原 著

ヒト正常口腔粘膜上皮におけるケラチンの発現状態の検討

神 部 芳 則 内 藤 浩 美 野 口 忠 秀
赤 坂 庸 子 矢 尾 板 英 夫*

抄録：ヒト正常粘膜上皮のうち舌背，歯肉，頬粘膜について9種類の抗ケラチンモノクローナル抗体（AE3, AE5, 903, No5/6, No4, No13, 4.62, CK1, PKK1）を用いてケラチン分子種の発現状態を検討した。その結果，AE3, AE5, 903を用いた場合は舌背，歯肉，頬粘膜の全層が染色されたが，他の抗体では部位によって染色像が異なった。ケラチン分子種の発現状態をまとめると舌背，歯肉，頬粘膜の3部位全てに発現していたのは角膜型ケラチンであった。これに加えて食道型ケラチンは舌背乳頭間上皮，歯肉，頬粘膜にみられ，表皮型ケラチンは舌背と歯肉で発現していた。また単層上皮型ケラチンは頬粘膜に発現していた。このようにケラチンの発現状態の部位による違いが観察された。これらの結果から口腔粘膜の分化様式は極めて複雑に，また高度に組織化されていることが示唆された。

キーワード：舌背粘膜，歯肉，頬粘膜，ケラチン，生物学的性状

緒 言

ケラチンは上皮細胞に特徴的なタンパクの一つであり，ケラチン中間線維として細胞骨格を構成して，細胞間の接着や形態形成に関与しているが，その分子種は現在21種が報告されており，それらの発現は分化の程度や増殖能とも深い関係があり，遺伝子レベルで厳密にコントロールされている¹⁻³⁾。これまで口腔粘膜におけるケラチンの発現状態については既にいくつかの報告⁴⁻⁷⁾があるが，これまでの報告は口腔粘膜疾患，前癌病変あるいは癌などの病態との関連や診断など，主に病理組織学的な立場から検討されたものである⁷⁾。これに対し，われわれは正常口腔粘膜上皮のケラチンの発現状態について部位別に比較し，他の上皮組織におけるケラチンの発現とも比較した。

口腔粘膜は部位によりその性状が大きく異なる⁸⁾。そこで，今回われわれは，正常口腔粘膜として，舌背，辺縁歯肉，頬粘膜の3部位についてケラチンの発現状態を検討した。そして，これまで報告されている各種上皮組織におけるケラチンの発現状態と比較し，それぞれの組織との類似点，相違点を明らかにし，ケラチンの発現状態を通しての口腔粘膜上皮の生物学的性状について考察した。

対象および方法

1. 対象

対象は20歳代から30歳代の健康なボランティアであり，本研究に対する同意を得た上で舌背，辺縁歯肉，頬粘膜について，それぞれ3名から採取した。2%キシロカイン8万倍エピネフリン添加の局所麻酔後，臨床的に病変を認めない粘膜上皮を切除した。

2. 方法

採取した組織は OCT Compound (Miles Inc. USA) に包埋後-80°Cで凍結，未固定のまま5 μ mの凍結切片を作成した。-20°Cメタノールで7分間固定後，一次抗体を加え室温で45分間反応させ，その後 phosphate buffered saline (PBS) で洗浄した。さらに二次抗体を45分間反応

表1 抗ケラチンモノクローナル抗体

一次抗体	会 社 名	ケラチン No.
AE 3	ICN Immuno Biologicals	Type II 1, 2, 4, 5, 6
AE 5	ICN Immuno Biologicals	3, 12
No. 4	Boehringer Mannheim	4
No. 5 / 6	Boehringer Mannheim	5, 6, (4)
No. 13	Boehringer Mannheim	13, (14, 17)
4. 62	Bio Makor	19
CK 1	DAKO	6, 18
903	ENZ	1, 5, 10, 11
PKK 1	Labsystems	8, 18, 19

() : 弱陽性反応

自治医科大学歯科口腔外科学講座（主任：赤坂庸子教授）

*自治医科大学皮膚科学講座（主任：矢尾板英夫教授）

〔受付：2月28日，1997，受理：5月14日，1997〕

表 2 口腔粘膜上皮におけるケラチンの発現

部位 \ 抗体	AE3	AE5	No. 4	No. 5/6	No. 13	4z62	CK1	903	PKK1
舌粘膜 (n = 3)									
乳頭部上皮									
角化層	+	+	-	+	-	-	-	+	-
有棘層									
上層	+	+	-	+	-	±	+	+	-
下層	+	+	-	+	-	±	+	+	-
基底層	+	+	-	+	-	±	+	+	-
乳頭間上皮									
角化層	+	+	-	+	-	-	-	+	-
有棘層									
上層	+	+	+	+	+	±	+	+	-
下層	+	+	+	+	+	±	+	+	-
基底層	+	+	-	+	+	±	+	+	-
歯肉 (n = 3)									
角化層	+	+	-	+	+	+	±	±	-
有棘層									
上層	+	+	+	+	+	±	+	+	-
下層	+	+	+	+	+	±	+	+	-
基底層	+	±	-	+	+	±	+	+	-
頬粘膜 (n = 3)									
中間層/表層	+	+	+	-	+	-	-	+	-
有棘層									
上層	+	+	+	±	+	-	±	+	-
舌層	+	+	+	±	+	-	±	+	-
基底層	+	+	-	±	+	+	+	+	+

させ、これらの資料を蛍光顕微鏡 (Nikon, Microphot F X 落射型蛍光顕微鏡) で観察した。使用したモノクローナル抗体は、一次抗体として抗ケラチン抗体 9 種類 (表 1)、二次抗体として FITC ラベルの抗マウス IgG ヤギ IgG あるいは抗ラット IgG ヤギ IgG を使用した。

判定は、一次抗体を作用させない資料を対照として、対照と比較して明らかに染色されている場合を陽性 (+)、同程度あるいは染色されていないものを陰性 (-)、わずかながら染色されていると思われるものを偽陽性 (±) とした。

結 果

AE3を用いた結果は、舌背、歯肉、頬粘膜ともに全層にわたって陽性を示した (表 2)。AE5の場合は歯肉では基底層のみ染色が弱く偽陽性であったが、有棘層、角化層は陽性を示した (写真 1)。舌背、頬粘膜はAE5で全層が染色された。No. 4は舌背の乳頭部上皮では全層が陰性であったのに対して、乳頭間上皮では基底層、角化層は陰性で

あったが、有棘層は陽性であった (写真 2)。No. 4による歯肉の染色では基底層、角化層が陰性で有棘層は陽性を示した。頬粘膜では基底層のみが陰性であり、有棘層から上層は全て陽性を示した (写真 3)。No. 5/6では舌背、歯肉の全層が染色されたが、頬粘膜は基底層、有棘層が弱く染色され偽陽性であり、中間層を含めてその上層は染色されなかった。No. 13は舌背の乳頭部上皮では全層が陰性であり、No. 4と類似した結果を示した。しかしながら No. 4と異なり舌の乳頭間上皮、歯肉、頬粘膜の基底層は陽性あるいは偽陽性を示した。4.62は舌背では乳頭部、乳頭間上皮ともに反応が弱く基底層、有棘層が偽陽性であったのに対し、歯肉では基底層が偽陽性で、有棘層、角化層は陽性であった。これに対し頬粘膜では基底層のみ陽性で、他は陰性であった (写真 4)。このように 4.62による染色結果は各組織で反応性が大きく異なった。CK1は舌背では角化層が陰性、基底層から有棘層にかけては陽性であった (写真 5)。歯肉では角化層は染色強度が弱く偽陽性であり、基底層、有棘層は陽性を示した (写真 6)。903では舌背乳

写真1 AE5による歯肉の免疫染色像
基底層は染色強度が弱く偽陽性であったが、有棘層、角化層は陽性であった (×40)。

写真3 No.4による頬粘膜の免疫染色像
基底層のみ陰性であり、有棘層、中間層、表層は陽性を示した (×100)。

写真2 No.4による舌背の免疫染色像
乳頭部上皮は全層にわたり陰性であったのに対し、乳頭間上皮では有棘層は陽性であった (×100)。

写真4 4.62による頬粘膜の免疫染色像
基底層のみ陽性を示し、有棘層、中間層、表層は陰性であった (×100)。

写真5 CK1による舌背の免疫染色像
基底層から有棘層にかけて陽性を示したが、角化層は陰性であった (×40)。

写真6 CK1による歯肉の免疫染色像
角化層は染色強度がやや弱く偽陽性であったが、基底層、有棘層は陽性を示した (×40)。

頭部上皮、乳頭間上皮、頬粘膜の全層が陽性を示したが、歯肉では角化層のみ偽陽性であり、基底層、有棘層は陽性であった。PKK1は頬粘膜の基底層とのみ反応し、他の部位は全て陰性であった。

考 察

ケラチンは上皮系細胞に特有のタンパクであり、現在21種類の分子種が知られ、それらは細胞の種類、分化の程度、増殖能などの因子によって発現が規定されている複雑なファミリーを形成している¹⁻³⁾が、組織型との比較から次の4種類に大別されている。すなわち(1)表皮型、(2)非角化扁平上皮型あるいは特殊型(3)単層上皮型および(4)全上皮型である¹⁾。表皮型のうち角化型ケラチンとしてK1, K10が、また全表皮型ケラチンとしてK5, K14があげられる。非角化扁平上皮型ケラチンはK4, K13である。また単層上皮型ケラチンはK8, K7, K18, K19である。

口腔粘膜上皮は部位により角化扁平上皮かあるいは非角化扁平上皮で構成されている。特殊粘膜に分類される舌背部上皮については、ケラチンおよび接着分子の発現状態を既に報告した⁹⁾。今回はさらに、咀嚼粘膜として歯肉、被覆粘膜として頬粘膜を選び、それぞれの上皮におけるケラチンの発現状態を検索した。その結果、部位によりケラチン

ン分子種の発現に違いがみられたので、既に報告されている他の上皮組織におけるケラチンの発現と比較し(表2, 表3), 生物学的性状について考察を加えた。

今回使用した抗ケラチンモノクローナル抗体の9種類の中で単一の分子種を認識するものはNo.4と4.62の2種類のみであり、他の抗体は複数の分子種に反応するものである。AE3はK1, K2, K4, K5, K6のII型ケラチンを認識する。AE3は全ての組織で陽性をしめした。No.4, No.5/6の染色結果からK4, K5, K6の発現が示唆されるため、表皮型ケラチンのマーカーとされるK1, K2がこれらの組織で発現しているかどうかを今回の結果のみからは明言できないが Sawaf ら¹⁰⁾ および Lonig ら⁶⁾ は歯肉や硬口蓋、舌背ではK1, K2の発現を報告している。これに加えて舌背部では毛髪型ケラチン(ハードケラチン)も発現していることを Douailly ら¹¹⁾ が報告している。AE5はK3, K12に反応する抗体である。K3, K12は非角化扁平上皮である角膜型上皮のマーカーとされる極めて特殊なケラチン分子種である。これまでの報告で、K3, K12の両方の発現は角膜のみであり、K12の微量発現が膀胱粘膜上皮で報告されている¹⁾。今回の結果では舌背、歯肉、頬粘膜の全てが陽性であった。K3, K12については Reibel ら⁴⁾ も同じAE5抗体を用いて口蓋、頬粘膜に発現していることを報告している。したがって口腔粘膜

表3 各種上皮におけるケラチンの発現

(北島康雄: 臨皮 43:218,1989, Moll R, et al.: Differentiation 23:174, 1982,
Nagle R. B. et al.: differentiation 30:138, 1985より引用)

ケラチン番号	中世—塩基性 (タイプII) ケラチン										酸性 (タイプI) ケラチン								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
分子量 (kd)	68	65.3	63	59	58	56	54	52.5	64	56.5	56	55	54	50	50	48	46	45	40
等電点 (pH)	7.8	7.8	7.5	7.3	7.4	7.8	6.0	6.1	5.4	5.3	5.3	4.9	5.1	5.3	4.9	5.1	5.1	5.7	5.2
分布																			
表皮 (胎児10週)				+	+			+					+	(+)	(+)		+	(+)	+
(胎児13週)	(+)			+	+	(+)		+			(+)		+	(+)	(+)		+	(+)	+
(胎児20週)	+				+	(+)		(+)		+	+			+	(+)		+		(+)
(胎児24週)	+				+	(+)		(+)		+	+			+	(+)		+		(+)
(胎児39週)	+				+	+				+	+			+	+	(+)	(+)		
(成人)	+	(+)			+					+	+			+	(+)				
足底表皮	+	(+)			+	+			+	+	+			+		+			+
アポクリン汗腺				+	+		+	+					(+)	+			(+)	(+)	(+)
エクリン汗腺					+	+	+	+						+	+		(+)	+	+
皮脂腺				+	+	+				(+)	(+)			+	(+)		(+)		
外毛根鞘					+	+								+	(+)	+	+		
角膜			+		+							+							
口腔咽頭				+	+	(+)							+	+	(+)				(+)
咽頭蓋				+	+		(+)	+					+	(+)	(+)		+	(+)	(+)
声帯 (パターン1)				(+)	+	+							+	+		(+)	+		(+)
声帯 (パターン2)				+	+	(+)							+	+	(+)				(+)
咽頭室					+		(+)	+					(+)	(+)	(+)		+	(+)	+
食道粘膜				+	+	(+)							+	(+)	(+)	(+)	(+)		(+)
気管粘膜					+	(+)	(+)	+					+	(+)	+		+	(+)	+
膀胱移行上皮					(+)		+	+				(+)						(+)	+
小腸粘膜								+										+	+

(+)は弱陽性反応

上皮には角膜型ケラチン分子種も発現しており、口腔粘膜上皮は角膜に類似した分化様式を有していることが示唆される。No. 4はK 4単一種を認識する抗体である。K 4はK13のペアケラチンであり、非角化扁平上皮ケラチンに分類され、食道型上皮のマーカーである¹²⁾。K 4, K13は食道粘膜の他に胎児の表皮、咽頭、喉頭、声帯、肛門、膀胱、膈上皮にも発現しており、非角化扁平上皮、移行上皮などいわゆる開口部粘膜に共通したケラチン分子と考えられる。舌背の乳頭間上皮、歯肉、頬粘膜はK 4, K13を発現し基本的には食道型上皮の性質を有しているものと考えられた。しかし、舌背部の乳頭部上皮は全層にわたりK 4, K13を発現しておらず、乳頭部上皮は明らかに他の部位とは異なった上皮細胞群から構成されていると考えられる。No. 4の染色結果に比べNo. 13での染色陽性部位が多いのはNo. 13がK13の他にK14, K17とも弱い交叉反応を示すことが原因と思われた。No. 5/6はII型ケラチンであるK 4, K 5, K 6と反応する抗体である。角化の程度の

低い頬粘膜では反応が弱い傾向を認めたが、K 5はK14とともに小腸粘膜を除く全ての上皮組織で発現が確認されている分子種で、全表皮型ケラチンに分類されている上皮細胞に普遍的なケラチンである。4.62はK19のみと反応する抗体で、K19はK 8, K 7, K18とともに単層上皮型上皮のマーカーである。K19は胎児の表皮、咽頭、気管粘膜、膀胱移行上皮、小腸粘膜、汗腺、肝細胞、内分泌腺などに発現している^{13,14)}。今回の結果で、舌背部、歯肉、頬粘膜の基底層にK19の発現が示唆された。しかしK 8, K18, K19を認識する PKK1では舌背、歯肉が陰性であったことから、その発現の確認には他の抗体や二次元電気泳動などによる検討が必要である。4.62とPKK1で共に陽性を示したのは頬粘膜の基底層であり、頬粘膜基底層と単層上皮との類似性が示唆された。

以上をまとめると、口腔粘膜全体に共通なのは角膜型ケラチンであり、舌背および歯肉には表皮型ケラチンが発現し、これに加えて舌背部乳頭上皮では毛髪型、乳頭間上

表 4 口腔粘膜上皮の各部位におけるケラチン型

部位	表皮型		非角化扁平上皮型		単層上皮型	毛髪型 ¹¹⁾
	角化型 ^{6,10)}	全表皮型	食道型	角膜型		
舌粘膜						
乳頭部上皮	+	+	—	+	—	+
乳頭間上皮	+	+	+	+	—	—
歯肉	+	+	+	+	—	—
頬粘膜	—	±	+	+	+	—

皮、歯肉、頬粘膜では食道型ケラチンを発現していた（表 4）。頬粘膜では単層上皮型ケラチンを発現しており、これらの上皮に類似した分化形態、性状を有しているものと思われた。このように口腔粘膜上皮は部位によりケラチンの発現状態に差があり、さらに各部位におけるケラチンの発現状態も極めて多彩であった。このような部位によるケラチン発現の違いについて、森⁷⁾は発生母鰓弓の違いによるものと考えを示しているが、それだけでは説明が付かず、口腔粘膜上皮は非角化扁平上皮の性状を基本とし極めて複雑に、また高度に組織化された分化様式を示し、この問題の解決には遺伝子レベルでの詳細な研究が必要であると考える。

結 語

ヒト正常口腔粘膜上皮のうち舌背、歯肉、頬粘膜について、9種類の抗ケラチンモノクローナル抗体を用いてケラチン分子種の発現状態を検討した。その結果、

- ① AE3, AE5, 903では舌背、歯肉、頬粘膜の全層が陽性であった。
- ② No. 5/6では舌背、歯肉の全層が染色されたが頬粘膜は反応が弱く中間層以上は陰性であった。
- ③ No4, No13では舌背部乳頭間上皮、歯肉、頬粘膜の有棘層、中間層が染色されたが、乳頭部上皮では全層が陰性であった。
- ④ 4.62では歯肉の有棘層、角化層、頬粘膜の基底層が陽性で、舌背は反応が弱く、部位により染色性が異なった。
- ⑤ CK1は舌背では角化層が陰性、歯肉では角化層が偽陽性、頬粘膜では有棘層が偽陽性、中間層が陰性でありその他の部位は陽性であった。
- ⑥ PKK1では頬粘膜の基底層のみが陽性を示した。

以上の結果から3部位に共通なのは角膜型ケラチンであり、その他に舌背、歯肉には表皮型ケラチンをまた舌背部乳頭間上皮、歯肉、頬粘膜には食道型ケラチンを発現し、さらに頬粘膜では単層上皮型ケラチンも発現していた。こ

のように、ケラチンの発現状態は口腔粘膜の部位により大きく異なり、口腔粘膜の分化様式は極めて複雑に、また高度に組織化されていると考えられた。

文 献

- 1) 北島康雄：中間径フィラメントの基礎と腫瘍診断。臨皮，43：217-225，1989。
- 2) 衛藤 光：ケラチン。皮膚臨床，28：特26：985-995，1986。
- 3) 麻生和雄：角層ケラチンとその発現異常病態：西日皮膚，49：871-876，1987。
- 4) Bosh, F.X., Ouhayoun, J.P., Bader, B.L. et al.: Extensive changes in cytokeratin patterns in pathologically affected human gingiva. Virchows Archiv B, 58：59-77，1989。
- 5) Mori, M., Nakai, M., Hyun, K-H. et al.: Distribution of keratin proteins in neoplastic and tumor-like lesions of squamous epithelium. An immunohistochemical study. Oral Surg., 59：63-69，1985。
- 6) Loning, T., Staquet, M-J., Thivolet, J. et al.: Keratin polypeptides distribution in normal and diseased human epidermis and oral mucosa. Virchows Archiv A. Path. Anat. and Histol., 388：273-288，1980。
- 7) 森 昌彦：口腔領域病変の上皮性病変に対する免疫組織化学の応用。日口誌，4：1-23，1991。
- 8) 上松博子，中島 功：口腔粘膜の構造。歯科ジャーナル，32：133-141，1990。
- 9) 古谷野浩美，神部芳則，野口忠秀，他：ヒト正常舌背部粘膜上皮におけるケラチンおよび接着分子の発現状態。日口誌，44：596-602，1995。
- 10) Sawaf, M.H., Ouhayoun, J.P., Shabana, A.H.M. et al.: Cytokeratin expression in human tongue epithelium. Am. J. Anat., 189：155-166，1990。
- 11) Douailly, D., Xu, C. et al.: Expression of hair related keratins in a soft epithelium. Exp. Cell Res., 181：141-158，1989。
- 12) Van Muijen, G.N.P., Ruiter, D.J., Franke, W.N., et al.: Cell type heterogeneity of cytokeratin expression in complex epithelia and carcinoma as demonstrated by monoclonal antibodies specific for cytokeratins Nos. 4 and 13. Exp. Cell Res., 162：97-113，1986。
- 13) Nagle, R.B., Moll, R., Weidauer, H. et al.: Different patterns of cytokeratin expression in the normal epithe-

- lia of the upper respiratory tract. *Differentiation*, 30 : 130-140, 1985.
- 14) Moll, R., Moll, I. and Wiest, W. : Changes in the pattern of cytokeratin polypeptides in epidermis and hair follicles during skin development in human fetuses. *Differentiation*, 23 : 170-178, 1982.
- 別刷請求先：神部芳則 〒329-04 栃木県河内郡南河内町薬師寺 3311-1
自治医科大学歯科口腔外科学講座

Study on Expression Pattern of Cytokeratins in Human Normal Oral Mucosa

Yoshinori JINBU, Hiromi NAITO,
Tadahide NOGUCHI, Yoko AKASAKA and Hideo YAOITA*

Department of Dentistry and Oral Surgery, Jichi Medical School

(Chief : Prof. Yoko AKASAKA)

Department of Dermatology, Jichi Medical School

(Chief : Prof. Hideo YAOITA)

J. Jpn. Oral Muc. Membr., 3 : 19~26, 1997

Abstract : The expression pattern of cytokeratins in human normal tongue dorsal mucosa, gingiva, and buccal mucosa was examined immunohistochemically with 9 kinds of anti-keratin monoclonal antibodies (AE3, AE5, 903, No5/6, N.4, No13, 4.62, CK1, PKK1). All layers of tongue dorsal mucosa, gingiva, and buccal mucosa were positively stained with AE3, AE5, and 903. However, the staining pattern with other monoclonal antibodies varied due to the site in the oral cavity. The corneal type of keratin was detected in all oral mucosa, and the esophageal type was observed in interpapillary mucosa of the tongue dorsum, gingiva and buccal mucosa. The skin type was detected in tongue dorsal mucosa and gingiva, and the simple epithelial type was detected in buccal mucosa. As described above, the expression of cytokeratins was significantly different depending on the sites. These results suggested that the differentiation of oral mucosa must be controlled by extremely complicated and highly organized processes.

Key words : tongue dorsal mucosa, gingiva, buccal mucosa, cytokeratin, biological features

Reprint requests to Yoshinori JINBU, Department of Dentistry and Oral Surgery, Jichi Medical School, 3311-1, Yakushiji, Minamikawachi-Machi, Kawachi-gun, Tochigi 329-04, Japan.

[Received February 28, 1997: Accepted May 14, 1997]