原 著

口腔粘膜上皮の角化様式に関する レクチン組織化学的研究

横 山 滋 大 野 純

明海大学歯学部口腔病理学講座（主任：内海順夫教授）

〔受付：平成5年2月5日〕

Lectin histochemistry of the keratinization patterns of human oral epithelia

Shigeru Yokoyama and Jun Ohno

*Department of Oral Pathology, Meikai University School of Dentistry,
Sakado, Saitama 350-02, Japan
(Director : Prof. Nobuo Utsumi)*

〔Accepted for publication : February 5, 1993〕

Key words : human oral epithelia/lectins/histochemistry/keratinization

Abstract : Changes in the distribution of surface glycoconjugates of human oral mucosa epithelial cells in response to the degree of keratinization can be determined by lectin histochemistry. Paraffin blocks of normal human oral mucosa (gingiva, palate, and buccal mucosa) were sectioned at 4 μ m and were reacted with five biotinylated lectins (RCA-1, PNA, UEA-1, SBA, and DBA), followed by peroxidase-labeled avidin. The oral epithelia were divided into (a) non-keratinized, (b) para-keratinized, and (c) ortho-keratinized types by both H&E staining and by the Pauly reaction. In both non- and ortho-keratinized epithelia, lectin-binding patterns were similar to those shown in the epidermis of the skin. However, the glycoconjugate expression of epithelial cells in the para-keratinized type differed from that of the epidermal type. PNA Staining, observed on the surface of spinous cells in the epidermis, was not detected in the cells of the thickened para-keratinized layers and was also completely absent in the hyper-parakeratotic condition. DBA binding, on the other hand, was not evident in any epidermal cells of skin and epithelial cells of non- and ortho-keratinized mucosa, but was detectable on the surface of the differentiated cells. These findings indicate that in the human oral epithelia the expression of cell-surface glycoconjugates corresponds to the degree of keratinization. Particularly, the change in both PNA and DBA binding is a unique phenomenon for the para-keratinization process.

緒 言

口腔粘膜は、外部刺激あるいは微生物侵入に対する防御層の形式および痛覚、触覚、温度覚あるいは味覚などの外部情報の伝達器官として機能している¹⁾。粘膜防御機構は、粘膜層の最外層を被覆する重層扁平上皮がバリアーとなり司っている。重層扁平上皮は皮膚、爪や毛包などの皮膚付属器官および口腔、咽頭、食道あるいは膣などの粘膜組織の被覆上皮として認められるが、各部の上皮層を構成する上皮細胞（ケラチノサイト）の分化あるいは成熟様式にそれぞれの特徴を示す。特に、各部上皮層の最外表層部である角化層と呼ばれる上皮細胞の最終分化過程に違いがみられる。すなわち、皮膚の表皮でみられる正角化、毛包の外毛根鞘でみられる毛包型角化（トリキレンマル・ケラチニゼーション）および食道などの粘膜でみられる錯角化などの最終分化様式（角化様式）がある²⁾。一方、口腔粘膜上皮の角化様式は錯角化を呈する粘膜型のものが多くみられるが、実際の病理検査などでは、複雑な角化様式の混在することが知られている。

角化現象解明の組織化学的アプローチは、サイトケラチン抗体を用いて、上皮層内での分化度の異なる上皮細胞間あるいは角化様式の異なる上皮型間でのサブセット認識の免疫組織化学的比較が、現在のところ主流となっている³⁻⁶⁾。また、表皮型上皮では、表皮型角化の形態学的特徴である顆粒層内に存在するケラトヒアリン顆粒の構成タンパクであるフィラグリン（ヒスチジン・リッチ・プロテイン）の局在様式を抗体を用いた免疫染色^{7,8)}および同タンパクが、ヒスチジンを豊富に含有するという特性から組織化学的にヒスチジンを検出するポーリー反応を応用して、顆粒層および正角化層での同タンパクを組織化学的に識別する試み⁹⁾などがある。

一方、細胞内タンパクの推移以外に、上皮細胞の分化過程研究で注目されているものに、細胞表面複合多糖がある。一般に、複合多糖の解析にはレクチンが用いられている。レクチンと細胞表面糖鎖との結合性は、組織化学に広く応用され、数

多くの有意義な結果が報告されている^{10,11)}。特に、表皮切片あるいは表皮培養細胞でのレクチン組織化学的検索により、表皮細胞の分化に伴い細胞表面糖鎖の局在様式が変化することが明らかにされた¹²⁻¹⁴⁾。また、毛包の外毛根鞘細胞では表皮細胞層で検出されない糖鎖構造が、細胞が分化するにつれ出現するという興味深い報告がある¹⁵⁾。すなわち、これらの報告は、角化様式と表皮細胞表面糖鎖構造に何らかの関連性があることを示唆するものである。しかしながら、口腔粘膜上皮におけるレクチン組織化学的検索¹⁶⁻²⁰⁾は、表皮あるいは毛包のように分化度と細胞表面糖鎖構造に一定の相関性が得られていない。このことは、口腔粘膜上皮の多様な最終分化様式に着眼しなかったためと思われる。

そこで、本研究では口腔粘膜上皮の分化様式の特異性を明らかにする目的で、(1)口腔粘膜上皮の角化様式を組織学的および組織化学的に分類し、(2)上皮細胞表面糖鎖構造の局在様式と角化程度の相関性をレクチン組織化学的に検索し、表皮型および毛包型のものと比較検討した。

材料と方法

1. 研究材料

肉眼的に明らかな病変を伴わない健全と思われるヒト頭皮(男4例, 女1例; 56~67歳, 平均62.8歳), 手掌(男3例, 女2例; 22~58歳, 平均34.2歳)および歯肉(男2例, 女3例; 14~42歳, 平均30.4歳), 舌(男3例, 女2例; 18~55歳, 平均35歳), 口腔底(男1例, 女4例; 12~44歳, 平均27.6歳), 頬(男3例, 女2例; 31~58歳, 平均43.7歳), 口蓋(男4例, 女1例; 35~61歳, 平均46.2歳)からの口腔粘膜をそれぞれ5例を研究材料として用いた。

2. 研究方法

1) 切片標本作成

採取した試料は10%中性ホルマリン液にて、1日間固定した。その後、通法に従い、上昇系エタノールにて脱水し、パラフィン包埋を行い、3~5 μm の連続切片を作成した。

2) 染色方法

Table 1 Lectins used in this study

Lectins	Sugar residues
PNA (<i>Arachis hypogaea</i>)	D-Gal β 1-3GalNAc
RCA-I (<i>Recinus communis</i>)	D-Gal
SBA (<i>Glycine max</i>)	α GalNAc1-3Gal
DBA (<i>Dolichos biflorus</i>)	α GalNAc1-3GalNAc
UEA-I (<i>Ulex europaeus</i>)	α L-Fuc
D-Man, D-mannose : GalNAc, N-acetyl-D-galactosamine : NANA, N-acetyl neuraminic acid ; D-Gal, D-galactose : Fuc, L-fucose	

(1) 一般染色

切片標本の染色は一般染色としてヘマトキシリン・エオジン (H・E) 染色を施し、角化状態の組織学的分類に用いた。

(2) ポーリー反応

組織内のヒスチジンを組織学的に検出する目的でポーリー反応を施した。染色法としては、Reaven と Cox (1965)⁹⁾ の方法を応用した。すなわち、脱パラ切片を 1% スルファニル酸および 5% 亜硝酸ナトリウム溶液に 15 分間浸漬した後、同液に 20% 炭酸カルシウムを添加し 4 分間反応させた。最後に、70% エタノールを反応液に混合し、2 分間反応させ染色を終了した。ヒスチジンを含有する組織・細胞は赤色の陽性反応を示す。対照染色としては、2 mM 硫酸亜鉛溶液にて切片を前処理した後、ポーリー反応を施した。

(3) レクチン染色

本研究の主題である上皮細胞表面糖あるいは糖鎖の局在所見を得るために、RCA-I, PNA, UEA-I, SBA および DBA (E. Y. Lab., U. S. A.) の 5 種類のレクチンを用いた。各レクチンの糖鎖構造特異性については、Table 1 に示すとおりである。また、染色法は、従来より本教室で応用しているアビジン-ビオチン法によった^{15,21)}。簡単に染色法を記載すれば、内因性ペルオキシダーゼ阻止のために、脱パラ切片を 1% H₂O₂ に 10 分間浸漬させた。10 mM リン酸緩衝食塩水 (PBS, pH7.4) にて洗浄後、非特異的な染色性を押える目的で、1% 仔ウシ血清-PBS と 10 分間反応させた。洗浄をせずに、各種ビオチン化レクチン (10~25 μ g/ml) と室温で 30 分間反応させた。PBS 洗浄後、アビジン-ペルオキシダーゼあるいはアルカリフォス

ファターゼ溶液と 30 分間反応させた。ついで、diaminobenzidine (DAB) 液あるいはアルカリフォスファターゼ基質溶液に 5 分間浸漬させることにより反応物を発色させた。核染色としてはヘマトキシリンまたはメチルグリーンを用いた。その後、通法に従い、上昇系エタノールで脱水、キシロールで透徹し、パーマウントにて封入した。対照染色としては、各レクチンに対する特異糖 (Table 1) を阻害糖として、0.2 M の濃度でレクチン液に混合し染色を行った。

なお、標本の観察はニコン OPTIPHOT (日本光学) により行った。

結 果

1. ヘマトキシリン・エオジン染色による各角化様式の組織学的所見

1) 皮膚：本研究で用いた皮膚試料の頭皮 (菲薄型表皮) および手掌 (肥厚型表皮) とともに、表皮層の厚さに違いはみられたが、基本的な組織学的所見は同様であった。すなわち、手掌では表皮最外層はエオジンに淡染される核の消失した非常に厚い、頭皮では比較的薄い正角化層がみられた。正角化層の下部は、ヘマトキシリンに濃染されるケラトヒアリン顆粒を含有する顆粒層が著明であった。

2) 毛包の外毛根鞘：皮脂腺開口部直下の毛包峽部に、エオジンに濃染される均一無構造の毛包型角化 (トリキレンマル・ケラチニゼーション) を認めた。角化層は波状の形態を呈する傾向にあった。しかしながら、毛包型角化においては、表皮型角化上皮でみられる顆粒層は存在しなかった。

3) 口腔粘膜上皮：上皮は角化程度により、以下の 4 種類に分類された。

(1) 非角化型上皮：本検索においては、頬粘膜および口腔底にのみ認められた。上皮層は、他の口腔粘膜上皮型のものよりも厚く、上皮最外層に核を有する上皮細胞が認められ、角化現象はみられなかった (Fig. 1a)。

(2) 錯角化型上皮：検索した部位すべての口腔粘膜で、このタイプのものが認められた。非角化

Fig. 3 Diagrammatic representation of lectin bindings in the thin epidermis from scalp.

型と同様に、著明な顆粒層はみられないが、上皮最外層は扁平な核を有する錯角化層を認めた (Fig. 1b)。

(3) 正角化型上皮：このタイプのものは、硬口蓋および一部の歯肉粘膜でみられた。組織学的には皮膚表皮の正角化と全く同様の角化状態を示した (Fig. 1c)。

(4) 錯角化と正角化の混合型上皮：このタイプがみられる粘膜上皮は非常に少なく、本検索では歯肉粘膜にのみ認められた。錯角化部および正角化部ともに、組織学的には前述したそれぞれの特徴を示したが、両者の位置関係を対比すると、錯角化層が正角化部の顆粒層の位置に相当し、正角化層は錯角化層より外層に位置して認められる傾向にあった (Fig. 1d)。

2. 各角化様式でのポーリー反応結果

ポーリー反応の結果は、それぞれの重層扁平上皮での角化程度を反映するものであった。すなわち、頭皮および手掌の皮膚と正角化型口腔粘膜上皮において、顆粒細胞内のケラトヒアリン顆粒および正角化層が赤色の強陽性反応を示した (Fig. 2a)。その他の毛包表皮と非角化および錯角化型口腔粘膜上皮においては、角化部あるいは上皮最外層部ともに陽性所見は得られなかった。一方、錯角化および正角化混合型の口腔粘膜上皮では、正角化部の顆粒細胞および角化層で赤色の陽性反応を示した (Fig. 2b)。

対照染色として行った硫酸亜鉛前処理のポーリー反応染色では、すべての切片において陽性所

見はみられなかった。

3. レクチン染色結果

1) 皮膚

(1) 菲薄型表皮：頭皮表皮において、RCA-I が顆粒細胞の最上部および正角化層を除くすべての表皮細胞表面に染色性を認めた。PNA は基底細胞直上の棘細胞から顆粒細胞にまで染色性を示した。また、UEA-I と SBA の反応性は、棘細胞層最上部から顆粒細胞に局限していた。一方、DBA はすべての表皮細胞において、染色性はみられなかった。これらの所見の総括は Fig. 3 に示した。

(2) 肥厚型表皮：手掌における各種レクチンの反応性の総括を Fig. 4 に示した。基本的な染色性は菲薄型のもと同様であるが、UEA-I および SBA の染色性が、顆粒細胞から棘細胞中央部にかけてみられる傾向にあった。

2) 毛包の外毛根鞘：毛包型角化を示す外毛根鞘でのレクチン結合様式は、Ohno ら¹⁵⁾の報告と同様に、DBA 染色性を除いて、表皮型のものとはほぼ類似していた。すなわち、RCA-I は基底細胞から角化部直下の毛包細胞まで染色性がみられ、PNA では基底細胞と角化部を除く毛包細胞に陽性所見がみられた。また、UEA-I および SBA の染色性に関しても、角化部直下の成熟度の進んだ細胞にのみ反応を認めた。しかしながら、表皮では染色性が全く検出されなかった DBA の反応が、毛包型角化直下の成熟度の高い細胞にみられた。

3) 口腔粘膜上皮

Fig. 4 Diagrammatic representation of lectin bindings in the thick epidermis from human palm.

Fig. 5 Diagrammatic representation of lectin bindings in the non-keratinized oral epithelium.

角化の4つのタイプ別による口腔粘膜上皮におけるレクチン染色結果において、混合型口腔粘膜上皮の錯角化部および正角化部上皮の染色性は、単独の錯角化型口腔粘膜上皮および正角化型口腔粘膜上皮での結果と同様であった。したがって、(1)非角化型口腔粘膜上皮と(2)錯角化および正角化の混合型口腔粘膜上皮の2項目として記載する。

(1) 非角化型上皮：レクチン結合様式の総括は

Fig. 5に示した。RCA-Iはすべての上皮細胞の細胞表面に染色性を認めた。

UEA-IおよびSBAの染色性は、棘細胞層から最外層までを占める扁平な細胞からなる層(SU層)の中央部にかけて認められ、肥厚型表皮での所見と類似していた。また、PNAは、一部の基底細胞で染色性がみられたが、基本的には棘細胞からSU層下部の上皮細胞で著明な陽性反応を認めた。一方、DBAの染色性は全く認められなかつ

LECTIN BINDINGS IN THE PARA- OR ORTHO-KERATINIZED EPITHELIUM FROM HUMAN GINGIVA

Fig. 6 Diagrammatic representation of lectin bindings in the para- or ortho-keratinized oral epithelium.

た。

(2) 混合型上皮：錯角化および正角化の混在する上皮におけるレクチン染色性の総括は Fig. 6 に示した。

a) 錯角化と正角化上皮で染色性に変化が認められないレクチン群：このグループのレクチンは、RCA-I, UEA-I および SBA であった。RCA-I の染色性は表皮型でみられたように、基底細胞から顆粒細胞の細胞表面に認められた (Fig. 7a)。また、UEA-I および SBA も棘細胞中央部から顆粒細胞にかけて、著明な反応性を示した (Fig. 7b, c)。

b) 錯角化と正角化上皮との間で染色性に変化がみられたレクチン群：PNA と DBA がこのレクチンに属するレクチンで、両者の染色性は全く相反するものであった。すなわち、PNA の染色性は、正角化部上皮層では、表皮型でみられた所見と同様に、棘細胞から顆粒細胞層下部の上皮細胞に強く認められたが、錯角化上皮に移行すると、その染色性は消失した (Fig. 7d)。一方、DBA に関しては、PNA の所見とは異なり、正角化部上皮

では全く反応性を示さなかったが、錯角化上皮に移行し錯角化層が肥厚するにつれ、成熟度の進んだ上皮細胞の細胞表面に明らかな染色性を認めるようになった (Fig. 7e)。

錯角化過程での PNA の染色性の変化を Fig. 8a-d に示した。すなわち、非角化上皮では基底細胞直上から上部の上皮細胞で明らかな PNA 陽性反応を認めた (Fig. 8a)。しかし、最表層部細胞に角化現象が出現すると、上皮層の上部に存在する成熟度の進んだ細胞表面での染色性は消失した (Fig. 8b)。そして、組織学的に錯角化層がみられるようになると、基底細胞直上部の棘細胞にのみ染色性を認めた (Fig. 8c)。さらに、錯角化がやや亢進した状態を呈したものでは、上皮細胞での PNA 染色性は完全に消失した (Fig. 8d)。

なお、対照染色により、すべてのレクチン染色が陰性になったことから、各レクチンと糖鎖構造の結合性が特異的であることが確認された。

考 察

本研究で材料として用いた皮膚（頭皮および手掌）、毛包の外毛根鞘および各部の口腔粘膜は、すべて組織学的に重層扁平上皮により外層部を被覆されている。上皮層は、細胞学的にケラチン・タンパクを豊富に含有するケラチノサイトより構成され^{22,23)}、基底細胞層での分裂により、分化を開始する。基底細胞の形態は、皮膚表皮、外毛根鞘表皮および口腔粘膜上皮ともに類似するが、ヘマトキシリン・エオジン染色所見からも明らかに、各上皮はそれぞれ特徴的な最終分化様式（角化様式）を示す。つまり、各上皮は形態学的に同一と考えられる基底細胞から分化を始め、最終的には組織特異性の角化様式を示すという生物学的に興味深い特徴をもつ。分化様式の組織特異性については、次のように説明されている。すなわち、1) 基底細胞は形態学的には酷似しているが、各上皮層の基底細胞は、それぞれ独自の分化方向性すなわち、その組織に特異的な角化様式のプロプログラムをもつとする *intrinsic divergence* 説²⁾と、2) 各上皮の基底細胞は同一化能をもち、それぞれの上皮が存在する部位あるいはその部位での環境、例えば上皮下結合組織の形状あるいは湿潤状態などにより修飾を受け、それぞれ異なる角化様式を呈するとする *external modulation* 説²⁴⁻²⁶⁾の2つの仮説がある。特に、口腔粘膜上皮の最終分化様式は、皮膚表皮あるいは毛包の外毛根鞘細胞に比べ、さらに多様化を示すことから、複雑な角化メカニズムの解明に有用な材料である。本研究は各角化型上皮でのレクチン結合様式を比較検討し、口腔粘膜上皮における角化機構の解明を細胞表面糖鎖構造の変化から探究を試みたものである。

1. 角化程度の形態学的ならびに組織化学的判定

本研究で用いた各組織の重層扁平上皮は、上皮最表層の組織学的特徴により、以下のように分類される。顆粒層の存在を認め、同層より分化が進むと、核が消失し細胞質がケラチン化した角質層（正角化）をもつ皮膚表皮、毛包型角化を呈する毛包の外毛根鞘細胞、皮膚表皮と同様に脱核現象を

示す正角化型口腔粘膜上皮と、最表層部に依然として核の残存を認める非角化型口腔粘膜上皮および錯角化型口腔粘膜上皮に分けられる。しかし、非角化型は角膜上皮などと同様に、最表層部で、細胞の扁平化とエオジン好染性などの角化としての組織学的特徴を示さず分化を終了する上皮である。したがって、本研究での上皮は非角化性上皮（非角化型口腔粘膜上皮）と角化性上皮に大別される。角化性上皮は、形態学的特徴から、(1) 皮膚表皮でみられる正角化、(2) 毛包の外毛根鞘でみられる毛包型角化（トリキレンマル・ケラチニゼーション）および(3) 食道などの粘膜などでみられる錯角化の3種類が一般的とされている²⁾。しかしながら、口腔粘膜上皮は、多様な角化様式を示すため、本研究では、さらに細かい分類を試み、(a) 錯角化型、(b) 正角化型および(c) 錯角化型と正角化の混在型とした。正角化型口腔粘膜上皮では、その他の口腔粘膜上皮ではみられない顆粒細胞層を角質層直下で認めた。同細胞層は、細胞質内にケラトヒアリン顆粒を含有し、代謝活動の活発な表皮細胞（棘細胞および基底細胞）と脱核した角質細胞との移行部にあり、組織学的にも角化層形成に関与することが示唆される。ケラトヒアリン顆粒は、ヒスチジンを豊富に含有するフィラグリン・タンパクより構成されている^{7,8)}。同タンパクの抗体を用いた免疫組織化学的検索から、フィラグリンが皮膚表皮の顆粒層および角質層の下層部に局在することが明らかとなったが²⁷⁾、毛包および正角化上皮を除く口腔粘膜上皮には、本抗体が反応しないことが知られている²⁸⁾。フィラグリン抗体の局在部位は、本研究でのボーリー反応の陽性部位と一致した。このことから、ボーリー反応の陽性部位で検出されたヒスチジンは、顆粒層および角質層下部に存在するフィラグリン・タンパク内に含有されるヒスチジンであることが強く示唆される。すなわち、ボーリー反応は、間接的ではあるが、組織化学的にフィラグリン・タンパクの局在を示しているものと考ええる。同タンパクの生理学的機能は、角質層でケラチン・フィラメントに付着して、角化完了の指標とされているケラチン・パターンと呼ばれる複合体を形成することが知られている^{29,30)}。したがって、形態学的にケラ

トヒアリン顆粒の存在とポーリー反応陽性所見の確認が、本研究での表皮型角化の組織化学的指標であると考えられる。このことから、以上の2点が証明できた正角化型口腔粘膜上皮は、皮膚表皮と同様の分化過程を示しているものといえる。

2. 各角化様式におけるレクチン結合様式

本研究で使用したレクチンのうち、UEA-I, SBA および RCA-I は角化様式に影響されずに、それぞれ一定の反応性を示した。すなわち、RCA-I は角質細胞以外の代謝活動を保持するすべての上皮細胞に反応した。また、UEA-I と SBA は比較的分化の進んだ上皮細胞表面に反応性を認めた。すなわち、Fuc および α GalNAc1-3Gal の糖鎖構造は、上皮分化に伴い上皮細胞の細胞表面糖鎖構造に付加されるものと考えられる。同糖鎖構造と上皮分化との相関関係は、皮膚表皮および分化誘導した培養ケラチノサイトを用いたレクチン組織化学的検索においても推測されている^{13,14)}。また、機械的刺激により実験的に皮膚水疱を形成し、その治癒過程での表皮細胞糖鎖構造の変化に関する研究では、Fuc および α GalNAc1-3Gal は RCA-I より結合する糖鎖構造の末端に付加される可能性が示唆されている²¹⁾。また、各レクチンに共通した所見として、角質層におけるレクチン反応性の消失があげられる。すなわち、非角化上皮性口腔粘膜上皮においては、上皮全層の細胞に染色性を示すレクチンはみられたが、角化性口腔粘膜上皮の角質層では、角化程度に関係なく染色性を示すレクチンは認められなかった。角化に伴うレクチン反応性の消失に関する解釈の1つとして、角化時の細胞形態学的変化が考えられる。上皮細胞の角化に伴う微細構造の代表的な変化として、細胞膜の肥厚と membrane-coating granule (MCG) の細胞間への放出がある³¹⁾。したがって、これらの細胞膜に関連した形態学的変化により、細胞表面糖鎖の三次元立体構造が修飾され、レクチン認識部位の変化が推測される。さらに、Neumanic ら (1983)¹⁹⁾ が示唆しているように、顆粒細胞層にグリコシダーゼが存在し、この酵素により糖鎖構造が切断されるためレクチン結合糖鎖が消失してしまう可能性も示唆される。

次に、各角化型上皮でのレクチン結合様式につ

いて述べると、皮膚は、従来より報告されているレクチン結合パターン¹²⁻¹⁴⁾を示した。すなわち、前述した角化様式に影響されない RCA-I, SBA および UEA-I の染色パターンに加え、棘細胞層から顆粒層下部で PNA 染色性を示すことである。しかし、毛包型上皮においては、この基本型結合様式に特有のレクチン結合様式が加わる複雑なものであった。毛包型角化様式を示す外毛根鞘表皮細胞では、表皮でみられるように分化した表皮細胞に UEA-I および SBA の結合性を示す以外に、表皮では染色性を認めなかった DBA 結合性が毛包型角化 (トリキレンマル・ケラチニゼーション) 直下の表皮細胞に認めた。このことを糖鎖構造から考察すれば、毛包型分化には表皮型 (正角化型) でみられた Fuc および α GalNAc1-3Gal の糖鎖構造以外に、DBA で認識される GalNAc1-3GalNAc の付加が必須であることを示唆している。このことは、Ohno ら (1990)¹⁵⁾ も同様な考察を行っている。

一方、口腔粘膜上皮では、正角化型では表皮細胞でのレクチン結合様式と全く同じであり、前述のポーリー反応性をも含めて考えれば、正角化型口腔粘膜上皮は形態学的だけでなく、組織化学的にも表皮型の正角化と同一であることが証明されたことになる。なぜ、口腔粘膜上皮に正角化型が出現するのかは、本研究から明らかにすることはできないが、同一切片で錯角化と正角化をみる上皮がみられることを考えると、角化様式を制御すると思われる組織特異性^{2,24-26)}以外の要素が、関与している可能性が示唆される。また、錯角化型口腔粘膜上皮の分化様式に関連する糖鎖構造の変化は、毛包型をさらに複雑にしたものである。すなわち、表皮あるいは毛包細胞で変化のみられなかった PNA の染色性が、錯角化現象とともに減弱あるいは消失することと、PNA の消失とは逆に、DBA の反応性がみられることである。PNA 反応性の消失傾向は、錯角化層が厚くなるにつれ強くなることが明らかになった。この PNA 結合糖鎖の消失原因を糖鎖構造より推測すると、(1) D-Gal β 1-3GalNAc 糖鎖構造が、グリコシダーゼなどの酵素により切断され、PNA が認識できなくなった、あるいは (2) 同糖鎖構造末端に

シアル酸などの糖鎖が付加し、PNA が結合できなくなった2つのことが考えられる。以上のことから、錯角化現象ではPNAで認識される糖鎖構造と毛包でもみられたDBA結合糖鎖構造が関連することが考えられる。この点の解明は、今後、酵素処理などを組合せたレクチン組織化学研究により検討されるべき課題である。

今回の検索結果より、糖鎖構造の局在変化が角化様式を反映していることが明らかになった。錯角化型口腔粘膜上皮の分化過程における糖鎖局在変化が、最も複雑であったことは、口腔粘膜上皮が同一部位でも多様な角化様式に変化できるような能力を保持している可能性を示唆しているものである。すなわち、これらの検索結果は、複雑な角化現象と細胞表面複合多糖の相関性を示唆するもので、角化性粘膜疾患などの病理発生を追求していくうえで、重要な基礎的知見を提供するものと考ええる。

結 論

角化様式による上皮細胞の複合多糖局在変化に関して、レクチン組織化学的検索を行い、以下の結論を得た。

1. 角質層は使用したすべてのレクチンで陰性であった。
2. 皮膚表皮および毛包の外毛根鞘表皮細胞でのレクチン結合性は、従来の報告と同様であり、

1) 皮膚表皮ではRCA-Iが基底細胞から顆粒細胞に、PNAが棘細胞から顆粒層下部に、UEA-IおよびSBAが棘細胞層中央部から顆粒層下部に、それぞれ染色性を認めた。

2) 毛包では、表皮での結合性に加えて、分化の進んだ外毛根鞘細胞にDBAの結合性を認めた。

3. 口腔粘膜上皮では、

1) 非角化および正角化型上皮では、すべてのレクチン結合パターンは、表皮型のものとほぼ同様であった。

2) 錯角化型上皮では、RCA-I、UEA-IおよびSBAの染色性は表皮型と同様であった。しかしながら、PNAでは錯角化亢進に伴い染色性の減弱あるいは消失傾向を、また、DBAでは染色性の出現傾向を示した。

以上の結果より、ヒト口腔粘膜上皮の細胞表面糖鎖構造は、角化程度により修飾を受けることが示唆された。特に、PNAおよびDBAで検出される糖鎖構造の局在変化は、口腔粘膜上皮の錯角化過程でのユニークな現象の1つであると考えられた。

稿を終えるにあたり、本研究に終始絶大なるご指導、ご校閲をいただいた内海順夫教授に心からお礼申し上げます。また、多大なご助力をいただいた口腔病理学講座教室員各位に感謝いたします。

抄録：角化程度によるヒト口腔粘膜での上皮細胞表面糖鎖構造の発現変化を、レクチン組織化学的に検索した。粘膜の角化様式は、HE染色およびポーリー反応から、(a)非角化、(b)錯角化および(c)正角化型に分類された。非角化および正角化型上皮では、皮膚表皮と同様のレクチン結合性を上皮細胞は示した。しかしながら、錯角化型では、PNA染色性が錯角化層の肥厚に伴い、消失する傾向にあり、過錯角化では完全に消失した。さらに同型上皮では、表皮あるいは他の粘膜上皮において染色性を認めないDBAが、PNAの消失に伴い出現した。以上の結果は、口腔粘膜上皮表面糖鎖構造の発現様式に角化程度が関与することを示し、時にPNAとDBAの染色性の変化は、錯角化形成過程の特徴的な現象であることが示唆された。

文 献

- 1) Squire, D. A., Johnson, M. W. and Hopps, R. M.: The functions of oral mucosa. In Human oral mucosa: Development, structure and func-

tion. pp. 3-5, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Esinburg Melbourne, 1976.

- 2) Doran, T. I., Vidrich, A. and Sun, T-T.: Intrinsic and extrinsic regulation of the differentiation of skin, corneal and esophageal epithelial cells. Cell 22: 17-25, 1980.

- 3) Moll, R., Franke, W. W. and Schiller, D. L. : The catalog of human cytokeratins : Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* **31** : 11-24, 1982.
- 4) Fucks, E. and Green, H. : Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* **19** : 1033-1042, 1980.
- 5) Ouhayounm, J.-P., Gosselin, F., Forest, N., Winter, S. and Franke, W. W. : Cytokeratin patterns of human oral epithelia : Differences in cytokeratin synthesis in gingival epithelium and the adjacent alveolar mucosa. *Differentiation* **30** : 123-129, 1985.
- 6) Lynch, M. H., O'Guin, W. M., Hardy, C., Mak, L. and Sun, T.-T. : Acidic and basic hair/nail ("hard") keratins : Their colocalization in upper cortical and cuticle cells of the human hair follicle and their relationship to "soft" keratins. *J. Cell Biol.* **103** : 2593-2603, 1986.
- 7) Dale, B. A. : Purification and characterization of a basic protein from the stratum corneum of mammalian epidermis. *Biochim. Biophys. Acta* **491** : 193-204, 1977.
- 8) Lynley, A. M. and Dale, B. A. : The characterization of human epidermal filaggrin. A histidine-rich, keratin filament-aggregating protein. *Biochim. Biophys. Acta* **744** : 28-35, 1983.
- 9) Reaven, E. P. and Cox, A. J. : Histidine and keratinization. *J. Invest. Dermatol.* **45** : 422-431, 1965.
- 10) Damjanov, I. : Lectin cytochemistry and histochemistry. *Lab. Invest.* **57** : 5-19, 1987.
- 11) Alroy, J., Ucci, A. A. and Periera, M. E. : Lectin histochemistry : An update. In *Advances in immunohistochemistry*, pp. 93-131, Raven Press, New York, 1988.
- 12) Brabec, R. K., Peters, B. P., Bernstein, I. A., Gray, R. H. and Goldstein, I. J. : Differential lectin binding to cellular membranes in the epidermis of the newborn rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77** : 477-479, 1980.
- 13) Nemanic, M. K., Whitehead, J. S. and Elias, P. M. : Alterations in membrane sugars during epidermal differentiation : Visualization with lectins and role of glycosidases. *J. Histochem. Cytochem.* **31** : 887-897, 1983.
- 14) Brown, R., Ku, W. W. and Bernstein, I. A. : Changes in lectin binding by differentiating cutaneous keratinocytes from the newborn rat. *J. invest. Dermatol.* **88** : 719-726, 1987.
- 15) Ohno, J., Fukuyama, K. and Epstein, W. L. : Glycoconjugate expression of cells of human anagen hair follicles during keratinization. *Anat. Rec.* **228** : 1-6, 1990.
- 16) Rittman, B. R., Mackenzie, I. C. and Rittman, G. A. : Lectin binding to murine oral mucosa and skin. *Archs. Oral Biol.* **27** : 1013-1019, 1982.
- 17) Vedtofte, P., Dabelsteen, E., Hakomari, S.-I. and Yung, W. W. : Regional variations of cell surface carbohydrates in human oral stratified epithelium. *Differentiation* **25** : 221-228, 1984.
- 18) Prime, S. S., Rosser, T. J., Mera, S. L., Malamos, D., Maitaland, N. J. and Scully, C. : Preferential lectin binding to specific layers of rat oral epithelium and modification by enzyme pretreatment. *J. Invest. Dermatol.* **85** : 531-534, 1985.
- 19) Prime, S. S., Rosser, T. J., Malamos, D., Shephered, J. P. and Scully, C. : The use of the lectin *Ulex europaeus* to study epithelial cell differentiation in neoplastic and non-neoplastic oral white lesions. *J. Pathol.* **147** : 173-179, 1985.
- 20) Prime, S. S., Rosser, T. J. and Scully, C. : Site-specific distribution of epithelial cell-surface carbohydrates in rat oral mucosa. *Differentiation* **31** : 35-41, 1986.
- 21) Ohno, J., Fukuyama, K. and Epstein, W. L. : Dynamic changes of cell-surface glycoconjugates in human palmer epidermis following friction blisters. *Cell Tissue Res.* **258** : 403-408, 1989.
- 22) Sun, T.-T. and Green, H. : Cultured epithelial cells of cornea, conjunctiva and skin : absence of marked intrinsic divergence of their differentiated states. *Nature* **269** : 489-493, 1977.
- 23) Sun, T.-T. and Green, H. : Immunofluorescent staining of keratin fibers in cultured cells. *Cell* **14** : 469-476, 1978.
- 24) Billingham, R. E. and Silvers, W. K. : The origin and conservation of epidermal specificities. *N. Engl. J. Med.* **268** : 539-545, 1963.
- 25) Billingham, R. E. and Silvers, W. K. : Studies on the conservation of epidermal specificities of skin and certain mucosa in adult mammals. *J. Exp. Med.* **125** : 429-446, 1967.
- 26) Wessells, N. K. : Differentiation of epidermis and epidermal derivatives. *N. Engl. J. Med.* **277** : 21-33, 1987.
- 27) Dale, B. A., Gown, A. M., Kimball, J. R. and Resing, K. A. : Characterization of two monoclonal antibodies to human epidermal keratohyalin : Reactivity with filaggrin and related proteins. *J. Invest. Dermatol.* **88** : 306-313, 1987.
- 28) Smith, S. A. and Dale, B. A. : Immunologic localization of filaggrin in human oral epithelia and correlation with keratinization. *J. Invest. Dermatol.* **86** : 168-172, 1986.
- 29) Dale, B. A., Holbrook, K. A. and Steinert, P. M. : Assembly of stratum corneum basic pro-

- tein and keratin filaments in macrofibrils. *Nature* **276** : 729-731, 1978.
- 30) Steinert, P. M., Cantieri, J. S., Teller, D. C., LonsdaleEccles, J. D. and Dale, B. A. : Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78** : 4097-4101, 1981.
- 31) Schroeder, H. E. : Structure and differentiation pattern of normal stratified epithelia. In differentiation of human oral stratified epithelia. pp. 35-156, Karger, Basel, Munchen, Paris, London, New York, Sydney, 1981.

Fig. 1a-d Hematoxylin and eosin staining of oral mucosa, representing types of surface epithelium studied.

(a) Non-keratinized epithelium from buccal mucosa ; the epithelium is considerably thick and nuclei are present up to the superficial layers. No keratin-like materials are noted.

(b) Para-keratinized epithelium from gingiva ; a granular layer is not apparent and pyknotic nuclei are present in the surface layers.

(c) Ortho-keratinized epithelium from hard palate ; the histological findings are identical to those shown in the epidermis of the skin.

(d) Mixed type of para-and ortho-keratinized epithelium from gingiva ; the mucosa is surfaced by both para-keratinized (pk) and ortho-keratinized (ok) epithelia. The arrow (↑) divides both types of the epithelia. bl, basal cell layer ; sl, spinous cell layer ; su, superficial layer ; gl, granular cell layer ; pk, para-keratinized layer ; ok, ortho-keratinized layer.

Magnification ×300.

Fig. 1

Fig. 2 a and b Pauly reaction on sections from (a) scalp skin and (b) oral mucosa surfaced by both para-and ortho-keratinized epithelia. Red-colored reaction products are observed in granular and cornified cells in the ortho-keratinized epithelium, but no reaction is detected in any cells of the para-keratinized portion in the oral mucosa. pke, para-keratinized oral epithelium : oke, ortho-keratinized oral epithelium ; ↑, the junction of the ortho-and para-keratinized epithelia.

Magnification $\times 300$.

Fig. 7 a-e Lectin staining in oral mucosa surfaced by both para- and ortho-keratinized epithelium. Binding of RCA- I (a), UEA- I (b) and SBA (c) is similar to that seen in the thick epidermis and does not change by the degree of keratinization. PNA (d) binds obviously to the surface of spinous cells in the ortho-keratinized oral epithelium, whereas in the para-keratinized portion of oral epithelium, the reaction is absent from all epithelial cells. DBA staining (e) tends to appear in the surface of differentiated epithelial cells as the parakeratotic layer thickens. pke, para-keratinized oral epithelium ; oke, ortho-keratinized. oral epithelium ; ↑, the junction of the ortho- and para-keratinized epithelia. Magnification ×300.

Fig. 8 a-d Alterations in PNA binding to the epithelial cells during the para-keratinization process. PNA staining disappears from the surface of cells as the para-keratotic layers become thicker. a, non-keratinized epithelium ; b, intermediate stage between non- and para-keratinized epithelia ; c, para-keratinized (pk) epithelium ; d, hyperpara-keratinized (hpk) epithelium.

Magnification $\times 300$.