原 著 II

扁平上皮化生粘膜上皮内の Langerhans cell の動態

— ビタミン A 欠乏ラットを用いて —

吉田 麻子, 新里 雅範, 細川 暁
小澤 英夫, 社本 幹博

藤田保健衛生大学医学部総合医科学研究所病態細胞

(平成 7 年 9 月 14 日受付)
(平成 7 年 10 月 31 日受理)

Langerhans cells in the squamous metaplastic epithelium of vitamin A deficient rats

Asako Yoshida, Masanori Shinzato, Satoru Hosokawa, Hideo Kozawa, Mikihiro Shamoto

Division of Pathological Cytology, Institute for Comprehensive Medical Science, Fujita Health University School of Medicine

Langerhans cells (LCs) in the squamous metaplastic epithelium of the trachea and the urinary bladder of vitamin A-deficient rats were examined. Both round, immature cells which were considered to be precursor LCs, and mature LCs with prominent dendritic processes, were recognized in the present study. Both cells were positive for anti-protein kinase type II antibody (PKC-II), and although the former did not have Birbeck granules (BGs), the latter did. The precursor LCs without BGs first appeared in the early stage of squamous metaplasia. As the differentiation of squamous metaplasia progressed, the number of BG bearing LCs increased, and the precursor cells became mature LCs in the later stage of squamous metaplasia of both the trachea and the urinary bladder. In the later stage of squamous metaplasia of the urinary bladder, LCs with BGs also appeared in the lamina propria. These findings indicate that precursor cells which probably migrate from the bone marrow, disperse into the metaplastic squamous epithelium in morphologically immature forms, and mature into BG bearing LCs as a result of contact with squamous epithelium.

Key words: Langerhans cell, squamous metaplasia, vitamin A deficiency, trachea, urinary bladder

表1 ビタミン A 欠乏食の組成

β コンスターチ	41.5%
ビタミンフリーカゼイン	25.0%
α ポテトスターチ	10.0%
セルロースパウダー	8.0%
大豆油	6.0%
ミネラル混合	3.5%
グラニュー糖	5.0%
ビタミン混合 (D, E, K, B)	1.0%

は じ め に

Langerhans cells (LC) は皮膚表皮内のみならず扁平上皮化生組織や扁平上皮癌組織内等に存在する骨髓由来の遊走細胞である¹⁾²⁾。成熟した LC は形態学的には大型で不規則な核を有し、淡明な胞体と樹枝状の細胞質突起が特徴的である。電顕的には短桿状あるいはラケット状の Birbeck granules (BG) を細胞質内に認め³⁾、LC を同定する上で全ての動物に共通した重要なマーカーとされている。

扁平上皮化生組織は皮膚表皮や食道粘膜に極めて類似しており、形態面のみならず遺伝子発現に於いても類似性を示す事が報告されている⁴⁾。Wong ら⁵⁾は、ビタミン A 欠乏により扁平上皮化生を起こした気管や膀胱の化生組織内に BG を有する LC が出現してくる事を報告している。我々は既にビタミン A 欠乏ラット気管の扁平上皮化生について検索し、化生の進展と LC の関連性について報告した⁶⁾。

今回は、ビタミン A 欠乏ラットの気管と膀胱の扁平上皮化生組織内における LC の分布及び成熟過程について比較検討した。

材料及び方法

1. 実験動物

3 週齢の Sprague-Dawley 系雄ラット 52 匹を日本 SLC より購入した。対照群は 12 匹、ビタミン A 欠乏群 40 匹とした。飼育は、温度 21～25 度、照明時間 7:00～19:00 に設定された動物室で行い、水道水を自由に摂取させた。

ビタミン A 欠乏動物の作成は、オリエンタル酵母工業のビタミン A 欠乏試料 (表 1) を、対照群には小動物用の MF 固形試料を自由に摂取させた。ビタミン A 欠乏動物は、全身状態、摂餌量の推移を参考

図1 ビタミン A 欠乏食給餌後の体重推移

にしながら経時的に屠殺、剖検した。即ち、体重増加の停止期 (実験 13～15 週) 及び peak 時の体重から 10g 以上の減量を示す体重減少期 (実験 16～18 週) に剖検し、気管と膀胱を摘出した (図 1)。気管は上部、中央部及び下部から組織片を採取した。膀胱は膀胱底と前立腺の間を結紮し、生理食塩水を 150～200 μ l 注入、冷 4% パラホルムアルデヒドで 5 分間固定した後、長軸方向に沿って分割した。

2. 光顕的検索方法

Sato ら⁷⁾の方法に従い acetone, methyl benzoate and xylene (AMeX) 包埋し、パラフィン切片を作製、HE 染色及び免疫染色を行った。LC のマーカーとして、抗 protein kinase C type-II β モノクローナル抗体 (PKC-II; 生化学工業, 1:200) を用い、avidin-biotin peroxidase complex (ABC) 法により免疫組織化学的に検索した。PKC-II は Koyama らによりマウス及びヒトの LC の有用なマーカーである事が報告されており⁸⁾⁹⁾、我々もラットにおいても Ia 抗原同様に LC のマーカーとなり得る事を明らかにしている⁶⁾。LC 数の測定に際しては気管及び膀胱の基底膜 100 μ m あたりの PKC-II 陽性細胞数 (標本 5 箇所 の 平均 値) として算出した。

3. 電子顕微鏡学的検索方法

気管及び膀胱を 1 $\times$ 2 mm の大きさに細切後、直ちに冷 2.0% パラホルムアルデヒド・2.5% グルタルアルデヒド混合固定液で 2 時間前固定した。冷リン酸緩衝液で十分に洗浄した後、冷 2.0% オスミウム固定液で 1 時間後固定した。エタノール系列で脱

水後、エポキシ樹脂に包埋した。超薄切片を作製し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛による二重染色を行い、JEM-100CX 透過型電子顕微鏡(日本電子)を用いて観察した。

4. 化生の進展状況の判定

気管については扁平上皮化生の病理発生に関する Wong ら¹⁰⁾の文献を参考に、以下の様に分類した。①基底細胞増殖期。②重層期。③角質層形成期。④化生終息期。

膀胱については、気管に比べ扁平上皮化生の発生率は低いものの、化生の程度は全般的に急激に進展し、また個体差も著明であったため、以下の様に化生の前期と後期のステージに分類した。①化生前期：基底細胞が増殖し、部分的に重層化を呈するが被蓋細胞が残存しているもの。②化生後期：角化傾向が明らかで、被蓋細胞が消失しているもの。

尚、気管あるいは膀胱のステージ分類は、各個体の中で最も化生の進展した部位をその動物のステージと判定し、検索を実施した。

結 果

扁平上皮化生の程度は個体によりばらつきがあり、しかも同一個体においても気管と膀胱の化生の進展状況は同程度ではなかった。気管の扁平上皮化生はビタミン A 欠乏群全てのラットで観察された(100%; 40/40)。気管における扁平上皮化生は基底細胞増殖期から扁平上皮類似の組織像を呈する化生終息期へと進展し、LC の分布は化生の進展に伴い、類円形で BG が認められない幼若型から樹状突起と BG を有する成熟型に移行していた。膀胱については、気管に比べ扁平上皮化生の発生率は低い傾向がみられた(47.5%; 19/40)。膀胱における扁平上皮化生は被蓋細胞の有無で2期に大別し、被蓋細胞が残存していた化生前期では幼若型と成熟型の LC が混在し、被蓋細胞が消失していた化生後期ではその殆どが成熟型の LC であった。ビタミン A 欠乏群の気管及び膀胱の各 stage で確認された LC の動態は以下の様であった。

1. 気管

① 基底細胞増殖期

基底細胞が2～3層に増殖した基底細胞増殖期では、PKC-II陽性細胞は基底層に僅かにみられたが(表2, 1.2 ± 0.4 個/100 μ m), 樹状突起を持たない類円形の細胞であった。電顕的に類円形の細胞は、明るい細胞質とやや不整形の核を有する細胞として

表2 気管扁平上皮化生組織における PKC-II陽性細胞数の推移

扁平上皮化生の ステージ	PKC-II陽性細胞数* (個/100 μ m)
基底細胞増殖期 (n=11)	1.2 ± 0.4
重層期 (n=8)	2.6 ± 1.7
角質層形成期 (n=15)	3.9 ± 0.9
化生終息期 (n=6)	2.4 ± 1.5

Mean $\pm$ SD

*細胞数の算出は、写真撮影後基底膜100 μ mあたりの PKC-II陽性細胞数を算出した。

確認された。この細胞は、周囲の上皮細胞との間にデスモゾーム結合はみられず、リボゾームが豊富で細胞内小器官が未発達で、形態的には極めて幼若な細胞であった。BGを有するLCは認められなかった。

② 基底細胞重層期

増殖した基底細胞が重層化を示す部位では、PKC-II陽性細胞が増加していたが(表2, 2.6 ± 1.7 個/100 μ m), LCに特徴的な樹状形態は明らかではなかった。電顕的には扁平上皮化生組織内に樹状突起を有する細胞は認められず、核小体が明瞭で類円形～長楕円形の核を有する一見リンパ球様の形態を示す細胞が存在していた。この細胞には極めて少ないながらもBGが確認され、LCと同定した。BGはゴルジ領域に分布していたが、その他にもShamoto¹¹⁾が atypical granule として報告しているライソゾームに似た小体も分布していた。

③ 角質層形成期

角化傾向の明らかな扁平上皮化生組織内には PKC-II陽性の樹状形態を示す細胞が多数出現していた(図2, 表2, 3.9 ± 0.9 個/100 μ m)。樹状突起が不明瞭な陽性細胞も僅かではあるが認められた。電顕的にはBGを持つLCが多数確認された。殆どのLCはユークロマチン主体の核で切れ込みを有し、ミトコンドリアや粗面小胞体等の細胞内小器官は比較的豊富で、細胞質内には多数のBGが認められた。

④ 化生終息期

基底細胞も扁平化し、角質層も明確になり、扁平上皮化生が終了した部位では、PKC-II陽性の細胞数は角質層形成期に比べ減少し(表2, 2.4 ± 1.5 個/

図2 扁平上皮化生角質層形成期の気管

- a : 扁平上皮組織と類似の組織像を呈し、気管の線毛円柱上皮は全く認められない。(HE 染色, $\times 230$)
- b : 扁平上皮化生組織内に多数の PKC-II 陽性細胞を認める。陽性細胞は樹状突起の明確なもの (矢印) と、類円形 (矢頭) のものがある。(PKC-II 免疫染色, $\times 230$)

表3 膀胱扁平上皮化生組織における PKC-II 陽性細胞数の推移

扁平上皮化生の ステージ	PKC-II 陽性細胞数* (個/100 μ m)
化生前期 (n=14)	1.1 $\pm$ 0.6
化生後期 (n=5)	4.6 $\pm$ 2.1

Mean $\pm$ SD

*細胞数の算出は、写真撮影後基底膜100 μ mあたりの PKC-II 陽性細胞数を算出した。

100 μ m)。その殆どが樹状突起の明瞭な細胞であった。電顕像では樹状突起の豊富な LC が多数確認された。これら LC は不規則な核と明るい細胞質を有し、通常皮膚で見られる LC と同様な形態を示しており、成熟型の LC と考えられた。幼若な LC は認められなかった。

2. 膀胱

① 化生前期

基底細胞の増生が認められ、部分的に重層化を示す化生前期では、PKC-II 陽性細胞が増生した基底細胞間に僅かに散見された (表3, 1.1 $\pm$ 0.6個/100 μ m)。気管と同様にこれら PKC-II 陽性細胞の樹状突起は不明瞭であった。電顕的には基底層に円形の核と明るい細胞質を有し、細胞内小器官が比較的豊富な細胞が少数分布していた。これらの細胞では

BG は確認出来なかったが、僅かではあるが atypical granule が認められた。

② 化生後期

化生後期では光顕的には被蓋細胞が消失し、角化傾向が明らかであった。またこのステージの膀胱の粘膜固有層では、好中球及びマクロファージを主体とした炎症性細胞の浸潤が著明であった。PKC-II 免疫染色では、扁平上皮化生組織内及び粘膜固有層に樹状突起が明らかな陽性細胞と樹状突起が短い類円形の陽性細胞が認められた (図3, 表3, 4.6 $\pm$ 2.1個/100 μ m)。これらの細胞は、電顕的に BG を有する細胞、即ち LC であった (図4)。これら LC は、明るい細胞質を持ち、細胞内小器官が豊富な成熟型の LC であった。また BG は、細胞質全域にわたって分布していた。更に BG 以外にも fingerprint 様構造

図3 扁平上皮化生後期の膀胱

- a : 移行上皮は全て角化傾向の強い扁平上皮化生組織に置換され、粘膜固有層には炎症性細胞の浸潤を認める。(HE 染色, ×230)
- b : 扁平上皮化生組織内に樹状突起の明確な PKC-II 陽性細胞 (矢印) と、類円形の陽性細胞 (矢頭) を認める。
(PKC-II 免疫染色, ×230)

を示す構造物もみられた。この fingerprint 様の構造物は、ヒトの histiocytosis X の細胞質内にみられるものに酷似していた。粘膜固有層にも BG, atypical granule や小型の dense body を有する LC が認められた。

考 察

ビタミン A 欠乏ラットの気管及び膀胱の扁平上皮化生にみられる LC の動態について検索した。気管及び膀胱のいずれにおいても扁平上皮化生の進展に伴い、種々の成熟段階の LC の出現が確認された。

正常ラットの気管粘膜の上皮は多列線毛円柱上皮より成り、膀胱の上皮は伸縮性に富む移行上皮より成る。ビタミン A 欠乏によりこれら正常の上皮構造は破綻し、扁平上皮化生の発現が認められた。扁平上皮化生の初期には BG と明瞭な樹状突起を有する LC は認められなかったが、類円形の形態的に幼若な細胞が認められた。扁平上皮化生の進展に伴い、BG を有する LC が認められ、その後明瞭な樹状突起を有する LC が確認できた。従って、扁平上皮化生初期の基底細胞が増殖するステージにみられた PKC-II 陽性細胞は LC の前駆細胞であり、LC は BG を持たない幼弱な状態で扁平上皮に分布し、BG を産生しながら成熟していくものと考えられる。またこの傾向は、気管及び膀胱ともに同様であり、外界との接触の有無や扁平上皮化生の出現する臓器の種類には無関係であると思われる。扁平上皮化生の完成時には、その組織に皮膚、食道や膈等の正常な

扁平上皮組織に極めて類似した微小環境が構築されるところと考えられている⁴⁾。今回の実験では、化生完成時に皮膚でみられる様な成熟型の LC が多数認められた。扁平上皮組織に認められる LC は、抗原を認識する主要な機能を十分に発揮するために合目的な樹状形態をとった高度に分化した細胞と考えられる。

LC は、その前駆細胞が骨髓に由来し、扁平上皮内で抗原を認識後、輸入りリンパ管を介して移動、所属するリンパ節に定着し、抗原提示を行うとのダイナミックな動態を示す事が示唆されている^{12)~15)}。本研究における気管及び膀胱の扁平上皮化生組織内に認められた LC は、化生完成時には抗原認識可能なまでに成熟したものと考えられる。膀胱の化生組織では気管に比べ炎症反応が強く、粘膜固有層にも多数の LC が存在していた。この粘膜固有層に認められた LC は、膀胱の炎症に伴い扁平上皮化生組織内より移動してきたものと思われる。

マウス尾の発生学的検索で LC の出現は扁平上皮の角化開始時と同時期である事が知られている¹⁶⁾。同様にこれまで多くの研究者により、LC の分布と扁平上皮組織の角化の程度が密接に関連しているであろう事が推測されてきた^{17)~19)}。しかし、本研究の結果、角質層形成以前においても BG を有する LC が出現することは明確であり、LC の分布・成熟はケラチノサイトの増殖態度と密接に関連するものと思われた。ケラチノサイトは IL-1, GM-CSF 等の種々のサイトカインを産出し、扁平上皮の炎症反応や免疫反応を調節している事が知られている^{20)~23)}。扁平

図4 扁平上皮化生後期の膀胱の普通電顕

- a: 扁平上皮化生組織内に細胞質が明るく Birbeck 顆粒を有するランゲルハンス細胞を認める ($\times 3,200$)。右上に Birbeck 顆粒 (矢印) と fingerprint 様構造物 (矢頭) を示す ($\times 23,000$)。
- b: 粘膜固有層に細胞内小器官が豊富なランゲルハンス細胞を認める ($\times 4,800$)。右上に Birbeck 顆粒 (矢印) の拡大像を示す ($\times 19,000$)。

上皮化生の進展に伴うケラチノサイトのサイトカイン産生の変化が LC の機能発現のみならず分布にも関与している可能性が示唆された。

結 語

気管及び膀胱の扁平上皮化生組織内の LC の分布

は、化生の進展に伴い、類円形で BG を持たない幼若型から樹状突起が明瞭で BG を有する成熟型に移行していく事が推測された。LC は、幼若な状態で扁平上皮化生組織へ分布し成熟する事、更に LC の分布・成熟にはケラチノサイトの増殖態度が密接に関与している事が示唆された。

文 献

- 1) Katz SI, Tamaki K, Sachs DH: Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* 282:324-326 1979
- 2) Tamaki K, Stingl G, Katz SI: The origin of Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 74:309-311 1980
- 3) Birbeck MS, Breathnach AS, Everall JD: An electron microscope study of basal melanocytes and high-level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. *J Invest Dermatol* 37:51-64 1961
- 4) Leube RE, Rustad TJ: Squamous cell metaplasia in the human lung: Molecular characteristics of epithelial stratification. *Virchows Arch B Cell Pathol* 61:227-253 1991
- 5) Wong YC, Buck RC: Langerhans cells in epidermoid metaplasia. *J Invest Dermatol* 56:10-17 1971
- 6) Hosokawa S, Shinzato M, Kaneko C, Shamoto M: Migration and maturation of Langerhans cells in squamous metaplasia of the rat trachea induced by vitamin A deficiency. *Virchows Arch B Cell Pathol* 63:159-166 1993
- 7) Sato Y, Mukai K, Watanabe S, Goto M, Shimosato Y: The AMeX method. A simplified technique of tissue processing and paraffin embedding with improved preservation of antigens for immunostaining. *Am J Pathol* 125:431-435 1986
- 8) Koyama Y, Fukaya Y, Ueda H, Hachiya T, Hagiwara M, Hidaka H, Marunouchi T: Expression of protein kinase C isozyme in human Langerhans' cells. *Acta Derm Venereol (Stokh)* 70:502-505 1990
- 9) Koyama Y, Hachiya T, Hagiwara M, Kobayashi M, Ohashi K, Hoshino T, Hidaka H, Marunouchi T: Expression of protein kinase C isozyme in epidermal Langerhans cells of the mouse. *J Invest Dermatol* 94:677-680 1990
- 10) Wong YC, Buck RC: An electron microscopic study of metaplasia of the rat tracheal epithelium in vitamin A deficiency. *Lab Invest* 24:55-66 1971
- 11) Shamoto M: Langerhans cells granule in Letterer-Siwe disease. An electron microscopic study. *Cancer* 25:1102-1108 1970
- 12) Stingl G, Katz SI, Shevach EM: The functional role of Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 74:315-318 1980
- 13) Stingl G, Tamaki K, Katz SI: Origin and function of epidermal Langerhans cells. *Immunol Rev* 53:149-174 1980
- 14) Katz SI, Cooper KD, Iijima M, Tsuchida T: The role of Langerhans cells in antigen presentation. *J Invest Dermatol* 85:96S-98S 1985
- 15) King PD, Katz DR: Mechanisms of dendritic cell function. *Immunol Today* 11:206-211 1990
- 16) Schweizer J, Marks F: A developmental study of the distribution and frequency of Langerhans cell in relation to formation of patterning in mouse tail epidermis. *J Invest Dermatol* 69:198-204 1977
- 17) Riley PA: Esterase in epidermal dendritic cells of the mouse. A study of the histochemical properties and distribution of activity of the enzyme in relation to patterning in the tail. *Br J Dermatol* 78:388-397 1966
- 18) Kolenic S, Ding TG, Longley J: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) decreases CD1a expression by human Langerhans cells and increase proliferation in the mixed epidermal cell-lymphocyte reaction. *J Invest Dermatol* 95:359-362 1990
- 19) Huchens LH, Sagebiel RW, Clark MA: Oral epithelial dendritic cells of the rhesus monkey: Histologic demonstration, fine structure and quantitative distribution. *J Invest Dermatol* 56:325-336 1971
- 20) Matsue H, Cruz PD, Bergstresser PR, Takashima A: Cytokine expression by epidermal cell subpopulations. *J Invest Dermatol* 99:42S-45S 1992
- 21) McKenzie RC, Sauder DN: Keratinocyte cytokines and growth factors. Functions in skin immunity and homeostasis. *Dermatol Clin* 8:649-661 1990
- 22) Kupper TS: Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues. *J Clin Invest* 86:1783-1789 1990
- 23) Barker JNWN, Mitra RS, Griffiths CEM, Dixit VM, Nickiloff BJ: Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet* 337:211-214 1991