

ラット臼歯接合上皮のレクチン組織化学的研究

著者	酒井 信, 金田一 孝二, 小松 正志
雑誌名	東北大学歯学雑誌
巻	20
号	2
ページ	91-103
発行年	2001-12
URL	http://hdl.handle.net/10097/31765

原 著

ラット臼歯接合上皮のレクチン組織化学的研究

酒井 信・金田一 孝二・小松 正志*

東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座・口腔分子生物学分野

(主任: 加賀山學教授)

口腔機能再建・材料学講座・歯科保存学分野

(主任: 小松正志教授)

Histochemical study of lectin binding in junctional epithelium of rat

Shin Sakai, Koji Kindaichi and Masashi Komatu

Department of Oral Molecular Biology

(Director : Prof. Manabu KAGAYAMA)

**Department of Operative Dentistry*

(Director : Prof. Masashi Komatu)

Tohoku University Graduate School of Dentistry

Abstract: The present study was designed to analyze the expression of carbohydrate residues of junctional epithelium as compared with those of gingival, primary junctional, and reduced enamel epithelia in rats.

In the junctional epithelium, basal cells were Wheat-germ agglutinin(WGA)-positive but Peanut agglutinin(PNA)/Maclura Pomifera agglutinin(MPA)/Soybean agglutinin(SBA)-negative. Since the basal cell surface was WGA-negative and the lateral and apical cell surfaces were WGA-positive, the WGA binding of basal cells appeared to be U-shaped. Parabasal cells were PNA/MPA/WGA/SBA-positive. Spinous cells were PNA/MPA-positive and WGA/SBA-positive. The lectin binding pattern of superficial cells was similar to that of basal cells. The lectin binding pattern of gingival epithelial cells was similar to that of junctional epithelial cells; however, spinous gingival epithelial cells were virtually PNA/MPA-negative. In the primary junctional epithelium, spinous cells were PNA-positive, MPA-negative, and WGA/SBA-positive, and both basal and superficial cells were WGA-positive and SBA-negative. All cells of reduced enamel epithelium were PNA/MPA/WGA/SBA-slightly positive.

Our results suggest that superficial cells of junctional epithelium contain carbohydrate residues similar to those found in basal cells of junctional and gingival epithelia. A lectin-binding pattern appears in the superficial cells of the primary junctional epithelium, but does not appear in reduced enamel epithelium.

Key words: junctional epithelium, rat molar, lectins, PNA/MPA, WGA/SBA

緒 言

歯と歯肉との接合部 (dentogingival junction) の上皮は付着上皮または接合上皮 (junctional epithelium) と呼ばれ, 生理的に歯肉を歯に接合して歯周組織を保護するとともに感染防御システムの一部として機能す

ることが知られており, また臨床的に歯周病の成因と密接に関連する組織として重要視されている。接合上皮は基底層および基底上層で構成される重層扁平上皮であり, 接合上皮と結合組織およびエナメル質の間には外基底膜および内基底膜が形成される。接合上皮に関する電子顕微鏡的研究によりエナメル質に接する

上皮細胞が半デスモソームによりエナメル質表面の内基底膜に結合すること、上皮細胞間の細胞間隙が拡大して多数の白血球を含み感染防御機構として機能すること、また接合上皮は membrane coating granule を欠如し物質拡散バリアーがないことが明らかにされてきた¹⁾。免疫組織化学的研究から接合上皮は歯肉上皮と異なり、ケラチン 5, 13, 14 を発現するとともに単層上皮のマーカーであるケラチン 19 を発現し²⁻⁵⁾、また intercellular adhesion molecules ICAM-1 および LFA-3 を発現する^{4,6)} ことなどが報告されている。

歯の萌出時に退縮エナメル上皮から形成されるいわゆる一次接合上皮はその後の発生過程を経て接合上皮(二次接合上皮)に分化する⁷⁾。ラット臼歯の接合上皮の発生過程について組織学的研究が報告されている⁸⁻¹⁰⁾。しかし発生過程における接合上皮の経時的変化を比較検討した組織化学的研究の報告は少ない。上皮細胞の表面には複合糖質が多く、糖鎖を認識する各種のレクチンによる解析が上皮細胞の特性解明に有用であり、癌細胞を含めて上皮細胞の分化過程において細胞表面の複合糖質に変化がおこることが知られている¹¹⁻¹³⁾。

この研究は上皮細胞のマーカーとして各種レクチンを用い、発生過程におけるラットの上顎第一臼歯近心側の歯肉上皮、歯肉溝上皮および接合上皮の糖鎖特異性に注目し、これらの上皮、特に接合上皮の発生過程を検討するため、18日齢ラットの退縮エナメル上皮、および3-4週齢ラットの接合上皮(以下一次接合上皮)についても比較検討した。

材料と方法

実験動物は生後18日, 3, 4, 6, 8, 10週齢のウイス

ター系ラット各週齢5個体, 計30個体を用いた。ペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与による全身麻酔下で左心室よりカテーテルを挿入し灌流固定を行った。固定液には0.1 M リン酸緩衝液で pH 7.4 に調整した4% パラフォルムアルデヒド溶液を用いた。上顎骨を摘出の後、同固定液により12時間浸潤固定を行った。その後、10% EDTA/0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) による低温脱灰を行い、エタノール系列による脱水およびキシレン透徹の後、パラフィンに包埋し、5 μ m 厚の矢状断連続切片を作成した。切片を脱パラフィンの後、一部はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し、隣接切片は以下のレクチン染色に供した。

レクチン染色

切片をリン酸緩衝塩類溶液 (phosphate buffered saline; PBS) により5分間洗浄し、内因性ペルオキシダーゼ除去のため0.3% 過酸化水素により室温で30分間反応させた。その後、切片をPBSにより洗浄し、5% ウシ血清アルブミンにて室温30分間反応させたのち、ビオチンで標識された Peanut agglutinin (PNA), *Maclura pomifera* agglutinin (MPA), Wheat-germ agglutinin (WGA), Soybean agglutinin (SBA) (EY Laboratories, Inc., San Mateo, CA, USA) のレクチン溶液 (10-25 μ g/ml) を用いて湿箱中4°Cで一晩反応させた。その後、切片をPBSにより洗浄し、アビジン-ペルオキシダーゼ複合体 (ABC Kit, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) と室温で30分反応させ、PBSによる洗浄の後、0.01% 過酸化水素を添加した0.01% diaminobenzidine (DAB)/0.05 M Tris HCl 溶液により発色させた。対照実験には、各標識レクチンに対す

表1. 本研究で用いたレクチンの糖特異性および阻害糖

レクチン	糖特異性	阻害糖
PNA Peanut agglutinin	N-acetyl-galactosamine	β -lactose
MPA <i>Maclura Pomifera</i> agglutinin	α -D-galactose	α -D-melibiose
WGA Wheat-germ agglutinin	N-acetyl-D-glucosamine	N-acetyl-D-glucosamine
SBA Soybean agglutinin	α -D-galactose N-acetyl-galactosamine	N-acetyl-galactosamine

る阻害糖を0.1 Mの濃度で各レクチン溶液に混合し、染色を行った。PNA, MPA, WGA, およびSBAに対する阻害糖には、それぞれ β -lactose, α -D-melibiose, N-acetyl-galactosamine, およびN-acetyl-D-glucosamineを用いた(表1)。これらの試料について光学顕微鏡(AX-80, オリンパス株式会社, 東京)を用いて観察しCCDカメラにより写真撮影を行った。

結 果

本論文では、歯・歯肉移行部上皮の歯肉縁を境にその外側を歯肉上皮、また内側(エナメル質側)の上皮についてはさらに歯頸側の接合上皮と歯肉縁側の歯肉溝上皮とに分けて記述する。ラットの歯肉溝上皮は角質層を含む。歯肉溝上皮の角質層周囲、および接合上皮周囲には、しばしば組織標本作製時の組織収縮による亀裂が認められた。

1. 組織学的観察

10週齢ラットの接合上皮は歯肉固有層側から、基底細胞層、旁基底細胞層、有棘層を認めるが、顆粒層および角質層を認めない。有棘細胞はエナメル質側に移行するにしたがい次第に扁平となり、エナメル質表面に接する細胞(以下表層細胞)は極めて扁平な細胞として認められる(図1a, 1c)。接合上皮には毛細血管を含む乳頭形成が認められた。歯肉上皮および歯肉溝上皮は基底膜側より、基底細胞層、旁基底細胞層、有棘層、顆粒層および角質層を認め、さらに後者は角質層とエナメル質表面との間に2-3層の角質化しない扁平細胞を含む(図1a, 1b)。歯肉溝上皮における角質層・エナメル質間の角質化しない扁平細胞は接合上皮のエナメル質に接する扁平細胞層に連続している(図1a)。

3週齢ラットにおける一次接合上皮の有棘細胞層は薄いものの、表層細胞は扁平化し、乳頭形成も認められ、基底膜直下には結合組織線維に乏しく細胞に富む固有層を認めた(図1d)。4週齢ラットの一次接合上皮は有棘細胞の重層化が進み、6-8週齢ラットの接合上皮は重層化がさらに進行して、3-4週齢ラットで認められた薄い上皮を認めず、10週齢ラットと同様の形態を示した。

18日齢ラットの第一臼歯歯冠部に退縮エナメル上皮を認めた。退縮エナメル上皮は一層の内エナメル上皮細胞および乳頭層とからなり、内エナメル上皮細胞は円柱形または立方体を呈していた(図1e)。退縮エナ

メル上皮は咬頭頂で口腔粘膜上皮と融合していた(図示せず)。

2. レクチン組織化学

1) 6-10週齢ラットにおける染色所見

接合上皮、歯肉上皮、および歯肉溝上皮の各レクチンに対する染色性は、6, 8, 10週齢ラットの間で相違を認めず、また歯肉上皮と歯肉溝上皮のレクチン染色性は同様であった。

A) 接合上皮

PNA染色標本では、基底細胞は陰性、旁基底細胞を含む有棘細胞は陽性反応を示しその反応強度は歯肉側からエナメル側に向かい強陽性から弱陽性または陰性へと移行し、表層細胞は弱陽性であった。エナメル・セメント境の象牙質表面はPNA陽性反応を示した(図2a)。

MPA染色標本では多くの細胞はPNAと同様の染色性を示したがMPAの反応強度はPNAに比べて弱かった。エナメル・セメント境に近接する表層細胞の表面およびエナメル・セメント境の象牙質表面がMPA陽性反応を示した(図2b)。

WGA染色標本では、基底細胞は強い陽性反応を示した。多くの基底細胞は、外基底膜に面する細胞表面(底面)はWGA陰性で、その他の細胞表面(側面および頂面)が強陽性という逆U字型の染色パターンを示した。旁基底細胞および有棘層細胞はWGA陽性、また表層細胞および表層細胞に隣接する2-3層の扁平細胞は強陽性であった。表層細胞のエナメル質に接する細胞表面は陰性であり、細胞は扁平ではあるものの基底細胞と同様の染色パターンを示した(図2c)。

SBA染色標本では旁基底細胞を含むすべての有棘細胞が強陽性、基底細胞および表層細胞は陰性であった(図2d)。

なおこれらのレクチンは歯・歯肉移行部以外の部位で特徴的な染色性を示した。すなわち、WGAは結合組織の血管を、MPAは骨表面の多核巨細胞を、またSBAは歯根膜内のマラッセの上皮遺残および骨髄内の一部の細胞を染色した(図示せず)。

B) 歯肉上皮および歯肉溝上皮

歯肉上皮と歯肉溝上皮は用いたすべてのレクチンに対して同様の染色性を示した。

PNA染色標本では、基底細胞はその一部が弱陽性を示したがその多くは陰性で、旁基底細胞が強いPNA陽性反応を示した。接合上皮のPNA染色性に比

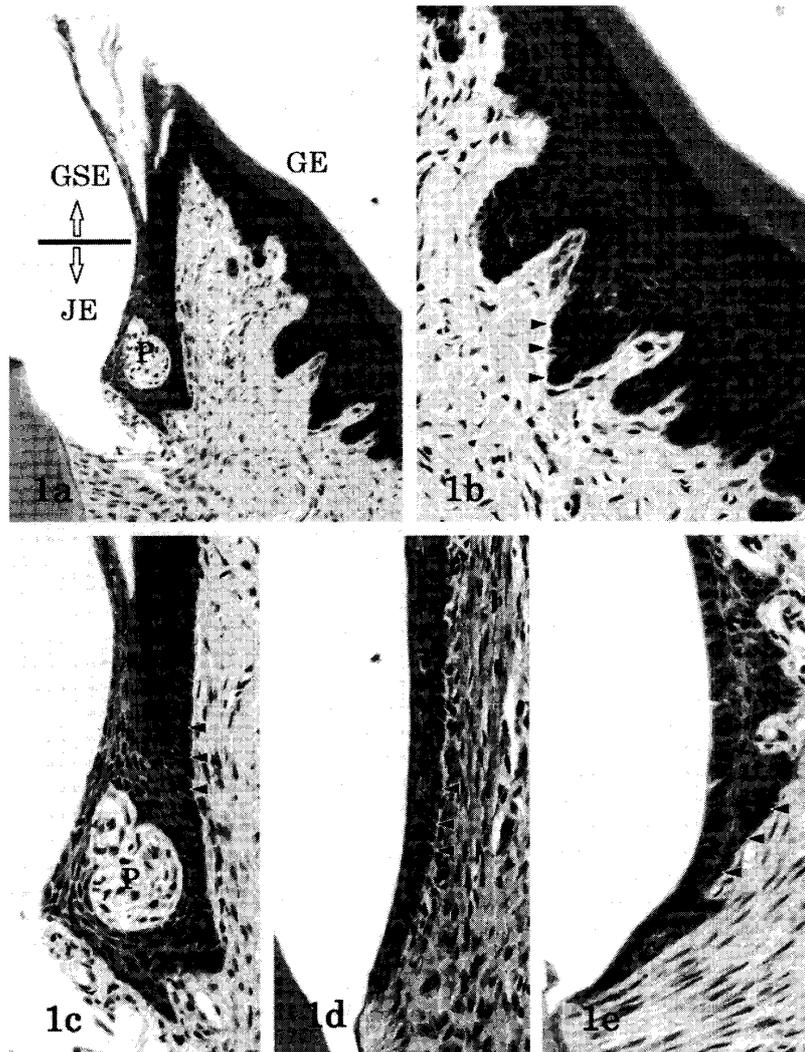


図1 10週齢ラットにおける接合上皮および歯肉上皮・歯肉溝上皮の組織像, 3週齢ラットにおける一次接合上皮, 18日齢ラットの退縮エナメル上皮 (H-E)

接合上皮 (JE) は外基底膜側から, 基底細胞, 旁基底細胞, 有棘細胞, 表層細胞を認めた。(図 1a, 1c)。歯肉上皮 (GE) は歯肉溝上皮 (GSE) と同様に基底膜側より, 基底細胞, 旁基底細胞, 有棘細胞, 顆粒細胞および角質層を認めた (図 1a, 1b)。3週齢ラットにおける一次接合上皮の有棘細胞層は薄いものの, 表層細胞は扁平化し, 乳頭形成も認められ, 基底膜直下には結合組織線維に乏しく細胞に富む固有層を認める (図 1d)。18日齢ラットの退縮エナメル上皮は一層の内エナメル上皮細胞および乳頭層で構成される (図 1e)。JE: 接合上皮, GSE: 歯肉溝上皮, GE: 歯肉上皮, P: 乳頭, ▶: 基底膜。倍率: 1a; $\times 150$, 1b-1e; $\times 300$ 。

べて, 歯肉上皮および歯肉溝上皮の PNA 陽性部位の範囲は狭く, 旁基底細胞に近接する 1-2 層の有棘細胞のみが PNA 陽性で多くの有棘細胞は陰性, 顆粒層は弱陽性, 角質層は陰性であった (図 3a)。

MPA 染色標本では, 各細胞は PNA に類似の染色性を示した (図 3b)。

WGA 染色標本では, 基底細胞の基底膜に接する細胞表面は WGA 陰性で, 接合上皮と同様に, 基底面以外の細胞表面は WGA 強陽性という逆 U 字型パター

ンを示した。旁基底細胞を含む多くの有棘細胞は WGA 陽性, 顆粒層および角質層は WGA 陰性であった (図 3c)。

SBA 染色標本では, 基底細胞は陰性で, 旁基底細胞を含む有棘層のすべての細胞が強陽性, 顆粒層および角質層は陰性であった (図 3d)。

2) 一次接合上皮のレクチン染色性

3-4 週齢ラットの一次接合上皮は 6-10 週齢ラットの接合上皮に比べて PNA/MPA に対する反応性は弱

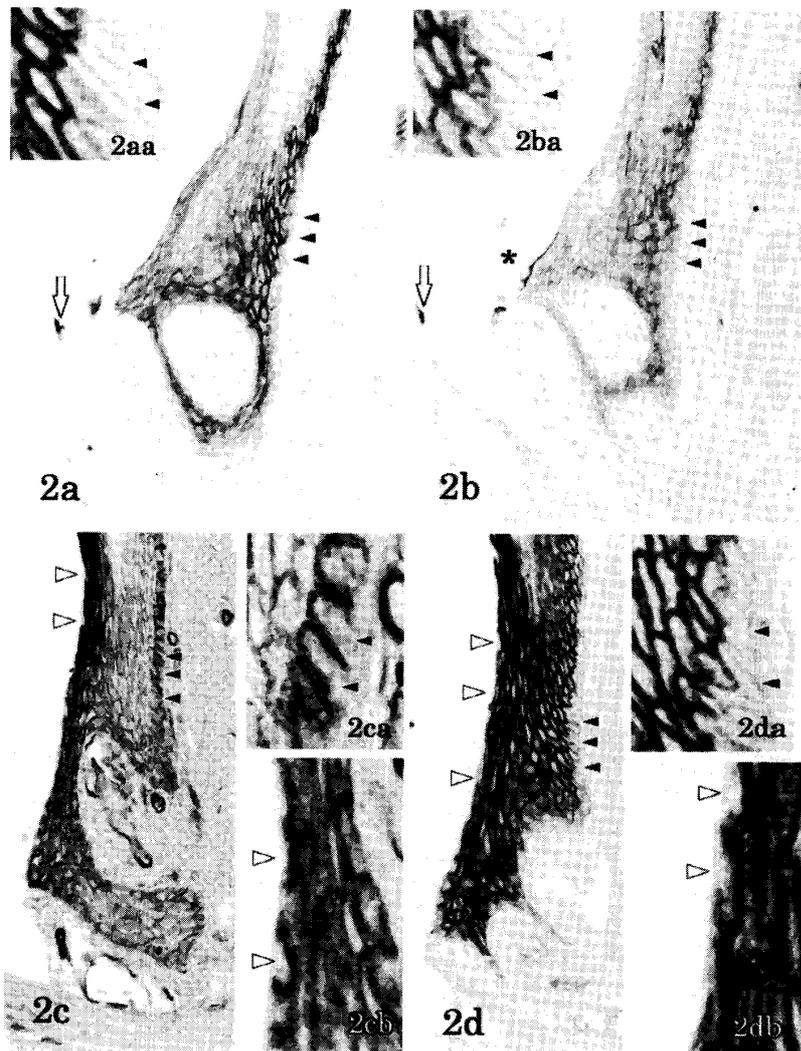


図2 10週齢ラットにおける接合上皮のレクチン染色像

PNA (図2a) および MPA (図2b) 染色標本では、基底細胞が陰性、旁基底細胞が強陽性、旁基底細胞に接する有棘細胞は歯肉側からエナメル側に向かい強陽性から陰性へと移行し、表層細胞は PNA 弱陽性であった (図2a, 2aa, 2b, 2ba)。エナメル・セメント境の象牙質表面は PNA/MPA 陽性反応を示し (図2a, 2b の⇒印)、エナメル・セメント境に近接する表層細胞の表面は MPA 陽性反応を示した (図2b の*印)。WGA (図2c) 染色標本では、基底細胞は強陽性、旁基底細胞および有棘層細胞は陽性、また表層細胞は強陽性であり、基底細胞と表層細胞は逆U字型パターンを示した (図2c, 2ca, 2cb)。SBA (図2d) 染色標本では旁基底細胞および有棘細胞が強い陽性反応を示した。基底細胞および表層細胞は陰性であった (図2d, 2da, 2db)。▶: 基底膜, ▷: 表層細胞。倍率: 2a-2d; ×300, 2aa, 2ba, 2ca, 2cb, 2da, 2db; ×1,200。

く、有棘細胞は PNA 弱陽性 MPA 陰性であった (図4a, 4b)。一方、WGA および SBA に対する一次接合上皮の染色性は6-10週齢ラットの接合上皮と同様の染色性を示した (図4c, 4d)。

3) 退縮エナメル上皮のレクチン染色性

退縮エナメル上皮はすべてのレクチンに対して極めて弱い陽性反応を示した (図5)。

以上の結果をまとめて表2に示す。

各レクチンに対する阻害糖 (表1) を加えた対照染色により、全てのレクチンにおいて陰性または反応性の減弱を認め、各レクチンの反応が糖鎖特異的であると判断された。

考 察

本研究では接合上皮の糖鎖特異性を明らかにする目

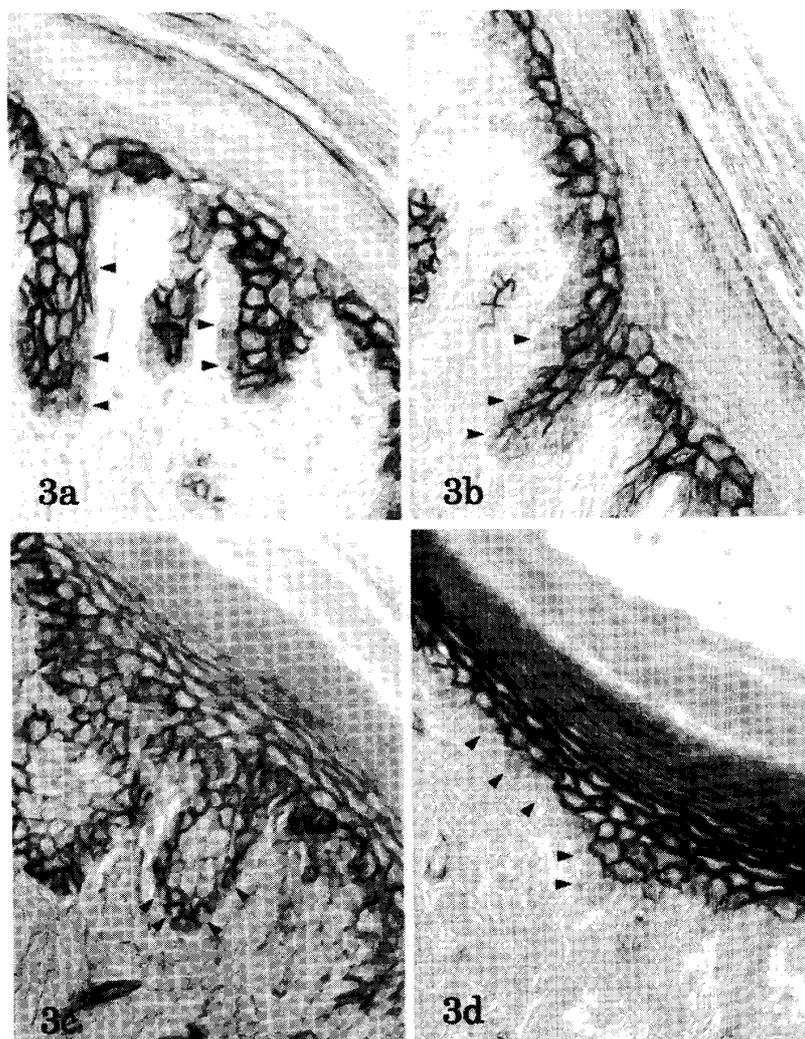


図3 10週齢ラットにおける歯肉上皮のレクチン染色像

PNA (図3a) および MPA (図3b) 染色標本では、基底細胞は陰性、旁基底細胞が強陽性、旁基底細胞に接する一部の有棘細胞は弱陽性、顆粒層は弱陽性、角質層は陰性であった。WGA (図3c) 染色標本では、基底細胞は接合上皮と同様の基底膜に接する細胞表面は WGA 陰性であり、基底面以外の細胞表面は WGA 強陽性を示した。旁基底細胞を含む有棘細胞は WGA 陽性、また顆粒層および角質層は WGA 陰性であった。SBA (図3d) 染色標本では、基底細胞は陰性、旁基底細胞を含む有棘層のすべての細胞が強陽性で、顆粒層および角質層は陰性であった。▶：基底膜。倍率：3a-3d；×600。

的で、ラット臼歯の接合上皮、歯肉上皮、および歯肉溝上皮について、4種類のレクチン PNA, MPA, WGA および SBA を用いて組織化学的に検討した。歯肉上皮と歯肉溝上皮のレクチン染色性はほぼ類似していた。歯肉上皮および歯肉溝上皮の染色性から、用いた4種のレクチンは2群に分類された。すなわち PNA および MPA は旁基底細胞と旁基底細胞に近接する1-2層の有棘細胞のみが陽性で多くの有棘細胞は陰性であり、一方 WGA および SBA は基底細胞または旁基底細胞から扁平な有棘細胞までのすべての有棘細胞

を染色した。以下前者を狭範囲認識型レクチン、後者を広範囲認識型レクチンと記述する。このような染色所見は従来の研究でも報告されており、広範囲認識型レクチンとして WGA, SBA, RCA-I⁽⁴⁾ などが、また狭範囲認識型レクチンとして UEA-I⁽⁵⁾, PNA, MPA などが知られている。また各層ごとのレクチン染色性について反応強度を省略して表示すると、基底細胞は WGA 陽性 PNA/MPA/SBA 陰性 (WGA のみが陽性)、旁基底細胞は WGA/PNA/MPA/SBA 陽性 (すべてのレクチンに陽性)、旁基底細胞を除く有棘細胞は

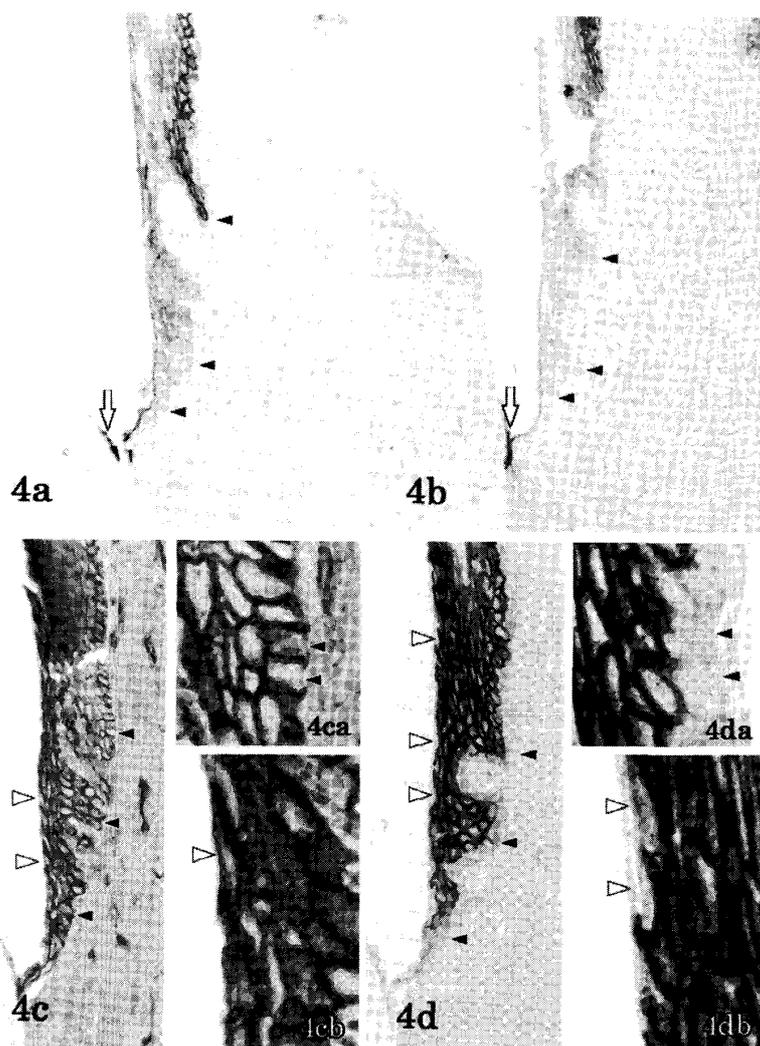


図4 3週齢ラットにおける一次接合上皮のレクチン染色像

3週齢ラットにおいて一次接合上皮の傍基底細胞，有棘細胞，および表層細胞はPNA(図4a)弱陽性またMPA(図4b)陰性であった。WGA(図4c)およびSBA(図4d)に対する一次接合上皮の染色性は10週齢ラット接合上皮(図2c, 2d)と類似の染色性を示し，有棘細胞はWGA/SBA陽性，基底細胞と表層細胞はWGA陽性SBA陰性であった(図4c, 4ca, 4cb, 4d, 4da, 4db)。⇨: エナメル・セメント境における象牙質表面のPNA/MPA陽性層，▲: 基底膜，▽: 表層細胞。倍率: 4a-4d; ×300, 4ca, 4cb, 4da, 4db; ×1,200。

PNA/MPA陰性WGA/SBA陽性(広範囲認識型レクチンのみが陽性)という特徴が認められる。歯肉上皮および歯肉溝上皮における有棘細胞のレクチン染色性をみると4種のレクチンはすべて傍基底細胞に陽性であり，有棘細胞は広範囲認識型レクチンWGAおよびSBAには陽性であるが，狭範囲認識型レクチンPNAおよびMPAには傍基底細胞に近接する1-2層の有棘細胞のみが陽性で多くの有棘細胞は陰性であった。傍基底細胞を含む有棘細胞のPNAおよびMPAに対する染色性に関する今回の結果はTsutsuiら¹⁵⁾，Abeら¹⁶⁾によるラット歯肉上皮，歯肉溝上皮における

PNAの報告，Bamptonら¹⁷⁾によるヒト歯肉上皮，歯肉溝上皮におけるPNAの報告と同様であったが，高田ら¹⁸⁾によるラット歯肉上皮，歯肉溝上皮におけるMPAの報告とは異なっていた。一般にレクチンの染色性は用いる標本の作成法により異なることが指摘されている。今回の研究では今日標準的に行われるパラホルムアルデヒドによる固定を用いたが，一方高田らはカルノア液による固定を用いており，基底層と有棘層がMPA陽性であるとした高田らの結果と本研究の結果との相違はこのためと思われる。有棘細胞に関するWGAおよびSBAの染色性については今回の結

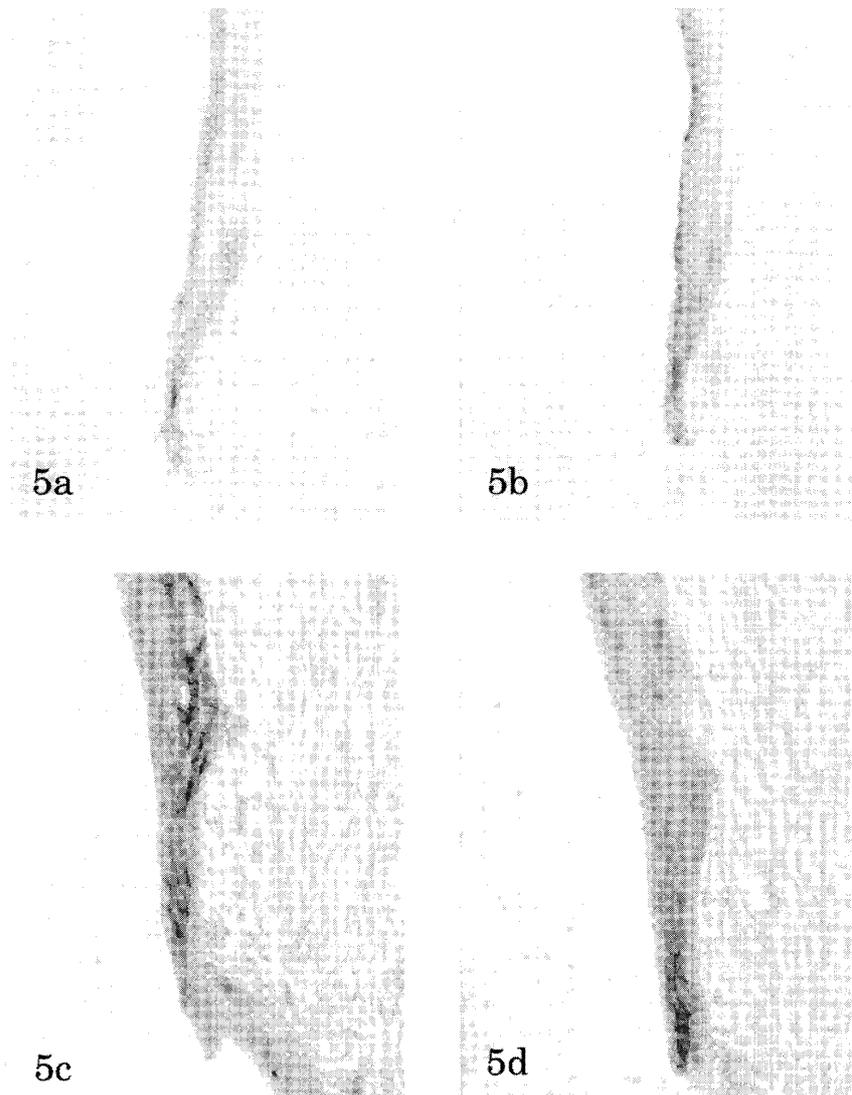


図5 18日齢ラットにおける退縮エナメル上皮のレクチン染色像
退縮エナメル上皮はすべてのレクチンに対して極めて弱い陽性反応を示した。倍率5a-5d; ×300.

果は従来の報告¹⁹⁻²¹⁾とほぼ同様であった。

今回の観察結果から、接合上皮の基底細胞は、歯肉上皮・歯肉溝上皮の基底細胞と同様に、WGA 陽性 SBA 陰性で、また PNA/MPA 陰性であった。このように基底細胞が多くのレクチンに対して陰性であることは従来の研究からも指摘されており^{15,16,18)}、糖鎖発現に関して基底細胞は未分化な細胞と考えられている。基底細胞は基底膜と接する細胞表面(基底面)と隣接する基底細胞または傍基底細胞と接する細胞表面(側面および頂面)を有し、電子顕微鏡的に基底面には半デスモソームが、また側面および頂面にはデスモソームが認められる。従来の報告では基底細胞層については単に WGA 陽性と記述され¹⁵⁾、またヒトの口腔

粘膜上皮において基底細胞が WGA と同様の染色性を示す RCA-I についても陽性とのみ記述され、基底面と側面および頂面を区別した記述はされていない²¹⁾。今回の研究で基底細胞の基底面が WGA 陰性、また側面および頂面は WGA 陽性という逆 U 字型の反応を示したことは、これらの細胞表面がその糖鎖構造においても異なることを示唆している。

従来の口腔粘膜上皮に関するレクチン組織化学的研究は、各種レクチンに対する染色性の変化を主として角質化との関係で検討・考察を行っている。これは口腔粘膜上皮が部位により角質化の程度が異なり、角質化という分化過程の正常・異常が生理的にもまた病理的にも重要と考えられるためであり、さらに角質化に

表2. 各種レクチンの染色性

PNA						
18日		3週	4週	6週	8週	10週
		歯肉上皮	歯肉上皮	歯肉上皮	歯肉上皮	歯肉上皮
	角質層	—	—	—	—	—
	顆粒層	—	—	±	±	±
	有棘層	—	—	—	—	—
	傍基底細胞層	±	±	++	++	++
	基底層	—	—	—	—	—
		歯肉溝上皮	歯肉溝上皮	歯肉溝上皮	歯肉溝上皮	歯肉溝上皮
	角質層	—	—	—	—	—
	顆粒層	—	—	±	±	±
	有棘層	—	—	—	—	—
	傍基底細胞層	±	±	++	++	++
	基底層	—	—	—	—	—
退縮エナメル上皮		一次接合上皮	一次接合上皮	接合上皮	接合上皮	接合上皮
	表層細胞	±	±	±	±	±
	有棘層	±	±	+	+	+
	傍基底細胞層	±	±	++	++	++
±	基底層	—	—	—	—	—
MPA						
18日		3週	4週	6週	8週	10週
		歯肉上皮	歯肉上皮	歯肉上皮	歯肉上皮	歯肉上皮
	角質層	—	—	—	—	—
	顆粒層	—	—	±	±	±
	有棘層	—	—	—	—	—
	傍基底細胞層	±	±	++	++	++
	基底層	—	—	—	—	—
		歯肉溝上皮	歯肉溝上皮	歯肉溝上皮	歯肉溝上皮	歯肉溝上皮
	角質層	—	—	—	—	—
	顆粒層	—	—	±	±	±
	有棘層	—	—	—	—	—
	傍基底細胞層	±	±	+	+	+
	基底層	—	—	—	—	—
退縮エナメル上皮		一次接合上皮	一次接合上皮	接合上皮	接合上皮	接合上皮
	表層細胞	—	—	±	±	±
	有棘層	—	—	+	+	+
	傍基底細胞層	—	—	++	++	++
±	基底層	—	—	—	—	—

WGA						
18日		3週	4週	6週	8週	10週
		歯肉上皮	歯肉上皮	歯肉上皮	歯肉上皮	歯肉上皮
	角質層	-	-	-	-	-
	顆粒層	-	-	-	-	-
	有棘層	+	+	+	+	+
	傍基底細胞層	+	+	+	+	+
	基底層	+	+	++	++	++
		歯肉溝上皮	歯肉溝上皮	歯肉溝上皮	歯肉溝上皮	歯肉溝上皮
	角質層	-	-	-	-	-
	顆粒層	-	-	-	-	-
	有棘層	+	+	+	+	+
	傍基底細胞層	+	+	+	+	+
	基底層	+	+	++	++	++
退縮エナメル上皮		一次接合上皮	一次接合上皮	接合上皮	接合上皮	接合上皮
	表層細胞	+	+	++	++	++
	有棘層	+	+	+	+	+
	傍基底細胞層	+	+	+	+	+
±	基底層	+	+	++	++	++

SBA						
18日		3週	4週	6週	8週	10週
		歯肉上皮	歯肉上皮	歯肉上皮	歯肉上皮	歯肉上皮
	角質層	-	-	-	-	-
	顆粒層	-	-	-	-	-
	有棘層	+	+	+	+	+
	傍基底細胞層	+	+	++	++	++
	基底層	-	-	-	-	-
		歯肉溝上皮	歯肉溝上皮	歯肉溝上皮	歯肉溝上皮	歯肉溝上皮
	角質層	-	-	-	-	-
	顆粒層	-	-	-	-	-
	有棘層	+	+	+	+	+
	傍基底細胞層	+	+	++	++	++
	基底層	-	-	-	-	-
退縮エナメル上皮		一次接合上皮	一次接合上皮	接合上皮	接合上皮	接合上皮
	表層細胞	-	-	-	-	-
	有棘層	+	+	++	++	++
	傍基底細胞層	+	+	++	++	++
±	基底層	-	-	-	-	-

関して基底細胞は各組織に特有な角化様式のプログラムを持つとする Intrinsic divergent theory および基底細胞の角化過程はメカニカルストレス・湿潤状態など組織周囲の環境により修飾を受けるとする External modulation theory の2つの仮説が唱えられていることによる²²⁾。横山ら¹⁴⁾はこのような観点から皮膚および口腔粘膜上皮の様々な部位についてレクチン組織化学的研究を行い、皮膚においては表皮と毛包との間で、また口腔粘膜上皮においては非角化型および正角化型上皮と錯角化型上皮との間でレクチン染色性が異なることから、ヒト口腔粘膜上皮における細胞表面の糖鎖構造は角化程度により修飾を受けることを示唆した。

今回の観察結果では、ラット臼歯接合上皮における有棘細胞の多くが用いたすべてのレクチンに対して陽性反応を示した。すなわち接合上皮の有棘細胞は広範囲認識型レクチン WGA/SBA に加えて、歯肉上皮および歯肉溝上皮では狭範囲認識型と判断された PNA/MPA も陽性反応を示した。接合上皮は歯肉上皮および歯肉溝上皮と異なり顆粒層および角質層を持たない非角化型上皮に属するので、今回の接合上皮に関する PNA および MPA による染色結果は前述の角質化の程度によりレクチン染色性が異なるという考え方と矛盾しない。一方歯肉上皮および歯肉溝上皮で広範囲認識型の WGA および SBA は接合上皮においても、広範囲の細胞を染色した。すなわち SBA は基底細胞および表層細胞を除くすべての細胞が強い陽性反応を示し、また WGA は基底細胞を含めすべての接合上皮細胞が陽性反応を示した。歯肉上皮および歯肉溝上皮と同様に WGA による基底細胞の染色性は逆 U 字型が多く認められた。今回の研究で注目すべき現象として、表層細胞の染色所見がある。低倍率で観察すると、一部の表層細胞が陰性と認められるが、高倍率で詳細に観察するとこの陰性部位は扁平な表層細胞が屋根瓦状に斜めに内基底膜に接しており、その接触面が WGA 陰性であることが明らかになった。この現象は外基底膜に接する基底細胞の基底面が陰性である、すなわち逆 U 字型であることと類似している。表層細胞が WGA にのみ陽性であり他のレクチンに陰性であることは、表層細胞が接合上皮、歯肉上皮および歯肉溝上皮の基底細胞に類似の特性を有することを示唆している。

前述のように接合上皮は歯肉上皮および歯肉溝上皮と異なり顆粒層および角質層を持たない非角化型上皮

に属するので、接合上皮のレクチン染色性は角化の程度によりレクチン染色性が修飾を受けているとの考察と矛盾しない。しかし接合上皮は他の非角化型口腔粘膜上皮と異なり、接合上皮最表層の細胞はエナメル質に接し、表層細胞とエナメル質の間には電子顕微鏡的に内基底膜と呼ばれる基底膜様構造を認める⁹⁾。免疫組織化学的研究により、基底膜を構成する細胞外基質蛋白のラミニンおよび IV 型コラーゲンは接合上皮の基底細胞に接する外基底膜に認められ、一方表層細胞が接する内基底膜には認められないことが報告されている²³⁾。近年ラミニンに関してアイソフォームの存在が明らかにされ、従来のラミニンはラミニン-1 と呼ばれてはほすすべての基底膜に認められるのに対し、ラミニン-5 は上皮細胞に特有であることが知られている²⁴⁾。接合上皮の内基底膜は免疫組織化学的にラミニン-5 を含み^{23,25)}、ラミニン-5 の mRNA は接合上皮細胞で強く、歯肉上皮細胞では低く発現されることが報告されている²³⁾。また、hemidesmosome-associated receptor protein インテグリン $\alpha 6\beta 4$ が表層細胞の基底面に局在することも報告されている²⁶⁾。以上の事実は、接合上皮における内基底膜と外基底膜の分子構成は異なるものの、表層細胞の基底面も基底細胞の基底面と同様に特殊化していることを示唆している。今回観察された表層細胞のレクチン染色性、すなわち表層細胞のエナメル質に接する細胞表面が WGA 陰性、その他の細胞表面が WGA 陽性という結果は、糖鎖構造においても表層細胞のエナメル質に接する細胞表面が特殊化していることを示唆するものと思われる。

歯根の形成過程においてエナメル・セメント境に隣接する上皮は退縮エナメル上皮から一次接合上皮を経て接合上皮に変化する。この過程における上皮組織のレクチン染色性に注目すると、退縮エナメル上皮はすべてのレクチンに対して極めて弱い陽性反応を示した。また 3-4 週齢ラットにおける一次接合上皮は広範囲認識型レクチン WGA と SBA に対して 6-10 週齢ラットにおける接合上皮と同様の染色所見を示したが、狭範囲認識型レクチン PNA に弱い陽性反応を、また MPA に陰性反応を示した。以上の結果は退縮エナメル上皮の糖鎖構造が 6-10 週齢ラットにおける接合上皮と異なることを示唆している。また一次接合上皮は退縮エナメル上皮と異なり弱い PNA 染色性を発現するものの、6-10 週齢ラットの接合上皮とも異なり MPA 染色性を発現するに至っていないが、WGA と SBA の染色性から判断される表層細胞を含めた一次

接合上皮の糖鎖は6-10週齢ラットと同様の分化構造を有することを示唆するものと思われる。このような観察結果は、歯の萌出時に退縮エナメル上皮から形成されるいわゆる一次接合上皮はその後の発生過程を経て二次接合上皮に分化するという従来の考え方⁷⁾と矛盾しない。

細胞表面の糖鎖は細胞の機能変化に対応して変わることが示唆されている¹⁹⁾。また歯肉上皮細胞のターンオーバータイムは早く、マウスでは約4-5日であることが示されている²⁷⁾。ラット臼歯における接合上皮細胞のターンオーバータイムがマウス歯肉上皮と同じと仮定すると、2週間で3回転のターンオーバーを経ることになる。4週齢ラットの一次接合上皮から6週齢ラットの二次接合上皮に至る過程で、接合上皮にどのような機能状態の変化がおこるのか、またその変化に上

皮細胞のターンオーバーがどの様に関与するかは興味ある問題として残されている。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始、ご指導、ご校閲を賜りました東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座・口腔分子生物学分野の加賀山學教授に謹んで感謝の意を表します。さらに、本研究に多大なご協力をいただきました江口正美、三上靖人両技官をはじめとする上記分野の皆様、および、歯科保存学分野の山本寿則博士、只友陽太郎大学院生に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は、日本解剖学会第46回東北・北海道連合支部学術集会(平成12年10月14日、15日、弘前)において発表した。

内容要旨: 18日-10週齢ウィスター系雄性ラットを用いて臼歯の歯肉・歯肉溝上皮および接合上皮について、その発生過程を含めて、4種のレクチン、Peanut agglutinin(PNA), Maclura Pomifera agglutinin(MPA), Wheat-germ agglutinin(WGA), Soybean agglutinin(SBA)を用いて、レクチン組織化学的検索を行った。接合上皮において、基底細胞はWGA陽性PNA/MPA陰性、旁基底細胞はPNA/MPA/SBA/WGA陽性、有棘細胞はPNA/MPA陰性(一部陽性)WGA/SBA陽性、表層細胞はWGA陽性SBA陰性PNA/MPA陽性であった。基底細胞はWGAのみが陽性反応を示し、基底細胞細胞表面は基底膜に接する細胞表面のみがWGA陰性という逆U字型パターンを示し、この特徴は表層細胞にも認められた。歯肉・歯肉溝上皮の基底細胞、旁基底細胞および有棘細胞は接合上皮の各細胞に類似のレクチン染色性を示したが、接合上皮に比べて有棘層におけるPNA/MPA陽性反応の範囲は狭かった。

一次接合上皮は旁基底細胞と有棘細胞がPNA弱陽性、MPA陰性、WGA陽性、SBA陽性で、基底細胞と表層細胞はWGA陽性、SBA陰性であり、退縮エナメル上皮はすべてのレクチンに対して極めて弱い陽性反応を示した。

以上の結果から、接合上皮の表層細胞は基底細胞に類似のレクチン染色性を示し、その特性は退縮エナメル上皮には認められず、一次接合上皮において発現される特性であることが示唆された。

文 献

- Schroeder, H.E., Listgarten, M.A.: The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontology* 2000. **13**: 91-120, 1997.
- Morgan, P.R., Johnson, N.W., Leigh, I.M., Ane Lane, E.B.: Structure of gingival epithelium as revealed by monoclonal antibodies to keratins. In: Lehner T, Cimasoni G, (edit.): *The borderland between caries and periodontal disease*. Vol. 3. Geneva: Médecine et Hygiène, 1986, pp. 47-59.
- Juhl, M., Reibel, J. and Stoltze, K.: Immunohistochemical distribution of keratin proteins in clinically healthy human gingival epithelia. *Scand. J. Dent. Res.* **97**: 159-170, 1989.
- Gao, Z. and Mackenzie, I.C.: Patterns of phenotypic expression of human junctional, gingival and reduced enamel epithelia in vivo and in vitro. *Epith. Cell Biol.* **1**: 156-167, 1992.
- Feghali-Assaly, M., Sawaf, M.H., Serres, G., Forest, N. and Ouhayoum, J.P.: Cytokeratin profile of the junctional epithelium in partially erupted teeth. *J. Periodont. Res.* **29**: 185-195, 1994.

- 6) Crawford, J.M.: Distribution of ICAM-1, LFA-3 and HLA-DR in healthy and diseased gingival tissues. *J. Periodont. Res.* **27**: 291-298, 1992.
- 7) Grant, D.A., Stern, I.B. and Listgarten, M.A.: Gingiva and dentogingival junction. *Periodontics in the tradition of Orban and Gottlieb ed. 6.* St. Louis, The C.V. Mosby Co. 1988, pp. 37-41.
- 8) 仁井谷 究: ラット臼歯部付着上皮の形成過程に関する超微形態学的研究. *日歯周誌* **21**: 111-133, 1979.
- 9) Schroeder H.E.: *Handbook of Microscopic Anatomy V/5: The Periodontium* 1986, pp. 256-296.
- 10) 浜田義信: ラット臼歯部付着上皮の発生に関する研究—酵素抗体法および電子顕微鏡による観察. *歯科学報* **88**: 633-663, 1988.
- 11) 平野 寛: 細胞表面の糖鎖と細胞認識. *代謝* **14**: 1743-1754, 1977.
- 12) 高崎誠一, 木幡 陽: 癌細胞の膜糖蛋白質とその糖鎖. *代謝* **16**: 1725-1734, 1979.
- 13) Hakomori, S.: Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* **50**: 732-764, 1981.
- 14) 横山 滋, 大野 純: 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. *Jpn. J. Oral Biol.* **35**: 371-385, 1993.
- 15) Tsutsui, J. and Wada, S.: Lectin binding patterns in regenerated rat junctional epithelium. *J. Osaka Dent. Univ.* **28**: 17-28, 1994.
- 16) Abe, Y., Hara, Y. and Kato, I.: Histological study of lectin binding in regenerated rat junctional epithelium. *J. Periodont. Res.* **30**: 238-244, 1995.
- 17) Bampton, J.L.M., Shirlaw, P.J., Topley, S., Weller, P. and Wilton, J.M.: Human junctional epithelium: demonstration of a new marker, its growth in vitro and characterization by lectin reactivity and keratin expression. *J. Invest. Dermatol.* **96**: 708-717, 1991.
- 18) 高田 隆, 二階宏昌, 宮内睦美, 伊東博司, 伊集院直邦: 歯肉各上皮におけるレクチン結合性の検討. *日歯周誌* **29**: 114, 1987.
- 19) Rittman, B.R., Mackenzie, I.C. and Rittman, G. A.: Lectin binding to murine oral mucosa and skin. *Arch. Oral Biol.* **27**: 1013-1019, 1982.
- 20) Takata, T., Nikai, H., Miyauchi, M., Ito, H., Kobayashi, J. and Ijuhina, N.: Lectin binding of rat gingival epithelia. *J. Periodont. Res.* **25**: 151-155, 1990.
- 21) 丸茂町子, 菅原由美子, 古内寿, 阪本真弥, 三條大助: 口腔扁平苔癬のビオチン化レクチンによる組織科学的研究. *日口診誌* **8**: 303-312, 1995.
- 22) 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**(1 Pt 1): 17-25, 1980.
- 23) Hormia, M., Sahlberg, C., Thesleff, I. and Airenne, T.: The epithelium-tooth interface—a basal lamina rich in laminin-5 and lacking other known laminin isoforms. *J. Dent. Res.* **77**(7): 1479-1485, 1998.
- 24) Ekblom, M., Falk, M., Salmivirta, K., Durbeek, M. and Ekblom, P.: Laminin isoforms and epithelial development. *Annals of the New York Academy of Sciences.* **857**: 194-211, 1998.
- 25) Mullen, L.M., Richards, D.W. and Quaranta, V.: Evidence that laminin-5 is a component of the tooth surface internal basal lamina, supporting epithelial cell adhesion. *J. Periodont. Res.* **34**(1): 16-24, 1999.
- 26) Hormia, M., Virtanen, I. and Quaranta, V.: Immunolocalization of integrin alpha 6 beta 4 in mouse junctional epithelium suggests an anchoring function to both the internal and the external basal lamina. *J. Dent. Res.* **71**(8): 1503-1508, 1992.
- 27) Skougard M.R.: Cell renewal, with special reference to the gingival epithelium. *Adv. Oral Biol.* **4**: 261-288, 1970.