

論文の内容の要旨

氏名：牧野 公 亮

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Infection of Epstein-Barr virus in periapical granulomas and its reactivation by butyric acid from

Porphyromonas endodontalis

(歯根肉芽腫内における Epstein-Barr virus 感染と *Porphyromonas endodontalis* から産生される酪酸による EBV 再活性化)

根尖性歯周炎は、根尖歯周組織の口腔常在菌感染により、根尖周囲の細胞から種々のサイトカインや成長因子が放出され、炎症が憎悪する。しかし、根管内の無菌化を図っても治癒しない症例や根管充填に問題がない場合でも抜歯が選択される症例が多く存在する。そこで、根尖性歯周炎の病因として細菌以外の微生物が関与している可能性が示唆される。近年、ヘルペスウイルス科の Epstein-Barr virus (EBV) が根尖病巣から検出されたとの報告がある。しかし、根尖病巣内での EBV 感染の有無や EBV 感染細胞の局在などについては明らかにはされていない。

EBV は、全人口の 90%以上に感染している。EBV は、伝染性単核症の原因となる発癌性ウイルスであり、バーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫や T 細胞リンパ腫において頻繁に検出される。EBV 感染症は、tumor necrosis factor (TNF) - α 、インターロイキン (IL) -1 β 、IL-8、IL-10、IL-12 と IL-17 のような炎症誘発性サイトカインの発現を誘発させることから、EBV は発癌だけではなく、局所炎症の病因とも関係していることが知られている。また、EBV 感染症は、慢性関節リウマチやシェーグレン症候群との相関関係が認められており、組織および細胞損傷に深い関係がある可能性が考えられる。

EBV は、生体内に感染した後に潜伏状態で存在している。潜伏感染の間、前初期遺伝子である BZLF-1 は、様々な因子によって活性化される。BZLF-1 は、EBV の DNA 複製のためのシグナルとなるため、EBV 再活性化に直接的な関わりを持つ。*n*-酪酸は BZLF-1 を発現させ、EBV の再活性化に関わることが知られている。酪酸は 4-炭素による短鎖脂肪酸であり、偏性嫌気性菌からの代謝産物として産生される。近年、歯周病原細菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*) の代謝産物である *n*-酪酸により EBV が再活性化されることが報告された。

根尖性歯周炎に起因するグラム陰性嫌気性菌である *Porphyromonas endodontalis* はリポ多糖類 (LPS) を産生し、炎症性サイトカインを誘導することで、根尖周囲の骨吸収を引き起こすことが知られている。*P. endodontalis* は、根尖性歯周炎の病態と非常に関わりが強く、根管治療によって除去すべき主要な細菌である。したがって根尖病巣内に感染した EBV は通常潜伏性であるが、根尖周囲組織に感染した *P. endodontalis* により EBV が再活性化され、根尖性歯周炎の病態および全身に様々な影響を与える可能性が示唆される。

そこで著者は、根尖病巣内での EBV 感染の証明および *P. endodontalis* による EBV 再活性化を明らかにすることを本研究の目的とした。

歯根肉芽腫における EBV 感染を明らかにするため、日本大学歯学部倫理委員会の承認の下、外科的歯内治療により摘出された根尖病巣組織 (n = 63) から、病理組織学的に歯根肉芽腫と診断された根尖病巣組織のみ (n = 50) を本研究に供試した。コントロールとして完全水平埋伏智歯の抜歯の際に採取した健常歯肉組織を用いた。試料は分割し、DNA 抽出およびパラフィン切片を作製した。そして、EBV 特異的プライマーを用いた real-time PCR により検量線を作成し、歯根肉芽腫における EBV DNA の定量的検出を行った。EBV DNA を高検出した試料のパラフィン切片を用い、組織内の EBV 感染細胞の証明となる EBV-encoded small RNA (EBER) 陽性細胞の局在を *in situ* hybridization 法により光学顕微鏡下で観察した。さらに EBER 陽性細胞を認めた同試料の連続切片を用い、免疫組織化学的方法により latent membrane protein 1 (LMP-1) 発現細胞を観察した。

上記と同試料から抽出した DNA を用いて歯根肉芽腫内に感染している *P. endodontalis* を real-time PCR によって検出した。また、*P. endodontalis* と EBV 再活性化との関連を調べるために、*P. endodontalis* (JCM8526 菌株) を培養し、その培養上清中の *n*-酪酸産生の有無をイオン排除高速液体クロマトグラフ

イー (HPLC) を用いて測定した。EBV 感染 B 細胞である Daudi に、*n*-酪酸 (1.0 mM) を添加し 48 時間後に、real-time PCR によって BZLF-1 mRNA の発現を検討した。また、同様の条件下で培養した Daudi に *P. endodontalis* の培養上清 (1.2 mM) を添加し 3, 6, 12, 24 時間培養後、real-time PCR を用いて時間毎の BZLF-1 mRNA の発現を比較検討した。

その結果、歯根肉芽腫 50 例中 38 例 (76.0%) で EBV DNA を検出した。*in situ* hybridization 法と免疫染色により歯根肉芽腫内の B 細胞と形質細胞に EBER および LMP-1 発現の局在が確認された。一方、健常歯肉組織には EBV DNA および EBV 感染細胞は認められなかった。また、歯根肉芽腫内における *P. endodontalis* の感染率は、50 例中 32 例 (64.0%) であった。*P. endodontalis* が産生する *n*-酪酸濃度を測定した結果、 23.38 ± 3.67 mM であった。次に、Daudi に *n*-酪酸 (1.0 mM) を添加したところ、無添加培養の Daudi と比較して BZLF-1 mRNA 発現の上昇が認められた。さらに *P. endodontalis* の培養上清 (1.2 mM) を添加し、経時的に比較したところ、時間依存的に BZLF-1 mRNA の発現の上昇が認められた。

以上のことから、歯根肉芽腫内の B 細胞および形質細胞に EBV が感染していることが明らかとなった。また、*P. endodontalis* が産生する *n*-酪酸によって、EBV の再活性化が起こることを確認した。したがって、本研究によって、歯根肉芽腫内に感染した EBV が根尖周囲組織に感染した *P. endodontalis* から産生される *n*-酪酸によって再活性化され、根尖性歯周炎の病態や進行に影響を与える可能性が示唆された。