

論文審査の結果の要旨

氏名：加藤 彩子

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Detection and quantitative analysis of Epstein-Barr virus DNA and *Porphyromonas gingivalis* associated with Japanese chronic periodontitis patients

（日本人慢性歯周炎患者における Epstein-Barr virus DNA と *Porphyromonas gingivalis* の検出と定量解析）

審査委員：（主査） 日本大学教授 博士（理学） 吉垣 純子

（副査） 日本大学教授 歯学博士 松島 潔

（副査） 日本大学教授 歯学博士 小方 頼昌

歯周炎は、歯肉縁下プラーク中の歯周病原菌の感染により惹起される炎症性病変である。細菌感染に対する生体の炎症反応は、免疫担当細胞により制御されるが、炎症性サイトカインやマトリックスメタロプロテアーゼが歯周組織中で過剰に産生されると、結合組織の破壊や骨吸収等の臨床症状が生じる。歯周病の臨床症状は様々で、長期間に少しずつ症状が進行する典型的な慢性歯周炎や、短期間に歯周組織の急速な破壊を生じる侵襲性歯周炎等、多様な病態像を示し、左右対称に限局した部位に垂直性骨欠損が認められる症例等、細菌感染だけでは説明できない病態像が存在する。

Epstein-Barr ウイルス（EBV）はヒトを宿主とし、唾液を介して感染し、B細胞内で成人の90%以上に潜伏感染することが知られている。また、EBVが、歯周炎の発症と進行に関与する可能性を示す報告が近年認められることから、本研究では、慢性歯周炎患者の歯肉溝滲出液中のEBV DNA および *Porphyromonas gingivalis* ゲノムの検出および定量解析を行い、歯周炎とEBVおよび歯周病原菌の関連性について考察した。

慢性歯周炎患者の5 mm以上の深いプロービングポケット深さ（PPD）部位と同患者の3 mm以下の浅いPPD部位に、滅菌ペーパーポイントを30秒間、3回挿入して歯肉溝滲出液を採取し、DNAを抽出した。また健常者の3 mm以下の健常PPD部位2ヶ所から同様の方法で歯肉溝滲出液を採取し、対照群として比較検討を行った。EBVおよび *P. gingivalis* に対する特異的プライマーを用いて、Nested および Multiplex PCR、リアルタイムPCR（SYBR Green法）を行い、EBVおよび *P. gingivalis* ゲノムの検出および定量を行った。また歯周外科手術中時に得られた炎症歯肉を用いて、*In Situ* ハイブリダイゼーションおよび免疫染色を行った。

85人の慢性歯周炎患者と20人の健常者から歯肉溝滲出液を採取し、EBVと *P. gingivalis* 検索した結果、EBVは慢性歯周炎患者の深いPPD 56部位（66%）、浅いPPD 41部位（48%）、健常者の浅いPPD 18部位（45%）で検出された。EBVの検出率に、男女差は認められなかった。*P. gingivalis* は、慢性歯周炎患者の深いPPD 55部位（65%）、浅いPPD 34部位（40%）、健常者の浅いPPD 16部位（40%）で検出され、深いPPD 34部位（40%）、浅いPPD 12部位（14%）、健常者の浅いPPD 5部位（13%）でEBVと *P. gingivalis* の共感染が認められた。慢性歯周炎患者の5 mm以上のPPD部位（85部位）では、EBVのみが20部位、*P. gingivalis* のみが19部位、EBVと *P. gingivalis* の両方が36部位で検出され、10部位では両方とも検出されなかった。Bleeding on probing（BOP）は、EBVと *P. gingivalis* が両方検出され

なかった 10 部位中 50%、EBV のみが検出された 20 部位中の 65%、*P. gingivalis* のみが検出された 19 部位中の 58%、EBV と *P. gingivalis* が両方検出された 36 部位中の 61% で検出されたが、BOP の発現率に有意差は認められなかった。EBV と *P. gingivalis* が、5 mm 以上の PPD 部位に共感染しているオッズ比は 4.67 であった。歯周外科手術中時に採取した炎症歯肉を、B 細胞マーカーである CD19 抗体で染色すると、炎症性細胞浸潤を認める上皮下結合組織中に B 細胞の陽性反応が多数認められた。さらに、EBV (EBER) プローブで *In Situ Hybridization* を行った結果、EBER 染色は、B 細胞の陽性反応部位とほぼ重複して認められることが明らかになった。

次に、25 名の慢性歯周炎患者の 5 mm 以上の深い PPD 部位から歯肉溝滲出液を採取し、EBV と *P. gingivalis* のゲノムコピー数を検索すると、 $3.74 \times 10^3 \sim 2.83 \times 10^9$ copies/ml および $2.73 \times 10^5 \sim 6.65 \times 10^9$ copies/ml であった。同一患者の 3 mm 以下の浅い PPD から採取したの歯肉溝滲出液中の EBV と *P. gingivalis* のゲノムコピー数は $4.37 \times 10^4 \sim 9.13 \times 10^6$ copies/ml および $3.97 \times 10^6 \sim 2.13 \times 10^9$ copies/ml であった。一方、13 人の健常者の 3 mm 以下の PPD からの歯肉溝滲出液中の EBV および *P. gingivalis* のゲノムコピー数は、 $1.27 \times 10^4 \sim 2.66 \times 10^8$ copies/ml および $4.16 \times 10^6 \sim 6.62 \times 10^9$ copies/ml であった。EBV のゲノムコピー数は、慢性歯周炎患者の深い PPD 部位では、浅い PPD 部位に比べて約 300 倍、*P. gingivalis* のゲノムコピー数は約 3 倍高値を示した。EBV は、慢性歯周炎患者の深い PPD の 20 部位 (80%)、浅い PPD の 10 部位 (40%)、健常者の浅い PPD の 13 部位 (50%) で検出された。*P. gingivalis* は、慢性歯周炎患者の深い PPD の 20 部位 (80%)、浅い PPD の 9 部位 (36%)、健常者の浅い PPD の 7 部位 (27%) で検出された。さらに、慢性歯周炎患者の深い PPD の 17 部位 (68%)、浅い PPD の 3 部位 (12%)、健常者の浅い PPD の 4 部位 (15%) では、EBV と *P. gingivalis* の共感染が認められ、慢性歯周炎の進行した病変部位で最も高値を示した。

以上の結果から、歯周病変部位には、EBV と *P. gingivalis* が高率で共存し、歯周組織の破壊に関与している可能性が示唆された。EBV は、90%以上の健康成人に潜伏感染し、なおかつ、*P. gingivalis* が共感染していることから、歯周病原菌の代謝産物である酪酸等が EBV を再活性化する可能性が考えられた。EBV の再活性化は、歯周組織でのサイトカインの異常産生を誘導し、歯周病の進行や歯槽骨吸収に関与すると考えられる。ウイルスと歯周炎の発症・進行のメカニズムを解明することは、新規の歯周病の診断や治療法の開発に役立つと考えられ、歯周治療の発展に大きく寄与するものである。

よって本論文の著者は、博士 (歯学) の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成 27 年 10 月 22 日