

## 論文の内容の要旨

氏名：氷 見 一 馬

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Epstein–Barr virus reactivated by persistent apical periodontal pathogens induces interferon- $\gamma$  expression

（根尖性歯周炎病原体により再活性化された Epstein–Barr virus は interferon- $\gamma$  の発現を誘導する）

Epstein-Barr Virus (EBV) は、Burkitt's リンパ腫患者のリンパ球で最初に発見されたヒトヘルペスウイルス 4 型であり、世界中の 90% 以上の人々が感染している。EBV は近年、様々な自己免疫疾患の原因となっていることが報告され、歯科領域においても潜伏感染した EBV が *Porphyromonas endodontalis* の代謝産物である *n*-酪酸によって再活性化することなどが明らかにされている。しかし、根尖病巣中には *P. endodontalis* 以外にも *n*-酪酸を産生する菌が存在しており、それらの菌が EBV の再活性化に関与している可能性が考えられるが、未だ詳細は不明である。

そこで著者は、難治性根尖性歯周炎の原因菌により、根尖病巣内で EBV の再活性化および Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) の発現を誘導する可能性について検討した。

根管治療を繰り返しても治癒せず、日本大学歯学部附属歯科病院に紹介された患者(n=66)を被験者とし、外科的歯内治療が適応とされた患者から採取した根尖病巣組織を供試試料とした。採取試料は直ちに 3 分割し、それぞれ DNA と RNA の抽出およびホルマリン固定した後パラフィン切片の作製に供試した。すべての試料に対して HE 染色を行い、歯根肉芽腫 (n=50) と病理診断された組織を本研究に用いた。また、完全水平埋伏智歯の抜去の際に採取した健常歯肉組織 (n=10) をコントロールとして用いた。健常歯肉組織も同様に分割し、DNA および RNA の抽出、パラフィン切片を作製した。試料の採取にあたっては歯学部倫理委員会の承諾 (EP16D026) を得て実施した。

はじめに、根尖病巣中の細胞に EBV と難治性根尖性歯周炎原因菌が感染していることを確認するため、EBV 特異的プライマーを用いて Real-time PCR 法により、歯根肉芽腫および健常歯肉組織における EBV DNA を検出した。同時に EBV DNA を 10 倍希釈したもの ( $1 \times 10^3 \sim 10^7$  copy) を用いて PCR 反応を行い、検量線を作成し、歯根肉芽腫中に検出された EBV DNA のコピー数を算出した。同様に、難治性根尖性歯周炎原因菌として、*Fusobacterium nucleatum* (ATCC25586 株)、*Staphylococcus epidermidis* (IID886 株)、*Streptococcus mitis* (ATCC49456 株)、*Prevotella intermedia* (ATCC25611 株)、*Actinomyces naeslundii* (ATCC12104 株)、*Enterococcus faecalis* (ATCC19433)、*Candida albicans* (ATCC18804) の 7 菌種を用い、各々を適切な培養条件で培養し、特異的プライマーを用いて Real-time PCR 法により検量線を作製、歯根肉芽腫および健常歯肉組織における各病原体の定量的検出を行った。

EBV が再活性化していることを確認するため、同組織より mRNA を抽出し、cDNA に変換後、EBV の再活性化遺伝子である BZLF-1 mRNA 特異的プライマーを用いて Real-time PCR 法を行い、BZLF-1 mRNA を検出した。また、BZLF-1 mRNA 発現量を EBV DNA 発現量および難治性根尖性歯周炎の病原体の発現量と比較検討し、Pearson's 相関係数を用いて有意水準 0.05 の条件で統計学的検定を行った。

次に、ヒト歯根肉芽腫中における EBV の再活性化を確認するため、パラフィン切片を製作し、マウス抗ヒト latent membrane protein (LMP-1) (膜タンパク) モノクローナル抗体およびマウス抗ヒト ZEBRA (BZLF-1 発現タンパク) モノクローナル抗体を用いて、免疫染色を行い、両者を検索した。さらに、上記 2 種類の抗体および B 細胞マーカーであるウサギ抗ヒト CD79a モノクローナル抗体を用いて蛍光抗体法により蛍光二重染色を行った。

難治性根尖性歯周炎の病原菌から産生される *n*-酪酸値を検索するため 7 菌種の培養上清を回収し、イオン排除高速液体クロマトグラフィーを用いて各菌の酪酸値を計測した。その結果から、最も *n*-酪酸値が高かった *F. nucleatum* の培養上清を用いて、EBV 感染 B 細胞である Daudi を 24 時間刺激後、各々

細胞から mRNA を抽出し cDNA に変換後、BZLF-1 mRNA 特異的プライマーを用いた Real-time PCR 法にて BZLF-1 mRNA を検出した。Steel test を用いて有意水準 0.05 の条件で統計学的検定を行った。同様に、24 時間培養後の培養液を回収し、Western blot 法により ZEBRA 発現も検討した。

続いて、BZLF-1-Luc プラスミドが組み込まれた B95-8-221 細胞を用いて *F. nucleatum* および *P. intermedia* の培養上清を 24 時間添加した後、Luciferase assay により BZLF-1 発現の誘導能を検討し、Steel test を用いて有意水準 0.05 の条件で統計学的検定を行った。

最後に、*F. nucleatum* の代謝産物である *n*-酪酸により EBV の再活性化と炎症増悪の関係を検討するため、Daudi を用い、LPS を除去した *F. nucleatum* の培養上清および除去を行わなかった *F. nucleatum* の培養上清を 24 時間添加した後、ELISA 法にて IFN- $\gamma$  発現量を測定し、Steel-Dwass test を用いて有意水準 0.05 の条件で統計学的検定を行った。

その結果、EBV DNA および BZLF-1 mRNA は歯根肉芽腫 50 症例中 47 症例で検出され、健常歯肉組織では検出されなかった。EBV DNA と *F. nucleatum* は BZLF-1 mRNA 発現において有意な相関を認めた。一方、*P. intermedia* と BZLF-1 mRNA 発現ではわずかな相関を認め、その他の菌種での相関は認められなかった。また、歯根肉芽腫中の CD79a 陽性 B 細胞では、LMP-1 および ZEBRA の発現を観察したが、健常歯肉組織で発現は観察されなかった。*n*-酪酸の産生は *F. nucleatum* が最も高く、*P. intermedia* で最も低かった。その他の菌に関しては *n*-酪酸の産生は認められなかった。*F. nucleatum* の上清はルシフェラーゼ活性を有意に増加させたが、*P. intermedia* では活性は認められなかった。さらに、*F. nucleatum* の上清は Daudi による BZLF-1 mRNA および ZEBRA の発現も誘導し、EBV 再活性化に密接に関与していることが示された。また、LPS を除去した *F. nucleatum* の上清により Daudi による IFN- $\gamma$  の発現が誘導されたことから、*F. nucleatum* の産生する酪酸は IFN- $\gamma$  発現を誘導することが示唆された。

以上のことから、7 菌種のうち *F. nucleatum* が最も EBV を再活性化し IFN- $\gamma$  の発現を誘導することにより、根尖性歯周炎の炎症を増悪、難治化させている可能性が示唆された。