

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462897

研究課題名(和文) 難治性根尖性歯周炎におけるEpstein-Barrウイルスの再活性化に関する検討

研究課題名(英文) Reactivation of Epstein-Barr virus by periapical periodontitis-related bacteria

研究代表者

武市 収 (TAKEICHI, Osamu)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：10277460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：根尖病巣(63例)のうち、50例が歯根肉芽腫であり、そのうち38例(76%)でEBV DNAが確認された。9例の歯根肉芽腫に対して6例にEBER mRNAおよびLMP-1タンパク発現細胞が観察された。歯根肉芽腫9例中6例からPolphylomonas endodontalisが検出され、その培養上清から高濃度のn-酪酸が検出された。EBV感染細胞にこの培養上清を添加したところ、有意にZEBRAの発現が上昇した。以上の結果から、歯根肉芽腫にEBVが感染しており、歯根肉芽腫に感染したP. endodontalisが産生するn-酪酸によってEBVが再活性化することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Sixty three periapical lesions were examined, and fifty periapical granulomas were obtained. Thirty eight out of 50 periapical granulomas involved Epstein-Barr virus (EBV). Six out of 9 samples showed EBER mRNA and LMP-1 protein expressing cells. Six out of 9 samples involved Polphylomonas endodontalis. As determined using high performance liquid chromatography, n-butylic acid was most produced in the culture supernatants of P. endodontalis. EBV-infected cells were cultured with the culture supernatants of P. endodontalis, and the cells expressed ZEBRA protein in the dose dependent manner. According to these findings, it is concluded that periapical granulomas were infected with EBV, and EBV was reactivated by n-butyric acid produced from P. endodontalis.

研究分野：歯内療法

キーワード：根尖性歯周炎 歯根肉芽腫 ウイルス 再活性化 Porphylomonas endodontalis EBV in situ hybridization ZEBRA

1. 研究開始当初の背景

- (1) 近年、根管からヒトヘルペスウイルスが検出された (Oral Microbiol Immunol, 18, 104, 2003)。そのため、根管に侵入したウイルスが根尖周囲の組織に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆される。
- (2) 本研究では、数あるヘルペスウイルスの中でも特に Epstein-Barr ウイルス (EBV) に着目した。EBV はヒトに感染したのち、直ちに病原性を示さず潜伏性を示す。しかし、細菌の代謝産物である酪酸の刺激を受けることで再活性化する (Vilol, 107, 557, 1980)。EBV が再活性化すると、炎症性細胞に作用し、炎症性サイトカインや成長因子の発現を誘導する。また、ヘルパーT 細胞の機能低下とサプレッサーT 細胞の機能亢進をきたすため、根尖周囲の組織破壊や骨吸収を惹起することが予想される。
- (3) ウイルスは一度感染すると完全に除去することが難しいことから、EBV が根尖性歯周炎を惹起したり、根尖部の炎症を難治化させたりしている可能性が示唆される。しかし、EBV が細胞に感染していることを証明した研究はなく、また根尖病巣内で EBV の再活性化を誘導する因子については未だに検討されていない。

2. 研究の目的

根尖性歯周炎は口腔内常在菌の感染によって惹起されるが、根管の無菌化を図っても治癒せず、抜歯が選択されることもある。従って、根尖性歯周炎の発症には、細菌以外の微生物が関与している可能性が示唆されるが、そのような研究はほとんど見られない。そこで申請者は、根管にウイルスが感染することにより、炎症の遷延を促している可能性に着目した。本研究の目的は、根尖性歯周炎における Epstein-Barr ウイルス (EBV) の感染細胞を同定し、加えて潜伏期 EBV の再活性化のメカニズムを解明することで、新たな治療法開発の一助とすることである。

3. 研究の方法

- (1) 供試試料：難治性根尖性歯周炎患者に対する根尖切除術時に摘出した根尖病巣組織を本研究に使用した。また、完全埋伏抜歯時に摘出される歯肉を健常歯肉として使用した。
- (2) 病理組織学的検索：得られた根尖病巣組織と健常歯肉組織を直ちに3分割し、一つはホルマリン固定を行ったのち、パラフィン切片を作製した。その後、ヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡下で精査した。
- (3) EBV および *Porphyromonas endodontalis* の定量的検索：real time PCR 法を用いて、供試試料中の EBV および *P. endodontalis* の検出を行った。また、コピー数既知の EBV DNA および *P. endodontalis* を用いて検量線を作製し、供試試料中の EBV のコ

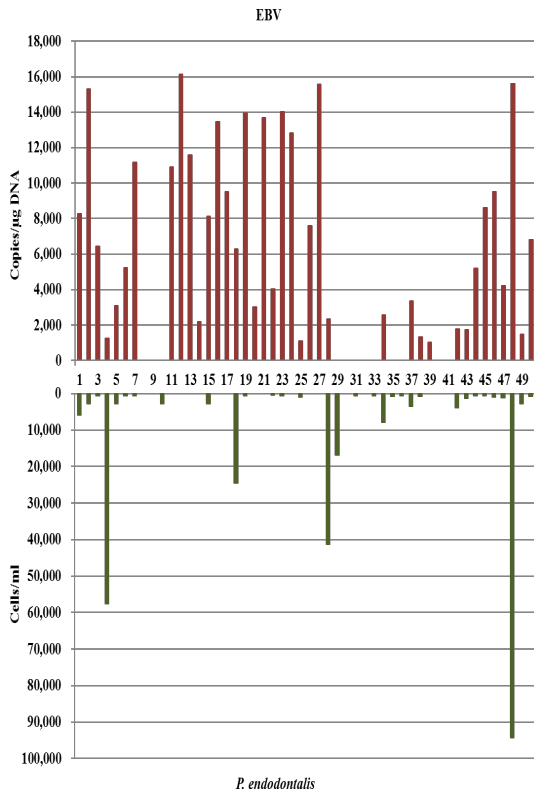
ピー数および *P. endodontalis* の細胞数を算定した。

- (4) EBV 感染の検索：*in situ* hybridization 法を用いて EBV-encoded small RNA (EBER) mRNA の発現細胞を検索した。また、連続切片を用いて LMP-1 の免疫組織化学的染色を行った。
- (5) *P. endodontalis* からの短鎖脂肪酸産生：*P. endodontalis* の培養液を回収し、高速液体クロマトグラフィーを用いて短鎖脂肪酸量を定量した。
- (6) ルシフェラーゼアッセイ：BZLF-1 プロモーター領域をルシフェラーゼ発現ベクターに挿入し、その後 B95 細胞に遺伝子導入した (B95-8-221 luc 細胞の作製)。 *P. endodontalis* の培養液または市販の酪酸を用いて B95-8-221 細胞を培養し、その後ルシフェラーゼ活性を測定した。
- (7) EBV 感染細胞を用いた BZLF-1 mRNA 発現の検討：Daudi 細胞に *P. endodontalis* の培養液または市販の酪酸を用いて刺激を行った。細胞を回収し BZLF-1 mRNA の発現を real-time PCR を用いて検索した。また、培養液を回収し、ZEBRA の発現をウエスタンブロット法を用いて検索した。
- (8) 歯根肉芽腫中の EBV、*P. endodontalis* DNA および BZLF-1 mRNA 発現の検討：歯根肉芽腫から DNA および mRNA を抽出し、それぞれ EBV と *P. endodontalis* DNA および BZLF-1 mRNA 発現を real-time PCR 法で検索した。

4. 研究成果

- (1) 供試試料：難治性根尖性歯周炎と診断され、根尖切除術が適応とされた患者 63 名から根尖病巣組織を摘出した。
また、健常歯肉組織 10 例を埋伏智歯の抜去時に摘出し、コントロールとした。
- (2) 病理組織学的検索：得られた根尖病巣組織 63 例を直ちに3分割し、一つはホルマリン固定を行ったのち、パラフィン切片を作製した。その後、ヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡で精査したところ、歯根肉芽腫 50 例、歯根嚢胞 13 例であった。以後の検索には歯根肉芽腫を使用した。
また、健常歯肉組織には少数の炎症性細胞浸潤を認めた。
- (3) EBV および *P. endodontalis* の定量的検出：既知の濃度の EBV (1×10^6 コピー) および *P. endodontalis* (1×10^8 個) から DNA を抽出したのち、それぞれ 10 倍ずつ段階希釈し、SYBR green を用いた real-time PCR 法を行った。その後片対数グラフを用いて検量線を作製した。
- (4) 歯根肉芽腫からの EBV および *P. endodontalis* の定量的検出：歯根肉芽腫から DNA を抽出し、real-time PCR 法で EBV および *P. endodontalis* の検出を行った際、(3) で実施した定量的検索を同時

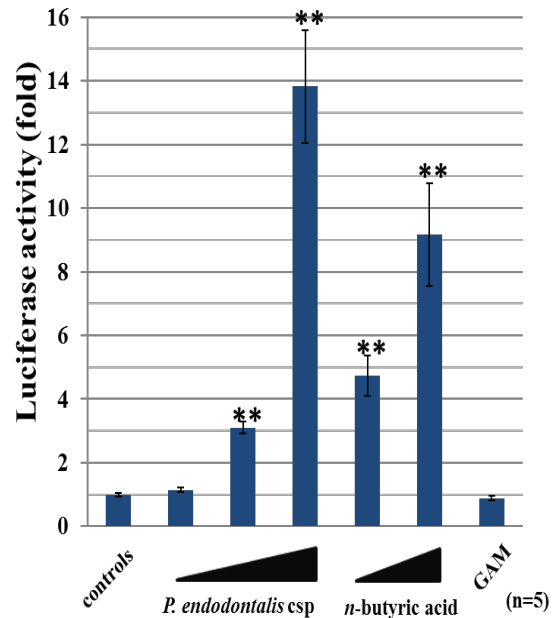
に行った。その結果、歯根肉芽腫 50 例中 38 例 (76.0%) に EBV が検出されたが、健常歯肉からは 1 例も検出されなかった。また、歯根肉芽腫 50 例中 32 例 (62%) に *P. endodontalis* が検出され、健常歯肉でも 10 例中 5 例 (50.0%) に検出された。



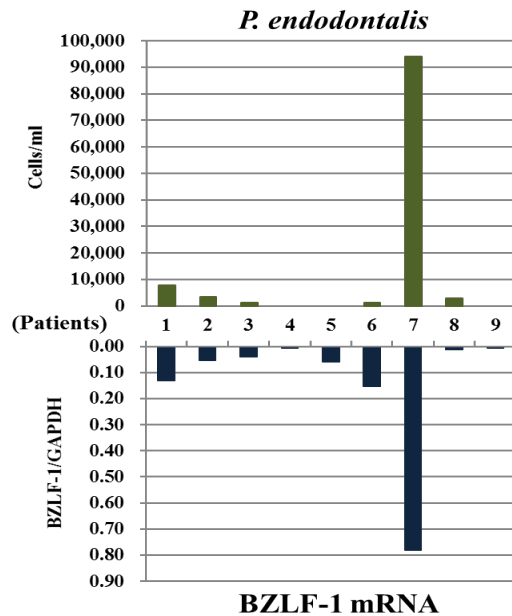
- (5) EBER *in situ* hybridization 法：歯根肉芽腫および健常歯肉組織のパラフィン切片を用いて *in situ* hybridization 法を行ったところ、歯根肉芽腫 9 例中 6 例 (66.6%) に EBER mRNA を発現する細胞を検出した。発現細胞は主に B 細胞であり、形質細胞からの発現も観察された。一方、健常歯肉組織では EBER mRNA を発現する細胞は見られなかった。
- (6) 免疫組織化学的検索：LMP-1 タンパクの発現細胞を検索するため、ABC 法を用いた免疫染色法を行ったところ、EBER mRNA を発現していた組織の全てで LMP-1 陽性を認め、陽性細胞は B 細胞と形質細胞であった。なお、健常歯肉組織では LMP-1 陽性細胞を認めなかった。
- (7) *P. endodontalis* による短鎖脂肪酸の産生：*P. endodontalis* を培養したのち培養液を回収し、高速液体クロマトグラフィーを用いて短鎖脂肪酸量を定量した。その結果、n-酪酸が最も高濃度に産生されており、その濃度は 23.38nM であった。そのほか、酢酸 (18.95nM)、プロピオン酸 (9.4nM)、乳酸 (0.94nM)、コハク酸

(0.61nM)、葉酸 (0.36nM) が検出されたが、iso 酪酸および吉草酸は検出されなかった。

- (8) ルシフェラーゼアッセイ：B95-8-221 luc 細胞に市販の酪酸または *P. endodontalis* の培養液を加えて 48 時間培養した。細胞を回収したのちルシフェラーゼ活性を測定したところ、市販の酪酸および *P. endodontalis* の培養液の濃度依存的に活性は上昇した。



- (9) EBV 感染 B 細胞による BZLF-1 mRNA および ZEBRA タンパク発現：Daudi 細胞に市販の酪酸または *P. endodontalis* の培養液を加えて培養した。その後、RNA を抽出し、real-time PCR 法で検索したところ、市販の酪酸または *P. endodontalis* の培養液の濃度依存的に BZLF-1 mRNA の発現が上昇した。また、Daudi 細胞の培養液をウエスタンブロット法で検索したところ、市販の酪酸または *P. endodontalis* の培養液の濃度依存的に ZEBRA のタンパク発現が上昇した。
- (10) 歯根肉芽腫中の BZLF-1 mRNA 発現：歯根肉芽腫 10 例から RNA を抽出し、BZLF-1 mRNA の発現を real-time PCR 法で検索したところ、すべての症例で BZLF-1 mRNA 発現が確認された。また、BZLF-1 発現と EBV のコピー数に正の相関関係が認められた。



(11) 考 察： 以上の結果から、以下のよう
に考察した。

EBV は歯根肉芽腫中の B 細胞および
形質細胞に感染している。 *P.*
endodontalis は高濃度の n-酪酸を産生し、
それによって EBV が再活性化する。
n-酪酸の濃度依存的に EBV の再活性化
が行われる。 健常歯肉組織では EBV
の感染もなく、EBV の再活性化に必要な
n-酪酸の産生も見られない。

(12) 結 論： 歯根肉芽腫中で EBV は潜伏
感染しているが、根尖性歯周炎病原細菌
である *P. endodontalis* によって再活性化
し、炎症の遷延に深く関与していること
が推察された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
は下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Kosuke Makino, Osamu Takeichi,
Keisuke Hatori, Kenichi Imai,
Kuniyasu Ochiai, Bunnai Ogiso,
Epstein-Barr Virus Infection in
Chronically Inflamed Periapical
Granulomas, PLoS One, 査読有, 10(4),
2015, e0121548

[学会発表](計 9 件)

武市 収 他、難治性根尖性歯周炎に
感染した *Porphyromonas endodontalis*
による Epstein-Barr virus 再活性化、
第 37 回日本歯内療法学会、2016 年 7
月 23 日、ウインクあいち(愛知県・名
古屋市)

Osamu Takeichi et al., *In situ*
detection of Epstein-Barr
virus-encoded small RNA in
periapical granulomas, 17th Biennial
Congress of the European Society of
Endodontology, September 18, 2015,
Barcelona (Spain)

武市 収 他、*Porphyromonas*
endodontalis は Epstein-Barr virus を
再活性化する、第 142 回春季日本歯科
保存学会、2015 年 6 月 25 日、北九州国
際会議場および西日本総合展示場(福岡
県・北九州市)

Osamu Takeichi et al.,
Inflammatory and anti-
inflammatory reactions in
periapical granulomas, 93rd General
Session and Exhibition of the IADR,
March 11-14, 2015, Boston (USA)

Osamu Takeichi et al., The evidence
of the Epstein-Barr virus infection
in periapical granulomas, 93rd
General Session and Exhibition of the
IADR, March 11-14, 2015, Boston
(USA)

Osamu Takeichi et al., Prevalence of
Epstein-Barr virus in periapical
granulomas from Japanese patients,
7th International Association for
Dental Research/Annual Congress of
the Pan European Region, September
12, 2014, Dubrovnik (Croatia)

武市 収 他、Epstein-Barr virus は歯
根肉芽腫の B 細胞に感染する、第 35 回
日本歯内療法学会学術大会、2014 年 7
月 12 日、朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)

武市 収 他、歯根肉芽腫における
Epstein-Barr virus 感染の検出、第 140
回春季日本歯科保存学会、2014 年 6 月
19 日、滋賀県立芸術劇場びわ湖ホール
(滋賀県・大津市)

武市 収 他、歯根肉芽腫における
Epstein-Barr virus 感染の検出、第 66
回日本大学歯学会総会、2014 年 5 月 18
日、日本大学歯学部(東京都・千代田区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武市 収 (TAKEICHI, Osamu)
日本大学・歯学部・准教授
研究者番号：10277460

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

牧野 公亮 (MAKINO, Kosuke)
小林 寛 (KOBAYASHI, Hiroshi)
井比 陽菜 (IBI, Haruna)