

学 位 論 文 題 名

ヒト口腔内因子による潜在 EB ウイルスの活性化

学位論文内容の要旨

【目 的】

EB ウイルス (EBV) はヘルペスウイルス科に属し、既感染者の口腔内にしばしば排出されつつ、広くヒトに不顕性持続感染しているきわめて普遍的なウイルスである。一方、EBV 関連ヒト悪性腫瘍であるバーキットリンパ腫は疫学的に著しい特徴を有し、いわゆるバーキットベルトと呼ばれる赤道アフリカに多発する。このような EBV 普遍性とバーキットリンパ腫の局地多発性という gap から、赤道アフリカには EBV の発癌活性を促進する環境因子の存在が想定される。近年、北大と京大の詳細な共同疫学調査により、バーキットリンパ腫集中域に一致して密生する特異的な植物種、*Euphorbia tirucalli* が見いだされた。この植物は民間薬として利用され、また周辺土壌や飲料水の中に本植物の主成分である 4 - deoxyphorbol ester (4 - DPE) が高濃度に検出されることから、4 - DPE は経口的に地域住民の体内に摂取されているものと考えられる。さらに、4 - DPE は腫瘍プロモーターとしての性質を有していることから、バーキットリンパ腫発生の重要な環境危険因子と考えられる。そこで今回このような環境因子に加え、EBV 活性化に影響を及ぼす生体側因子の検索を目的として、主要な EBV 増殖部位である口腔内に着目、唾液中に存在し単独あるいは 4 - DPE と共同して潜在 EBV 活性化の促進に働く口腔内因子の同定とその性状解析を行った。

【材料と方法】

1. 唾液：起床時採取した唾液を 35, 00 g, 30 分間の遠心上清を、0.45 μ m メンブレンフィルターによりろ過滅菌後、使用時まで -70°C に保存した。
2. 細胞：EBV 関連抗原の発現を検索するための細胞はバーキットリンパ腫由来 EBV 非産生系細胞株である Raji 細胞、バーキットリンパ腫由来 EBV 低許容性細胞株である P3HR - 1 細胞を使用した。
3. 4 - deoxyphorbol ester (4 - DPE)：*Euphorbia tirucalli* のメタノール抽出液を、シリカゲルクロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーで精製後、dimethylsulfoxide

(DMSO) に溶解後、RPMI 培地で希釈し、40ng/*ml* で使用した。

4. EBV 抗原の発現誘導と検出 : Raji 細胞, P3HR - 1 細胞 1×10^6 / *ml* に 4 - DPE 40ng / *ml* と RPMI 培地で希釈した唾液を 50%, 10% となるように添加して 37°C, 2 日間培養を行った。EBV 抗原の検出は抗早期抗原 (EA - DR), 抗ウイルスカプシド抗原 (VCA) モノクローナル抗体による蛍光抗体染色法および EBV 抗体陽性ヒト血清を用いるウエスタンブロット法により EA, VCA 発現の変化を検索した。唾液成分の分画は遠心分離による限外ろ過, ゲルろ過法にて行った。また唾液中の低級脂肪酸の検出はガスクロマトグラフィーにて行い, さらに各低級脂肪酸の検出はこれらの精製標品を用いて EA 発現の増強効果を検索した。

【結果と考察】

1) 唾液による早期抗原 (EA) の増強効果

未処理 Raji 細胞における EA 陽性細胞率の 0.2% と比較すると, Raji 細胞に 4 - DPE 単独添加した場合は 0.9% とわずかに EA 発現の増強効果が認められたが, Raji 細胞に唾液 50% および唾液 10% と 4 - DPE を共存して添加すると著大な EA 発現の増強効果が認められた。また EBV 未感染, 既感染にかかわらず, 唾液中には EA 発現の増強効果が認められた。さらに唾液単独添加でも EA 発現の誘導が認められる例もあった。EBV 発現の増強因子が持続的に唾液中に排出されているかどうかを検索するために, 同一人物から起床時に連続して採取した唾液の EA 発現の増強効果を検索すると, Raji 細胞に 4 - DPE 単独添加したものと比較すると 4 - DPE と唾液 50% および唾液 10% を共存して添加した場合はいずれにおいても著大な EA 発現の増強効果が認められた。このことより, 本活性因子は, ほぼ常時口腔内に存在していることが認められた。EA の他に VCA の発現の増強効果について検索するためにバーキットリンパ腫由来低許容性細胞株である P 3 HR - 1 細胞を使用して同様に施行した。その結果, P 3 HR - 1 細胞に 4 - DPE 単独添加したものと比較すると, 4 - DPE と唾液 10% および唾液 50% 添加したものはいずれにおいても著大な EA, VCA 発現の著しい増強効果が認められた。またウエスタンブロット法により EA 発現の誘導を検索した結果, Raji 細胞に 4 - DPE と唾液 50% を共存して添加したレーンには EA バンドが検出され, 蛍光抗体法での結果と一致していた。

2) 唾液中の EBV 活性因子の性状解析

本活性因子の性状を解析するために口腔内洗浄前後の唾液の EA 発現の増強効果を比較すると, 洗浄前の唾液は洗浄後の唾液と比較して著しい EA 発現の増強効果が認められた。さらにフィルターを通さずに 48 時間インキュベートを行った唾液は, フィルターを通して 48 時間インキュベートを行った唾液よりも著大な EA 発現の増強効果が認められた。これらのことより,

本活性因子は口腔内に長時間滞留している物質が関与しているものと示唆された。また、活性因子の熱感受性について検索すると、150℃、60分で失活する物質であった。

3) 唾液中の成分の分画

本活性因子の分子量を検索するために、唾液を限外ろ過法およびゲルろ過法により分離して、Raji 細胞に 4 - DPE と唾液50%を共存して添加し、EA 発現の増強効果を検索した結果、分子量3,000以下のより低分子画分に存在する物質に著名な EA 発現の増強効果が認められた。

以上の結果より本因子が低級脂肪酸に関与するものと着目し、唾液中の低級脂肪酸をガスクロマトグラフィーにより分離しその精製標品について EA 発現の増強効果について検索すると、*n*-酪酸、イソ吉草酸、*n*-吉草酸に著名な EA 発現の増強効果が認められた。

【結 語】

1) 唾液中には 4 - DPE 共存下において、潜在 EBV 活性化を著しく増強する因子が存在した。この増強作用は未感染、既感染にかかわらず、すべてのヒト唾液中に認められ、また唾液単独でも認められる例が存在した。

2) 熱非働化実験と限外ろ過、ゲルろ過法による検討の結果、本活性因子は低級脂肪酸と考えられた。

3) ガスクロマトグラフィーにより唾液中に検出される 6 種の低級脂肪酸のうち、*n*-酪酸、イソ吉草酸、*n*-吉草酸に EBV 活性の増強効果が認められた。

4) 本活性因子は口腔内に長時間滞留した全唾液中により多く含まれることから口腔内常在菌が関与している可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 口 春 久

副 査 教 授 渡 邊 継 男

副 査 教 授 松 本 章

副 査 教 授 大 里 外 誉 郎

審査は、主査および副査全員の口頭試問により、研究目的ならびにその内容について詳細に行なわれた。

EB ウイルス (EBV) は広く世界中のヒトに不顕性持続感染しているきわめて普遍的なウイ

ルスである。一方、EBV 関連腫瘍であるバーキットリンパ腫は赤道アフリカに多発するが、同地域に生育する植物種、*Euphorbia tirucalli* に含まれる腫瘍プロモーターである 4 - deoxyphorbol ester (4 - DPE) は、その多彩な EBV 活性化作用から本症発生の環境危険因子と考えられる。本研究はこの環境危険因子に加え、EBV 活性化に影響を及ぼす生体側因子の検索を目的として主要な増強部位である口腔内に着目、唾液中に存在し単独あるいは 4 - DPE と共同して潜在 EBV 活性化の促進に働く口腔内因子の同定とその性状解析を行なった。本学歯学部小児歯科外来を受診した小児10名（男児 5 名、女児 5 名）および健康成人 4 名（男 2 名、女 2 名）より起床時採取した全唾液を遠心およびろ過滅菌処理後、試料として用いて実験を行ない、次のような結果を得た。

1. 唾液中には 4 - DPE 共存下において、潜在 EBV 活性化を著しく増強する因子が存在した。この因子は未感染、既感染にかかわらず、すべてのヒト唾液中に認められ、また唾液単独でも活性が認められる例も存在した。
2. 熱非働化実験および限外ろ過、ゲルろ過法により検討を行なった結果、本活性因子は低級脂肪酸と考えられた。
3. ガスクロマトグラフィーによって唾液中に検出された 6 種類の低級脂肪酸のうち、*n*-酪酸、イソ吉草酸に EBV 活性の増強作用が認められた。
4. 本活性因子は口腔内に長時間滞留した全唾液中により多く含まれていることから、口腔内常在菌が関与している可能性が示唆された。

以上の成績は、ヒト口腔内に広く検出可能な EBV 活性化因子の存在と、それが口腔内常在菌に関与する低級脂肪酸の可能性に由来することを明らかにしている。本活性因子が 4 - DPE のような環境因子と共存して作用することで、潜在 EBV 発現を著しく増強した結果はバーキットリンパ腫の局地多発性を理解するうえで重要であり、口腔内因子の EBV 増殖促進を通じ、本リンパ腫の顎部好発に関与している可能性が考えられる。

以上のような学位申請者（論文提出者）からの説明にもとづいて、主査および副査から詳細な質問がなされ、明確な回答が得られた。また、審査担当者から指摘された数多くの示唆に対しても、学位申請者は十分に理解した上で、端的に賛同し、将来における本研究の展望についても明確な説明を行なった。

本研究は、歯科医学とウイルス学の共同した基礎的研究として、EBV に関する研究の発展にとどまらず、EBV の他にもヒト口腔内に常在しているウイルスの活性化因子の解明に大いに貢献していくものであり、この点が高く評価され、審査の結果、審査担当者全員によって、本研究の論文は博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた。