

氏名	かわむらたかふみ 川村貴史
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	岩医大院歯博第241号
学位授与の日付	平成20年3月11日
学位論文題目	口腔白板症上皮細胞へのマイコプラズマの侵入

## 論文内容の要旨

### I 研究目的

口腔白板症の発症原因はまだ不明で、DNA 特異的蛍光色素を用いた研究により、白板症の上皮細胞の細胞質に多数の微細な蛍光像が観察されたことから、微生物の存在が示唆され、その微生物がマイコプラズマであることが推測された。最近いくつかのマイコプラズマの細胞内侵入/寄生が報告されている。口腔には数種類のマイコプラズマが常在しているが、口腔常在マイコプラズマの細胞内侵入/寄生に関する報告は見られない。そこで、本研究は、口腔粘膜上皮細胞におけるマイコプラズマの細胞内での有無を検索する目的で、口腔白板症組織を材料として、抗マイコプラズマ・ウサギポリクローナル抗体を用いた蛍光免疫組織化学、免疫電顕、マイコプラズマ検出用 nested PCR、ならびに PCR 産物の塩基配列解析により、上皮細胞内のマイコプラズマの有無を検討した。

### II 研究方法

1. *Mycoplasma salivarium* ATCC23064 株の浮遊液を、日本白色家兎(12 週齢)の背部皮下に注射して、ポリクローナル抗体を作製した。*M. salivarium* 感染 3T6 細胞を作製し、凍結切片法による免疫電顕にて *M. salivarium* に対する抗体の反応性を確認した。
2. 生検もしくは切除した 3 例の白板症組織の一部を材料として免疫組織化学および免疫電顕を行った。試料採取の際は、患者に本研究の主旨を説明し、同意を得た。本研究は本学歯学部倫理委員会の審査を受け、承認された(受付番号:01056)。試料の準超薄切片を作製し、上記のウサギポリクローナル抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー走査顕微鏡にて陽性反応の有無を観察した。陽性反応を認めた試料を用いて、凍結切片法による免疫電顕を行い、透過型電子顕微鏡にて観察した。
3. 3 例の白板症組織を試料として、それぞれ厚さ  $4\mu\text{m}$  の凍結切片を作製し、免疫染色を行い、陽性反応の認められた部分の上皮細胞を laser microdissection にて採取し、DNA 抽出後、nested PCR によりマイコプラズマの有無を検討した。さらに、検出された PCR 産物がマイコプラズマか否かを確認するために塩基配列解析を行った。

### III 研究成績

1. 作製したウサギポリクローナル抗体は、*M. salivarium* 感染 3T6 細胞を材料とした免疫電顕による検討で、*M. salivarium* に反応性を示した。一方、3T6 細胞の細胞質や細胞内の小器官と反応しないことが確認された。
2. 白板症組織の準超薄切片での蛍光免疫染色では、上皮細胞の核周囲に緑色の微細な蛍光像が観察されたが、健常と思われる口腔粘膜上皮では観察されなかった。光顕免疫組織化学による観察で陽性反応を認めた試料の超薄切片を作製し、免疫電顕を行った結果、顆粒層から有棘層上部の上皮細胞の細胞質に、周囲との境界が明瞭で電子密度の高い直径  $0.5\sim 0.8\mu\text{m}$  の多形性構造物が認められ、それらの構造物に一致して、金コロイドの付着が認められた。一方、健常と思われる口腔粘膜上皮細胞では、白板症に認められたような構造物は認められなかった。
3. マイコプラズマ検出用 nested PCR において、白板症 3 例の上皮細胞から抽出した DNA による 2nd PCR では、およそ 150bp のバンドが検出され、その位置は対照として用いた *M. salivarium* のバンドと一致した。さらに、2nd PCR 産物の塩基配列解析の結果は、3 例とも塩基長が 151 塩基対で、BLAST searching で検索した結果、そ

の塩基配列は *M. salivarium* のそれと 98% の相同性を示した。

#### IV 考察及び結論

最近、いくつかのマイコプラズマの細胞内寄生性が報告されているが、*M. salivarium* の細胞内寄生性の報告は見当たらない。本研究により、ウサギポリクローナル抗体を用いた免疫電顕で、周囲との境界が明瞭な多形性の構造物が多数観察され、それらに限局して陽性反応が認められた。また免疫染色で陽性を示した白板症3例の上皮細胞から抽出したDNAのnested PCRでは *M. salivarium* と同じ塩基長のPCR産物が検出され、さらにその2nd PCR産物の塩基配列は3例とも *M. salivarium* のそれと98%の相同性を示したことから、白板症の上皮細胞内に *M. salivarium* が侵入していることが示された。

*M. salivarium* の病的意義について、現在のところ不明であるが、培養細胞にマイコプラズマの感染が生じると、代謝ならびに増殖への影響、染色体の異常、サイトカイン産生の誘導などの諸変化をきたすことがよく知られていることから、*in vivo* においても、マイコプラズマが口腔粘膜上皮細胞内感染をきたすと、培養細胞における変化と同様に、何らかの変化を口腔粘膜上皮細胞にもおよぼすことが推測される。本研究で、口腔マイコプラズマの上皮細胞への侵入と白板症発症との関連が示唆されたが、これについては *in vivo* や *in vitro* でのより詳細な研究が必要である。

#### 論文審査の結果の要旨

##### 論文審査担当者

主査 教授 水 城 春 美 (口腔外科学第一講座)

副査 教授 野 坂 洋一郎 (口腔解剖学第一講座)

副査 教授 木 村 重 信 (口腔微生物学講座)

口腔白板症の発症原因はまだ不明であるが、微生物では、とくにHPVと白板症の関連についての報告が近年多くなされている。その中で川村君は、HPVではなく口腔マイコプラズマと白板症との関連について着目し、研究を行った。その背景には、DNA特異的色素にて染色した白板症組織で、上皮細胞の細胞質に微細な蛍光像が認められたとの報告があること、また最近いくつかのマイコプラズマの細胞内侵入/寄生が報告されていることによる。

マイコプラズマの検出にはDNA特異的蛍光色素染色、免疫組織化学、電顕的観察、*in situ hybridization*、PCR、ELISAなどの方法が用いられるが、川村君は研究方法として、光顕ならびに電顕による免疫組織化学、PCRを用いた。免疫組織化学においては、口腔マイコプラズマに対する抗体が市販されていないため、業者に依頼して作製したウサギポリクローナル抗体を用いた。抗体では、とくにポリクローナル抗体の場合は、その抗体の特異性が重要であるが、本研究では抗体の特異性について、*Mycoplasma salivarium* を感染させた3T6細胞を材料として、免疫電顕を行い、マイコプラズマには反応性を示すが、3T6の正常細胞成分には反応性を有しないことを確認している。その抗体を用いて、ヒト口腔白板症組織を材料として、光顕による蛍光免疫組織化学ならびに免疫電顕により白板症上皮細胞内におけるマイコプラズマの存在の有無を検討した。その結果、蛍光免疫組織化学で明らかな陽性所見を認めた。さらに、光顕で陽性所見を認めた材料の凍結切片法による免疫電顕で、形態的にマイコプラズマの特徴を有した構造物が観察され、さらにその構造物に一致して、抗体に対して陽性を意味する金コロイドの付着がみられ、観察された構造物がマイコプラズマである可能性が高いことを示した。

しかし、免疫電顕の所見だけでは、観察された構造物がマイコプラズマであるとは言い切れないことから、本研究では、*laser microdissection* にて上皮層内の上皮細胞を採取し、その細胞から抽出したDNAをテンプレートとしてマイコプラズマ検出用nested PCRを行った。その結果、*M. salivarium* に一致したバンドを検出し、さらにnested PCRの2nd PCR産物の塩基配列を解析して、検出されたマイコプラズマが *M. salivarium* であることを確

認した。

これらの結果から、本研究は、白板症の上皮細胞内に *M. salivarium* が侵入していることを明らかにした。今までに口腔マイコプラズマの口腔粘膜上皮細胞内への侵入／寄生に関する報告は全くなかったことから、本研究が見出した結果は、きわめて新規性に富み、また白板症発症の発症原因の解明に大きく寄与することが示唆され、学位論文に十分に値すると評価した。

### 試験・試問の結果の要旨

本論文の目的、概要について説明がなされ、研究方法、結果に対する考察について試問した結果、適切な解答が得られた。また、今後の研究にも意欲を示すとともに後輩への指導能力も備えていると判定した。