

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20644

研究課題名(和文) 口腔・咽頭がん発生に關与するヒトパピローマウイルス感染の実態とリスク因子の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the actual situation and the risk factor of the human papilloma virus infection involved in the oral cavity, pharynx cancer

研究代表者

竹内 研時 (Takeuchi, Kenji)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：10712680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は40-69歳の成人574名(男性269名、女性305名)を対象に、口腔の悪性型HPV感染の実態把握とリスク因子の解明を解明を行った。対象者の内、25名の唾液検体から悪性型HPVが確認された。多変量解析の結果、様々な交絡因子を調整した上で、悪性型HPV感染のオッズはPlaque Indexが1未満の者に比べて1以上の者が3.49倍(95%信頼区間 = 1.24-9.81)有意に高いことが明らかとなった。本研究からPlaque Indexを1未満に保つことが、悪性型HPVの感染を抑制し、将来的な口腔がん発生の予防に役立つ可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study estimated the prevalence of high-risk human papillomavirus (HPV) infection and determined distinct risk factors for high-risk HPV infection in a community-dwelling adults aged 40-69 years. Among 574 respondents (269 men and 305 women), high-risk HPV infection was found in 25 respondents (4.4%). In a multivariate logistic regression model, higher plaque score was significantly associated with greater odds of high-risk HPV infection (plaque score >1, odds ratio = 3.49, 95% confidence interval= 1.24-9.81). These findings suggest that plaque score is an important predictor of high-risk HPV infection and maintenance of oral hygiene may contribute to prevention of oral cavity, pharynx cancer in Japanese adults.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ヒトパピローマウイルス 口腔がん 歯学 唾液

1. 研究開始当初の背景

日本では、人口の高齢化によるがん罹患率の増加傾向に伴い、1979年には人口10万対で3.5%であった口腔・咽頭がん罹患率は2009年には7.5%にまで達し、過去30年間で2倍以上に増加していることから、口腔・咽頭がんの予防、早期発見の対策は喫緊の課題と言える。近年、口腔・咽頭がんを引き起こす要因として、喫煙や飲酒といった従来のリスク因子に加え、ヒトパピローマウイルス (Human Papillomavirus: HPV) の存在が注目を集めている (Gillison ML et al. *J Natl Cancer Inst* 2008, 100:407-420.)。現在、HPV感染に関連した口腔・咽頭がんは世界中で増加傾向にあり (Adelstein DJ et al. *Head Neck* 2009, 31:1393-1422.)。特に口腔・咽頭がん全体の40~80%に悪性型であるHPV-16の感染が認められることが報告されている (Marur S et al. *Lancet Oncol* 2010, 11:781-789.)。

HPVは口腔・咽頭がんの腫瘍部のみではなく、健康な人の口腔粘膜にも存在することが知られている (Miller CS et al. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001, 91:622-635.)。口腔粘膜におけるHPVの有病率については世界中で様々な報告があるが、その割合はバラツキが多い。その原因の一つに、対象者バイアスの問題がある。これまで一般化代表性の高い地域住民を対象とした口腔のHPV感染に関する研究報告はほとんど行われていない。最近では、2012年に初めて米国で国民健康栄養調査に基づいた口腔におけるHPVの有病率が報告され (Gillison ML et al. *JAMA* 2012, 307:693-703.) 14歳から69歳の男女の有病率はそれぞれ10.1%と3.6%、悪性型であるHPV-16の有病率は1.0%であった。一方、日本では、米国や他の国々と同様にHPV感染に関連した口腔・咽頭がん罹患率が増加傾向であるにも関わらず、地域住民を対象とした大規模調査の結果に基づき口腔におけるHPVの有病率を報告したものは存在しない。

口腔・咽頭がんのリスク因子としてエビデンスが蓄積されている喫煙や飲酒に加え、60歳未満の若年者での口腔・咽頭がん増加を背景に、様々な生活習慣が口腔のHPV感染に関連すると報告されている。さらに、生活習慣の多くは口腔の健康とも密接に関わっており、主観的評価に基づく口腔の健康状態不良がHPV感染と有意に関連することが近年報告された (Bui TC et al. *Cancer Prev Res* 2013, 6:917-924.)。しかし、う蝕や歯周疾患、口腔清掃状態といった客観的評価に基づく口腔の健康状態との関連は未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

近年、日本でも口腔のHPV感染の有病率の報告は存在するが、地域住民を対象に平均的な日本人集団における有病率を報告した

ものは存在しない。そこで、本研究は平均的な日本人集団である久山町住民を対象に、様々な生活習慣の影響を考慮した上で、口腔のHPV感染の実態把握と各リスク因子を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 対象

対象は平成24年度の久山町生活習慣病予防健診を受診した40-69歳の成人から各年代別に層別化無作為抽出した574名 (男性269名、女性305名) とした。

本研究は九州大学倫理審査委員会の審査・承認を経て行われ、全研究参加者から署名によるインフォームドコンセントが得られた。

2) HPVの検出

平成24年に実施した久山町生活習慣病予防健診で得られた唾液検体から既に抽出済みの微生物群集DNAを用いて、各検体のE6とE7を含む遺伝子領域をPCR法にて増幅を行った。その際、悪性型 (HPV 16, 18, 31, 35, 52b および 58 型) をターゲットとし、HPVpU-1M と HPVpU-2R の2種のコンセンサプライマーを用いた。まずはじめに、悪性型のHPV 18のゲノムDNAが挿入されたプラスミドDNAを鋳型として、先行研究で推奨される反応条件の下でPCR法を実施した。各型のHPVが正確に増幅可能となるように、94°Cで2分、続いて94°Cで30秒、55°Cで2分、72°Cで30秒を30サイクル行った。

3) 口腔内診査

口腔内診査は、米国の第三次国民健康栄養調査の手法に基づき (Brown et al. *J Dent Res* 1996, 75:672-683.)、キャリブレーションを行った複数の歯科医師により実施された。アタッチメントロスの測定を基準として、診査者間の信頼妥当性は充分な値を示した (カッパ係数は0.8以上)。

計測した歯数は、20歯以上か否かで評価を行った。歯周状態はアタッチメントロスとBleeding On Probing (BOP) を計測し、それぞれ4mm以上部位があるか否かと10%以上の部位で出血が認められたか否かで評価を行った。口腔の清掃状態はSilnessとLoeのPlaque Indexを用い、その値が1以上か否かで評価を行った。

4) 質問紙調査

問診と自記式質問紙にて、対象者の性別や年齢、体重、身長、職業といった人口統計学的な特性に加え、喫煙や飲酒といった生活習慣に関する調査を行った。

身長と体重はbody mass index (BMI) の計算に用いた。職業は国際標準職業分類に基づき、7種類のグループに分類した後、人数が明らかに少ないグループを統合し、ブルーカ

ラーとホワイトカラー、その他の職種の3群とした。喫煙については、現在喫煙しているか否かで2群に分類し、飲酒も同様に現在飲酒しているか否かで2群に分類した。

5) 唾液中の細菌構成の評価

次世代シーケンサーを用い、唾液検体に含まれる16S rRNAの網羅的塩基配列解析を行い、唾液中の細菌構成の評価を行った。各検体から抽出されたDNAに含まれる16S rRNA遺伝子を、PCR法を用いて98°Cで2分、続いて98°Cで15秒、60°Cで20秒、74°Cで30秒を30サイクルの条件で網羅的に増幅・回収した。プライマーにはアダプター配列と検体ごとに異なるタグ配列を付与した細菌共通配列8F (5'-AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG-3')とアダプター配列を付与した338R (5'-TGC TGC CCT CCC GTA GGA GT-3')を用いて、16S rRNA遺伝子のV1-V2領域を増幅した。異なるタグ配列をもつこれらの16S rRNA遺伝子群を等濃度ずつ混合し、これを鋳型としてIon PGM Template OT2 400 Kit (Thermo Fisher Scientific社)を用いてエマルジョンPCRを行い、シーケンス用テンプレートとした。シーケンステンプレートは適切な濃度に希釈したのち、Ion PGM HiQ Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific社)を用いて次世代シーケンサーIon PGM (Thermo Fisher Scientific社)にて塩基配列の解読を行った。得られた塩基配列はクオリティチェックを行い、高品質のリードを選別した。タグ配列の情報に基づき全リードを各検体に割り振ったのち、解析ソフトウェアUPARSEを用いてOperational taxonomic unit (OTU, 解析操作上の菌種)に分類した。RDP Classifierを用いて菌属レベルの同定を行った。各検体に含まれる該当リード数を算出し、含まれる各菌属レベルOTUの構成比率を決定した。

6) 解析

対象者の特性について、悪性型HPVの感染有無による比較をPearsonのカイ二乗検定を用いて行った。悪性型HPVの感染のリスク因子を検討するため、悪性型HPVの感染有無を従属変数に、先行研究からリスク因子の疑いのある社会経済的状態や生活習慣、口腔の健康に関する項目を独立変数としたロジスティック回帰分析を行い、オッズ比を算出した。解析は、SPSS version 23 (IBM SPSS Japan, Tokyo, Japan)を用いて行った。悪性型HPVの感染有無による唾液中の細菌の各菌属レベルの構成比率の違いについて、統計学的有意差を示すP値はStudentのt検定で算出したのち、Benjamin Hochberg法をもちいて多重検定の有意水準の調整を行った。統計学的有意差は $P < 0.05$ と定めた。

本研究はSTROBEガイドラインに準拠して行われた。

4. 研究成果

解析対象の574名のPCR法の結果、25検体(4.4%)から悪性型HPVの増幅が確認された。悪性型HPV感染の有無による対象者特性の比較を表1に示す。悪性型HPVの感染がある群ではない群に比べて、Plaque Indexが1以上である割合が有意に高かった。それ以外の項目では有意差は認めなかった。

表1. 悪性型HPV感染の有無による対象者特性の比較

	悪性型 HPV 感染		P 値
	なし (n=549)	あり (n=25)	
性別 (% 男性)	46.4	56.0	0.349
年齢 (%)			0.092
40-49 歳	35.5	56.0	
50-59 歳	33.2	28.0	
60-69 歳	31.3	16.0	
職業 (%)			0.073
ブルーカラー	20.0	32.0	
ホワイトカラー	47.4	56.0	
その他の職種	32.6	12.0	
BMI (% ≥25)	28.6	28.0	0.948
喫煙習慣 (% 現在喫煙)	26.6	36.0	0.300
飲酒習慣 (% 現在飲酒)	59.6	64.0	0.658
現在歯数 (% 20 歯以上)	90.7	92.0	0.828
アタッチメントロス (% 4mm 以上あり)	47.0	36.0	0.281
BOP (% 10%以上)	34.4	44.0	0.326
Plaque Index (% 1 以上)	18.4	36.0	0.029

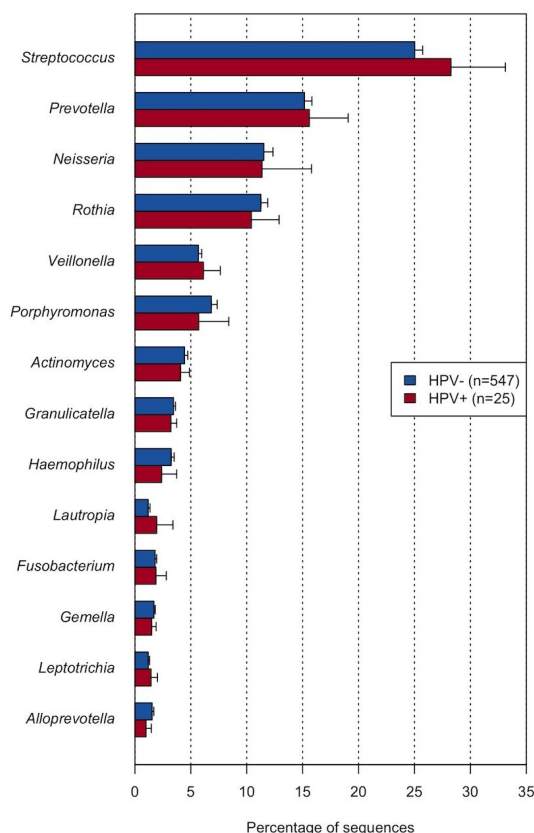
多変量ロジスティック回帰分析の結果を表2に示す。想定し得る様々な交絡因子を調整した上で、悪性型HPV感染のオッズはPlaque Indexが1未満の者に比べて1以上の者が3.49倍(95%信頼区間 = 1.24-9.81)有意に高いことが明らかとなった。性別や年齢などその他の項目は有意差を認めなかった。

表2. ロジスティック回帰分析による各特性別の悪性型HPV感染のオッズ比

	多変量オッズ比 (95%信頼区間)	P 値
性別 (ref. 女性)		
男性	0.94 (0.35–2.54)	0.910
年齢 (ref. 60-69 歳)		
40-49 歳	3.00 (0.84–10.73)	0.091
50-59 歳	1.63 (0.44–6.04)	0.464
職業 (ref. ホワイトカラー)		
ブルーカラー	1.46 (0.57–3.72)	0.427
その他の職種	0.33 (0.08–1.34)	0.122
BMI (ref. <25)		
≥25	0.72 (0.28–1.88)	0.501
喫煙習慣 (ref. 非喫煙)		
現在喫煙	1.15 (0.44–3.00)	0.780
飲酒習慣 (ref. 非飲酒)		
現在飲酒	1.30 (0.53–3.18)	0.571
現在歯数 (ref. 20 歯以上)		
20 歯未満	0.89 (0.17–4.54)	0.883
アタッチメントロス (ref. 4mm 以上なし)		
4mm 以上あり	0.52 (0.20–1.33)	0.170
BOP (ref. 10%未満)		
10%以上	1.35 (0.52–3.51)	0.541
Plaque Index (ref. 1 未満)		
1 以上	3.49 (1.24–9.81)	0.018

唾液中の菌属レベルの同定ができた 572 名について、悪性型 HPV の感染有無による唾液中の細菌の各菌属レベルの構成比率の比較を図に示す。唾液中の細菌構成比率で最上位であった *Streptococcus* 属は悪性型 HPV の感染がある群では 28.3%、感染がない群では 25.0%であった。また、同構成比率が 2 番目に高かった *Prevotella* 属も HPV の感染がある群では 15.6%、感染がない群では 15.2%であり、どちらの菌属も悪性型 HPV の感染がない群と比べて感染がある群でその割合が高かったものの、有意差は認めなかった。

図. 悪性型 HPV の感染有無による唾液中の細菌の各菌属レベルの構成比率の比較



本研究から、平均的な日本人集団である久山町住民を対象に、口腔の HPV 感染の実態と、様々な生活習慣の影響を考慮した上での口腔関連リスク因子の存在が明らかとなった。

これまでの唾液を検体とした悪性型 HPV 感染の存在率は、男女での違いもあるが約 5%から 15%程度と報告されており、今回の存在率 4.4%はわずかに低い値ではあるものの、概ねその結果は一致していた。

本研究から Plaque Index が 1 以上であることが、悪性型 HPV 感染の口腔関連リスク因子であることが新たに明らかとなった。このことから、歯科医院を定期的に受診しプロフェッショナルケアを受けたり、自宅にてセルフケアを行い口腔内を清潔に保つことが将来的な口腔がん発生の予防に役立つ可能性が示唆された。

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 2 件)

Takeuchi Kenji, Ohara Tomoyuki, Furuta Michiko, Takeshita Toru, Shibata Yukie, Hata Jun, Yoshida Daigo, Yamashita Yoshihisa, Ninomiya Toshiharu, Tooth loss and risk of dementia in the community: the Hisayama Study, J Am Geriatr Soc, 査読有, 2017, 65, e95-e100.

DOI: 10.1111/jgs.14791.

Takeshita Toru, Kageyama Shinya, Furuta Michiko, Tsuboi Hidenori, Takeuchi Kenji, Shibata Yukie, Shimazaki Yoshihiro, Akifusa Sumio, Ninomiya Toshiharu, Kiyohara Yutaka, Yamashita Yoshihisa, Bacterial diversity in saliva and oral health-related conditions: the Hisayama Study, Sci Rep, 査読有, 2016, 6, 22164, DOI: 10.1038/srep22164.

〔学会発表〕(計 1 件)

Harada Yuriko, Takeuchi Kenji, Furuta Michiko, Tanaka Shunichi, Yamashita Yoshihisa, Gender-Specific Association Between Periodontal Disease and Job Classification Among Employees, The 94th IADR General Session & Exhibition, June 24, 2016, Seoul, Republic of Korea.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 研時 (TAKEUCHI, Kenji)
九州大学・大学院歯学研究院・助教
研究者番号：10712680

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()