

機関番号：13101

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008 ~2010

課題番号：20390512

研究課題名 (和文) ヒト免疫不全ウイルス感染者の唾液検査による治療効果および感染性判定法の確立

研究課題名 (英文) Quantitative study on HIV-1 in oral fluids of infected individuals

研究代表者 高木 律男 (TAKAGI RITSUO)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：20143795

研究成果の概要 (和文)：我々は、HIV 感染者の口腔内ウイルスを評価するために、唾液中ウイルス量を正しく測定する独自の方法を考案した。この方法を用いて唾液中ウイルス量を決定し、血中ウイルス濃度、口腔内の炎症や唾液分泌速度との相関を評価した。この結果、唾液中ウイルスが血中ウイルス量と相関し、唾液腺から排出されることが考えられる。

さらに、唾液中ウイルスの核酸の完全性を測定する新しい分析方法を開発した。この方法を用いることにより、より科学的に感染性について評価できる。唾液中のウイルス濃度は血中濃度に比べて低く、これらの研究結果は、HIV の口腔内分泌機序や唾液の感染性を明らかにするための基礎となるものである。

研究成果の概要 (英文)：

We developed a new original method for measuring the amount of HIV-1 RNA and DNA that was based on Poisson distribution analysis of nested PCR results. Using this method, we evaluated the viral load in saliva and compared it to viral load in serum, degree of oral inflammation and velocity of salivary flow. As a result, the viral load of HIV-1 RNA and DNA in saliva relates to that in serum, and it is suggested that the virus is supplied from a salivary glands.

Furthermore, we also developed a new analysis method to measure the integrity of the nucleic acid of the virus in saliva. This method is able to clarify the HIV infectivity in saliva, scientifically. The virus in saliva was lower integrity in comparison with that in serum.

These results indicate a foundation for elucidating the mechanism of HIV secretion to the oral cavity and the infectiveness of HIV in saliva as a transmission medium.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2009 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2010 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	12,300,000	3,690,000	15,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 外科系歯学

キーワード：口腔顎顔面再建外科学

## 1. 研究開始当初の背景

抗ウイルス薬の新規開発、使用方法の改善により HIV 感染者の生命予後は飛躍的に伸び、HIV 感染に関する諸問題は歯科医療従事者にとってますます身近なものとなっている。さらに、口腔内の HIV に関する正確な情報は、医療行為のみならず日常生活においても非常に重要である。

現在までに、唾液中に HIV が存在することが確認されているにも関わらず、唾液を介して HIV 感染が拡大したとする報告はない。唾液による感染が成立しにくい原因として、低ウイルス量、唾液中の抗ウイルス因子などがあげられているが、その原因はまだ不明である。

また、従来の唾液中ウイルスに関する研究はほとんど遊離ウイルスを対象としており、より感染性の高い感染細胞についてはあまり注目されてこなかった。

この様に、HIV 感染者の口腔内ウイルスや感染性についての科学的な解析は HIV 感染者と歯科医療従事者の双方、さらに一般市民にとって大きな意義を有していると考えた。

## 2. 研究の目的

HIV 感染者の唾液検査による治療効果および感染性判定法の確立：

本研究計画は唾液による非侵襲的検査を開発し、採血により得られる血中ウイルス量や血中薬剤濃度の動的把握を在宅でも可能にすることを目指している。これは、血液検査の弱点を補い、HIV 感染者に対する医療に実質的改善をもたらす可能性がある。さらに、唾液中のウイルス RNA と DNA の定量・定性データから HIV 感染者の唾液の感染力について、新たな科学的根拠を提示できる。この結果は歯科医療のみならず HIV 感染者を取り巻く社会全般に有意義な情報をもたらすことが期待できる。

構想として、以下について検証する

- (1) 血液中と唾液中の HIV・RNA 量の相関  
－唾液検査による HIV 感染者の病状(治療効果)把握の実現性を明らかにする。
- (2) 抗 HIV 療法施行者の血漿中と唾液中の薬剤濃度の相関  
－唾液検査による抗 HIV 療法中の薬剤血中濃度検査の実現性を明らかにする。
- (3) HIV 感染者唾液の感染性と唾液中の HIV・RNA 分解レベルおよびプロウイルス DNA 量の関連  
－HIV 感染者唾液の感染性の有無

## 3. 研究の方法

### (1) 血液中と唾液中の HIV・RNA 量の相関

- ① サンプル採取の際の口腔内の状態(潜血、歯周組織、唾液採取時間など)の詳細な記録を作成する。
- ② 新潟大学医歯学総合病院にて管理している HIV 感染患者より唾液を採取する。唾液は安静時唾液を吐唾法にて 5ml 採取する。
- ③ 検査委託：唾液中の遊離ウイルス量測定は血液検体共に外注委託検査で行う。
- ④ 外注検査とは別で、我々が開発した唾液中ウイルス定量法により HIV ウィルス量を再度測定する。方法は以下に示す。
  - ④-1. 唾液サンプルは完全に気密密封したパック・容器を用いて $-70^{\circ}\text{C}$ から常温に解凍する。
  - ④-2. 唾液にエタノール沈殿を行い、RNA 抽出キット(UltraSens QIAGEN)で HIV-RNA を抽出する。
  - ④-3. 抽出された溶液をリアルタイム PCR または RT-nested PCR 法+ポアソン分布理論式より HIV-RNA 量を定量する

### (2) 抗 HIV 療法施行者の血漿中と唾液中の薬剤濃度の相関

仮説：唾液中薬剤濃度は血中の有効薬剤濃度を反映する。(血清中遊離薬剤のみが唾液中に移行する)

唾液中の薬剤濃度の測定と血中の遊離薬剤方法 1:唾液中の薬剤濃度の測定濃度を以下の方法で測定する予定であった。

- ① 吐唾法により唾液を採取する。容器にはシリコナイズドスナップキャップ付マイクロチューブを用いる。
  - ② 唾液中薬剤濃度の定量は、共同研究所である慶應大学・免疫学教室で行う。
  - ③ 血液と唾液サンプルの新潟大学から慶應大学への運搬の際は、ポータブル保管用冷蔵庫(VT-78)を使用する。
  - ④ 唾液 20  $\mu\text{L}$  に 80  $\mu\text{L}$  のメタノールを加え、混合する。
  - ⑤ エタノール希釈した唾液を 14,000 rpm で 1 分間遠心分離する。
  - ⑥ 上清液を減圧遠心乾燥器にて乾燥する。
  - ⑦ 乾燥物を 20 $\mu\text{L}$  の LC 初期移動相で溶解する。
  - ⑧ 液体クロマトグラフ-タンデム質量分析装置(LC-MS/MS: 慶大医学部中央機器室にて委託計測)で薬剤成分を定量する。
- 方法 2: 血液中の薬剤濃度の測定
- ① 血漿 5ml を採血し、シリコナイズドスナップキャップ付マイクロチューブにて $-80^{\circ}\text{C}$ 保存する。
  - ② 血漿 20  $\mu\text{L}$  に 80  $\mu\text{L}$  のメタノールを加え、

混合する。

③エタノール希釈した血清を 14,000 rpm で 1 分間遠心分離する。

④以下、唾液測定と同じ。

◆計測対象薬剤は、抗 HIV 療法にて一般的な Key drug: RTV、LPV および Backbone drugs: 3TC、AZT を対象とする。LC-MS/MS の内部標準としては LPV と RTV には SQV、3TC と AZT には AZdU を用いる。

(3) HIV 感染者唾液の感染性と唾液中の HIV・RNA 分解レベルおよびプロウイルス DNA 量の関連

まず、唾液中ウイルスは抗ウイルス作用により核酸 (HIV-1RNA) が断片化していると予測し、核酸の完全性を評価する。

①HIV 感染者の安静時唾液を吐法により採取する。

②唾液中に遠心分離を行い、液性成分と非液性成分に分ける。

③液相に RNA 抽出キット (QAGEN) を用いて HIV-RNA を抽出する。

④抽出された HIV-RNA に逆転写を行う。

⑤逆転写されたウイルス核酸に U3R から U5R にかけて 5 つの異なる領域のプライマーでリアルタイム PCR を行う。

増幅されたプロダクト DNA 量を唾液と血清の HIV・RNA 間で比較する。

プロウイルスの定量については、血液中と唾液中の HIV・RNA 量の関連の実験にて用いたポアソン分布理論式の方法を用いて、逆転写の行程を省いて定量を行う。

#### 4. 研究成果

我々は、唾液と血中のウイルス量の相関関係・HIV 感染者の唾液の感染性についての研究を行った。HIV 感染者の薬剤濃度の研究は期間内に結果は得られなかった。前記 2 項目について得られた成果を報告する。

・唾液と血中のウイルス量の相関関係

唾液中ウイルス量の正確な定量法を検討するために、2 つの定量方法で検討した。1 つは、我々が開発した独自の測定方法 (RT-nested PCR+ポアソン確率分布) であり、もう一方は、現在一般的に臨床にて血中のウイルス量測定に使用されている外注検査による方法 (リアルタイム PCR 法; COBAS TaqMan 法) である。

まず、定量されたサンプル数を比べみると、RT-nested PCR+ポアソン確率分布の方が 2 倍以上多く測定できた (表 1)。これにより、RT-nested PCR+ポアソン確率分布による定量法の方が高感度と考えられる。

COBAS TaqMan法	RT-nested PCR+ポアソン確率分布		total
	detected	undetected	
	14	1	15
	18	11	29
	32	12	44

表 1 : 定量方法の比較

次に RT-nested PCR+ポアソン確率分布法と COBAS TaqMan 法の両者の測定値を比べた。その結果、両者には強い相関を認め RT-nested PCR+ポアソン確率分布法が 4.4 倍高い値を示した (図 1)。以上より、RT-nested PCR+ポアソン確率分布法は、唾液中ウイルス量の測定において正確な定量法である。

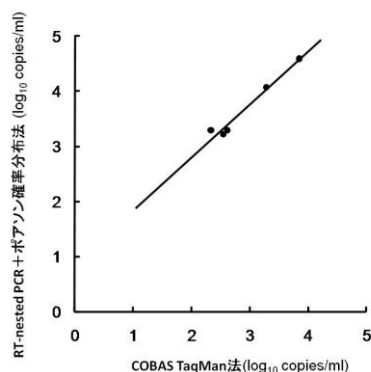


図 1 : 唾液中ウイルス定量値の比較

RT-nested PCR+ポアソン確率分布法を用いて測定された唾液中ウイルス量と血中ウイルス量を比較検討した。唾液中ウイルス量と血中ウイルス量との間には相関関係が確認され、唾液中には血中の 20% のウイルス量が存在した (図 2)。

以上より、唾液は HIV 感染者の病態把握に適した検体である事が示唆された。

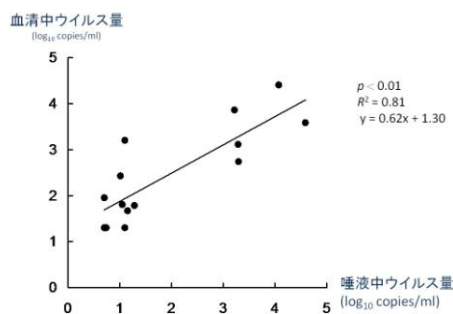


図 2 : 唾液と血中ウイルス量の比較

・HIV 感染者の唾液の感染性についての研究

唾液中の遊離ウイルスのウイルス完全性を分析した。唾液中と血漿中の HIV-1 の RNA 鎖の長さを比べることにより、ウイルスの完全性の評価を行った。HIV-1RNA 鎖の評価法は、逆転写を行った後のウイルス核酸に異なる 5 か所のプライマーを用いて real-time PCR を行う。完全性の高い遊離ウイルスは PCR にて長い cDNA が多く合成され、A・B・C・D・E 領域で合成される核酸の量は全て多い。損傷を受けた、遊離ウイルスは A・B・C・D・E 領域で合成される核酸は順に減少する (図 3)。

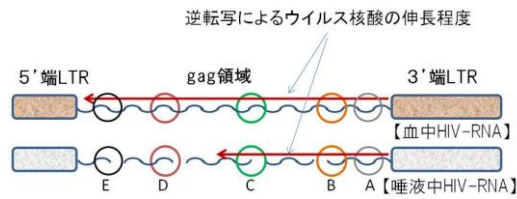


図3：ウイルスの損傷

予備実験にて、紫外線で意図的に損傷を加えた HIV-RNA、長時間赤外線に暴露した HIV-RNA、健全な HIV-RNA の3サンプルで比較したところ、損傷が多くなる程 A・B・C・D・E 領域で合成される核酸の減少量は増加した。

次いで、血漿中の HIV-1RNA と唾液中 HIV-1RNA で比較したところ唾液中ウイルスは下方領域の E に向かうにつれ大きく減少して損傷が多い事が示唆された。今回は1名の被験者に行ったため、今後より多くの症例が必要となる。

感染力を評価するもう1つの指標としたプロウイルス量の評価については、ポアソン確率分布法を用いた。唾液中のウイルス核酸が100copies/ml以上を示した5名の被験者の唾液中の HIV 総ウイルス中のプロウイルスの割合を解析した(図4)。多くの被験者の唾液中ウイルス量は、遊離ウイルスが99%を占めて優位なものであった。これは、唾液が低感染性といわれる根拠の1つとなる発見である。しかし、全ウイルス量の75%を感染細胞数が占めている被験者も存在した。感染細胞が高濃度であることは、Perre ;2000 の報告によると母乳における高感染性の原因の第一に挙げられており、この被験者の唾液は低感染性とは言い切れ無いものとなる。このことから、外科処置のみならず如何なる歯科治療においてもスタンダードプリコーションの徹底を再確認される結果となった。

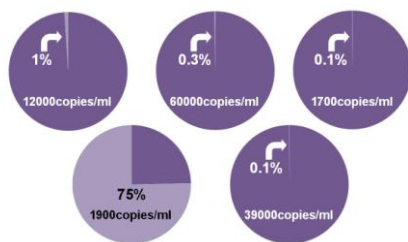


図4：唾液中総ウイルス注のプロウイルスの割合

## 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)

池野 良：新潟歯学会雑誌 第40巻(2010) 第2号 71-76(181-186), 査読なし

〔学会発表〕 (計8件)

①池野 良、村山正晃、児玉泰光、高木律男、加藤真吾：新潟大学顎顔面口腔外科で行った HIV 感染者の唾液研究 -新しい発見と今後の展望-：第12回日本 HIV 歯科医療研究会：平成23年1月9日：東京

②村山正晃、池野 良、児玉泰光、田邊嘉也、川口玲、山崎さやか、加藤真吾、高木律男：唾液中ウイルスと血中ウイルスの定量値とウイルス RNA 鎖の比較：第24回日本エイズ学会学術集会・総会：平成22年11月24-26日：東京

③池野 良、永田昌毅、児玉泰光、村山正晃、高木律男：HIV-1感染者における唾液中ウイルスの定量的研究：第55回(社)日本口腔外科学会総会・学術大会：2010年10月16-18日：千葉県千葉市

④村山正晃、池野 良、児玉泰光、川口 玲、田邊嘉也、加藤真吾、高木律男：唾液中 HIV-1濃度が血液中よりも高かった3症例：第23回日本エイズ学会学術集会・総会：2009年11月26-28日：愛知県名古屋

⑤池野 良、高木律男、永田昌毅、加藤真吾：唾液中 HIV-1 RNA/DNA 量と血清中 HIV-1RNA 量の比較検討-唾液中に含まれる血液の関与-：第63回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会：2009年4月16日~17日：静岡県浜松市

⑥池野 良、高木律男、永田昌毅、児玉泰光、田邊嘉也、加藤真吾：唾液中 HIV-1 RNA/DNA 量と血清中 HIV-1RNA 量の比較検討：第10回日本 HIV 歯科医療研究会：2009年1月11日：東京都

⑦池野 良、高木律男、児玉泰光、田邊嘉也、加藤真吾：リアルタイム PCR 法 (TaqMan 法) を用いた唾液中 HIV-1 RNA/DNA 量と血清中 HIV-1 RNA 量の比較検討：第22回日本エイズ学会学術集会・総会：2008年11月26-28日：広島市

⑧高木律男、池野 良、児玉泰光、安島久雄：Web-site を利用した歯科医療のための院内感染対策教育：第27回歯科医学教育学会学術大会：2008年7月11日-12日：東京都

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)  
なし

○取得状況 (計0件)  
無し

〔その他〕  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 律男 (TAKAGI RITSUO)  
新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：20143795

(2) 研究分担者

加藤 真吾 (KATO SHINGO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10177446

田邊 嘉也 (TANABE YOSHINARI)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：40444161

永田 昌毅 (NAGATA MASAKI)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：10242439

(3) 連携研究者

無し