

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月20日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22406032

研究課題名（和文） ベトナム・メコンデルタの母子および家族における口腔領域のHPV感染の総括的調査

研究課題名（英文） The investigation of HPV infection in oral region among children and their family in the Mekong Delta of Vietnam

研究代表者

吉田 和加 (YOSHIDA WAKA)

愛知学院大学・歯学部・助教

研究者番号：10513210

研究成果の概要（和文）：口腔領域の悪性腫瘍の中で最も発生頻度の高い扁平上皮癌をはじめ、口腔領域の粘膜疾患の多くにヒトパピローマウイルス(HPV)の感染が関与している。本調査では、ベトナムで伝統的な生活環境を保っている地域において、母子ならびに家族の口腔領域のHPV感染と粘膜疾患の発生の現状を調査し、生活習慣や環境との関係を解明することを目的とした。口腔粘膜サンプルからDNAを抽出し、精度の高いHPV検出方法を比較検討しながら解析を進め、口腔粘膜疾患の発生機序解明および、将来的な治療法ならびに予防法の開発に向けた基礎データを得ている。

研究成果の概要（英文）：Human papillomavirus (HPV) has been considered to be an etiologic factor for diseases of oral mucosa, such as squamous cell carcinoma. In this investigation, the samples of buccal mucosa and the epidemiological data were taken from children, their mothers and their families in the Mekong Delta of Vietnam, the area that traditional living environment is maintained. The HPV's DNA extracted from buccal mucosa samples were detected by several PCR methods and have been considering about these results. The relation among the HPV infection in oral region, the diseases of oral mucosa and life style has been investigating. The fundamental data has been obtained, valuable to elucidate the mechanism for occurrence of diseases of oral mucosa, to treat and prevent these diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|------------|
| 2010年度 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |
| 2011年度 | 2,200,000 | 660,000 | 2,860,000 |
| 2012年度 | 2,400,000 | 720,000 | 3,120,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 7,700,000 | 2,310,000 | 10,010,000 |

研究分野：医歯薬学B

科研費の分科・細目：形態系基礎歯科学

キーワード：病理学、歯学、ウイルス、感染症、HPV

1. 研究開始当初の背景

ヒトパピローマウイルス(HPV)は現在までに120種類以上の型が知られており、その約60%は皮膚指向性で、約40%は粘膜指向性である。粘

膜型には、子宮頸癌で検出された悪性化に関わる高リスク型として16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68、73型などが、また良性の尖圭コンジローマなどの原因となる低リスク型の6、11型などがある。

口腔領域の粘膜疾患の多くにも HPV 感染が関与している。特に、口腔領域の悪性腫瘍の中で最も発生頻度の高い扁平上皮癌には、HPV がその発生に重要な関与をしていることが報告されている。さらに、局所性上皮肥厚や喉頭乳頭腫症などはモンゴロイドに多く、HPV の特定の型により発生することが報告されている。

我々はこれまでに、扁平上皮癌への HPV の関与を報告してきた (Kojima A, Maeda H, Sugita Y, Tanaka S and Kameyama Y: Human papillomavirus type 38 infection in oral squamous carcinoma. *Oral Oncol*, 38: 591~596, 2002)。また、日本において健常な口腔領域の HPV 感染を検索した結果、3 歳から HPV 感染が認められ、その後、感染率が増加していくことが判明した (Kojima A, Maeda H, Kurahashi N, Sakagami G, Kubo K, Yoshimoto H and Kameyama Y: Human papillomaviruses in the normal oral cavity of children in Japan. *Oral Oncol*, 39: 821~828, 2003)。さらに、高校の 1 年生から 3 年生まで継続的に口腔衛生状態と HPV 感染の関係を調査した結果、HPV 感染は口腔衛生状態の改善に伴い減少することが示唆された (外山恵子、前田初彦、杉田好彦、西村叔枝、森田一三、榊原康人、春日井麻希、中垣晴男: 高校生における口腔の衛生状態とヒトパピローウイルス (HPV) 保有に関する研究。 *東海学校保健研究*, 32:3~12, 2008)。また最近では、歯肉の接合上皮から HPV の感染が確認され、口腔が HPV のリザーバーとなっているとの報告がある。これらのことより、口腔領域は HPV 感染を検討する上で重要な部位であり、また HPV 感染は生活習慣に大きく依存していることが考えられる。

近年、ベトナム社会主義共和国のホーチミンなどの主要都市では急速に欧米化が進み、生活習慣病である糖尿病、う蝕などが急激に増加している。しかしながら、都市部を離れた地方においては、未だ他の地域への交通が限られ伝統的な東南アジアの生活環境が保たれている。我々と同じアジアのモンゴロイドであるベトナム人の伝統的な生活環境の中での HPV 感染および関連口腔疾患を検索することは、環境および生活習慣と HPV 感染の関係ならびに、関連疾患の発生を解明するうえで非常に有用であり、将来的な HPV 感染の予防、さらには関連疾患の予防や治療に大いに寄与するものと考えられる。

我々は、口唇口蓋裂の治療を中心とした非営利の医療援助団体を組織して、ベトナム各地で口唇口蓋裂患者の手術を行うとともに技術移転を行ってきた。そのため、ベトナムの行政機関ならびに病院や大学との良好な関係が構築されており、この医療援助活動に合わせて学術調査を

実施することが可能であった。

2. 研究の目的

口腔領域の粘膜疾患の多くに HPV 感染が関与している。特に、口腔領域の悪性腫瘍の中で最も発生頻度の高い扁平上皮癌には、HPV がその発生に重要な関与をしていると考えられる。我々のこれまでの研究より、HPV 感染は生活習慣に大きく依存し、また口腔衛生状態の改善により減少することが示唆されている。

本調査では、ベトナムの地方都市で伝統的な生活環境を保っているベンチェ省メコンデルタ地域における口腔領域の HPV 感染と口腔粘膜疾患の発生の現状を、母子とその家族を一括して調査し、遺伝子工学的および疫学的に検索することで、生活習慣・環境と HPV 感染の関係を解明することを目的とした。

これにより HPV の感染経路と口腔での HPV の生活環の解明に大きく寄与できるものとする。またこれは、口腔粘膜疾患の発生機序解明および、将来的な治療法ならびに予防法の開発に大きく貢献するものである。

3. 研究の方法

母子とその家族を対象とした口腔領域の HPV 感染に関する遺伝子工学的解析と、口腔粘膜疾患の疫学的調査、生活習慣等の調査の結果を統合し検討する。

(1) 試料採取ならびにデータ収集

我々が毎年行っているベトナム・ベンチェ省メコンデルタ地域への医療援助に合わせ、当該地域にあるグエンディンチュー病院へ赴いた。口唇口蓋裂の手術のために来院した患者と母親ならびにその家族を対象に、インフォームド・コンセントを得た上で、歯間ブラシを用いて口腔粘膜(頬粘膜)の擦過サンプルを採取し、血液サンプルは濾紙上で乾燥させた。また口腔粘膜疾患の有無とその種類、ならびに生活習慣や口腔衛生状態に関するデータを収集した(喫煙、アルコール摂取、義歯、疣贅(いぼ)、感染症など)。

(2) 遺伝子試料の解析

解析は、愛知学院大学歯学部口腔病理学講座にて実施し、現在も検証を行っている。

① DNA 抽出

口腔粘膜の擦過サンプルより QIAamp DNA

Micro Kit (キアゲン株式会社)を用いて DNA を抽出した。

②DNA 試料の質の確認

NanoDrop (Technologies, Inc.、株式会社エル・エム・エス)により濃度と純度を測定した。

DNA が断片化されていないか等、質を確認するため、 β -Globin 用のプライマー (PC03: 5'-ACACA ACTGT GTTCA CTAGC-3'、PC04: 5'-CAACT TCATC CACGT TCACC-3'、PCR 産物 110 bp)、2×PCR Solution Premix Taq (TaKaRa Ex Taq Version 2.0) (タカラバイオ株式会社)を用いた PCR を行い、1×TAE 3%アガロースゲル電気泳動とエチジウムブロマイドによる染色にてバンドの確認を行った。

③コンセンサスプライマーを用いた PCR による HPV の検出

HPV 遺伝子の検出を、コンセンサスプライマー (多くの型の HPV を一括して検出するために用いる、HPV に共通してみられる塩基配列からなるプライマー)を用いた PCR 法にて行った。

GP5+/6+ (GP5+: 5'-TTTGT TACTG TGGTA GATAC TAC-3'、GP6+: 5'-GAAAA ATAAA CTGTA AATCA TATTC-3'、PCR 産物 150 bp)

MY09/11 (MY09: 5'-CGTCC MARRG GAWAC TGATC-3'、MY11: 5'-GCMCA GGGWC ATAAY AATGG-3'、PCR 産物約 450 bp)

多種の型の HPV を検出し得るように設計されたコンセンサスプライマーの塩基配列には、多くの HPV と相補的でない塩基も含まれるため、アニーリング温度は一般的な PCR 条件よりも低く設定した。そこで、試薬にはホットスタート PCR 用の 2×PCR Solution Premix Ex Taq Hot Start Version (タカラバイオ株式会社)を用い、非特異的増幅を抑えた。

また、HPV のコピー数が少ない場合や、複数の型の HPV が同時に感染している場合などは、正確な検出が難しく工夫を要する。1回目の PCR 産物を鋳型として2回目の PCR を行い(1回目に MY09/11、2回目に GP5+/6+を用いる nested PCR、1回目と2回目に同じプライマーセットを用いる auto-nested PCR)、これらの結果を比較検討している。

それぞれの PCR 産物は、分離能の良い NuSieve 3-1 Agarose (Lonza Rockland, Inc. USA)を使用した1×TAE 3%アガロースゲル電気泳動と、エチジウムブロマイドによる染色にて

バンドの確認を行った。

④型特異的プライマーを用いた PCR による HPV 型の同定

コンセンサスプライマーを用いた PCR で陽性と判定された試料については、HPV の型特異的プライマーを用いた PCR により、型の判定を行っている。型特異的プライマーによっては、得られた PCR 産物を電気泳動にて分離し目的のバンドを切出して DNA 精製し、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, HITACHI)によるシークエンス解析を行ったところ、非特異的配列が増幅されていたことが判明した場合もあり、プライマー配列の再検討を要した。

本研究では、母子ならびに家族の試料を一括して解析し、感染経路を明らかにすることを目的としているため、多種の HPV 型の同定は重要であり、精度の高い方法が求められた。

⑤Reverse Line Blot 法による HPV 型の同定

WHO の附属研究機関である国際癌研究機構 (International Agency for Research on Cancer: IARC) による調査でも用いられている Reverse Line Blot 法による型の同定も試みている。この方法は、37種類の HPV 型にそれぞれ特異的なプローブに 5'-アミノ修飾 C6 を行ってメンブランに吸着させ、そこに、コンセンサスプライマー GP5+とビオチン修飾した GP6+による各サンプルの PCR 産物をハイブリダイズさせ、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを結合させた後、化学発光により検出するものである。プローブを用いるため、偽陽性を排除しやすいなど結果の精度が増すほか、37種類にのぼる多くの HPV 型の検出が可能であることは、感染経路を明らかにする上で有効な方法であると考えられる。

今後、定量的な検索を Real-time PCR 法で行うことも予定している。

HPV 感染と口腔粘膜疾患発生状況、生活習慣、口腔衛生状態のデータを解析し、関連性を検討している。

4. 研究成果

(1) 試料採取ならびにデータ収集

我々が毎年行っている医療援助に合わせ、ベトナムに赴いた。

平成 22 年度:12 月 24 日～12 月 31 日

平成 23 年度:12 月 23 日～12 月 28 日

平成 24 年度:12 月 21 日～12 月 27 日

ベトナム・ベンチェ省のグエンディンチュー病院にて、口唇口蓋裂患者とその母親、家族を対象に、インフォームド・コンセントを得た上で、口腔粘膜(頬粘膜)の擦過サンプルおよび血液を採取し、口腔粘膜疾患や生活習慣や口腔衛生状態に関するデータを収集した。

平成22年度:患者67名、家族96名、合計163名分

平成23年度:患者56名、家族80名、合計136名分

平成24年度:患者61名、家族78名、合計139名分

(2) 現地研究者との協力関係の構築

試料採取を行った後、平成22年度ならびに23年度には、HPV感染を含め口腔粘膜疾患の研究を行っているホーチミン医科薬科大学を訪問し、歯科口腔病学部の学部長 Le Duv Lanh 氏、副学部長 Ngo Thi Quynh Lan 氏、口腔病理学講座長 Nguyen Thi Hong 氏を含む8名の研究者ならびにスタッフと、共同研究に関する会議を行った。また平成24年度には、ホーチミン医科薬科大学に加え、ハノイ医科大学へも訪問し、歯科口腔病学部の学部長 Truong Manh Dung 氏、副学部長 Tong Minh Son 氏、口腔顎顔面外科の Le Van Son 氏を含む5名の研究者と、今後の共同研究も含め会議を行った。

ホーチミン医科薬科大学口腔病理学講座とは、ベトナム人における口腔癌の遺伝子試料の解析を共同で行うに至り、正常粘膜試料30名分、口腔癌試料100名分のHPV検出を、コンセンサスプライマーGP5+/6+、MY09/11、FAP59/64を用いたPCRならびに、6、11、16、18、33型を同時に検出するMPCR Kit for Human Papilloma Virus (Maxim Biotech, Inc. USA)を用いたPCRにて行った。今後も症例数を増やすため継続して共同研究を実施していく予定であり、現地でDNA抽出を行えるよう、QIAamp DNA Micro Kitを送付した。また平成25年12月には、当科で実施しているPCR等の解析方法を習得する目的で、ホーチミン医科薬科大学口腔病理学講座より研究者が1名来日する予定である。

また、現在当科においても本学附属病院の各種口腔粘膜疾患の検体試料よりDNAを抽出し、HPV感染率や感染HPVの型の分布を調べている。今後、ベトナムの共同研究施設においても同様の解析を進め結果を比較することで、民族による差の観点からも、発生機序を多角的に検証していく予定である。

(3) 試料の解析

研究方法の項に記した通り、HPVのDNA

の検出を種々の方法で行い、結果を検証している。

各検出方法による結果の違い等も含め、関連学会にて発表を予定している。

(4) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

①ベトナムにおける口腔領域のHPV感染と口腔粘膜疾患の発生の現状を、遺伝子工学的および疫学的に統合的に調査した報告は皆無であり、本調査が初めての試みである。

②ベンチェ省メコンデルタ地域は、未だに閉鎖された社会構成と生活習慣が残されているため、先祖代々から引き継いだ遺伝的な形質が比較的よく保たれており、HPV感染と口腔粘膜疾患との関連、特にその発生機序を解明するのに非常に意義があると考えられる。

③この海外学術調査は、現在、急速に欧米化しているベトナムにおいて、伝統的な生活環境におけるHPV感染の現状を検索する貴重な機会であり、この機会を逃せば永遠に無く、急を要するものであった。

④母子とその家族の各世代を通じて口腔領域のHPV感染を調査することで、HPVの感染経路と生活環を検討し得る。

⑤血液試料も採取し得たことで、口腔粘膜と血清中のHPV感染を比較検討することが可能であり、HPVの生活環に関する新たな知見が得られる。

(5) 今後の展望

本研究で得られる成果は、環境および生活習慣とHPV感染の関係ならびに、関連疾患の発生を解明する上で非常に有用であり、HPV感染の予防、さらには関連疾患の予防や治療に大いに寄与するものである。

さらに、口腔領域のHPV感染に対するDNAワクチンの有用性と投与時期・方法を検討する際の基礎的データとして活用できるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

現在、関連学会での発表の準備を進めている。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 和加 (YOSHIDA WAKA)

愛知学院大学・歯学部・助教

研究者番号: 10513210

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者

前田 初彦 (HATSUHIKO MAEDA)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号：30175591

夏目 長門 (NATSUME NAGATO)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号：90183532

久保 勝俊 (KUBO KATSUTOSHI)
愛知学院大学・歯学部・准教授
研究者番号：60329604

杉田 好彦 (SUGITA YOSHIHIKO)
愛知学院大学・歯学部・講師
研究者番号：20367618

佐藤 恵美子 (SATO EMIKO)
愛知学院大学・歯学部・講師
研究者番号：60111001