

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24406034

研究課題名(和文) 一括・同時診断技術を用いたケニアでの歯周病原細菌感染とHIV感染との関連性の研究

研究課題名(英文) Relationship between periodontal infection and HIV infection in Kenya using simultaneous microsphere-based multiplex assays

研究代表者

中山 浩次(NAKAYAMA, Koji)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号：80150473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ケニアMbita地区の年齢20歳以上の対象から得られた血清検体から、さらに無作為に抽出した242検体について歯周病原細菌4菌種に対する抗体価とHIVに対する抗体価との相関性について調べた。その結果、HIVに対する抗体価が高いグループはどの菌種の歯周病原細菌に対しても有意に低い抗体価を示した。他の感染症に対する抗体価についても、HIVの陽性者で低い傾向が認められた。HIV感染による抗体産生機能抑制が歯周病原細菌に対する抗体産生に影響したことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the relationship between levels of plasma antibodies against 4 bacterial species of periodontal pathogens and a level of plasma antibody against HIV in 242 blood samples randomly collected from the general population older than 20 years in Mbita region of Kenya. As a result, we found that groups with higher levels of anti-HIV showed lower levels of anti-periodontal pathogens. This tendency was observed in the relationship between anti-HIV and anti-other pathogens. These results indicate that general suppression of antibody production by HIV infection affects production of anti-periodontal pathogens antibodies.

研究分野：口腔病原微生物学

キーワード：歯周病原細菌感染 HIVに対する抗体価 エイズ

### 1. 研究開始当初の背景

エイズ・パンデミックは現在も依然として続いている。ヒト免疫不全ウイルス (HIV) が粘膜表面をどのように通過し、感受性細胞に接近するかについてはほとんどわかっていない。ミネソタ大学の M. Herzberg らは歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* と口腔粘膜ケラチノサイトとを共培養すると本菌の産生するジンジパインプロテアーゼによる限定分解で細胞表面の PAR 受容体が活性化し、その結果、細胞表面に CCR5 受容体が出現し、R5 指向性 HIV がケラチノサイトに侵入することを発見した (Giaman et al., J. Immunol., 2007)。さらに HIV 含有ケラチノサイトは CD4, CXCR4 および CCR5 を発現している細胞に HIV を感染させ、HIV 増殖を引き起こすことを発見した (Giacaman et al., Retrovirology, 2008; Vacharaksa et al., ibid., 2008)。この発見は *P. gingivalis* が存在すると口腔粘膜ケラチノサイトを介して HIV 感染を受ける可能性を示唆している。一方、今井らは潜伏 HIV ウイルスの再活性化への *P. gingivalis* の影響を調べた (Imai et al., J. Immunol., 2009)。HIV 感染を受けた細胞では HIV ゲノム DNA はヘテロクロマチンに統合した状態で維持されており、HIV 遺伝子が転写・翻訳されていない、サイレントなプロウイルスとして潜伏している。この潜伏感染にはヒストン・デアセチラーゼによるヒストンタンパク質の低アセチル化が関係している。彼らは *P. gingivalis* 培養液で HIV 潜伏細胞を処理すると HIV ゲノムの複製 (HIV の再活性化) が起こることを発見した。この活性は *P. gingivalis* の線毛、プロテアーゼ、LPS などの細菌細胞性因子とは無関係であり、培養上清に活性があることがわかった。さらにその本体は培養上清中の本菌の代謝産物である酪酸にあることをつきとめた。さらに、HIV の活性化は酪酸がヒストン・デアセチラーゼを阻害することで起こることがわかった。これらの結果は歯周病が HIV 感染者における HIV の再活性化の危険因子であり、HIV の全身への散布に関わる可能性があることを示唆した。

上記の2つのグループの研究は *P. gingivalis* 感染が HIV の初感染・再活性化に関与している可能性を示唆した実験結果を提示している。このことが実際の感染で起こっているとすると口腔粘膜からの HIV 感染の予防や HIV 感染者における HIV 再活性化の防止において歯周病予防あるいは歯周病治療の重要性がクローズアップされる。しかしながら、*P. gingivalis* 感染を含めた歯周病罹患状況と HIV の初感染・再活性化との関係を示すためには、実際の HIV 感染者における歯周病罹患状況や *P. gingivalis* 感染の有無をフィールド調査研究において実証していく必要がある。さらに踏み込んで言えば、そのようなフィールド調査研究を行わなければ、実験室レ

ベルでの特殊な結果であると言われてもやむを得ないと思われる。

ケニア共和国は東アフリカの主要国で政治、経済が比較的、安定している。人口 4,000 万人に対して歯科医師は 700 名と、人口 10 万人あたりでは、わが国の 50-60 分の 1 と極端に少なく、さらに都市部に 80% 以上の歯科医師が偏在しており、地方では無歯科医地区が一般的である。アフリカの優等生といわれているケニアでも地方の歯科事情は我が国と比べて極めて劣悪である。ケニアは HIV 感染者が世界的にみてもっとも多い地域であるサハラ以南アフリカに位置しており、HIV 成人感染率は 6.3% (2009 年推計、UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2010) であり、保健衛生上、大きな問題となっている。

現在、長崎大学熱帯医学研究所はケニア中央医学研究所および世界保健機関アフリカ地域事務所との協力体制のもとに HIV 感染を含めた複数感染症の一括同時診断技術の分子生物学的研究・開発を行い、住民を対象としたフィールド研究を平成 23 年度から実施している。複数感染症の一括同時診断技術とはマルチプレックス解析法を適用したものであり、100 種類のマイクロビーズに解析対象と結合する物質を固定させることにより、少量血液サンプルから、100 項目を同時に解析する技術で、この技術は既に確立されている。現在、HIV ウイルス、コレラ菌、結核菌、リーシュマニア原虫、フィラリア原虫、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、トキソプラズマ原虫、赤痢アメーバなどの複数の熱帯感染症病原体の抗原をマイクロビーズに固定させる物質として解析を行っており、これらの病原体に対する抗体の有無により罹患状況を把握する研究を行っている。

### 2. 研究の目的

HIV の感染・再活性化を歯周病原細菌 *P. gingivalis* 感染が助長・誘発する可能性を示唆する研究結果が複数の研究者により報告されてきている。長崎大学はケニア共和国に長崎大学アフリカ海外教育研究拠点を設立し、ケニア中央医学研究所および世界保健機関アフリカ地域事務所との協力体制のもとに HIV 感染を含めた複数感染症の一括同時診断技術の分子生物学的研究・開発を行い、住民を対象としたフィールド研究を平成 23 年度から実施している。本研究目的はこのプロジェクトに *P. gingivalis* などの歯周病原細菌の全菌体抗原および抗原タンパク質を加えることでケニア地区における HIV 感染・再活性化と歯周病原細菌感染との関係をフィールド研究において明らかにすることにある。

### 3. 研究の方法

(1) 一括同時診断技術による抗歯周病抗体検出のための抗原タンパク質の分離・精製：*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*(aa抗原)、*Tannerella forsythia*(Tf抗原)、*Prevotella intermedia*(Pi-OM14抗原、Pi-S17抗原)、*Porphyromonas gingivalis*(pg抗原)の4病原体、5抗原について、菌体破碎後の可溶性成分を抗原として、一括同時診断システムの組み込むため、診断用マイクロビーズを作成した。これらのビーズをすでに開発を終了している他の感染症に対する診断用ビーズと共に使用し、歯周病4種・5抗原とHIVに対する3種の抗原に対する抗体価を複数の感染症(病原体)に対する抗体価測定を実施した。

(2) 実際の抗歯周病抗体の検出：  
対象地域：  
ケニア共和国西部ピクトリア湖畔のMbita地区を用いた。Mbita地区は、長崎大学-ケニア中央医学研究所プロジェクトにより住民登録(Health and Demographic Surveillance System: HDSSと称する)が実施されている地域であり、同調査地域に居住する全住民約5万人が登録されている。また、同地域の一般住民におけHIV感染割合は26%と報告されている。

対象者：  
マルチプレックス技術の評価のために約5万人の住民から、HDSSのデータベースから性・年齢階級別(5歳間隔で、ゼロ歳~45歳以上を10段階に分けた10年齢階級)に無作為に抽出した2000名に対し調査協力依頼を行い、1958名から同意を得て、採血を実施した。本研究では、実際に採血により得られて検体から、年齢20歳以上の対象から得られた検体から、さらに無作為に242検体を抽出し、歯周病菌病原体に対する抗体価をマルチプレックス技術により測定を実施した。

(3) 歯周病菌抗体価とHIV抗体価との関係についての解析  
HIVに対しては、3つの抗原(gag, gp41, gp120)に対する抗体価をマルチプレックス技術により同時に測定した。それぞれの抗原に対する抗体価のカットオフ値については、抗体価(対数値に変換)の分布が複数の正規分布により構成されていると仮定から、数理モデル(finite mixture model)により分離した複数の正規分布から一番高い中央値を持つ正規分布と2番目の正規分布を用い、その2つの分布から、感度・特異度が最も高くなる抗体価(Youden index: (感度-(1-特異度))が最大となる値のこ))を持って、カットオフ値とした。これを3種のHIV抗原に対して行い、それぞれのHIV抗原に対する抗体陽性・陰性を決定した。さらに、3つの抗体価の値を主成分分析(Principal component analysis: PCA分析)にかけ、その第一成分

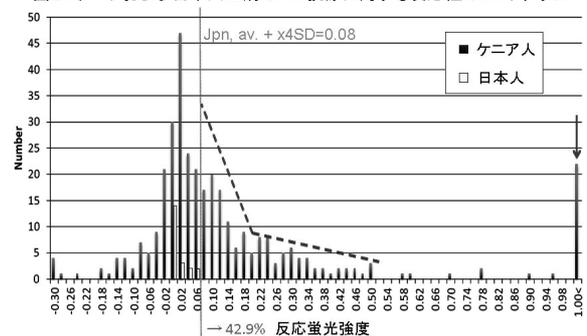
から、対象者をHIVの抗体値により低値から高値にかけて5群に分類した。下位2群は、陰性、上位2群は陽性、中間の群は感染の評価が難しいという解釈となる。

さらに歯周病菌抗原5種に対する抗体価の分布を上記HIV抗体価5群間で比較した。歯周病菌抗体価の群間比較については、それぞれの群の分散が統計的に差の無い場合(Bartlett検定)にANOVAを用い、分散に差がある場合は、Kruskal-Wallis検定を用いた。

#### 4. 研究成果

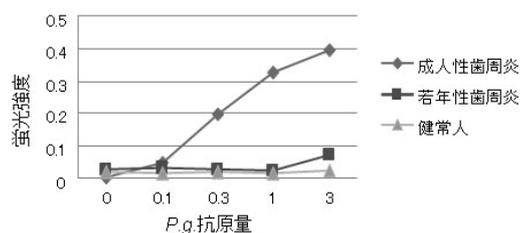
(1) HIVウイルスのGag (group specific antigen)のマトリックス(MA)とカプシド(CA=p24)領域のリコンビナントタンパク質をアミンカップリング法により、カルボキシルコートビーズに結合させたものを用いたマルチプレックス解析により、ケニアの検体に現在、想定されているより、はるかに多いHIV潜伏感染者が存在することが示唆された(下図)。

図2. ケニアおよび日本人血清のHIV抗原に対する反応性のヒストグラム



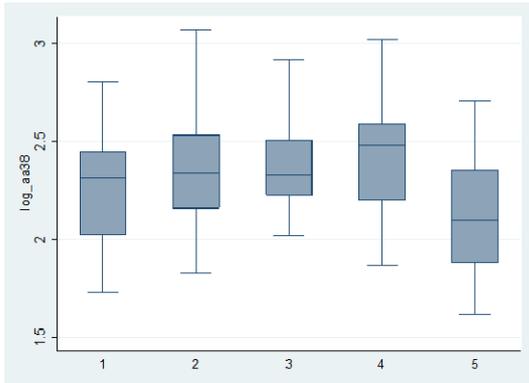
(2) *P.gingivalis* 菌体破碎後の可溶性成分を抗原として、マイクロビーズにアミンカップリングさせたもので成人性歯周炎の患者、若年性歯周炎の患者および健常者の血清中の抗体価を測定したところ、健常人や若年性歯周炎では、ほとんど反応が認められないが、成人性歯周炎患者においては、抗原の濃度依存性に反応が強くなり、血清中に抗P.g.抗体が存在することが確認された(下図)。

図3. P.g. 抽出液に対する血清抗体価



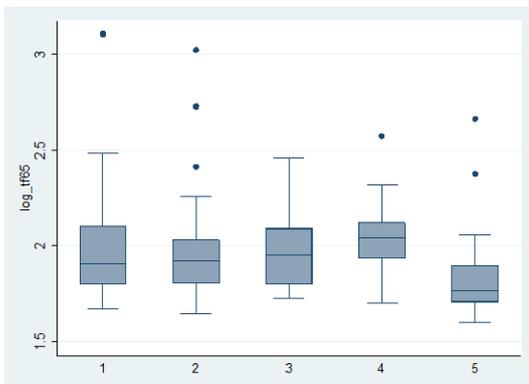
(3) 歯周病菌抗体価とHIV抗体価との関係  
*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (aa抗原)

HIV、5群の間の抗体価の比較については、ANOVAにより、F値0.0000となり群間に統計学的に有意な差が生じていた。実際の分布は、下図のようであり、HIV陽性者に有意にaa抗原に対する抗体価が低い傾向にあることが明らかとなった。



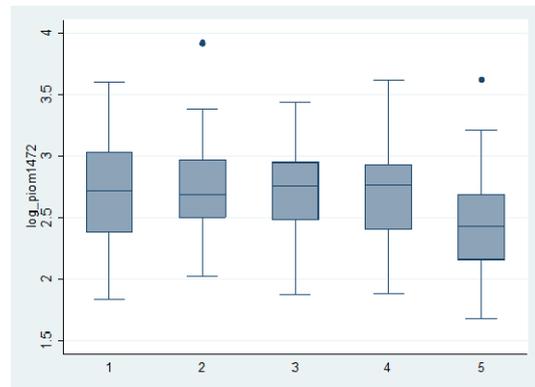
*Tannerella forsythia* (Tf 抗原)

HIV、5群の間の抗体価の比較については、Kruskal-Wallis検定により行った。p値0.0000となり群間に統計学的に有意な差が生じていた。実際の分布は、下図のようであり、HIV陽性者に有意にTf抗原に対する抗体価が低い傾向にあることが明らかとなった。



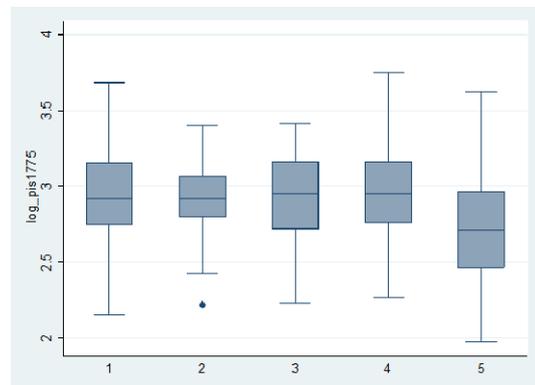
*Prevotella intermedia* (Pi-OM14 抗原、Pi-S17 抗原)

Pi-OM14 抗原に対する抗体価の HIV、5群の間の抗体価の比較については、ANOVAにより、統計学的に差があるかどうかの検討を行った。その結果、F値0.0006となり群間に統計学的に有意な差が生じていた。実際の分布は、下図のようであり、HIV陽性者に有意にPi-OM14 抗原に対する抗体価が低い傾向にあることが明らかとなった。



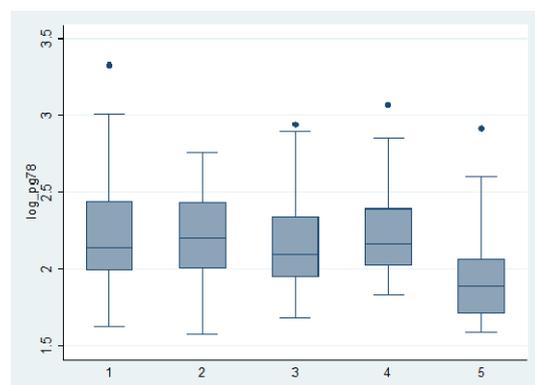
Pi-S17 抗原

Pi-S17 抗原に対する抗体価の HIV、5群の間の抗体価の比較については、Kruskal-Wallis検定により検討を行った。その結果、p値0.0058となり群間に統計学的に有意な差が生じていた。実際の分布は、下図のようであり、HIV陽性者に有意にPi-S17 抗原に対する抗体価が低い傾向にあることが明らかとなった。



*Porphyromonas gingivalis* (pg 抗原)

HIV、5群の間の抗体価の比較については、ANOVAにより、F値0.0000となり群間に統計学的に有意な差が生じていた。実際の分布は、下図のようであり、HIV陽性者に有意にpg抗原に対する抗体価が低い傾向にあることが明らかとなった。



(4)他の感染症(トキソプラズマ、アメーバ赤痢、フィラリア)に対する抗体価についても、HIVの陽性者で低い傾向が認められた。

#### (5)抗体価間の関連について

複数の抗原に対する抗体価間の関連を「外れ値の存在」も考慮し、ノンパラメトリックな順位相関を測る Spearman 順位相関により検定した。HIV 陽性者に関しては、抗体産生能力低下の問題も上記より示唆されたことから、HIV 陰性者の 142 名を抽出し、相関を検討した。

以下、検定結果の p 値を示す。赤の太字の p 値の関連が有意であり、相関があると言える。

	aa	tf	pim14	pis17	pg	krp42	sag1	igl
tf		0.0038						
pim14	0.0197	0.0001						
pis17	0.0011	0.0000	0.0000					
pg	0.0026	0.0054	0.0000	0.0019				
krp42	0.4324	0.1155	0.8029	0.2200	0.0994			
sag1	0.3555	0.4706	0.3086	0.6587	0.4828	0.0382		
igl	0.3320	0.9722	0.2680	0.4726	0.3590	0.0009	0.0008	
sxp1	0.7291	0.1858	0.6005	0.2728	0.4765	0.4760	0.0000	0.0327

\* aa: *Actinomyces mucosus*; tf: *Tannerella forsythensis*; pim14/pis17: *Prevotella intermedia*; pg: *Porphyromonas gingivalis*; krp42: *Leishmania donovani*; sag1: *Toxoplasma gondii*; igl: *Entamoeba histolytica*; sxp1: *Mucorales* (Banerjee)

すべての歯周病菌の抗体価の相関は、統計学的に有意であり、住民は、複数の歯周病原細菌に感染している可能性が示唆された。他の感染症(リーシュマニア、トキソプラズマ、アメーバ赤痢、フィラリア)と歯周病原細菌の関連は見られなかった。

#### <考察>

今回の研究の結果、当初の仮説に反して、HIV感染者は HIV 非感染者に比べ、歯周病菌に対する抗体価が低いことが明らかとなった。その解釈として、これまでの研究により、HIV のウイルス表面に見られる gp120 がヒトの抗体産生 B 細胞を不活化することが明らかになっている (Jelicic ら 2013)。この研究は、HIV に対する抗体応答が、HIV 感染初期に十分に機能しない事を明らかにした研究であるが、同様に抗体産生機能の抑制が他の感染症に対しても発生していることが予想される。また、歯周病菌に対する状況と同様に、HIV 陽性者は、他の感染症(トキソプラズマ、フィラリア、アメーバ赤痢)に対する抗体価についても低値である傾向が高いことも明らかとなった。このことから、HIV 陽性者の抗体産生能の HIV ウイルスによる抑制により、当初の目的が果たせなかった可能性が高い。また、今回の調査対象は、一般住民であることから、感染状況を十分に把握していないで、ART (antiretroviral therapy) を受けていない対象も含まれていることも予想される。HIV の初期感染もしくは活動的な HIV 感染者が多く含まれることが予想され、今回の様な結果に至ったと推測される。

また、調査地域の文化的特徴も一つの容認である可能性もある。同地域は、ビクトリア湖漁を行う漁師村が多数あり、文化的に魚の売り買いに jaboya 性交渉がともなう文化がある。近年、そのような文化的・地域的背景が

HIV 感染の拡大を促進しているとの批判も高い。このように HIV の感染経路は、おもに通常の性交渉である場合が多く、口腔粘膜からの感染経路が少ないという状況も今回の結果に反映されている可能性も否定できない。今後、コホート研究などにより、HIV に感染していない住民を把握し、歯周病原細菌感染状況の把握とその後の HIV に関する追跡調査により HIV 感染と歯周病原細菌感染の関係を調査する必要があると考えられる。

#### 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)

Fujii Y, Kaneko S, N zou SM, M w au M, N jenga SM, Tanigawa C, Kim o tho J, M w angi AW, Kiche I, M atsum oto S, N iki M, O sada-O ka M, Ichinose Y, Inoue M, Itoh M, Tachibana H, Ishii K, Tsuboi T, Yoshida LM, M ondal D, Haque R, Ham ano S, Changom a M, Hoshi T, Kam o K, Karam a M, M iura M, Hirayam a K. Serological surveillance development for tropical infectious diseases using simultaneous microsphere-based multiplex assays and finite mixture models. PLoS neglected tropical diseases 2014 Jul;8(7): e3040. doi: 10.1371/journal.pntd.0003040. 査読有

#### (学会発表)(計 1 件)

中山 浩次: ケニアにおける HIV 感染と歯周病原細菌感染との関係、第 56 回歯科基礎医学会総会、福岡国際会議場(福岡市) 2014 年 9 月 25-27 日

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

中山 浩次 (NAKAYAMA, Koji)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授  
研究者番号: 80150473

##### (2)研究分担者

金子 聡 (KANEKO, Satoshi)  
長崎大学・熱帯医学研究所・教授  
研究者番号: 00342907

原 宜興 (HARA, Yoshitaka)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授  
研究者番号: 60159100

藤井 仁人 (Fujii, Yoshito)  
長崎大学・熱帯医学研究所・助教  
研究者番号: 10404237

(3)連携研究者

筑波（門脇） 知子（TSUKUBA(KADOWAKI),  
Tomoko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・  
准教授

研究者番号：70336080