

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11468

研究課題名(和文) 男性も含めたヒトパピローマウイルス感染予防法の開発に向けた疫学調査

研究課題名(英文) Epidemiological study for preventives against HPV infection including men

研究代表者

吉田 和加 (YOSHIDA, Waka)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：10513210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：口腔領域において、ヒトパピローマウイルス(HPV)の感染と扁平上皮癌などの病変との関連が示唆されている。HPVの感染には不明な点が多く、感染様式、感染頻度、感染HPVの型を解析する必要がある。我が国では、子宮頸癌予防のためのHPVワクチン等、女性への情報は広まりつつあるが、口腔癌、中咽頭癌などは、男性の感染対策も必要である。

我々はモンゴル国での医療援助活動に同行し、同意の得られた約1,390名分の口腔粘膜試料を採取し、専門医による粘膜疾患の有無と種類の確認、飲酒や喫煙等の生活習慣や口腔衛生状態等の調査を行った。我々が改良した感度の高い検出法を用い、疫学情報との統合的な解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HPVの検出に加え、年齢、性別、口腔粘膜疾患の有無とその種類、生活習慣に関する調査も合わせて行うことで、HPV関連口腔粘膜疾患の発生機序解明、HPV感染の予防法や治療法開発に向けた基礎データが得られる。子宮頸癌のみならず、男性も含めた口腔癌等の口腔粘膜疾患や中咽頭癌、肛門や性器等の癌を含むHPV関連粘膜疾患のリスク軽減につながる可能性がある。

予防法開発に向けた基礎研究であり、人類のQOL向上や、医療保険制度における国の支出削減に貢献できる可能性がある。今後、感染予防に応用し得るデータが得られれば、啓蒙も含め広く成果を還元できる。

研究成果の概要(英文)：It is suggested that human papillomavirus (HPV) cause oral squamous cell carcinoma and other diseases in oral cavity. There are many unclear points in the HPV infection. It is necessary to study the mechanism of the infection in oral cavity, the infection rate, the type of infected HPV, etc. In Japan, information of HPV is spreading to women, particularly HPV vaccines for the prevention of cervical cancer. But, prevention of oral cancer and oropharyngeal cancer etc. is needed for men, too.

We went to Mongolia, and after giving informed consent, we had taken oral mucosa samples, from approximately 1,390 persons. Additionally, we had taken the information of diseases in oral cavity confirmed by dentist, and the data of lifestyle including drinking and smoking, hygiene of oral cavity. We are analyzing these samples using the high-sensitivity methods we improved, and investigating with epidemiological data, integratedly.

研究分野：口腔病理学

キーワード：病理学 ウイルス 感染症 HPV

1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌の原因として知られるヒトパピローマウイルス(HPV)は、口腔癌等の口腔粘膜疾患や肛門や性等の癌にも関与している。我々は、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、HPV がその発生に重要な関与をしていることを報告した (Kojima, A., Maeda, H., et al.: Human papillomavirus type 38 infection in oral squamous carcinoma. *Oral Oncol*, 38: 591~596, 2002.)。また、日本における健常な口腔領域の 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、感染率が増加することが判明した (Kojima A., Maeda, H., et al.: 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 感染の関係を検索した結果、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、他:高校生における口腔の衛生状態とヒトパピローマウイルス (HPV) 保有に関する研究。東海学校保健研究, 32:3~12, 2008)。

最近の報告では、歯肉の接合上皮から HPV が検出され、口腔が HPV のリザーバーとなっていることが報告されている。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、HPV 感染はその生活習慣に大きく依存することが考えられるものの、口腔領域における HPV の伝播経路やライフサイクルは未だ明らかになっていない。

これらの結果をふまえ、平成 22~24 年度基盤研究(B) (海外学術調査)「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」(研究代表者:吉田和加)を得て、伝統的な生活環境を保っている地域における口腔領域の HPV 感染と口腔粘膜疾患の発生状況の調査ならびに遺伝子工学的な検索を、母子・家族を対象として行った。ホーチミン医科大学との共同研究においては、口腔癌の 18%、咽頭癌の 16%に HPV 感染を検出した。この研究の中で、子宮頸部用の WHO の方法を改良し、少量あるいは断片化したウイルス DNA も検出し得る感度の高い解析方法を開発し、粘膜指向性の 40 種類にのぼる HPV 型の同定を可能にした。

これまで、HPV 感染の多くは一過性であると思われてきたが、最近の研究から HPV 感染の大部分は潜伏感染になり不定期に HPV 増殖を繰り返すと考えられるようになった。我々の開発した解析方法は、潜伏感染中の少量のウイルス DNA の検出にも有効であると考えられる。

子宮頸癌と HPV の関連については研究が進んでおり、子宮頸癌の発症に必須であるとされる HPV 感染には、16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 58 型などの高リスク型が関与するといわれている。近年、我が国においても子宮頸癌に関し、HPV16, 18 型に対する予防ワクチンが承認されたが、16, 18 型以外の高リスク型や、既感染者には効果がないなど、問題点も多い。現在は副反応の問題で推奨されていない。また日本では男性への接種の勧告は行われておらず、感染源の減少が望めない他、男性の口腔癌や肛門や性器の癌をはじめとする HPV 関連粘膜疾患の予防には活かされていない。

子宮頸部への HPV 感染の要因は、性交渉によることが明らかにされているものの、口腔領域への感染については、先述のように幼児期から感染が認められたり、口腔衛生状態の改善による感染率の減少がみられるなど、感染経路や持続感染の要因が様々であり、性別、年齢、口腔粘膜疾患の有無、生活習慣などを含めた調査検討が必要である。

近年、高リスク型である HPV-16, 18 型に対するワクチンが子宮頸癌の予防を目的に承認され、日本でも若年女性を中心に接種が開始された。ワクチン接種による副反応の疑いのある症例が大きく報道されたことで、日本では現在積極的な接種推奨は一時的に中断しているものの、若年女性をはじめ、既にワクチン接種を済ませた者を含む一般集団は、ワクチンに含まれる HPV 型に加え、他の型への交叉免疫を含め、HPV の分布に変化が生じているはずである。このような、重要度の高い HPV 型の分布に変化が生じている集団は、本来の HPV 分布の調査には適さない。

一方、我々が医療援助活動の一環として毎年歯科検診を実施しているモンゴル国は、まだ HPV ワクチンが普及していないため、ワクチンとして用いられている、感染率とリスクの高い重要な HPV 型の分布に変化は生じておらず、本来の HPV 分布の調査に適している。今後はモンゴル国でも HPV ワクチンが普及することが予想され、今この時期を逸しては、本研究のような調査を行っても、大規模一般集団における 16, 18 型とその交叉免疫のみられる型の分布に関する正確なデータは得られない。この理由からも、本研究は今を置いて他にはない急を要する研究課題である。

2. 研究の目的

我が国では、子宮頸癌予防を目的とした HPV-16, 18 型のワクチン等、女性への情報は広まり

つつあるが、男性の感染対策は行われていない。性感染症で、16,18 型以外の高リスク型も多く、男性の感染も予防されない限り子宮頸癌は無くならない。また、HPV 関連の尖圭コンジローマや口腔癌、中咽頭癌、肛門癌などを減らすためには、豪州や米国同様、男性もワクチンは必須である。

本研究では、HPV ワクチンが普及していないモンゴル国で口腔粘膜試料を採取し、約 40 種の粘膜指向性 HPV 型を高感度に検出する。また、専門医による粘膜疾患の有無と種類の確認、飲酒や喫煙等の生活習慣、口腔衛生状態の調査の結果と合わせて解析する。

これは、口腔癌等の口腔粘膜疾患や中咽頭癌、肛門や性器等の癌を含む HPV 関連粘膜疾患の予防法開発に向け、リスク要因や、効果的なワクチンとその投与時期の検討のための基礎データを得るものであり、子宮頸癌のみならず、男性も含めた全ての粘膜指向性 HPV 関連疾患の減少に寄与する。

3. 研究の方法

口腔領域の HPV 感染の疫学的および遺伝子工学的調査と、口腔粘膜疾患の有無や口腔衛生状態や生活習慣などの疫学的調査とを、同時に統合的に行う。

(1) 試料採取ならびにデータ収集

若年女性をはじめ既にワクチン接種が開始された日本においては、ワクチンに含まれる HPV-16,11,16,18 型に加え、他の型への交叉免疫を含め、HPV の分布に変化が生じており、本来の HPV 分布の調査には適さないため、ワクチンが普及しておらず調査に適したモンゴル国の試料を用いることとした。

モンゴル国における医療援助活動の一環として毎年実施している歯科検診への来訪者の内、インフォームド・コンセントの得られた者を対象とした。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、保存液中に懸濁した。また、専門医による粘膜疾患の有無と種類の確認を行い、生活習慣や口腔衛生状態や感染症などに関するデータ（飲酒、喫煙、義歯、疣贅など）を収集した。

(2) 遺伝子試料とデータの解析

愛知学院大学歯学部口腔病理学講座において、解析を行っている。

DNA 抽出と、DNA 試料の質の確認

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。

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) を用いて 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ている。

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 法にて行っている。

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)

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) これらの結果をもとに検討している。

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ている。

Reverse 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) による子宮頸癌の調査で用いられている Reverse Line Blot 法による型の同定方法を参考に、主に下記の 3 点において改変した。

- ・断片化 DNA 用に、PCR 産物の小さいコンセンサプライマーへ変更
MGP プライマー (PCR 産物: 約 150 bp) (J Clin Microbiol, 47(3): 541-546, 2009 より)
- ・最大 43 種類のプローブを用い、一度に多数の HPV 型を同定
45 レーンのプロッター装置にアプライできる最大数とした。
- ・口腔粘膜への感染が報告されている HPV 型のプローブを追加

この方法は、多くの種類の HPV 型にそれぞれ特異的なプローブに 5' -アミノ修飾 C6 を行ってメンブレンに吸着させておき、そこに、ビオチン修飾したコンセンサプライマーで増幅した各サンプルの 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、多くの種類の HPV 型を同時に検出することが可能である。

疫学データの統合的解析

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

モンゴル国で毎年行われている歯科診療の医療援助活動に同行した。

2016 年度: 8 月 17 日~8 月 21 日

2017 年度: 8 月 16 日~8 月 20 日

2018 年度: 8 月 16 日~8 月 21 日

ウランバートル市ナライハ区の病院 (2016 年)、ウルジート区集会所 (2017 年、2018 年) にて実施された歯科診療に訪れた子供と両親などの付き添い者を対象に、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。

2016 年度: 約 445 名分

2017 年度: 約 403 名分

2019 年度: 約 542 名分

合計: 約 1,390 名分

(2) 現地研究者との協力関係の構築

モンゴル国での医療援助活動の一環である歯科診療は、モンゴル国立医療科学大学の協力の下に行われている。また我々、愛知学院大学歯学部口腔病理学講座も、当該大学の卒業者を招聘し、口腔病理診断の研修を行うなど、長年にわたり協力関係を築いている。今回の調査では、以前に当科で研修した経験のある 4 名の歯科医師の協力が得られた。

今回の研究を含め、口腔癌をはじめとする口腔領域の疾患に関する共同研究を継続するため、試料採取に合わせ、モンゴル国立医療科学大学を訪問し、長年協力関係にある同大学の研究者 (Ariuntuul Garidkhuu 氏 (准教授)、Uranchimeg Dolgorjav 氏 (准教授)、Delgertsetseg Jargaltsogt 氏 (歯科医師)、Oyundari Batbulgan 氏 (歯科医師)、Bulgan Chadraabal 氏 (歯科医師)) や、歯学部長と研究打ち合わせを行った。

また、現在当科では、日本人の HPV 感染に関する共同研究にも参加している。今後、モンゴルでの結果と比較することで、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。

(3) 試料の解析

研究方法の項に記した方法にて解析を進めている。

関連学会での学会発表と論文投稿の準備を進めている。

(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

ウイルスの検出方法は、精度が重要である。我々が改良した、潜伏感染中の少量のウイルスとその型も検出できると考えられる感度の高い検出方法を用いている。これは、粘膜指向性の約 40 種類もの HPV 型を同定し得る。

海外で実施された調査では、口洗いで得られた試料を用いているが、我々は粘膜擦過によって、より多くの細胞数を得られている。また、ある程度断片化された鋳型 DNA から検出し得る、PCR 産物の小さなプライマーを用いるなど、他の調査と異なる改良した検出方法を用いている。

モンゴル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、統合して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。

モンゴルでは、まだ HPV ワクチンが普及していないため、先進国で広く普及しているワクチンに含まれる HPV-16, 11, 16, 18 型に加え、他の型への交叉免疫を含め、HPV の分布に変化が生じていない。そのため、本来の HPV 分布の調査が行え、発生機序解明のためのデータを得るのに適していると考えられる。

子供とその家族からサンプルや疫学情報を得て行った調査であり、家族内での伝播について検証できる。

年齢、性別、口腔粘膜疾患の有無とその種類、生活習慣に関する調査も合わせて行い、HPV 関連口腔粘膜疾患の発生機序解明、HPV 感染の予防法や治療法開発に向けた基礎データを得る。子宮頸癌のみならず、男性も含めた口腔癌等の口腔粘膜疾患や中咽頭癌、肛門や性器等の癌を含む HPV 関連粘膜疾患のリスク軽減につながる可能性がある。

(5) 今後の展望

予防法開発に向けた基礎研究であり、人類の QOL 向上や、医療保険制度における国の支出削減に貢献できる。感染予防に応用し得るデータが得られれば、啓蒙も含め広く成果を還元できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田 和加, 加藤 世太, 河合 遼子, 磯村 まどか, 佐藤 伸明, 杉田 好彦, 久保 勝俊, 前田 初彦
2. 発表標題 口腔領域のヒトパピローマウイルスDNAの検出におけるリバースラインプロットティング法の検討
3. 学会等名 第70回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	前田 初彦 (MAEDA Hatsuhiko)		
研究協力者	久保 勝俊 (KUBO Katsutoshi)		
研究協力者	杉田 好彦 (SUGITA Yoshihiko)		
研究協力者	加藤 世太 (KATO Seeta)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	夏目 長門 (NATSUME Nagato)		
研究協力者	嶋崎 義浩 (SHIMAZAKI Yoshihiro)		