

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390462

研究課題名(和文) ヒト免疫不全ウイルス感染者の病態把握における唾液検査の実用化

研究課題名(英文) Practical applications of saliva test to grasp the condition of HIV-1 infected patients

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円、(間接経費) 3,960,000円

研究成果の概要(和文)：HIV-1感染者の治療において重要な抗ウイルス薬の内服状態の把握と、行政統計で最も問題となる新規感染者の感染時期判定法の開発を目的とした。

まず、HIV感染者の血中と唾液中薬剤濃度測定法を開発した。そして血液中と唾液中の薬剤濃度を測定し、両者が相関関係にあることを見出した。これにより、薬物動態を唾液を用いて評価できる可能性が示唆された。次に、唾液中に感染性がない原因が唾液中のウイルス粒子の中のRNAが損傷を受けることにあるという仮説を立て、それを検証するための測定法を確立した。

これらの研究はHIV-1感染者にとってより簡便な検査や感染時期判定に役立つ。

研究成果の概要(英文)：The aim of our study is to evaluate the efficacy of a regimen or monitor the compliance of patients treated with antiretroviral therapy. Another aim is to develop a method for determination of HIV-1 infection period of novel patients.

First, we established a method to measure drug concentrations in plasma and saliva. Then, we measured drug concentrations in plasma and saliva and found significant correlations were evident between drug concentrations in saliva and those in plasma, so the possibility of using saliva was suggested. Second, we generated a hypothesis that HIV-1 infected patient's saliva have no infectivity because HIV-1 RNA in saliva were damaged. Then, we established a method for validate this hypothesis.

These studies are valuable for HIV-1 infected patients with more convenient clinical examination or determination for the period of HIV-1 infection.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：HIV 唾液 薬物濃度測定

1. 研究開始当初の背景

HIV 多剤併用療法での薬剤の飲み忘れは高頻度で薬剤耐性ウイルスを誘導する。耐性ウイルスの発現は感染者個人における薬剤効果の消失ばかりか、その耐性ウイルスが蔓延することで有効な薬剤の減少を意味し、医療上重大な課題の一つである。それゆえに、服薬維持をささえるモニタリング技術および管理体制の向上は重要な意義を有する。

HIV 感染者の歯科医療では、唾液や切削時の飛沫感染の可能性が問題とされている。歯科診療所におけるHIV 感染者の診療受け入れについては根拠のない治療拒否が繰り返され、肝炎ウイルスなどとの間には対応に格差が存在する。それに加えて、HIV 感染者の高齢化が進む中、介護保健施設等では院内感染のリスク、職員の教育や経験の不足から、現時点で7 割以上の施設がHIV 感染者の受け入れに難色を示している。それらの理由の一つが、体液としての唾液を介しての感染への懸念にある。したがって、唾液を介するHIV 感染リスクの科学的検証は歯科界のみならず社会的にも重要な課題と言える。

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) LC MS/MS を用いて唾液・血中薬剤濃度間の相関を明らかにする。
唾液検査を用いた血中薬剤濃度判定法の実用性を検証する。
- 2) HIV 特異的な血中IgG と唾液中分泌型IgA の生成に時間的ずれがある可能性に着目し HIV感染者の定期来院時における採血および唾液採取により特異的な血中IgG と唾液中分泌型IgAの抗体価の継時変化を測定する。
その結果から特異的な血中IgG と唾液中分泌型IgA の量的関係から感染時期を推定する方法を開発する。
- 3) 唾液中のウイルス構造の断片化を、リアルタイムPCR 法を応用し、定性する。
唾液の非感染性を証明する。

3. 研究の方法

1) LC MS/MS を用いた唾液・血中薬剤濃度間の相関。

唾液中の薬剤濃度の測定

- ・HAART 療法中の患者より血液と唾液を採取する（新潟大）。
- ・新潟大学から慶應大学への血液と唾液サンプルの運搬の際はポータブル保管用冷凍庫を用いる。
- ・唾液中薬剤濃度の定量は慶應大学にて行う。
- ・唾液は安静時唾液を吐唾法により採取し、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注入し、即時-80 で保存する。
唾液50 μ L に50 μ L のエタノールを加え、混合する。
エタノール希釈した唾液を14000 rpm で1分間遠心分離する。
上清液40 μ Lを減圧遠心乾燥器にて乾燥する。
乾燥物を20 μ L のLC 初期移動相で溶解する。

液体クロマトグラフ-タンデム質量分析装置 (LC-MS/MS) で薬剤成分を定量する。

血液中の薬剤濃度の測定

- ・静脈血5ml を採血し、密封し-80 で保存する。
- ・新潟大学検査部にて、血液を遠心分離にかけ血清成分を用い、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注入し、即時-80 で保存する。
血清50 μ L に50 μ L のメタノールを加え、混合する。
エタノール希釈した血清を14000 rpm で1分間遠心分離する。
以下、唾液測定と同じ。
計測対象薬剤は、HARRT 療法において一般的なKey drug: DRV、RAL およびBackbone drug:ABC、TDF を対象とする。

2) HIV 感染者の定期来院時における採血および唾液採取により特異的な血中 IgG と唾液中分泌型 IgA の抗体価の継時変化を測定する。
唾液中分泌型 IgA および血中 IgG の測定

- ・新規 HIV 感染者の定期受診時に唾液および血液を採取する（新潟大、および慶應大学病院関連施設）。
- ・採取した唾液は即時-80 で凍結し、測定まで保存する。
- ・新潟大学検査部で遠心分離にかけ血清成分を用い、マイクロチューブに注入し測定まで-20 で保存する。
- ・血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を用いる。

・唾液分泌型IgA はEIA法によるEIA s-IgA テストキット (MBL社) を用いて定量する。同様に血中IgG の測定を行い、分泌型IgA および血中IgG の抗体価の推移を検証する。まず室温で解凍した検体を遠心分離 (4 , 12000rpm × 15分間) し、反作用緩衝液で40 倍に希釈する。

反作用緩衝液を0.4ml 入れ、希釈した唾液検体を10 μl 加えてよく混和し、抗原抗体反応(一次反応)を促す。37 で1時間静置し、洗浄する。

酵素標識抗体を0.3ml 添加して抗体・抗原・酵素標識抗体の複合体を形成(二次反応)させ、室温(20 前後)で1時間静置し、洗浄。

酵素基質液を0.5ml 入れ、室温(20 前後)で30分静置後、反応停止液を各試験管に2ml 添加し、反応を停止する。

分光光度計の対照として492nm における吸光度を測定し、検体中の抗体量を測定する。

3)唾液中のウイルス構造の断片化を、リアルタイムPCR 法を応用し、定性する。

唾液中の環境(ウイルス阻害因子や低張圧など)におけるHIV-RNA の分解レベルの評価。

HIV 感染者から血液を採取し、同日中に安静時唾液を吐唾法により採取する。

血液および唾液に遠心分離を行い、液性成分と非液性成分に分ける。

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

HIV-RNA からcDNA を合成する。

gag 領域に任意の5 点を設定し、独自に開発した各プライマーを用いてリアルタイム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。

4. 研究成果

我々は、唾液と血中の薬剤濃度の相関関係・唾液中のウイルス構造の断片化の定性についての研究を行った。HIV 感染者の抗体価の経時変化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。

・唾液と血中の薬剤濃度の相関関係

まず LC-MS/MS にて血中と唾液中の薬剤濃度を測定する系を作成した。これにより、従来発表されているものより低い濃度である1ng/mL まで測定可能となった。

次に、同意の取得された患者のべ 30 名から血液と唾液検体を得た。薬剤別の内訳は以下のとおりである。

薬剤名	DRV	RAL	ABC	TDF
n	8	8	16	13

表1: 薬剤別患者人数

また、血液検体は遠心し血漿としたのち、うち半分は centrifree®(メルクミリポア社) にてタンパク質結合型薬剤を除去した血漿を得た。

次に血漿中、除タンパク質血漿中、唾液中の薬剤濃度を測定した。血漿と除タンパク質血漿中薬剤濃度より、各薬剤の血漿タンパク結合率が得られた。またピアソンの相関係数にて計算し、DRV、RAL、ABC において血漿中ならびに除タンパク質血漿中と唾液中の薬剤濃度に相関関係がみられた。さらに、この相関は血漿と唾液よりも、除タンパク質血漿と唾液の方が強いことがわかった。一方でTDF は血漿、除タンパク質血漿と唾液の間に薬剤の相関はみられなかった。

	除タンパク質血漿/ 血漿	唾液/ 血漿	唾液/ 除タンパク質血漿	血漿タンパク 結合率
DRV	29.0 ± 13.1%	6.5 ± 3.4%	27.3 ± 15.5%	74.5 ± 6.0%
RAL	55.6 ± 20.1%	13.5 ± 5.7%	26.0 ± 11.7%	44.4 ± 20.1%
ABC	41.7 ± 15.2%	62.3 ± 19.2%	164.5 ± 60.7%	58.3 ± 15.2%
TDF	113.6 ± 24.5%	2.4 ± 1.8%	2.2 ± 1.7%	10.9%以下

表2: 薬剤濃度の割合と血漿タンパク結合率

	血漿- 除タンパク質血漿 間	血漿- 唾液間	除タンパク質血漿- 唾液間
DRV	0.9364 <i>P=0.0023</i>	0.8847 <i>P=0.0079</i>	0.9222 <i>P=0.0035</i>
RAL	0.9175 <i>P=0.00049</i>	0.9210 <i>P=0.00042</i>	0.9473 <i>P=0.00010</i>
ABC	0.9780 <i>P=6.4 × 10⁻¹¹</i>	0.9375 <i>P=8.4 × 10⁻⁸</i>	0.9759 <i>P=1.2 × 10⁻¹⁰</i>
TDF	0.9819 <i>P=2.6 × 10⁻⁹</i>	0.3175 <i>P=0.29</i>	0.3317 <i>P=0.27</i>

表3: ピアソンの相関係数(P<0.05 で相関あり)

以上より DRV、RAL、ABC に関しては、薬物動態を唾液を用いて評価できる可能性が示唆された。さらにABC の唾液中濃度が高かったことから、Pre-Exposure Prophylaxis (PrEP) すなわち予防内服薬として、今回検討した4 剤の中ではABC を含む抗 HIV 薬の投与が口腔に関連した HIV 感染の予防に有効であると考えられた。

・唾液中のウイルス構造の断片化を、リアルタイムPCR 法を応用し、定性する

私たちがこれまでに行った実験結果から、唾液中ウイルス量の定量が可能であることが認められている。そこで、唾液の感染性が「低い」あるいは「ない」原因が唾液中のウイルス粒子の中のRNAが損傷を受けることにあるという仮説を立て、それを検証するための測定法を確立した。まずRNAの精製操作においてどの程度損傷するかを調べた。精製する前のRNAと精製後のRNAはどちらもCT値の傾きが0に近く有意差がなかった($P=0.48$)。これは精製操作においてRNA鎖の切断は起こっていないことを示している(図1)。

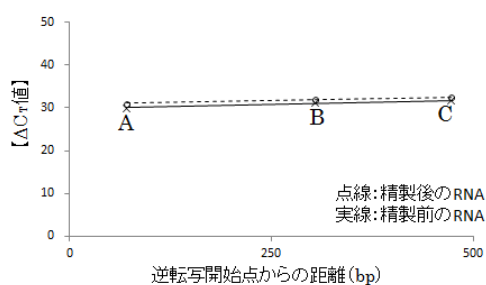


図1 HIV-1 RNAの抽出・精製に伴う損傷度の評価

次に、RNAを損傷することが明らかな紫外線照射による損傷度を本法で実際に評価できることを確かめた。まずHIV-1 RNAに紫外線を0、1、2、4、8分間照射し、RT-リアルタイムPCRで定量した結果、照射時間が長くなるにしたがってCT値の傾きが増加した(図2)。すなわちHIV-1 RNAの損傷を定量的に評価できることがわかった。

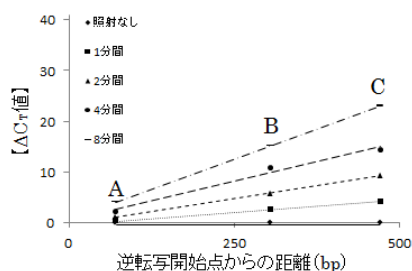
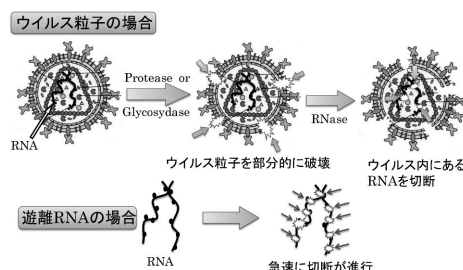


図2 紫外線照射による損傷度の評価

唾液検体は70で20分間の熱処理を行ったものと、熱処理を行っていないものに分け、それぞれの唾液にHIV-1 RNAと、感染性がないことが確認されているHIV-1株8E5(以下8E5)を添加し、37で0、2.5、5、10分間静置した後に精製を行った。その結果、熱処理をしない場合の8E5は、 C_T 値の傾きは処理時間とともに次第に増大した。熱処理をした場合では、8E5は C_T 値の傾きは時間経過によらず0に近かった。HIV-1 RNAは熱処理を行ったものと、行っていないもののどちらも5分以降で全く検出され

なくなった。すなわち唾液の中には、遊離ウイルスRNAを急速に切断する熱に安定な活性と、ウイルス粒子の中のRNAの切断に關与する熱不安定な活性が含まれることが示唆された。



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 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 13 件)

Eiko Yamada, Ritsuo Takagi, Shingo Kato: Relationship between concentrations of antiretroviral drugs in plasma and saliva. 12TH European HIV&Hepatitis Workshop, Barcelona (Spain), 2014.3.26-28

山田瑛子, 木内 英, 吉本順子, 高木律男, 加藤真吾: AZT/ 3TC が投与されていた HIV 感染母体からの児が無顆粒球症を発症した 1 例. 第 14 回日本 HIV 歯科医療研究会, 東京都千代田区, 2014 年 1 月 11-12 日

山田瑛子, 高木律男, 田邊嘉也, 永井孝宏, 村山正晃, 池野 良, 児玉泰光, 親泊あいみ, 須藤弘二, 戸蒔祐子, 藤原 宏, 長谷川直樹, 岩田 敏, 加藤真吾: 抗 HIV 薬の唾液中薬剤濃度の検討. 第 14 回日本 HIV 歯科医療研究会, 東京都千代田区, 2014 年 1 月 11-12 日

山田瑛子, 木内 英, 吉本順子, 高木律男, 加藤真吾: AZT/ 3TC が投与されていた HIV 感染母体からの児が無顆粒球症を発症した 1 例. 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会, 熊本市, 2013 年 11 月 20-22 日

山田瑛子, 高木律男, 田邊嘉也, 永井孝宏, 村山正晃, 池野 良, 児玉泰光, 親泊あいみ, 須藤弘二, 戸蒔祐子, 藤原 宏, 長谷川直樹, 岩田 敏, 加藤真吾: 抗 HIV 薬の唾液中薬剤濃度の検討. 第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会, 熊本市, 2013 年 11 月 20-22 日

永井孝宏, 児玉泰光, 山田瑛子, 村山正晃, 池野 良, 田邊嘉也, 高木律男: 新潟大学医歯学総合病院歯科における HIV

感染症患者の臨床的検討．第27回日本エイズ学会学術集会・総会，熊本市，2013年11月20-22日

村山正晃，山田瑛子，池野 良，児玉泰光，田邊嘉也，高木律男：HIV- 1 陽性者の唾液中に存在するウイルスRNA の完全性について．第25回日本口腔診断学会総会・第22回日本口腔内科学会総会合同学術大会，東京，2012年9月21日

村山正晃，山田瑛子，池野 良，児玉泰光，田邊嘉也，高木律男：HIV- 1 陽性者の唾液中に存在するウイルスRNA の完全性に関する研究．第66回日本口腔科学会学術集会，広島市，2012年5月18日

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：HIV- 1 陽性者の唾液中に存在するウイルスRNA の完全性に関する研究．第25回日本エイズ学会学術集会・総会，東京，2011年11月30日-12月2日

村山正晃，池野 良，永田昌毅，高木律男：HIV- 1 陽性者の唾液中に存在するウイルスRNA の完全性に関する研究．平成23年度新潟歯学会第2回例会，新潟市，2011年11月12日

村山正晃，池野 良，児玉泰光，高木律男：歯科観血処置が必要であったHIV/HCV重複感染を伴う血友病患者の2例．第37回日本口腔外科学会北日本地方会，新潟市，2011年5月21-22日

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，東京，2010年11月24-26日

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回日本口腔外科学会総会・学術大会，千葉市，2010年10月16-18日

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

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