

## 学位研究紹介

## HIV-1 感染者における唾液中ウイルスの 定量的研究 Quantitative study on HIV-1 in oral fluids of infected individuals

新潟大学医歯学総合研究科 口腔生命科学専攻  
顎顔面口腔外科学分野

池野 良

Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Niigata University  
Graduate School of Medical and Dental Sciences

Ryo Ikeno

### 【緒 言】

HIV は血液だけでなく母乳、精液、腺分泌液、唾液、汗などの体液にも存在することが知られている。これらの体液のうち、血液、母乳、精液、腺分泌液を介して HIV 感染が起こることは実証されているが、唾液を介する感染は、多量の出血を含む場合を除いて、起こらないと考えられている。

唾液による感染が起こりにくい原因として、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、原因はまだ不明である。ウイルス量に関しては、唾液中のウイルス濃度が血中よりも高い症例（高分泌型）が存在するが、その原因はわかっていない。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。

そこで我々はまず、唾液中の遊離型と細胞内のウイルス量を正しく測定する独自の方法を開発した。次に、この方法を用いて HIV 感染者の唾液中ウイルス量を決定し、血中濃度との相関を評価するとともに、それが口腔内の炎症や衛生状態とどのように関連しているかを検討した。

本研究で得られた結果は、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。

### 【対象と方法】

#### 被験者と検体

被験者は、新潟大学医歯学総合病院感染管理部にて加療されている HIV 感染者で、十分な説明により書面で同意が得られた 18 名 (2008 年 4 月から 2009 年 7 月まで)

である。

唾液検体としては、安静時の全唾液を被検者が自己採取したものを用いた。実験には唾液 5 ml 以上を必要とし、採取には平均 13 分（最短 4 分・最長 40 分・中央値 10 分）要した。

#### 方法

##### 唾液中ウイルスの定量法

##### A. in-house nested PCR とポアソン確率分布法

唾液検体は採取後 2 時間以内に  $-40^{\circ}\text{C}$  にて保存した。定量前に解凍し、唾液検体にエタノール沈殿を施行し、その後 RNA/DNA 抽出キット QIAamp<sup>®</sup> UltraSens<sup>TM</sup> Virus Kit を用いて核酸の抽出を行った。この抽出液を適当に希釈して RT-nested PCR を行った。RT-nested PCR により得られた結果をポアソン確率分布式に代入し定量（以下、ポアソン法）を行った。ポアソン確率分布式による定量には 1 検体 15 本の RT-nested PCR の結果を使った。核酸抽出液の希釈比は、RT-nested PCR の陽性反応が 15 本中 5 本以上 10 本以下になるように設定した。抽出液を希釈しないでそのまま用いても陽性反応が 15 本中 5 本未満の場合は、その結果をポアソン分布式に代入して濃度を計算した。

また、唾液中感染細胞 (HIV-1 DNA) 量の計算は、上記の方法から逆転写酵素を省いて同様に行った。

既知の量の HIV-1 RNA を用いて行った予備実験の結果、RNA/DNA 抽出キットの核酸回収率が 40% であったことから、ポアソン分布式により計算された数値の 2.5 倍をポアソン法による唾液中ウイルス定量値とした。500  $\mu\text{l}$  の唾液でウイルス量を測定した場合、ポアソン法による定量の検出下限は 5 copies/ml であった。

##### B. リアルタイム PCR 法

Roche Molecular Systems Inc. (米国・プレザントン) で開発されたリアルタイム PCR 法による HIV-1RNA 定量試薬 COBAS<sup>®</sup> TaqMan<sup>®</sup> HIV-1「オート」(以下コバス法) にて唾液中 HIV-1RNA/DNA の定量を行った。採取された検体は、 $-40^{\circ}\text{C}$  にて一旦保存した。定量前に検体を解凍し、転倒混和して濃度を均一にした。次に、唾液検体を 400g で遠心し、浮遊物を沈殿させ、沈殿物を吸引しないように採取した上清を用いて定量を行った。

コバス法の測定範囲は 40 copies/ml  $\sim$   $1.0 \times 10^7$  copies/ml である。結果が測定下限未満となった場合、定量値は得られないが HIV-1 RNA を検出している場合は “< 40copies/ml”，また、HIV-1 RNA が検出されない場合は、“検出されず” と報告される。測定には 3.0ml の検体を必要とする。

血中ウイルス量の定量法については血清を用い、コバス法にて定量を行った。

#### 口腔内の炎症や衛生状態の評価

口腔内の炎症・衛生状態の評価としてはCPIを用いた。

唾液への出血量の指標としてはヘモグロビンを用いた。唾液中ヘモグロビン量は、私が開発した方法により決定した。唾液をヘモグロビン濃度判定用試験紙（サリバスター®；昭和薬品化工株式会社）に滴下し、30秒後に30%過酸化水素水／エタノール（10：90）に10秒間浸漬して固定し、デジタルカメラで撮影後、発色の程度をImage J®で数値化した。検量線は0.36～5.98 mg/dlの領域における7点のヘモグロビン濃度をもつ標準唾液によって作成した。この検量線の範囲を越える場合は、試料を標準唾液で適当な比で希釈してから測定した。唾液へのヘモグロビン滲出を評価するにあたり、唾液中ヘモグロビン量／血中ヘモグロビン量（Oral Hemoglobin Index, 以下 OHbI）を設定した。

粘膜状態の評価は唾液採取時に、口腔内診査・口腔内写真を撮影し粘膜状態の評価を行った。

#### 倫理審査

本研究は、2007年11月、新潟大学歯学部倫理委員会に倫理審査申請を行った。2008年12月に承認（承認番号19-R13-07-12）を受け、2008年4月より研究を開始した。統計解析

ポアソン法およびコバス法による唾液中 HIV-1 RNA/DNA 定量値の比較、および、唾液検体と血清検体との関連は単回帰分析で評価した。唾液中ウイルス量と血中ウイルス量・口腔内環境との関連は重回帰分析を用いて評価した。定量下限以下のデータは定量下限値の1/2を代入した。解析ソフトは Statcel - The Usefull Addin Forms on Excel を用いた。

## 【結 果】

被験者18名のうち唾液中ウイルスが検出されたのは、コバス法では7名、ポアソン法では14名であった。両方法の定量値は強い相関があり（ $r^2 = 0.95$ ）、ポアソン法の方が平均して約4.4倍高い定量値を与えた（図1-A, 表1）。ポアソン法とコバス法の二つの方法による唾液ウイルス値は血中ウイルス量との間に相関が認められた（図1-B, 図1-C）。ポアソン法による唾液中ウイルス量は血中ウイルス量の20%、コバス法では12%であった。

次に、唾液中のHIV感染細胞の割合を調べるため、唾液中ウイルス量が100 copies/ml以上であった5名（14検体）を対象に、唾液中のプロウイルスDNA量を測定した（図2）。これら5名のうち4名はプロウイルス量が全ウイルス量の1%以下であったが、1名（被験者NO. 2）はプロウイルス量が唾液ウイルス量（1900

Table: 1. ポアソン法とコバス法による唾液中ウイルス検出数の比較

	In-house Poisson quantitation assay		total
	Detected	Undetected	
COBAS TaqMan Detected	14	1	15
assay Undetected	18	11	29
total	32	12	44

copies/ml) の75%もあった。

最後に、唾液中ウイルス量に影響を与える因子として口腔内炎症や血中ウイルス量を疑い、重回帰分析にて解析した（表2）。口腔内炎症の指標として、全血中ヘモグロビン量に対する唾液中ヘモグロビン量の比を採用した。解析の結果、唾液中ウイルス量の予測には血中ウイルス量のみが有意で（ $p < 0.01$ ）、唾液中出血量とは有意な相関がなかった（ $p = 0.72$ ）。

## 【考 察】

唾液中ウイルス量を定量は、ポアソン法の方がコバス法より定量値が高値であった。コバス法では定量前の検体処理で浮遊物の沈下を目的に遠心分離を行っているのに対し、ポアソン法では、唾液検体を攪拌し均一濃度にして後に定量を行う。この前処理の相違が定量値に影響を与えたものと考えられた。

唾液中ウイルス量は血中ウイルス量との間には相関が確認された。ポアソン法により定量された唾液中ウイルス量では血中ウイルス量の20%であり、以前の報告であった10%より高値を示した。その理由としては、以前の報告では遊離ウイルスを定量しているのに対し本研究では遊離ウイルスと感染細胞を同時に定量していること、以前の報告と定量方法が異なることが考えられた。

唾液中ウイルス量に影響を与える因子としては血中ウイルス量が有意で、唾液中出血量とは有意な相関がなかった。この結果は、唾液中のウイルスは、炎症や出血などによる血管からの滲出との関連は低く、口腔内に独自に分泌されていることが示唆される。

唾液中ウイルス量が100 copies/ml以上を示した5名の被験者の感染細胞数を測定した。4名の唾液中ウイルス量中の感染細胞数の割合は1%以下であり、遊離ウイルスが優位であった。ウイルス高分泌型感染者もこの中に含まれた。遊離ウイルスは唾液の抗ウイルス作用により感染力が低くなることは、過去の報告で解析されており、高分泌型感染者においても唾液は低感染性であることが考えられる。しかし、1名の被験者は唾液中ウイルスの75%をプロウイルスが占められており、プロウイルス量は感染細胞数を反映することから、この症例は感染細胞が優位に唾液中に存在している特異な症例と思われる。さらに、この被験者の唾液中ウイルス量は血中ウ

イルス量より高値を示していた。母乳の有する高感染の理由は感染細胞が高濃度であることと高濃度ウイルス量であることから、同被験者の唾液も感染性を有する可能性が示唆される。感染性についてはさらなる今後研究を

進める必要があるが、いずれにしろ医療従事者は、スタンダードプリコーションを徹底することが二次感染予防に重要であるのは言うまでもない。

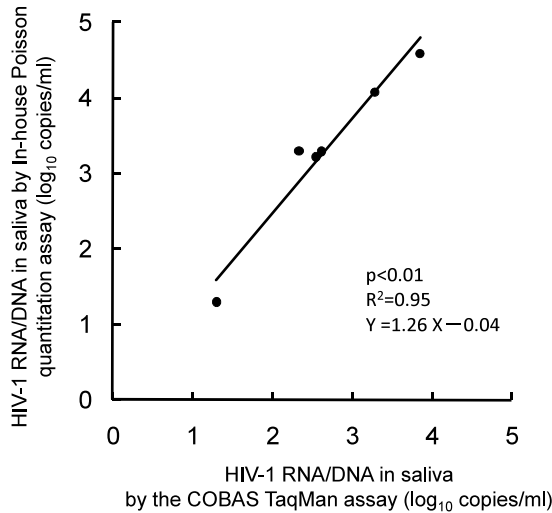


Fig : 1-A. ポアソン法とコバス法による唾液中ウイルス定量値の比較

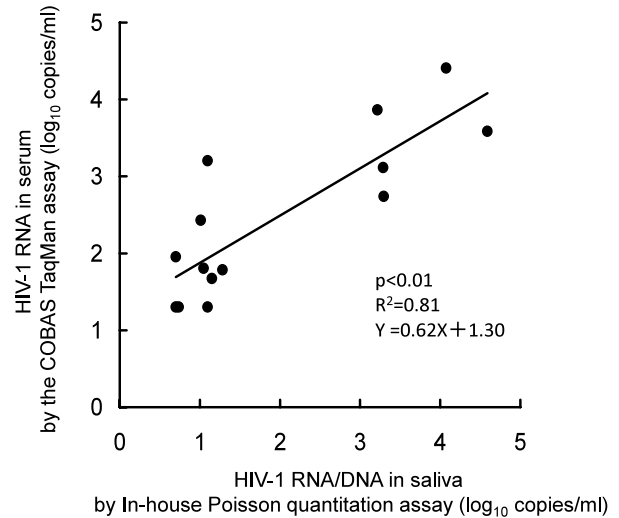


Fig : 1-B. 血中ウイルス量とポアソン法により定量した唾液ウイルス量との関連

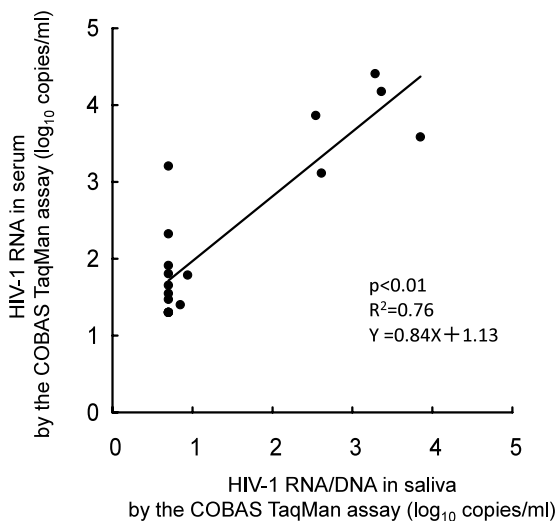


Fig : 1-C. 血中ウイルス量とコバス法により定量した唾液中ウイルス量との関連

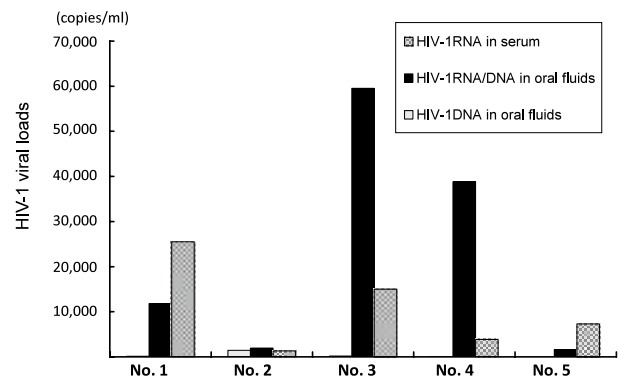


Fig : 2. 唾液中ウイルス量、唾液中感染細胞数と血中ウイルス量の比較

Table : 2. 唾液中ウイルス量と全身状態および口腔内との関連

	Regression coefficient	Partial correlation coefficient	F	P
Constant term	- 1.18		2.17	0.16
Viral load of HIV-1 in serum	1.23	0.83	29.01	< 0.01
OHbl	12.47	0.03	0.01	0.91
Salivary secretion rate	- 0.38	- 0.20	0.57	0.47
CD4	0.00	0.17	0.41	0.53