

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°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[®] UltraSensTM 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 μl 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[®] TaqMan[®] 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°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 ~ 1.0×10^7 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 assay Undetected	14	1	15
	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100copies/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

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。

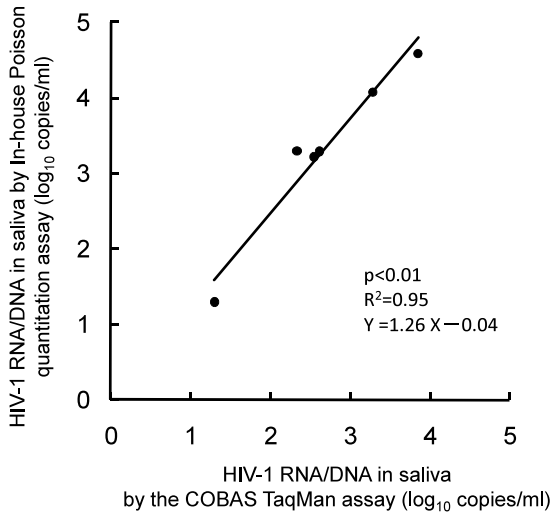


Fig : 1-A. ポアソン法とコバスマによる唾液中ウイルス定量値の比較

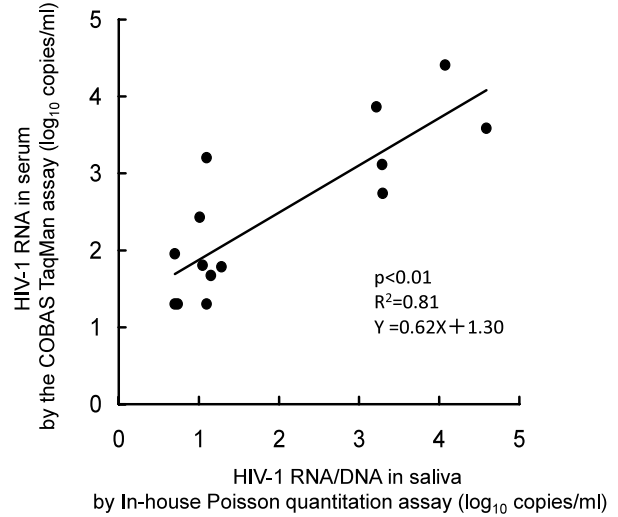


Fig : 1-B. 血中ウイルス量とポアソン法により定量した唾液中ウイルス量との関連

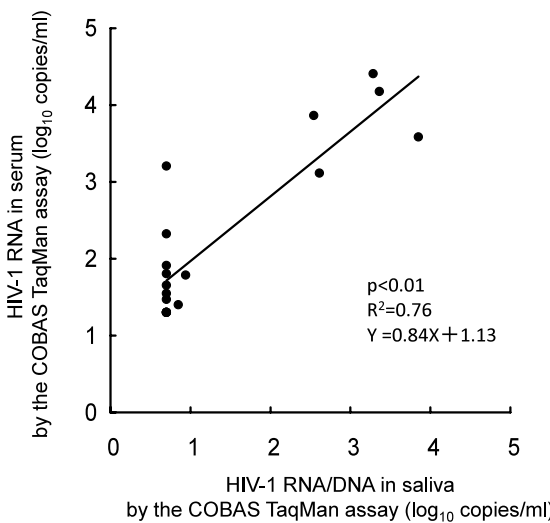


Fig : 1-C. 血中ウイルス量とコバスマにより定量した唾液中ウイルス量との関連

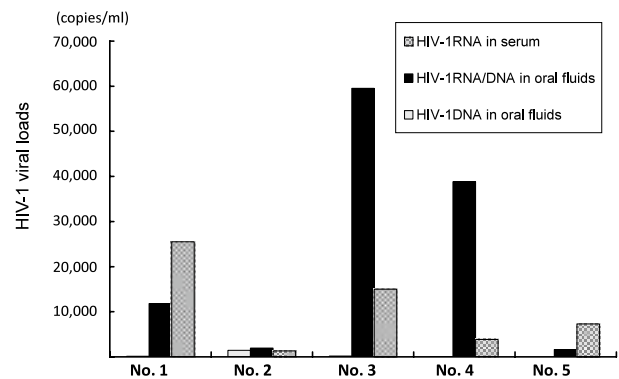


Fig : 2. 唾液中ウイルス量、唾液中感染細胞数と血中ウイルス量の比較

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

学位研究紹介

義歯着脱補助具の有用性の評価 Evaluation of a denture placement and removal aid device for the dependent elderly

新潟大学医歯学総合研究科 口腔生命科学専攻
口腔健康科学講座 生体歯科補綴学分野

川崎真依子

Division of Bio-Prosthetics
Department of Oral Health Science
Course for Oral Life Science

Niigata University Graduate School of Medical and Dental
Sciences

Maiko Kawasaki

【目 的】

超高齢社会の日本において、65歳以上で、必要でありながら部分床義歯を使用していない者はその50%に及ぶ(平成21年度総務省統計局及び歯科疾患実態調査より)^{1) 2)}。医療保険診療で提供される義歯の殆どは、クラスプを用いて口腔内に保持されているために、手指感覚、口腔内感覚の低下が顕在化する後期高齢者や、片麻痺、リウマチで関節が拘縮した要介護者では、着脱が困難なことが多いのが、その一因であると思われる。また、介護する側の者においても複雑な設計の義歯を寝たきり等の要介護者の口腔内に装着することは容易ではない。そこで、本研究では、要介護高齢者が安全かつ容易に義歯を着脱できる装置を考案し、その有用性を明らかにすることを目的として、片麻痺を想定した健常高齢者の非利き手での義歯着脱操作について、主観的評価であるアンケートと、客観的評価である画像解析の両面から分析評価を行った。

【対象と方法】

被験者は健常な高齢者で、装着中の義歯に支障がない21名とし、本研究の趣旨を説明し、研究参加への同意書に署名を頂いた。内訳は男性が8名、女性が13名で、平均年齢は74.6歳である。(表1)被験者の除外基準としては、手指に麻痺、痙縮などがある場合や、認知症など意思疎通が困難である場合とした。義歯の着脱の様子

表1 The summary of the subjects

The number of people	21	
The number of devices	26	
Sex	Mele : 8	Female : 13
Age	75 ± 5.8	
The type of clasp	Wire	0.5 ± 0.762
	Metal	2.385 ± 0.983
Kennedy's classification	I	10
	II	15
	III	1

を客観的に評価するため、義歯の着脱時の動作をデジタルビデオカメラにて撮影し、その画像を解析した。

撮影による評価対象は非利き手での義歯着脱操作と補助具を使用した義歯着脱操作の二項目である。画像解析は、画像解析ソフトデジモ社製 Swallow シリーズ・Image Hyper II を用いた。具体的な評価項目は、①義歯着脱に要した時間②手指の運動範囲の面積③手指の運動軌跡の長さ④使いやすさなどを聞いたアンケートの4項目とした。撮影は、初めて非利き手と補助具を使用した義歯着脱操作を行った時と、2週間自宅での着脱練習をした後の2回行った。ビデオカメラとマーカーの配置は予備実験の結果に基づいて決め、椅子に腰掛けた被験者の動作を正面から撮影した。左手中指の第一関節にLEDライトを使用したマーカーを装着して、この軌跡をトレースすることとし、これを容易にするために背景と被験者の胸部には黒い布をかけて撮影した。結果の分析にはt-testとマクネマー検定を用いた。アンケートは、着脱操作の容易さを、両手を使用した場合を10点満点として、点数で評価した。

【結果と考察】

アンケートによる非利き手と補助具使用での着脱のしやすさの主観的評価では、装着、撤去ともに練習後での評価が高い、すなわち補助具の使用が有効であるという回答が有意に多く、撤去操作においては、補助具の使用は初回から有意に高い評価を得た。(表2)このことは、義歯の着脱操作において、撤去の方が難しいと被験者が感じている可能性を示唆しており、慣れるに従い補助具が使いやすく感じられることがうかがえる。また、被験者全体の非利き手のみと補助具を使用し義歯着脱操作を行った場合の評価の得点分布に着目したところ、それぞれ7点から8点の間でピークが分かれた。このことから、非利き手のみの方が、補助具を使用した時より、高い評価であった群と、補助具を使用したほうが高い評価で

表2 Subjective evaluations

		Only left hand(/10point)	With device(/10point)	P-value
To place the denture	First time	7.12 ± 8.42	7.50 ± 1.14	NS
	Second time	7.65 ± 1.13	8.27 ± 0.83	<0.01*
To remove the denture	First time	6.27 ± 1.19	7.73 ± 1.56	<0.001*
	Second time	6.81 ± 1.10	8.23 ± 0.95	<0.001*

T-test

表3 Objective evaluations

		Only left hand	With device	P-value	
To place the denture	First time	Time(sec)	12.28 ± 6.13	13.37 ± 4.51	NS
		Area(cm ²)	4.94 ± 1.72	3.74 ± 2.02	<0.05*
		Length(cm)	19.18 ± 3.10	17.49 ± 2.50	<0.05*
	Second time	Time(sec)	10.90 ± 6.86	8.85 ± 3.89	NS
		Area(cm ²)	4.33 ± 1.90	3.13 ± 1.40	<0.01*
		Length(cm)	18.12 ± 3.24	16.26 ± 2.00	<0.001*
To remove the denture	First time	Time(sec)	10.69 ± 5.60	15.26 ± 7.92	NS
		Area(cm ²)	4.24 ± 1.94	2.97 ± 1.37	<0.01*
		Length(cm)	17.61 ± 2.52	16.58 ± 2.85	<0.05*
	Second time	Time(sec)	10.85 ± 6.64	10.04 ± 5.21	NS
		Area(cm ²)	3.59 ± 2.11	2.68 ± 1.18	<0.05*
		Length(cm)	18.18 ± 4.23	16.48 ± 1.68	<0.05*

あった群とを比較して、撤去時において、補助具を使用したほうが、高い評価の群の人数が有意に多いことが示された。

客観的評価結果では、義歯の装着に要した時間においては初回にも練習後にも有意差は認められなかったが、操作時の手指の動きの軌跡の面積と外周の長さに関しては、初回も練習後も補助具を使用したほうが有意に少ない手指の動きで装着していることが明らかになった。義歯の撤去時では、装着時と同様に、手指の動作の面積と外周の長さにおいて、補助具を使用した方が有意に少ない運動量で撤去していた。(表3) このことから、補助具を使用した方が少ない動きで義歯の装着ができることが示された。

【結 論】

これらの結果より、試作した補助具を使用することに

よって手指の運動量が少なく、義歯を着脱しやすいと評価されたことから、その有用性が示されたと考えられる。また、補助具の使用によって義歯の着脱時の怪我や煩わしさを減少させることができ、義歯の使用率を向上させることができる可能性が示唆された。

【参考文献】

- 1) Maki Y, Enoki T, Sugihara N, et al: A study on food acceptance in relation to oral status of the elderly with dementia. Rounensigaku: 5: 39-43, 1991. (in Japanese)
- 2) Yoshida M, Wadamoto S, Takahashi A, et al. The Survey on the Use of Removable Denture for the Elderly with Medical Conditions. J Hiroshima Univ Dent Soc: 28: 342-346, 1996. (in Japanese)