

令和元年6月7日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08711

研究課題名(和文)ヘリコバクターピロリ菌感染と口腔内病巣の関連に関する検討

研究課題名(英文) Association between H. pylori infection and dental disease

研究代表者

水野 由子 (mizuno, yoshiko)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任研究員

研究者番号：80436477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：【研究成果の概要】

Helicobacter pylori(ピロリ菌)はグラム陰性菌で、胃上皮細胞表層に持続感染し、慢性胃炎、胃十二指腸潰瘍、胃癌、胃MALTリンパ腫、特発性血小板減少性紫斑病の原因となる。感染伝播の経路に関しては未だ不明な点も多く、齲歯、歯周炎がピロリ菌の病原巣として除菌治療後の再感染の要因となる可能性が指摘されるが、日本人での検討は十分でない。本研究では検診受診者の臨床情報を用い、ピロリ菌の亜型cytotoxin-associated-Aに焦点を置き、ピロリ菌感染と齲歯/歯周病の関連につき解析した他、ピロリ菌感染と酸化ストレスの関連について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ピロリ菌の罹患率は、先進国では20-30%であり、除菌治療に成功しない限り感染者は生涯キャリアとなる。本邦では除菌治療の健康保険適用が「慢性胃炎」にまで改訂され、治療法は確立されているが、除菌の成功率は約90%である。また、一旦除菌に成功しても胃・十二指腸病変が再発する症例もあり、除菌治療後の成人におけるピロリ菌の再感染も否めない。本研究では齲歯、歯周炎がピロリ菌の病原巣となりうるかにつき、ピロリ菌感染と齲歯/歯周病の関連について解析した。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter pylori (H. pylori) is a gram negative, microaerophilic, spiral-shaped bacterium found in the gastric mucosa. Infection with this organism causes peptic and duodenal ulcers, gastric carcinoma and non-Hodgkin's lymphomas of gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT). Although approximately 50% of people in the world are infected with H. pylori, the route by which H. pylori infection is transmitted is not yet clear. One of the unanswered questions is whether oral cavities could be a reservoir of these bacteria. The aim of this study is to determine the relationship between H. pylori and dental caries/periodontitis focusing on cytotoxin-associated A (CagA)-positive H. pylori strains.

研究分野：予防医学、内科学

キーワード：ヘリコバクターピロリ菌 齲歯 歯周炎 胃十二指腸病変

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクターピロリ菌(以下、ピロリ菌)は、1983年にオーストラリアの医師、J. Robin Warren と Barry J. Marshall により発見されたグラム陰性の微好気性菌で、当初は *campylobacter* 属に分類されていたところを改め *Helicobacter pylori* と命名された経緯を持つ。ピロリ菌は人体に感染後、胃粘液下の上皮細胞表層に長く存在し、胃粘膜を萎縮させることで慢性胃炎(萎縮性胃炎)を招き、さらには胃・十二指腸潰瘍、胃癌といった病態形成に関与する。その他、稀な症例ではあるが、胃 MALT (Mucosa Associated Lymphoid Tissue) リンパ腫や特発性血小板減少性紫斑病 (ITP: Idiopathic thrombocytopenic purpura) の原因としても知られている。消化器病領域に関しては、2013年より、抗生剤によるピロリ菌除菌治療の健康保険適用範囲が「慢性胃炎」にまで改訂され、治療対象者の拡大は予防医学に大きく貢献し、またピロリ菌が組織障害を起こす機序についても、多くの先進的な研究が国内外で行われてきたが、意外なことにピロリ菌の感染経路、殊に再感染のメカニズムに関しては不明な点も多い。

世界的な統計によれば、ピロリ菌の罹患率は、先進国の成人 20-30%、発展途上国の 90% であり、ひとたび感染すると除菌治療に成功しない限り感染者は生涯キャリアとなる。また、ピロリ菌の検出部位が、食物、便、唾液、歯垢、胃・十二指腸などであることより、感染経路は口腔-口腔感染、糞口感染、上部消化管-口腔感染が想定され、その中でも上部消化管-口腔感染が、同一個人におけるピロリ菌の除菌後再感染に関与する可能性が示唆される。

既述のように、本邦においても治療法は確立されているが、ピロリ菌の除菌の成功率は約 90% であるほか、一旦除菌に成功しても胃・十二指腸病変が再発するケースもあり、除菌治療後の成人におけるピロリ菌の再感染も否認ない。そこで除菌の難しさや再感染の原因として、胃・十二指腸以外にピロリが潜伏する「感染巣」があるのではないかと考え、歯科領域の研究を調査したところ、口腔内のピロリ菌の存在を示唆する報告をいくつか発見し、本研究テーマ着想の手掛かりを得た。

2. 研究の目的

歯周病患者の口腔内ではピロリ菌の検出率が高く(Umeda M et al. J Periodontol 74: 129-134, 2003, Gebara EC et al. 2004)、歯垢(Eskandari A et al. 2010)、歯肉縁下プラーク(Riggio M et al. 1999)、唾液(Souto R et al. 2008)等でその存在が確認されている。一般に口腔内ピロリ菌感染は衛生状態に影響され、また抗生剤の除菌治療が奏効しない。理由として、口腔内の特殊な環境があり、以下に述べる。

歯周病や齲歯の発生母体すなわち好発部位は歯垢である。歯垢はバイオフィーム (biofilm) からなり、歯牙表面に付着したグリコカリックス複合体 (glycocalyx complex) に覆われる。またバイオフィーム内の細菌は細胞外多糖(extracellular polysaccharide: EPS)を分泌し外部環境へのバリアを形成する。よって、ピロリ菌除菌のため抗生剤を全身投与しても、バイオフィームが破壊されない限り薬剤は内部に到達せず(Herrera D et al. J Clin Periodontol 35: 45-66, 2008)、歯垢は抗生剤の全身治療から逃れたピロリ菌の温床となる(Gurbuz A et al. South Med J 96: 244-24, 2003)。同様に、歯周ポケットも微好気性菌であるピロリ菌の生息に適した環境であり、抗生剤による除菌治療が効きにくい(Gebara EC et al. J Clin Periodontol 33: 329-333, 2006)。実際に、ピロリ菌の除菌治療の成功率を部位ごとに調べた検討では、口腔内の除菌が格段に難しいことが示されており、歯垢や歯周ポケットを有する口腔内という特殊な環境によるところが大きいと考える。

しかしながら、口腔内のピロリ菌感染と胃・十二指腸のピロリ菌感染が、互いに影響し関連するかについては、現時点では明確な答えはない。先行研究を取りまとめたメタ解析が、2011年に北京大学(中国)(Zou QH. et al. (2011) J Oral Pathol Med 40(4): 317-324) と Kerman 大学(イラン)(Navab N et al. (2011). Dent Res J 8(4): 178-182)の二つの研究機関から報告され、前者では関連あり、後者ではなしと、見解に乖離を認めた。両メタ解析とも、2005年、日本の Umeda らの報告が含まれる。同研究では口腔内のピロリ菌感染と胃・十二指腸のピロリ菌感染が影響しあうとの結果であったが、45症例とサンプル数が小さく、またピロリ菌感染の計測法が組織診断、尿素呼吸試験法(Urea Breath test, UBT)、組織培養、迅速ウレアーゼ試験 (rapid urease test, RUT) と多様であり統一されていない特徴をもつ。遡ること 2000 年に、Miyabayashi らも口腔内のピロリ菌感染が抗生剤治療の妨げになることを示したが(*Helicobacter* 5:30-37)、Miyabayashi、Umeda らに続く研究論文は少なく、既述の通り日本人の検討は十分でない。本研究ではその点を明らかにしたい。

3. 研究の方法

(1) 検診データの収集

研究対象は、東京大学医学部附属病院予防医学センターの基本健診に加え、歯科オプション検診を受診した男女の連続症例とした。受診時の基本検診項目に加えて、採血及び生活習慣や病歴(既往歴、家族歴)に関する自記式質問票調査を収集し、消化管内視鏡検査では胃・十二指腸病変の有無を、血清検査ではヘリコバクターピロリ菌 IgG 抗体値の測定とペプシノゲン I/II 比(胃癌リスク判定)の評価を行った。

(2) ピロリ菌の亜型 cytotoxin-associated-A (CagA)に着眼した解析

Helicobacter pylori は1983年に発見され、1997年にはゲノム解析が完了し、本菌がゲノムレベルで多型性に富むことが明らかとなった。多くの型のうち、ピロリ菌が持つ特殊な蛋白質分泌装置 (IV型分泌装置) を介して菌体から宿主細胞内に直接注入される「エフェクター分子 cytotoxin-associated-A (CagA)」と、細胞に空胞編成を引き起こす「空胞化毒素 Vacuolating cytotoxin A (VacA)」を産生する2菌株は、病原性が高く研究が進んでいる。なかでも CagA 陽性株の感染が胃癌の発症には重要であり、胃上皮細胞に接触したピロリ菌が IV 型分泌装置を用いて CagA を胃上皮細胞内へ注入し、細胞内部のシグナル伝達の攪乱を惹起し、癌化に加担するとされる (Poppe M. et al. *Oncogene* 26: 3462-3472, 2007, Hatakeyama M. *Cell Host Microbe* 15: 306-316, 2014)。

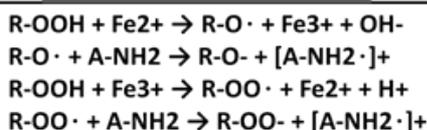
既述の如く、細菌性癌蛋白質として胃癌形成に関与する CagA であるが、興味深いことに、動脈硬化など癌以外の病態へも関与する。基礎研究によれば、ピロリ菌は血管内皮機能を障害し、酸化脂質を増加させ動脈硬化を促進するものの、他方、ヒトを対象とした臨床疫学研究においては、ピロリ菌の単独感染が動脈硬化や心血管イベントの発症に関わるというエビデンスは得られていない。実験研究とヒト研究で相違のある結果だが、ピロリ菌の菌株亜型に特化した場合、CagA 型ピロリ菌がヒト頸動脈内中膜厚比すなわち早期動脈硬化を促進することが判明している (Mayr M. et al. *Stroke* 34: 610-615, 2003, Corrado E et al. *Stroke* 37(2): 482-486, 2006)。これらの知見より、本申請課題「ヘリコバクターピロリ菌感染と口腔内病巣の関連に関する検討」においても、ピロリ菌株を念頭に置いた生化学的解析を行った。具体的には、Human *Helicobacter Pylori* Cytotoxin-associated Genen A Protein IgG A ELISA (MyBioSource, Inc.) を使用した。

(3) 酸化ストレスがピロリ菌感染と関連病態に及ぼす影響について

発展的な研究構想として、酸化ストレス状態を評価項目に追加した。脂質、蛋白質、糖、核酸などを酸化変性させる活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) の過剰な生成は、体内の酸化ストレスを増加させ、動脈硬化、心筋梗塞、糖尿病、癌などの生活習慣病を惹起する。同様の研究は歯科領域でも行われており、歯周病患者で口腔内(唾液)の酸化ストレス濃度は高く、歯周病原菌とも相関することが報告される。また、過剰に生成された活性酸素が血液内に入り、口腔以外の器官臓器に損傷を与えることも懸念され、歯周病患者の血中酸化ストレス濃度の測定も臨床的な意味を持つ。そこで、発展的な試みとして、上部消化管内視鏡検査結果及びピロリ菌感染の有無に加え、個々の被験者の血中酸化ストレス濃度を測定し、その影響について検証した。

酸化ストレス濃度の測定は、血中の過酸化脂質や酸化 LDL、または酸化ストレス由来の DNA 損傷を反映する血中・尿中 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH dG) などが、従来汎用されてきた。しかし本研究では、より簡便で短時間の変化を反映しうる、画期的な diacron reactive oxygen metabolites (d-ROMs) テスト法 (Free Radical Analytical System 4 (FRAS4); H&D srl, Parma, Italy) を用い、血中、唾液中の酸化ストレス濃度を測定した。測定の原理は右図の通りで、d-ROMs テストは血清中の ROMs、主としてヒドロペルオキシドが鉄の存在下でフェントン反応によりアルコキシラジカルおよびペルオキシラジカルを生成し、試薬中のアルキル置換芳香族アミンを連続的に参加し、薄紅色の誘導体を生成し、その発色強度が ROMs 濃度に比例する。

d-ROMsテストにおける反応



R-OOH = ヒドロペルオキシド全般
R-O = アルコキシラジカル
R-OO = ペルオキシラジカル
A-NH₂ = N,N-ジエチルパラフェニレンジアミン
(d-ROMsテストのクロモゲン基質)
[A-NH₂]⁺ = クロモゲン基質の発色したラジカル陽イオン

4. 研究成果

(1) 予備検討

2008年1月から2011年1月まで東京大学医学部附属病院検診部で基本健診に加え歯科検診を受診した連続症例68名(34-82歳、平均値59歳、中央値63歳)を対象に予備検討を行った。上部内視鏡検査結果と抗ピロリ抗体濃度ならびに胃粘膜の萎縮の程度を照会し、齶歯及び歯周病への影響につき検証したところ、慢性胃炎・胃十二指腸潰瘍の罹患群で、ペプシノゲン I/II 比の低下と、抗ピロリ抗体濃度の上昇を認めしたが、齶歯/歯周病を有する群では慢性胃炎・十二指腸潰瘍の罹患頻度が低く、抗ピロリ抗体濃度は低かった。また統計学的有意差は得られなかったものの、齶歯/歯周病の口腔内病変を有する群でペプシノゲン I/II 比は高値であった。

(2) 本申請における研究成果

上述、予備検討において齶歯・歯周病とピロリ菌感染の関連は見いだせなかったが、その問題点として、解析対象数が68例と少ないこと、口腔内ピロリ菌感染の有無を直接検証していないことが挙げられた。口腔内ピロリ菌の存在が、胃・十二指腸のピロリ菌感染に影響を及ぼすかについては不明な点も多いが、衛生状態が悪い口腔内ではピロリ菌感染率が高く、プラークコントロールなどの口腔内ケアが推奨される(Bouziane et al. *J Clin Periodontol* 39(12): 1166-1173)。海外の疫学研究が先行している現状を鑑み、臨床情報が同時かつ均質的に取得できる検診の特徴を活かし日本

国内における独自の研究展開を実施した。まずは予備検討の問題点を踏まえ解析対象数の増幅に努め、またHelicobacter pylori菌系の解析と関連する項目(生物指標など)の検証を行い、同時に、遺伝子を標的にした増幅法や培養・鏡検法の条件最適化を試みた。またピロリ菌の菌株亜型(cytotoxin-associated-A (CagA))や感染による酸化ストレスも検証した。生活習慣や病歴(既往歴、家族歴)については自記式質問票調査により情報収集し、初年度に38症例の研究検体を取得したが、その後の検体取得の進捗が遅滞し、基本検診と歯科検診の同時施行例を解析範囲とした当初の検体取得方法では統計学的検証を行うに足る症例数が集められないとの判断に至った。また口腔内ピロリ感染の直接検証を増幅法や培養・鏡検法で試みたが条件の最適化が困難であることが判明し、新たな方針として被験者の保存検体の解析をHuman Helicobacter Pylori Cytotoxin-associated Genen A Protein IgG A ELISA (MyBioSource,Inc.)に特化して行った。研究期間内に約450例の対象を得て、現在解析を続行している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9件) 全て査読あり

水野由子、山崎力： 脳ドックの実際、心電図. Clinical Neuroscience 「脳ドック - 先制医療の切り札へ」(34巻4号：419-423,2016)

Itoh H, Kaneko H, Kiriyama H, Yoshida Y, Nakanishi K, **Mizuno Y**, Daimon M, Morita H, Yatomi Y, Yamamichi N, Komuro I. Effect of metabolically healthy obesity on the development of carotid plaque in general population: A community-based cohort study. J Atheroscler Thromb in press.

Itoh H, Kaneko H, Kiriyama H, Yoshida Y, Nakanishi K, **Mizuno Y**, Daimon M, Morita H, Yatomi Y, Komuro I. Relation between the updated blood pressure classification according to the ACC/AHA guidelines and carotid intima-media thickness. Am J Cardiol in press.

Iino H, Okano T, Daimon M, Sasaki K, Chigira M, Nakao T, **Mizuno Y**, Yamazaki T, Kurano M, Yatomi Y, Sumi Y, Sasano T, Miyata T. Usefulness of carotid arterial strain values for evaluating the arteriosclerosis. J Atheroscler Thromb. 26(5):476-487, 2019

Lee SC, Daimon M, Di Tullio MR, Homma S, Hasegawa T, Chiou SH, Nakao T, Hirokawa M, **Mizuno Y**, Yatomi Y, Yamazaki T, Komuro I. Beneficial effect of body weight control on left ventricular diastolic function in the general population: an analysis of longitudinal data from a health check-up clinic. Eur Heart J Cardiovasc Imaging 19(2):136-142, 2018

Matsumoto L, Suzuki K, **Mizuno Y**, Ohike Y, Ozeki A, Ono S, Takanashi M, Sawaki D, Suzuki T, Yamazaki T, Tsuji S, Iwata A. Association of subclinical carotid atherosclerosis with immediate memory and other cognitive functions. Geriatrics & Gerontology International 18(1):65-71, 2018

Lee SL, Daimon M, Di Tullio MR, Homma S, Nakao T, Kawata T, Kimura K, Shinozaki T, Hirokawa M, Kato TS, **Mizuno Y**, Watanabe M, Yatomi Y, Yamazaki T, Komuro I. Relationship of left ventricular diastolic function to obesity and overweight in a Japanese population with preserved left ventricular ejection fraction. Circulation Journal 80(9):1951-1956, 2016

Lee SL, Daimon M, Nakao T, Singer DE, Shinozaki T, Kawata T, Kimura K, Hirokawa M, Kato TS, **Mizuno Y**, Watanabe M, Yatomi Y, Yamazaki T, Komuro I. Factors influencing left atrial volume in a population with preserved ejection fraction: Left ventricular diastolic dysfunction or clinical factors? Journal of Cardiology. 68(4):275-281, 2016.

Hirokawa M, Daimon M, Lee SL, Nakao T, Kawata T, Kimura K, Kato TS, **Mizuno Y**, Watanabe M, Yatomi Y, Yamazaki T, Komuro I. Early menopause does not influence left ventricular diastolic dysfunction: A clinical observational study in healthy subjects. Journal of Cardiology. 68 : 548-553, 2016

〔学会発表〕(計 7件)

Mizuno Y, Daimon M Uemura K, Ito H, Kiriyama H, Yoshida Y, Nakanishi K, Kaneko H, Koide D, Yamamichi N, Komuro I. Lipoprotein(a) is associated with elevated mitral E/e' ratio in Japanese non-Heart Failure population. American College of Cardiology 2019 (New Orleans, 2019)

Kiriyama H, Kaneko H, Itoh H, Yoshida Y, Nakanishi K, **Mizuno Y**, Daimon M, Morita H, Yatomi Y, Komuro I. Role of anemia and proteinuria in the development of renal function deterioration in general population with preserved glomerular filtration Rate. 第 83 回日本循環器学会学術集会 Japanese Circulation Society 2019 (東京)

Itoh H, Kaneko H, Kiriyama H, Yoshida Y, Nakanishi K, **Mizuno Y**, Daimon M, Morita H, Yatomi Y, Komuro I. Association between the updated blood pressure classification according to ACC/AHA guidelines and carotid intima-media thickness: A community-based cohort study. 第 83 回日本循環器学会学術集会 Japanese Circulation Society 2019 (東京)

Yoshida Y, Nakanishi K, Daimon M, Nakao T, Ishiwata J, Sawada N, Hirokawa M, Kaneko H, **Mizuno Y**, Morita H, Yatomi Y, Komuro I. Association of arterial stiffness with left atrial volume and function: A community-based cohort study. 第 83 回日本循環器学会学術集会 Japanese Circulation Society 2019 (東京)

水野由子、小出大介、大門雅夫、山道信毅、小室一成 人間ドック受診者における脂肪肝と脂質関連因子および動脈硬化の検討、第 59 回日本人間ドック学会学術大会 (2018 年 8 月 30 日 ~ 31 日、新潟)

古川佳子、横山郁夫、松尾容子、**水野由子**、内野悠一、林田済、銭谷幹夫、天野隆弘、当センターで新たに診断された心房細動症例についての検討、第 58 回日本人間ドック学会学術大会 (2017 年 8 月 24 日 ~ 25 日、大宮)

水野由子、山崎力、小出大介、小室一成、耐糖能異常が腫瘍マーカーに及ぼす影響について、第 112 回日本内科学会総会 (2015 年 4 月 10 日、京都)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 0件)

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。