

令和元年6月14日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20697

研究課題名（和文）成人の口腔内におけるピロリ菌の定着部位の探索および胃感染との関連の検討

研究課題名（英文）Evaluation of Helicobacter pylori in the oral cavity in Japanese adults

研究代表者

渡邊 功 (Watanabe, Isao)

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：10636525

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、歯髄除去または抜歯処置を受けた患者192人の口腔内サンプル内の Helicobacter pylori 遺伝子の有無と、胃感染との関連を調査した。13.0%が尿検査より H. pylori 感染陽性であった。また、12.0%の歯髄より H. pylori が検出された。この内21人は H. pylori 感染および歯髄からの H. pylori 検出の両方がみられた。歯垢から H. pylori は2人検出されたが、唾液から検出されなかった。また、H. pylori 感染者の内、歯科臨床診断で重度う蝕を有していると診断された者は有意に歯髄内に H. pylori が存在していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

詳細が不明な H. pylori の感染経路および蓄積場所を明らかにすることは、口腔内と胃内の H. pylori の関係を明らかにすることができる。これは、効果的な H. pylori 感染予防を可能とし、胃粘膜の炎症の軽減や萎縮性胃炎、胃潰瘍、胃がんの発症の減少に寄与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We studied the association between H. pylori infection and the presence of H. pylori gene in oral samples among 192 patients who received either pulp treatment or tooth extraction. The urine test showed that 13% were positive for H. pylori antibody. The dental pulp PCR test indicated that 12% were positive for the H. pylori gene. Twenty-one of those subjects were positive for both the antibody in urine and gene in dental pulp. PCR was positive in dental plaque of two subjects, but negative in saliva. Among H. pylori -infected subjects, the subjects who were clinically diagnosed with severe dental caries had the H. pylori gene in dental pulp significantly.

研究分野：口腔衛生

キーワード：ピロリ菌 歯髄 歯垢 唾液

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

## 1. 研究開始当初の背景

International Agency for Research on Cancer の報告では、*H. pylori* は胃癌を発症させる発がん性細菌であると述べられ (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, 1994) 我が国における感染率として Hirayama Y らは、2008 ~ 2012 年の調査で日本人全体では約 28% が *H. pylori* に感染していると報告した。*H. pylori* の胃内への感染経路は口口感染、糞口感染が想定されており、これまで口腔内領域では歯垢や唾液、歯髄の口腔サンプルから *H. pylori* が検出されているが (Anand P et al. World Journal of Gastroenterology; 2014, Ogaya Y et al. Journal of Medical Microbiology; 2014) 感染獲得から発症までの蓄積場所および感染経路を裏付ける明確な研究成果は不十分である。口腔サンプルからの *H. pylori* の検出には、PCR 法を応用した分子生物学的手法が広く使用されているが、これらの PCR 法を使用した *H. pylori* の検出では対象地域、口腔サンプルの種類、増幅させる PCR 産物の種類により検出率は 0 ~ 100% と様々であり、信頼性に乏しい (Anand P et al. World Journal of Gastroenterology; 2014)。これに対して、Nomura らは *H. pylori* の完全ゲノム配列が決定している 70 株の内、日本・韓国株、南米株、インド株、ヨーロッパ株、アフリカ株を含む 48 株の全塩基配列を GenBank データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 上で検索し、続いて 16rRNA、vacA、cagA、glmM(ureC)、ureA 遺伝子の多重配列の解析を、日本 DNA データバンク (DNA Data Bank of Japan; DDBJ) の CLUSTALW (<http://clustalw.ddbj.hig.ac.jp/>) を用いて行った。そして、20 塩基以上連続した共通配列を抽出し、その中から ureA 遺伝子をプライマーとした PCR 法を開発し、これを使用して小児歯髄から *H. pylori* を検出した (Nomura R et al, 2017)。しかし、この Nomura らの開発した PCR 法を用いた日本人の成人からの報告は未だ無く、口腔内の *H. pylori* と胃感染の関連については調査されていない。そこで本研究では、成人の口腔内サンプル (唾液、歯垢、歯髄) を採取し、この PCR 検出系を用いて *H. pylori* の感染の有無を同定し、口腔内の *H. pylori* の定着部位を比較検討した。また、尿中 *H. pylori* 抗体から胃内における *H. pylori* 感染の有無を判定し、口腔内の *H. pylori* 保有との関連を評価した。

## 2. 研究の目的

本研究では、*H. pylori* の全ゲノム情報から得られた ureA 遺伝子配列を基にした特異的な PCR 法を用いて、成人における口腔内サンプル (唾液、歯垢、歯髄) の感染の有無を評価した。そして、尿中抗体や生活習慣に関する自記式質問票を評価し、口腔内定着部位と胃感染、生活習慣病因子との関連について明らかにすることを目的としている。

## 3. 研究の方法

### 調査対象

2016 年 1 月から 2017 年 2 月までに京都府立医科大学附属病院歯科外来を受診した成人患者の内、歯科臨床診断により歯髄除去又は抜歯処置が適用となり、担当歯科医師が対面で書面を用いて研究参加の同意を得た 192 人 (男性 87 人、女性 105 人: 平均年齢 58.6 ± 18.8 歳) を対象として解析した。

### 口腔内診査と処置歯の歯科臨床診断および質問票

担当歯科医師が、口腔内診査より現在歯数、う蝕の有無、Community Periodontal Index (CPI) を診査した。また、歯科臨床診断として、担当医により歯髄除去又は抜歯処置が必要と判断されたう蝕を重度う蝕、抜歯処置が必要と判断された歯周病を重度歯周病、これらが混合しているものを重度う蝕・重度歯周病混合、その他歯牙破または智歯周囲炎の 5 つに分類した。また、自記式質問票を用いて対象者の既往歴、*H. pylori* 除菌歴の有無、生活習慣、口腔衛生習慣を調査した。

### 歯髄・歯垢・唾液の採取

歯髄除去処置をした対象者の歯髄は 10ml 生理食塩水入キットに保存した。また、抜歯処置をした場合は、担当歯科医師が歯牙抜去後に歯牙を歯科用タービンで穿通し歯髄を採取し、10ml 生理食塩水入キットに保存した。歯肉縁上歯垢は前歯部および臼歯部より 1 箇所ずつ採取し、10ml 生理食塩水入キットに保存した。唾液は専用検出キット (Salivette: SARSTEDT) にて 5ml の安静時唾液を採取した。そして、採取した歯髄、歯垢、唾液を -20 で保存した。

### 口腔内サンプルからの *H. pylori* DNA の同定方法

我々は、ureA 遺伝子の一部を増幅させ PCR 産物として使用した Nested PCR 法 (Nomura R et al. 2018) を使用して、歯髄、歯肉縁上歯垢、唾液サンプルから *H. pylori* 遺伝子を検出した。検体 5ml に対して、遠心分離後に 10mM Tris/HCl (pH 8.0) 250ul にて懸濁した。その後、Cell Lysis solution 600ul を加えて、80 5 分間反応させた。続いて、RNase 3ul 添加して 37 30 分間反応させた。この反応液に Protein precipitation solution 200ul を添加し、遠心分離後に上清にイソプロパノール 600ul を添加した。得られた沈渣を 70% EtOH にて洗浄し、乾燥後 Tris-EDTA

buffer 100ul に溶解し、DNA 100ul を抽出した。次いで、Ex Tag Buffer (Takara Bio) 2ul、dNTP Mix (Takara Bio) 1.6ul、Forward primer (MilliQ80ul+ureA-aF primer [5'-ATG AAA CTC ACC CCA AAA GA-3'] 20ul) 0.5ul、Reverse primer (MilliQ80ul+ureA-bR primer [5'-TAG ACT TTG ACA GAG AAA AAA CTT TCG G-3'] 20ul) 0.5ul、Ex Tag (Takara Bio) 0.1ul および MilliQ13.3ul を混和した。混和溶液 18ul を採取し、抽出した DNA 2ul と混和し遠心分離した。その後、PCR 法 (MyCyclerTM: BIO RAD) にて 30 cycles des DNA を増幅し、1.5% アガロースゲル電気泳動 (MupidR-2plus: ADVANCE) にて 100bp のレベルでシングルバンドを検出した。透過 UV 光 302nm で、バンドの蛍光の有無を確認した。そしてこれにより検出された PCR 産物から Forward primer (MilliQ80ul+ureA-bF primer [5'-AAA CGC AAA GAA AAA GGC ATT AA-3'] 20ul) 0.5ul、Reverse primer (MilliQ80ul+ureA-aR primer [5'-TTC ACT TCA AAG AAA TGG AAG TGT GA-3'] 20ul) 0.5ul を用いて、同様に DNA を増幅し、0.7% アガロースゲル電気泳動にて 100bp のレベルでシングルバンドを検出し、バンドの蛍光の有無にて H. pylori の有無を確認した。

尿の採取と H. pylori 感染の有無の判定

我々は H. pylori 感染の有無の判定に、尿抗体検査 (ラピラン H.ピロリ抗体スティック: 大塚製薬株式会社) を用いた。我々は対象者から随時尿を集めて、冷蔵下で保存し速やかに尿抗体検査を行った。

解析方法

各検査結果項目の解析には  $\chi^2$  検定および t 検定を使用した。有意水準は 0.05 とし、SPSS16.0J for Windows (SPSS : Japan Inc.) を使用した。

#### 4. 研究成果

対象者の特性

本研究対象者は、平均年齢  $58.6 \pm 18.8$  歳であった。H. pylori 除菌歴のある対象者は 11% (n=21) であった。対象者の歯科的特徴として平均現在歯数は  $20.4 \pm 6.8$  本であり、う蝕有り群は 57% (n=110)、CPI による歯周病有り群は 71% (n=136) であった。しかし男女別における生活習慣因子において有意な差は認められなかった。

H. pylori 感染者および口腔内の H. pylori 陽性者数

H. pylori 感染者率は全体で 13% (25/192) であった。そして口腔サンプル内の H. pylori は歯髄から 12% (23/192)、歯垢から 1% (2/192) 検出されたが、唾液から H. pylori は検出されなかった。

H. pylori 感染者と歯髄内 H. pylori 陽性者の関連

H. pylori 感染者における歯髄内の H. pylori 陽性率は 84% (21/25) であり、歯髄内の H. pylori 陽性者における H. pylori 感染率は 91% (21/23) であった。H. pylori 感染者は有意に歯髄内に H. pylori を保有していた ( $p < 0.01$ )。

歯髄内 H. pylori 陽性者における歯科臨床診断の内訳

歯髄内 H. pylori 陽性者の内、重度う蝕・重度歯周病混合が 66% (15/23)、重度う蝕が 30% (7/23) であり、合わせると 96% (22/23) であり、他には重度歯周病と診断された者が 4% (1/23) であった。また、歯髄内 H. pylori 陽性者の内、重度う蝕を含むと診断された者が有意に多かった ( $p < 0.01$ )。しかし、重度歯周病の有無では有意な差は認められなかった。

これらにより、H. pylori 感染者では、高頻度に歯髄内に H. pylori を保有している事が明らかとなり、これには重度う蝕と関係している可能性が高いことが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. K Iwai, I Watanabe, T Yamamoto, N Kuriyama, R Nomura, D Matsui, T Amemiya, F Oseko, K Adachi, Y Ogaya, E Ozaki, T Koyama, K Nakano, Y Watanabe, N Kanamura. Evaluation of Helicobacter pylori in the oral cavity in Japanese adults. Japanese Association for Dental Research. 2017 年 10 月

2. 岩井浩明, 山本俊郎, 渡邊功, 松井大輔, 金村成智. 重度歯周病患者における Helicobacter pylori 菌蓄積箇所に関する検討. 第 30 回日本口腔診断学会. 2017 年 9 月

3. 岩井浩明, 山本俊郎, 滝沢茂太, 西垣勝, 大迫文重, 雨宮傑, 金村成智. 口腔内における Helicobacter pylori 菌定着部位に関する検討. 第 71 回日本口腔科学会. 2017 年 4 月

4. 岩井浩明, 渡邊功, 山本俊郎, 松井大輔, 小山晃英, 鋸屋侑布子, 西垣勝, 尾崎悦子, 野村良太, 栗山長門, 仲野和彦, 金村成智, 渡邊能行. Helicobacter pylori 菌の口腔内感染巣に関する検討. 第 27 回日本疫学会. 2017 年 1 月

5. 岩井浩明, 山本俊郎, 西垣勝, 松井大輔, 渡邊功, 鋸屋侑布子, 野村良太, 栗山長門, 仲野和彦, 渡邊能行, 金村成智. 歯髓組織における Helicobacter pylori 菌感染に関する検討. 日本口腔科学会近畿地方部会. 2016 年 12 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし