

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K12023

研究課題名（和文）ヒト口腔からのピロリ菌検出法の確立と唾液を介した家庭内感染の実態調査

研究課題名（英文）Isolation and identification methods for *Helicobacter pylori* from human oral cavities and investigation of its transmission pattern

研究代表者

續橋 治 (TSUZUKIBASHI, Osamu)

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号：80333110

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：近年の報告によると、胃内のみならず口腔内もピロリ菌の生息部位である可能性が示唆されている。そこで本研究は、口腔試料から確実にピロリ菌を検出するための選択培地の開発とPCR法による精度の高い本菌の同定・検出法の確立を行い、口腔内における本菌の分布の調査、また遺伝子多型解析による感染源と感染経路の解明を目的とした。

本研究において開発したピロリ菌は200名の被験者のうち、わずか3名からのみの検出に留まったことにより、ピロリ菌にとって口腔は好ましい生息部位ではないと考えられた。またAP-PCR法の結果から、ピロリ菌の口腔内への感染は頻繁に起こるものではないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、PCR法を用いた菌の検出方法により、唾液や歯石などの口腔試料からもピロリ菌が検出されていることから、胃内のみならず口腔内もピロリ菌の生息部位である可能性が示唆されている。さらに、唾液や歯石などから検出されるために、離乳食として親が噛み砕いた食品を乳幼児に食べさせる行為や、家族内で共通食器の使用によって、ピロリ菌を口腔に保菌している親の唾液などを介して子供にピロリ菌が感染するという家族内での感染・伝播の可能性も示唆されている。本研究により、ピロリ菌の感染様式が詳細に解明されれば、感染防止策の確立に繋がり胃癌発症等の減少に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）： *Helicobacter pylori* causes gastric and peptic ulcers, and also gastric cancer. Recently, it was frequently reported that *H. pylori* was detected from human oral cavities. The aim of this study was to establish the isolation and identification methods for *H. pylori* from human oral cavities, and investigate its transmission pattern.

A selective medium, HPSM, for the isolation of *H. pylori* from oral cavities was developed in this study. Also, PCR primer for the identification and detection of *H. pylori* was designed. HPSM and PCR method using the primers designed in this study were useful for the isolation and identification of *H. pylori* from human oral cavities. *H. pylori* in 200 saliva samples was detected at 1.5%. Moreover, *H. pylori* isolates showed same genotypes on AP-PCR using OPA-07 primer. These results indicated that human oral cavities were not suitable for the habitats of *H. pylori*.

研究分野：口腔細菌学

キーワード： *Helicobacter pylori* 胃・十二指腸潰瘍 胃がん 選択培地 口腔 感染様式

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) は、1983 年にオーストラリアの Warren と Marshall によって初めて報告されたらせん状の細菌である。ピロリ菌のヒト体内への感染・定着は、胃炎や胃・十二指腸潰瘍の発症原因の一つと考えられている。さらに、現在最も注目されているのが胃癌との関連性である。胃癌罹患者の 9 割以上はピロリ菌感染者であることや、砂ネズミという動物を用いた発癌実験においてピロリ菌感染が胃癌発生に関連したという報告がなされている。ピロリ菌の発見は消化器疾患の領域で極めて大きな発見であることは間違いないが、未だ不明な点が非常に多く残されており、ピロリ菌感染者の一部しか胃癌を発症しないことや、胃癌発症の詳細なメカニズムは未だ解明されていない。また、ピロリ菌の感染源と感染経路についても詳細は不明であるが、本菌汚染飲食物を介して口から胃に入り、胃内で生息・増殖する経口感染だと考えられてきた。

近年、PCR 法を用いた菌の検出方法により、唾液や歯石などの口腔試料からもピロリ菌が検出されていることから、胃内のみならず口腔内もピロリ菌の生息部位である可能性が示唆されている。さらに、唾液や歯石などから検出されるために、離乳食として親が噛み砕いた食品を乳幼児に食べさせる行為や、家族内で共通食器の使用によって、ピロリ菌を口腔に保菌している親の唾液などを介して子供にピロリ菌が感染するという家族内での感染・伝播の可能性も示唆されている。申請者は以前、PCR 法と商品化された既存のピロリ菌選択培地を用いた培養法にて、ボランティア 30 人の唾液からピロリ菌の検出を試みたことがある。しかしながら、PCR 法ではピロリ菌を検出することはできなかった。口腔試料中におけるピロリ菌の菌数が少なく、さらに細胞や組織などの阻害物質の混入による偽陰性の可能性が考えられた。選択培地による培養法においても、ピロリ菌以外の口腔細菌の発育を抑制できなかったために、検出は不可能であった。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、口腔試料から確実にピロリ菌を検出するための選択培地を開発して、口腔内における本菌の分布の調査、また遺伝子多型解析による感染源と感染経路の解明を目的とする。それにより、感染防止策の確立に繋がり胃癌発症等の減少に寄与するものと考えられる。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究は、ヒトから採取された唾液試料を用いるため、日本大学松戸歯学部倫理審査委員会に本研究の申請を行い、承認を得ている。なお、本研究で対象となる被験者は、試料採取時に 2 ヶ月間抗菌薬の服用がないこと、以前にピロリ菌除菌療法を受けていない者とした。(承認番号 EC17-011)。

(2) ヒト口腔試料を対象としたピロリ菌を高精度に検出するための選択培地の開発を行った。既存のピロリ菌選択培地 (コロンビア HP 寒天培地; 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社、ピロリ寒天培地; シスメックス・ピオメリユー株式会社) に、ヒト唾液試料を接種・培養後、選択培地上に発育 (集落を形成) したピロリ菌以外の口腔細菌を目的外菌とし、分離操作を行い、その分離菌株の純培養と菌株のストックを行った。申請者が所属する研究室には、ピロリ菌の認定株を 4 株保有している (*H. pylori* JCM12093<sup>T</sup>、*H. pylori* JCM12095、*H. pylori* JCM12096、*H. pylori* JCM12097)。この 4 株を用いて、最もピロリ菌の発育に適した基礎培地の検討を行った。また、より良好な発育が得られる様に、ピロリ菌の発育因子の検索も併せて行った。分離した目的外菌の複数株とピロリ菌認定株の 4 株に対して、抗菌薬ディスクを用いた薬剤感受性試験を実施した。それにより、目的とするピロリ菌の発育を阻害せず、かつ目的外菌のみの発育を阻害する抗菌薬の選定を行った。最もピロリ菌の発育が良好であった基礎培地に、ピロリ菌のみ発育が阻害されない抗菌薬を添加した選択培地を作製して、10 名から採取されたヒト唾液試料

をその培地に接種・培養後、実際の臨床で本選択培地が有用であるか否かを検討し、有用性が確認された選択培地を、ヒト口腔試料を対象としたピロリ菌検出用選択培地とした。

(3) 菌種同定は PCR 法によって行うため、感度に優れたピロリ菌特異的プライマーの設計を行った。PCR プライマーは、DDBJ から得られたピロリ菌とその類縁菌 5 菌種の 16S rDNA の配列に基づき、CLUSTAL W を用いてマルチプル・シーケンス・アライメント解析を行うことにより設計した。その後、設計したプライマーの特異性は BLAST search により検索した。

(4) 開発した選択培地を用いて、ヒト口腔内におけるピロリ菌の分布の調査を行った。本研究協力に同意が得られた被験者 200 名から採取した唾液試料を適当な濃度へ段階希釈し、開発した選択培地へ接種し、CO<sub>2</sub> インキュベーター (CO<sub>2</sub> 濃度 5 %) にて培養を行った。総菌数に対する比率も算定するために総菌用培地にも同様に唾液試料を適当な濃度へ段階希釈し、接種・培養を行った。総菌用培地にはコロンビア馬血液平板培地を用いた。総菌用培地は、ガスパックシステム (AnaeroPack<sup>®</sup>、三菱ガス化学株式会社) を用いた嫌気培養を行う。培養後に、培地上に形成された集落数から集落形成単位 (CFU) を算定することにより菌数算定を行った。菌種同定は、設計したピロリ菌特異的プライマーを用いた PCR 法によって実施した。これらの結果により、口腔内におけるピロリ菌保菌者率、唾液中の総菌数に対するピロリ菌の比率を求めた。

(5) 分離されたピロリ菌分離株に対して、AP-PCR 法を利用した遺伝子多型解析を行った。AP-PCR に用いるプライマーは、Paju らが設計した AP-PCR 用ランダムプライマーを用いた (J Clin Microbiol, 36:2019-2022, 1998)。本プライマーを用いた PCR 後、増幅パターンを解析することにより、感染経路や感染様式について調査した。

#### 4. 研究成果

(1) ピロリ菌の選択培地に使用する基礎培地を検討した結果、既存の選択培地でも汎用されている Columbia blood agar base (OXOID Ltd., UK) が最も良好な発育を示したために、これを開発する選択培地に使用する基礎培地とした。次に、ピロリ菌の発育因子を調査した結果、7% のウマ血液を基礎培地に添加すると本菌の発育が著しく促進されたため、基礎培地に 7% のウマ血液を添加することとした。また、選択培地に使用する抗菌薬の選定を行った結果、ピロリ菌は bacitracin、vancomycin、colistin、および ST 合剤に対して非感受性を示した。以上の結果から、選択培地の組成は Columbia blood agar base に 7% のウマ血液と bacitracin、vancomycin、colistin、および ST 合剤を添加したものと、HPSM と命名した。当講座が保有しているピロリ菌認定株 4 株のコロンビア HPSM 上での発育は、非選択培地であるコロンビア馬血液平板培地と比較して同程度であった (Table 1)。

| Strain                     | Columbia blood<br>CFU/ml, × 10 <sup>8</sup> | HPSM<br>CFU/ml, × 10 <sup>8</sup> | Recovery, % |
|----------------------------|---|-----------------------------------|-------------|
| <i>Helicobacter pylori</i> |   |                                   |             |
| JCM 12093                  | 3.9 ± 0.2 <sup>a</sup>                      | 3.8 ± 0.3                         | 97.7        |
| JCM 12095                  | 6.9 ± 0.2                                   | 6.8 ± 0.3                         | 98.1        |
| JCM 12096                  | 4.5 ± 0.3                                   | 4.4 ± 0.2                         | 97.3        |
| JCM 12097                  | 3.2 ± 0.1                                   | 3.2 ± 0.2                         | 99.3        |

<sup>a</sup> Ave ± SD.

のとし、HPSM と命名した。当講座が保有しているピロリ菌認定株 4 株のコロンビア HPSM 上での発育は、非選択培地であるコロンビア馬血液平板培地と比較して同程度であった (Table 1)。

(2) 本研究で設計した PCR 法による菌種同定に用いるピロリ菌特異的プライマーの配列を Table 2 に示す。

| Species          | Primer | Sequence           | Product size (bp) | Position  | Accession number |
|------------------|--------|--------------------|-------------------|-----------|------------------|
| <i>H. pylori</i> | HP2F   | ATAGTCAGTCAGGTGTGA | 869               | 551-568   | Z25741           |
|                  | HP2R   | CAATTAGCAICCTGACTT |                   | 1419-1401 |                  |

Fig. 1 は、本研究で設計したピロリ菌

特異的プライマーによる検出限界を調査したものを示す。本 PCR プライマー使用による PCR 法は、PCR テンプレートに 5 CFU のピロリ菌が含まれていれば検出可能であり、高感度であることが判明した。Fig. 2 は、以前に報告されたピロリ菌特異的プライマーと本研究で設計したプライマーを用いて、6 名のピロリ菌を保菌していない被験者の唾液試料で PCR 法を行った結果をそれぞれ示す。本研究で開発したプライマーを用いた PCR 法は増幅バンドが全く認められな

かったのに対し、報告されたプライマーを使用したものは4名の被験者試料で複数の非特異的な増幅バンドが認められた。以上のことから、本研究で設計したプライマーによるPCR法は、高感度かつ特異的に優れ、雑多な口腔試料からピロリ菌を検出・菌種同定するのに有用であることがわかった。

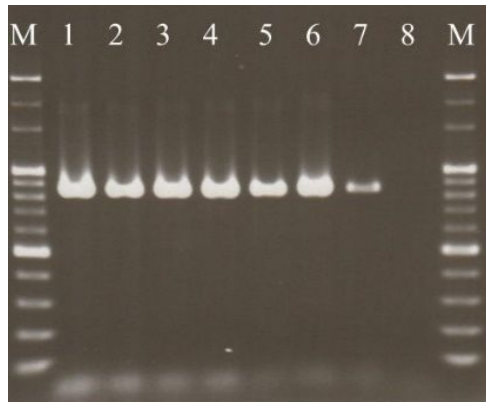


Fig. 1 Detection limit of the multiplex PCR assay for detecting *H. pylori*. The primers are HP2F and HP2R. The following numbers of cells were added:  $5 \times 10^6$  (lane 1),  $5 \times 10^5$  (lane 2),  $5 \times 10^4$  (lane 3),  $5 \times 10^3$  (lane 4),  $5 \times 10^2$  (lane 5),  $5 \times 10$  (lane 6),  $5 \times 1$  (lane 7), 0 (lane 8). M, molecular size marker (100 bp DNA ladder)

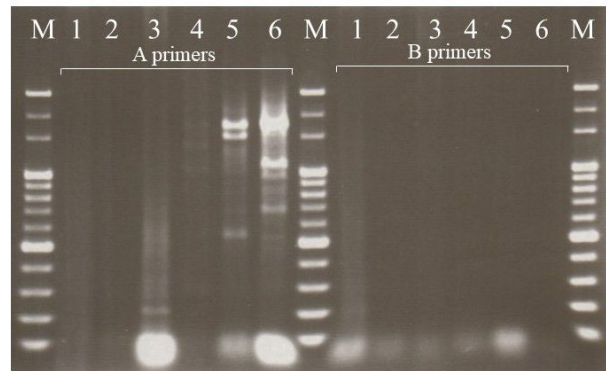
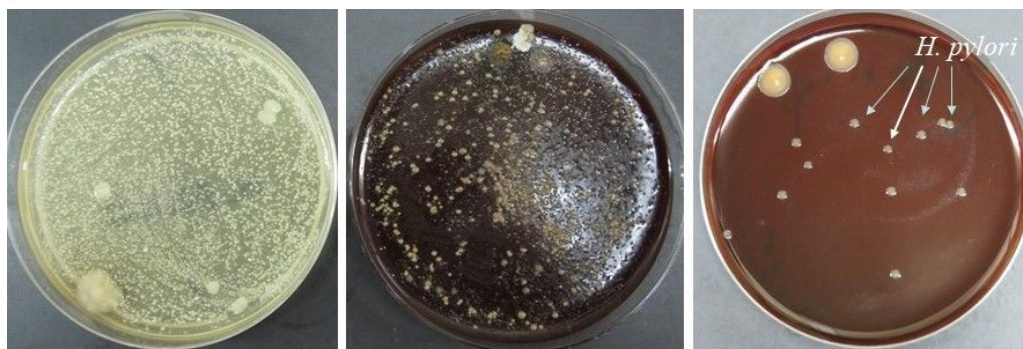


Fig. 2 Direct PCR assay for detecting *H. pylori* in saliva samples. The A primers are reference primers, and the B primers are HP2F and HP2R. Lanes 1-6 are saliva samples from each *H. pylori* negative subject. M, molecular size marker (100 bp DNA ladder)

(3) 開発した選択培地を用いて、被験者200名から採取した唾液試料におけるピロリ菌の分布の調査を行った結果をTable 3に示す。ピロリ菌が検出されたのは、わずか3名(1.5%)であった。その3名の唾液中の総細菌数は $7.8 \times 10^7$  CFU/ml、ピロリ菌数は $1.06 \times 10$  CFU/mlで総細菌数に対するピロリ菌の割合は0.00001%であった。また、HPSM上に認められたピロリ菌以外の細菌の発育は僅かであり、その発育を99.99981%阻害した。これらの結果から、HPSMは選択性に優れ、唾液などの口腔試料からピロリ菌を検出するのに有用であることが示唆された。ピロリ菌が検出された被験者一人の唾液試料を各選択培地に接種、培養後の写真をFig. 3に示す。

Table 3 Detection frequencies of *H. pylori* in saliva samples

|                           | No. of subjects<br>n=200<br>(%, frequency) | No. of total bacteria<br>(CFU) | No. of <i>H. pylori</i><br>(CFU) | Others<br>(CFU)   |
|---------------------------|--|--------------------------------|----------------------------------|-------------------|
| <i>H. pylori</i> positive | 3 (1.5)                                    | $7.8 \times 10^7$              | $1.06 \times 10$                 | $1.5 \times 10^2$ |
| <i>H. pylori</i> negative | 197 (98.5)                                 | $9.3 \times 10^7$              | 0                                | $7.5 \times 10$   |



ピロリ寒天培地  
bioMéieux Japan Ltd.

コロンビアHP寒天培地  
Becton Dickinson co., Ltd.

本研究で開発したピロリ菌  
選択培地 (HPSM)

Fig. 3 Comparison of three *H. pylori* selective media after inoculation of *H. pylori* positive saliva and cultivation

本研究で開発したピロリ菌選択培地 HPSM は、著しくピロリ菌以外の細菌の発育を阻害するために、容易にピロリ菌を検出可能であるのに対し、商品化されている 2 つの既存の選択培地はピロリ菌以外の細菌の発育を阻害出来ず、ピロリ菌を検出することは不可能であった。

(4) ピロリ菌が検出された 3 名の被験者から分離したピロリ菌分離株 3 株ずつに対して、AP-PCR 法を用いて遺伝子多型解析を行った結果を Fig. 4 に示す。

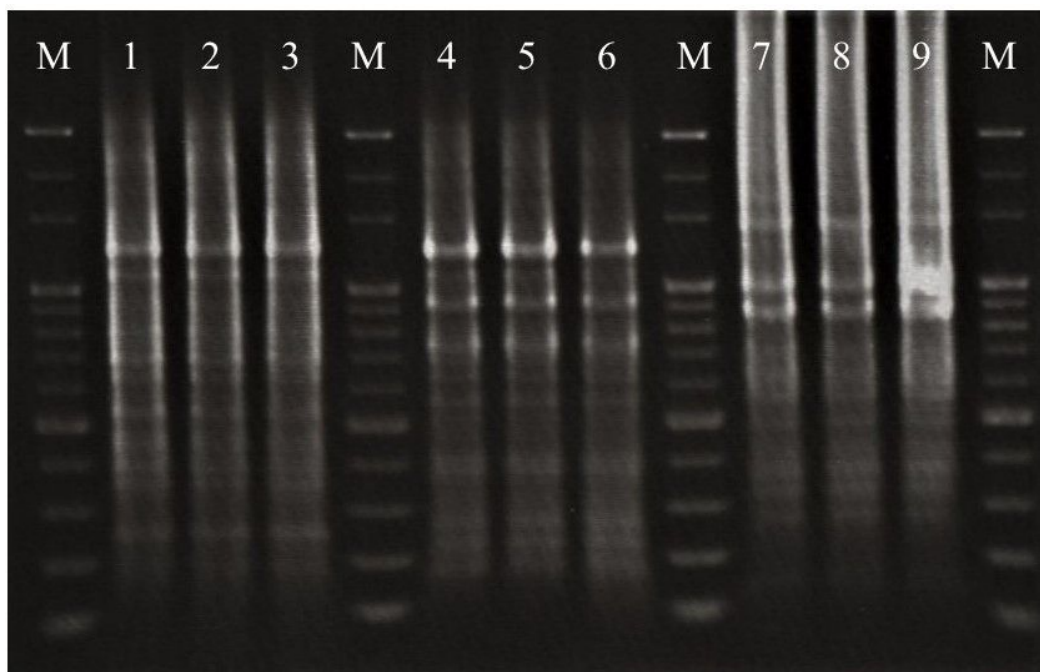


Fig. 4 AP-PCR assay. The primer is OPA 7.

Lanes 1-3 are *H. pylori* isolates from subject A, Lanes 4-6 are *H. pylori* isolates from subject B, and Lanes 7-9 are *H. pylori* isolates from subject C. M, molecular size marker (100 bp DNA ladder)

1 から 3 は被験者 A、4 から 6 は被験者 B、7~9 は被験者 C から分離したピロリ菌であり、AP-PCR 法の結果から、唾液中のそれぞれのピロリ菌は 3 者とも同一の遺伝子型を示した。以上のことから、ピロリ菌はわずか 3 名からのみの検出に留まったことより、ピロリ菌にとって口腔は好ましい生息部位ではなく、外部から経口感染により本菌は口腔に住み着くことなく口腔を通過し、好ましい生息場所と考えられる消化管・腸管などに感染・常在化するものと考えられた。また AP-PCR 法の結果から、ピロリ菌の口腔内への感染は頻繁に起こるものではないことが示唆された。

#### <引用文献>

Suzuki N, Yoneda M, Naito T, Iwamoto T, Masuo Y, Yamada K, Hisama K, Okada I, Hirofuji T, Detection of *Helicobacter pylori* DNA in the saliva of patients complaining of halitosis, J Med Microbiol, 57巻、2014、1553 - 1559

Deyi VYM, Van den Borre C, Fontaine V, Comparative evaluation of 3 selective media for primary isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies under routine conditions, Diag Microbiol infect disease, 68 巻、2010、474 - 476

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

|  |                      |
|--|----------------------|
| 1. 著者名<br>内堀 聡史、續橋 治、上里 ちひろ、高橋 佑次、玉木 大之、小峯 千明、淵上 真奈、深津 晶、小林 平、村上 洋、福本 雅彦 | 4. 巻<br>12           |
| 2. 論文標題<br>歯周組織の健常マーカーの指標となる得る細菌の検索                                      | 5. 発行年<br>2020年      |
| 3. 雑誌名<br>日本口腔検査学会雑誌   | 6. 最初と最後の頁<br>3 - 10 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし  | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難                                   | 国際共著<br>-            |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>續橋 治、内堀聡史、淵上真奈、上里ちひろ、小峯千明、高橋佑次、小西賀美、小野良徳、深津 晶、福本雅彦    | 4. 巻<br>12            |
| 2. 論文標題<br>Aggregatibacter actinomycetemcomitans簡易検査キットの開発と臨床応用 | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>日本口腔検査学会雑誌  | 6. 最初と最後の頁<br>39 - 45 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし                                   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難                          | 国際共著<br>-             |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>上里 ちひろ、内堀 聡史、田中 孝明、後藤 治彦、北川 剛至、小林 平、續橋 治 |
| 2. 発表標題<br>インプラント周囲炎で優勢なEubacterium属のMultiplex PCR法 |
| 3. 学会等名<br>日本歯科補綴学会                                 |
| 4. 発表年<br>2019年                                     |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>内堀 聡史、上里 ちひろ、田中 孝明、後藤 治彦、村上 洋、小林 平、續橋 治 |
| 2. 発表標題<br>最終補綴装置の作製時期決定に有用な細菌検査法の確立               |
| 3. 学会等名<br>日本歯科補綴学会                                |
| 4. 発表年<br>2019年                                    |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>續橋 治, 内堀 聡史, 齋藤 真規, 小林 良喜, 瀧澤 智美, 桑原 紀子, 落合 智子 |
| 2. 発表標題<br>口臭簡易キットの開発と口臭に関わる細菌の検索                         |
| 3. 学会等名<br>第59回歯科基礎医学会                                    |
| 4. 発表年<br>2017年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>内堀 聡史, 續橋 治, 小林 平, 會田 雅啓              |
| 2. 発表標題<br>Slackia exigualはインプラント周囲炎の病的マーカーとなり得る |
| 3. 学会等名<br>第59回歯科基礎医学会                           |
| 4. 発表年<br>2017年                                  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>續橋 治, 内堀 聡史, 齋藤真規, 桑原紀子, 落合智子   |
| 2. 発表標題<br>Isolation method of Scardovia wiggisiae and relationship with adult dental caries |
| 3. 学会等名<br>第91回日本細菌学会  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>續橋 治, 深津 晶, 淵上真奈, 小峯千明, 小西賀美, 中島麻友, 小倉由希, 大森寛子, 鈴木秀紀, 浅賀勝寛, 福本雅彦 |
| 2. 発表標題<br>口臭症と関連するSolobacterium moorei分離・定量法の確立                            |
| 3. 学会等名<br>第12回日本口腔検査学会   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|