

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22704

研究課題名(和文) 口腔ピロリ菌の闇に迫る一分離・同定, 感染機序, 持続感染制御因子の探索的研究

研究課題名(英文) Approaching the darkness of oral Helicobacter pylori: exploratory research on isolation / identification, infection mechanism, and persistent infection regulators

研究代表者

野杵 由一郎 (Noiri, Yuichiro)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50218286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：口腔におけるピロリ菌の検出割合は明らかでない。本研究では、Nested PCR法を用いて、口腔バイオフィーム等からのH. pyloriの検出を試みた。本研究で用いたNested PCR法は、口腔ピロリ菌を高感度に検出可能であった。続いて、胃ピロリ菌罹患患者(胃がん患者)の胃組織と口腔試料にNested PCR法を実施したところ、ピロリ菌DNAは100%検出可能であった。胃ピロリ菌陽性者の76%は、口腔内からもピロリ菌DNAが検出された。ピロリ菌が口腔内で生きて存在していた場合、口腔が胃の持続感染のリザーバーとして機能する可能性が強く示唆された。その相同性の確認は、期間内には実施できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本ヘリコバクターピロリ学会は、除菌で胃がんのリスクが34%程度(1/3)に低下するとの見解を示したが、除菌療法の成功率は、1次除菌, 2次除菌併せて60-80%程度で頭打ち状態である。本研究の成果はこの日本の現状の打開策に留まらない。研究成果の波及を想定する規模としては、WHOが予測する2050年の世界の医療フィールドである。本研究構想は“胃がん予防戦略”と不適切な抗菌剤使用に伴う“耐性菌被害”(現在、クラリスロマイシン耐性ピロリ菌の出現が問題視)、すなわち年間約1兆円の社会的・経済的損失と約100万人の人命を救う挑戦の一翼を担う芽生え期の研究成果である。

研究成果の概要(英文)：The detection rate of Helicobacter pylori in the oral cavity is not clear. In this study, we attempted to detect H. pylori from oral biofilms using the Nested PCR methods. In this study, using a Nested PCR method was tried to detect H. pylori from oral biofilms. The Nested PCR method used in this study was able to detect H. pylori with high sensitivity. Subsequently, by Nested PCR method, from the gastric H. pylori suffering patient's gastric tissue, H. pylori DNA was detectable 100%. If H. pylori was alive in the oral cavity, the oral cavity could function as a persistent gastric infectious reservoir. Confirmation of the homology could not be carried out within the study period. Oral H. pylori DNA was frequently detected in patients with a history of gastric H. pylori infection. Oral H. pylori has characteristic distribution independent of sex and age, suggesting that it is part of the normal microflora in the oral cavity.

研究分野：歯科保存学

キーワード：ピロリ菌 nested PCR 胃がん 口腔バイオフィーム 感染機序

1. 研究開始当初の背景

1994年世界保健機構(WHO)は、ヘリコバクターピロリ(以下ピロリ菌と略す)を胃がんの『確実な発がん因子』と認定し、その後ピロリ菌除菌に胃がん予防効果があることを認め、各国毎にその戦略を立てるように勧告した(図1)。その結果、ピロリ菌除菌後の再発率は、除菌後3年で非除菌群の1/3まで抑制された。しかし、未だに日本人のピロリ菌感染者は6000万人にのぼり、厚労省調査では6%の自治体が独自にピロリ菌検査を導入している。他方で、ピロリ菌検査

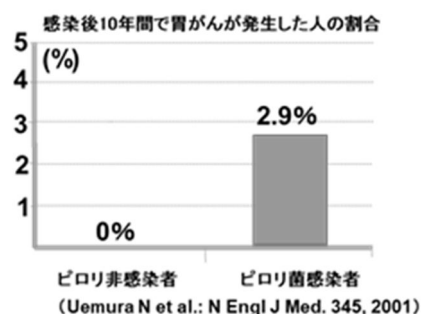


図1. ピロリ菌感染と胃がん発生率

および初期感染に対する抗菌剤の予防投与は、胃がんの死亡率を減らせるかを示す証拠がないとして、日本の胃がん対策にはピロリ菌検査・予防投与の導入は見送られている。

ピロリ菌の感染伝播経路については、幼少期に、(1)口腔-口腔、(2)糞口、あるいは(3)上部消化管-口腔に感染し、持続感染すると想定されているが、不明な点が多い。従来の科学的根拠をもとに、各部検体を対象にピロリ菌感染診断法が開発され、各種診断キットが販売されているが、口腔の検体を標的とした診断/検出キットはまだない。以上の背景を踏まえ、口をピロリ菌のリザーバーと捉える斬新的視点に立ったピロリ菌感染へのアプローチが必須と考えた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、胃がんを歯性病巣感染として捉え、(1)オーラル/デンタルバイオフィルム(OB/DB)等からピロリ菌の分離/同定、(2)感染メカニズムの解明、(3)口腔持続感染を制御する病原因子の探索に挑むこととした。さらにピロリ菌感染(含:再感染)による胃がん予防対策として、口腔ピロリ菌の簡易・迅速検出法、抗菌療法を確立することを最終の目的とした。

3. 研究の方法

(1)口腔ピロリ菌の網羅的検出

2018年1月から2020年4月までに新潟大学医歯学総合病院に来院し、本研究の趣旨を説明し同意を得た24-91歳の男女88名(平均52歳)を対象とし、唾液、舌苔およびデンタルバイオフィルムを採取した(承認番号2017-0150)。各試料からDNAを抽出後、230bpを標的遺伝子としてNested PCRを行った。PCR産物の有無は、アガロースゲル電気泳動により確認した。参考菌株として*H. pylori* IID3023株を使用し、PCR産物のDNAシーケンシングを行った。さらに、本Nested PCR法の検出限界は、段階希釈した*H. pylori*懸濁液のPCR産物より解析した。得られた結果は、ピアソンのカイ二乗もしくはフィッシャーの直接確率検定を行い、統計学的有意水準を5%とした。

(2)ピロリ菌が感染中の胃がん罹患患者の口腔ピロリ菌の検出と口腔と胃ピロリ菌の同一性/同一性の解析

2019年11月から2020年9月までに胃がんにより新潟大学医歯学総合病院消化器内科を受診し、胃がんの内視鏡手術を行った59-86歳の男女21名(平均72.8歳)を対象とした(新潟大学倫理審査委員会承認番号:2019-0220)。内視鏡手術により切除した胃の一部組織を試料とした。また、内視鏡手術前日に、歯科外来にて口腔内診査を行い、口腔試料(唾液、デンタルバイオフィルム(以下DB)、舌苔)を採取した。DBは上顎前歯、下顎前歯、上顎右側臼

歯、下顎左側臼歯部より滅菌済みのスプーンエキスカベータを用いて採取した。採取部位が欠損歯の場合は、反対側同名歯から採取した。

胃組織は半分を粉碎(パワーマッシャー)し、ニッスイプレートヘリコバクター寒天培地(日水製薬)に播種した。寒天培地を37℃、微好気条件下で3日培養した。コロニーはグラム染色を施すとともに、PCR法によりピロリ菌であることを確認した。また、残りの半分はNucleospin Microbial DNAを用いてDNAを抽出した。口腔サンプルは、洗菌後、DNAを抽出した。ピロリ菌DNAを標的遺伝子(230bp)をとした高感度かつ特異度の高いプライマーを用いてNested PCRを行った。増幅産物の有無は、アガロースゲル電気泳動により確認した。

さらに、胃組織から抽出したピロリ菌DNAのシーケンス解析を行った。*H. pylori* IID 3023株を参考菌株として塩基配列の相同性を検索した。

(3)口腔内持続感染を制御する新規病原因子の探索

スナネズミおよびマウスにピロリ菌を経口接種し、8週間後の胃内から単離したピロリ菌のショットガン解析を行い、変異が導入されたゲノム部位を同定した。次いで、変異挿入部位の周辺RNA発現が変動する可能性が考えられたことから、周辺RNAの発現について、接種前の菌株との差異を解析した。具体的には、sRNA HPnc4160の欠損変異株を作製し、RNAおよびタンパク質の発現解析を行なった。

4. 研究成果

(1)口腔ピロリ菌の網羅的検出(担当:大墨、竹中、野杵)

DNAシーケンシングの結果、Nested PCRで増幅した遺伝子は、参考菌株の遺伝子と99.5%の相同性があり、その陽性率は36%(32/88)であった。年齢別では、高齢者(65-91歳)、中高年者(35-64歳)、若年者(24-34歳)で各々39、48、21%であったが有意差はなかった($p > 0.05$)。胃に*H. pylori*罹患歴がある人の陽性率は高かったが(80%, $p < 0.05$)、未検査者の27%からも*H. pylori*が検出された。採取部位別では、下顎前歯(22%)、上顎前歯(16%)が高く、口腔*H. pylori*の生存は環境依存的であると考えられた。100万菌体細胞中に1菌体の*H. pylori*が存在すれば、本Nested PCR法により検出可能であった。

(2)ピロリ菌が感染中の胃がん罹患患者の口腔ピロリ菌の検出と口腔と胃ピロリ菌の相同性/同一性の解析(担当:寺井、横山、佐藤、竹中、野杵)

全ての被験者は、便中抗原検査に陽性で、胃にピロリ菌の現感染があった。Nested PCRの結果、胃ピロリ菌DNAの陽性率は胃組織100%(21/21)、胃培養細菌100%(21/21)であり全ての被験者の胃組織からピロリ菌DNAが検出された。口腔ピロリ菌DNAの

表1 部位別のピロリ菌検出率

採取部位	検出人数 (陽性/全体)	検出割合(%)
胃組織	21/21	100
胃培養細菌	21/21	100
上顎前歯	6/19	31.6
下顎前歯	5/21	23.8
上顎臼歯	6/20	30.0
下顎臼歯	6/20	30.0
唾液	7/21	33.3
舌苔	4/20	20.0

陽性者は76.2%(16/21)であった。試料部位別では、ピロリ菌陽性率は、唾液 > 上顎前歯 > 上

下顎臼歯 > 下顎前歯 > 舌苔の順で高かった(表1)。

```
840440bp          840460bp          840480bp
.....AGG.....T.....CT.T.....T.....
TGGGAATCTCGTGCTGATAGCGAAAAGAAGCGCTATTTT TAGATCATTTTT
```

図2 DNA シーケンスにより判明した変異部の抜粋

下に参考菌株の DNA 配列が羅列され、その上に変異部が表記される。これにより、DNA のどの部分で変異が起きているか確認可能である。

被験者の平均 DMFT は 18.4 ± 7.3 であった。相同性検索の結果、参考株と胃ピロリ菌 DNA は 7 万以上の変異部があることが確認された(図2)。現在、変異部を特異的に増幅するプライマーの設計を行っている。今後、口腔ピロリ DNA との相同性/同一性を検索し近縁関係を解析する予定である。

(3)口腔内持続感染を制御する新規病原因子の探索(担当:三室)

変異挿入部位の周辺 RNA 発現について、接種前の菌株との差異を解析したところ、small RNA (sRNA) HPnc4160 の発現変動が最も大きいことが明らかになった(図3)。また、野生株に比べ、発がん因子 CagA を含む 8 つの菌体因子の発現が増大することが明らかになった。モチーフ解析の結果、これらの菌体因子のうち 6 つは、機能未知の菌体外膜タンパク質であった。そこで現在、ピロリ菌のバイオフィーム形成能測定を目指して、これらの因子の欠損変異株を複製している。

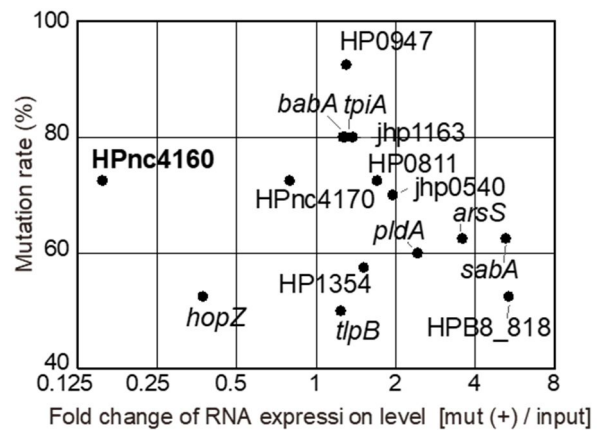


図3. スナネズミ感染8週後の胃内から単離したピロリ菌のゲノム変異率と発現変動。Y軸は胃内から単離したピロリ菌40株のうち、ゲノム変異を有する菌株の割合を、X軸は、感染前と比較した感染後の単離株でのRNA発現量を示す。

・研究業績

1. Nagata R, Ohsumi T, Takenaka S, Noiri Y.: Current Prevalence of Oral *Helicobacter pylori* among Japanese Adults Determined Using a Nested Polymerase Chain Reaction Assay. Pathogens 10, doi: 10.3390/pathogens10010010, 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nagata Ryoko, Ohsumi Tatsuya, Takenaka Shoji, Noiri Yuichiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Current Prevalence of Oral Helicobacter pylori among Japanese Adults Determined Using a Nested Polymerase Chain Reaction Assay	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pathogens10010010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永田量子、大墨竜也、磯野俊仁、Naksagoon Traithawit、鈴木裕希、長谷川泰輔、竹中彰治、野杵由一郎
2. 発表標題 Nested PCRアッセイを用いた口腔内Helicobacter pyloriの検出
3. 学会等名 日本歯科保存学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永田量子、大墨竜也、竹中彰治、野杵由一郎
2. 発表標題 Nested PCR法を用いた口腔ピロリ菌（Helicobacter pylori）の網羅的検出
3. 学会等名 新潟歯学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究 分 担 者	大墨 竜也 (Ohsumi Tatuya) (30759725)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	竹中 彰治 (Takenaka Shouji) (50313549)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	
研究分担者	三室 仁美 (Mimuro Hitomi) (80396887)	大阪大学・微生物病研究所・准教授 (14401)	
研究分担者	寺井 崇二 (Terai Souji) (00332809)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	横山 純二 (Yokoyama Junji) (70422615)	新潟大学・医歯学総合病院・准教授 (13101)	
研究分担者	佐藤 裕樹 (Sato Hiroki) (50644556)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関