

平成30年6月25日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05049

研究課題名(和文)ヘリコバクター・ピロリ菌の感染経路の特定と小児歯科領域からの胃疾患予防法の構築

研究課題名(英文) Specification of route of *Helicobacter pylori* infection and construction of preventive approaches for gastric diseases in pediatric dentistry field

研究代表者

仲野 和彦 (Nakano, Kazuhiko)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：00379083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：*Helicobacter pylori* はグラム陰性微好気性の桿菌であり、胃疾患の原因菌として知られている。*H. pylori*は、主として乳幼児期に口腔を介して感染が成立すると考えられている。本研究では、48株の*H. pylori*の全ゲノムをもとに設計したプライマーを用いて、*H. pylori*を検出するための新たなPCR法を構築した。そのPCR法を用いることにより、131症例の小児患者から採取した歯髄検体において、38.9%の割合で*H. pylori*が存在することが明らかになった。また、*H. pylori*はヒト由来の歯髄線維芽細胞に対する付着能を有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：*Helicobacter pylori*, a Gram-negative microaerophilic bacteria, is known to be a major pathogen related to gastric diseases. The oral cavity is considered to be the source of *H. pylori* infection, which is mainly acquired in early childhood. In the present study, a novel PCR system for *H. pylori* detection was constructed using primer sets designed from the complete genome information of 48 *H. pylori* strains. The bacteria were identified in 38.9% of 131 inflamed pulp specimens obtained from children using the PCR system. In addition, *H. pylori* strains showed adhesion to human dental fibroblast cells.

研究分野：歯学

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ菌 ゲノム PCR法 nested PCR法 ureA 歯髄サンプル 唾液サンプル 歯髄線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter pylori はグラム陰性微好気性の桿菌であり、胃炎や胃潰瘍、胃癌などの原因菌として知られている。*H. pylori* の感染経路の詳細は未だ不明であるが、その多くが小児期に口腔を介して感染が成立すると考えられている。胃組織に対する *H. pylori* の検出方法としては、尿素呼気試験、迅速ウレアーゼ試験、便中抗原検査、血清学的検査法および培養法などが用いられている。これまでに、消化器領域の研究者により、胃生検組織から分離された *H. pylori* を用いた研究が進められている。

口腔サンプルからの検出には PCR 法を応用した分子生物学的手法が広く応用されている。主に歯科領域の研究において、唾液やデンタルプラークサンプルから *H. pylori* の細菌 DNA が検出されることが示されている。一方で、乳歯の感染根管より *H. pylori* が分離されることが明らかになったことから、小児期の歯髄に至る重度の齲蝕病変の存在が *H. pylori* の感染成立に関わっている可能性が考えられた。

これまでに報告されている *H. pylori* の検出のための PCR 系では、16S rRNA や *vacA*、*cagA*、*glmM* (*ureC*)、*ureA* 等が標的遺伝子とされてきた。一方で、これらの検出系を用いた研究では、口腔における *H. pylori* の検出率は 0% から 100% とかなりのばらつきがあり、実際の存在頻度に対するコンセンサスが得られるに至っていない。このように、既存の方法では口腔内における正確な検出率を評価することは困難であり、*H. pylori* の感染源や感染経路の特定に関する研究の進展における妨げとなっている。

H. pylori 遺伝子の全塩基配列は、1997 年になって初めて 26695 株 [American Type Culture Collection (ATCC) 700392 株] で報告された。それ以降、分子生物学的研究は急速に発展し、現時点では約 50 株の全塩基配列がデータベース上で公開されている。しかしながら、これらの豊富なゲノムデータに着目し、多くの菌株に共通した遺伝子配列を抽出することにより *H. pylori* を正確に検出することのできる分子生物学的手法の確立はなされていなかった。

本研究では、これまでに全塩基配列が特定されている *H. pylori* 48 株で共通する塩基配列を見出し、口腔サンプルから *H. pylori* を検出するゴールドスタンダードとなるような分子生物学的手法の構築を企画立案することにした。また、若年者の口腔サンプルにおいて、特に重度の齲蝕病変部が *H. pylori* の感染成立に関与しているという仮説を立て、不可逆性歯髄炎および根尖性歯髄炎症例から採取した歯髄サンプルにおける検出を試みるという考えに至った。さらに、根管内への *H. pylori* 定着メカニズムの一端を明らかにするために、歯髄線維芽細胞への臨床分離株における附着

能の分析を行うこととした。

2. 研究の目的

- (1) 歯髄サンプルを用いた高い感度かつ高い特異度を有する *H. pylori* 検出系を構築する。
- (2) (1)の方法により、小児歯髄サンプルにおける *H. pylori* の検出頻度を特定する。
- (3) *H. pylori* 株の歯髄線維芽細胞への附着能の分析を行う。

3. 研究の方法

(1) 供試菌と培養条件

H. pylori 株として、26695 株、ATCC 51932 株、J99 (ATCC 700824) 株、ATCC 43504 株および CPY 2052 株を用いた。また、*Helicobacter pullorum* ATCC 51802 株 *Helicobacter felis* ATCC 49179 株も使用した。各株は血液寒天培地に播種し、微好気環境下にて 37 で 3 日間静置培養した。その後、培地上のコロニーを Tryptic Soy Broth にて、微好気環境下で 37 で 3~5 日間振盪培養した。

(2) *H. pylori* 検出のための PCR 法の確立

H. pylori 48 株の全塩基配列を GenBank データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 上で検索した。続いて 16S rRNA および *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://www.clustalw.ddbj.hig.ac.jp>) を用いて行った。48 株全てにおいて 20 塩基以上連続した共通配列を抽出し、*H. pylori* 検出のためのプライマーの候補となる 5 種のプライマー (*ureA*-aF/aR、*ureA*-aF/bR、*ureA*-bF/aR、*ureA*-bF/bR、*ureA*-cF/cR) を設計した。その後、*H. pylori* から抽出したゲノム DNA もしくは歯髄サンプルより抽出した細菌 DNA を鋳型とした PCR 法により、それぞれの遺伝子を増幅した。

各プライマーにおける *H. pylori* 検出の特異度の評価は、全ての *H. pylori* 株および *H. pullorum* ATCC 51802 株、*H. felis* 49179 株のそれぞれから抽出したゲノム DNA を用いて行った。また、感度の評価は、 1.0×10^5 colony forming units (CFU) / mL に調整した *H. pylori* J99 株から抽出したゲノム DNA を 10 倍連続希釈したものを PCR 法に用いることにより検討した。

(3) *H. pylori* 検出のための Nested PCR 法の確立

H. pylori 検出系の検出感度をさらに上げるため、*H. pylori* 検出のための Nested PCR 法を確立した。1 度目の PCR (Single PCR) ではプライマー *ureA*-aF と *ureA*-bR を用いて行い、2 度目の PCR (Nested PCR) では 1 度目の PCR による増幅産物を鋳型とし

て、1 度目のプライマーの配列の内側に位置するプライマーである ureA-bF と ureA-aR を用いて行った。

(4) 口腔サンプルからの *H. pylori* の検出

本研究は、大阪大学大学院歯学研究科倫理委員会の承認のもと、保護者の同意を得た上で、不可逆性歯髄炎および根尖性歯周炎サンプルおよび唾液サンプルを採取した。不可逆性歯髄炎および根尖性歯周炎サンプルは 2013 年 2 月から 2016 年 2 月までの期間に大阪大学歯学部附属病院小児歯科を受診し、重度齲蝕 (114 症例) または外傷 (17 症例) が原因となって不可逆性歯髄炎または根尖性歯周炎に陥り、根管治療を受けた 94 名 (1~19 歳) の患者から 131 サンプルを採取した。そのうち 101 サンプルは乳歯から、30 サンプルは永久歯から採取した。また全サンプル中には、同一患者において異なる歯の根管より採取したサンプルを含み (18 名、55 歯) それぞれ異なるサンプル番号を付与した。

131 サンプル中 20 サンプルに関しては、異なる来院日に同一歯よりさらにサンプル採取を行った。20 サンプルは全て歯肉膿瘍の形成を伴う感染根管より採取した。まず、感染根管治療開始時に、排膿のため根管開放した際に 1 度目のサンプル採取を行った。次に、2 度目の根管治療のための来院時に 2 度目のサンプル採取を行った (20 症例)。1 度目と 2 度目に採取されたそれぞれのサンプルから *H. pylori* の検出を試み、それらの検出率を比較した。

不可逆性歯髄炎および根尖性歯周炎サンプルは、滅菌インスツルメントを用いて採取し、滅菌生理食塩水の入ったプラスチック管に保存した。唾液サンプルは、水で含嗽を行った後、滅菌プラスチック管に採取した。両サンプルは採取後氷上で保管した後、分析に使用した。前述の方法を用いて各サンプルから細菌 DNA を抽出し、本研究で作製した *H. pylori* 検出のための新規 PCR 法を用いて *H. pylori* の検出を行った。

(5) 歯髄線維芽細胞への *H. pylori* の付着能の分析

歯髄線維芽細胞は大阪大学大学院歯学研究科倫理委員会承認後、大阪大学歯学部附属病院にて矯正治療上の理由で便宜抜髄となった下顎左側乳犬歯から保護者の同意を得て採取した。この歯髄線維芽細胞を培養後 1.0×10^5 に調整し、 1.0×10^6 CFU に調整した *H. pylori* 26695 株、J99 株、ATCC 51932 株をそれぞれ感染させた。1.5 時間培養後メディアムを取り除き、感染した細胞を PBS にて洗浄し滅菌蒸留水を加え細胞を破碎させた。続いて、段階希釈した細胞溶解液を血液寒天培地に播種し、微好気的環境下で 37 °C、3 日間静置培養し、歯髄線維芽細胞への *H. pylori* 付着菌数を算出した。

4. 研究成果

(1) 新規 *H. pylori* 検出プライマーの作製

全ゲノムが決定している *H. pylori* 48 株における遺伝子の多重配列分析により、20 塩基以上共通した配列は vacA および cagA では 1 か所も認められなかったが、16S rRNA および glmM では 1 か所認められた。一方で、ureA では 20 塩基以上共通した配列を 6 か所認めたため、これらの共通配列を利用し、約 300~500bp の PCR の増幅産物が得られる 5 種類のプライマー (ureA-aF/aR, ureA-aF/bR, ureA-bF/aR, ureA-bF/bR, ureA-cF/cR) を作製した。5 種類のプライマーを用いて PCR を行い、得られた遺伝子断片のシーケンスを行ったところ、全ての *H. pylori* 株から得られた遺伝子断片において ureA 遺伝子断片に相当する遺伝子の増幅を認めた。一方、*H. pullorum* ATCC 51802 株および *H. felis* ATCC 49179 株においてはそのような遺伝子の増幅は認めなかった。以上のことから、これら 5 種類のプライマー全てが *H. pylori* 検出のために十分な特異度を有することが示された。さらに、全てのプライマーにおいて約 1~10 CFU という高い検出感度を示した。本研究では、作製したプライマーのうち ureA-aF/ureA-aR プライマーを Single PCR 法として用いることとした。

(2) 新規 *H. pylori* 検出プライマーの感度および特異度の検討

培養した *H. pylori* J99 株から抽出したゲノム DNA を鋳型とした場合、Single PCR および Nested PCR とともに約 1~10 CFU の検出感度を示した。しかし、連続希釈した既知の細菌数の *H. pylori* を根尖性歯周炎サンプルに加えた上で抽出した細菌 DNA を鋳型とした場合には、Single PCR における検出感度は $10^2 \sim 10^3$ CFU に低下した。一方で、Nested PCR においては検出感度は 1~10 CFU に維持された。他の根尖性歯周炎サンプルを用いて分析を行った場合にも、Single PCR および Nested PCR とともに同様の結果となった。さらに、連続希釈した既知の細菌数の *H. pylori* を非感染歯髄サンプルに加えた上で抽出した細菌 DNA を鋳型とした場合、Single PCR および Nested PCR とともに約 1~10 CFU の検出感度を示した。しかし、Single PCR で認められたバンドは、培養したゲノム DNA を鋳型とした Single PCR で認められたものよりも薄いことが確認された。他の非感染歯髄サンプルを用いて分析を行った場合にも、Single PCR および Nested PCR とともに同様の結果となった。

(3) 口腔サンプルからの *H. pylori* の検出

不可逆性歯髄炎および根尖性歯周炎サンプルについて、Single PCR を用いた場合には、131 サンプル中 4 サンプルより *H.*

pylori が検出され (3.1%)、これらのサンプル中には $10^2 \sim 10^3$ CFU 以上の H. pylori が存在することが示された。一方で、Nested PCR では 51 サンプル (38.9%) より H. pylori が検出され、これらのサンプル中には 1~10 CFU 以上の H. pylori が存在することが示唆された。Nested PCR において得られた H. pylori の検出率は、Single PCR における検出率と比較して有意に高い値を示した。さらに、複数歯よりサンプルを採取した患者のうち、全ての歯より H. pylori が検出された患者は認められなかった。一方、唾液サンプルについて Nested PCR を用いて分析を行った結果、1 サンプルのみ H. pylori に陽性反応を示した (2.5%)。

同一歯より 2 度サンプル採取した 20 サンプルでは、1 度目のサンプル採取において 8 サンプルより H. pylori が検出され、そのうち 7 サンプルでは 2 度目のサンプル採取においても H. pylori が検出された。一方で、1 度目のサンプル採取において H. pylori が検出されなかった 12 サンプルのうち、1 サンプルからのみ 2 度目のサンプル採取にて H. pylori が検出された。1 度目のサンプル採取にて H. pylori が検出されたサンプルは、1 度目のサンプル採取において H. pylori が検出されなかったサンプルと比較して、2 度目のサンプル採取における H. pylori の検出率は有意に高い値を示した。

齶蝕が原因で根管治療を行ったサンプルと外傷が原因で根管治療を行ったサンプルの間での H. pylori の検出率を比較したところ、両者間に有意差は認めなかった。また、乳歯の由来サンプルと永久歯の由来サンプルの間においても H. pylori の検出率に有意差を認めなかったものの、乳歯の由来サンプルにおいて高い傾向を認めた。

(4) 歯髄線維芽細胞への H. pylori 付着能の検討

3 種の H. pylori 株において歯髄線維芽細胞へ約 $3.0 \sim 9.0 \times 10^3$ CFU 程度の菌付着が認められた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Ogaya Y, Nomura R, Watanabe Y, Nakano K. Detection of Helicobacter pylori DNA in inflamed dental pulp specimens from Japanese children and adolescents. J Med Microbiol 査読有 64: 117-123, 2015.
doi: 10.1099/jmm.0.079491-0.

[学会発表](計 3 件)

Ogaya Y, Nomura R, Nakano K.

Helicobacter pylori detected in oral specimens and investigation of dental pulp fibroblast cell adhesion and invasion. The 25th Congress of the International Association of Pediatric Dentistry, July 1-4, 2015, Glasgow, UK.

Ogaya Y, Nomura R, Matsui D, Watanabe I, Koyama T, Miyatani F, Iwai K, Ozaki E, Kuriyama N, Watanabe Y, Nakano K. Distribution of Helicobacter pylori in dental plaque from Japanese children and adults. The 93rd General Session of the International Association for Dental Research. June 22-25, 2016, Seoul, Korea.

Ogaya Y, Nomura R, Morita Y, Nakano K. Molecular and clinical analyses of Helicobacter pylori colonization of inflamed dental pulp, 65th Annual Meeting of the Japanese Division of the International Association for Dental Research, November 18, 2017, Tokyo.

[図書](計 1 件)

野村良太, 仲野和彦 小児歯科領域からの胃疾患予防法構築を目指したヘリコバクター・ピロリ菌の感染経路の検討 BIO Clinica 6(3): 132-138, 2017.

[その他]

ホームページ等

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~pedo/research/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲野 和彦 (NAKANO, Kazuhiko)
大阪大学・歯学研究科・教授
研究者番号: 0 0 3 7 9 0 8 3

(2) 研究分担者

野村 良太 (NOMURA, Ryota)
大阪大学・歯学研究科・准教授
研究者番号: 9 0 4 3 7 3 8 5

大川 玲奈 (OKAWA, Rena)
大阪大学・歯学部附属病院・講師
研究者番号: 8 0 4 3 7 3 8 4

仲 周平 (NAKA, Shuhei)
岡山大学・大学病院・講師
研究者番号: 1 0 5 8 9 7 7 4

(3) 連携研究者

渡辺 能行 (WATANABE, Yoshiyuki)
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研

究院)・教授
研究者番号：00191809