

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17252

研究課題名（和文）歯科領域からのピロリ菌の母子伝播の可能性の検討と口腔-胃連関動物モデルの構築

研究課題名（英文）Dental field investigation of possible mother-child transmission of Helicobacter pylori and construction of oral-gastric linkage animal model

研究代表者

鋸屋 侑布子（OGAYA, Yuko）

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：40803078

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、口腔検体およびラットモデルにおいて、ピロリ菌の母子伝播の可能性の検討および口腔-胃連関動物モデルの構築を試みた。その結果、母子両方からの口腔検体でピロリ菌の存在を確認できたペアが存在し、母子感染の可能性が示唆された。また、ラット齲蝕モデルに対してピロリ菌を感染させることにより、口腔からのピロリ菌の検出および胃粘膜へのピロリ菌の侵入、胃・十二指腸組織への傷害が確認できる口腔-胃連関動物モデルの構築に成功した。本動物モデルを用いて検討を行った結果、齲蝕の存在がピロリ菌が口腔へ定着するためのリスク因子となるとともに、胃・十二指腸傷害へも影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、口腔-胃連関動物モデルの構築に成功するとともに、その動物モデルを用いて検討した結果、齲蝕の存在とピロリ菌感染が関連している可能性について初めて報告した。本動物モデルを応用し、齲蝕とピロリ菌感染および胃・十二指腸組織傷害の関連についてさらなる研究が進めば、乳幼児期からの齲蝕を予防することがピロリ菌の胃への感染成立を防止し、関連する胃・十二指腸疾患発症の予防につながるという知見が得られる可能性があり、大変意義深いものであると考えている。

研究成果の概要（英文）：This study was conducted by dental field researchers to investigate the possibility of mother-to-child transmission of Helicobacter pylori as well as construction of an oral-gastric linked rat model. The presence of H. pylori was confirmed in specimens from some of the examined mother-child pairs, suggesting the possibility of mother-child infection. In addition, inoculation of H. pylori in a caries-induced rat model successfully resulted in an oral-gastric linked rat model. In the model rats, detection of H. pylori in the oral cavity, invasion of H. pylori into gastric mucosa, and gastric/duodenal tissue injury were confirmed. These results indicate that dental caries presence is a possible risk factor for H. pylori colonization in the oral cavity and has effects on gastroduodenal injury.

研究分野：歯学

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ菌 口腔-胃連関 動物モデル 齲蝕 胃疾患

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter pylori は、らせん型のグラム陰性桿菌であり、胃潰瘍や胃がんの原因菌となることが知られている。*H. pylori* の感染経路の詳細は未だ示されておらず不明なままではあるものの、乳幼児期に口腔を介して成立すると推定されている。その感染経路として、衛生環境が整備されていなかった時代には *H. pylori* に汚染された水や食物の摂取により感染すると考えられていた。衛生環境が整備されている現代では *H. pylori* への感染率自体が減少してはいるものの、未だに新たな感染者が存在する。この感染経路の一つとして乳幼児と最も密に接する母親からの感染を疑い、母子伝播の可能性について検討することにした。

また、*H. pylori* の口腔からの感染メカニズムの一端を明らかにするために、口腔-胃関連動物モデルの確立に取り組むこととした。これまでも *H. pylori* を口腔から感染させ、胃炎を生じさせた動物モデルが存在するが、このモデルは医科領域において確立されたものであり、小児期の口腔からピロリ菌が感染する現象を再現したものとは言い難い。これまでに、口腔に存在する *H. pylori* を検出するための高い検出感度と特異性を有する分子生物学的手法を確立し、小児口腔内において *H. pylori* は歯髄に達した齶蝕を有する根管内から検出されることを示した。そこで、人工的に齶蝕を発生させて動物モデルに *H. pylori* を感染させることで口腔への定着および胃への定着、胃炎の発症を検討するモデルの構築を目指すこととした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*H. pylori* の母子感染の可能性を検討するとともに、人工的に齶蝕を発生させた動物モデルに *H. pylori* を感染させることで、口腔および胃へ *H. pylori* の定着や胃炎の発症を検討する口腔-胃関連動物モデルを構築することである。

3. 研究の方法

(1) ヒト口腔サンプルにおけるピロリ菌の検出

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行った(承認番号:H27-E17-1、H30-E32)。大阪大学歯学部附属病院小児歯科を受診し、同意が得られた小児患者8名から根管サンプルおよび口腔サンプル(デンタルプラークおよび唾液)を採取した。さらにその母親7名からも同様に、同意が得られた対象から口腔サンプルを採取するとともに、胃疾患に関する問診を行った。これらのサンプルから細菌DNAを抽出した後、これまでに独自に確立した信頼性の高いPCR検出系を用いた分析により *H. pylori* の存在を検討した。

(2) 口腔-胃関連動物モデルの構築および検討

①動物モデルの構築

本研究はアメリカ国立衛生研究所および AERI-BBRI 動物実験委員会のガイドラインに従い、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認を得て行った(承認番号;29-031-0)。

18日齢のラットに対して齶蝕原性細菌である *Streptococcus mutans* を口腔より5日間連続投与するとともに、齶蝕誘発性飼料を与えて1か月(48日齢)または2か月(78日齢)飼育することで、人工的に齶蝕を発生させたラット齶蝕モデルを作製した。作製したそれぞれのラット齶蝕モデルに対して、*H. pylori* を口腔より5日間連続投与し1か月飼育する共感染群を作製した。同様に、*S. mutans* を感染させず *H. pylori* のみを48日齢時または78日齢時に感染させる群、*H. pylori* を感染させず18日齢時に *S. mutans* のみを感染させる群および細菌を感染させない非感染群を作製した。各群はそれぞれ82日齢または112日齢時に屠殺し、顎骨および胃・十二指腸組織を摘出した。

②口腔への細菌の定着評価

S. mutans を感染させた群に対し、感染1週間後にラットの臼歯部よりデンタルプラークを採取し、*S. mutans* 培養のための選択培地であるミティスサリバリウス寒天培地に播種した。37°Cで48時間、嫌気条件下で培養した後、寒天培地上のコロニー形態を観察し、*S. mutans* の定着を評価した。

屠殺したラットから摘出した顎骨からデンタルプラークを採取し抽出した細菌DNAを、こ

れまでに独自に確立した信頼性の高い PCR 検出法を用いて *H. pylori* の存在を評価した。

③胃および十二指腸の組織学的評価

摘出した胃および十二指腸組織を固定し、組織切片を作製してヘマトキシリンエオジン染色を行った。これらの切片を顕微鏡にて観察し、国際毒性病理用語・診断基準統一化委員会が定める基準を参考にして組織学的評価を行った。また、観察により胃粘膜に細菌の侵入を認めた切片に対し、*H. pylori* 特異的に反応する抗 *H. pylori* ポリクローナル抗体を一次抗体、ヒストファイニンシンプルステインラット MAX-PO を二次抗体として用いた免疫組織染色を行った。

4. 研究成果

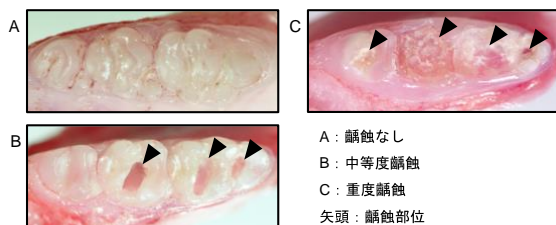
(1) ヒト口腔サンプルにおけるピロリ菌の検出

採取された患児 8 名の口腔サンプルの中で、4 名のサンプルから *H. pylori* が検出された。そのうち、3 名の母親 2 名の口腔サンプルからも *H. pylori* が検出された。しかしどちらの母親も *H. pylori* 検査を受けた経験はなく、胃への *H. pylori* 感染に関しては不明であった。*H. pylori* 陽性であった口腔サンプルのうち、残り 1 名の母親からは *H. pylori* は検出されなかったものの、患児の祖父に *H. pylori* 感染の既往があることが分かった。これらのことから、小児への *H. pylori* の感染経路として家族からの感染が疑われる結果となった。今後も口腔サンプルの採取を続けてサンプル数を増やし、より明確に家族内感染の有無について検討を行いたいと考えている。

(2) 動物モデルにおける検討

①口腔からの細菌の検出および齶蝕状態の評価

ラット口腔から採取したデンタルプラークから、*S. mutans* を感染させた全ての群において *S. mutans* が検出され、感染させていない群からは検出されなかった。一方で、*H. pylori* は *S. mutans* とともに感染させた共感染群からのみ検出され、*H. pylori* のみを単独で感染させた *H. pylori* 群からは検出されなかった。

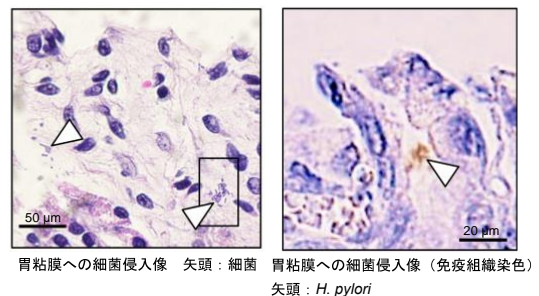


ラットから摘出した顎骨の歯牙について齶蝕状態の評価を行ったところ、齶蝕を認めないもの、歯髄には達していない中等度の齶蝕を認めるもの、歯髄に達した重度の齶蝕を認めるものそれぞれが観察された（左図）。共感染群のラットにおいて、細菌を感染させていない非感染群および *H. pylori* 群と比較して、中等度以

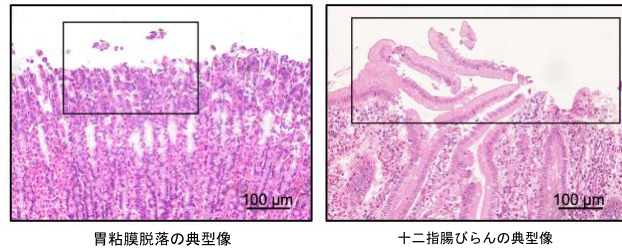
上の齶蝕歯の平均本数が有意に多く認められた。

②胃・十二指腸組織の組織学的評価

48 日齢時に *H. pylori* を感染させた共感染群ラットの 90%において、胃粘膜への細菌の侵入像を認めた。一方で、78 日齢時に *H. pylori* を感染させた共感染群を含めたそのほかのすべての群においては、同様の細菌侵入は認めなかった。侵入した細菌に対し、*H. pylori* 特異的に反応する特異抗体を用いた免疫組織染色を行ったところ、陽性反応を示したことから *H. pylori* であることが確認された（右図）。



続いて、ラットより摘出した胃および十二指腸に対してそれぞれの組織における病態のスコアを算出した。その結果、胃粘膜組織においては、齶蝕誘発後 1 か月または 2 か月で *H. pylori* を感染させた共感染群とともに、その他の群と比較して高い胃粘膜脱落スコアを示した。また、それ以外に角化嚢胞像や上皮の過角化像、腸上皮化生像、炎症性細胞の浸潤、限局性びらん像を認めるラットが存在したが、それぞれの項目において各グループ間のスコアに有意差は認められなかった。十二指腸組織においては、齶蝕誘発後 1 か月で *H. pylori* を感染させた共感染群において、その他の群と比較して有意に高い十二指腸びらんスコアを示した。一方で、十二指腸組織においては、びらん以外の病態は認められなかった。



以上の結果から、ラット齶蝕モデルを利用した *H. pylori* の感染モデルの構築に成功したことを確認した。さらに同モデルにおいて、口腔からの *H. pylori* の検出および胃粘膜組織における *H. pylori* の組織侵入像および胃・十二指腸組織への傷害を確認することができたことから、口腔-胃連関動物モデルの構築にも成功したといえる。本動物モデルを用いた検討により、*H. pylori* と *S. mutans* を共感染させた群においてのみ口腔内における *H. pylori* の存在を確認できた。さらに、同群ではその他の群と比較してより齶蝕の程度が重度であることが分かった。このことから、*S. mutans* と *H. pylori* がともに存在している場合、その相互作用により *H. pylori* の口腔内への定着および口腔細菌の病原性の両者に影響を及ぼすことが示唆された。加えて、共感染群では胃および十二指腸組織の傷害程度がその他の群と比較して高い傾向を示した。これらの結果から、齶蝕の存在は *H. pylori* が口腔へ定着するための重要なリスク因子になるとともに、胃・十二指腸傷害へも影響をおよぼすことが示唆された。

これまでにも、齶蝕と *H. pylori* の関連に焦点を当てた報告は存在するが、それらはヒトを対象とした疫学的調査が多く、動物モデルを用いて検討を加えたものはない。本研究は、口腔-胃連関動物モデルの構築に成功し、齶蝕と *H. pylori* 感染が関連している可能性について初めて報告するものである。本動物モデルを応用し、齶蝕と *H. pylori* 感染および胃・十二指腸組織傷害の関連についてさらなる研究が進めば、乳幼児期からの齶蝕を予防することが *H. pylori* の胃への感染成立を防止し、関連する胃・十二指腸疾患発症の予防につながるという知見が得られる可能性があり、大変意義深いものであると考えている。今後は、本動物モデルを応用して *H. pylori* 感染時期の違いや齶蝕重症度による *H. pylori* 定着の違い、*H. pylori* 感染後の飼育期間の違いによる胃・十二指腸組織の傷害程度の違いなどさらに詳細な分析を行っていきたいと考えている。

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 1件）

1. 著者名 Hamada M, Nomura R, Ogaya Y, Matayoshi S, Kadota T, Morita Y, Uzawa N and Nakano K	4. 巻 9
2. 論文標題 Potential involvement of Helicobacter pylori from oral specimens in overweight body-mass index	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4845
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-41166-5	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 -

1. 著者名 Kadota T, Ogaya Y, Hatakeyama R, Nomura R, Nakano K	4. 巻 107
2. 論文標題 Comparison of oral flora before and after triple therapy for Helicobacter pylori eradication in patient with gastric disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Odontology	6. 最初と最後の頁 261 ~ 267
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10266-018-0393-y	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 門田珠実, 鋸屋侑布子, 畠山理那, 野村良太, 仲野和彦
2. 発表標題 Helicobacter pylori の除菌療法を受けた十二指腸潰瘍患者の口腔内細菌叢に関する検討
3. 学会等名 第56回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kadota T, Ogaya Y, Matayoshi S, Morita Y, Hamada M, Nomura R, Uzawa N and Nakano K
2. 発表標題 Association of Helicobacter pylori in the oral cavity with overweight
3. 学会等名 The 66th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kadota T, Ogaya Y, Nomura R, Nakano K
2. 発表標題 Evaluation fo Helicobacter pylori colonization periods in caries-induced rats
3. 学会等名 The 4th Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kadota T, Ogaya Y, Nomura R, Nakano K
2. 発表標題 Influence of Helicobacter pylori colonization in oral cavity on gastric mucosa
3. 学会等名 The 27th International Association of Pediatric Dentistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kadota T, Ogaya Y, Nomura R, Nakano K
2. 発表標題 Helicobacter pylori colonization in rats with induced caries
3. 学会等名 The 97th General Session of the International Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 門田珠実、又吉紗綾、鋸屋侑布子、野村良太、仲野和彦
2. 発表標題 Helicobacter pylori の口腔内における局在と齲蝕罹患との関連性の検討
3. 学会等名 第57回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ogaya Y, Kadota T, Nomura R, Nakano K
2. 発表標題 Dental caries accelerates Helicobacter pylori colonization in oral cavity
3. 学会等名 The 98th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research (国際学会)
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
--	---------------------------	-----------------------	----