

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18778

研究課題名（和文）ピロリ菌感染メカニズムにおける齲蝕の関与についての検討

研究課題名（英文）Investigation of involvement of dental caries in Helicobacter pylori infection mechanism

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、ヒト口腔内における齲蝕の存在とピロリ菌の口腔への定着との関連を検討するとともに、齲蝕原性細菌であるミュータンスレンサ球菌により形成されるバイオフィームとピロリ菌定着との関係を検討した。その結果、未処置齲蝕歯を有する被験者において、未処置齲蝕を有しない被験者と比較して有意に高いピロリ菌検出率を認めた。また、歯面上に形成されるミュータンスレンサ球菌を含むバイオフィームは口腔内へのピロリ菌定着のリスク因子となることが示唆された。以上の結果から、齲蝕およびミュータンスレンサ球菌の存在はピロリ菌の口腔内への定着に關与する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

本研究によって、齲蝕およびその原因菌であるミュータンスレンサ球菌の存在がピロリ菌の口腔内への定着に關与する可能性を示唆された。今後さらに本研究を進め、齲蝕を含めた口腔衛生環境とピロリ菌定着の關連が明らかになれば、乳幼児期から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、關連する胃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 to investigate the relationship between the presence of dental caries and colonization of Helicobacter pylori in the human oral cavity. In addition, the relationship between biofilms formed by colonization of Streptococcus mutans, cariogenic bacteria, and H. pylori was examined. The detection rate of H. pylori was significantly higher in subjects with as compared to those without untreated dental caries. In addition, biofilm containing S. mutans formed on tooth surfaces was found to be a risk factor for H. pylori colonization in the oral cavity. These results suggest that the presence of dental caries together with S. mutans in the oral cavity may be a risk factor for H. pylori colonization.

研究分野：歯学

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ菌 齲蝕

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter pylori は、らせん状のグラム陰性微好気性桿菌であり、胃潰瘍や胃がんといった胃疾患の原因菌であることが知られている。*H. pylori* の感染は、乳幼児期に口腔を介して成立すると考えられているが、その詳細な感染経路は未だ示されておらず、不明なままである。胃からの *H. pylori* の検出には、尿素呼気試験や *H. pylori* 抗体測定といった内視鏡を用いない非侵襲的な手法と、迅速ウレアーゼ試験や培養法といった内視鏡を用いる侵襲的な手法が用いられてきた。分子生物学的手法の発展とともに、分子生物学的手法を用いて口腔からの *H. pylori* の検出を試みる論文が多数報告されるようになったものの、これらの検出頻度にはかなりのばらつきがあり、正確な検出頻度に対するコンセンサスが得られていなかった。そこで申請者らは、約 50 株の *H. pylori* の全ゲノムデータを利用して全ての *H. pylori* 菌株に共通した遺伝子配列を利用した高い特異性および感度を有した *H. pylori* 検出法を確立した。その手法を用いて、*H. pylori* が小児口腔内の感染根管にある一定期間局在する可能性を示した。一方で、*H. pylori* が感染を成立すると考えられる乳幼児期に重度に齲蝕が進んで生じる感染根管を有している乳幼児は減少していることから、齲蝕の存在自体と *H. pylori* 感染の関連性の可能性を考えた。そこで、申請者らは齲蝕誘発ラットに *H. pylori* を経口感染させることにより構築した *H. pylori* 感染ラット齲蝕モデルを用いて、齲蝕の存在が *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可能性を見出した。本研究では、ヒト口腔内における *H. pylori* の存在および齲蝕の関連について検討を加えることとした。また、*H. pylori* の口腔への定着メカニズムの一端を明らかにするため、齲蝕の原因菌である *Streptococcus mutans* により形成されるバイオフィームと *H. pylori* の口腔への定着との関係を検討することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト口腔内における齲蝕の存在と *H. pylori* の口腔への定着との関連を検討するとともに、齲蝕原性細菌である *S. mutans* により形成されるバイオフィームと *H. pylori* 定着との関係を検討することである。

3. 研究の方法

(1) ヒト口腔サンプルにおける *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行った(承認番号: 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 20 名(4 歳~12 歳)から口腔サンプル(根管サンプルおよび唾液、デンタルプラーク)を採取するとともに、胃疾患に関する問診を行った。さらに、重度の齲蝕や歯周炎などの理由で抜歯が必要となったため同附属病院口腔外科 2 (修復系)を受診し、同意が得られた成人患者 84 名(20 歳~80 歳)において、唾液および抜去歯を提供いただくとともに胃疾患に関する問診を行った。抜去歯は 10mL の滅菌生理食塩水にて保存し、速やかに研究室へ運んだ後に超音波洗浄器にて 10 分間超音波処理することで、歯に付着したデンタルプラークを採取した。得られたそれぞれの口腔サンプルから細菌 DNA を抽出した後に、これまでに独自に確立した信頼性の高い Nested PCR 法を用いて *H. pylori* の存在の有無を検討した。また、全被検者の齲蝕経験歯数を視診およびレントゲン診査により算出した。

(2) *S. mutans* および *H. pylori* のバイオフィーム形成能の分析

1%スクロース含有 BHI 液体培地にて *H. pylori* および *S. mutans* 菌液をそれぞれ 1.0×10^7 CFU/ml となるよう調整した。調整した菌液 200 μ l を、*S. mutans* 単独で培養するもの、*H. pylori* 単独で培養するもの、*S. mutans* および *H. pylori* を共培養させるものに分けてチャンバースライドに加え、微好気環境下において 37 °C で 18 時間培養した。培養後、浮遊している細菌を洗浄し、形成されたバイオフィームを 3%パラホルムアルデヒドにより 10 分間固定した。*S. mutans* および *H. pylori* をそれぞれの特異抗体を用いて蛍光免疫染色を行った後に、共焦点レーザー顕微鏡を使用して形成されたバイオフィームを観察した。

4. 研究成果

(1) ヒト口腔サンプルにおける *H. pylori* の検出

採取された成人被験者 84 名の口腔サンプルのうち 25 名から *H. pylori* が検出され (29.8%)、小児被験者 20 名からは 8 名において検出された (40.0%)。

H. pylori 検出の有無で比較した被験者の特徴を下表に示す。成人被験者では、*H. pylori* 陽性患者は陰性患者よりも平均年齢が高い傾向を示した。一方で、小児被験者においては *H. pylori* 陽性患者は陰性患者よりも平均年齢が低い傾向を示したものの、有意な差は認めなかった。

表1 成人被験者および小児被験者における特徴

成人被験者	<i>H. pylori</i> 陰性 (n=59)	<i>H. pylori</i> 陽性 (n=25)
年齢 (平均 \pm 標準偏差)	35.0 \pm 15.4	38.8 \pm 18.7
性別 (男性 : 女性)	23 : 36	10 : 15
胃疾患の既往あり (%)	5 (8.5%)	3 (12.0%)
胃における <i>H. pylori</i> 感染の診断歴あり (%)	7 (11.9%)	3 (12.0%)
胃における <i>H. pylori</i> 除菌経験あり (%)	6 (10.2%)	3 (12.0%)
小児被験者	<i>H. pylori</i> 陰性 (n=13)	<i>H. pylori</i> 陽性 (n=7)
年齢 (平均 \pm 標準偏差)	8.6 \pm 2.5	6.7 \pm 2.2
性別 (男性 : 女性)	7 : 6	5 : 2
家族内に胃への <i>H. pylori</i> 感染既往者あり (%)	2 (15.4%)	3 (42.9%)

成人被験者において、胃疾患の既往、胃における *H. pylori* 感染の診断および除菌経験と口腔 *H. pylori* の存在の有無の間に差は認めなかった。小児患者においては、胃疾患の既往、胃における *H. pylori* 感染の診断および除菌経験のあるものは認めなかった。

H. pylori が検出された小児患者のうち、3 名で家族内に胃への *H. pylori* 感染の既往があり、*H. pylori* が検出されなかった患者と比較して多い傾向を認めたが、有意な差は認めなかった。

成人被験者において、口腔内に未処置齲蝕歯を有しない 50 名のうち 10 名 (20.0%) から採取した口腔サンプルより *H. pylori* が検出された。一方で、口腔内に未処置齲蝕歯を 1 歯以上有する被験者 34 名のうち 15 名 (44.1%) が *H. pylori* 陽性であり、口腔内に未処置齲蝕歯を有しない被験者と比較して有意に高い検出率を認めた ($p < 0.05$) (右図)。小児被験者においては、齲蝕経験歯数が 4 歯以下の 9 名のうち 1 名 (11.1%) から採取した口腔サンプルにおいてのみ *H. pylori* が検出された。齲蝕経験歯数が 5 歯以上の小児被験者 11 名のうち 6 名 (54.5%) から *H. pylori* が検出され、4 歯以下の被験者より *H. pylori* の検出率が高い傾向を示した。以上の結果から、齲蝕の存在は口腔内でのピロリ菌の存在に關与する可能性が示唆された。今後も様々な年齢および口腔状態を対象として口腔サンプル採取を継続し、サンプル数を増やして分析を加えていきたいと考えている。

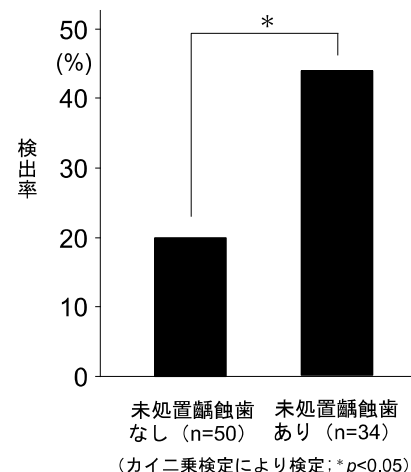


図1 未処置齲蝕歯の有無による *H. pylori* 検出率の比較

(2) *S. mutans* および *H. pylori* のバイオフィーム形成能の分析

バイオフィームを横断面から二次元的に観察したところ、1%スクロース含有 BHI 液体培地を用いた *H. pylori* の単独培養および *S. mutans* と *H. pylori* の共培養の両方で *H. pylori* の存在

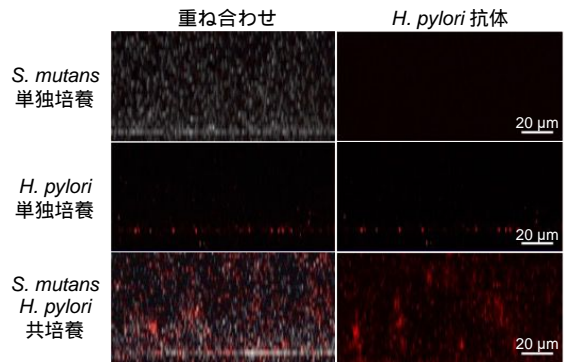


図2 共焦点走査型レーザー顕微鏡像（バイオフィームを側面より観察）
白：*S. mutans* 赤：*H. pylori*

が確認された。一方で、形成されたバイオフィームを側面から観察すると、*H. pylori* の単独培養では単相で希薄なバイオフィームが形成されるに留まったが、*S. mutans* および *H. pylori* を共培養した場合には *H. pylori* がより多量に分布していることが確認された（左図）。さらに、チャンバースライド内において *H. pylori* が占める菌量の割合は、*S. mutans* および *H. pylori* をそれぞれ単独培養した場合と比較して

S. mutans と *H. pylori* を共培養した場合に有意に高い割合を示した ($p < 0.001$)。以上の結果から、歯面上に形成されるミュータンスレンサ球菌を含むバイオフィームは、口腔内へのピロリ菌定着のリスク因子となる可能性が示唆された。

以上の結果から、齲蝕およびその原因菌であるミュータンスレンサ球菌の存在がピロリ菌の口腔内への定着に関与する可能性が示唆された。今後さらに本研究を進めることにより、齲蝕を含めた口腔衛生環境とピロリ菌定着の関連が明らかになれば、乳幼児期から齲蝕を予防することがピロリ菌の感染成立を防止し、関連する胃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。

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 2件）

1. 著者名 Kadota Tamami, Hamada Masakazu, Nomura Ryota, Ogaya Yuko, Okawa Rena, Uzawa Narikazu, Nakano Kazuhiko	4. 巻 8
2. 論文標題 Distribution of Helicobacter pylori and Periodontopathic Bacterial Species in the Oral Cavity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 161 ~ 161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines8060161	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 Nomura Ryota, Kadota Tamami, Ogaya Yuko, Matayoshi Saaya, Iwashita Naoki, Okawa Rena, Nakano Kazuhiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Contribution of Streptococcus mutans to Helicobacter pylori colonisation in oral cavity and gastric tissue	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12540
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-69368-2	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kadota T, Ogaya Y, Nomura R, Nakano K
2. 発表標題 Effects of Helicobacter pylori infection in caries-induced rats.
3. 学会等名 The 68th Conference of Japanese Association of 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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------