

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10184

研究課題名（和文）小児期のう蝕および口腔内環境に着目したピロリ菌定着の予防法追究に対する新戦略

研究課題名（英文）New strategies for the prevention of Helicobacter pylori colonization focusing on childhood dental caries and oral environment

研究代表者

野村 良太（Nomura, Ryota）

広島大学・医系科学研究科（歯）・教授

研究者番号：90437385

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）：ヘリコバクター・ピロリ菌は、消化器疾患の原因細菌として知られており、乳幼児期に口腔を介して感染すると考えられている。本研究では、異なる部位の歯からピロリ菌の検出を行うとともに、免疫性血小板減少性紫斑病患者とパーキンソン病患者の口腔からピロリ菌の検出を試みた。分析の結果、萌出している歯牙だけでなく埋伏した智歯からもピロリ菌が検出され、マイクロバイオームの包括的な分析によってピロリ菌の陽性者ではポルフィロモナス属が多く存在することが明らかとなった。また、免疫性血小板減少性紫斑病患者やパーキンソン病患者の口腔からもピロリ菌が検出され、ピロリ菌がこれらの全身疾患に関与してい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

ヘリコバクター・ピロリ菌が埋伏智歯から検出されたことから、感染を生じた智歯を抜歯することはピロリ菌を減らすことに有効であると考えられた。また、マイクロバイオームの包括的な分析によって、ピロリ菌の陽性者から主要な歯周病原性細菌として知られるポルフィロモナス属が検出されたことから、歯周病の予防がピロリ菌の定着予防にも有効である可能性が示唆された。また、免疫性血小板減少性紫斑病患者やパーキンソン病患者において消化器のピロリ菌が影響を及ぼすとされているが、これらの患者の口腔からもピロリ菌が検出されたことから、口腔内を健全に保つことはこれらの全身疾患の改善に有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Helicobacter pylori is a bacterium that causes digestive diseases and is thought to be transmitted through the oral cavity during infancy. In the present study, we detected H. pylori in teeth from different locations and in the oral cavity of patients with immune thrombocytopenic purpura and Parkinson's disease. As a result of the analyses, H. pylori was detected not only in erupted teeth but also in impacted third molar, and a comprehensive analysis of the microbiome revealed that the genus Porphyromonas was abundant in H. pylori-positive subjects. H. pylori was also detected in the oral cavity of patients with immune thrombocytopenic purpura and Parkinson's disease, suggesting that H. pylori may be involved in these systemic diseases.

研究分野：歯学

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ菌 nested PCR法 マイクロバイオーム 免疫性血小板減少性紫斑病 パーキンソン病 埋伏智歯 デンタルプラーク

1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクター・ピロリ菌は、消化器疾患の原因細菌として知られており、乳幼児期に口腔を介して感染すると考えられている。これまでに、口腔サンプルからピロリ菌を特異的に検出することのできる遺伝子解析法を構築して、小児の口腔内にピロリ菌が定着していることを明らかにした。一方で、口腔内へのピロリ菌の定着における部位特異性や、口腔マイクロバイオームとの関連性については明らかになっていない。また、一過性または持続的な血小板減少を特徴とする自己免疫疾患である免疫性血小板減少性紫斑病 (Immune Thrombocytopenic Purpura; ITP) や中脳のドーパミン神経細胞の原因不明の減少により生じるパーキンソン病において、消化器におけるピロリ菌の存在が影響を及ぼしている可能性のあることが明らかにされてきているが、口腔におけるピロリ菌の存在とこれらの疾患との関連性は分かっていない。これらの背景をもとに、本研究では、①異なる部位の歯を抜去した患者の抜去歯および他の口腔検体からのピロリ菌の検出、②口腔内のピロリ菌とマイクロバイオームとの関連性、③ITP 患者およびパーキンソン病患者からのピロリ菌の検出に着目して研究を行うこととした。

2. 研究の目的

以下の4点を本研究の目的とした。

(1) 口腔内におけるピロリ菌の局在

抜去歯からピロリ菌が検出されることは明らかになっているが、部位ごとの検出率は不明であることから、抜去歯を智歯以外、口腔内に萌出を認める智歯、埋伏智歯に分類し、それぞれからピロリ菌の検出を試みる。

特に、小児が成長を完了する10代後半から20代前半における口腔内の特徴として智歯の萌出が挙げられ、位置的な特徴から智歯周囲では感染が生じやすいことが知られていることから、智歯を抜去する患者からは抜去歯周囲のデンタルプラークだけでなく唾液と歯髄も採取して詳細な分析を行う。

(2) 口腔内のピロリ菌とマイクロバイオームとの関連性

口腔内のピロリ菌の有無に着目して口腔マイクロバイオームの包括的な分析を行うことに加え、小児と成人とのマイクロバイオームの違いを解明する。

(3) ITP 患者の口腔からのピロリ菌の検出

ITP 患者の多くは、消化器のピロリ菌の除菌後に血小板数の改善を示すことが知られていることから、口腔内からピロリ菌が検出された ITP 患者を対象にして、抜歯前後のピロリ菌の有無について経時的な分析を行う。

(4) パーキンソン病患者の口腔からのピロリ菌の検出

パーキンソン病患者ではピロリ感染の有病率が高いことが報告されていることから、パーキンソン病患者の口腔におけるピロリ菌の定着について分析を行う。

3. 研究の方法

(1) ピロリ菌の検出方法

ピロリ菌の検出には、データベース上に存在する約50株のピロリ菌株において20塩基以上の共通領域が存在する ureA 遺伝子上の配列を使用して設計されたプライマー2組 (ureA-aF と ureA-bR および ureA-bF と ureA-aR) を使用した。まず、口腔検体から抽出した細菌 DNA を鋳型として、プライマー ureA-aF と ureA-bR を使用して PCR 法を実施した。次に、PCR 法で得られた増幅産物を鋳型として、プライマー ureA-bF と ureA-aR を使用して nested PCR 法を実施した。PCR 法および nested PCR 法は、TaKaRa Ex Taq ポリメラーゼを使用して、95°C で4分間の初期変性、95°C で30秒・55°C で30秒・72°C で30秒を30回繰り返す増幅サイクル、72°C で7分間の最終伸長のサイクルパラメータで実施した。DNA のサイズは PCR 法で得られた産物が 488 bp、nested PCR 法で得られた産物は 383 bp であり、nested PCR 法における陽性反応をもってピロリ菌陽性とした。

(2) 口腔内におけるピロリ菌の局在

195名の患者 (15歳~83歳; 平均 41.7±19.4歳) から、抜去歯をご提供いただいた。抜去歯は、智歯以外が57本、口腔内に萌出を認めた智歯が99本、埋伏智歯が43本であった。抜去歯は滅菌生理食塩水に浸漬し、超音波処理によって歯面からデンタルプラークを剥離して採取した。その後、各検体から細菌 DNA を抽出して nested PCR 法を行ってピロリ菌の検出を試みた。被験者のうち、智歯の抜去を希望された142名の患者については、唾液もご提供いただき、抜去歯から歯髄を採取して分析に使用した。唾液と歯髄からはデンタルプラークと同様にして細菌 DNA を抽出し、nested PCR 法を用いてピロリ菌の検出を試みた。

(3) 口腔内のピロリ菌とマイクロバイオーームとの関連性

成人 41 名 (20 歳~24 歳; 平均 37.1±16.5 歳) と小児 21 名 (1 歳~12 歳; 平均 8.0±2.4 歳) から、唾液をご提供いただいた。唾液検体から細菌 DNA を抽出し、nested PCR 法を用いてピロリ菌の検出を試みた。また、唾液検体から抽出した細菌 DNA を鋳型として PCR 法により 16S rRNA を増幅し、次世代シーケンサーおよび微生物群集解析ツールである QIIME 2 を用いてマイクロバイオーーム解析を行った。

(4) ITP 患者の口腔からのピロリ菌の検出

ITP と診断された 64 歳の女性から、抜去歯 (右側下顎第一大臼歯) をご提供いただいた。また、抜去時および抜去後 10 日後と 30 日後に、唾液検体を採取した。さらに、抜去 10 日後の縫合糸とスプリントを滅菌生理食塩水に浸漬し、超音波処理によって付着したデンタルプラークを剥離して採取した。抜去から 30 日後に、4 本の歯 (上顎左第二小臼歯、下顎左第二小臼歯、下顎右第二小臼歯、下顎右第二大臼歯) からデンタルプラークを採取した。これらの口腔検体から細菌 DNA を抽出し、nested PCR 法を用いてピロリ菌の検出を試みた。

(5) パーキンソン病患者の口腔からのピロリ菌の検出

パーキンソン病に罹患していない被験者 186 名とパーキンソン病の患者 13 名から唾液を採取した。これらの唾液検体から細菌 DNA を抽出し、nested PCR 法を用いてピロリ菌の検出を試みた。また、パーキンソン病の患者の重症度は、パーキンソン病統一スケール (UPDRS) に基づいて評価した。

4. 研究成果

(1) 口腔内におけるピロリ菌の局在

1) 各部位の抜去歯を用いた分析

195 名の患者のうち 27 名 (13.8%) の抜去歯からピロリ菌が検出された。智歯以外、萌出智歯、埋伏智歯におけるピロリ菌の検出率は、12.1%~15.8%の範囲内に分布しており、歯種間の検出率に有意差を認めなかった。

2) 智歯を用いた分析

99 名の被験者から抜去した智歯は完全萌出もしくは半萌出の状態であり、28 名 (28.2%) において唾液、デンタルプラーク、歯髄のいずれかの口腔サンプルからピロリ菌が検出された。また、これらの被験者の各口腔サンプルについては、唾液で 9 名 (9.1%)、デンタルプラークで 12 名 (12.1%)、歯髄で 12 名 (12.1%) がピロリ菌陽性であった。一方、完全埋伏した智歯を抜去した 43 名の被験者においては、ピロリ菌が 12 名 (27.9%) で検出された。各口腔サンプルにおいては、唾液で 4 名 (9.3%)、デンタルプラークで 6 名 (14.0%)、歯髄で 5 名 (11.6%) がピロリ菌に対して陽性反応を示した。

さらに、完全埋伏歯を 2 本抜去した被験者で、1 歯がピロリ菌陽性でもう 1 歯が陰性であったものについて、抜去歯周囲における口腔細菌種の網羅的解析を行なった結果、ピロリ菌陽性検体では陰性検体と比較して Bacteroidetes 門の細菌の占める割合が多く、Firmicutes 門の細菌の占める割合が少ないことが明らかになった。

1) および 2) の研究結果から、萌出歯だけでなく埋伏智歯もピロリ菌定着のリザーバーとなり得る可能性が示唆された。

(2) 口腔内のピロリ菌とマイクロバイオーームとの関連性

成人 41 人と小児 21 人の唾液検体から細菌 DNA を抽出し、nested PCR を用いてピロリ菌を検出するとともに、次世代シーケンサーを用いてマイクロバイオーームの解析を行った。バイオインフォマティクス解析の結果、Faith の系統的多様性分析では、ピロリ菌陰性の成人検体と小児検体の間に α 多様性で有意差を認めた ($P < 0.05$)。また、ピロリ菌陽性と陰性の小児検体の間には、 β 多様性で有意差を認めた ($P < 0.05$)。属レベルでの分類学的分析から、ポルフィロモナス属は、ピロリ菌陽性の成人と小児の両方において、陰性の場合よりも有意に多く存在した ($P < 0.05$)。

(3) ITP 患者の口腔からのピロリ菌の検出

ITP 患者の抜去歯からピロリ菌の検出を試みたところ、本菌の DNA が確認された。また、抜去後 10 日目に採取した抜去歯の周囲の縫合糸からもピロリ菌の DNA が検出された。しかし、術後 10 日、30 日の他の口腔サンプルからはピロリ菌は検出されなかった。さらに、術後 60 日目の尿素呼吸試験では、消化管内にピロリ菌は存在しなかった。これらの結果から、重度の細菌感染を有する歯が ITP 患者のピロリ菌のリザーバーとなる可能性が示唆された。

(4) パーキンソン病患者の口腔からのピロリ菌の検出

パーキンソン病の患者から採取した唾液中のピロリ菌の検出率は、対照群における検出率よりも有意に高かった ($P < 0.01$)。また、ピロリ菌陽性のパーキンソン病患者の UPDRS スコアは、日常生活活動および運動検査の時点で、ピロリ菌陰性のパーキンソン病患者よりもそれぞれ

有意に高かった ($P < 0.05$)。これらの結果から、口腔内におけるピロリ菌の存在がパーキンソン病の悪化に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Nomura R, Matayoshi S, Ogaya Y, Kameyama H, Uzawa N, Nakano K	4. 巻 10(11)
2. 論文標題 Detection of Helicobacter pylori from extracted teeth of a patient with idiopathic thrombocytopenic purpura	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 2285
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms10112285.	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 白田桃子、亀谷茉莉子、門田珠実、鋸屋侑布子、秋友達哉、光畑智恵子、仲野和彦、野村良太
2. 発表標題 抜歯適応となった永久歯におけるヘリコバクター・ピロリ菌の局在に関する検討
3. 学会等名 第41回日本小児歯科学会中四国地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kadota T, Matsuoka Y, Hamada M, Ogaya Y, Nomura R, Nakano N
2. 発表標題 Association of Helicobacter pylori in oral cavity and Parkinson's disease
3. 学会等名 101st General Session & Exhibition of the IADR（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ogaya Y, Kadota Y, Nomura R, Nakano K
2. 発表標題 Possible unique oral microbiome characteristics in children harboring Helicobacter pylori in the oral cavity
3. 学会等名 101st General Session & Exhibition of the IADR（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kadota T, Hamada M, Nomura R, Nakano K
2. 発表標題 Association of Helicobacter pylori in the oral cavity and dental caries with lifestyle-related disease
3. 学会等名 The 70th ORCA congress (国際学会)
4. 発表年 2023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	仲野 和彦 (Nakano Kazuhiko) (00379083)	大阪大学・大学院歯学研究科・教授 (14401)	
研究分担者	鋸屋 侑布子 (Ogaya Yuko) (40803078)	大阪大学・大学院歯学研究科・助教 (14401)	

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