

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593166

研究課題名(和文) 口腔内細菌が及ぼすヘリコバクター・ピロリ定着への影響の解析と口腔内マーカーの探索

研究課題名(英文) Analysis of mutual interaction between Helicobacter pylori and oral bacteria

研究代表者

米澤 英雄 (Yonezawa, Hideo)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：60453528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヘリコバクター・ピロリがヒト口腔を経由し胃内へと定着する過程において、口腔内細菌より影響を受けているかについて検討した。ピロリ菌はバイオフィルムなどの菌密集状態において、本菌の病原・定着因子であるウレアーゼの発現が亢進していた。ピロリ菌は一部の口腔内細菌と強い共凝集性を示し、これら共凝集状態において、ウレアーゼの発現が有意に上昇していた。マウス感染モデルでの感染実験の結果、口腔内細菌と共凝集させたピロリ菌を感染させると初期定着数の上昇が認められた。以上よりピロリ菌感染を助長する口腔細菌が存在する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter pylori is one of the most common causes of bacterial infection in humans. H. pylori is transmitted via the oral cavity. The oral cavity is colonized by a variety of microorganisms. The aim of this study is to characterize the mutual interaction between H. pylori and oral bacteria in vitro. Some of oral bacteria such as Streptococcus mutans were strongly aggregated with H. pylori. In this aggregation state, the expression of urease, which is one of colonization factor of H. pylori, was higher than that in H. pylori single-culture. In addition, oral inoculation by the H. pylori and S. mutans co-culture exhibited an increased initial infection rate relative to that by the H. pylori single culture. Taken together, these results suggest that coexistence of oral bacteria such as S. mutans might enhance the colonization of H. pylori in the human gastrointestinal tract.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ

1. 研究開始当初の背景

(1) *Helicobacter pylori* は急性および慢性胃炎を惹起するとともに胃十二指腸潰瘍の再発因子、さらに WHO の発癌評定基準 Group I に認定されてきている。*H. pylori* は発見されてから 28 年が経ち、それまでの胃・十二指腸疾患の発症メカニズムに関する概念を覆し、同疾患の病態解明のための新しい視点を与えてきた。しかし全世界の約半数の人が感染し、除菌しない限り一生持続感染する本細菌がどのように胃粘膜に定着・感染するのか、またどのような個体条件・環境だとヒト胃粘膜に定着・感染しやすいのかについての詳細は未だ解明されていない。

(2) *H. pylori* は、胃に棲息する細菌であること、そして胃を含む消化管の入り口である口腔と排出物である糞便において本菌が検出され、この経路以外でヒト体内では本菌は検出されないことから、感染経路は経口的であると考えられている。*H. pylori* の感染でもっとも可能性の高い感染経路は家族内、特に母から子への垂直感染である。追加して環境、特に井戸水などの水を介した感染や、保育施設・心身障害者施設などの集団内における水平感染などが、感染様式として考えられている。その一方で夫婦間での伝播に関してはその可能性は低いという見解が得られている。以上のことから、多くの *H. pylori* 感染は、小児期に起こりやすいということが示唆される。実際 *H. pylori* の主要な感染時期は 5 歳までという報告がなされている。

(3) 口腔内は 600 種以上 1 兆個以上の細菌が存在し、口腔フローラをなしている。*H. pylori* の主要な感染時期である 5 歳という時期は、口腔内において乳歯萌出、特に乳臼歯萌出が起こり、口腔内の細菌叢（口腔フローラ）に変化が起きる時期と重なる。これまで口腔内には存在しなかったう蝕原因菌や歯周病原菌が口腔内に定着、感染する時期である。口腔フローラは家族間で似たものとなる場合が多い。また集団生活においても、接触機会が多い集団内で似た口腔フローラとなる。

2. 研究の目的

口腔内細菌はデンタルプラークと呼ばれる菌塊（バイオフィーム）に代表されるように非常に凝集しやすいという性質を持つ細菌が多数存在している。口腔内細菌は唾液とともに絶えず胃内へと流入するものであり、*H. pylori* が経口感染する際には、口腔内細菌と凝集状態もしくはバイオフィームに取り込まれた状態となって、その状態を保ちながら胃内に到達すると強く推測できる。以上より家族間や集団生活における *H. pylori* 感染に、口腔フローラが影響を及ぼしている可能性が十分に考えられる。本研究では「口腔内細菌が及ぼす *H. pylori* 感定着への影響の解析と口腔内マーカーの探索」という新たな切り口で、本菌感染の生態学、病態学の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) *H. pylori* 単独でのバイオフィーム・凝集状態の性状の解析として、抗菌薬への抵抗性、遺伝子発現の解析を行った。またバイオフィーム状細菌における遺伝子発現調節のメカニズム、特に定着因子に関する遺伝子発現の動態とその制御についての解明を行った。

(2) 口腔内細菌の *H. pylori* への影響については、*H. pylori* と共凝集性の高い口腔内細菌のスクリーニングを行ない、強い共凝集状態下での *H. pylori* 定着因子の発現に影響を与えるかについて検討を行った。

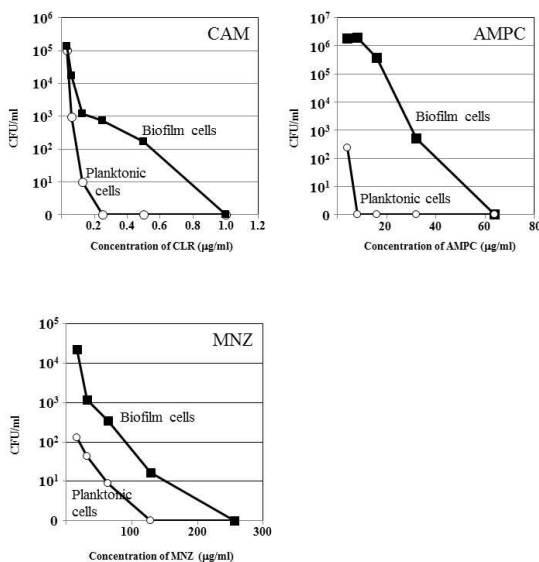
(3) 健常者および *H. pylori* 感染者の唾液サンプルより、細菌 DNA を抽出し、次世代シーケンサーを使用したメタゲノム解析で口腔内フローラの解析を行ない、構成する細菌について、*H. pylori* 感染者および非感染者の間の相違を検討した。

4. 研究成果

(1) *H. pylori* バイオフィーム性状の解析：細菌が形成するバイオフィームの役割としては宿主防御機構からの回避や抗菌物質からのエスケープなどがある。さらにクオラムセンシングや環境応答メカニズムを利用して遺伝子発現を調整するという役割も持っている。一方で *H. pylori* のバイオフィーム形成においてこれらの報告はまだなされていない。われわれはこれまで日本人胃・十二指腸潰瘍患者由来の臨床分離である TK1402 株が、*in vitro* 実験系において高いバイオフィーム形成能を所有していることを明らかとしている。そこで、高バイオフィーム形成株である TK1402 を用いて *in vitro* バイオフィーム形成が及ぼす抗菌薬抵抗性への影響について検討を行った。抗菌薬は、本邦除菌療法で使用される抗菌薬である、クラリスロマイシン (CAM)、アモキシシリン (AMPC) およびメトロニダゾール (MNZ) を使用した。3 日培養にて成熟したバイオフィームをカバーガラス上に作成し、それぞれの抗菌薬を含む培地へと移し、24 時間抗菌薬処理を行った。処理後、カバーガラス上のバイオフィームを器械的に剥がし、生存細菌数を培養にて確認した。対照として浮遊状細菌にて同様の処理を行った。全ての抗菌薬処理において、浮遊状細菌よりもバイオフィーム状細菌で生存菌の数が多くなる結果となった (図 1)。また最小殺菌濃度 (MBC) の比較でも CAM では浮遊状細菌 0.25 μg/ml に対してバイオフィーム状細菌では 1.0 μg/ml、AMPC では 8 μg/ml に対して 64 μg/ml、MNZ では 128 μg/ml に対して 256 μg/ml と全ての抗菌薬に対してバイオフィーム状細菌で高くなる結果となった。以上より *H. pylori* のバイオフィーム形成は、抗菌薬への抵抗性を亢進させることが明らかとなった。次にバイオフィーム形成が、CAM 耐性菌出現にどのような影響を与えるかについて検討を行った。浮

遊状細菌を 1/2 MBC (0.125 $\mu\text{g/ml}$) や 1/4 MBC (0.063 $\mu\text{g/ml}$) 濃度の CAM で 5 回まで処理すると、約 30% で耐性菌が出現したのに対して、バイオフィーム状細菌を 1/4 MBC 濃度 (0.25 $\mu\text{g/ml}$) の CAM で 5 回まで処理すると、約 80% のバイオフィームにおいて CAM 耐性菌が出現した。バイオフィームを 1/2 MBC (0.5 $\mu\text{g/ml}$) や 1/8 MBC (0.125 $\mu\text{g/ml}$) 濃度の CAM で処理した際には、耐性菌出現度は約 50% と減少したものの、やはり高頻度の耐性菌出現頻度であった。次に本菌バイオフィーム形成特異的遺伝子発現の解析を行った。*H. pylori* の抗菌薬耐性に関わる efflux pump 遺伝子として HP0605、HP0971、HP1327、HP1489 が報告されている。これら efflux pumps のバイオフィーム状細菌の遺伝子発現について、浮遊状細菌との比較検討を行った。すべての efflux pumps 遺伝子において、バイオフィーム状細菌は浮遊状細菌と比較して約 2~5 倍発現量が上昇していることが明らかとなった。またウレアーゼ特異的なプライマーでの mRNA レベルおよびモノクローナル抗体を用いた Western blotting の結果から、バイオフィームにおいてウレアーゼが約 3 倍程度高く発現していることも明らかとなった。ウレアーゼの発現は、バイオフィーム状態だけでなく、凝集状態においても同様に発現が亢進していた。以上より本菌はバイオフィームを形成することで、抗菌薬への抵抗性を亢進し、耐性菌出現頻度も上昇すること、そしてそれらはバイオフィーム細菌の特異的な遺伝子発現制御によるものであることが明らかとなった。また凝集を起こすことで、遺伝子発現に影響があることを明らかとした。

図1 The effects of antibiotics on cell viability



(2) 口腔内細菌が及ぼす *H. pylori* への影

響：口腔内細菌と *H. pylori* の共凝集性について検討を行った。共凝集試験より齶蝕原因細菌である *Streptococcus mutans* GS5 株は、*H. pylori* TK1402 株と Aggregation rate 96% と非常に強い共凝集性を示した。さらに *S. sanguinis* ATCC 10556 株も Aggregation rate 91% と強い共凝集性を示した。*S. salivarius* HT9R 株が 50% とやや強い凝集性を示した。一方、*S. mutans* UA159 株や *S. salivarius* JCM5707 株、*S. gordonii* Challis 株や *S. sobrinus* 6715 株は 20% 前後の Aggregation rate であった。また口腔内 *Actinomyces* 属菌や *Veillonella* 属菌などの菌でも共凝集は起こさなかった。従って、*H. pylori* との共凝集は一部の *Streptococcus* 属菌が所有する特性の 1 つであることが示唆された。これら凝集状態における *H. pylori* の発育の状態を調べるために、*S. mutans* GS5 株と *H. pylori* TK1402 株および *S. sanguinis* ATCC 10556 株と *H. pylori* TK1402 株での共凝集状態におけるそれぞれの菌数を培養法にて測定した。すると *H. pylori* は *S. mutans* GS5 株との共凝集状態においては 6×10^9 CFU レベルの菌数が、*S. sanguinis* ATCC 10556 株との共凝集状態では 4×10^8 CFU レベルの菌数が確認でき、共培養中においても *H. pylori* の発育には影響がないことが確認できた。なおその際の *S. mutans* GS5 株は 3×10^9 CFU、*S. sanguinis* ATCC 10556 株は 3×10^9 CFU レベルの菌数であった。そこで *H. pylori* TK1402 株と *S. mutans* GS5 株との共凝集状態、および TK1402 株単独の凝集状態で発育させた菌より Total RNA を採取し、*H. pylori* ウレアーゼの遺伝子発現を Real-time RT-PCR にて確認した。*S. mutans* GS5 株との共凝集状態におけるウレアーゼの発現は、*H. pylori* TK1402 株単独凝集状態と比較して約 4 倍近くウレアーゼが発現していることが明らかとなった。*H. pylori* の至適 pH は 6-8 であり、それ以外の pH 下では生存することは不可能である。そこで本菌は胃内という強酸性下で生存するためには、自身の周辺を至適 pH にする必要があるのである。必要となるのがウレアーゼである。本菌はウレアーゼを産生し、それがヒトの胃内において胃上皮細胞由来の尿素を利用してアンモニアを作りだす。アンモニアはアルカリ性であり、胃酸を中和することで本菌の周囲は中性に保たれる。結果として本菌は胃内という強酸下において定着を可能としている。つまり *S. mutans* との共凝集状態においては、ウレアーゼ発現が高く、その状態を保ったまま胃内へと流入する可能性が考えられる。その結果、*H. pylori* の胃内環境への適応力が上昇し、感染・定着を促進する可能性が示唆された。そこで *S. mutans* との共凝集状態を使用してマウスへの感染実験を行った。*H. pylori* と *S. mutans* との共凝集状態を、マウス *H. pylori* 感染実験モデルである C57/BL6 マウスへ投与し、*H. pylori* 単独培養とで初期定着にどのような違いが認められるかについて検討を行った。*H. pylori* の菌数を 5×10^8

にそろえ、マウス胃内に投与した。感染1週間後、マウスより胃を採取し、胃粘膜表層の *H. pylori* を培養しその菌数を測定した。また粘膜より抽出したDNAから *H. pylori* の菌数の比較を Real-time PCR にて測定した。両者ともに共凝集状態で投与した *H. pylori* で菌数が2-3倍多く定着していた。以上の結果から *H. pylori* の経口感染時、口腔を通過する際に口腔内細菌と共凝集を起こしたり、口腔内バイオフィームに取り込まれたりする結果、ウレアーゼの発現が亢進し、胃内定着性が高まる可能性が示唆された。

(3) 次世代シーケンサーを用いたメタゲノムによる口腔内細菌叢の比較：*H. pylori* 感染者および非感染者の唾液サンプルより抽出したDNAを用いて次世代シーケンサーにてメタゲノム解析を実施した。得られたデータは16S Metagenomics Workflowにより百分率表示により菌種構成として評価した。細菌叢全体のうち目レベルにおいて *H. pylori* 感染者唾液では *Streptococcus* 属が属する *Lactobacillales* が最優勢であるのに対して非感染者では *Neisseriales* や *Pasteurellales* が最優勢と違いが認められた。また *Streptococcaceae* および *Streptococcus* 属が占める割合は、*H. pylori* 感染者唾液では32.2%に対して非感染者では24.2%、*Streptococcus* 属は18.1%に対して14.1%と感染者で *Streptococcaceae* および *Streptococcus* 属の占める割合が高かった。

(結論)以上の結果より口腔内 *Streptococcus* 属細菌は胃内への *H. pylori* の定着性を高める可能性が示唆された。その一方で、われわれは口腔内歯周病原菌が、*H. pylori* の殺菌作用を及ぼす物質を産生することを明らかにしている。口腔は外界より食物・飲料といった外界物を摂取するための開口部であり、細菌学的にも消化管に匹敵するような多種類の常在細菌が棲息している。口腔内には *H. pylori* の感染に手助けをするような細菌が存在する一方で、*H. pylori* を排除しようとする細菌が存在しており、細菌間における相互作用が複雑に入り交じった環境であることが明らかとなった。本研究より口腔内細菌叢とその性状を知ること、*H. pylori* の感染リスクを知ることが出来る可能性を見いだせると考えている。また本研究では *H. pylori* と口腔内細菌との相互関係に着目しているものの、多くの感染症、特に食中毒を引き起こす細菌などは、口腔は感染症起因菌の入り口とし役割している。口腔を通過する際には必ず口腔内細菌と出会っていることから、これらの細菌間でも何かの相互作用があり得る。最終的に口腔内細菌を用いた新たなマーカーの検出やテラーメイド診断への応用、また感染予防方法の開発などに繋がる可能性が期待される。

(引用文献)

Costerton et al. Science. 284: 1318-1322, 1999.

Yonezawa et al. BMC Microbiol. 9: 197, 2009.

Yonezawa et al. J Gastroenterol Hepatol. 25 Suppl 1:S90-4, 2010.

Yonezawa et al. Anaerobe. 17:388-90, 2011.

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15件)

1) Impact of *Helicobacter pylori* Biofilm Formation on Clarithromycin Susceptibility and Generation of Resistance Mutations. Yonezawa H, Osaki T, Hanawa T, Kurata S, Ochiai K, Kamiya S. PLoS One. 2013 6;8(9):e73301. 査読有

2) The destructive effects of butyrate on the cell envelope of *Helicobacter pylori*. Yonezawa H, Osaki T, Hanawa T, Kurata S, Zaman C, Woo TD, Takahashi M, Matsubara S, Kawakami H, Ochiai K, Kamiya S. J Med Microbiol. 2012 61:582-9. 査読有

〔学会発表〕(計16件)

1) *Helicobacter pylori* 外膜タンパク AlpB のバイオフィーム形成への関与. 米澤英雄、大崎敬子、花輪智子、蔵田訓、北条史、Zaman Cynthia、神谷茂. 第88回日本細菌学会総会. 2015年3月26-28日岐阜

2) Susceptibility of amoxicillin and metronidazole to *Helicobacter pylori* biofilm. Yonezawa H, Osaki T, Kamiya S. European *Helicobacter* Study Group XXVIIth International Workshop. 2014年9月11-14日イタリア、ローマ.

3) Impact of biofilm formation by *Helicobacter pylori* on antibiotics susceptibility. Yonezawa H, Osaki T, Kamiya S. Campylobacter, *Helicobacter*, and Related Organisms CHRO conference. 2013年9月15-19日スコットランド、アバディーン.

4) Effects of biofilm formation by *Helicobacter pylori* on antibiotics susceptibility. Yonezawa H, Osaki T, Hanawa T, Kurata S, Kamiya S. American Society for Microbiology 113th General Meeting. 2013年5月18-21日アメリカ、コロラド.

5) *Helicobacter pylori* のバイオフィーム形成とその制御に向けて. 米澤英雄、神谷茂. 第86回日本細菌学会総会. 2013年3月18-20日千葉

〔図書〕(計1件)

米澤英雄、神谷茂. 微生物の簡易迅速検査法、テクノシステム. 2013. p325-336

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/user/medicine/did/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米澤 英雄 (YONEZAWA, Hideo)
杏林大学医学部・感染症学教室・講師
研究者番号：60453528

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

神谷 茂 (KAMIYA, Shigeru)
杏林大学医学部・感染症学教室・教授
研究者番号：10177587

大崎 敬子 (OSAKI, Takako)
杏林大学医学部・感染症学教室・准教授
研究者番号：90255406

花輪 智子 (HANAWA, Tomoko)
杏林大学医学部・感染症学教室・講師
研究者番号：80255405

蔵田 訓 (KURATA, Satoshi)
杏林大学医学部・感染症学教室・助教
研究者番号：00383670