

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670872

研究課題名(和文)ヘリコバクター・ピロリ菌による胃疾患高リスク者の早期スクリーニング法の確立

研究課題名(英文)Establishment of early screening method for gastric diseases caused by *Helicobacter pylori*

研究代表者

仲野 和彦 (NAKANO, Kazuhiko)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00379083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヘリコバクター・ピロリ菌は乳幼児期に主に口腔を介して感染すると考えられているが、その感染経路に関しては明らかになっていない。本研究では、データベース上に登録されている48株のピロリ菌の全遺伝子配列の情報をもとに、ピロリ菌を適切に検出するための新しいPCR法を確立した。この手法を用いて検討したところ、感染根管からピロリ菌が約15%の割合で検出されたことから、ピロリ菌が感染根管に定着している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter pylori infection is believed to be acquired in early childhood, mainly via the oral cavity. However, the route of infection has yet to be elucidated. In the present study, we constructed a novel PCR system for the identification of H. pylori DNA based on complete genome information of 48 H. pylori strains registered in a database. Analysis of infected root canal specimens using this system revealed a detection rate of 15%, indicating the root canal as a possible reservoir for H. pylori.

研究分野：小児歯科学

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ菌 口腔 感染経路 遺伝子配列 PCR法 感染根管 定着 唾液

1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクター・ピロリ菌は、グラム陰性微好気性のらせん型の細菌であり、胃潰瘍や胃がんと関連することが知られている。主に胃酸の分泌や胃粘膜の免疫能が不十分な小児期に感染が成立することが多いことから、小児期のヒトからヒトへの経口感染が疑われているが、それを裏付ける明確な研究成果は示されていない。胃に感染したピロリ菌を検出する臨床的検査法として、尿素呼吸試験、抗体測定、迅速ウレアゼ試験、鏡検法、培養法など、多くの検査法が確立している一方で、口腔内に存在するピロリ菌を検出する検査法は確立していない。口腔内には約 700 種類の細菌が存在する上に、グラム陰性微好気性細菌であるピロリ菌はグラム陽性菌や好気性菌と比較して培養が難しく、口腔内のピロリ菌を選択的に培養することが困難であることが、経口感染を示すことが困難であった理由の一つであると考えられる。

近年、分子生物学の発展に伴い、実験室で培養できない多くの菌の有無を調べることが可能となった。ピロリ菌においても、16SrRNA、*vacA*、*cagA*、*glmM* および *ureA* などの多くのピロリ菌株に共通して存在し比較的変異が生じにくいと考えられる遺伝子をターゲットとした分子生物学的手法が検討されており、口腔内に存在するピロリ菌を検出した論文も報告されている。しかしながら、口腔内のピロリ菌の検出頻度は報告により著しく異なっており、口腔内の数多くの菌からピロリ菌の遺伝子だけを特異的に検出するための信頼できる方法は未だ存在していない。

20 世紀の終わりから 21 世紀のはじめにかけて、分子生物学のうちのシーケンス技術の発展に伴い、細菌の全ゲノムを解析する研究が進められてきた。ピロリ菌においては、1997 年に 26695 株 (ATCC700392 株) の全ゲノムが明らかにされた。その後、2005 年までに全ゲノムが解読されたピロリ菌はわずか 3 株だけであったのに対し、現在では約 50 株ものピロリ菌の全ゲノムがデータベースに公表されている。

当教室では、分子生物学的手法によりう蝕病原性細菌や歯周病原性細菌の検出を行い、口腔細菌の定着や母子伝播に関して詳細に検討してきた。これまでに公表されているピロリ菌の豊富な遺伝情報を用いて、当教室で行ってきた分子生物学的手法を口腔内のピロリ菌の検出に応用し、ピロリ菌の感染経路として口腔が関連するかどうかを明らかにしたいという着想に至った。

2. 研究の目的

ピロリ菌は、胃の中に生息しているらせん型細菌であるが、これまでに、口腔、吐物および糞便などでも存在が確認されている。小児期の経口感染が最も有力な感染経路と考えられているが、明確な根拠はなく、感染の

予防策として確実な方法は見つかっていない。

これまでに、ピロリ菌の小児期の経口感染を示すことが困難であった理由の一つとして、ピロリ菌の研究を主として行っている消化器領域の研究者が、小児患者の口腔サンプルを採取する機会に恵まれなかったことが考えられる。また、仮に口腔からサンプルを採取する機会が得られたとしても、歯肉縁下プラークや歯髄からサンプルを採取するためには、歯科領域の専門知識を必要となり、それらのサンプル採取は極めて困難であったと考えられる。本研究では、小児歯科における視点から口腔サンプルの採取を行い、口腔におけるピロリ菌の検出頻度を明確に示したいと考えた。

最近、乳歯の根管内から生きたピロリ菌を分離した論文が報告されたが、分析を行った症例数がごくわずかで、検出頻度を明確に示すには至っていない。そこで、本研究では、唾液サンプルだけでなく、齶蝕、外傷及び中心結節の破折などにより歯髄処置の適応となった感染歯髄サンプルを複数の小児患者から採取し、それらのサンプル中に含まれるピロリ菌の頻度を明らかにすることを目的とした。また、歯髄サンプルからピロリ菌が検出された場合には、便宜的に抜髄を行った非感染性の小児の歯髄線維芽細胞を分離し培養を行いたいと考えた。この歯髄線維芽細胞にピロリ菌株を感染させることにより、病原性の評価を行うという計画を立てた。

ピロリ菌は培養が比較的難しいことから、最近になって、分子生物学的手法によって口腔内から採取した検体中に存在するピロリ菌の細菌 DNA を検出する手法が多く用いられている。しかしながら、それらの検出率は 0% ~ 100% まで著しくばらつきがあり、信頼できる方法が確立されていないのが現状である。本研究では、これまでに明らかになっているピロリ菌の豊富な遺伝情報をできる限り応用し、口腔におけるピロリ菌の存在の有無を明確に示すことのできる方法を確立することを目的とした。この方法により、感染経路として口腔が関連するかどうかを明らかにするとともに、ピロリ菌の母子伝播の可能性についても検討することにした。本研究を遂行することにより、ピロリ菌の感染時期や感染メカニズムを明らかにし、それを社会に広く理解していただくことで、ピロリ菌の感染そのものの防止に貢献していきたいと考えた。

3. 研究の方法

(1) ピロリ菌株およびピロリ菌近縁種の培養

ピロリ菌として、26695 株、Tx30a 株 (ATCC51932 株)、J99 株 (700824 株)、ATCC43504 株、および CPY2052 株を用いた。また、ピロリ菌の近縁種である *Helicobacter feris* ATCC49179 株および *Helicobacter pullorum* ATCC 51802 株も研究に使用した。

これらの菌株を血液寒天培地にて 37℃、3 日間好気条件下で培養した。得られたコロニーを Tryptic Soy Broth 液体培地にピックアップし 37℃、1 日間好気下で培養後ゲノム DNA の抽出を行い、以下の研究に使用した。

(2) 新規ピロリ菌検出系の構築

GenBank のデータベースから全ゲノムが決定しているピロリ菌 48 株のデータベース上の情報を獲得し、これまでにピロリ菌の分子生物学的な検出に用いられたことのある 16SrRNA、*vacA*、*cagA*、*glmM* および *ureA* の 5 種類の遺伝子に着目することにした。この 5 種の遺伝子それぞれについて、48 株のピロリ菌の多重配列を ClustalW により行い、48 株すべてにおいて 20 塩基以上連続して一致するような遺伝子領域を検索した。そのような塩基配列上に、得られる増幅産物が約 300bp~400bp 前後となるようにピロリ菌を検出するための新規のプライマーを設計した。

(3) ピロリ菌の検出

研究に先立ち、以下の内容について大阪大学大学院歯学研究所倫理委員会に申請し承認を得た。

2013 年 2 月~12 月の間に、大阪大学歯学部附属病院小児歯科を受診した小児とその保護者のうち、本研究内容にご理解をいただき参加に同意の得られた母子 40 組から唾液サンプル (小児:3~8 歳) を採取した。また、同時期に齲蝕、外傷及び中心結節の破折のいずれかにより歯髄処置の適応となった小児患者のうち、保護者の同意を得られた対象から採取した根管内のサンプル 40 サンプル (2~19 歳) も対象とした。これらの口腔サンプルから細菌 DNA を抽出し、(2) で設計したプライマーを用いた分子生物学的手法を用いてピロリ菌の存在を分析した。

(4) 歯髄線維芽細胞への付着能の分析

矯正治療のために便宜抜髄を行った 8 歳男児の上顎左側乳犬歯から歯髄線維芽細胞を分離し培養した。この歯髄線維芽細胞を 1.0×10^5 個となるように 24 well plate に添加し、37℃で 18 時間培養した。この歯髄線維芽細胞に 1.0×10^6 集落形成単位 (Colony Forming Unit; CFU) に調整した 3 株のピロリ菌株 (26695 株、J99 株、Tx30a 株) をそれぞれ加え 90 分反応させた後、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline; PBS) にて 3 回洗浄した後、滅菌蒸留水を加え細胞を粉碎した。この菌液を PBS にて段階希釈したものを血液寒天培地に播種し、37℃で 4 日間好気条件下で培養した。培養後、血液寒天培地上に得られたコロニー数を計測した。

4. 研究成果

(1) 新規ピロリ菌検出系の構築

48 株のピロリ菌の遺伝子を用いて多重配

列による分析を行ったところ、*vacA* と *cagA* の 2 つの遺伝子では 20 塩基以上連続して一致するような遺伝子領域は認められず、16SrRNA と *glmM* の 2 つの遺伝子では、そのような遺伝子領域は 1 箇所だけしか認められなかった。一方で、*ureA* 遺伝子上には、48 株すべてに共通した遺伝子領域が 5 箇所存在した。それらの *ureA* 遺伝子配列上に、PCR により増幅される遺伝子配列が約 300bp~400bp となるように新規検出プライマーの設計を試みたところ、5 種類のプライマーを設計することができた。これらのプライマーを用いて、6 株のピロリ菌株より抽出したゲノム DNA を鋳型として PCR 法を行ったところ、すべてのプライマーで 300bp~400bp に相当する遺伝子断片をアガロースゲル上に認めた。一方で、ピロリ菌の近縁種である *Helicobacter feris* および *Helicobacter pullorum* のゲノム DNA とは交叉反応を示さず、構築した分子生物学的手法がピロリ菌特異的であることを確認できた。また、5 種のすべてのプライマーにおいて、1~10 CFU の菌量のピロリ菌が存在すれば検出可能であることが示されたことから、5 種のプライマーのうちの 1 種を以下の研究に用いることにした。

(2) 口腔サンプルからのピロリ菌の検出

小児 40 名および母親 38 名から採取した唾液サンプル中からは、母親 1 名からのみしかピロリ菌の細菌 DNA は検出されなかった。一方で、40 名から採取した歯髄サンプルのうち、6 サンプル (15.0%) でピロリ菌の細菌 DNA が検出された。

(3) 歯髄線維芽細胞への付着能の分析

ピロリ菌のうち、26695 株感染群では、約 9×10^3 CFU の菌の歯髄線維芽細胞への付着を認めた。また、J99 株感染群において、約 5×10^3 CFU の菌の歯髄線維芽細胞への付着を認めたのに対し、Tx30a 株においては歯髄線維芽細胞への付着をほとんど認めなかった。

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)

1. 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. 2015;64:117-123.

[学会発表] (計 5 件)

1. 鋸屋侑布子, 野村良太, 仲野和彦 ヘリコバクターピロリ菌の検出系の検討と歯髄組織における分布の解析 第 32 回日本小児歯科学会中四国地方会大会, 2013. 11. 3, 岡山
2. 鋸屋侑布子, 野村良太, 仲野和彦 歯髄

組織におけるヘリコバクターピロリ菌の局在に関する分子生物学的検討 第 52 回日本小児歯科学会大会, 2014. 5. 17, 東京

3. Ogaya Y, Nomura R, Nakano K. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in inflamed dental pulp specimens extirpated from Japanese children and adolescents. Oral specimens. The 9th Biennial Conference of Pediatric Dentistry Association of Asia. 2014. 8. 24, Singapore.
4. 鋸屋侑布子, 野村良太, 仲野和彦 ヘリコバクターピロリ菌の検出系の改良と歯髄組織における局在に関する検討 第33回日本小児歯科学会近畿地方会大会, 2014. 10. 5, 大阪
5. Ogaya Y, Nomura R, Nakano K. Localization of *Helicobacter pylori* in Oral specimens. 62nd Conference of Japanese Association of Dental Research. 2014. 12. 4, Osaka, Japan.

〔図書〕 (計 0 件)

〔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://web.dent.osaka-u.ac.jp/%7Epedo/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

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

仲 周平 (NAKA, Shuhei)
大阪大学・歯学研究科・助教
研究者番号: 1 0 5 8 9 7 7 4