

研究者：鋸屋侑布子（所属：大阪大学大学院歯学研究科小児歯科学教室）

研究題目：*Helicobacter pylori* の新規検出系の構築と口腔内における局在の検討

目的：

Helicobacter pylori はグラム陰性微好気性の桿菌であり、胃炎や胃潰瘍、胃がんの原因菌として知られている。感染経路についての詳細は不明であるが、その多くが小児期に口腔を介して感染が成立すると考えられている。

これまでに、約 50 株の公開されている *H. pylori* の全ゲノムデータを利用して、*H. pylori* の分子生物学的検出法を確立した。本研究では、この検出系に改良を加えることでさらに検出感度を上昇させ、不可逆性歯髄炎および根尖性歯髄炎症例から採取した歯髄サンプルから *H. pylori* の検出を試みることにした。さらに、根管内への *H. pylori* 定着メカニズムの一端を明らかにするために、歯髄線維芽細胞への *H. pylori* 臨床分離株における付着能の分析を行うこととした。

対象および方法：

1. Nested PCR 法の確立

これまでに確立した *H. pylori* 検出系の検出感度をさらに上昇させるために、構築した Single PCR 系をもとに新たに Nested PCR 系を確立した。確立した Nested PCR 法における特異度の評価を *H. pylori* 株 (26,695 株, J99 株, ATCC 51,932 株) および *H. pylori* の近縁種である *H. pullorum* ATCC 51,802 株, *H. felis* ATCC 49,179 株を用いて行った。さらに、*H. pylori* が存在しないことを確認した不可逆性歯髄炎および根尖性歯髄炎サンプルおよび抜歯された完全埋伏智歯より採取した細菌感染が起こっていない歯髄サンプルのそれぞれに対して、既知の細菌数の *H. pylori* を 10 倍連続希釈した溶液を加えて細菌 DNA を抽出し、これらの細菌 DNA を鋳型として Single PCR および Nested PCR 法における検出限界を検討した。

2. Nested PCR 法を用いた口腔サンプルからの *H. pylori* の検出

大阪大学大学院歯学研究科倫理委員会承認後、大阪大学歯学部附属病院小児歯科を受診し、重度齲蝕 (114 症例) または外傷 (17 症例) が原因となって不可逆性歯髄炎または根尖性歯周炎に陥り、根管治療を受けた 94 名 (1~19 歳) の患者から 131 の不可逆性歯髄炎および根尖性歯周炎サンプルを採取した。また、20 名から異なる来院日に同一歯よりサンプルを採取した。さらに、前述の患者とは異なる新たな 40 名の患者 (3~8 歳) より採取した唾液サンプルを採取した。採取したサンプルから細菌 DNA を抽出し、Nested PCR 検出系を用いて *H. pylori* の検出を行った。

3. *H. pylori* の歯髄線維芽細胞への付着能の検討

大阪大学大学院歯学研究科倫理委員会承認後、大阪大学歯学部附属病院にて矯正治療上の理由

で便宜抜髄となった下顎左側乳犬歯より、保護者の同意を得た上で歯髄線維芽細胞を採取した。歯髄線維芽細胞は培養後に調整して、 1.0×10^5 個ずつ組織培養プレートの各ウェルに添加した。その後、 1.0×10^6 CFU に調整した *H. pylori* 株 (26,695 株, J99 株, ATCC 51,932 株) を感染させ、1.5 時間培養後にメディウムを取り除き、感染した細胞をリン酸緩衝生理食塩水にて洗浄し滅菌蒸留水を加え細胞を破碎させた。続いて、段階希釈した細胞溶解液を血液寒天培地に播種し、微好気的環境下で 37°C 、3 日間静置培養し、歯髄線維芽細胞への *H. pylori* 付着菌数を算出した。

結果および考察：

1. Nested PCR 法の確立

連続希釈した既知の細菌数の *H. pylori* 株を根尖性歯周炎サンプルに加えた上で、抽出した細菌 DNA を鋳型とした際には特異度には問題ないものの、これまでに確立した Single PCR における検出感度は $10^2 \sim 10^3$ CFU に減少した (図1)。一方で、今回作製した Nested PCR においては検出感度は 1~10 CFU に維持された。さらに、連続希釈した既知の細菌数の *H. pylori* を非感染歯髄サンプルに加えた上で、抽出した細菌 DNA を鋳型とした場合には、Single PCR および Nested PCR とともに約 1~10 CFU の検出感度を示した (図2)。しかし、Single PCR で認められたバンドは、培養したゲノム DNA を鋳型とした単独 PCR で認められたものよりも薄くなり検出が困難になることが分かった。

2. 口腔サンプルにおける *H. pylori* の検出

不可逆性歯髄炎および根尖性歯周炎症例から採取した 131 症例のサンプルに対して Nested PCR 法を用いて分析を行った結果、*H. pylori* の検出率は 38.9% であった (図3)。唾液サンプルにおいては 1 サンプルからのみ *H. pylori* が検出された。さらに、同一患者の同一歯より異なる来院日に採取されたサンプルを分析した結果、1 回目に *H. pylori* が検出された患者の 87.5% で 2 回目にも検出された。

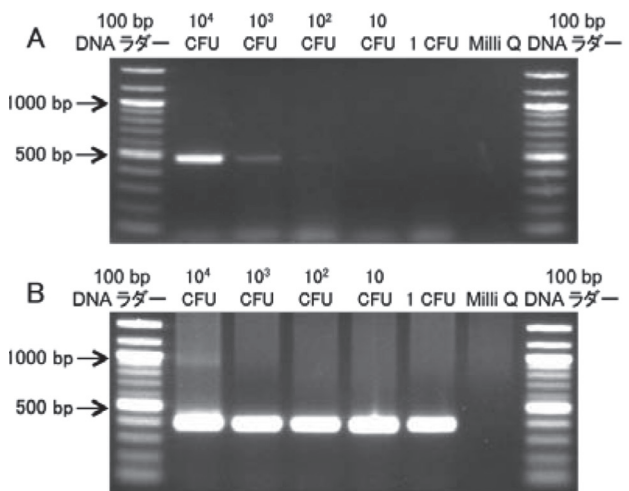


図1 感染根管サンプル中に *H. pylori* J99 株 ($1 \sim 10^4$ CFU) を混ぜて抽出した細菌 DNA を用いた検出感度の検討

(A) Single PCR (B) Nested PCR

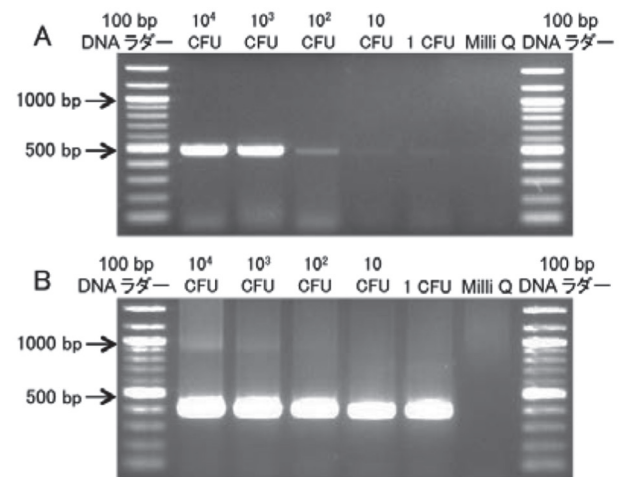


図2 非感染歯髄サンプル中に *H. pylori* J99 株 ($1 \sim 10^4$ CFU) を混ぜて抽出した細菌 DNA を用いた検出感度の検討

(A) Single PCR (B) Nested PCR

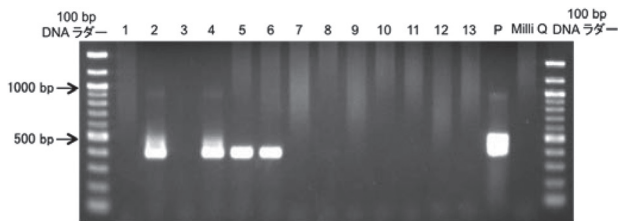


図3 可逆性歯髄炎および根尖性歯周炎サンプルの一例

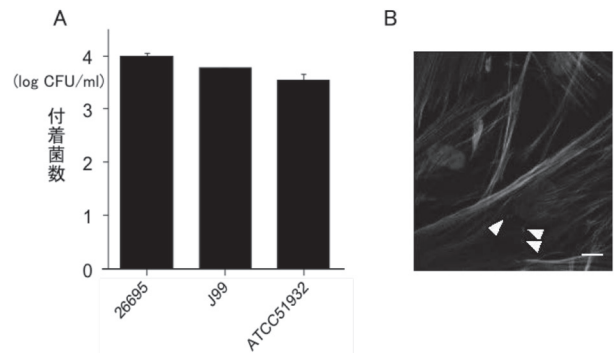


図4 歯髄線維芽細胞への *H. pylori* の付着能の検討

(A) 歯髄線維芽細胞への付着菌数

(B) 歯髄線維芽細胞に付着する *H. pylori* 26695 株の共焦点レーザー顕微鏡像

青：細胞核，緑：細胞骨格のアクチン，

赤：歯髄線維芽細胞に付着する *H. pylori* (矢印)，

スケールバー：10 μ m

3. *H. pylori* の歯髄線維芽細胞への付着能の検討

検討した全ての *H. pylori* 株において $3\sim 9 \times 10^3$ CFU ほどの菌が付着していることが明らかになった (図4)。また、共焦点レーザー顕微鏡により *H. pylori* 菌体が歯髄線維芽細胞に付着することが視覚的にも確認された。

本研究結果から、48 株の *H. pylori* 全ゲノム情報を基にして、Nested PCR 法により臨床検体の分析も可能な感度の信頼性の高い検出系を確立することができた。そして、*H. pylori* は唾液よりも不可逆性歯髄炎および根尖性歯周炎に陥った根管に局在しやすいことおよびある一定期間根管に定着している可能性が考えられた。さらに、*H. pylori* 菌株において歯髄線維芽細胞への明確な付着能を認めることが明らかになった。これらのことから、*H. pylori* は不可逆性歯髄炎および根尖性歯周炎に陥った根管にある一定期間局在することで、感染を成立させている可能性が示唆された。今後は、*H. pylori* の病原因子により誘発される不可逆性歯髄炎および根尖性歯周炎となった歯の根管への定着メカニズムの詳細を解明するために、更なる研究をしていきたいと考えている。

成果発表：

1. Ogaya Y, Nomura R, Matsui D, Watanabe I, Koyama T, Miyatani F, Iwai K, Ozaki E, Kuriyama N, Watanabe Y and Nakano K. Distribution of *Helicobacter pylori* in dental plaque from Japanese children and adults. 94th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, 2016. 6. 24, Seoul, Korea.