

研究者：門田 珠実（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：口腔におけるヘリコバクター・ピロリ菌と全身疾患の関連性の検討

目的：

胃・十二指腸疾患の原因細菌であるヘリコバクター・ピロリ菌は、口腔を介して感染が成立すると考えられている。ピロリ菌の検出法として検出感度の高い PCR 法を応用した分子生物学的手法が確立されたことにより、ピロリ菌は胃からだけでなく口腔からも検出されることが示されている。また、ピロリ菌の存在は腸内細菌叢や口腔細菌叢の変化を引き起こし、免疫応答システムが変化することで、胃疾患の発症だけでなく、他の全身疾患の発症や悪化の原因となる可能性が推察されている。本研究では、多数の被験者から口腔サンプルを採取してピロリ菌の検出と細菌叢の構成の解析を行うことで、口腔のピロリ菌と全身疾患の関連性について検討することとした。

対象および方法：

1. 対象およびサンプル採取

本研究は大阪大学大学院歯学研究科倫理委員会の承認後（承認番号；H30-E32）、被験者の同意を得て行った。2019 年から 2021 年にかけて重度齲蝕および歯周炎や智歯周囲炎などの理由で大阪大学歯学部附属病院を受診した患者を対象として、既往歴や生活背景などに関する問診を行い、唾液および抜去歯を提供いただいた。抜去歯は 10mL の滅菌生理食塩水に保存して超音波洗浄器にて 10 分間超音波処理し、歯に付着したデンタルプラークサンプルを採取した後、歯髓サンプルを採取した。

2. 口腔サンプルからのピロリ菌の検出

それぞれの口腔サンプルから細菌 DNA を抽出し、*ureA* 遺伝子上に設計した特異プライマーを用いた Nested PCR 検出系によりピロリ菌の検出を行った（Nomura ら, BMC Oral Health, 2018）。最初の PCR 法は抽出した細菌 DNA とプライマー（*ureA*-aF/*ureA*-bR）を用いて行い、Nested PC 法は最初の PCR 法で得られた PCR 産物を鋳型としてプライマー（*ureA*-bF/*ureA*-aR）を用いて行った。

3. 口腔細菌叢の解析

被験者の口腔細菌叢の構成を解析するために、16S メタゲノム解析法を利用した。細菌共通のプライマーを用いて抽出した細菌 DNA からランダムに 16S rDNA を増幅し、クローニング操作により様々な細菌由来の 16S rDNA 断片をそれぞれ単離した。シーケンサーを用いて単離した 16S rDNA の塩基配列を決定し、菌叢解析ソフト Qiime2 を用いて解析を行った。

4. 統計学的分析

多群間の統計学的有意差の検定には、一元配置分散分析の後 Bonferroni 法を用いた。また、二群間の統計学的有意差の検定には t 検定およびカイ二乗検定を用いた。有意水準 5% 以下を有意差ありとした。

結果および考察：

1. 口腔サンプルにおけるピロリ菌の検出

本研究に参加した被験者は 19 歳から 80 歳の男性 33 名、女性 46 名であり、既往歴を有さない被験者だけでなく消化器疾患、循環器疾患、呼吸器疾患、神経系疾患といった様々な既往歴を有する被験者が参加していた。また、79 名の被験者から提供いただいた抜去歯は合計 103 歯であった。各口腔サンプルのうち、デンタルプラークサンプルにおけるピロリ菌の検出率が最も高く（図 1）、いずれかの口腔サンプルからピロリ菌が検出された被験者は 79 名のうち 26 名（32.9%）であった。さらに、被験者の年齢、性別、全身疾患の既往歴、胃・十二指腸疾患の既往歴、胃におけるピロリ菌の診断歴および除菌歴、飲酒歴、喫煙歴については、ピロリ菌が検出された被験者と検出されなかった被験者との間に大きな差異は認められなかった（表 1）。

一方で、全身疾患の中でも、生活習慣病に分類される高血圧、高脂質血症、糖尿病、悪性腫瘍などに罹患した既往がある被験者は、生活習慣病の既往がない被験者と比較して、口腔におけるピロリ菌の検出率が有意に高いことが明らかとなった（ $P < 0.05$ ）（図 2）。

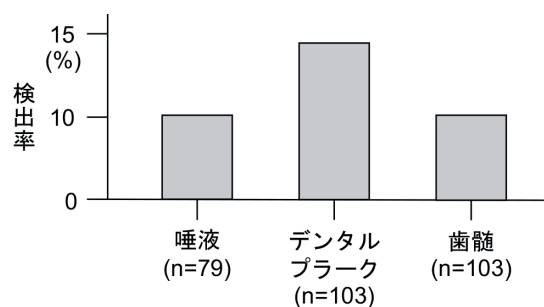


図 1 各種口腔サンプルにおけるピロリ菌の検出率

表 1 本研究に参加した被験者の年齢、性別、社会的背景

	口腔サンプル (n=79)	
	ピロリ菌 (+) (n=26)	ピロリ菌 (-) (n=53)
年齢 (平均 ± SD)	37.3 ± 19.6 歳	32.8 ± 13.9 歳
性別 (男性 : 女性)	11 : 15	22 : 31
全身疾患の既往歴	46.2%	37.7%
胃・十二指腸疾患の既往歴	11.5%	11.3%
胃におけるピロリ菌の診断歴	15.4%	11.3%
胃におけるピロリ菌の除菌歴	11.5%	11.3%
飲酒歴	61.5%	60.4%
喫煙歴	13.0%	12.8%

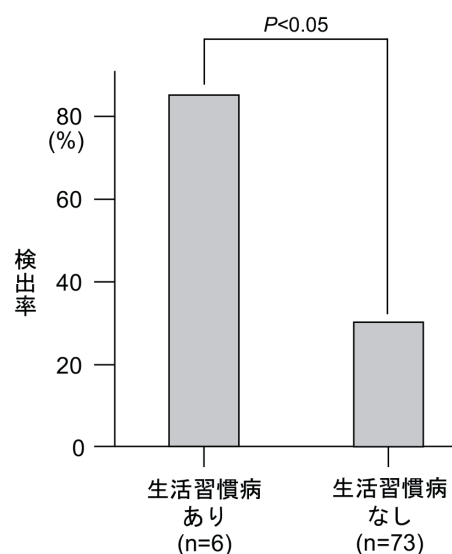


図 2 生活習慣病の既往と口腔におけるピロリ菌の検出率

2. 口腔細菌叢の解析

16S メタゲノム解析の結果、う蝕病原性細菌が含まれる *Streptococcus* 属をはじめとして、歯周病原性細菌が含まれる *Porphyromonas* 属や胃・十二指腸疾患と関連する *Helicobacter* 属など様々な菌種が検出された (図3)。その中でもピロリ菌が検出された被験者における *Porphyromonas* 属の相対的細菌量の割合は、ピロリ菌が検出されなかった被験者と比較して有意に高いことが明らかになった ($P < 0.05$) (図4)。

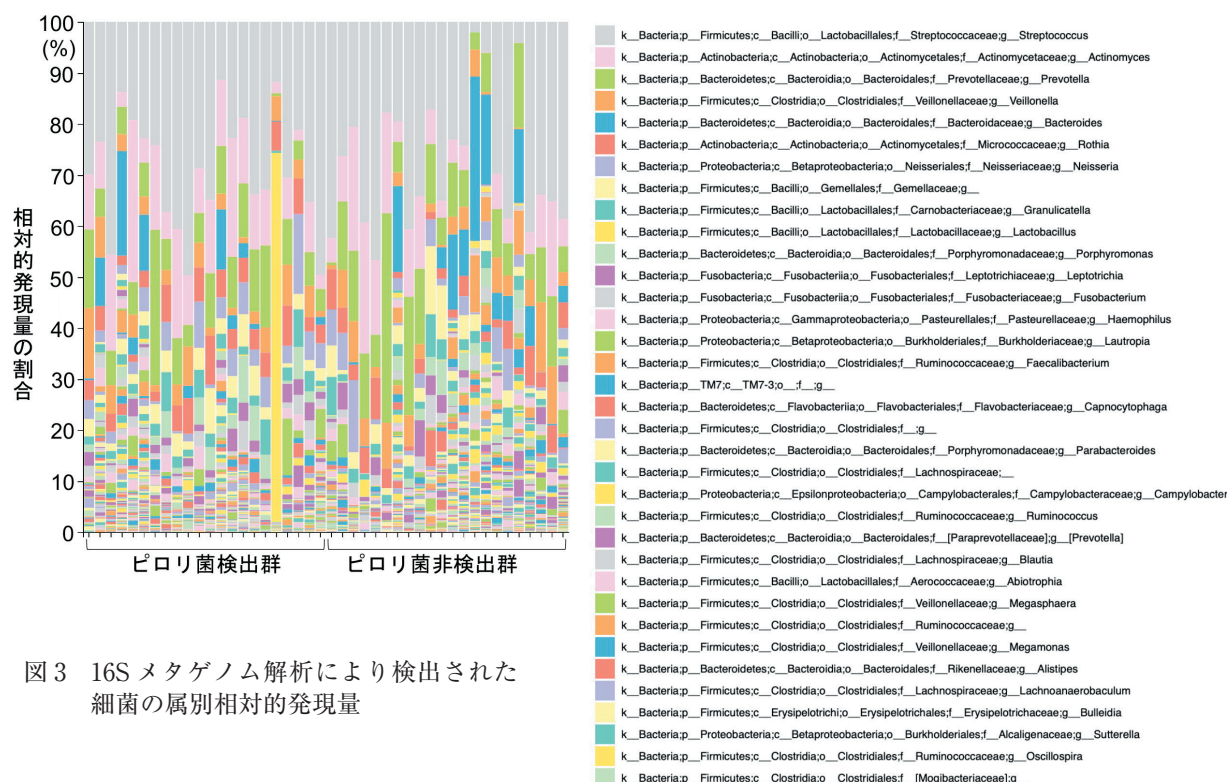


図3 16S メタゲノム解析により検出された細菌の属別相対的発現量

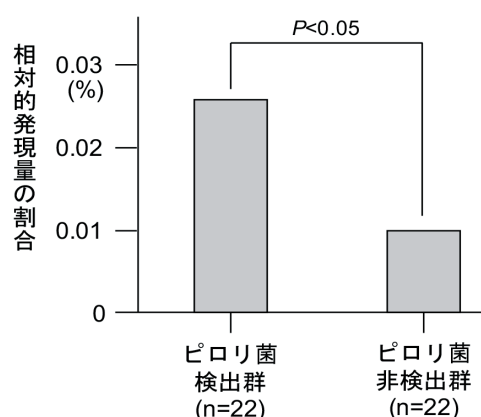


図4 口腔におけるピロリ菌の有無による *Porphyromonas* 属の相対的発現量の割合

本研究結果から、生活習慣病罹患者は非罹患者と比較して、口腔内におけるピロリ菌の検出率が高いことが示された。生活習慣病とは、食事や運動習慣、喫煙、飲酒といった生活習慣が深く関与し、発症の要因となる疾患の総称であり、悪性腫瘍や虚血性心疾患、脳卒中、高血圧、高脂質血症、糖尿病などが生活習慣病に分類される。さらに、口腔細菌は様々な全身疾患と関連していることが報告されており、中でも歯周病原性細菌は糖尿病、肥満、心血管疾患などの発症に有意な関連があるとされている。本研究において、ピロリ菌を口腔に有する被験者の口腔細菌叢は、ピロリ菌を口腔に有さない被験者と比較して歯周病原性細菌に分類される *Porphyromonas* 属の相対的細菌量の割合が高いことが示された。これらのことから、ピロリ菌が口腔内に定着することで口腔細菌叢の変化が生じ、歯周病原性細菌種の割合が増加した結果、生活習慣病の発症にも関与した可能性が考えられる。今後は、生活習慣病および歯周病とピロリ菌感染との関連性についての詳細を解明するために、より多くの被験者を対象とした大規模研究を継続していきたいと考えている。

成果発表：(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

いくつかの学会での発表を予定していたが、新型コロナウイルス感染症拡大のため学会の開催が中止になったり、参加自体も困難になり発表ができなかった。今後、さらに研究を発展させて論文化を目指している。