



|              |                                                                                                                                                       |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Helicobacter pylori の新規検出系の構築と口腔内における局在の検討                                                                                                            |
| Author(s)    | 鋸屋, 侑布子                                                                                                                                               |
| Citation     | 大阪大学, 2017, 博士論文                                                                                                                                      |
| Version Type |                                                                                                                                                       |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/61645">https://hdl.handle.net/11094/61645</a>                                                                   |
| rights       |                                                                                                                                                       |
| Note         | やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 鋸屋 侑布子 )

論文題名 *Helicobacter pylori* の新規検出系の構築と口腔内における局在の検討

## 論文内容の要旨

## 【はじめに】

*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。*H. pylori* の検出は、様々な遺伝子を標的とした分子生物学的手法によって、胃からだけでなく口腔からの検出も試みられている。しかし、その検出率には報告ごとによりかなりのばらつきがあり、結果の解釈が困難な現状にある。これまでに、デンタルプラークや唾液サンプルにおいて、*H. pylori* の細菌 DNA が検出されることが報告されてきた。最近になって乳歯の感染根管サンプルからの検出も報告されている。

本研究では、口腔からの *H. pylori* の検出のための信頼性の高い分子生物学的手法の構築を試みることにした。また、若年者の口腔サンプルにおいて、特に重度の齲蝕病変部が *H. pylori* の感染成立に関与しているという仮説を立て、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。

## 【材料と方法】

1. 新規 *H. pylori* 検出系の構築1) *H. pylori* 検出のための PCR 法の確立

これまでに報告されている検出系において標的とされてきた遺伝子のうち、主要な5つの遺伝子（16SrRNA, *vacA*, *cagA*, *glmM*, *ureA*）に関して、データベース上にゲノム情報が登録されている *H. pylori* 48 株の多重配列を行った。その後48株全てにおいて20塩基以上連続した共通配列を抽出し、その領域に新規プライマー対を設計して PCR 系を確立した。特異度の検討には、*H. pylori* 株(26695 株、J99 株、ATCC 51932 株、ATCC 43504 株、CPY 2052 株)、*H. pullorum* 株 (ATCC 51802 株)、*H. felis* 株 (ATCC 49179 株) のそれぞれ抽出したゲノム DNA を用いた。また、既知の細菌数の *H. pylori* 株 (J99株) から抽出した細菌 DNA を連続希釈することで感度の検討を行った。

## 2) Nested PCR 法の確立

*H. pylori* 検出系の検出感度をさらに上昇させるために、1) で構築した Single PCR 系をもとに Nested PCR 系を確立した。Nested PCR 法における特異度の評価を *H. pylori* 株 (26695 株、J99 株、ATCC 51932 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. 口腔サンプルからの *H. pylori* の検出1) Single PCR 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の承認のもと保護者の同意を得た上で、不可逆性歯髄炎および根尖性歯周炎サンプルおよび唾液サンプルを採取した。不可逆性歯髄炎および根尖性歯周炎サンプルの採取は、2013年2月から2014年4月までの期間に大阪大学歯学部附属病院小児歯科を受診し、重度齲蝕（30症例）、外傷（8症例）、中心結節の破折（2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、根管治療の適応となった40名の患者（年齢2～19歳）を対象として行った。唾液サンプルの採取は、同期間に当科を受診した前述の患者とは異なる新たな40名の患者（年齢3～8歳）より採取した。採取されたサンプルから、歯周病病原性細菌における DNA 抽出法に準じて細菌 DNA を抽出し、1-1) で構築した Single PCR 検出系を用いて *H. pylori* の検出を行った。

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

不可逆性歯髄炎および根尖性歯周炎サンプルは、2013年2月から2016年2月までの期間に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サンプルを採取した。また、18名からは複数歯の根管よりサンプルを採取し、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。採取したサンプルからは細菌 DNA を抽出し、1-2) で構築した Nested PCR 検出系を用いて *H. pylori* の検出を行った。さらに、2-1) で採取した唾液サンプルを用いて、唾液サンプルからの *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、 $1.0 \times 10^5$ 個ずつ組織培養プレートの各ウェルに添加した。その後、 $1.0 \times 10^6$  CFU に調整した *H. pylori* 株（26695株、J99株、ATCC51932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℃、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】

#### 1. 新規 *H. pylori* 検出系の構築

##### 1) *H. pylori* 検出のための PCR 法の確立

20塩基以上一致した配列は、*ureA* 遺伝子で6か所認められただけであった。そこで、それぞれの塩基配列をもとに、5種類の検出プライマー対を設計した。これらの検出系の全てで十分な特異度を示すとともに、検出感度は 1～10 CFU 程度であった。

##### 2) 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、Single PCR における検出感度は  $10^2 \sim 10^3$  CFUに減少した。一方で、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。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. 感染根管サンプルにおける *H. pylori* の検出

40症例の口腔サンプルに対して Single PCR を用いて分析を行った結果、*H. pylori* の検出率は不可逆性歯髄炎および根尖性歯周炎サンプルにおいては15.0%であった。唾液サンプルにおいては全く検出されず Nested PCR 法を用いて分析を行った場合には1サンプルからのみ *H. pylori* が検出された。また、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。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。

#### 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。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。

#### 【考察】

本研究では、48株の *H. pylori* 全ゲノム情報を基にして、信頼性の高い新規 *H. pylori* PCR 検出系を構築するとともに、Nested PCR 法により臨床検体の分析も可能な感度の高い検出系を確立することができた。また、不可逆性歯髄炎および根尖性歯周炎サンプルからの *H. pylori* の検出率が唾液サンプルからよりも高かったことから、*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内に局在しやすいことが示唆された。また、1度目のサンプル採取において *H. pylori* が検出された根管のほとんどから、2度目のサンプル採取時にも *H. pylori* が検出されたことから、明確な定着期間は不明ではあるものの、ある一定期間根管内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内への定着メカニズムの詳細を解明するために、更なる研究が必要であると考えている。

論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏 名 ( 鋸 屋 侑 布 子 )                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |               |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------------|
|                                                                                                                                                                                                                                                                                       | (職) | 氏 名           |
| 論文審査担当者                                                                                                                                                                                                                                                                               | 主 査 | 教 授 仲 野 和 彦   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 副 査 | 教 授 林 美 加 子   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 副 査 | 准教授 久 保 庭 雅 恵 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 副 査 | 講 師 村 上 智 彦   |
| <p>論文審査の結果の要旨</p> <p>本研究は、ヘリコバクター・ピロリ菌の信頼性の高い新たな分子生物学的検出法の構築を行うとともに、口腔内から採取した 131 症例の臨床サンプルを用いて菌の局在に関する分析を行ったものである。その結果、ヘリコバクター・ピロリ菌が重度のう蝕に陥った乳歯の根管内に定着することで、将来的な胃への感染の成立につながる可能性を示した。</p> <p>本研究の結果は、これまでに不明とされてきたヘリコバクター・ピロリ菌の感染経路の特定を行う上で重要な示唆を与えるものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。</p> |     |               |