The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Helicobacter pylori の感染経路と定着に関わるリスク因子の追究
Author(s)	門田, 珠実
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/82161
rights	© The Author(s) 2019 This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　門田　珠実　　）	
論文題名	*Helicobacter pylori* の感染経路と定着に関わるリスク因子の追究

論文内容の要旨

【はじめに】

Helicobacter pylori は胃・十二指腸疾患の原因菌として知られるグラム陰性の桿菌である。*H. pylori* の感染経路に関する詳細は未だ不明であるが、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* は歯周病原性細菌と類似したタンパク抗原を有していることから、口腔内においては深い歯周ポケットに存在すると考えられてきた。しかし、小児期に深い歯周ポケットが形成されることは稀であり、歯周ポケットが *H. pylori* の初期定着部位になる可能性は低いと考えられる。

一方で、小児期における主要な口腔疾患としてはう蝕が挙げられ、う蝕の主要な病原菌である *Streptococcus mutans* により形成されるバイオフィルムは成熟が進むにつれ、多様な細菌種が検出されることが報告されている。しかしながら、*S. mutans* の口腔における存在が *H. pylori* の定着に及ぼす影響については明らかになっていない。

本研究ではラットう蝕モデルを用いて、ヒトの小児期と成人期に相当する日齢に *H. pylori* を経口投与し、*H. pylori* の感染時期や *S. mutans* が引き起こすう蝕の存在が *H. pylori* の定着に及ぼす影響について検討することにした。また、ヒトの抜去歯を用いて、ヒトの口腔における *H. pylori* の検出率とう蝕罹患状態について比較することにした。さらに、口腔への *H. pylori* 定着メカニズムの一端を明らかにするために、*S. mutans* および *H. pylori* のバイオフィルム形成能の分析を行うことにした。

【材料および方法】

1. ラットう蝕モデルを用いた検討

本研究は、本学歯学研究科動物実験委員会の承認（動歯-29-031-0）を得て行った。

1）*H. pylori* の感染時期に着目した検討

Sprague-Dawley 系ラット（オス; 15日齢）に抗菌薬を3日間投与した後に、1.0×10^9 CFU に調整した *S. mutans* MT8148R 株を5日間連続で口腔に投与し、56%スクロース配合う蝕誘発性飼料を飼育終了まで与えた。その後、ヒトの小児期に相当する48日齢に *H. pylori* を投与するＡ群と、ヒトの成人期に相当する78日齢に *H. pylori* を投与するＢ群に分け、1.5×10^6 CFU に調整した *H. pylori* J99 株を5日間連続で口腔に投与した。各群のラットは *H. pylori* 感染１か月後に屠殺し、う蝕罹患状態の評価と細菌の定着率の算出、血清における *H. pylori* 抗体の評価を行った。さらに、胃・十二指腸の組織切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン染色および免疫組織染色による病理組織学的評価を行った。

2）菌感染の有無に着目した検討

1）で検討したＡ群に加えて、*H. pylori* のみを投与するＣ群、*S. mutans* のみを投与するＤ群、菌を投与しないＥ群を作製した。全てのラットは屠殺した後、1）と同様の方法を用いてう蝕罹患状態の評価や細菌の定着率の算出、血清における *H. pylori* 抗体の評価および胃・十二指腸組織の病理組織学的評価を行った。

2. ヒトの抜去歯を用いた検討

本研究は、大阪大学大学院歯学研究科倫理審査委員会の承認後（H23-E1-5, H30-E32）、被験者の同意を得て行った。159名の患者を対象とし、唾液および抜去歯を提供いただいた。抜去歯に付着したデンタルプラークを採取し、唾液検体とデンタルプラーク検体における *H. pylori* の検出を行った。また、114名の被験者は視診およびパノラマエックス線写真所見により DMFT を算出した。

3.　*S. mutans* および *H. pylori* のバイオフィルム形成能の分析

１%スクロース含有 BHI 液体培地中にて *S. mutans* および *H. pylori* 菌液をそれぞれ1.0×10^7 CFU/mL となるよう調整し、200 μL の菌液をチャンバースライドに加えて微好気性環境下において37℃で18時間培養した。その後、*S. mutans* と *H. pylori* をそれぞれ蛍光免疫染色し、光学顕微鏡を用いて形成されたバイオフィルムを観察した。

4.　統計学的分析

他群間比較は ANOVA の後 Bonferroni 法を用いて行い、二群間比較はカイ二乗検定を用いて行った。有意水準5%以下を有意差ありとした。

【結果】

1. ラットう蝕モデルを用いた検討

1）*H. pylori* の感染時期に着目した検討

Ａ群、Ｂ群ともに象牙質に及ぶう蝕を多数認め、デンタルプラークサンプルから *H. pylori* のゲノム DNA が検出された。また、血清においても *H. pylori* 抗体が検出された。一方で、ヘマトキシリンエオジン染色像ではＡ群においてのみ胃粘膜への桿菌侵入像を認め、免疫組織染色によって、これらの桿菌は *H. pylori* 特異抗体に対して陽性反応を示した。

2）菌感染の有無に着目した検討

象牙質に及ぶう蝕の本数は、Ｃ群およびＥ群と比較してＡ群において有意に高い値を認め、Ａ群においてのみデンタルプラークサンプルから *H. pylori* のゲノム DNA が検出された。また、Ａ群の血清における *H. pylori* の抗体濃度は他の群と比較して有意に高い値が認められた。さらに、Ａ群においてのみ胃粘膜への桿菌侵入像が認められ、十二指腸のびらんスコアはその他の群と比較して有意に高い値を示した。

2. ヒトの抜去歯を用いた検討

DMFT が７歯以上の被験者は、DMFT が６歯以下の被験者と比較して有意に高い *H. pylori* の検出率を認めた。また、胃・十二指腸疾患の既往がある被験者は、胃・十二指腸疾患の既往のない被験者と比較して有意に高い *H. pylori* の検出率を認めた。

3.　*S. mutans* および *H. pylori* のバイオフィルム形成能の分析

H. pylori の単独培養では単層で希薄なバイオフィルムを形成するに留まったが、*S. mutans* と *H. pylori* を共培養することで *S. mutans* により形成されたバイオフィルム内に *H. pylori* が広く分布することが示された。さらに、バイオフィルム内における *H. pylori* の割合は *H. pylori* を単独培養した場合と比較して、*S. mutans* と *H. pylori* を共培養した際に有意に高い割合を示した。

【考察】

本研究において、*S. mutans* により引き起こされたう蝕を有するラットに *H. pylori* を投与したところ、ヒトの小児期に相当する日齢に投与したラットには *H. pylori* の胃粘膜への侵入が認められ、ヒトの成人期に相当する日齢に投与したラットでは認められなかった。ヒトにおいては、う蝕経験歯数の多い被験者や胃・十二指腸疾患の既往がある被験者の口腔から *H. pylori* が多く検出された。また、バイオフィルム形成能の分析において、*H. pylori* は *S. mutans* により形成されたバイオフィルム内に広く分布することが示された。

本研究の結果から、*H. pylori* は *S. mutans* が定着しう蝕が誘発された小児期の口腔内に感染後、*S. mutans* に形成されたバイオフィルム内に定着し、う窩を介して胃へと移行して病原性を発揮している可能性が示唆された。これらのことから、小児期に *S. mutans* の口腔への定着を予防し、口腔衛生状態を良好に保つことは、早期の除菌療法とは違った *H. pylori* の根本的な感染防止策になり得ると考えられる。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　門田　珠実　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教　授	仲野　和彦
	副 査　教　授	天野　敦雄
	副 査　准教授	伊藤　祥作
	副 査　講　師	住友　倫子

論文審査の結果の要旨

本研究は、*Helicobacter pylori* の感染経路と定着に関わるリスク因子について検討したものである。その結果、ラットう蝕モデルにおいて、*H. pylori* はヒトの小児相当期にう窩を介して胃粘膜へ侵入する可能性が示された。また、7 歯以上のう蝕経験歯数あるいは胃・十二指腸疾患の既往を有する被験者の口腔サンプルでは、*H. pylori* のゲノム DNA が多く検出された。さらに、*H. pylori* は口腔バイオフィルム内に存在する際には、単独よりも *Streptococcus mutans* と共存する方が有利であることが示唆された。

本研究の結果は、これまでに詳細が不明とされてきた *H. pylori* の感染経路と定着メカニズムを解明する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。