

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	

Helicobacter pylori の感染経路と
定着に関わるリスク因子の追究

大阪大学大学院歯学研究科口腔科学専攻
口腔分子感染制御学講座小児歯科学教室

門 田 珠 実

はじめに

Helicobacter pylori は主に胃および十二指腸から分離される螺旋形のグラム陰性微好気性桿菌であり、胃癌や胃潰瘍、十二指腸潰瘍といった胃・十二指腸疾患の病原菌として知られている (Fennerty, 1994)。世界の人口の半数以上がこの *H. pylori* に感染しており、特に衛生環境の悪い発展途上国で感染率が高いと言われている (Hooi ら, 2017)。*H. pylori* は免疫機構が未確立の小児期に、飲み水や食物を介して口腔から感染すると考えられているが (Banatvala ら, 1995; Pounder と Ng, 1995)、その感染時期や感染経路の詳細は未だ不明である。

H. pylori は Warren と Marshall (1983) によって初めて胃組織から分離され、*Campylobacter* 属に類似した特性を多く有していたことから当初は *Campylobacter pylori* と命名されていた (Marshall と Goodwin, 1987)。しかし、さらなる解析によって独自の属性を有することが明らかとなり、名称が *H. pylori* に変更された (Goodwin ら, 1989)。その後は、胃および十二指腸から *H. pylori* を検出するために、尿素呼気試験や血清学的検査法といった臨床的な検出法や (Goodwin ら, 1997)、検出感度の高い PCR 法を応用した分子生物学的手法によって *H. pylori* の細菌 DNA を検出する方法が開発された (Westblom と Bhatt, 1999)。このような手法により、胃や十二指腸からだけでなく唾液やデンタルプラークといった口腔サンプルからも *H. pylori* が検出されたことが報告されている (Miyabayashi ら, 2000)。これまでに、*H. pylori* は歯周病原性細菌の一種である *Campylobacter rectus* と類似したタンパク性抗原を有することが報告されており (Ishihara ら, 2001)、口腔内においては *C. rectus* と同様に深い歯周ポケットに存在するものと思われていた (Dye ら, 2002)。しかし、小児期には深い歯周ポケットが形成されることは珍しく、小児の健常な歯肉溝から採取したデンタルプラークサンプルにおける歯周病原性細菌の検出率は極めて低いことが報告されている (Friskén ら,

1987; Wojcicki ら, 1987)。そのため、*H. pylori* の感染が成立すると考えられている小児期において、歯周ポケットが *H. pylori* の初期定着部位となる可能性は低いと考えられる。

一方で、小児期の主要な口腔疾患としてはう蝕が挙げられる (Andres と Karen, 2017)。う蝕の主要な病原菌として知られている *Streptococcus mutans* はグラム陽性通性嫌気性のレンサ球菌であり (Hamada と Slade, 1980)、乳幼児期に主として母親をはじめとする家族から口腔を介して感染するとされている (Caufield ら, 1993)。*S. mutans* は歯面上でスクロースを代謝してバイオフィルムを形成し、酸を産生することで歯の脱灰を引き起こす (Eckert ら, 2006)。また、成熟したバイオフィルムやう蝕病変部からは、多様な細菌種が検出されることが報告されている (Krzyściak ら, 2014)。しかしながら、う蝕や *S. mutans* の存在が、*H. pylori* の口腔および胃・十二指腸組織への感染成立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 *S. mutans* を口腔内に定着させたラットう蝕モデルを用いて、小児期および成人期に相当する日齢に *H. pylori* を経口投与し、*H. pylori* の感染時期について検討した。次に、*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ため、投与する菌の組み合わせが異なる 4 群のラットを設定して比較を行った。また、ヒトの抜去歯における *H. pylori* の検出率とう蝕罹患状態の関係についても検討した。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った。

材料と方法

1. 供試菌および培養条件

1) *H. pylori* 菌株と培養条件

H. pylori は J99 (ATCC 700824) 株を住商ファーマインターナショナル株式会社 (東京) より購入した。J99 株は、血液寒天培地 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) に播種し、微好気環境下にて 37°C で 3 日間静置培養した。その後、血液寒天培地上のコロニーを 1 mL の馬血清を添加した 10 mL のブルセラ液体培地 (Becton Dickinson) に釣菌し、微好気環境下にて 37°C で 24 時間振盪培養して実験に使用した。

2) *S. mutans* 菌株と培養条件

S. mutans は、本研究室に保管している日本人小児口腔由来の MT8148 株にストレプトマイシン耐性を付与した MT8148R 株を使用した (Nomura ら, 2004)。MT8148R 株は、ストレプトマイシン (1,500 µg/mL, 富士フィルム和光純薬, 大阪)、バシトラシン (0.2 U/mL; Sigma Chemical Co., St. Lois, MO, USA) および 15%スクロース (富士フィルム和光純薬) を添加した Mitis-Salivarius (MSB) 寒天培地 (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) に播種し、95%窒素および 5%炭酸環境 (嫌気環境) 下にて 37°C で 48 時間静置培養した。その後、MSB 寒天培地上のコロニーを釣菌し、ストレプトマイシン (1,500 µg/mL) を添加した Brain Heart Infusion 液体培地 (Difco Laboratories) を用いて 37°C で 18 時間培養して実験に使用した。

2. ラットう蝕モデルを用いた検討

本研究はアメリカ国立衛生研究所および AERI-BBRI 動物実験委員会のガイドラインに従い、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認を得て行った (承認番号; 29-031-0)。

1) *H. pylori* の感染時期に着目した検討

実験スケジュールを図 1 に示す。本研究には、Specific pathogen-free (SPF) の Sprague-Dawley (SD) 系ラット (15 日齢オス, 76 匹, 日本クレア, 東京) を用いた。これらのラットは、ヒトの小児期 (約 10 歳) に相当する 48 日齢に *H. pylori* を投与する群 (A 群, n=10) とヒトの成人 (約 20 歳) に相当する 78 日齢に *H. pylori* を投与する群 (B 群, n=10) に分けた (Sengupta, 2013)。

S. mutans 株は、BHI 液体培地にて培養した菌液を滅菌生理食塩水を用いて $OD_{550} = 1.0$ (1.0×10^9 CFU/mL 相当) に調整し、10 倍に希釈することで 1.0×10^8 CFU/mL 相当の菌液を準備した。*H. pylori* 株は、ブルセラ液体培地にて振盪培養した菌液を滅菌生理食塩水を用いて $OD_{550} = 0.4$ (1.5×10^6 CFU/mL 相当) に調整した。全ての 18 日齢のラットに対して *S. mutans* 菌液 100 μ L を 5 日間連続で経口投与し、口腔内に *S. mutans* を定着させた。次に、A 群の 48 日齢のラットと B 群の 78 日齢のラットに *H. pylori* 菌液 100 μ L を 5 日間連続で経口投与した。

ラットのう蝕は Ooshima ら (1998) の方法を用いて誘発させた。全ての 15 日齢のラットに対し、テトラサイクリン (4 mg/g) を添加した普通食 (日本クレア) およびペニシリン G (4000 U/mL, Meiji Seika ファルマ, 東京) を添加した蒸留水を 3 日間与えた。その後は、56%スクロース含有う蝕誘発性飼料 (Diet 2000, 日本クレア) を実験終了まで与え、A 群のラットは全て 82 日齢まで飼育し、B 群のラットは全て 112 日齢まで飼育した。すべてのラットは、Kawai ら (2011) の方法にてイソフルラン吸入麻酔液 (ファイザー, 東京) による吸入麻酔後、滅菌蒸留水 45 mL に塩酸メデトミジン (日本全薬工業, 福島) 0.75 mL、ミダゾラム (アステラス製薬, 東京) 2 mL および酒石酸ブトファノール (Meiji Seika ファルマ) 2.5 mL を加えて調製した三種混合麻酔薬を、体重 10 g あたり 0.1 mL 腹腔内に投与することにより安楽死させた。その後、顎骨、胃組織および十二指腸組織、血液を摘出して以降の検討に使用した。

(1) う蝕罹患状態の評価

27 ゲージの滅菌注射針を用いて上下片顎の歯牙に付着したデンタルプラークを除去し、う蝕状態について実体顕微鏡を用いて観察した (Ooshima ら, 1998)。上下顎片側第一臼歯、第二臼歯および第三臼歯 (合計 6 歯) を対象として、実質欠損を認めないもの (図 2 A) もしくは実質欠損を伴った象牙質に及ぶう蝕を認めるもの (図 2 B) に分類した。

(2) 口腔における *H. pylori* のゲノム DNA の検出率

(1) で顎骨から除去したデンタルプラークを 1 mL の滅菌生理食塩水が入った滅菌試験管に採取した。採取したデンタルプラークサンプルから、Puregene Yeast/Bact. Kit B (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて細菌 DNA を抽出した (Nakano ら, 2004)。まず、1 mL の滅菌生理食塩水に懸濁したデンタルプラークサンプルを遠心分離して回収し、250 μ L の Glu-TE Buffer (1M グルコース, 10mM 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1, 3-プロパンジオール, 1mM エチレンジアミン四酢酸) に懸濁した。この懸濁液 250 μ L に、N-アセチルムラミターゼ (2.0 mg/mL; 生化学工業, 東京) 62.5 μ L と塩化リゾチーム (10 mg/mL; 富士フイルム和光純薬) 0.25 μ L を加え、37°C で 90 分間反応させた。その反応液に、Cell Lysis Solution (QIAGEN) 600 μ L を加えて 80°C で 5 分間反応させた後、RNase (10 mg/mL; QIAGEN) 3 μ L を添加して 37°C で 30 分間静置し、Protein Precipitation Solution (QIAGEN) 200 μ L を加えてボルテックスにて 20 秒間激しく懸濁させた。この反応液を遠心分離して得られた上清に、600 μ L のイソプロパノール (富士フイルム和光純薬) を添加して混和し、再度遠心分離を行った。得られた沈殿を 70% エタノール (富士フイルム和光純薬) にて洗浄して乾燥後、DNA Hydration Solution (QIAGEN) 100 μ L に溶解した。

抽出した DNA サンプルを用いて、全ての細菌の 16S rRNA 遺伝子上の共通領域に設計されたユニバーサルプライマー (PA/PD) を用いた Polymerase Chain Reaction (PCR)

法により細菌 DNA が抽出できていることを確認した (Marques da Silva ら, 2006)。本研究で用いたプライマーの塩基配列を表 1 に示す。また、細菌 DNA 溶液中に存在する *H. pylori* の検出は、*ureA* 遺伝子上に設計した特異プライマーを用いた Nested PCR 法により行った (Nomura ら, 2018)。まず、Single PCR では、各検体から検出した細菌 DNA 2 μ L、0.5 μ L のプライマー (*ureA*-aF / *ureA*-bR) および *TaKaRa Ex Taq*[®] (タカラバイオ, 大津) を添付のプロトコールに従って合計 20 μ L に調製した。ポジティブコントロールとして J99 株から抽出したゲノム DNA、ネガティブコントロールとして滅菌蒸留水を使用した。Nested PCR では、Single PCR で得られた PCR 産物 1 μ L、0.5 μ L のプライマー (*ureA*-bF / *ureA*-aR) および *TaKaRa Ex Taq*[®] (タカラバイオ) を用いて合計 20 μ L に調製した。DNA の増幅はサーマルサイクラー (iCycler; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を使用して、95°C で 4 分間の熱変性後、95°C で 30 秒間の熱変性、55°C で 30 秒間のアニーリング、72°C で 30 秒間の伸長反応を 30 サイクル行い、最後に 72°C で 7 分間伸長反応を行った。PCR 産物の電気泳動は、TAE 緩衝液 (40 mM Tris, 40 mM 酢酸, 1 mM EDTA, pH8.0; 富士フイルム和光純薬) に 1.5% アガロース S (ニッポンジーン, 東京) を加えて加熱溶解したものをゲルとして使用し、TAE 緩衝液に 100 V の定電圧を流すことにより行った。DNA サイズマーカーとして、100 bp DNA ラダー (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) を使用した。電気泳動後、ゲルを臭化エチジウム (0.5 μ g/mL) 溶液で染色し、FAS4 ゲル撮影装置 (日本ジェネティックス株式会社, 東京) を用いて波長 312 nm の紫外線を照射することにより DNA のバンドを可視化し、*H. pylori* の検出率を算出した。

(3) 口腔における *S. mutans* の検出率

摘出した顎骨のうち、下顎を 10 mL の滅菌生理食塩水が入った滅菌容器に浸漬した。その後、超音波洗浄器 (US-103, エスエヌディ, 長野) にて 10 分間の超音波処理を行うことにより顎骨に付着したデンタルプラークを剥離させ、ストレプトマイシン (1,500

μg/mL) を添加した MSB 寒天培地に播種した。37℃の嫌気環境下で 48 時間培養後、寒天培地上のコロニー形態を実体顕微鏡にて観察し、*S. mutans* の検出率を算出した。

(4) 胃組織および十二指腸組織の病理組織学的評価

摘出した胃組織および十二指腸組織を 10%中性緩衝ホルマリン液（富士フイルム和光純薬）で固定してパラフィンにて包埋後、3 μm の組織切片を作製してヘマトキシリンエオジン（Haematoxylin-Eosin; HE）染色を行った。病理組織学的評価は国際毒性病理用語・診断基準統一化委員会（International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria for Lesions in Rats and Mice）が定める基準（Nolte ら, 2016）を参考にして、光学顕微鏡を用いて個体間に差異を認める組織変化について評価を行った。

また、HE 染色による病理組織学的評価において胃粘膜へ桿菌の侵入を認めた胃組織に対し、Kojima ら（2012）の方法に従って免疫組織染色を行った。まず、脱パラフィンした組織切片を 3% H₂O₂、10%ヤギ血清（ニチレイバイオサイエンス、東京）にてブロッキングをした後、リン酸緩衝生理食塩水（Phosphate buffered saline; PBS）で 1:500 に希釈した抗 *H. pylori* ポリクローナル抗体（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）を一次抗体として用いて室温で 50 分間反応させた。その後、二次抗体としてヒストファインシンプルスステインラット MAX-PO（MULTI）（ニチレイバイオサイエンス）を室温で 30 分間反応させて発色させた。さらに、マイヤーヘマトキシリン（ニチレイバイオサイエンス）にて核染色を行い、光学顕微鏡を用いて染色した組織切片を観察した。

(5) 血清における *H. pylori* 抗体濃度の測定

Nakagawa ら（2005）の方法に従い、屠殺したラットから採取した血清に含まれる *H. pylori* 抗体について評価した。まず、0.1M PBS（pH 7.4）（富士フイルム和光純薬）に 1.0×10^7 CFU 相当となるよう *H. pylori* を懸濁した後に超音波発生機（ULTRASONIC DISRUPTOR UD-201; トミー精工、東京）を用いて 5 分間細菌を破碎した。破碎処理した菌液を 96 穴プレート（Becton Dickinson）の各ウェルに 100 μL ずつ加え、さらに 10%

中性緩衝ホルマリン溶液を添加して 4℃で 18 時間静置した。PBS で 3 回洗浄した後、PBS にスキムミルク (Difco Laboratories) を 0.01 mg/mL となるよう添加した PBS-S を各ウェルに 100 μ L ずつ加えた。37℃で 1 時間静置した後に PBS で 3 回洗浄し、PBS にて 1:500 に希釈した血清を各ウェルに 100 μ L ずつ加え、37℃で 2 時間静置した。ポジティブコントロールとして 1:500 に希釈した抗 *H. pylori* ポリクローナル抗体 (200 μ g/mL, Thermo Fisher Scientific)、ネガティブコントロールとして滅菌蒸留水を使用した。PBS で 3 回洗浄後、PBS-S に 25 μ g/mL となるよう溶解した PROTEIN G HRP CONJUGATE (Millipore, Burlington, MA, USA) を各ウェルに 100 μ L ずつ加え、37℃で 1 時間静置した。基質溶液には、塩酸 (富士フイルム和光純薬) に 10 mg/mL となるよう溶解した o-フェニレンジアミン (富士フイルム和光純薬) 90 μ L、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) (富士フイルム和光純薬) 10 mL および 30%過酸化水素水 (富士フイルム和光純薬) 1 μ L を混合したものを使用した。調製した基質溶液を各ウェルに 100 μ L ずつ加え、室温で 5 分間反応させて発色させ、1 M 硫酸 (富士フイルム和光純薬) 50 μ L を加えることで発色を停止させた。マイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて各ウェルの OD₄₅₀ 値を測定した。ポジティブコントロールとして用いた抗 *H. pylori* ポリクローナル抗体の濃度 (200 μ g/mL) と測定した OD₄₅₀ 値をもとに、各検体における OD₄₅₀ 値を *H. pylori* 抗体濃度へと換算した。

2) 菌感染の有無に着目した実験

実験スケジュールを図 3 に示す。1) で検討した 18 日齢時に *S. mutans* を投与後、48 日齢時に *H. pylori* を投与する A 群 (n=10) に加えて、48 日齢時に *H. pylori* の投与のみを行う群 (C 群; n=10)、18 日齢時に *S. mutans* の投与のみを行う群 (D 群; n=10)、菌を投与しない群 (E 群; n=10) 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、口腔における *S. mutans* および *H. pylori* の検出率の算出、胃組織および十二指腸組織の病理組織学的評価、血清における *H. pylori* 抗

体濃度の測定を行った。

3. ヒトの口腔における *H. pylori* のゲノム DNA の検出率

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：H23-E1-5, H30-E32）、被験者の同意を得て行った。2016 年から 2020 年にかけて重度のう蝕や歯周炎などの理由で抜歯が必要となり、大阪大学歯学部附属病院を受診した 159 名の患者を対象とし、問診後に唾液および抜去歯を提供いただいた。10 mL の滅菌生理食塩水に保存された抜去歯を超音波洗浄器にて 10 分間超音波処理し、歯に付着したデンタルプラークを採取した。得られたそれぞれの口腔サンプルから細菌 DNA を抽出し、Nested PCR 法により *H. pylori* の存在の有無を検討した。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。

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

S. mutans により形成されるバイオフィルムと *H. pylori* の口腔への定着との関係を検討するため、*H. pylori* と *S. mutans* を共培養して形成されたバイオフィルムを分析した。1%スクロース含有 BHI 液体培地にて *H. pylori* および *S. mutans* 菌液をそれぞれ 1.0×10^7 CFU/mL となるよう調整した。調整した菌液 200 μ L をチャンバースライド（Culture WellTM, Grace Bio Labs, Bend, OR, USA）に加え、微好気性環境下において 37°C で 18 時間培養した。培養後、浮遊している細菌を PBS で洗浄し、形成されたバイオフィルムを 3%パラホルムアルデヒド（富士フイルム和光純薬）により 10 分間固定した。*S. mutans* の染色には、ウサギ抗 PA 抗体（Nakano ら, 2006）を一次抗体とし、Alexa Fluor 633 conjugated goat anti-rabbit IgG（Molecular Probes[®], Life Technologies Co., Eugene, OR, USA）を二次抗体として使用した。*H. pylori* の染色にはウサギ抗 *H. pylori* 抗体（Thermo Fisher Scientific）を一次抗体とし、Alexa Fluor 533 conjugated goat anti-rabbit IgG

(Molecular Probes[®], Life Technologies Co., Eugene, OR, USA) を二次抗体として使用した。各種抗体は 0.5% Bovine Serum Albumin (BSA; SIGMA-ALDRICH, St. LOUIS, USA) 含有 PBS にて 1:500 に希釈し、チャンバースライドに 200 μ L 加えて室温で 30 分間反応させた。各種抗体を加える前後には、チャンバースライドを PBS で洗浄した。形成されたバイオフィルムを TCS-SP5 顕微鏡 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) および DMI6000 B 蛍光顕微鏡 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) の 63 \times 油浸対物レンズを用いて観察した。さらに、チャンバースライド内に含まれる *H. pylori* の割合を測定するため、それぞれの共焦点レーザー顕微鏡像を 10 分割し、ImageJ ソフトウェア (National Institution of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて分析した。

5. 統計学的分析

統計分析はコンピュータのソフトウェアパッケージである GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) を用いて行った。多群間の統計学的有意差の検定には ANOVA の後 post-hoc 解析として Bonferroni 法を用いて行い、二群間の統計学的有意差の検定に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. *H. pylori* の感染時期に着目した検討

1) う蝕罹患状態の評価

ヒトの小児期に相当する 48 日齢に *H. pylori* を投与した A 群とヒトの成人期に相当する 78 日齢に *H. pylori* を投与した B 群では、ともに象牙質に及ぶ実質欠損を伴うう蝕が多数認められた (図 4)。

2) 口腔における *S. mutans* および *H. pylori* の検出率

S. mutans は全てのラットのデンタルプラークサンプルより検出された (図 5)。一方で、ヒトの小児期に相当する 48 日齢で *H. pylori* を投与した A 群のラット 10 匹のうち 5 匹 (50%) の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、ヒトの成人期に相当する 78 日齢で *H. pylori* を投与した B 群のラット 10 匹のうち 4 匹 (40%) の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。

3) 胃組織および十二指腸組織の病理組織学的評価

HE 染色により、ヒトの小児期に相当する 48 日齢で *H. pylori* を投与した A 群のラット 10 匹のうち 9 匹 (90%) において胃粘膜への桿菌侵入像を認め、B 群と比較して有意に高い侵入率を認めた ($P<0.001$) (図 6、7)。さらに、免疫組織染色により、これらの胃粘膜へ侵入した桿菌は *H. pylori* 特異抗体に対して陽性反応を示した (図 8)。

胃組織における胃粘膜脱落、角化嚢胞、上皮の過角化、腸上皮化生、炎症性細胞浸潤、限局性びらの典型像およびスコアを図 9 から図 15 に示す。また、十二指腸組織におけるびらの典型像およびスコアを図 16、17 に示す。A 群、B 群ともに胃組織および十二指腸組織において組織変化を認めたが、両群のスコアに有意差は認められなかった。

4) 血清における *H. pylori* 抗体濃度の測定

A 群、B 群ともにポジティブコントロールと同等の *H. pylori* 抗体濃度であることが示されたが、両群の値の間に有意差は認められなかった (図 18)。

2. 菌感染の有無に着目した検討

1) う蝕罹患状態の評価

象牙質に及ぶう蝕の本数は、*H. pylori* を単独で投与した C 群および菌を投与していない E 群と比較して、*S. mutans* および *H. pylori* をともに投与した A 群において有意に高い値を認めた ($P<0.01$) (図 19)。また、*S. mutans* を単独で投与した D 群は、菌を投与していない E 群と比較して象牙質に及ぶう蝕の本数が有意に高い値を示した ($P<0.05$)。

2) 口腔における *S. mutans* および *H. pylori* の検出率

S. mutans は、*S. mutans* と *H. pylori* を両方投与した A 群および *S. mutans* を単独で投与した D 群のラットのデンタルプラークサンプルの全てにおいて検出され、*S. mutans* を感染させていないラットからは検出されなかった (図 20)。一方で、*H. pylori* のゲノム DNA は A 群のラット 10 匹のうち 5 匹 (50%) のデンタルプラークサンプルにおいてのみ検出され、*H. pylori* を単独で投与した C 群からは検出されなかった。

3) 胃組織および十二指腸組織の病理組織学的評価

HE 染色により、*S. mutans* および *H. pylori* をともに投与した A 群のラットの 90% において胃粘膜への桿菌侵入像を認め、他の群と比較して有意に高い侵入率を認めた ($P<0.001$) (図 21)。胃組織における病理組織評価の結果から、胃粘膜脱落は A 群において高いスコアを認める傾向を示したが、各群間のスコアには有意差を認めなかった (図 22)。また、角化嚢胞、上皮の過角化、腸上皮化生、炎症性細胞浸潤、限局性びらんにおいても、各群間のスコアに有意差を認める項目は存在しなかった。十二指腸組織における病理組織評価の結果から、A 群におけるびらんのスコアは、その他の群と比較

して有意に高いスコアを示した ($P<0.05$) (図 23)。

4) 血清における *H. pylori* 抗体濃度の測定

H. pylori および *S. mutans* をともに投与した A 群における *H. pylori* 抗体濃度は他の群と比較して有意に高い値を認めた ($P<0.05$) (図 24)。

3. ヒトの口腔における *H. pylori* の検出率

DMFT が 6 歯以下の被験者 31 名のうち 4 名から採取した口腔サンプルにおいて *H. pylori* のゲノム DNA が検出された。一方で、DMFT が 7 歯以上の被験者 83 名のうち 29 名 (34.9%) が *H. pylori* 陽性であり、DMFT が 6 歯以下の被験者と比較して有意に高い検出率を認めた ($P<0.05$) (図 25)。

また、29 歳以下の被験者 51 名うち 8 名 (15.7%) の口腔サンプルから *H. pylori* のゲノム DNA が検出された。一方で、30 歳から 49 歳の被験者 57 名のうち 21 名 (36.8%)、50 歳から 69 歳の被験者 24 名のうち 9 名 (37.5%) の口腔サンプルから *H. pylori* のゲノム DNA が検出され、29 歳以下の被験者と比較して有意に高い検出率を認めた ($P<0.05$) (図 26)。

さらに、胃・十二指腸疾患の既往のない被験者 130 名のうち 33 名 (25.4%) から採取した口腔サンプルにおいて *H. pylori* のゲノム DNA が検出された。一方で、胃・十二指腸疾患の既往がある被験者 29 名のうち 13 名 (44.8%) が *H. pylori* 陽性であり、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検出率を認めた ($P<0.05$) (図 27)。

4. バイオフィルム形成能の分析

バイオフィルムを横断面から二次元的に観察したところ、1%スクロース含有 BHI 液体培地を用いた *H. pylori* の単独培養および *S. mutans* と *H. pylori* の共培養の両方で、

H. pylori の存在が確認された (図 28)。一方で、形成されたバイオフィルムを側面から観察もしくは三次元構築した場合には、*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 *H. pylori* がより多量に分布していることが確認された (図 29、30)。さらに、チャンバースライド内において *H. pylori* が占める菌量の割合は、*S. mutans* および *H. pylori* をそれぞれ単独培養した場合と比較して、*S. mutans* と *H. pylori* を共培養した場合に有意に高い割合を示した ($P<0.001$) (図 31)。

考察

H. pylori は胃および十二指腸に定着して胃炎や十二指腸潰瘍、胃癌といった胃・十二指腸疾患を引き起こす (Fennerty, 1994)。日本において、悪性新生物は死因の上位を占めており (厚生労働省, 2019)、胃癌はその中でも上位に位置していることが報告されている (国立がん研究センター, 2018)。また、*H. pylori* 感染者は非感染者と比較して胃癌リスクが 15 倍以上であると言われているため (Uemura ら, 2001)、胃癌のリスク因子となる *H. pylori* 感染を予防することは日本における大きな疫学的課題の一つである。衛生環境の悪い発展途上国を中心として、世界の人口の半数以上が *H. pylori* に感染していると考えられており (Hooi ら, 2017)、日本においては生活環境の改善により感染者は減少しているものの、依然として感染人口は多いと言われている (Ueda ら, 2014; Kamada ら, 2015)。*H. pylori* は小児期に飲み水や食物を介して口腔から感染すると考えられているが (Banatvala ら, 1995; Pounder と Ng, 1995)、感染時期や感染経路の詳細は未だ不明である。

現在に至るまでに *H. pylori* を検出するための様々な方法が開発されており (Goodwin ら, 1997; Westblom と Bhatt, 1999)、*H. pylori* 感染が確認された患者は一般的に抗菌薬とプロトンポンプ阻害剤を併用した除菌療法が推奨されている (The National Institutes of Health Consensus Conference, 1994)。しかし、除菌療法によって胃および十二指腸から *H. pylori* が検出されなくなった後に、再感染を認めるケースが増加している (Hu ら, 2017)。*H. pylori* は胃や十二指腸からだけでなく、口腔からも検出されることが示されていることから、口腔が胃および十二指腸以外の定着箇所の一つであり、除菌成功後に口腔に定着していた *H. pylori* が胃および十二指腸への再感染を引き起こしているのではないかと考えられている (Miyabayashi ら, 2000)。

口腔内の定着部位として、*H. pylori* は歯周病原性細菌と類似した抗原タンパクを有

することが判明していることもあり (Ishihara ら, 2001)、歯周病原性細菌と同様に深い歯周ポケット内が考えられている (Dye ら, 2002)。しかしながら、*H. pylori* の感染が成立するとされる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、*H. pylori* の初期定着部位として歯周ポケットは想定し難い。そこで本研究では、小児期の主要な口腔疾患であるう蝕に着目することにした。ヒトにおいて、*S. mutans* は主に 19 か月から 31 か月の幼児に感染すると考えられており (Caufield ら, 1993)、ラットでは 18 日齢に *S. mutans* を経口投与することで口腔に *S. mutans* を定着させ (Ooshima ら, 1998)、56% スクロース含有う蝕誘発性飼料を与えることでう蝕を誘発することができる。本研究では、このラットう蝕モデルを用いてラットの口腔に *H. pylori* を投与することで、*H. pylori* 感染ラットう蝕モデルの作製に成功した。

H. pylori 感染ラットう蝕モデルにおいて、口腔から *H. pylori* のゲノム DNA が検出され、血清においても *H. pylori* 抗体が検出された。さらに、胃組織および十二指腸組織では、*H. pylori* に起因する胃炎の主な症候とされている病理組織学的変化を認めた (Smoot, 1997; Gisbert ら, 1997)。*H. pylori* は体内に侵入すると CagA や VacA といった病原毒素を細胞内へ注入して急性炎症を引き起こし (Yamaoka ら, 1996; Mohommadi ら, 1996; Reytrat ら, 1999; Marshall, 2002)、*H. pylori* を捕捉した Th1 細胞が獲得免疫反応を引き起こすことによって持続的な慢性炎症へと移行することが報告されている (Mohommadi ら, 1996; D'Elis ら, 1997)。これらのことから、ラットう蝕モデルに投与した *H. pylori* は口腔に定着した後に胃へと移行し、胃および十二指腸に定着して病原性を発揮したと考えられる。

H. pylori 感染ラットう蝕モデルを用いて *H. pylori* の感染時期を検討したところ、胃粘膜への *H. pylori* と思われる桿菌の侵入像はヒトの小児期に相当する日齢に *H. pylori* を投与したラットにおいてのみ認められた。*H. pylori* は免疫機構が未確立である小児期に侵入することで胃への定着が成立して生涯に渡る持続的な感染を引き起こすと考

えられており (Gold ら, 1997)、免疫機構が確立された後に侵入しても免疫反応によって体内から排除されると推測されている (Cullen ら, 1993)。また、*H. pylori* 感染時の免疫応答として腸管免疫系の関与が注目されており、出生時には抗原感作を受けていない未熟な状態で発達過程にある乳幼児期のマウスでは、T 細胞や IgA 産生細胞数が成熟したマウスと比較して少ないことが報告されている (Parrott ら, 1990; Ter Steege ら, 1997)。これらのことから、本研究においても *H. pylori* は免疫機構がまだ確立されていない小児期に体内へ侵入したことで胃粘膜へ侵入できたと考えられる。今後は、ヒトの小児期に相当する日齢に *H. pylori* を投与したラットをさらに長期飼育して、胃粘膜における *H. pylori* の持続的な定着の有無について検討を行う必要があると考えている。

菌感染の有無に着目した検討においては、*S. mutans* と *H. pylori* の両方を投与した群のラットでのみ口腔へ *H. pylori* は定着し、他の群と比較して最も多くの歯がう蝕に罹患していた。過去の報告によると、*H. pylori* は口腔レンサ球菌によって形成されるバイオフィルムの菌叢バランスを変化させる可能性があり、*H. pylori* がバイオフィルムの形成に関与する口腔レンサ球菌のシグナル伝達に影響を及ぼすと考えられている (Zhang ら, 2018)。このことから、*S. mutans* によるう蝕が存在する口腔内に *H. pylori* を感染させることで、口腔内の菌叢バランスが変化してう蝕が重篤化した可能性があると考えられる。このことを示すためには、今後は各群のラットの口腔細菌叢の詳細な解析を行う必要があると思われる。

S. mutans と *H. pylori* の両方を投与した群のラットでは、胃粘膜への *H. pylori* の侵入像を認め、他の群のラットと比較してより重度の胃粘膜脱落を認めた。胃粘膜脱落は迅速に治癒することが報告されており (Mimuro ら, 2007)、より重度の胃粘膜脱落が生じたことで治癒前に *H. pylori* が上皮内に侵入し、留まることができた可能性が考えられる。また、*S. mutans* と *H. pylori* の両方を投与した群のラットでは、血清における *H. pylori* 抗体濃度が他の群と比較して多いことが示された。本研究の結果から、*S. mutans*

は *H. pylori* の胃粘膜への侵入および病原性に密接に関与していることが示された。しかしながら、これらのラットは胃潰瘍や胃癌といった深刻な胃・十二指腸疾患には至らなかった。*H. pylori* 感染は、塩分過多や喫煙などの他のリスク因子と組み合わせることで、より重度な胃・十二指腸疾患の発症に至ると考えられている (Wroblewski ら, 2010)。そのため、ラットう蝕モデルにおいてより重度な胃・十二指腸症状を誘発するためには、飼料に食塩を混合させる等、これらのリスク因子と本研究で用いた細菌感染とを組み合わせる必要があると考えられる。

ヒトの抜去歯を用いた検討において、30 歳から 69 歳の被験者の口腔サンプルから *H. pylori* のゲノム DNA が多く検出された。日本の歯科疾患実態調査において、12 歳の小児におけるう蝕罹患率は 1977 年にピークをむかえ、1980 年から 1990 年にかけて緩やかに減少し、1990 年以降はフッ化物等の普及により大きな減少傾向を認めたことが報告されている (日本口腔衛生学会, 2013)。このことから、本研究における 30 歳から 69 歳の被験者はう蝕罹患率の高い時代に小児期を過ごしていたと考えられる。また、う蝕経験歯数が日本人の平均値を上回る成人の口腔サンプルから *H. pylori* のゲノム DNA が多く検出された。小児期に多くの乳歯がう蝕に罹患していた場合に、永久歯においてもう蝕が多発する傾向を認めることが知られている (Ter Pelkwijk ら, 1990)。これらのことから、本研究の被験者は、乳歯列期から高いう蝕感受性を有したことにより小児期に *H. pylori* が定着した可能性が考えられる。さらに、胃・十二指腸疾患の既往のある被験者の口腔サンプルから *H. pylori* のゲノム DNA が多く検出された。この結果から、口腔に *H. pylori* が定着していることで、*H. pylori* が胃へ移行する可能性が高まり、胃・十二指腸疾患を発症するリスクが高まったと考えられる。

一方で、混合歯列期の健常な歯肉溝から採取した口腔サンプルにおいて、わずかではあるが歯周病原性細菌が検出されたことが報告されている (Okada ら, 2000)。この研究では、乳歯の歯肉溝に存在した歯周病原性細菌が乳歯の脱落部位に残存し、混合歯列

期の永久歯の歯肉溝においても生存する可能性があると考えられている。今後は、乳歯列期および混合歯列期を含む小児の被験者や胃・十二指腸疾患の既往がある被験者を対象とした大規模な検討を行いたいと考えている。

バイオフィルム形成能の分析においては、*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 *S. mutans* と共存する方が有利になることが示された。*H. pylori* はウレアーゼを産生し、胃酸に含まれる尿素をアンモニアに分解して周囲を覆うことで酸性度を調整して生存している (Dunn ら, 1997)。口腔内は尿素が含まれる唾液が常に存在する上に、*S. mutans* はスクロース存在下で酸を産生することができることから (Eckert ら, 2006)、*S. mutans* により形成されるバイオフィルムは *H. pylori* が生存しやすい環境である可能性がある。一方で、*S. mutans* によって形成されるバイオフィルムは、成熟が進むにつれて多様な細菌種が検出されるようになる (Krzyściak ら, 2014)。これらのことから、歯面上に *S. mutans* を含むバイオフィルムが形成されることは *H. pylori* 定着のリスク因子になると考えられた。

H. pylori 感染はその持続に伴って胃癌などの重度な胃・十二指腸疾患を発症するリスクが高まり (Kikuchi ら, 2000)、感染早期の除菌療法は胃癌予防効果が高いと推測されている (Take ら, 2007)。そのため、胃癌リスクの高い日本においては、*H. pylori* 感染の有無を早期にスクリーニングして対応することが重要であると考えられるが、小児期に *H. pylori* 関連疾患を発症することは稀であることから (Kalach ら, 2017)、小児期からの検査はあまり普及していない (Sabbagh ら, 2019)。本研究の結果から、*H. pylori* は *S. mutans* により形成されたバイオフィルム内に定着することが示唆されたことから、デンタルプラークサンプルを用いた簡便な *H. pylori* スクリーニング法を確立することは、小児期からの *H. pylori* 感染発見に貢献できる可能性があると思われる。また、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。

結論

H. pylori の感染経路と定着に関わるリスク因子を追求するため、*H. pylori* 感染ラットう蝕モデルとヒトの抜去歯を用いた検討およびバイオフィーム形成能の分析を行ったところ、以下の結果が示された。

1. *H. pylori* 感染ラットう蝕モデルにおいて、*H. pylori* はヒトにおける小児相当期にう窩を介して胃へと移行し、定着することが示唆された。
2. *H. pylori* 感染ラットう蝕モデルにおいて、*S. mutans* により誘発されるう蝕が存在することで *H. pylori* が胃粘膜へ侵入しやすいことが示唆された。
3. ヒトにおいて、30 歳から 69 歳の被験者、DMFT が 7 歯以上の被験者および胃・十二指腸疾患の既往がある被験者の口腔サンプルからは、*H. pylori* のゲノム DNA が多く検出された。
4. *H. pylori* は口腔バイオフィーム内に存在する際には、単独よりも *S. mutans* と共存する方が有利であることが示された。

以上の結果から、*H. pylori* は *S. mutans* が定着してう蝕が誘発された小児期の口腔内に感染後、*S. mutans* により形成されたバイオフィーム内に存在することで、口腔への定着が成立する可能性が示唆された。さらに、う窩を介して *H. pylori* は胃へと移行して胃粘膜に定着し、病原性を発揮する可能性が示唆された。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始御懇意なる御指導および御校閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔科学専攻口腔分子感染制御学講座小児歯科学教室 仲野 和彦 教授に心から謝意を表します。また、本研究を遂行するにあたり、終始様々な御指導および御校閲を頂きました大阪大学大学院歯学研究科口腔科学専攻口腔分子感染制御学講座小児歯科学教室 野村 良太 准教授および鋸屋 侑布子 助教に厚く御礼申し上げます。さらに、抜去歯の御提供を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔科学専攻顎口腔病因病態制御学講座口腔外科第二教室 鵜澤 成一 教授および濱田 正和 助教、病理組織学的評価に関しまして様々な御教示を頂きました麻布大学獣医学科薬理学教室 岩下直樹 博士に厚く御礼申し上げます。

最後に、終始研究に対し、御援助、御助力頂いた大阪大学大学院歯学研究科口腔科学専攻口腔分子感染制御学講座小児歯科学教室の皆様には厚く御礼申し上げます。

文献

- Andres, G., and E. N. Karen.** 2017. The oral microbiome of children: development, disease and implications beyond oral health. *Microb. Ecol.* 73, 492-503.
- Banatvala, N., L. Clements, Y. Abdi, J. Y. Graham, J. M. Hardie, and R. A. Feldman.** 1995. Migration and *Helicobacter pylori* seroprevalence: Bangladeshi migrants in the U. K. *J. Infect.* 31, 133-135.
- Caufield, P. W., G. R. Cutter, and A. P. Dasanayake.** 1993. Initial acquisition of *mutans streptococci* by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J. Dent. Res.* 72, 37-45.
- Cullen, D. J. E., B. J. Collins, K. J. Christiansen, J. Epis, J. R. Warren, I. Surveyor, and K. J. Cullen.** 1993. When is *Helicobacter pylori* infection acquired? *Gut.* 34, 1681-1682.
- D' Elios, M. M., M. Manghetti, M. De. Carli, F. Costa, C. T. Baldari, D. Burroni, J. L. Telford, S. Romagnani, and G. Del. Prete.** 1997. T helper 1 effector cell specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *J. Immunol.* 158, 962-967.
- Dunn, B. E., H. Cohen, and M. J. Blaser.** 1997. *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbio. Rev.* 10, 720-741.
- Dye, B. A., D. Kruszon-Moran, and G. McQuillan.** 2002. The relationship between periodontal disease attributes and *Helicobacter pylori* infection among adults in the United States. *Am. J. Public. Health.* 92, 1809-1815.
- Eckert, R., J. He, D. K. Yarbrough, F. Qi, M. H. Anderson, and W. Shi.** 2006. Targeted killing of *Streptococcus mutans* by a pheromone-guided “smart” antimicrobial peptide. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 50, 3651-3657.

- Fennerty, M. B.** 1994. *Helicobacter pylori*. Arch. Intern. Med. 154, 721-727.
- Friskien, K. W., J. R. Tagg, A. J. Laws, and M. B. Orr.** 1987. Suspected periodontopathic microorganisms and their oral habitats in young children. Oral. Microbiol. Immunol. 2, 60-64.
- Gisbert, J. P., D. Boixeda, C. M. de Argila, F. Bermejo, C. Redondo, and L. de Rafael.** 1997. Erosive duodenitis: prevalence of *Helicobacter pylori* infection and response to eradication therapy with omeprazole plus two antibiotics. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 9, 957-962.
- Gold, B. D., B. Khanna, L. M. Huang, C. Y. Lee, and N. Banatvala.** 1997. *Helicobacter pylori* acquisition in infancy after decline of maternal passive immunity. Pediatr. Res. 41, 641-646.
- Goodwin, C. S., J. A. Armstrong, T. Chilvers, M. Peters, M. D. Collins, L. Sly, W. McConnell, and W. E. S. Harper.** 1989. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. Nov. and *Helicobacter mustelae* comb. Nov., respectively. Int. J. Syst. Bacteriol. 39, 397-405.
- Goodwin, C. S., M. M. Mendall, and T. C. Northfield.** 1997. *Helicobacter pylori* infection. Lancet. 349; 265-269.
- Hamada, S., and H. D. Slade.** 1980. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol. Rev. 44, 331-384.
- Hooi, J. K. Y., W. Y. Lai, W. K. NG, M. M. Y. Suen, F. E. Underwood, D. Tanyingoh, P. Malfertheiner, D. Y. Graham, V. W. S. Wong, J. C. Y. Wu, F. K. L. Chan, J. J. Y. Sung, G. G. Kaplan, and S. C. Ng.** 2017. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* infection: Systematic review and meta-analysis. Gastroenterology. 153, 420-429.
- Hu, Y., Y. Zhu, and N-H. Lu.** 2017. Novel and effective therapeutic regimens for *Helicobacter pylori* in an era of increasing antibiotic resistance. Front. Cell. Infect. Microbiol. 7, 168.

- Ishihara, K., T. Miura, Y. Ebihara, T. Hirayama, S. Kamiya, and K. Okuda.** 2001. Shared antigenicity between *Helicobacter pylori* and periodontopathic *Campylobacter rectus* strains. FEMS. Microbiol. Lett. 197, 23-27.
- 厚生労働省. 2019. 人口動態調査（死因簡単分類別にみた性別死亡数・死亡率）. https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei19/dl/11_h7.pdf
- 国立がん研究センター. 2018. 最新がん統計. https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html
- Kalach, N., P. Bontems, and J. Raymond.** 2017. *Helicobacter pylori* infection in children. Helicobacter. 22, e12414.
- Kamada, T., K. Haruma, M. Ito, K. Inoue, N. Manabe, H. Matsumoto, H. Kusunoki, J. Hata, M. Yoshihara, K. Sumii, T. Akiyama, S. Tanaka, A. Shiotani, and D. Y. Graham.** 2015. Time trends in *Helicobacter pylori* infection and atrophic gastritis over 40 years in Japan. Helicobacter. 20, 192-198.
- Kawai, S., Y. Takagi, S. Kaneko, and T. Kurosawa.** 2011. Effects of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. Exp. Anim. 60, 481-487.
- Kikuchi, S., T. Nakajima, O. Kobayashi, T. Yamazaki, M. Kikuchi, K. Mori, S. Oura, H. Watanabe, H. Nagawa, R. Otani, N. Okamoto, M. Kurosawa, H. Anzai, T. Kubo, T. Konishi, S. Futagawa, N. Mizobuchi, O. Kobori, R. Kasai, T. Sato, Y. Inaba, and O. Wada.** 2000. Effect of age on the relationship between gastric cancer and *Helicobacter pylori*. Jpn. J. Cancer. Res. 91: 774-779.
- Kojima, A., K. Nakano, K. Wada, H. Takahashi, K. Katayama, M. Yoneda, T. Higurashi, R. Nomura, K. Hokamura, Y. Muranaka, N. Matsuhashi, K. Umemura, Y. Kamisaki, A. Nakajima, and T. Ooshima.** 2012. Infection of specific strains of *Streptococcus mutans*, oral bacteria, confers a risk of ulcerative colitis. Sci. Rep. 2, 332.

- Krzyściak, W., A. Jurczak, D. Kościelniak, B. Bystrowska, and A. Skalniak.** 2014. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilm. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 33, 499-515.
- Marques, da Silva R., D. A. Caugant, E. R. Eribe, J. A. Aas, P. S. Lingaas, O. Geiran, L. Tronstad, and I. Olsen.** 2006. Bacterial diversity in aortic aneurysms determined by 16S ribosomal RNA gene analysis. J. Vasc. Surg. 44, 1055-1060.
- Marshall, B.** 2002. *Helicobacter pylori*: 20 years on. Clin. Med (Lond). 2, 147-152.
- Marshall, B. J., and C. S. Goodwin.** 1987. Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. Int. J. Syst. Bacteriol. 37, 68.
- Mimuro, H., T. Suzuki, S. Nagai, G. Rieder, M. Suzuki, T. Nagai, Y. Fujita, K. Nagamatsu, N. Ishijima, S. Koyasu, R. Haas, and C. Sasakawa.** 2007. *Helicobacter pylori* dampens gut epithelial self-renewal by inhibiting apoptosis, a bacterial strategy to enhance colonization of the stomach. Cell. Host. Microbe. 11, 250-263.
- Miyabayashi, H., K. Furihata, T. Shimizu, I. Ueno, and T. Akamatsu.** 2000. Influence of oral *Helicobacter pylori* on the success of eradication therapy against gastric *Helicobacter pylori*. Helicobacter. 5, 30-37.
- Mohammadi, M., S. Czinn, R. Redline, and J. Nedrud.** 1996. *Helicobacter*-specific cell-mediated immune responses display a predominant Th1 phenotype and promote a delayed-type hypersensitivity response in the stomachs of mice. J. Immunol. 156, 4729-4738.
- Nakagawa, S., T. Osaki, Y. Fujioka, H. Yamaguchi, and S. Kamiya.** 2005. Long-term infection of mongolian gerbils with *Helicobacter pylori*: microbiological, histopathological, and serological analyses. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12, 347-353.
- Nakano, K., R. Nomura, I. Nakagawa, S. Hamada, and T. Ooshima.** 2004. Demonstration of *Streptococcus mutans* with a cell wall polysaccharide specific to a new serotype, *k*, in the

human oral cavity. J. Clin. Microbiol. 42, 198-202.

Nakano, K., M. Tsuji, K. Nishimura, R. Nomura, and T. Ooshima. 2006. Contribution of cell surface protein antigen PAc of *Streptococcus mutans* to bacteremia. Microbes. Infect. 8, 114-121.

日本口腔衛生学会. 2013. 政策声明「う蝕のない社会の実現に向けて」. http://www.kokuhoken.or.jp/jsdh/statement/file/statement_20130516.pdf

Nolte, T., P. Brander-Weber, C. Dangler, U. Deschl, M. R. Elwell, P. Greaves, T. Hailey, M. W. Leach, A. R. Pandiri, A. Rogers, C. C. Shackelford, A. Spencer, T. Tanaka, and J. M. Ward. 2016. Nonproliferative and proliferative lesions of the gastrointestinal tract, pancreas and salivary glands of the rat and mouse. J. Toxicol. Pathol. 29, 1S-125S.

Nomura, R., K. Nakano, and T. Ooshima. 2004. Contribution of glucan-binding protein C of *Streptococcus mutans* to bacteremia occurrence. Arch. Oral. Biol. 49, 783-788.

Nomura, R., Y. Ogaya, S. Matayoshi, Y. Morita, and K. Nakano. 2018. Molecular and clinical analyses of *Helicobacter pylori* colonization in inflamed dental pulp. BMC. Oral. Health. 18, 64.

Ooshima, T., T. Minami, M. Matsumoto, T. Fujiwara, S. Sobue, and S. Hamada. 1998. Comparison of the cariostatic effects between regimens to administer oolong tea polyphenols SPF rats. Caries. Res. 32, 75-80.

Okada, M., F. Hayashi, and N. Nakagawa. 2000. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in dental plaque samples from children 2 to 12 years of age. J. Clin. Periodontol. 27, 763-768.

Parrott, D. M. V., and T. T. MacDonald. 1990. The ontogeny of the mucosal immune system in rodents. Ontogeny of the Immune System of the Gut, CRC Press, Boston, USA. P. 51.

Pounder, R. E., and D. Ng. 1995. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different

countries. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 9; Suppl 2, 33-39.

Reyrat, J. M., V. Pelicic, E. Papini, C. Montecucco, R. Rappuoli, and J. L. Telford. 1999.

Towards deciphering the *Helicobacter pylori* cytotoxin. *Mol. Microbiol.* 34, 197-204.

Sabbagh, P., M. Javanian, V. Koppolu, V. R. Vasigala, and S. Ebrahimpour. 2019.

Helicobacter pylori infection in children: an overview of diagnostic methods. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 38, 1035-1045.

Sengupta, P. 2013. The laboratory rat: relating its age with human's. *Int. J. Prev. Med.* 4, 624-630.

Smoot, D. T. 1997. How does *Helicobacter pylori* cause mucosal damage? Direct mechanism. *Gastroenterology*. 113, S31-34.

Take, S., M. Mizuno, K. Ishiki, Y. Nagahara, T. Yoshida, K. Yokota, and K. Oguma. 2007.

Baseline gastric mucosal atrophy is a risk factor associated with the development of gastric cancer after *Helicobacter pylori* eradication therapy in patients with peptic ulcer diseases. *J. Gastroenterol.* 42, 21-27.

Ter Pelkwijk, A., W. H. van Palenstein Helderma, and J. W. E. van Dijk. 1990. Caries experience in the deciduous dentition as predictor for caries in the permanent dentition. *Caries. Res.* 24, 65-71.

Ter Steege, J. C., W. A. Buurman, and P. P. Forget. 1997. The neonatal development of intraepithelial and lamina propria lymphocytes in the murine small intestine. *Dev. Immunol.* 5, 121-128.

The National Institutes of Health Consensus Conference. 1994. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *JAMA.* 272, 65-69.

Ueda, J., M. Gosho, Y. Inui, T. Matsuda, M. Sakakibara, K. Mabe, S. Nakajima, T. Shimoyama, M. Yasuda, T. Kawai, K. Murakami, T. Kamada, M. Mizuno, S. Kikuchi,

- Y. Lin, and M. Kato.** 2014. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection by birth year and geographic area in Japan. *Helicobacter*. 19, 105-110.
- Uemura, N., S. Okamoto, S. Yamamoto, N. Matsumura, S. Yamaguchi, M. Yamakido, K. Taniyama, N. Sasaki, and R. J. Schlemper.** 2001. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N. Engl. J. Med.* 345, 784-789.
- Warren, J. A., and B. J. Marshall.** 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in chronic gastritis. *Lancet*. 1, 1273-1275.
- Westblom, T. U., and B. D. Bhatt.** 1999. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 241, 215-235.
- Wojcicki, C. J., D. S. Harper, and P. J. Robinson.** 1987. Differences in periodontal disease-associated microorganisms of subgingival plaque in prepubertal, pubertal and postpubertal children. *J. Periodontol.* 58, 219-223.
- Wroblewski, L. E., R. M. Peak. Jr., and K. T. Wilson.** 2010. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 713-739.
- Yamaoka, Y., M. Kita, T. Kadoma, N. Sawai, and J. Imanishi.** 1996. *Helicobacter pylori cagA* gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa. *Gastroenterology*. 110, 1744-1752.
- Zhang, W., X. Deng, X. Zhou, Y. Hao, and Y. Li.** 2018. Influence of *Helicobacter pylori* culture supernatant on the ecological balance of a dual-species oral biofilm. *J. Appl. Oral. Sci.* 26, e2017113.

表1 本研究で用いたプライマー

用途	名称	塩基配列 (5' → 3')	増幅 サイズ (bp)	文献
細菌の検出	PA	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	315	Marques da Silva ら (2006)
	PD	GTA TTA CCG CGG CTG CTG		
<i>H. pylori</i> の検出 Single PCR	<i>ureA</i> -aF	ATG AAA CTC ACC CCA AAA GA	488	Nomura ら (2018)
	<i>ureA</i> -bR	CCG AAA GTT TTT TCT CTG TCA AAG TCT A		
Nested PCR	<i>ureA</i> -bF	AAA CGC AAA GAA AAA GGC ATT AA	383	Nomura ら (2018)
	<i>ureA</i> -aR	TTC ACT TCA AAG AAA TGG AAG TGT GA		

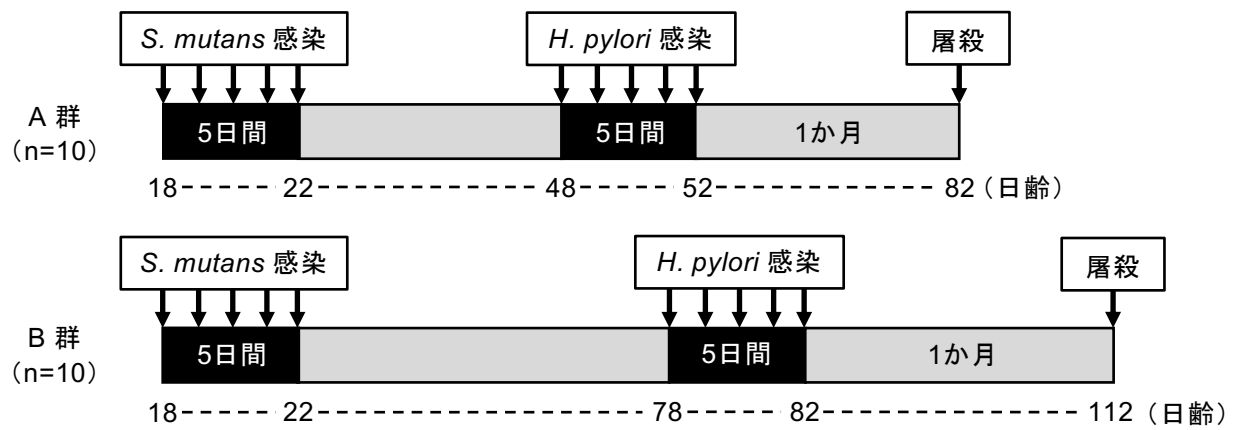


図1 *H. pylori* の感染時期に着目した実験スケジュール

全ての18日齢のラットに *S. mutans* を投与した。次に A 群の48日齢のラットと B 群の78日齢のラットに *H. pylori* を投与した。全てのラットは *H. pylori* 投与終了後、1か月間飼育して屠殺した。

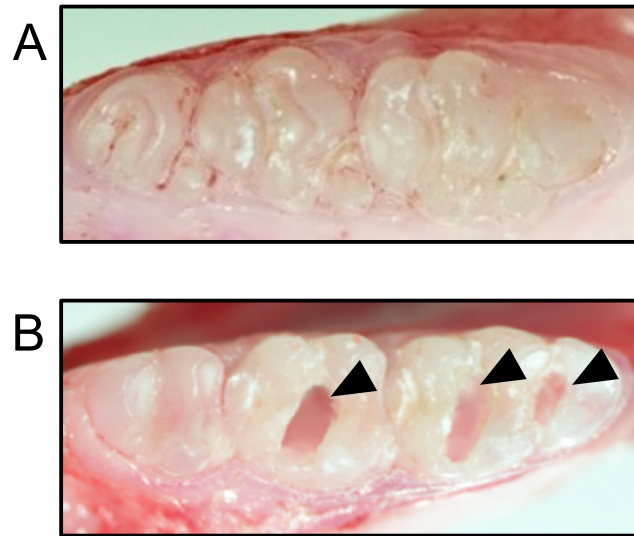


図2 ラットから摘出した顎骨におけるう蝕罹患状態の評価法

屠殺したラットから摘出した顎骨の上下顎片側第一臼歯、第二臼歯および第三臼歯（合計6歯）を対象として、実質欠損を認めないものと象牙質に及ぶ実質欠損を認めるものに分類した。

A：実質欠損を認めない

B：象牙質に及ぶ実質欠損を認める（矢頭）

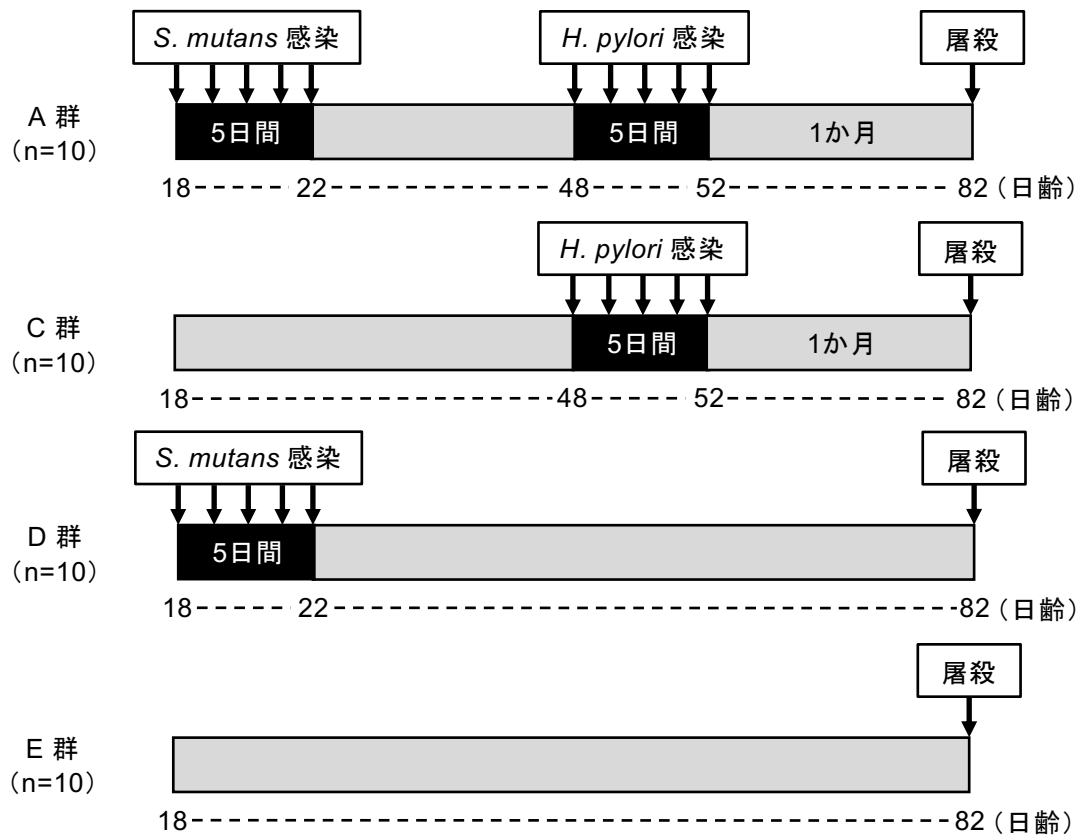


図3 菌感染の有無に着目した実験スケジュール

A 群：18日齢時に *S. mutans* を投与後、48日齢時に *H. pylori* を投与した。

C 群：48日齢時に *H. pylori* のみを投与した。

D 群：18日齢時に *S. mutans* のみを投与した。

E 群：いずれの菌も投与しなかった。

全てのラットは82日齢まで飼育して屠殺した。

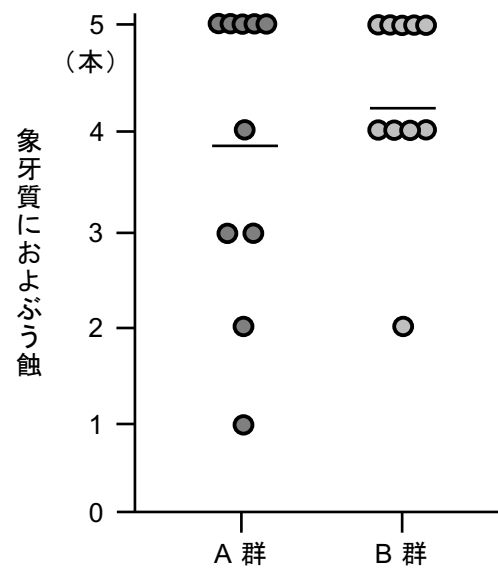


図4 実質欠損を伴う象牙質に及ぶ蝕を認める歯の本数の評価

摘出した顎骨において、上下片側臼歯部の実質欠損を伴う象牙質に及ぶ蝕の本数を評価した。A 群、B 群ともに象牙質に及ぶ蝕を多数認めたが、両群の値の間には有意差を認めなかった。

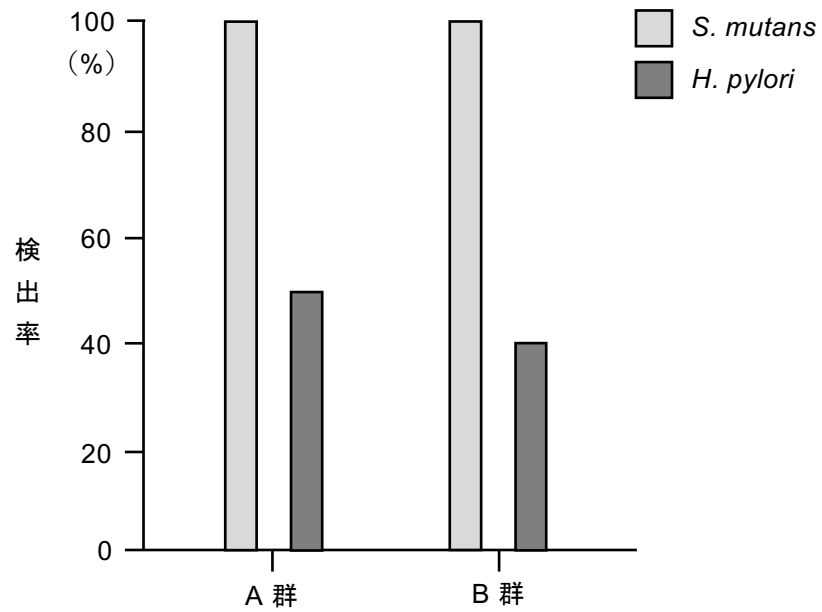


図5 ラットの口腔からの *S. mutans* および *H. pylori* の検出率

採取したデンタルプラークサンプルにおける *S. mutans* および *H. pylori* の検出率を算出した。*S. mutans* は全てのラットのデンタルプラークサンプルから検出された。一方で、*H. pylori* は A 群では50%のラットから、B 群では40%のラットから検出された。

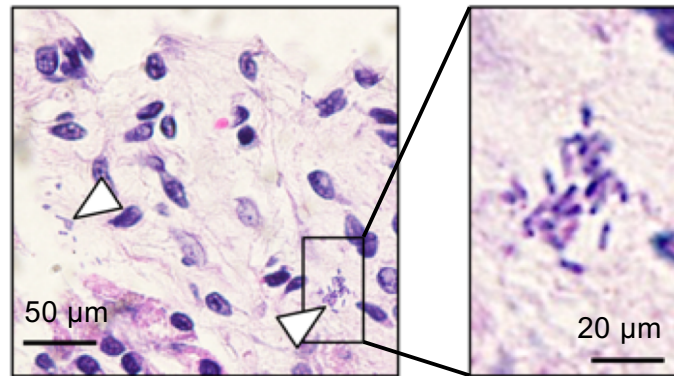


図6 ラットの胃組織における胃粘膜への桿菌の侵入像（HE 染色）

摘出した胃組織の組織切片を作製し、HE 染色を行って胃粘膜への桿菌の侵入の有無について評価した。48日齢時に *H. pylori* を投与したラットにおいてのみ、胃粘膜への桿菌の侵入（矢頭で示す）を認めた。

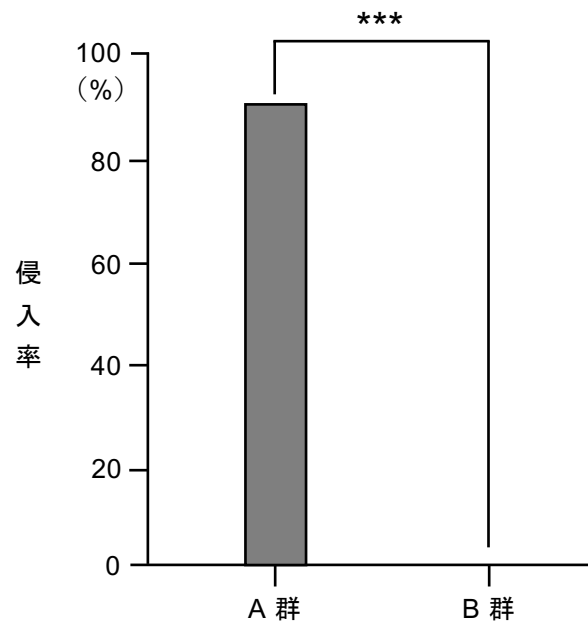


図7 ラットの胃組織における胃粘膜への桿菌の侵入率

(カイ二乗検定により検定; *** $P<0.001$)

ラットの胃組織における胃粘膜への桿菌の侵入率を算出した。A 群の90%のラットの胃組織において胃粘膜への桿菌侵入像を認め、B 群と比較して有意に高い侵入率が認められた。

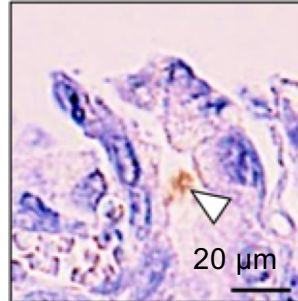


図8 ラットの胃組織における胃粘膜への桿菌の侵入像（免疫組織染色）

胃粘膜への桿菌の侵入を認めたラットの胃組織において、*H. pylori* 特異抗体を用いて免疫組織染色を行い組織学的評価を行った。胃粘膜へ侵入した桿菌は *H. pylori* 特異抗体に対して陽性反応を示した（矢頭で示す）。

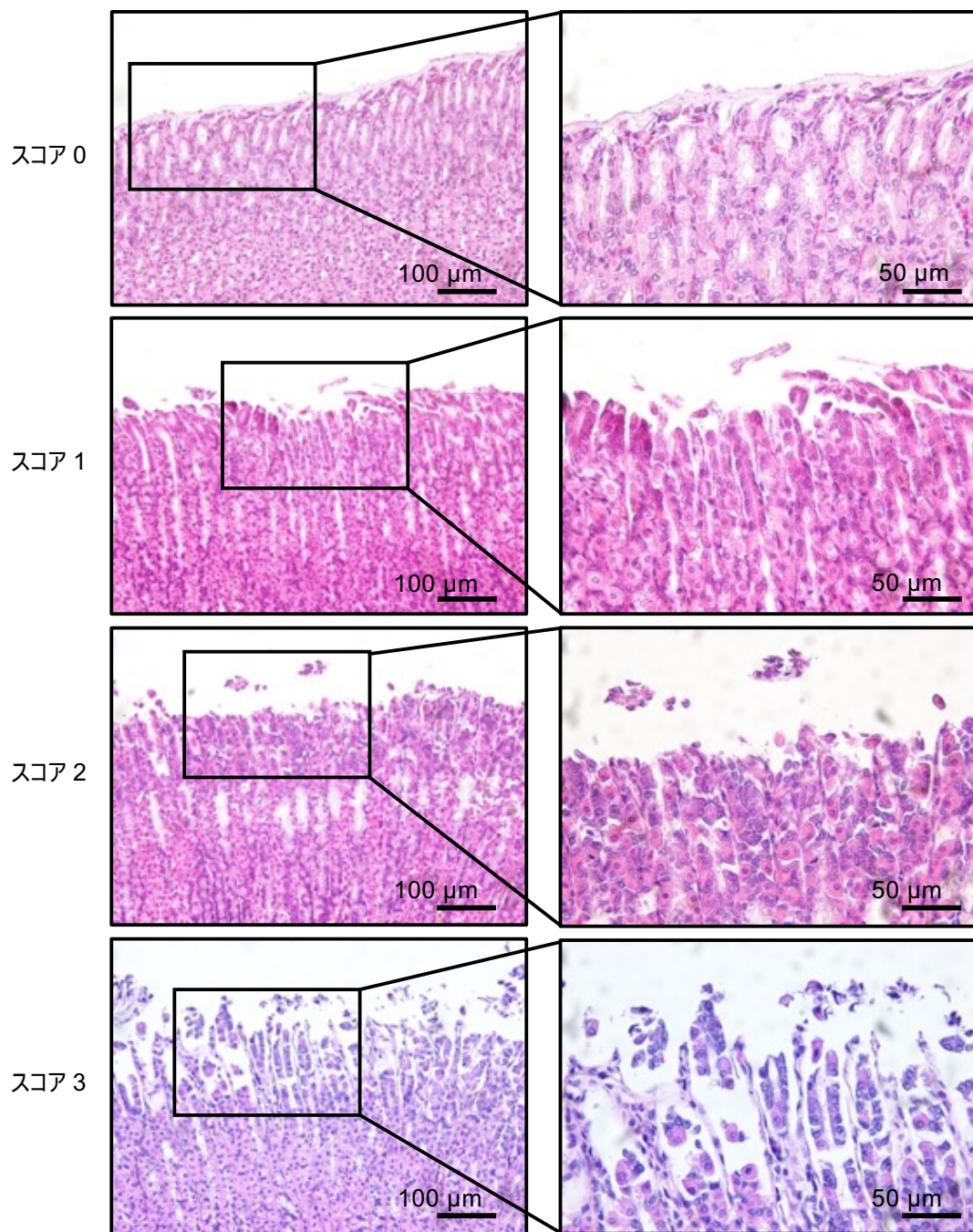


図9 ラットの胃組織における胃粘膜脱落の代表像（HE 染色）

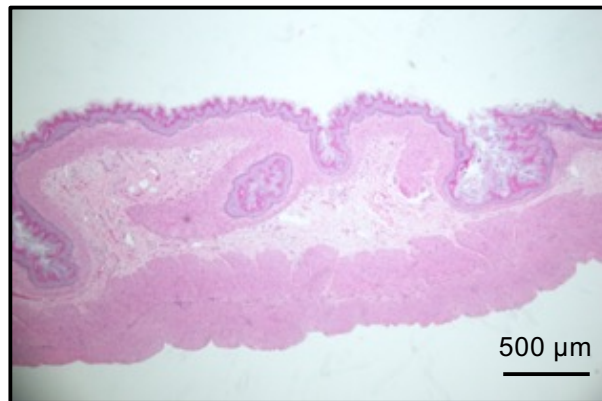
スコア 0：胃粘膜脱落は認められない。

スコア 1：限局性に胃粘膜脱落を認める。

スコア 2：びまん性に脱落が認められるが、その直下の胃粘膜上皮は基底膜と結合している。

スコア 3：びまん性に脱落が認められ、胃粘膜上皮が再生せず基底膜のみが残存している。

スコア 0



スコア 1



図10 ラットの胃組織における角化嚢胞の代表像（HE 染色）

スコア 0：角化嚢胞は認められない。

スコア 1：単発性の角化嚢胞を認める。

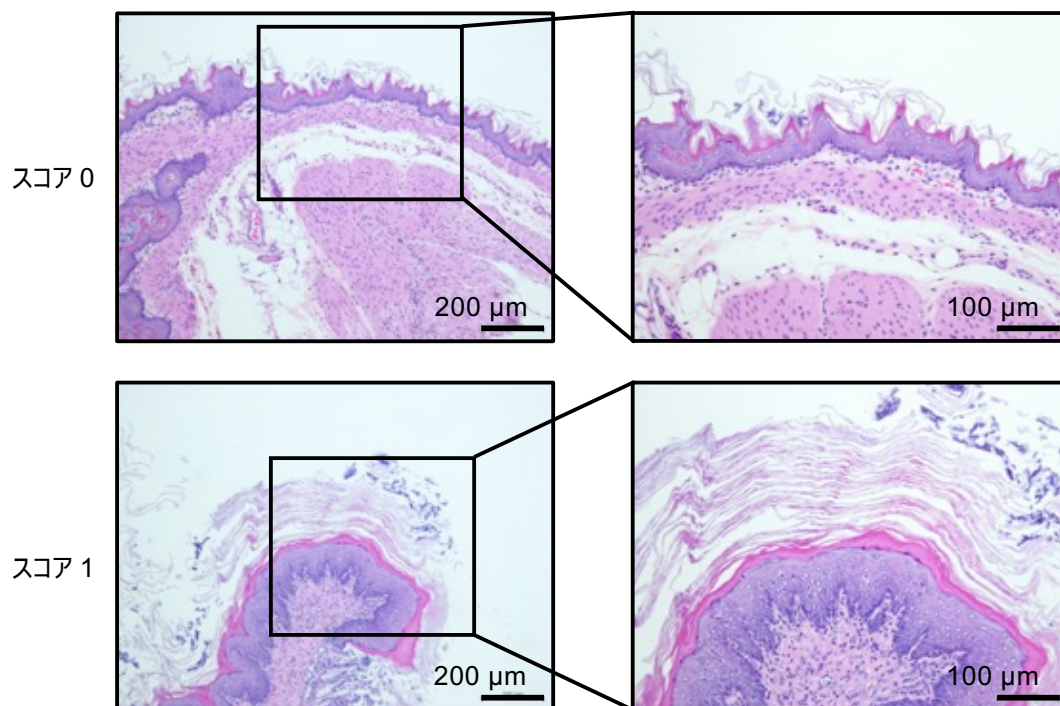


図11 ラットの胃組織における上皮の過角化の代表像（HE 染色）

スコア 0：上皮の過角化は認められない。

スコア 1：一部分に上皮の過角化を認める。

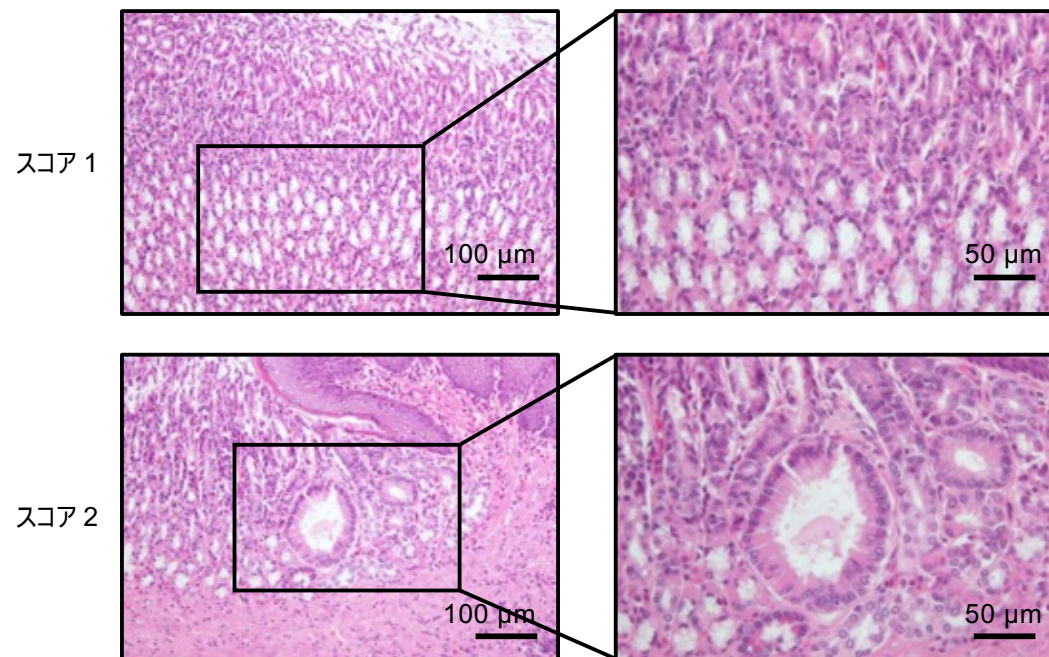


図12 ラットの胃組織における腸上皮化生の代表像（HE 染色）

スコア 0：腸上皮化生は認められない。

スコア 1：一部分に盃細胞で構成された腸上皮化生を認める。

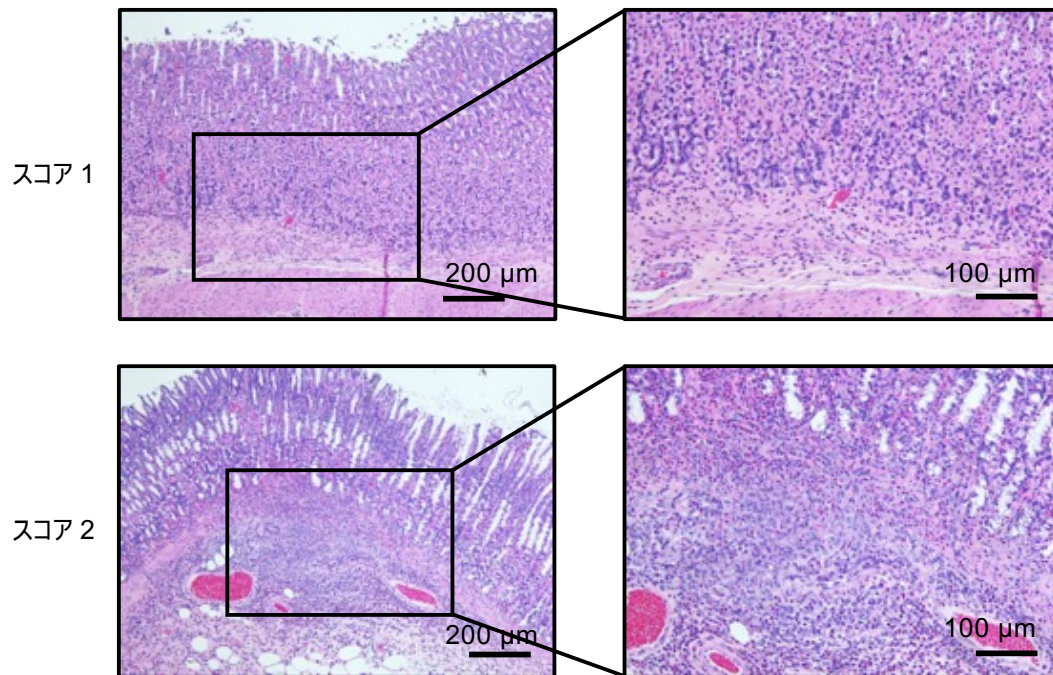


図13 ラットの胃組織における炎症性細胞浸潤の代表像（HE 染色）

スコア 1：胃の粘膜下および粘膜基底部にびまん性に炎症性細胞が浸潤している。

スコア 2：びまん性な炎症性細胞の浸潤に加え、リンパ球の浸潤および結節が認められる。

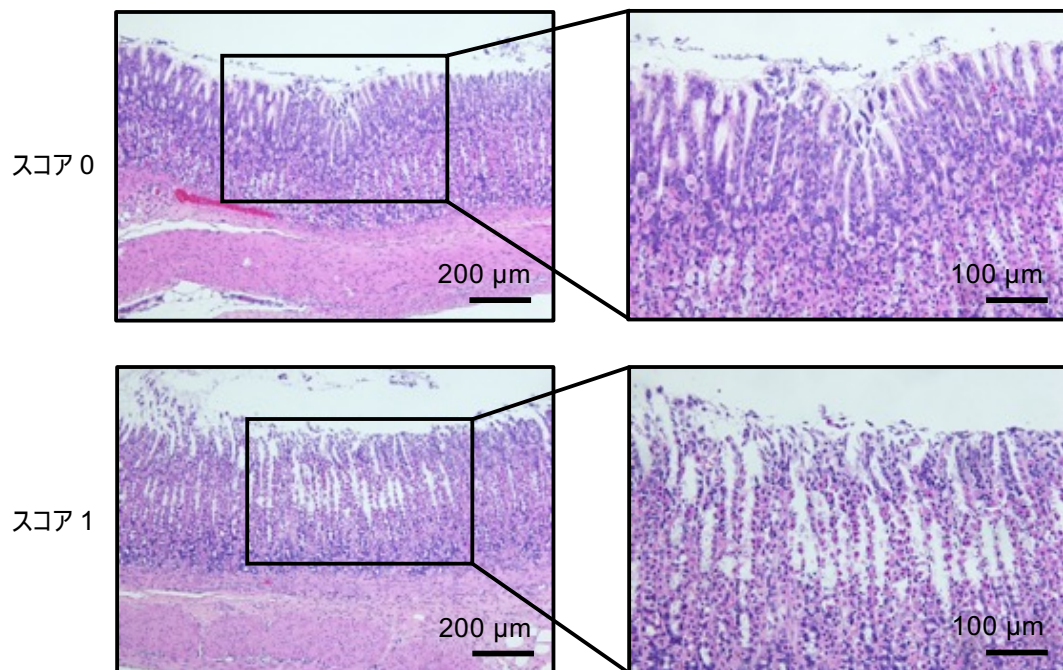


図14 ラットの胃組織における限局性びらの代表像（HE 染色）

スコア 0：上皮の傷害を認めない。

スコア 1：一部分に筋層粘膜に至らない上皮の傷害を認める。

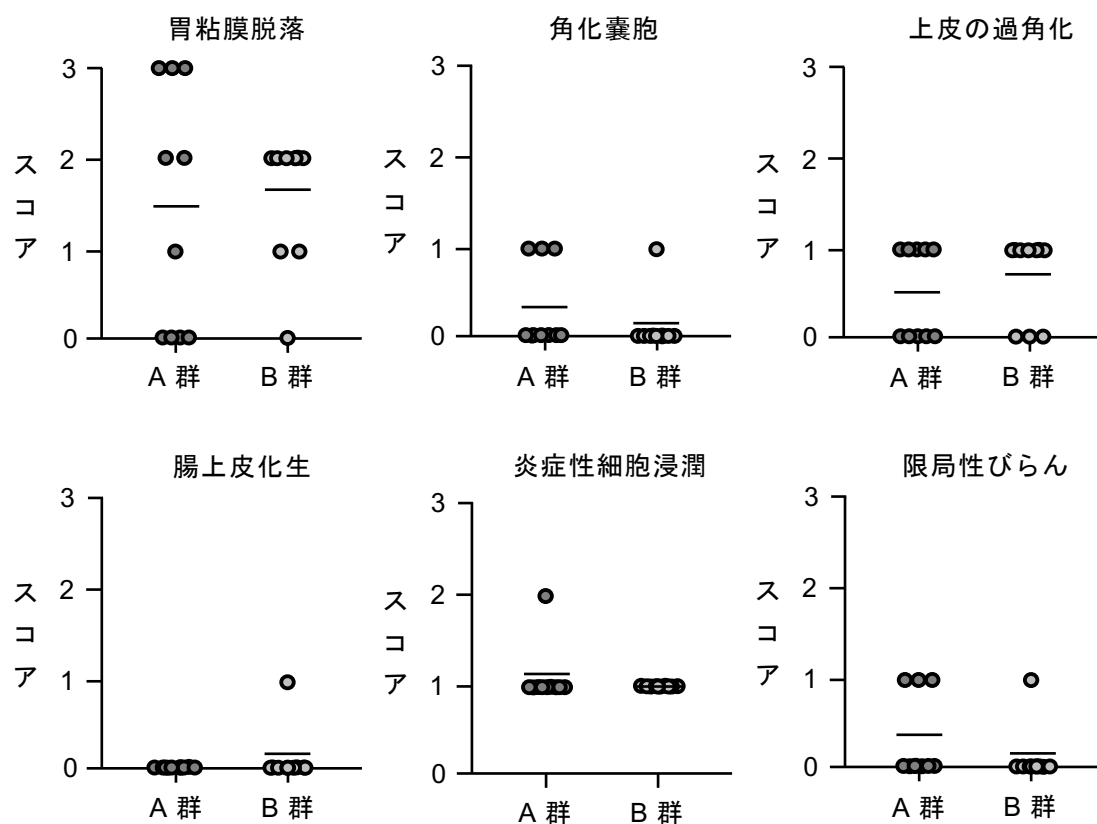


図15 ラットの胃組織の病理組織学的評価

(バーは平均値を示す)

ラットの胃組織から作製した組織切片を HE 染色して病理組織学的評価を行った。A 群、B 群ともに胃組織において組織変化を認めたが、両群間のスコアに有意差は認められなかった。

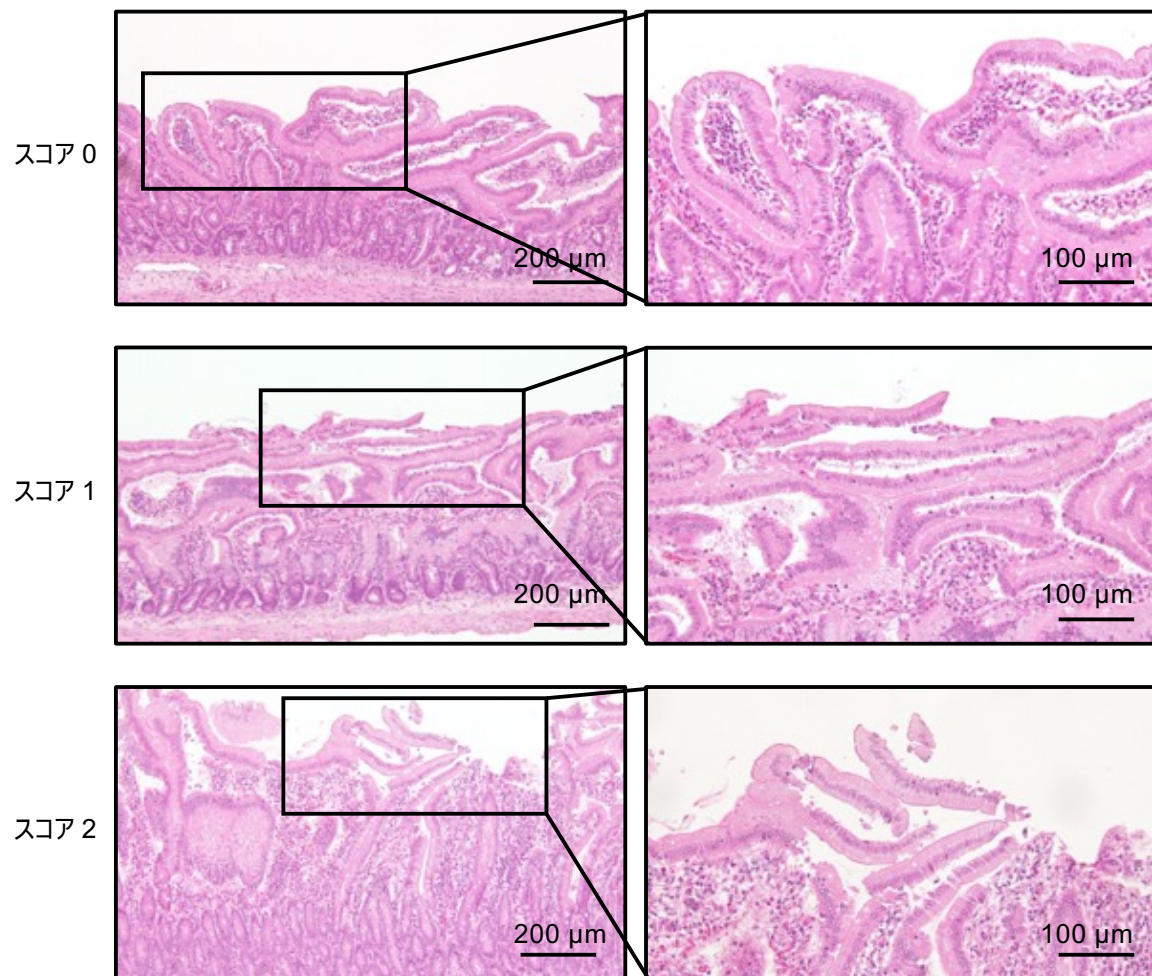


図16 ラットの十二指腸における十二指腸びらんの代表像（HE 染色）

スコア 0：上皮の傷害を認めない。

スコア 1：筋層粘膜に至らない上皮の傷害が全体の50%未満である（写真は10%である）。

スコア 2：筋層粘膜に至らない上皮の傷害が全体の50%以上である（写真は70%である）。

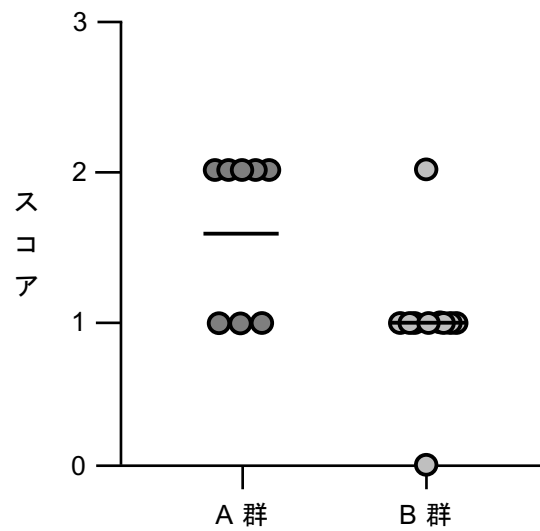


図17 ラットの十二指腸組織における十二指腸びらの病理組織学的評価
(バーは平均値を示す)

ラットの十二指腸組織から作製した組織切片を HE 染色して病理組織学的評価を行った。
A 群、B 群ともに十二指腸組織においてびらを認めたが、両群間のスコアに有意差は認められなかった。

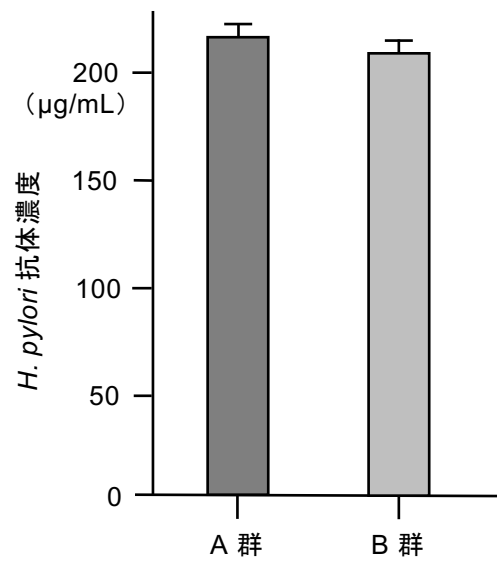


図18 ラットの血清における *H. pylori* 抗体濃度の測定

ラットから採取した血清における *H. pylori* 抗体濃度の測定を行った。A 群、B 群ともにポジティブコントロールと同等の濃度の *H. pylori* 抗体が検出されたが、両群の値の間に有意差は認められなかった。

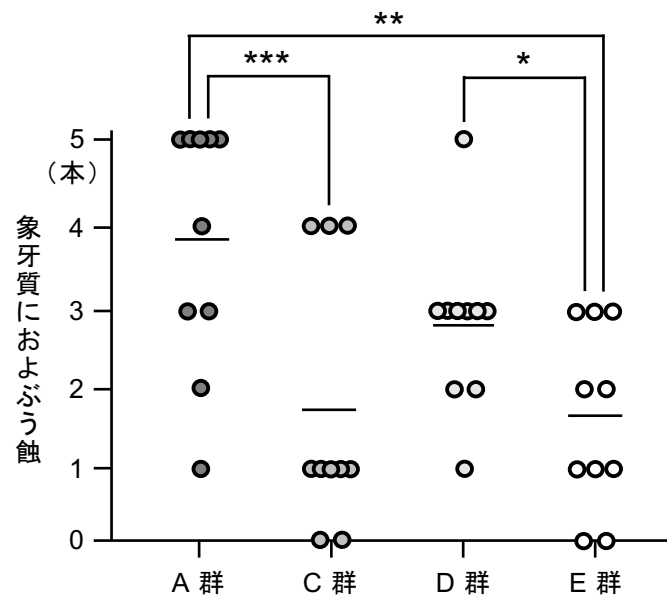


図19 実質欠損を伴う象牙質に及ぶう蝕を認める歯の本数の評価

(ANOVA の後 post-hoc 解析として Bonferroni 法により検定; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)

摘出した顎骨において、上下片側臼歯部の実質欠損を伴う象牙質に及ぶう蝕の本数を評価した。A 群における象牙質におよぶう蝕の本数は、C 群および E 群と比較して有意に高い値を認めた。また、D 群は E 群と比較して有意に高い値を認めた。

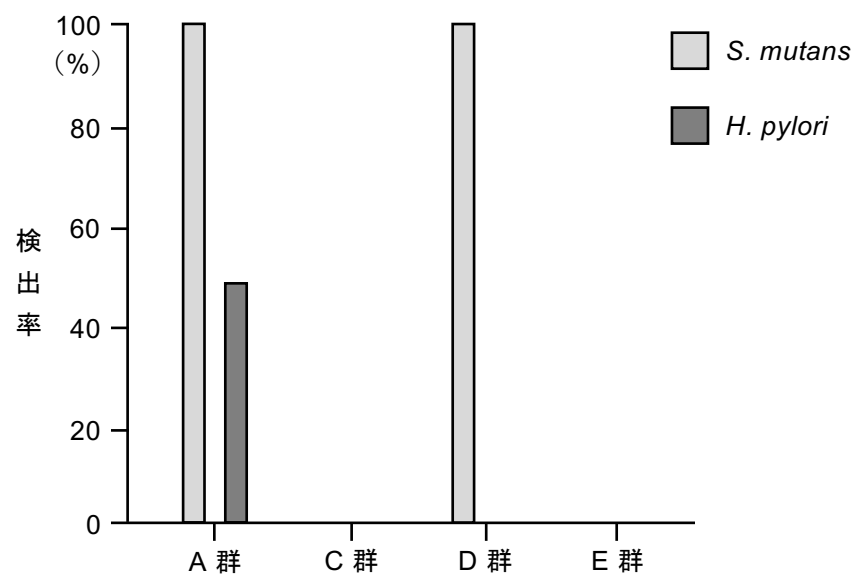


図20 ラットの口腔からの *S. mutans* および *H. pylori* の検出率

採取したデンタルプラークサンプルにおける *S. mutans* および *H. pylori* の検出率を算出した。*S. mutans* は A 群および D 群の全てのラットにおいて検出され、*S. mutans* を投与していない C 群および E 群からは検出されなかった。一方で、*H. pylori* は A 群においてのみ検出され、*H. pylori* を単独で投与した C 群からは検出されなかった。

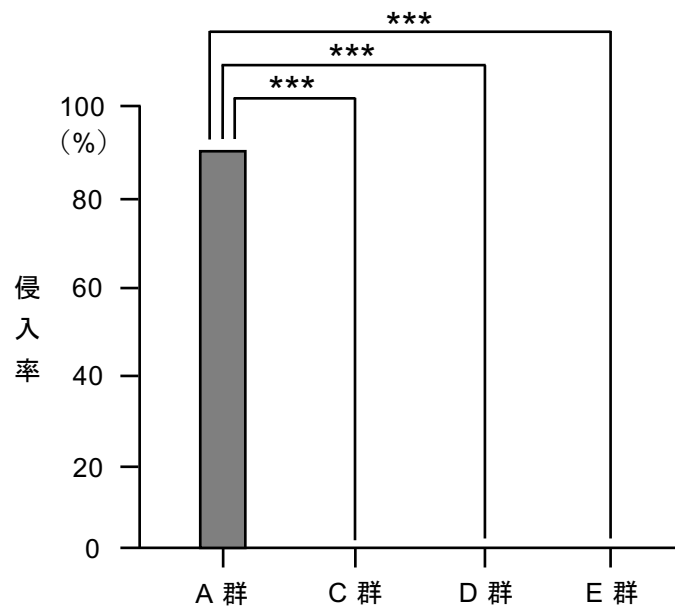


図21 ラットの胃組織における胃粘膜への桿菌の侵入率

(ANOVA の後 post-hoc 解析としてBonferroni 法により検定; *** $P<0.001$)

ラットの胃組織における胃粘膜への桿菌の侵入率を算出した。A 群のラットにおいてのみ胃粘膜への桿菌侵入像を認め、その他の群と比較して有意に高い侵入率を認めた。

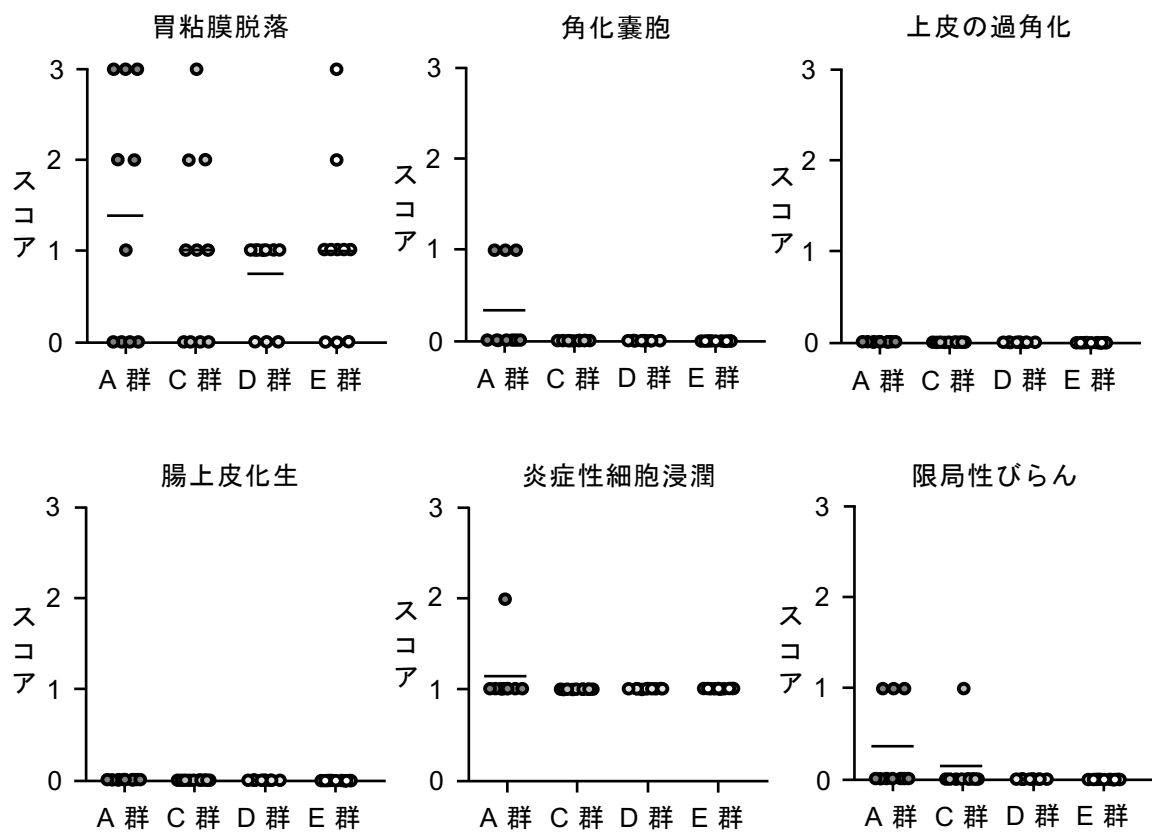


図22 ラットの胃組織の病理組織学的評価（HE 染色）

（バーは平均値を示す）

ラットの胃組織から作製した組織切片を HE 染色して病理組織学的評価を行った。全ての群のラットの胃組織において組織変化を認めたが、各群間のスコアに有意差は認められなかった。

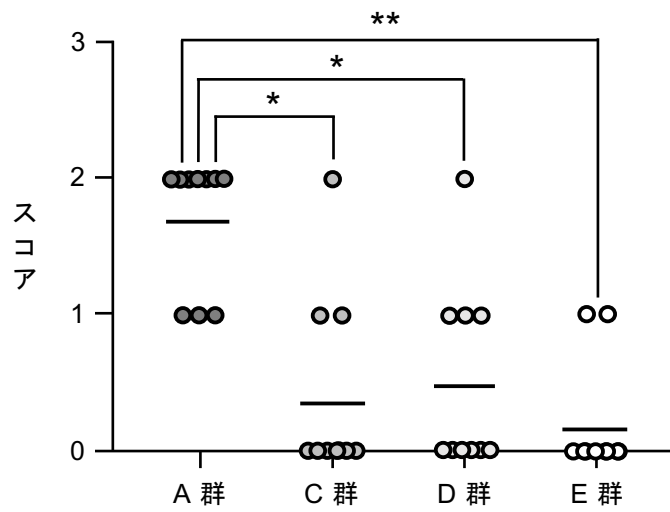


図23 ラットの十二指腸組織におけるびらんの病理組織学的評価（HE 染色）

（バーは平均値を示す）

（ANOVA の後 post-hoc 解析として Bonferroni 法により検定; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ ）

ラットの十二指腸組織から作製した組織切片を HE 染色して病理組織学的評価を行った。

A 群はその他の群と比較して有意に高いスコアが認められた。

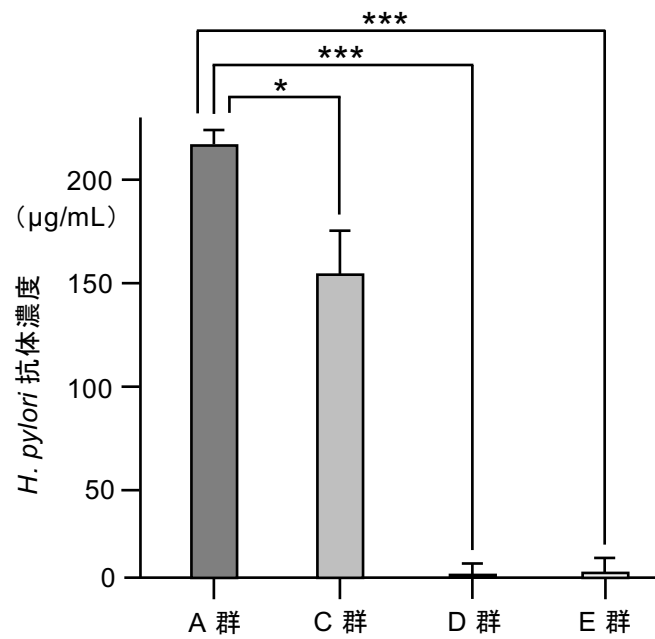


図24 ラットの血清における *H. pylori* 抗体濃度の測定

(ANOVA の後 post-hoc 解析としてBonferroni 法により検定; * $P<0.05$, *** $P<0.001$)

ラットから採取した血清における *H. pylori* 抗体濃度の測定を行った。A 群における *H. pylori* 抗体濃度は他の群と比較して有意に高い値を認めた。

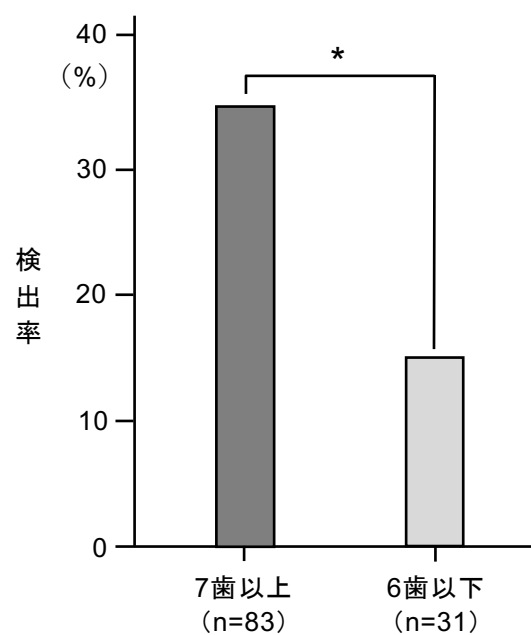


図25 ヒトの口腔における *H. pylori* の検出率と DMFT の関係

(カイ二乗検定により検定; * $P<0.05$)

採取した口腔サンプルにおける *H. pylori* の検出率を算出した。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、*H. pylori* の検出率が有意に高い値を示した。

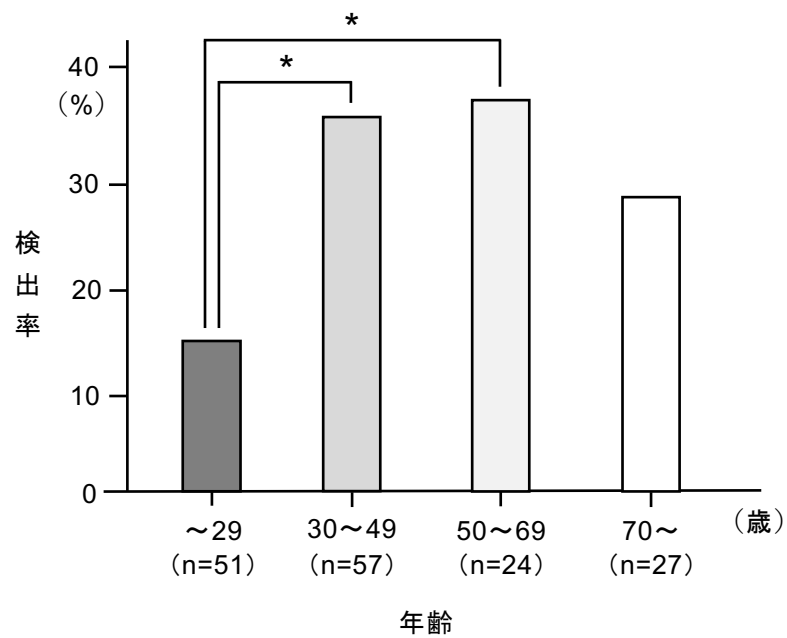


図26 ヒトの口腔における *H. pylori* の検出率と年齢の関係

(カイ二乗検定により検定; * $P<0.05$)

採取した口腔サンプルにおける *H. pylori* の検出率を算出した。30~69歳の被験者は29歳以下の被験者と比較して、*H. pylori* の検出率が有意に高い値を示した。

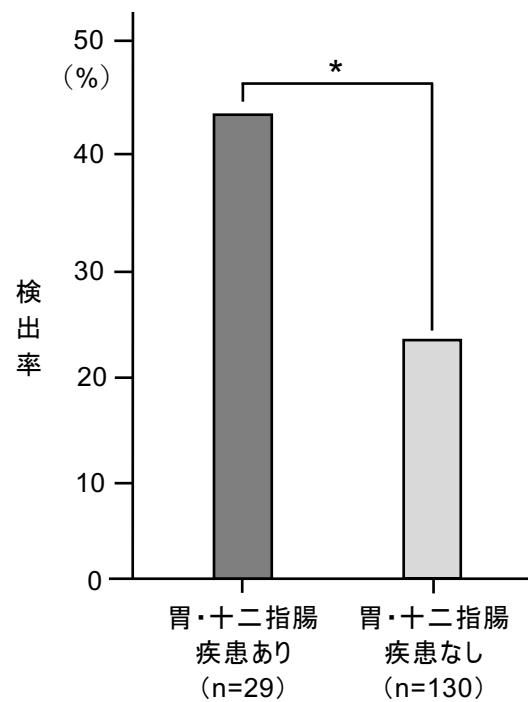


図27 ヒトの口腔における *H. pylori* の検出率と胃・十二指腸疾患の既往の関係

(カイ二乗検定により検定; * $P<0.05$)

採取した口腔サンプルにおける *H. pylori* の検出率を算出した。胃・十二指腸疾患のある被験者は胃・十二指腸疾患の既往のない被験者と比較して、*H. pylori* の検出率が有意に高い値を示した。

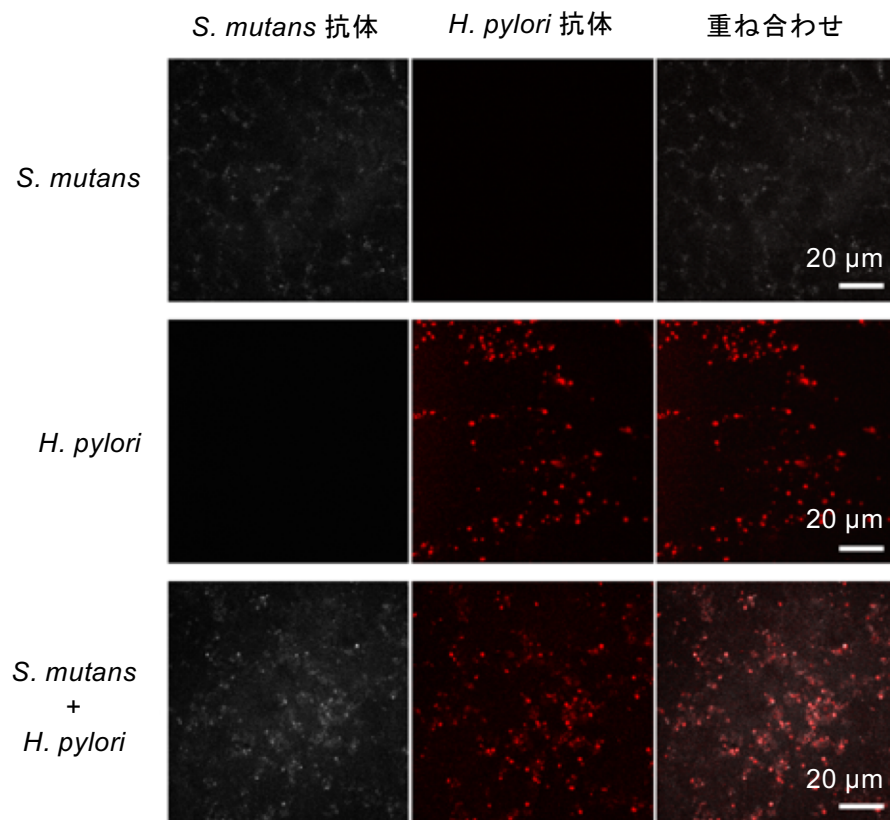


図28 1%スクロース含有 BHI 液体培地におけるバイオフィーム形成能
(共焦点走査型レーザー顕微鏡像 (上部より観察))

チャンバースライド内で培養した *S. mutans* および *H. pylori* をそれぞれ蛍光免疫染色して共焦点走査型レーザー顕微鏡を用いて上部から観察した。*H. pylori* の単独培養および *S. mutans* と *H. pylori* の共培養の両方において、*H. pylori* の存在が確認された。

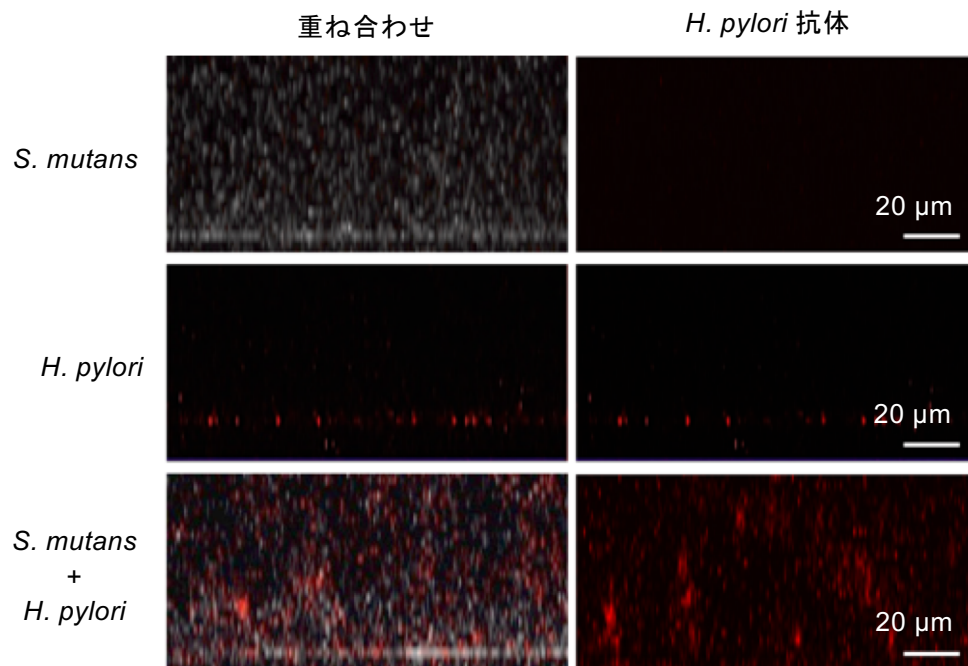


図29 1%スクロース含有 BHI 液体培地におけるバイオフィーム形成能

(共焦点走査型レーザー顕微鏡像 (側面より観察))

チャンバースライド内で培養した *S. mutans* および *H. pylori* をそれぞれ蛍光免疫染色して共焦点走査型レーザー顕微鏡を用いて側面から観察した。*H. pylori* の単独培養では単層で希薄なバイオフィー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* が形成するバイオフィーム内に多数の *H. pylori* が分布していることが確認された。

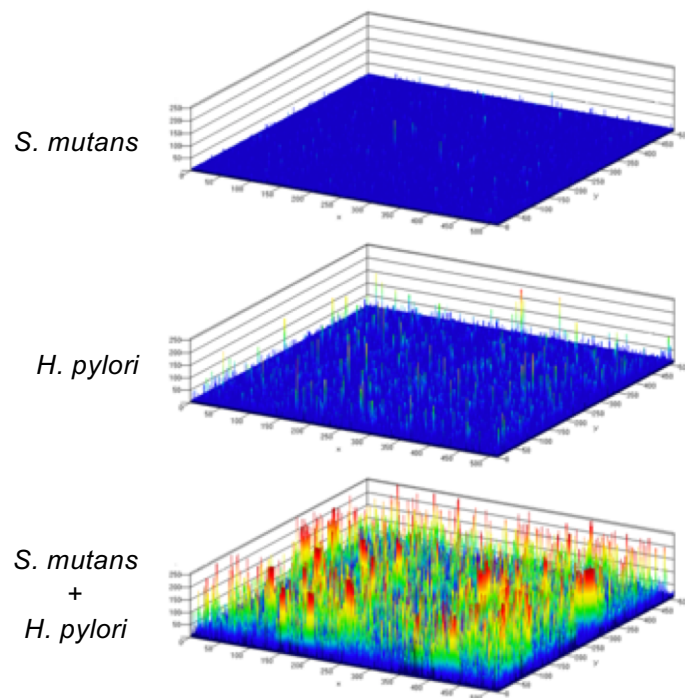


図30 1%スクロース含有 BHI 液体培地におけるバイオフィーム形成能

(共焦点走査型レーザー顕微鏡像 (三次元像))

バイオフィームの厚さ： 0-50 μm (青)、50-100 μm (水色)、100-150 μm (緑)、
150-200 μm (黄色)、200-250 μm (赤)

チャンバースライド内で培養した *S. mutans* および *H. pylori* をそれぞれ蛍光免疫染色して共焦点走査型レーザー顕微鏡を用いて観察したものを三次元像に構築した。*S. mutans* と *H. pylori* を共培養することで *S. mutans* が形成するバイオフィーム内に多数の *H. pylori* が分布していることが確認された。

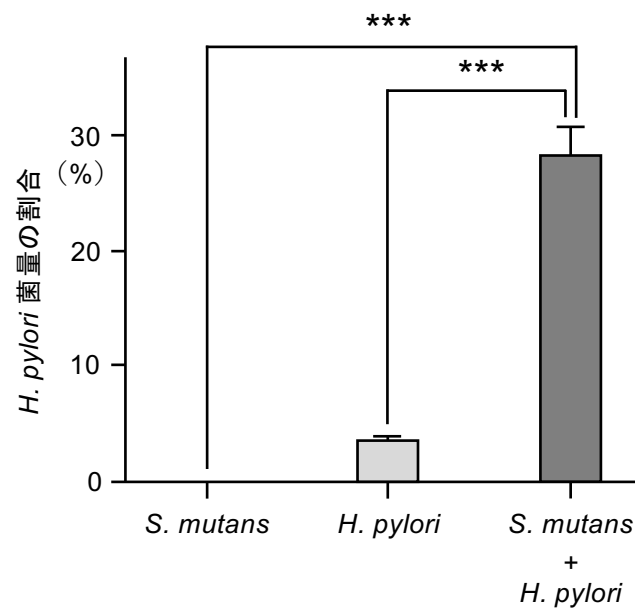


図31 培養したチャンバースライド内における *H. pylori* 菌量の割合

(ANOVA の後 post-hoc 解析として Bonferroni 法により検定; *** $P < 0.001$)

培養したチャンバースライド内において *H. pylori* が占める菌量の割合を算出した。*S. mutans* および *H. pylori* をそれぞれ単独培養した場合と比較して、共培養した場合にバイオフィルム中の *H. pylori* 量が有意に高い割合を示した。