

Title	口腔および胃・十二指腸組織への <i>Helicobacter pylori</i> 定着に対する <i>Streptococcus mutans</i> の影響
Author(s)	門田, 珠実; 野村, 良太; 鋸屋, 侑布子 他
Citation	大阪大学歯学雑誌. 2023, 67(1), p. 1-3
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/93199
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

口腔および胃・十二指腸組織への *Helicobacter pylori* 定着に対する *Streptococcus mutans* の影響

門田 珠実*, 野村 良太*, 鋸屋侑布子*
又吉 紗綾*, 大川 玲奈*, 仲野 和彦*

(令和4年9月29日受付)

はじめに

胃・十二指腸疾患の原因細菌である *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) は¹⁾, 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^{2,3)}。これまでに, *H. pylori* は歯周病患者の口腔から多く検出されたことから, 口腔内では深い歯周ポケットに存在すると考えられていたが⁴⁾, 小児期に深い歯周ポケットが形成されることは稀である。一方で, 小児期における主要な口腔疾患としてう蝕が挙げられ⁵⁾, う蝕の主要な原因細菌である *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) は乳幼児期に口腔に定着すると考えられている⁶⁾。また, *S. mutans* により形成されるバイオフィームは成熟が進むにつれて多様な細菌種が検出されることが報告されている⁷⁾。しかしながら, う蝕原性細菌である *S. mutans* の口腔における存在が, *H. pylori* の口腔および胃・十二指腸組織への定着に及ぼす影響については明らかとなっていない。そこで, 本研究ではラットう蝕モデルを用いた検討と, *S. mutans* および *H. pylori* のバイオフィーム形成能の分析を行うことにより, *S. mutans* の存在が *H. pylori* の口腔および胃・十二指腸組織への定着に及ぼす影響について検討することとした。

ラットう蝕モデルを用いた検討

ラットう蝕モデルを用いた検討は, 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; 歯 29-031-0)。本研究には, Specific pathogen-free の Sprague-Dawley 系ラット (15日齢オス, 40

匹)を用いた。これらのラットは, *S. mutans* および *H. pylori* を投与する群 (A群, 10匹), *H. pylori* のみを投与する群 (B群, 10匹), *S. mutans* のみを投与する群 (C群, 10匹), いずれの菌も投与しない群 (D群, 10匹)に分けた。まず, 全ての15日齢のラットに対し, テトラサイクリンを添加した普通食およびペニシリンを添加した蒸留水を3日間与えて口腔常在菌を抑制した。次に, *S. mutans* MT8148株にストレプトマイシン耐性を付与した *S. mutans* MT8148R株を 1.0×10^9 CFU/mL に調整した菌液を用意し⁸⁾, 18日齢のA群およびC群のラットに5日間連続で経口投与することで, 口腔内に *S. mutans* を定着させた⁹⁾。さらに, ヒトの小児期に相当する48日齢のA群およびB群のラットには¹⁰⁾, 1.5×10^6 CFU/mL に調整した *H. pylori* J99株の菌液を5日間連続で経口投与した。全てのラットに対し, 18日齢から飼育終了まで56%スクロース含有う蝕誘発性試料を与えた。

飼育終了後, 全てのラットを安楽死させて顎骨を摘出し¹¹⁾, う蝕の程度を評価した⁹⁾。その結果, 象牙質に及ぶう蝕の本数はB群およびD群と比較して, A群において多く認められた。次に, 顎骨に付着したデンタルプラークを採取し, *S. mutans* および *H. pylori* の検出を行った¹²⁻¹⁴⁾。その結果, *S. mutans* はA群およびC群の全てのラットにおいて検出された。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B群からは検出されなかった。さらに, 胃組織および十二指腸組織を摘出して病理組織学的評価を行った^{15,16)}。ヘマトキシリンエオジン染色において, A群のラットにおいてのみ胃粘膜への桿菌侵入像が認

* 大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座 (小児歯科学教室)

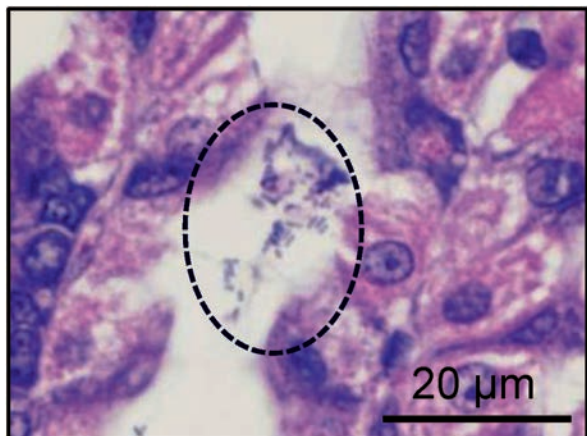


図1 ラット胃組織における *H. pylori* の局在 (ヘマトキシリンエオジン染色像)
点線囲みは桿菌を示す。

められ (図1), これらの桿菌は免疫組織染色により *H. pylori* 特異抗体に対して陽性反応を示した。また, 十二指腸組織におけるびらんの程度について, 国際病理用語・診断基準統一化委員会が定める基準を参考にしてスコア0から2の3段階で評価した。スコア0は上皮の傷害を認めないもの, スコア1は筋層粘膜に至らない上皮の傷害が全体の50%未満であるもの, スコア2は筋層粘膜に至らない上皮の傷害が全体の50%以上であるものとした。その結果, A群における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。

S. mutans および *H. pylori* の バイオフィーム形成能の分析

1%スクロース含有Brain heart infusion 液体培地中にて *S. mutans* MT8148R 株および *H. pylori* J99 株の菌液をそれぞれ 1.0×10^7 CFU/mL となるよう調整し, *S. mutans* 単独の菌液, *H. pylori* 単独の菌液, *S.*

mutans と *H. pylori* を合わせた菌液をそれぞれ 200 μ L ずつチャンバースライドへ添加し, 微好気性環境下において 37 $^{\circ}$ C で 18 時間培養した。培養した菌液に含まれる *S. mutans* と *H. pylori* をそれぞれ蛍光免疫染色¹⁷⁾, 共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。その結果, *H. pylori* は単独培養では単層のバイオフィームを形成するに留まったが, *S. mutans* と共培養することでバイオフィーム内に *H. pylori* が広く分布していることが確認された (図2)。さらに, チャンバースライド内における *H. pylori* 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高い割合を示した。

おわりに

本研究結果より, 小児期に *S. mutans* と *H. pylori* を両方投与したラットにおいてのみ *H. pylori* は口腔へ定着し, 象牙質に及ぶ蝕の本数が最も多いことが示された。また, これらのラットにおいてのみ *H. pylori* は胃粘膜へ侵入し, より重篤な十二指腸病変を引き起こすことが明らかとなった。さらに, バイオフィーム形成能の分析により, *H. pylori* は単独でもわずかにバイオフィームを形成するが, *S. mutans* と共培養することで *H. pylori* の割合が有意に増加することが示された。これらのことから, *H. pylori* は *S. mutans* が定着した小児期の口腔へ侵入し, *S. mutans* が形成するバイオフィームやう窩に存在することで口腔へ定着する可能性が示された。さらに, *H. pylori* は口腔を介して胃へと移行して病原性を発揮していることが示唆された。

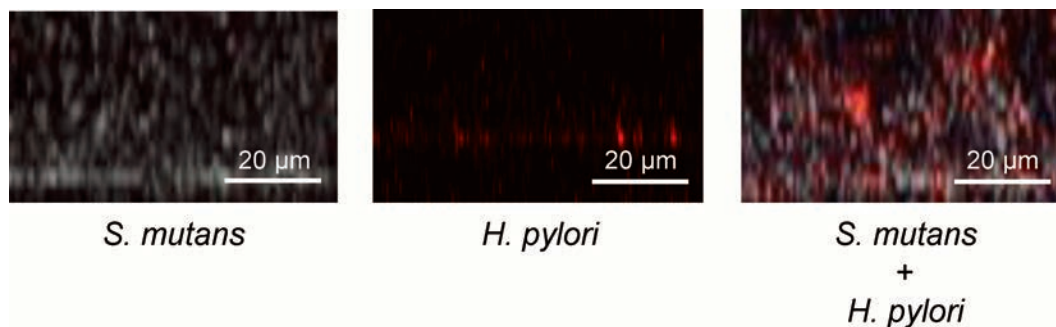


図2 *S. mutans* および *H. pylori* によるバイオフィーム形成 (共焦点レーザー顕微鏡像)
白色部は *S. mutans*, 赤色部は *H. pylori* をそれぞれ示す。

文 献

- 1) Fennerty, M. B. (1994): *Helicobacter pylori*. *Arch Intern Med*, **154**, 721-727.
- 2) Banatvala, N., Clements, L., Abdi, Y., Graham, J. Y., Hardie, J. M. and Feldman, R. A. (1995): Migration and *Helicobacter pylori* seroprevalence: Bangladeshi migrants in the U. K. *J Infect*, **31**, 133-135.
- 3) Pounder, R. E. and Ng, D. (1995): The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment Pharmacol Ther*, **9**, Suppl 2, 33-39.
- 4) Dye, B. A., Kruszon-Moran, D. and McQuillan, G. (2002): The relationship between periodontal disease attributes and *Helicobacter pylori* infection among adults in the United States. *Am J Public Health*, **92**, 1809-1815.
- 5) Andres, G. and Karen, E. N. (2017): The oral microbiome of children: development, disease and implications beyond oral health. *Microb Ecol*, **73**, 492-503.
- 6) Caufield, P. W., Cutter, G. R. and Dasanayake, A. P. (1993): Initial acquisition of *mutans streptococci* by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res*, **72**, 37-45.
- 7) Krzyściak, W., Jurczak, A., Kościelniak, D., Bystrowska, B. and Skalniak, A. (2014): The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilm. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **33**, 499-515.
- 8) Nomura, R., Nakano, K. and Ooshima, T. (2004): Contribution of glucan-binding protein C of *Streptococcus mutans* to bacteremia occurrence. *Arch Oral Biol*, **49**, 783-788.
- 9) Ooshima, T., Minami, T., Fujiwara, T., Sobue, S. and Hamada, S. (1998): Comparison of the cariostatic effects between regimens to administer oolong tea polyphenols SPF rats. *Caries Res*, **32**, 75-80.
- 10) Sengupta, P. (2013): The laboratory rat: relating its age with human's. *Int J Prev Med*, **4**, 624-630.
- 11) Kawai, S., Takagi, Y., Kaneko, S. and Kurosawa, T. (2011): Effects of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. *Exp Anim*, **60**, 481-487.
- 12) Nakano, K., Nomura, R., Nakagawa, I., Hamada, S. and Ooshima, T. (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.
- 13) Marques, da Silva R., Caugant, D. A., Eribe, E. R., Aas, J. A., Lingsaas, P. S. Geiran, O., Tronstad, L. and Olsen, I. (2006): Bacterial diversity in aortic aneurysms determined by 16S ribosomal RNA gene analysis. *J Vasc Surg*, **44**, 1055-1060.
- 14) Nomura, R., Ogaya, Y., Matayoshi, S., Morita, Y. and Nakano, K. (2018): Molecular and clinical analyses of *Helicobacter pylori* colonization in inflamed dental pulp. *BMC Oral Health*, **18**, 64.
- 15) Nolte, T., Brander-Weber, P., Dangler, C., Deschl, U., Elwell, M. R., Greaves, P., Hailey, T., Leach, M. W., Pandiri, A. R., Rogers, A., Shackelford, C. C., Spencer, A., Tanaka, T. and Ward, J. M. (2016): Nonproliferative and proliferative lesions of the gastrointestinal tract, pancreas and salivary glands of the rat and mouse. *J Toxicol Pathol*, **29**, 1S-125S.
- 16) Kojima, A., Nakano, K., Wada, K., Takahashi, H., Katayama, K., Yoneda, M., Higurashi, T., Nomura, R., Hokamura, K., Muranaka, Y., Matsuhashi, N., Umemura, K., Kamisaki, Y., Nakajima, A. and Ooshima, T. (2012): Infection of specific strains of *Streptococcus mutans*, oral bacteria, confers a risk of ulcerative colitis. *Sci Rep*, **2**, 332.
- 17) Nakano, K., Tsuji, M., Nishimura, K., Nomura, R. and Ooshima, T. (2006): Contribution of cell surface protein antigen PAc of *Streptococcus mutans* to bacteremia. *Microbes Infect*, **8**, 114-121.