

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 永田量子
学位 博士(歯学)
学位記番号 新大院博(歯)第470号
学位授与の日付 令和3年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Current prevalence of oral *Helicobacter pylori* among Japanese adults determined using a nested polymerase chain reaction assay

論文審査委員 主査 教授 野杵 由一郎
副査 教授 寺尾 豊
副査 教授 照沼 美穂

『博士論文の要旨』

学位申請者永田量子氏より提出のあった主論文(英文)の要旨(和訳)は、以下の通りである。

【背景および目的】

胃がんや慢性胃炎の原因である *Helicobacter pylori* の感染率は国の衛生状態などの条件により、19~88%と異なる。*H. pylori* の感染経路は不明確であり、胃のみならず口腔内からも検出されている。しかし、*H. pylori* は口腔では休眠状態で存在するため、培養法では検出困難である。これまで、口腔 *H. pylori* の検出には PCR 法が主体となって使用されてきた。しかし、その検出率は 0%~100%とばらつきがあり、明らかではない。現在、日本の衛生環境は改善され *H. pylori* の感染率は減少したため、胃がんの発生率も減少すると予想されている。胃と口腔の *H. pylori* 感染について強い関連性がある場合、若年者集団における胃と口腔の *H. pylori* 感染率の低下は相関すると考えられる。しかし、日本人の口腔 *H. pylori* 検出率に関する知見はない。そこで本研究では、Nested PCR 法にて日本人の口腔 *H. pylori* 検出率を調査し、年齢、性別、サンプリング部及び病歴ごとに相対頻度を分析した。

【方法】

本研究は新潟大学倫理審査委員会へ申請承認後、承認ガイドラインに従って行われた(承認番号 2017-0150)。被験者は 2018 年 1 月から 2020 年 4 月までに新潟大学医歯学総合病院歯の診療科を受診し、本研究の趣旨を説明し同意が得られた 24-91 歳の男女 88 名(女性 54 名、男性 34 名、平均年齢 52 歳)とした。試料は無刺激唾液、舌苔及び上顎前歯、下顎前歯、上顎右側臼歯、下顎左側臼歯部のデンタルバイオフィルム(DB)を採取した。陽性対照は *H. pylori* IID3023 株を、陰性対照は滅菌蒸留水を使用した。各試料から DNA を抽出後、417bp を標的遺伝子とした EHC プライマーにてシングルステップ PCR を、続いて、228bp を標的遺伝子とした ET-5 プライマーを用いて Nested PCR を行った。増幅産物の有無は、1.5%アガロースゲル電気泳動により確認した。

Nested PCR にて *H. pylori* が検出された口腔サンプルと陽性対照株の増幅産物の 228bp 部をアガロースゲルカッターで切り出し、精製後、DNA シークエンシングによる相同性解析を行った。さらに、*Streptococcus mutans* UA159 株と、*H. pylori* IID3023 株を段階希釈した混合細菌懸濁液を作製し、その PCR 増幅産物より Nested PCR 法の検出限界を解析した。

【結果と考察】

C DNA シークエンシングの結果、Nested PCR で増幅した遺伝子は、*H. pylori* 標準株の遺伝子と 100%の相同性が確認された。口腔 *H. pylori* の陽性率はシングルステップ PCR にて 88 人中 2 人(2.3%)、Nested PCR にて 88 人中 32 人(36.4%)であった。男女間での検出率に有意差はなく(男性

29.4%、女性 40.7%)、年齢別でも、高齢者(65-91 歳)、中高年者(35-64 歳)、若年者(24-34 歳)で検出率は各々 38.7、48.3、21.4%であり有意差はなかった($p > 0.05$, χ^2 test)。このことは口腔 *H. pylori* は性別や年齢に関係なく存在し、成人の口腔細菌叢の一部である可能性が示された。また、*H. pylori* 罹患歴がある被験者の陽性率は 80.0%で有意に高く($p < 0.05$, Fisher's exact probability test)、口腔が *H. pylori* の潜在的なリザーバーとして機能していることが示唆された。罹患歴のある被験者の内 1 名は 2 ヶ月毎に試料を提供し、*H. pylori* は 6 回中 3 回検出された。これは *H. pylori* が口腔内で存在する時と生息していない時期があり、検出には複数回のサンプル回収が必要であることを示唆している。部位別では、歯肉縁上 DB での検出率が高く(30.7%)、特に前歯部にて多く検出された($p < 0.05$, Fisher's exact probability test)。このことから、前歯部の酸素濃度が *H. pylori* の生存に最適な環境である可能性があり、生息部位は環境依存的であると考えられた。検出限界はシングルステップ PCR にて 1×10^4 CFU であり Nested PCR にて 10CFU であった。この結果、DB 中において *H. pylori* の予想される存在比率は 0.0001%未満と考えられる。

【結論】

口腔 *H. pylori* は胃への感染の有無にかかわらず口腔内に存在している可能性があることが示された。しかし、口腔が *H. pylori* の感染および再感染の潜在的なリザーバーとして機能しているかは不明である。口腔細菌叢、口腔疾患および胃がんの再発に対する口腔 *H. pylori* の影響を解明するためには感染機序や感染経路等、更なる研究が必要である。

『審査結果の要旨』

学位申請者永田量子 氏より提出のあった主論文をもとに、寺尾教授は令和3年2月10日に、照沼教授は令和2年2月14日に、野村は令和3年2月12日に各々7項目、9項目、7項目について諮問を実施した。口頭ならびに後日文章にて適切かつ十分な回答を得たので合格と判定いたしました。これらより主論文の成果は新潟大学博士(歯学)の学位に相応しいと評価した。

本研究は、口腔 *Helicobacter pylori* (ピロリ菌) の網羅的検索を目指して企画されたものである。WHO がピロリ菌を『確実な発がん因子』と認定し、ピロリ菌除菌に胃がん予防効果があることが認知されているが、口腔ピロリ菌の生息状況・感染機序等の詳細は不明であるという背景を踏まえて立案された。口腔ピロリ菌は coccoid-form で存在し、VNC(Viable not culturable)菌体であることが知られ生きた状態で同定することが不可能な菌である。よって、口腔ピロリ菌検出には PCR 法、抗原抗体反応や酵素活性測定法が応用されているが、検出率はほぼつき (0-100%) がある。そこで我々は、PCR(Polymerase chain reaction)法の変法で、その感度が数倍から 10 倍程度高いと考えられている、Nested PCR 法を用いて口腔ピロリ菌の検出を試みた。新潟大学倫理審査委員会へ申請承認後(承認番号 2017-0150)、新潟大学医歯学総合病院、歯の診療科を受診し本研究の趣旨を説明し同意が得られた 24-91 歳の男女 88 名(女性 54 名、男性 34 名、平均年齢 52 歳)を対象とし、唾液、舌苔、ならびに口腔各所よりデンタルバイオフィルムを採取し Nested PCR 法にて検索した。Nested PCR 法により増幅した遺伝子は、参考菌株(*P. pylori* IID3023 株)の遺伝子と 99.5% 相同性があり、100 万菌体細胞中に 1 菌体のピロリ菌が存在すれば、本 Nested PCR 法により検出可能で、その特異度・感度は良好であった。その陽性率は 36% (32/88 人) であった。年齢別では、高齢者 (65-91 歳)、中高年者 (35-64 歳)、若年者 (24-34 歳) で各々 39、48、21% であるが有意差はなかった ($p > 0.05$)。胃にピロリ菌の罹患歴がある人の陽性率は高かったが (80%, $p < 0.05$)、胃の未検査者の 27% からピロリ菌が検出された。採取部位別では、下顎前歯 (22%)、上顎前歯 (16%) が高く、口腔ピロリ菌の生存は環境 (特に酸素分圧) 依存的であると考えられた。

本研究では口腔のピロリ菌のみをターゲットにしている為、口腔と胃のピロリ菌の関連は不明のまま、両サンプルを同時に検索し遺伝子型を解析すればピロリ菌の感染機序の一端が解明できると考えられる。さらに幼少期より経時的に長期的に解析を継続することにより、ピロリ菌感染の全貌が明らかになり、胃癌撲滅に向けた口腔由来の予防キャンペーンの実施も夢ではない。現在、本学附属病院消化器内科との共同研究により、胃と口腔のピロリ菌の遺伝子解析中という事であり、本研究は高い発展性を有し、学位論文として十分な価値があると考えられる。また、論文内容に関する諮問に対しても、満足な回答を得ることができ、博士(歯学)の学位を授与するにふさわしいと判断した。