

学位研究紹介
--------

## Nested PCR 法を用いて決定された日本人成人の口腔 *Helicobacter pylori* 有病率 Current Prevalence of Oral *Helicobacter pylori* among Japanese Adults Determined Using a Nested Polymerase Chain Reaction Assay

新潟大学大学院医歯学総合研究科歯学分野

永田 量子

Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics,  
Faculty of Dentistry & Graduate School of Medical and Dental  
Sciences, Niigata University

Ryoko Nagata

### 【目的及び背景】

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<sup>1)</sup>。*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<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup>。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<sup>4)</sup>。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<sup>5)</sup>。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* 感染率の低下は関連すると考えられる。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* 検出率を検索し、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】

#### 1. 被験者の選択

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。

#### 2. 試料採取部位、方法

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。舌苔は舌ブラシにて、舌表面を 2,3 回擦り、生理食塩水内に攪拌した。DB は滅菌したスプーンエキスカベータにて採取した。各試料は 10000rpm 10 分で遠心分離を行い、DNA 抽出まで -80 にて凍結保存した。

#### 3. DNA 抽出, Nested PCR

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 (NucleoSpin<sup>®</sup> Microbial DNA Kit, TaKaRa Bio), 417bp を標的遺伝子とした EHC-U (5'-CCCTCAGCCATCAGTCCCAAAA A-3') と EHC-L (5'-AAGAAGTCAAAAACGCCCAAAA AC-3') 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-5U (5'-GGCAAATCATA AGTCCGCAGAA-3') と、ET-5L (5'-TGAGACTTTCCT AGAAGCGGTGTT-3') 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<sup>6)</sup>。

#### 4. DNA シークエンシング

Nested PCR にて *H. pylori* が検出された口腔内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 (Miseq ペアエンド解析, イルミナ社)。

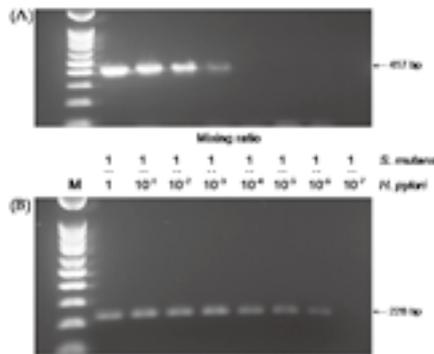
さらに、*Streptococcus mutans* UA159 株と、*H. pylori* IID3023 株を段階希釈した混合細菌懸濁液を作製し、その PCR 増幅産物より Nested PCR 法の検出限界を解析した。

### 【結果および考察】

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 ( $p > 0.05$ ,  $\chi^2$  test) (Table 1)。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) (Table 1), 口腔が *H. pylori* の潜在的なりザーバーとして機能していることが示唆された。

Table 1. Association between the presence of oral *H. pylori* and socio-demographic variables and medical history.

	Individuals (Positive/Total)	Prevalence (%)	<i>p</i>
<b>Gender</b>			
Male	10/34	29.4	0.364
Female	22/54	40.7	
<b>Generation (age)</b>			
Young (24 to 34)	6/28	21.4	0.103
Middle-aged (35 to 64)	14/29	48.3	
Elderly (64 to 91)	12/31	38.7	
<b>Medical history</b>			
Gastric infection carrier & Received eradication therapy Experience not required	12/15	80.0	0.02
	20/73	27.4	

Figure 1. Detection limits for single-step and nested PCR. PCR products were prepared from bacterial suspensions containing various proportions of *H. pylori* IID3023 and *S. mutans* UA159<sup>7)</sup>. A: Single-step PCR. B: Nested PCR. Lane M, 100-bp DNA ladder.Table 2. Frequent sites of oral *H. pylori*<sup>7)</sup>.

	Individuals (Positive/Total)	Prevalence (%)	OR
<b>Supragingival biofilm</b>			
Lower incisor	19/88	21.6	24.0
Upper incisor	14/88	15.9	16.5
Lower left molar	3/88	3.4	3.1
Upper right molar	1/88	1.1	1
Saliva	4/88	4.5	
Tongue	2/88	2.3	

The number includes overlapping detections among the above individual sites. OR: Odds ratio

また、未検査者の27.4%からも *H. pylori* が検出された。さらに、罹患歴のある被験者のうち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* が口腔に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) (Table 2)。このことから、前歯部の酸素濃度が微好気条件を好む *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性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  $1 \times 10^4$  CFU であり Nested PCRにて 10 CFU 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 (Figure 1)。

## 【結 論】

口腔 *H. pylori* は胃への感染の有無にかかわらず口腔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り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。

## 【引用文献】

- 1) Hooi, J.K.Y. Lai, W.Y. Ng, W.K. Suen, M.M.Y. Underwood, F.E. Tanyingoh, D. Malfertheiner, P. Graham, D.Y. Wong, V.W.S. Wu, J.C.Y. et al. Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: Systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*. 153, 420-429, 2017.
- 2) Yee, J.K.C. Are the view of *Helicobacter pylori* colonized in the oral cavity an illusion? *Exp. Mol. Med.* 49, e397, 2017.
- 3) Dowsett, S.A. Kowolik, M.J. Oral *Helicobacter pylori*: Can we stomach it? *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 14, 226-233, 2003.
- 4) Adler, I. Muiño, A. Aguas, S. Harada, L. Diaz, M. Lence, A. Labbrozzi, M. Muiño, J.M. Elsner, B. Avagnina, A. et al. *Helicobacter pylori* and oral pathology: Relationship with the gastric infection. *World J. Gastroenterol.* 20, 9922-9935, 2014.
- 5) Miyamoto, R. Okuda, M. Lin, Y. Murotani, K. Okumura, A. Kikuchi, S. Rapidly decreasing prevalence of *Helicobacter pylori* among Japanese children and adolescents. *J. Infect. Chemother.* 25, 526-530, 2019.
- 6) Song, Q. Spahr, A. Schmid, R.M. Adler, G. Bode, G. *Helicobacter pylori* in the oral cavity: High prevalence and great DNA diversity. *Dig. Dis. Sci.* 45, 2162-2167, 2000.
- 7) Nagata R. Ohsumi T. Takenaka S. Noiri Y. Current Prevalence of Oral *Helicobacter pylori* among Japanese Adults Determined Using a Nested Polymerase Chain Reaction Assay *Pathogens*. 24; 10(1): 10, 2020.