

平成30年6月18日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08956

研究課題名(和文) 唾液による、実用的なH. pyloriの診断・抗生剤感受性試験の開発

研究課題名(英文) Development of practical method for the diagnosis of infection and antibiotics susceptibility of H. pylori

研究代表者

半田 修 (Handa, Osamu)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90381970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：H. pylori診断には時間や費用を要する。本研究では既報の「唾液内のH. pyloriの存在」に着目し、唾液を用いた迅速かつ安価なH. pylori感染診断と抗生剤感受性試験の開発を試みた。まず、H. pyloriが確実に存在する標準液を用い、既報のH. pyloriのDNAの鋳型(プライマー)でPCRを行うと、H. pylori特異的なピークが認められた。しかし患者の唾液(感染者・非感染者)では特異的なピークは認めなかった。PCRの条件変更、他プライマーの使用、検体濃縮、H. pyloriの毒素DNAに対するプライマーに変更など試みたが、唾液内のH. pyloriは検出不可であった。

研究成果の概要(英文)：Diagnosis for H. pylori requires time and expenses. In this study, we focused on "the existence of H. pylori in saliva" as previously reported and by using saliva, attempted to develop a rapid and inexpensive H. pylori infection diagnosis and an antibiotic susceptibility test. First, using a standard solution in which H. pylori was reliably present, PCR was carried out with a template (primer) of H. pylori DNA as previously reported and an H. pylori-specific peak was recognized. However, in patients saliva (infected / non-infected), no specific peak was observed. We tried modification of PCR condition, use of other primers, concentration of specimen, change to primer for toxin DNA of H. pylori, but H. pylori in saliva was not detectable.

研究分野：ヘリコバクター・ピロリ、消化器内科学

キーワード：唾液 ヘリコバクター・ピロリ PCR 感染診断

1. 研究開始当初の背景

本邦の *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 除菌成功率は年々低下してきており、その一因として抗生剤耐性 *H. pylori* (耐性 HP) の増加があげられる。本邦では HP の耐性の如何に関わらず除菌メニューの変更は不可であるが、耐性 HP の除菌に際して感受性の無い抗生剤を投与することは医学的にも医療経済的にも望ましくない。将来的には *H. pylori* の抗生剤感受性に応じたテーラード除菌を行うことが望まれる。その基本である *H. pylori* の抗生剤感受性試験の欠点として 1) 内視鏡下生検で行うこと、2) 日数を要すること、3) 高額であること、があげられる。つまり、*H. pylori* の抗生剤感受性をいかに非侵襲的に、短時間で、安価に診断するかが今後の *H. pylori* 除菌の鍵を握っている。

唾液中の *H. pylori* の存在診断については、これまでに母から児への食事の口移しにより感染することが報告されており、近年では口腔内の歯垢や唾液に *H. pylori* が存在することが報告されているが、臨床の現場では実用化されていない。現在、おこなわれている最も早い *H. pylori* 診断法は、内視鏡下生検検体を用いて菌体のウレアーゼ活性を利用し間接的に診断をおこなう方法で、最短1時間で施行可能である。しかし、頻用されるプロトンポンプ阻害薬を服用していると偽陰性を生じる、内視鏡下生検を必要とする、出血のリスクを伴うなど不都合な点も多く、日々の臨床の中ではストレスを感じる。本研究では *H. pylori* の遺伝子を直接検出するため内服薬に左右されず確実であり、濾紙に染みこませた乾燥唾液を用いるため、非常に低侵襲で、検体の扱いが簡単で、PCR の装置があればどこでも簡便におこなえ、1000 円/検体と安価で、2 時間で結果が得られるという臨床に最も近い方法を用いて、*H. pylori* の存在診断が可能になると予測される。

抗生剤感受性試験に関しては、現在内視鏡下生検培養が標準的に行われているが、上記同様侵襲的、高額(7千円程度)、時間を要する(最短2週間)といった欠点を有する。それらの報告のいくつかでは *H. pylori* 遺伝子に対する PCR 法が使用されており、彼らは自らの方法を「簡便で迅速な *H. pylori* の存在診断方法」とであると結論付けている。しかし、既存の *H. pylori* 存在診断法と比べると、これらの報告されている診断法はその簡便性、迅速性、精度などに関して、実用に堪えるものではなく実際の臨床の場では使用されていないのが現状である。

分担研究者の木下健司は濾紙上に滴下した一滴の血液を用いたアルコール脱水素酵素(ADH)1BとALDH2遺伝子のSNPを同定するための画期的PCR法を開発し、検査の大幅なコストダウンを実現している。この手法を用いて今回の検討をおこなう。

今回、「唾液による非侵襲的で、短時間でおこなえる、安価な *H. pylori* の抗生剤感受性

試験」を今後の標準試験とすべく、本申請研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究は唾液を検体として用いることにより、現在の *H. pylori* 診療の臨床的障壁を取り除くことを目的とする。即ち現行の検査法と比較して圧倒的に安価、迅速、非侵襲、簡便、確実な、*H. pylori* の存在診断法ならびに *H. pylori* の抗生剤感受性試験法、を開発することである。

3. 研究の方法

本研究では、濾紙に唾液を浸透させ、乾燥させたもの(乾燥濾紙唾液)を検体として使用する。

(1) *H. pylori* の存在診断について、従来の存在診断法(迅速ウレアーゼ試験、尿素呼気試験、血清抗ヘリコバクター抗体、便中抗原のいずれか)と本検討の乾燥濾紙唾液診断法とで比較を行う。本検討はそれぞれの従来法による診断法をランダムに割り付けるため、各群の症例数確保のために時間を要する。27年度から3年をかけておこなう。*H. pylori* 存在診断は通常診療としておこなう。上記記述の4種類のうち1種類の検査を行うが、内視鏡的に陽性が疑われるにもかかわらず、上記診断法で陰性の場合、さらに残り2つのうちいずれかの方法で確認を行う。それぞれの症例からは唾液採取前に書面で説明のうえ同意取得をする。乾燥濾紙唾液は、具体的にはPCRに直接使用して *H. pylori* の16SrRNAを増幅するStraightforward TaqMan Genotyping Assay (STGA)法(研究分担者である木下健司が開発:特許公開2012-157295:遺伝子の増幅方法、特定遺伝子の検出方法)にておこなう。これまでに唾液中では *H. pylori* はcoccoid formで存在することが報告されているが、STGA法では *H. pylori* の遺伝子を解析するため、問題なく判定が可能である。

(2) 28年度からは、(1)で確立した検査の流れに追加する形で、*H. pylori* の抗生剤耐性について、従来の内視鏡下生検培養法と本検討の乾燥濾紙唾液による抗生剤感受性試験とで比較をおこなう。

4. 研究成果

唾液中で coccoid form で存在する *H. pylori* は従来の培養法では検出出来ないが、PCR により *H. pylori* の遺伝子を増幅し TaqMan Genotyping Assay により検出が可能である。

唾液からの DNA 抽出

冷凍にて保管しておいた唾液を室温にて融解し、その 400 μ l から Qiuck Gene SP kit DNA tissue (KURABO, Osaka, Japan) を用いて DNA を抽出した。

PCR

調整した DNA 溶液 5 μ l をテンプレートして、Primer (100nM)、Probe (250nM)、Path qPCR Master Mix, CG (Applied Biosystems) を使用し 95 15 秒、60 60 秒を 60 サイクルの条件下にて Real-Time PCR を行った。

既報では唾液検体でも解析に十分な菌量を得られると報告されている。当初、*H. pylori* の菌体が確実に存在する標準菌液を染みこませた乾燥濾紙 (乾燥濾紙 *H. pylori* 菌液) を用いて、既報で用いられている *H. pylori* に対する特異的プライマーで検出を試みたところ、ネガティブコントロールに比べて、乾燥濾紙 *H. pylori* 菌液では十分なピークがみられた。次に検体を菌液の代わりにヒト唾液 (*H. pylori* 感染者・非感染者) を濾紙に採取し乾燥させたもの (乾燥濾紙唾液) に変更して、同様のプライマーを用いて *H. pylori* 特異的なピークの検出を試みたところ、*H. pylori* 感染者、非感染者のいずれでも同様のピークがみられた。既報で用いられている *H. pylori* に対するプライマーを複数種使用し同様の検討をおこなうも、乾燥濾紙 *H. pylori* 菌液では *H. pylori* 特異的なピークが見られるも、*H. pylori* 感染者の乾燥濾紙唾液では *H. pylori* 特異的なピークが得られなかった。また、*H. pylori* の菌体毒素である cytotoxin-associated gene A(cagA) に対するプライマーを用いたが、同様の結果であった。

また、唾液採取の方法に問題があると考え、唾液採取前日の21:00以降は絶食、採取当日は起床時 (朝食前) に採取し、運動、喫煙を禁止、一度のうがい後に自然に分泌される唾液を容器内に自然滴下したものを採取しもちいたが、同様の結果であった。

標準菌液では特異的なピークがみられることより手技的に問題はないと考えられる。それにもかかわらず特異的なピークが検出出来ない理由は、唾液中の菌量の不足、もしくは報告されているプライマーの特異度に問題があるものと考えられる。

以上の結果をまとめると、唾液を用いた *H. pylori* 感染の正診率は 50.7% と非常に低く、微小な菌量をいかに感度特異度とも高く検出するかが課題であると考えられた。

陰性的中率 : 61.7%

陽性的中率 : 25.0%

感度 : 21.0%

特異度 : 65.9%

正診率 : 50.7%

< 引用文献 >

Montaz H, Souod N, Dabiri H, Sarshar M. Study of *Helicobacter pylori* genotype status in saliva, dental plaques, stool and gastric biopsy samples. World J Gastroenterol 2012; 18(17): 2105-2111.

Yamazaki S, Kato S, Matsukura N, Ohtani M, Ito Y, Suto H, Yamazaki Y, Yamakawa A, Tokudome S, Higashi H, Hatakeyama M, Azuma T. Identification of *Helicobacter pylori* and the cagA genotype in gastric biopsies using highly sensitive real-time PCR as a new diagnostic tool. FEMS Immunology and Medical Microbiology 2005; 44: 261-268.

__Rimbara E, Sasatsu M, Graham DY. PCR detection of *H. pylori* in clinical samples. Methods Mol Biol. 2013; 943: 279-287.

Patel SK, Pratap CB, Jain AK, Gulati AK, Nath G. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: what should be the gold standard? World J Gastroenterol. 2014 Sep 28; 20(36): 12847-59.

Wang XM¹, Yee KC, Hazeki-Taylor N, Li J, Fu HY, Huang ML, Zhang GY. Oral *Helicobacter pylori*, its relationship to successful eradication of gastric *H. pylori* and saliva culture confirmation. J Physiol Pharmacol. 2014. Aug; 65(4): 559-66.

Hayashida M¹, Iwao-Koizumi K, Murata S, Yokoyama A, Kinoshita K. Genotyping of polymorphisms in alcohol and aldehyde dehydrogenase genes by direct application of PCR-RFLP on dried blood without DNA extraction. Anal Sci. 2010; 26(4): 503-5.

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

半田修. 基本から学ぼう、胃潰瘍・胃癌とピロリ菌. 第 45 回日本潰瘍学会. 2017年11月.

半田修. 高齢者の胃粘膜病変. 第20回日本高齢消化器病学会. 2017年7月.

半田修. 若年者に対する胃癌予防のあり方 Session overview. 第23回日本ヘリコバクター学会学術集会. 2017年7月.

Osamu Handa, Yuji Naito et al. Multi-center prospective “test and treat” study on *Helicobacter pylori* for high school students in Kyoto Prefecture. Digestive Disease Week 2017. 2017年5月.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

半田修 (HANDA, Osamu)

京都府立医科大学 消化器内科学 助教

研究者番号 : 90381970

(2) 研究分担者

内藤裕二 (NAITO, Yuji)

京都府立医科大学 消化器内科学 准教授

研究者番号 : 00305575

水島かつら (MIZUSHIMA, Katsura)
京都府立医科大学 消化器内科学 助教
研究者番号： 20564115

木下 健司 (KINOSHITA Kenji)
武庫川女子大学・薬学部・教授
研究者番号： 70441219