

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17546

研究課題名(和文) 奈良県のHelicobacter spp.による環境汚染とヒトへの感染経路の解明

研究課題名(英文) Analysis of environmental contamination by Helicobacter spp. and its infection routes to humans in Nara prefecture.

研究代表者

堀内 沙央里 (Horiuchi, Saori)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：40794334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：胃がんの発生と関連があるHelicobacter pylori(ピロリ菌)の感染源を特定することを目的に、胃がんの発生が多い地域のヒトと日常生活環境(163検体採取)におけるH. pyloriの蔓延実態を調査した。結果、住民の便検体の20%からH. pylori遺伝子が検出された。検出されたH. pyloriのうち、特に胃がんのリスクを高めるとされるcagA遺伝子を保有していた株は33.3%であった。日常生活環境検体からはH. pylori遺伝子は検出されなかったが、質問紙調査の結果からは動物(主にイヌ)が感染源として疑われ、人獣共通感染症の視点も含めた更なる疫学調査の必要性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、胃がんの発生が多い県内の地域住民および生活環境中におけるH. pyloriの蔓延実態が明らかになった。生活環境検体の調査からはH. pyloriの感染源は特定されなかったが、今後は生活環境に加え、人獣共通感染症の視点も含めた更なる疫学調査の必要性が示唆された。地域においてH. pyloriの感染源を包括的に検討している研究は少ないため、本研究をモデルケースとして確立することで、今後の大規模な疫学調査の基盤となる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Chronic infection with Helicobacter pylori have been proved to be associated with gastric cancer. We aimed to clarify the prevalence of H. pylori in the community, where gastric cancer incidence is high, for the identification of infection source. We collected 163 samples (90 fecal samples from the residents and 73 environmental samples; water samples used for drinking and daily life, as well as, vegetables which were homegrown for eating in the raw and feces from animals, including pets and wild animals).

H. pylori glmM gene was detected in 20% (18/90) of fecal samples from the residents. The cagA-positive H. pylori strains which considered significantly increased risk of gastric diseases was detected only in 33.3% (5/18) of H. pylori positive fecal samples. Although H. pylori was not detected in environmental samples, contact with living environment especially animals, were suggested as the sources of infection, based on the questionnaire.

研究分野：公衆衛生看護学

キーワード：Helicobacter pylori 感染源 PCR cagA 住民 動物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter spp. (ヘリコバクター属) なかでも *Helicobacter pylori* (ピロリ菌) には世界人口の 50%以上が感染しており、主に幼少時代に生活環境から経口感染することが示唆されている (Letters in Applied Microbiology 38:517-21, 2004)。これらの胃内への慢性的な感染は胃炎、胃・十二指腸潰瘍、さらには胃がんなどの消化器疾患を引き起こす原因となることが報告されている。また、*Helicobacter* spp. の中には人獣共通感染症を引き起こすものもあるが、これらの環境中での生態については未だ十分に解明されていない。

Helicobacter spp. の環境中における分布について、国外ではスペインの土壤 (Biomed & Biotechnol 11:27-9, 2010)、イランの飲料水や生野菜 (Jundishapur J Microbiol 7:e10013, 2014) あるいはエジプトの生活用水 (Iran J Public Health 44:203-10, 2015) から *H. pylori* が 1~11%の割合で検出されている。国内でも北海道から関東、および九州地方の井戸や川を中心とした水源 (Microbiol Immunol 45:515-9, 2003) から 10~15%の割合で *H. pylori* が検出されている。それに加え、日本や欧米諸国ではイヌやネコの糞便、胃、口腔内、および消化器症状が見られるヒトの胃からの *Helicobacter heilmannii* の検出が報告されている (Pol J Vet Sci 19:237-43, 2016)。

このように、世界各国において生活環境中の *Helicobacter* spp. の存在が確認されているが、その疫学調査数は少ないのが現状である。また、*Helicobacter* spp. への感染のコントロールには、感染の最終媒介物を特定し、それらからの感染を遮断する必要があるが、検索しうる限りにおいて多角的に *Helicobacter* spp. の感染経路やその感染リスクを検討した研究は行われていない。

我が国では、胃がんの年齢調整死亡率および罹患率は減少傾向にあるが、罹患者数は依然として 1年に 13 万人以上にものぼっている。奈良県でも同様の傾向が見られるが、県内の胃がんの年齢調整死亡率は全国平均を上回る値で推移しており、標準化死亡比においては地域差が見られる状況である ([www.pref.nara.jp/secure/116472/smr\(ppt\).pdf](http://www.pref.nara.jp/secure/116472/smr(ppt).pdf))。さらに、胃がんの罹患者数も他部位における悪性新生物と比較して多くなっている。そのため、奈良県において *Helicobacter* spp.、なかでも *H. pylori* 感染を予防することは、感染に起因する消化器疾患や胃がんへの罹患の減少につながると考えられるため、地域における感染の実態を明らかにし、感染予防策を講じることが急務である。しかし、県内において住民の生活とこれらへの感染、さらには胃がんの罹患に焦点を当てた疫学調査は実施されていない。

臨床現場における *H. pylori* の感染診断には、侵襲的なものから非侵襲的なものまで様々な検査法が用いられている。しかし感度はそれぞれで異なり、診断の精度を上げるためには複数の検査法を組み合わせる必要があると言われている。遺伝子検査法は、臨床現場における *H. pylori* 感染の診断には使用されていないが、感染をより正確に効率よく診断するためには重要であると考えられており、これまでに PCR 法を用いた胃生検検体や、便検体からの *H. pylori* の検出が開発されている。そのため、本研究では遺伝子検査法である PCR 法を用いて *H. pylori* の持つ遺伝子の検出を実施する。

2. 研究の目的

胃がんの死亡が多い奈良県内において、地域住民と住民の生活に密接に関係する水、土壌、ペットなどの動物からなる生活環境中における *Helicobacter* spp.、特に *H. pylori* の蔓延実態に関する調査を行う。これらの結果から地域住民への *Helicobacter* spp. の感染実態および感染源を明らかにし、住民の感染リスクを評価する。さらに、正確な情報の提供や感染予防策を講じることにより、住民が主体的に *Helicobacter* spp. への感染予防ができるよう啓発を行う。最終的には住民自らが取る予防行動によって *Helicobacter* spp. への感染を減少させ、*Helicobacter* spp. 感染に起因する胃がんを含む消化器疾患への罹患率を減少させることを目的とする。

また、*H. pylori* の検出について、遺伝子検査法のなかでも迅速で感度、特異度が極めて高く、既に臨床現場においてインフルエンザや結核などの診断に利用されている Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法の開発および臨床現場への応用可能性を検討する。

3. 研究の方法

医の倫理審査委員会の承認を得た後、本研究に協力していただける奈良県内の市町村を対象に実施した。

(1) 住民の *H. pylori* の感染実態の解明

研究参加者 90 名から便検体を採取し、PCR 法と培養法により *H. pylori* の検出を試みた。PCR 法では、*H. pylori* のハウスキーピング遺伝子である *glmM* 遺伝子、および胃がんの発生に関与するとされている病原遺伝子である *cagA* 遺伝子を増幅し、増幅産物を DNA シークエンシングによって解析した。培養法では、37 微好気環境下においてヘリコバクター寒天培地を使用して便検体から直接 *H. pylori* の培養を行った。

(2) *H. pylori* の感染源の解明

H. pylori の感染源を推察するために、参加者 90 名に対して日常生活に関する質問紙調

査を実施し、得られた結果を *H. pylori* 遺伝子陽性群と陰性群に分け、統計解析を使用して比較検討した。

さらに、飲料水を含む生活用水、生野菜、そしてペットや野生動物の糞便からなる生活環境検体 73 検体を採取し、PCR 法と培養法により *H. pylori* の検出を試みた。PCR 法により、*H. pylori glmM* 遺伝子および *cagA* 遺伝子、そして *Helicobacter* 属 16S ribosomal RNA 遺伝子を増幅し、増幅産物を DNA シークエンシングにより解析した。培養法では、便検体と同様に 37 微好気環境下においてヘリコバクター寒天培地を使用して培養を行った。

(3) *H. pylori cagA* 遺伝子の迅速検査法 (LAMP 法) の開発

我が国において開発された遺伝子迅速検査法である LAMP 法を用いて、胃がんの発症に関連するとされている *H. pylori cagA* 遺伝子の検出法の開発を行った。具体的には、Genbank に登録されている標準株を含む *H. pylori* 6 株を用い、*cagA* 遺伝子配列の相同性の高い領域を選択することにより、LAMP プライマーを作成し、感度を従来の PCR 法と比較検討した。

4. 研究成果

(1) 住民の *H. pylori* の感染実態の解明

便 90 検体中 18 検体 (20%) から *H. pylori glmM* 遺伝子が検出された (表 1)。便検体からの *H. pylori glmM* 遺伝子の検出に性差は見られなかった ($p > 0.05$)。 *H. pylori glmM* 遺伝子が検出された 18 検体のうち、特に胃がんのリスクを高めるとされる *cagA* 遺伝子が陽性であったものは 6 検体の 33.3%であった。便検体からは、*H. pylori* は培養されなかった。

(2) *H. pylori* の感染源の解明

今回採取した生活環境検体 73 検体からは PCR 法、培養法ともに *H. pylori* は検出されなかった。

質問紙調査においては、動物、特にイヌに接触していた参加者の割合が、*H. pylori glmM* 遺伝子陽性群では陰性群と比較して優位に高かった ($p < 0.05$)。また有意差は見られなかったが、日常生活において土壌に接触していた、あるいは水道水以外の水源を生活に使用 (飲水含む) していた参加者の割合は *H. pylori glmM* 遺伝子陽性群では、陰性群と比較して高い状況にあった (表 1)。

増幅されたヘリコバクター属 16S rRNA 遺伝子のシークエンス解析により、動物の糞便から *Helicobacter* spp. 遺伝子 (*Helicobacter canis*, *Helicobacter macacae*) が検出された。これら動物の糞便から検出された *Helicobacter* spp. 遺伝子の宿主であるイヌとサルは、*H. pylori* の宿主にもなり得る、あるいは接触により *H. pylori* への感染リスクが上昇する可能性が既存の研究から証明されている。そのため、*H. pylori* の感染源の特定のためには人獣共通感染症の視点も含めた更なる疫学調査の必要性が示唆された。

表 1. 日常生活における *H. pylori* 感染のリスク要因

項目	回答者の割合 (%)	
	<i>glmM</i> 遺伝子陽性 (n=18)	<i>glmM</i> 遺伝子陰性 (n=72)
動物と接する	38.9	20.0
イヌと接する	38.9*	12.9
庭や畑で土を触る	94.1	85.3
水道水で手を洗う	88.2	95.6
湧き水や山水で手を洗う	23.5	14.7
水道水を飲む	88.2	94.1
湧き水や沢の水を飲む	17.6	11.8

* $p < 0.05$

(3) *H. pylori cagA* 遺伝子の迅速検出法の開発

H. pylori cagA 遺伝子をターゲットとした LAMP プライマーセットの開発を試みた。本プライマーセットを使用して LAMP 法における *H. pylori cagA* 遺伝子の検出を PCR 法

と比較したところ、感度は 10^{-1} cfu/tube で PCR 法より 10 倍高く、最速 16 分で検出可能で迅速性 (PCR 法では約 140 分) が確認できた (図 1)。さらに、便検体中でも本遺伝子の検出感度は 10^{-1} cfu/tube と高感度であり、最速 20 分で検出可能で迅速性にも優れていた。

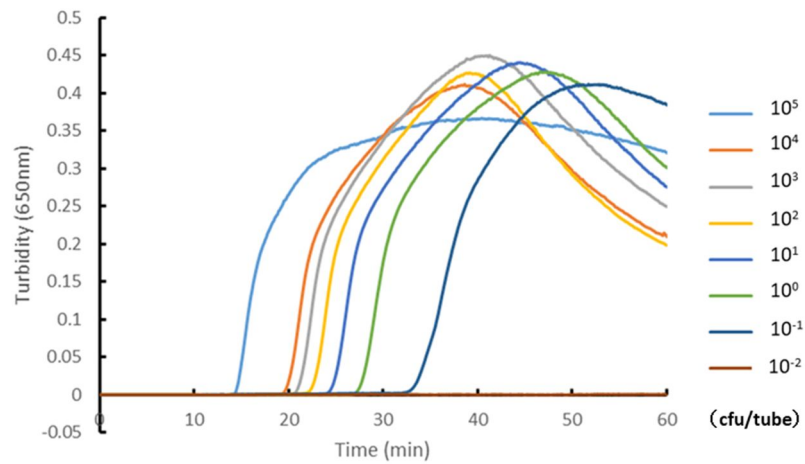


図 1. LAMP 法による *H. pylori* cagA 遺伝子の検出感度

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Saori Horiuchi, Ryuichi Nakano, Akiyo Nakano, Naokuni Hishiya, Kenji Uno, Yuki Suzuki, Ayako Tanouchi, Naoki Kakuta, Takashi Masui, Noriko Jojima, Hisakazu Yano.	4. 巻 163
2. 論文標題 Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid <i>Helicobacter pylori</i> detection.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Microbiological Methods	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mimet.2019.105653	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀内沙央里、中野竜一、中野章代、城島哲子、矢野寿一
2. 発表標題 <i>Helicobacter pylori</i> 検出のためのLAMP 法の開発
3. 学会等名 第88回日本感染症学会西日本地方会学術集会・第61回日本感染症学会中日本地方会学術集会・第66回日本化学療法学会西日本支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀内沙央里、中野竜一、中野章代、鈴木由希、角田尚紀、矢野寿一
2. 発表標題 奈良県における住民の <i>Helicobacter pylori</i> への感染実態と感染経路の検討
3. 学会等名 第89回日本感染症学会 西日本地方会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀内沙央里、中野竜一、中野章代、鈴木由希、角田尚紀、角田梨紗子、城島哲子、矢野寿一
2. 発表標題 奈良県における <i>Helicobacter pylori</i> の感染源の検討
3. 学会等名 第31回日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中野 竜一 (Nakano Ryuichi)		
研究協力者	中野 章代 (Nakano Akiyo)		
研究協力者	菱矢 直邦 (Hishiya Naokuni)		
研究協力者	宇野 健司 (Uno Kenji)		
研究協力者	鈴木 由希 (Suzuki Yuki)		
研究協力者	城島 哲子 (Jojima Noriko)		
研究協力者	矢野 寿一 (Yano Hisakazu)		