

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K10607

研究課題名（和文）飲食物の微生物汚染と胆嚢がん発症の関係及び本症早期診断のための血液検査体系の確立

研究課題名（英文）Associations of bacterial contamination in drinking waters and aflatoxin B1 with developing gallbladder cancer

研究代表者

生駒 俊和（Ikoma, Toshikazu）

新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：60612744

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：インド北部の胆嚢がん患者10名の家庭で使用している井戸水中に常在している細菌叢をメタゲノム解析し、AcinetobacterやFlavobacteriumなどの菌種が検出された。予想していた腸チフス菌やヘリコバクターピロリ菌は検出されなかった。胆嚢がん患者45人、胆嚢炎患者57人、健常者55人の血清中アフラトキシンB1-リジン付加体濃度をELISA法で測定し、胆嚢がん患者32人（71%）、胆嚢炎患者22人（39%）、健常者4人（7%）からアフラトキシンB1が検出された。胆嚢がん患者の検出率は胆嚢炎患者、健常者に比べ有意に高く、アフラトキシンB1汚染と胆嚢がん発生との関連が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆嚢がんは世界的には稀な悪性腫瘍であるが、特定の国や地域、あるいは民族で多発しており、5年生存率が低い予後不良のがんである。胆嚢がん多発国、インド北部の胆嚢がん患者、胆嚢炎患者、及び健常者を対象とした本症例対象研究において、アフラトキシンB1 リジン付加体の血清レベルに基づくアフラトキシンB1への曝露と胆嚢がんとの関連が明らかとなった。我々の知見が、他の方法、例えばHPLC法などで検証されれば、アフラトキシンB1への曝露を減らすことでインド北部における胆嚢がんの発生率、死亡率を減らせる可能性が示唆された。今後、アフラトキシンB1汚染源を解明する追加研究が必要である。

研究成果の概要（英文）：Metagenomic analysis of bacterial flora indigenous in well water used for eating and drinking in the homes of 10 patients with gallbladder cancer in northern India detected bacterial species such as Acinetobacter and Flavobacterium. The concentration of aflatoxin B1-lysine adduct in serum collected from 45 patients with gallbladder cancer, 57 patients with cholecystitis, and 55 healthy subjects was measured using a commercial ELISA test kit, and aflatoxin B1 was detected in 32 (71%) patients with gallbladder cancer, 22 (39%) patients with cholecystitis, and 4 (7%) healthy subjects. From the above, the expected Typhoid fever bacteria and Helicobacter pylori were not detected in drinking water. On the other hand, the detection rate of aflatoxin B1 in patients with gallbladder cancer was significantly higher than that in cholecystitis patients and healthy subjects, suggesting a relationship between aflatoxin B1 exposure and developing gallbladder cancer.

研究分野：疫学

キーワード：胆嚢がん インド 飲料水 細菌汚染 アフラトキシンB1

1. 研究開始当初の背景

胆嚢がんのリスク要因の 1 つとして、チフス菌、ヘリコバクター属菌感染が報告されている (Kumar et al. J Sur Oncol, 2006)。胆嚢がん多発国であるインドは腸チフス罹患率が高い国でありチフス菌感染と胆嚢がんとの関係が示唆される。これまで、両者の関係を調べた研究結果はいくつか報告されている (Csendes et al. Eur J Surg, 1994; Sharma et al. Hepato-Gastroenterol, 2007) が培養検査で菌の慢性持続が明らかにされたことは稀である。一方、先の研究で、胆嚢がん患者宅で飲食に使用している水中から簡易検査法により細菌を検出した (生駒俊和ほか, 医学検査, 2016)。しかし、汚染されている菌種については不明のままである。

アフラトキシン B1 暴露が胆嚢がんのリスク要因であるとする報告が、チリ人や中国人を対象とした研究で明らかにされている (Nogueira et al. JAMA, 2015; Koshiol et al. Gastroenterology, 2017)。インドにおける赤唐辛子のアフラトキシン類汚染と胆嚢がん発生との関係を明らかにする地域相関研究で、インドで摂取されている赤唐辛子は高濃度のアフラトキシン類に汚染されていることを明らかにした (Ikoma et al. Asian Pac J Cancer Prev, 2016)。しかし、インドにおいてアフラトキシン B1 への暴露が胆嚢がんのリスク要因であるとする直接的なデータはほとんど無い。

2. 研究の目的

細菌感染と胆嚢がん発症との関係を明らかにするため、胆嚢がん患者宅で飲食に使用している水中に生息している細菌叢を網羅的に明らかにすること。アフラトキシン B1 への暴露と胆嚢がん発症との関係を明らかにするため、胆嚢がん患者、胆石を有する胆嚢炎患者 (胆嚢炎患者) 及び健常者の血清中のアフラトキシン B1-リシン付加体濃度を ELISA 法により測定し、胆嚢がん患者が胆嚢炎患者や健常者よりもアフラトキシン B1 への曝露量が多いかどうかを調べること、さらに、胆嚢がん患者と胆嚢炎患者の術前診断時、及び同時期に採取した健常者の血液検査値の特徴を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 胆嚢がん患者宅井戸水中の細菌叢のメタゲノム解析

インド、パラナシ市内、及びその近郊で胆嚢がんと診断された 10 名の患者宅を訪問し、飲食に使用している水 20L を採取した。その水を吸引ろ過し、ろ過後のメンブレンフィルター上から市販の DNA 抽出・精製キットを用いて DNA 抽出を行った。

抽出された DNA を用いて常在する細菌叢を明らかにするためメタゲノム解析を行った。16S rRNA 領域を増幅した PCR 産物を対象に、次世代シーケンサーを用いて大量に配列解析を行い、得られた配列を用いて 16S rRNA データベースに対する相同性検索および系統分類解析を実施し、どのような微生物がどれくらい存在しているかを明らかにした。

(2) 血清アフラトキシン B1-リシン付加体の濃度測定

インド、ジャイプール市の Mahatma Gandhi Medical College and Hospital で 2021 年 5 月から 2024 年 2 月までの間に胆嚢がん患者、胆嚢炎患者、及び健常者から末梢血を採取し、血清分離した。血清中のアフラトキシン B1-リシン付加体濃度は、市販キットと吸光マイクロプレートリーダーを用いて測定した。胆嚢がん患者、胆嚢炎患者、及び健常者の血清中から検出感度 (0.1 ng/mL) 以上のアフラトキシン B1-リシン付加体濃度が検出された例数と平均濃度を算出し、3 群におけるアフラトキシン B1 への曝露量を比較した。

(3) 血液検査値の比較

胆嚢がん患者と胆嚢炎患者の術前診断時とそれらと同時期に採取した健常者の血液中 Hb 値、白血球数、血小板数、及び血小板数 / 白血球数比を調べた。

4. 研究成果

(1) 胆嚢がん患者宅の井戸水から検出された菌名

胆嚢がん患者宅で飲食に使用している水 10 例のうち 5 例から DNA が検出された。メタゲノム解析により各試料から検出された上位 5 菌名を以下に示す (表 1)。

表 1 胆嚢がん患者宅の飲料水から検出された菌の属名

	No.2	No. 4	No. 5	No. 6	No. 7
1	Acinetobacter	Vogesella	Acinetobacter	Cloacibacterium	Comamonadaceae
2	Comamonadaceae	Rheinheimera	Acidovorax	Flavobacterium	Novosphingobium
3	Acinetobacter	Flavobacterium	Flavobacterium	Methylobacterium	Acinetobacter
4	Pseudomonas	Prostheco bacter	Rheinheimera	Rheinheimera	Hydrogenophaga
5	Cellvibrio	Comamonadaceae	Pseudomonas	Methylobacterium	Alphaproteobacteria

検出された菌は、土壌由来の菌が大部分を占め、当初予想していたサルモネラ菌やヘリコバクター ピロリ菌は検出されなかった。

(2) 血清アフラトキシン B1 リシン付加体検出率とその濃度

採取期間中に、胆嚢がん患者 45 名 (男性 18 名、女性 27 名)、胆嚢炎患者 57 名 (男性 22 名、女性 35 名)、健常者 55 名 (男性 20 名、女性 35 名) から血清を採取できた。

表 2 対象者の特性と血清アフラトキシン B1 値

	GBC (n = 45)	CC (n = 57)	HS (n = 55)	P値
年齢 (mean ± SD)	56.3 ± 12.8	50.9 ± 15.9	33.8 ± 11.4	<0.001
女性 (%)	27 (60)	35 (61)	35 (64)	0.93
AFB1 値 (mean ± SD)	7.9 ± 8.4	2.7 ± 4.5	0.3 ± 1.1	<0.001

GBC: 胆嚢がん患者、CC: 胆嚢炎患者、HS: 健常者

AFB1: アフラトキシン B1-リシン付加体、P 値: 一元配置分散分析による分析

対象者の平均年齢には 3 群間で有意差が認められた ($P < 0.001$)。多重比較検定により胆嚢がん患者と健常者間、胆嚢炎患者と健常者間には有意差が認められた ($P < 0.001$) が、胆嚢がん患者と胆嚢炎患者間には有意差は認められなかった ($P = 0.11$)。一方、女性患者の割合には 3 群間で有意差は認められなかった。

血清中からアフラトキシン B1-リシン付加体が検出された数は、胆嚢がん患者 32 名 (71%)、胆嚢炎患者 22 名 (39%)、健常者 4 名 (7%) で、3 群間の検出率には有意差 ($P < 0.001$) が認められた。さらに、多重比較検定により、胆嚢がん患者と胆嚢炎患者間、胆嚢がん患者と健常者間、胆嚢炎患者と健常者間には何れも有意差が認められた ($P < 0.001$)。一方、平均濃度は、胆嚢がん患者 > 胆嚢炎患者 > 健常者の順で高く、3 群間には有意差が認められた。多重比較検定により、胆嚢がん患者と胆嚢炎患者間、胆嚢がん患者と健常者間ではいずれも有意差が認められた ($P < 0.001$) が、胆嚢炎患者と健常者間には有意差が認められなかった ($P = 0.051$)。

経口摂取されたアフラトキシン B1 は胆汁中に比較的長時間残留し、次いで血清中の濃度が高いことが報告されている (Plakas et al. Food Chem Toxicol, 1991)。本研究では、対象とした胆嚢がん患者の平均年齢が胆嚢炎患者や健常者に比べ有意に高く、年齢による差が考えられたが、胆嚢がん患者の 59 歳未満と 60 歳以上の 2 群間ではアフラトキシン B1-リシン付加体の検出率と平均濃度には有意差が認められなかった。

以上の結果より、インド北部では、アフラトキシン B1 暴露が胆嚢がん発症と関与している可能性が示唆された。

(3) 血液検査値

胆嚢がん患者、胆嚢炎患者、健常者の Hb 値、白血球数、血小板数を以下の表 3 に示す。

表 3 血液検査値の比較

項目	GBC (n=51)	CC (n=194)	HC (n=193)	P値
Hb (g/dL)	11.2 ± 1.4	11.6 ± 0.9	11.6 ± 0.8	0.149
WBC ($\times 10^9/L$)	9.9 ± 4.4	7.4 ± 2.0	7.0 ± 1.8	<0.001
PLT ($\times 10^9/L$)	259 ± 108	276 ± 42	244 ± 65	<0.001

Hb: ヘモグロビン値、WBC: 白血球数、PLT: 血小板数

一元配置分散分析の等分散を仮定しない検定により、白血球数と血小板数に有意差が認められた。多重比較検定により、胆嚢がん患者は胆嚢炎患者に比べ、Hb 値が有意に低く ($P = 0.03$)、白血球数が有意に高かった ($P < 0.001$)。さらに、胆嚢がん患者は健常者に比べ、Hb 値が有意に低く ($P = 0.02$)、白血球数が有意に高かった ($P < 0.001$)。しかし、血小板数は胆嚢炎患者と健常者間で有意差 ($P < 0.001$) が認められたが、それ以外の群間には有意差は認められなかった。

(4) 得られた成果のインパクト

アフラトキシン B1 暴露と原発性肝臓がんの関係はこれまで既に明らかにされているが、胆嚢がんとの関係では直接的な証拠は少ない。本研究では、胆嚢がん多発国のインド北部において胆嚢がん患者の血清中のアフラトキシン B1 濃度は、胆嚢炎患者や健常者に比べて有意に高いことを明らかにした。胆嚢がん患者のアフラトキシン B1 に曝露していたオッズ比は胆嚢炎患者に対して 3.9、健常者に対して 31.4 を示した。これは、アフラトキシ B1 暴露と胆嚢がん発症との関係を示すものであり、今後の胆嚢がんの発症予防対策を講じるうえでも意義が高いものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ratnakar Shukla, Yasuo Tsuchiya, Anu Behari, Toshikazu Ikoma, Kazutoshi Nakamura, Vinay K Kapoor	4. 巻 online Jun 07
2. 論文標題 Metagenomic analysis of biliary microbial flora in patients with gallbladder cancer or gallstones-associated chronic cholecystitis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancer Investigation	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/07357907.2024.2361305	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 該当する
1. 著者名 Mishra K, Behari A, Shukla P, Tsuchiya Y, Endoh K, Asai T, Ikoma T, Nakamura K, Kapoor VK	4. 巻 154
2. 論文標題 Risk factor for gallbladder cancer development in northern India: a gallstones-matched case-control study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Indian Journal of Medical Research	6. 最初と最後の頁 699-706
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4103/ijmr.IJMR_201_19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 R Shukla, P Shukla, A Behari, D Khetan, R K Chaudhary, Y Tsuchiya, T Ikoma, T Asai, K Nakamura, VK Kapoor	4. 巻 22
2. 論文標題 Roles of Salmonella typhi and Salmonella paratyphi in Gallbladder Cancer Development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Asian Pac J Cancer Prev	6. 最初と最後の頁 509-516
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.31557/APJCP.2021.22.2.509	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Takao Asai, Yasuo Tsuchiya, Kumudesh Mishra, Anu Behari, Pooja Shukla, Toshikazu Ikoma, Vinay K Kapoor, Kazutoshi Nakamura	4. 巻 20
2. 論文標題 Carcinogen Metabolism Pathway and Tumor Suppressor Gene Polymorphisms and Gallbladder Cancer Risk in North Indians: A Hospital-Based Case-Control Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Asian Pac J Cancer Prev	6. 最初と最後の頁 3643-3647
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.31557/APJCP.2019.20.12.3643.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Takao Asai
2. 発表標題 The polymorphism of p53 tumor suppressor gene and the risk of gallbladder cancer
3. 学会等名 2nd JAIPUR SURGICAL FESTIVAL (JSF) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazuo Endoh
2. 発表標題 Risk factors for gallbladder cancer in northern India: A gallstones-matched, case-control study
3. 学会等名 2nd JAIPUR SURGICAL FESTIVAL (JSF) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasuo Tsuchiya
2. 発表標題 Metagenomic analysis of biliary bacterial flora in north Indian patients with gallbladder cancer or gallstones-associated chronic cholecystitis
3. 学会等名 2nd JAIPUR SURGICAL FESTIVAL (JSF) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toshikazu Ikoma
2. 発表標題 Lack of association between genetic variants involved in lipid metabolism and gallbladder cancer risk in North Indians
3. 学会等名 8th Annual Conference of Molecular Pathology Association of India (国際学会)
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
研究分担者	土屋 康雄 (Tsuchiya Yasuo) (60334679)	新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員 (13101)	
研究分担者	浅井 孝夫 (Asai Takao) (60612736)	順天堂大学・医療科学部・准教授 (32620)	
研究分担者	中村 和利 (Nakamura Kazutoshi) (70207869)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

	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	K a p o o r (Vinay K)		
研究協力者	S h u k l a (Ratnakar)		
研究協力者	P u n e e t (Prof.)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
インド	Mahatma Gandhi Medical College Hospital	Banaras Hindu University		