

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：82406

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26670612

研究課題名(和文) 光線力学療法によるHelicobacter pylori除菌に関する研究

研究課題名(英文) Photo dynamic therapy for eradication of Helicobacter pylori

研究代表者

平木 修一 (Hiraki, Shuichi)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・外科学・助教)

研究者番号：40638839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：H.pylori感染に対し本邦ではPPIと抗菌薬を用いた除菌療法が推奨されているが、抗生剤アレルギーを有する患者や、耐性菌の増加が問題となっており、新しい除菌法の開発が求められる。胃癌根治術症例の胃切除検体を用いてPDTによるHP除菌効果を実験的に検討した。各濃度のMBを塗布し、波長660nm、強度325mWの赤色光を100秒間照射し、培養法および迅速ウレアーゼ法による除菌効果の判定をおこなった。30症例から得られた検体にPDTを施行し、除菌効果を判定した。PDTによってMBを塗布せずとも29例(96.7%)で陰性を示し、培養法で陰性は11例のうち8例(72.3%)と良好な効果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter(H.) pylori has been categorised as a group 1 carcinogen for gastric cancer, but a decline in eradication rate attributable to an increase of antibacterial drugs resistant H. pylori has become a serious problem. It is necessary to develop a different application for eradicate H. pylori with photo dynamic therapy(PDT) as a novel treatment.H. pylori infection was confirmed by the upper endoscopy and intended for 30 obtained cases of the agreement for study entry. We got specimens and applied the methylene blue which varied in the density and examined the eradication effect of red color PDT. The specimen that PDT was performed in the state that without MB was 96.7% of rapid urease test became negative. The specimen of 11 cases was examined using a cultural method, and eight cases (72.8%) of those became negative.

研究分野：消化器外科

キーワード：Helicobacter pylori Photo dynamic therapy 除菌療法

1. 研究開始当初の背景

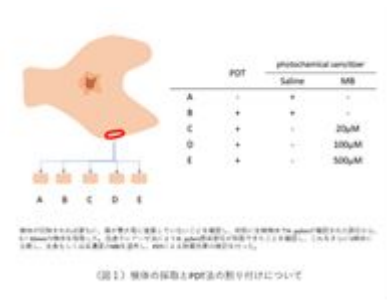
H.pylori 感染は、WHO によって胃癌の definite carcinogen と指定され(1, 2)、感染によって生じる慢性炎症から、萎縮性胃炎、そして腸上皮化生を生じ、胃癌のリスクが上昇することが報告されている(3-6)。本邦では PPI と抗菌薬を用いた除菌療法が推奨され、広く治療が行われている(7, 8)が、抗生剤にアレルギーを有する患者や、耐性菌の増加が問題となっており(9-11)、新しい除菌法の開発が求められる。

2. 研究の目的

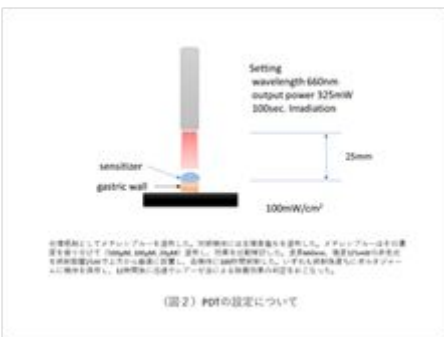
光線力学療法(PDT)を利用したHP除菌法の開発を目指し、胃癌根治術症例の胃切除検体を用いてPDTによるHP除菌効果を実験的に検討した。

3. 研究の方法

2015年4月1日から2017年3月31日の間に当科において胃癌に対し胃切除術が予定された症例のうち、術前精査時の上部内視鏡検査にてH. pylori 感染が確認され、研究参加に同意の得られた症例を対象とした。検体が切除されれば直ちに、癌が胃大弯に進展していないことを確認し、術前に生検検体でH.pylori が確認された部位から、15×5mmの検体を採取した。(図1)検体が切除されたと同時に、迅速ウレアーゼ法 CL0 test(Sysmex Co. Kobe, Japan)によりH. pylori 感染部位が採取できたことを確認し、これをさらに5検体に分割し、光増感剤として各濃度のメチレンブルー(MB)を塗布し、PDTによる除菌効果の検討を行った。なお、対照として生理食塩水を塗布した。



(図1) 検体の採取とPDT法の割り付けについて



(図2) PDTの設定について

PDT・迅速ウレアーゼ法、培養法による効果判定

各濃度(500µM, 100µM, 20µM)のMBを塗布し、PDTのHP除菌に対する効果を検討した。

MBもしくは生理食塩水を塗布した後に、波長660nm、強度325mWの赤色光を照射距離25mmで上方から垂直に設置し100秒間照射した(図2)。照射後直ちにポルタジャー姆に検体を保存し、8時間後に迅速ウレアーゼ法による除菌効果の判定をおこなった。

対象の30例のうち、11症例において、MB500µM塗布でのPDT施行後、胃壁の一部を採取しHP培養による効果判定を行った。

試薬・検査法

検体の移送・保存

検体の切除からPDT施行までの間や、PDT照射終了から迅速ウレアーゼ法による判定までの間は、Portagerm pylori(BIOMERIEUX Marcy-l'Etoile, France)に検体を保存したH. pylori 培養法

得られた検体をホモジナイズし、その懸濁液0.1mlを培地に接種する。選択分離培地にはピロリ寒天培地(Sysmex Co. Kobe, Japan)を用いた。微好気(CO2 8%, O2 8%)環境下で7日間培養した。微好気培養にはAnaero Pack(Mitsubishi gas Chem. Tokyo, Japan)を用いた。同定試験に、迅速ウレアーゼ試験を用い陽性を確認した。

研究の倫理委員会申請については防衛医科大学学校倫理委員会に2014/12/4申請をし、2015/3/9承認に承認された。

4. 研究成果

2015/4/1より2017/3/31の間、胃切除が予定された症例は170例であった。そのうち、術前評価時の内視鏡で、H. pylori 検索がなされた症例は65例(38.2%)。65症例のうち、CL0testによってH. pylori 陽性であった症例は36症例(55.4%)であった(data not shown)。36症例のうち、同意の得られた30症例(表1)で研究を実施した。

No.	Age	Sex	H. pylori detection			Gastric cancer with patient	
			biopsy	culture	specie test	cancer progression	operation
1	64	M	positive	positive	positive	T4N3M0	distal gastrectomy
2	79	M	+	+	positive	T4N0M0	distal gastrectomy
3	78	M	+	+	positive	T4N3M1	distal gastrectomy
4	75	M	+	+	positive	T4N3M1	distal gastrectomy
5	83	M	+	+	positive	T1N0M0	pylorus preserving gastrectomy
6	73	M	positive	positive	positive	T2N0M0	distal gastrectomy
7	73	M	+	+	positive	T1N0M0	total gastrectomy
8	73	M	negative	positive	positive	T1N0M0	total gastrectomy
9	72	M	negative	+	positive	T3N0M0	total gastrectomy
10	76	M	+	+	positive	T3N0M0	distal gastrectomy
11	62	M	+	+	positive	T2N0M0	total gastrectomy
12	63	M	+	+	positive	T2N0M0	total gastrectomy
13	74	M	+	+	positive	T1N0M0	distal gastrectomy
14	77	M	+	+	positive	T3N1M0	total gastrectomy
15	50	F	positive	positive	positive	T1N0M0	distal gastrectomy
16	72	F	positive	positive	positive	T2N1M0	total gastrectomy
17	78	M	+	+	positive	T4N2M0	total gastrectomy
18	68	M	+	+	positive	T3N1M0	total gastrectomy
19	78	F	+	+	positive	T1N0M0	distal gastrectomy
20	75	M	+	+	positive	T1N0M0	distal gastrectomy
21	67	M	+	+	positive	T2N0M0	total gastrectomy
22	65	F	positive	+	positive	T1N0M0	distal gastrectomy
23	65	M	positive	+	positive	T2N0M0	distal gastrectomy
24	67	M	+	+	positive	T1N0M0	distal gastrectomy
25	78	F	+	+	positive	T1N1M0	distal gastrectomy
26	74	F	negative	negative	positive	T1N0M0	pylorus preserving gastrectomy
27	68	M	+	+	positive	T1N0M0	pylorus preserving gastrectomy
28	84	F	positive	positive	positive	T2N1M0	distal gastrectomy
29	66	F	positive	positive	positive	T1N0M0	proximal gastrectomy
30	88	M	positive	+	positive	T4N3M1	total gastrectomy

表1 対象症例

30症例から得られた検体にPDTを施行し、除菌効果を判定した。この結果を表2に示す。MBを塗布せずともPDTによって29例(96.7%)で陰性であった。さらに、MB濃度を500µMとしたときにすべての症例で陰性になった。それ以下のMB濃度のPDTでは陽性となった症例が1例あった。11例のうち培

養法で陰性は 8 例 (72.3%)、陽性は 3 例 (27.3%) であった (表 2)。

	PDT semilazer	Urease test				Culture
		(-)	(+)	(-)	(+)	
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15	negative
16	negative
17	positive
18	negative
19	negative
20	negative
21	positive
22	negative
23	positive
24	negative
25	negative
26	negative
27	negative
28	negative
29	negative
30	negative

表 2 迅速ウレアーゼ法と培養法により PDT 除菌効果判定の結果
考察

今回我々は光線力学療法 (PDT) を利用した HP 除菌法の開発を目指し、胃癌根治術症例の胃切除検体を用い、PDT による HP 除菌効果を実験的に検討した。これまでも H.pylori 保菌者に対する胃内腔照射による PDT 除菌法に関していくつかの報告がみられる (12-15) が、その除菌効果は決して十分なものとは言えない。Lembo らは胃全体に照射可能な Light wand balloon を用いた violet phototherapy を行ったものの、その効果は長期には維持されなかったことを報告している (15)。また、Wilder らは、in vivo で 5-ALA を増感剤に使用した 50J/cm² での前庭部での限局的な PDT を行い、生検検体で評価したところ、その効果が限定的で、照射部位に再度 H.pylori が出現してくることを報告している (13)。これらの検討から、PDT による除菌法の困難性が、殺菌効果を得るに十分な波長のレーザーと増感剤を選択すること以外に、胃を十分に進展させてかつ均一・胃全体へと広範に、強度を保つことのできる PDT デバイスを開発することが必要ということであろうと示唆していると考えられる。

そこで、今回我々は、デバイスから照射すべき PDT の条件を求めるため、胃癌患者の切除検体を用いた検討を行った。Millson らは H. mustela の Ferret の胃粘膜感染モデルおよび H. pylori suspension を用いて、様々な光増感剤による PDT の検討を行い、MB で最も効果を発揮したことを報告しており (16)、今回我々は、H. pylori に対し十分な殺菌効果を持つ可能性の高い PDT 法として、MB を用いた赤色光での PDT を選択した。今回の検討で、赤色光による PDT によって高い除菌効果が示されたが、さらに MB を高濃度で塗布することで、より優れた除菌効果が得られる可能性が示された。一方で、培養法では 72.3% にと

どまっており、H.pylori が死滅に至らなかった場合に、PDT による治療効果がこれまでの検討と同じく、限定的となりうることを示唆している。PDT が細菌に対し有効であることは知られているもののその機序は明らかでなく、多方向もしくは複数回照射による治療効果増強についての検討を考慮している。今回の検討では、胃粘膜への照射条件が一定に保たれることで良好な結果が得られたと考えられる。が、本研究の問題点として、ex vivo で行ったため H. pylori が room air にさらされたことが好成績に影響した可能性も否定はできない。この点については、各処置の間の検体の保存に輸送培地を用いることや、照射の準備から照射完了までの間をできる限り少なくすること、そしてコントロール検体でこの間の迅速ウレアーゼ法で陽性が維持されていることが確認できた症例で検討を行うことでその影響を可能な限り少なくした。

今後、in vivo での検討や、実臨床への応用に向けてはいくつもの問題点がある。最も重要と考えられることは、胃全体に安定した光照射を行うに十分なデバイスの開発である。本研究の結果を踏まえ、MB を十分に散布したうえで、胃を十分に進展させた状態に保ち、胃壁からの距離と照射時間を保持できるようなデバイスの開発が今後の検討課題である。

結語

除菌に十分な PDT の条件を明らかにするために、ex vivo の安定した PDT 条件での検討を行った。高濃度の MB 散布による PDT が効果的であるという結果が得られた。しかし、実臨床で効果を再現するには課題が多く、更なる検討が必要である。

謝辞

本研究は JSPS 科研費 JP26670612 の助成を受けた。

参考文献

1. Forman D, Newell DG, Fullerton F, Yarnell JW, Stacey AR, Wald N, et al. Association between infection with Helicobacter pylori and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *BMJ*. 1991 Jun 1;302(6788):1302-5.
2. Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 1994;61:1-241.
3. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, et al. Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med*. 2001 Sep 13;345(11):784-9.
4. Watanabe T, Tada M, Nagai H, Sasaki S, Nakao M. Helicobacter pylori infection induces gastric cancer in

mongolian gerbils. Gastroenterology. 1998 Sep;115(3):642-8.

5. Asaka M. Helicobacter pylori infection and gastric cancer. Intern Med. 2002 Jan;41(1):1-6.

6. Asaka M, Sugiyama T, Nobuta A, Kato M, Takeda H, Graham DY. Atrophic gastritis and intestinal metaplasia in Japan: results of a large multicenter study. Helicobacter. 2001 Dec;6(4):294-9.

7. Asaka M, Kato M, Takahashi S, Fukuda Y, Sugiyama T, Ota H, et al. Guidelines for the management of Helicobacter pylori infection in Japan: 2009 revised edition. Helicobacter. 2010 Feb;15(1):1-20.

8. Suzuki H, Iwasaki E, Hibi T. Helicobacter pylori and gastric cancer. Gastric Cancer. 2009;12(2):79-87.

9. Sasaki M, Ogasawara N, Utsumi K, Kawamura N, Kamiya T, Kataoka H, et al. Changes in 12-Year First-Line Eradication Rate of Helicobacter pylori Based on Triple Therapy with Proton Pump Inhibitor, Amoxicillin and Clarithromycin. J Clin Biochem Nutr. 2010 Jul;47(1):53-8.

10. Matsuzaki J, Suzuki H, Nishizawa T, Hirata K, Tsugawa H, Saito Y, et al. Efficacy of sitafloxacin-based rescue therapy for Helicobacter pylori after failures of first- and second-line therapies. Antimicrob Agents Chemother. 2012 Mar;56(3):1643-5.

11. Kawai T, Takahashi S, Suzuki H, Sasaki H, Nagahara A, Asaoka D, et al. Changes in the first line Helicobacter pylori eradication rates using the triple therapy-a multicenter study in the Tokyo metropolitan area (Tokyo Helicobacter pylori study group). J Gastroenterol Hepatol. 2014 Dec;29 Suppl 4:29-32.

12. Hamblin MR, Viveiros J, Yang C, Ahmadi A, Ganz RA, Tolkoff MJ. Helicobacter pylori accumulates photoactive porphyrins and is killed by visible light. Antimicrob Agents Chemother. 2005 Jul;49(7):2822-7.

13. Wilder-Smith CH, Wilder-Smith P, Grosjean P, van den Bergh H, Woodtli A, Monnier P, et al. Photoeradication of Helicobacter pylori using 5-aminolevulinic acid: preliminary human studies. Lasers Surg Med. 2002;31(1):18-22.

14. Ganz RA, Viveiros J, Ahmad A, Ahmadi A, Khalil A, Tolkoff MJ, et al. Helicobacter pylori in patients can be killed by visible light. Lasers Surg Med. 2005 Apr;36(4):260-5.

15. Lembo AJ, Ganz RA, Sheth S, Cave

D, Kelly C, Levin P, et al. Treatment of Helicobacter pylori infection with intra-gastric violet light phototherapy: a pilot clinical trial. Lasers Surg Med. 2009 Jul;41(5):337-44.

16. Millson CE, Wilson M, MacRobert AJ, Bedwell J, Bown SG. The killing of Helicobacter pylori by low-power laser light in the presence of a photosensitiser. J Med Microbiol. 1996 Apr;44(4):245-52.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件) 投稿準備中

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕無し

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平木 修一 (HIRAKI, Shuichi)

防衛医科大学校医学教育部医学科専門課程、外科学助教

研究者番号: 40638839

(2) 研究分担者

守本 祐司 (MORIMOTO, Yuji)

防衛医科大学校医学教育部医学科進学課程及び専門課程、生理学教授

研究者番号: 10449069

小野 聡 (SATOSHI, Ono) 32645

東京医科大学 医学部教授

研究者番号: 30531355

宮崎 裕美 (MIYAZAKI, Hiromi)

防衛医学研究センター 助教

研究者番号: 30531636

長谷 和生

その他 学校長

研究者番号: 50511268

木下 学

防衛医科大学校医学教育部医学科進学課程及び専門課程、免疫・微生物学准教授

研究者番号: 70531391

辻本 広紀 (TSUJIMOTO, Hironori)

防衛医科大学校医学教育部医学科進学課程及び専門課程、医療安全・感染対策部教授

研究者番号: 80554998