

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21790427

研究課題名（和文）

ヘリコバクター・ハイルマニイ感染と胃 MALT リンパ腫形成の因果関係の検討

研究課題名（英文）

*Helicobacter heilmannii* infection and gastric MALT lymphoma

研究代表者

関谷 幸江 (SEKIYA YUKIE)

北里大学・北里生命科学研究所・研究員

研究者番号：10414054

研究成果の概要（和文）：東京周辺の上部消化管疾患患者(1,045 名)の内訳は、73.9%が *H. pylori* 陽性であり、1.1%が *H. heilmannii* 陽性であった。しかし胃 MALT リンパ腫患者に限定すると 25%の患者は、*H. heilmannii* 陽性であった。また *H. heilmannii* 陽性患者の 20%は *H. pylori* との混合感染であった。

研究成果の概要（英文）：In this case study conducted in Tokyo metropolitan area, it was revealed that the infection rates of *H. pylori* and *H. heilmannii* in upper gastrointestinal tract diseases were 73.9% and 1.1%, respectively (total 1,045 patients). However, on the restricted patients suffering from gastric MALT lymphoma, the infection rate of *H. heilmannii* was 25%. Besides, 20% patients in the *H. heilmannii*-infected were coinfecting with *H. pylori*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細菌学（含真菌学）

キーワード：*Helicobacter heilmannii*, 胃 MALT リンパ腫

## 1. 研究開始当初の背景

16S rRNA 遺伝子の配列が明らかにされた *Helicobacter* 属細菌は、これまでに 23 種類が報告されている。これらのうちヒトに対する病原性が確認されているのは、胃に寄生する *H. pylori*, *H. heilmannii* と腸肝循環(enterohepatic)菌である、*H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. fennelliae* である。また、近縁に位置する *H. heilmannii*,

*H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. suis* の 5 種は、*Helicobacter heilmannii*-like organisms (HHL0s) として表記される。申請者らは、ウレアーゼ陽性にも拘わらず、*H. pylori* が分離できない胃 MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) リンパ腫のヒト臨床検体から DNA を抽出し、特異プライマーを用いた PCR 法を用いて解析した結果、*H. heilmannii* 感

染を確認した。しかしヒト由来の生検体から本菌の純粋培養に成功した報告は未だ無い。

「平成 19～20 年度萌芽研究」、研究課題「ピロリ菌以外のヘリコバクター感染と消化器疾患の因果関係の検討」、研究代表者：関谷幸江、研究分担者：中村正彦、村山そう明、松井英則、課題番号:19659113 により全国的規模で胃の臨床検体中の *Helicobacter* 属細菌の感染状況の調査を試みた。平成 19 年～現在までに 570 例の胃生検体（内訳；MALT リンパ腫，16 例；胃食道逆流症，19 例；胃潰瘍，86 例；胃炎，269 例；胃癌，5 例；十二指腸潰瘍，70 例；その他，105 例）から DNA を調製し、特異プライマーを用いた PCR 法により、感染菌種の同定を行った。驚くべきことに、16 例の胃 MALT リンパ腫の臨床検体中から、6 例（約 40%）の *H. heilmannii* を主とした HHL0s の遺伝子断片を検出した。しかしながら、MALT リンパ腫を除く上部消化器疾患の生検体からは、554 例中 4 例（約 0.7%）のみ HHL0s の遺伝子断片を検出した。従って、ヒトにおいては、*H. heilmannii* を含む HHL0s 感染により、高頻度に胃 MALT リンパ腫が誘発されると結論づけた。*H. heilmannii* は、人獣共通感染菌で感染源はペットや産業動物が疑われるが、純粋培養法が確立しておらず、細菌学的解析は行われていない。

## 2. 研究の目的

- ① 「平成 19～20 年度萌芽研究」の継続として *H. heilmannii* 感染と胃 MALT リンパ腫の疫学的解析を継続し、因果関係を明らかにする。
- ② 胃生検体から *H. heilmannii* の分離法と純粋培養法を確立する。
- ③ *H. heilmannii* マウス感染モデルを用いて、プロバイオティクスの効果を調べる。

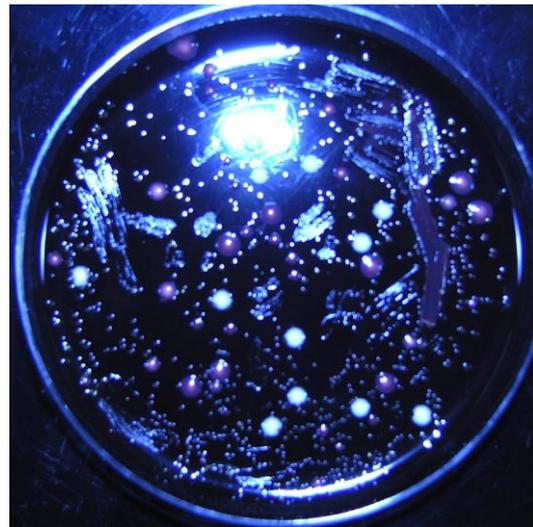
## 3. 研究の方法

- ① 胃生検体を PBS で懸濁し一部を Sepa-Max rabbit IgG（ウサギ IgG を固定化したナノ磁気ビーズ，JNC 石油化学・試作品）で処理し、非吸液を続いて Sepa-Max Hp（*H. pylori* 抗体を固定化したナノ磁気ビーズ，JNC 石油化学・試作品）で処理し、*Helicobacter* を分離した。

- ② 分離した *Helicobacter* は、ヘリコバクター寒天培地に塗布し、デシケーターを用いた混合ガス培養（ $H_2$  6%， $CO_2$  10%， $N_2$  84%）を行った（37°C，湿度 100%）。
- ③ 胃生検体の PBS 懸濁液の一部は、Proteinase K 処理とフェノール抽出により DNA を調製し、特異プライマーを用いた PCR により、感染菌種を同定した。
- ④ 胃生検体の PBS 懸濁液の残りは、4～6 週齢の♀の C57BL/6J マウスに経口ゾンデを用いて感染させた。
- ⑤ 感染マウスへ、各種乳酸菌を 2 週間経口投与した（1 日 1 回、 $10^8$  CFU）。投与終了 2 週間後にマウスを解剖し、胃粘膜から DNA を調製し、リアルタイム PCR により *Helicobacter* と乳酸菌の菌数を算定した。

## 4. 研究成果

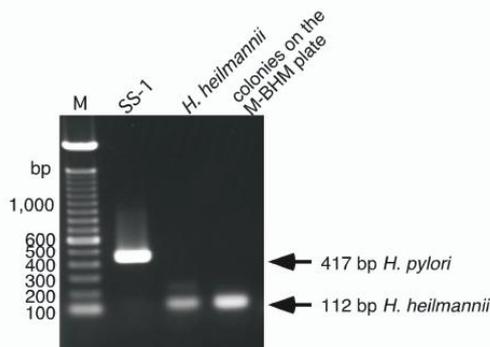
- ① 東京地域の上部消化管疾患患者（1,045 名）中 *H. pylori* 感染率は、73.9% で *H. heilmannii* 感染率は、1.1% であった。しかし、胃 MALT リンパ腫に限定すると、*H. heilmannii* の感染率は、25% であった。また、*H. heilmannii* 感染者の 20% は *H. pylori* との混合感染であった。このことから、*H. heilmannii* 感染と胃 MALT リンパ腫に因果関係を認めた。
- ② 胃疾患患者の生検体懸濁をヘリコバクター寒天培地に塗布し、微好気（6%  $O_2$ ，10%  $CO_2$ ，84%  $N_2$ ）中、37°C で一晩培養すると以下のように複数の菌が検出される。



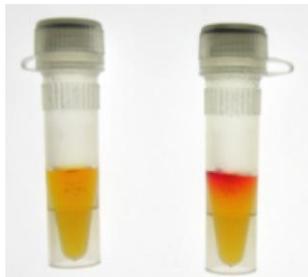
M-BHM 寒天培地

- ③ 胃疾患患者の生検体懸濁を

Sepa-Max rabbit IgG と Sepa-Max Hp を用いることで、*H. heilmannii* の単離には成功した。混合ガス (6% $H_2$ , 10% $CO_2$ , 84% $N_2$ ) 中で、37°C 3 日間培養後に *H. heilmannii* と思われるコロニーが出現した。生じたコロニーから DNA を調製し、特異プライマーを用いて PCR を行ったところ、*H. heilmannii* のバンドと一致した。



また、同じコロニーの PBS を用いた懸濁液は、ウレアーゼ陽性であった。



右がコロニーの懸濁液、左がコントロール (ウレアテストチューブ、日研生物医学研究所)

- ④ *Lactobacillus rhamnosus*, *L. johnsonii*, *L. gasseri*, *L. reuteri* の投与による感染防御効果は、*H. pylori* では認められたが、*H. heilmannii* では認められなかった。対照としてランソプラゾール (15 mg/kg)、クラリスロマイシン (50 mg/kg)、アモキシシリン (50 mg/kg) を 1 日 2 回、7 日間投与することで、*H. pylori* および *H. heilmannii* を完全に除菌することができた。

結論:

2006 年～2011 年の 5 年間の調査で *H. heilmannii* 感染と胃疾患、特に MALT リンパ腫に強い因果関係が認められた。*H. pylori* は、ヒト (親) → ヒト (子) に感染するため、乳幼児期の感染を防げれば、そ

の後感染する確率は極めて低い。一方、*H. heilmannii* は、動物→ヒトの感染経路をとる。80%以上の野生動物、産業動物、愛玩動物は、*H. heilmannii* に感染しており、特に愛玩動物 (イヌ・ネコ) からの感染に注意する必要がある。また、*H. heilmannii* 感染率は地域により大きく異なる。今回の調査は、東京地域であったため、地方では更に高い感染率が想定される。ウレアーゼ活性を有しない株も多く、起因菌が見つからないケースとして検査を依頼された検体の多くは、*H. heilmannii* 感染であった。また、*H. heilmannii* ゲノム解析に基づいて構築した新プライマーを用いた PCR 法では、更に高い感染率を示す。胃疾患が大きな問題となっている本邦において、全国規模の疫学調査が是非とも必要である。

##### 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 4 件)

- (1) Hidenori Matsui, Yukie Sekiya, Tetsufumi Takahashi, Masahiko Nakamura, Ken'ichi Imanishi, Haruno Yoshida, Somay Yamagata Murayama, Takashi Takahashi, Kanji Tsuchimoto, Takehiko Uchiyama, and Kimiko Ubukata. Dermal mast cells reduce progressive tissue necrosis caused by subcutaneous infection with *Streptococcus pyogenes* in mice. *Journal of Medical Microbiology*, 60 (1), 128-134, 2011.
- (2) Hidenori Matsui, Yukie Sekiya, Chihiro Aikawa, Somay Yamagata Murayama, Tetsufumi Takahashi, Haruno Yoshida, Takashi Takahashi, Kanji Tsuchimoto, and Masahiko Nakamura. "*Candidatus Helicobacter heilmannii*" infection in the course of gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma in human beings and mouse models.

Current Trends in Microbiology, 6, 27-34, 2010.

- (3) Hidenori Matsui, Yukie Sekiya, Masahiko Nakamura, Somay Yamagata Murayama, Haruno Yoshida, Tetsufumi Takahashi, Ken'ichi Imanishi, Kanji Tsuchimoto, Takehiko Uchiyama, Keinosuke Sunakawa, and Kimiko Ubukata. CD46 transgenic mouse model of necrotizing fasciitis caused by *Streptococcus pyogenes* infection. Infection and Immunity, 77 (11), 4806-4814, 2009.
- (4) 高橋哲史、松井英則、関谷幸江、中村正彦、土本寛二. 熱応答性磁性ナノ粒子を用いた細菌分離法. Progress in Medicine, 29(3), 751-754, 2009.

[学会発表] (計 7 件)

- (1) 日本における PCR 法を用いた胃生検体からの *Helicobacter heilmannii* DNA の検出 (Detection of *Helicobacter heilmannii* DNA in gastric biopsy specimens by PCR in Japan). 関谷幸江、中谷百合子、吉田春乃、村山そう明、中村正彦、松井英則. 85 回日本細菌学会総会、長崎ブリックホール・長崎新聞分化ホール, 3, 27-29, 2012.
- (2) CD46Tg マウスへの A 群レンサ球菌感染により誘導される骨壊死は T 細胞由来の RANKL に依存しない (Osteonecrosis in CD46 Tg mice caused by *S. pyogenes* infection is T cell-derived RANKL independent). 中谷百合子、松井英則、吉田春乃、関谷幸江、村山そう明、中村正彦、生方公子. 85 回日本細菌学会総会、長崎ブリックホール・長崎新聞分化ホール, 2012, 3, 27.

- (3) *Helicobacter heilmannii* 感染による胃 MALT リンパ腫病態形成時における宿主遺伝子発現の解析. 高橋 哲史, 中村 正彦, 松井 英則, 関谷 幸江, 土本 寛二. 39 回日本潰瘍学会、つくば国際会議場, 2011, 11, 18.
- (4) Gastric MALT lymphomas in mice infected with HHL0 from a patient with nodular gastritis. Tetsufumi Takahashi, Hidenori Matsui, Yukie Sekiya, Haruno Yoshida, Somay Murayama, and Masahiko Nakamura. 第 83 回日本細菌学会総会、パシフィコ横浜、平成 22 年 3 月 27 日.
- (5) Protective roles of skin mast cells in mouse models of necrotizing fasciitis caused by GAS infection Haruno Yoshida, Hidenori Matsui, Yukie Sekiya, Ken'ichi Imanishi, Tetsufumi Takahashi, Somay Murayama, Masahiko Nakamura, Takehiko Uchiyama, and Kimiko Ubukata. 第 83 回日本細菌学会総会、パシフィコ横浜、平成 22 年 3 月 27 日.
- (6) Maturation of Fundic Glandular Cells are Markedly Altered in IL-10(-/-) mice. Tetsufumi Takahashi, Masahiko Nakamura, Hidenori Matsui, Yukie Sekiya, Nobuhiko Kamada, Toshifumi Hibi, Kanji Tsuchimoto. 13th Taisho-Toyama International Symposium on Gastroenterology (Shimoda, Japan), 2009, April 16.
- (7) ヒト CD46 発現マウスを用いた実験的劇症型 A 群溶血性レンサ球菌感染症の解析. 松井英則、関谷幸江、中村正彦、高橋哲史、村山そう明、内山竹彦、砂川慶介、生方公子. 第 83 回日本感染

症学会総会、京王プラザホテル、平成  
21年4月23日.

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

関谷 幸江 (SEKIYA YUKIE)

北里大学・北里生命科学研究所・研究員

研究者番号：10414054