

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25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590680

研究課題名（和文）

食道バレット上皮、食道腺癌発生に関わる細菌叢T-RFLPプロファイル解析

研究課題名（英文）

Characterization of bacterial biota in the distal esophagus of Japanese patients with reflux esophagitis and Barrett's esophagus

研究代表者

安藤 貴文 (ANDO TAKAFUMI)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80378041

研究成果の概要（和文）：内視鏡所見および病理組織学的所見から正常コントロールならびに食道炎、バレット食道患者の診断を行い、食道下部内視鏡下生検検体よりDNAを抽出して16Sリボゾーム(r)RNAを指標とした消化管細菌叢の解析を行った。正常、食道炎、バレット食道それぞれに食道下部細菌叢に特徴のあることが認識された。この結果は、食道下部細菌叢の特徴により食道疾患が発生する可能性、あるいは、食道疾患によって食道下部細菌叢が規定される可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：We investigated bacterial composition in the distal esophagus in subjects with a normal esophagus, reflux esophagitis, and Barrett's esophagus. Biopsy specimens were obtained from the distal esophagus and used for histological examination and DNA extraction. Fragments of 16S rDNA genes were amplified by PCR using general bacterial primers, and bacterial populations were examined. Microbial communities differed among patients with a normal esophagus, reflux esophagitis and Barrett's esophagus. From this study, we conclude that esophageal bacterial composition differs under conditions of normal esophagus, reflux esophagitis, and Barrett's esophagus and Diverse bacterial communities may be associated with esophageal disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
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：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：食道炎、バレット食道、食道腺癌、食道下部細菌叢、16Sリボゾーム(r)RNA、シーケンス解析

1. 研究開始当初の背景
H. pylori 感染と胃炎、消化性潰瘍、胃癌の

発生、肝炎ウイルスと肝炎、肝臓癌の発生と

の関連が明らかにされ、最近では、腸内細菌と炎症性腸疾患の発生との関連についても報告されている。これら**消化器疾患と微生物感染との関わりの発見は新たな治療法の開発につながり、*H. pylori* 除菌により胃炎を、またインターフェロン治療による肝炎ウイルス排除により肝炎を治癒せしめ、胃癌、肝臓癌の発生を予防する治療法が確立されてきた。**近年、欧米では食道腺癌が増加し、米国では1970年代の6倍に達している。繰り返す食道炎から扁平上皮が円柱上皮化(バレット上皮)してバレット食道が発生し、さらに腸上皮化生を伴い食道腺癌が発生する。日本でも胃食道逆流症が増加しており、バレット食道、食道腺癌の増加が予想される。食道炎発生の原因として胃酸刺激が取り上げられ、治療には胃酸抑制剤が用いられている。しかし、食道炎は胃酸以外の十二指腸液などいわゆるアルカリ刺激によってもおこり、胃酸抑制剤によりバレット食道、食道腺癌の発生が予防できるかどうか明らかではない。ヒトの唾液には1mlあたり 10^8 個の細菌が存在し、胃内では胃酸の存在などにより減少するがそれでも1mlあたり 10^3 個の細菌が存在する。**食道下部において細菌叢の異常が炎症、発癌の原因となっている可能性がある。**

2. 研究の目的

我々は、上部消化管において *H. pylori* 感染と胃粘膜萎縮、胃癌の発生との関連について明らかにしてきた。*H. pylori* は微好気性菌であり分離・培養法が確立しているが、未知の微生物については好気性菌(偏性好気性菌と微好気性菌)であるのか嫌気性菌(通性嫌気性菌と偏性嫌気性菌)であるのかすらわからない。消化管の細菌は、高度な嫌気培養装置を用いても、70-80%は培養困難かあるいはその菌数が少ないため難分離性で菌同定にいたらない。**16Sリボゾーム(r)RNAを指標とする分子生物学的手法を導入すれば、この70-80%を占める難培養・難分離の消化管細菌叢の解析も可能**である。

バレット上皮、食道腺癌の発生は、日本ではまだ多くない。その前段階である胃食道逆流症、食道炎の患者は日常診療で多くみられる。これらの疾患患者ならびにコントロール群の食道下部粘膜生検組織を用いて、16SrRNAを指標とするT-RFLP法により食道下部細菌叢全容の変化を比較検討する。食道の炎症は

内視鏡所見のみでは、明確な診断、定量化が難しい。*H. pylori*に感染した胃でみられるように、肉眼的には異常がなくても、組織学的には強い炎症がある場合もあると考える。組織学的に炎症細胞浸潤の測定を行い、肉眼的所見と合わせて食道下部における炎症の診断と程度判定をする。バレット上皮、食道腺癌に特徴的な食道下部細菌叢を明確にすることを目指すが、研究期間内では少なくとも、食道下部細菌叢の変化が下部食道における炎症の発生と程度に影響することを明らかにする。

食道炎、バレット食道、食道腺癌は、*H. pylori*感染のない人に発生しやすい。その原因として、*H. pylori*感染のない人は胃酸分泌が多くて食道炎を発生しやすく、繰り返す食道炎から扁平上皮が円柱上皮化生を起こすこと、また、胆汁酸逆流も円柱上皮化生に関与することなどが報告されているが、いまだ定説はない。細菌感染は消化管の炎症と関連が深く、急性炎症のみならず *H. pylori*感染が慢性胃炎から胃粘膜萎縮、腸上皮化生を起こし、また、潰瘍性大腸炎も腸内細菌叢の変化により発生する可能性が指摘されている。我々の研究の独創的な点は、胃酸や胆汁酸などにより影響を受けると考えられる食道下部細菌叢を研究するところにある。検体として生検組織を用いることにより、粘液中や上皮細胞に付着し陰窩の深部に存在する粘膜関連細菌叢の解析に重きを置くことも特色である。食道下部細菌叢の変化が食道炎の発生とその程度に関与しているとの結果を予想する。バレット食道、食道腺癌に関与している細菌叢の変化を発見することを期待している。胃癌発生と *H. pylori*感染と同様に、バレット食道、食道腺癌発生に関与している細菌叢の変化を発見できれば、病態に関連している細菌叢を標的とした抗生剤の使用によりこれらの疾患の発生を予防するなど、新たな治療戦略の展開が可能となることにこの研究の意義がある。

3. 研究の方法

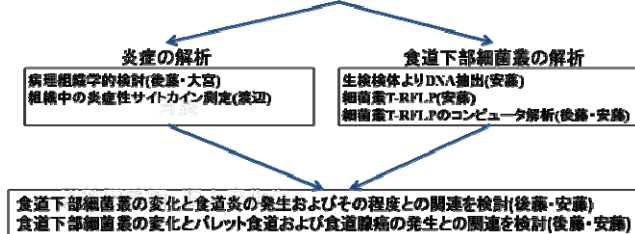
上部消化管内視鏡検査と内視鏡下生検組織の採取

(1)① 名古屋大学医学部附属病院および関連施設における上部消化管内視鏡検査の被検者で、胃食道逆流症状のある患者30例と逆流症状のない患者群30例を対象とする。十分なインフォームド Consentのもとに上部消化管

内視鏡検査を施行し、食道炎、バレット食道、食道腺癌の有無ならびに程度を判定する。内視鏡的に食道炎の程度はロサンゼルス分類を、バレット食道の判定にはプラハ基準 (Sharma P et al. Gastroenterology. 2006;131:1392-9) を用いる。

② 食道下部粘膜 (炎症部またはバレット上皮) の生検組織を採取する。

上部消化管内視鏡検査 および 内視鏡下食道下部生検 (安藤・大宮・渡辺)



生検組織からの DNA 抽出と T-RFLP

(2) ①生検組織から DNA を採取する。

② 16 SrRNA 遺伝子を PCR 法にて増幅し、PCR 産物を制限酵素 (HhaI と MspI: Moyer CL, et al., Appl Environ Microbiol. 1996;62:2501-7.) にて処理し、T-RFLP の解析を行う (Sakamoto M et al. Microbiol Immunol. 2003;47:133-42)。T-RFLP パターンのコンピューター解析をして、デンドログラムを作成する (Sakamoto M et al. Microbiol Immunol. 2003;47:133-42)。

病理組織学的検討

(3) 生検組織をヘマトキシリン-エオジン染色した上で鏡検し、炎症細胞浸潤の程度を判定する。

4. 研究成果

食道炎、バレット食道、食道腺癌における食道下部細菌叢の特徴から、これらの疾患発生に関与している微生物を測定し、増加しつつあるバレット食道、食道腺癌の発生予防策を考案することを目的とした研究である。名古屋大学医学部附属病院における上部消化管内視鏡検査の被験者で、胃食道逆流症状のある患者と逆流症状のない患者群を対象として、十分なインフォームドコンセントのもとに上部消化管内視鏡検査と内視鏡下生検組織の採取を施行した。内視鏡所見および病理組織学的所見から正常コントロールならびに食道炎、バレット食道患者の診断を行った。食道下部内視鏡下生検検体より DNA を抽出して 16S リボソーム (r) RNA を指標とした消化管細菌叢の

解析を行った。16SrRNA 部分を PCR 法にて増幅し、ダイレクトシーケンス解析を行った。この研究の期間中、食道腺癌症例はなく、正常 6 名、食道炎患者 6 名、バレット食道患者 6 名がこの研究の対象となった。それぞれの患者から約 40 コロニーずつの菌体について検討した。細菌叢は全体で主に 6 つの門に分類できた。正常、食道炎、バレット食道それぞれに門のレベルでも、また、菌種においても食道下部細菌叢に特徴のあることが認識された。この結果は、食道下部細菌叢の特徴により食道疾患が発生する可能性、あるいは、食道疾患によって食道下部細菌叢が規定される可能性を示唆している。以上の結果を国際学会 (2012 年アメリカ消化器病学会)、国際ジャーナル (BMC Infect Dis. 2013;13:130. doi: 10.1186/1471-2334-13-130) に発表し、国際的な評価を得ることができた。

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 2 件 査読有)

① Ning Liu, Takafumi Ando, Kazuhiro Ishiguro, Osamu Maeda, Osamu Watanabe, Kohei Funasaka, Masanao Nakamura, Ryoji Miyahara, Naoki Ohmiya and Hidemi Goto. Characterization of bacterial biota in the distal esophagus of Japanese patients with reflux esophagitis and Barrett's esophagus. **BMC Infectious Diseases** 13: 130; MAR 2013.

[学会発表] (計 3 件)

① Takafumi Ando, Masatoshi Sakakibara, Kazuhiro Ishiguro, Osamu Maeda, Osamu Watanabe, Toru Kamiya, Shunya Mimura, Masaki Ujihara, Yutaka Hirayama, Kazuhiro Morise, Keiko Maeda, Masanobu Matushita, Kohei Funasaka, Masanao Nakamura, Ryoji Miyahara, Naoki Ohmiya, Hidemi Goto. Prophyllactic *Helicobacter pylori* eradication in the gastric remnant may be useful in preventing metachronous gastric carcinoma. International Ulcer Week 2012. Tokyo, Japan. July, 2012.

② Takafumi Ando, Liu Ning, Kazuhiro Ishiguro, Osamu Maeda, Osamu Watanabe, Hidemi Goto. Characterization of Bacteria in the Distal Esophagus of Japanese Patients With Reflux Esophagitis and Barrett's Esophagus. Digestive Disease Week 2012. San Diego, USA. May, 2012.

〔図書〕（計1件）

① 安藤貴文, 榊原真肇, 石黒和博, 前田修, 渡辺修, 後藤秀実. 【H. pylori 胃炎からの発癌-除菌有効性を巡っての視点】胃切除後残胃に対する除菌の異時性多発癌発生予防効果 臨床消化器内科 27(3): 337-342; 2012. 02.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安藤 貴文 (ANDO TAKAFUMI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 80378041

(2) 研究分担者

後藤 秀実 (GOTO HIDEMI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 10215501

大宮 直木 (OHMIYA NAOKI)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 00335035

渡辺 修 (WATANABE OSAMU)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 80378059

(3) 連携研究者

なし