

Helicobacter pylori 家族内感染に 腸内常在細菌叢はどう影響を与えるか

大 崎 敬 子

杏林大学医学部感染症学講座 准教授

緒 言

Helicobacter pylori はヒトの胃に長期間持続感染し、胃炎、消化性潰瘍、MALTリンパ腫、胃癌など消化器疾患の原因菌である他、特発性血小板減少症、鉄欠乏性貧血、蕁麻疹など全身性の疾患との関与も知られている。1983年にオーストラリアのR. Warren博士とB. J. Marshall博士が本菌の胃からの分離培養に成功し、1994年には国際癌研究機関 (IARC) の発癌リスク一覧に本菌がグループ1の発癌物質として記載されている。その後2014年にはIARCから*H. pylori*の除菌治療は胃癌予防戦略として報告された。日本国内で感染している菌株のほとんどは東アジア型と呼ばれる遺伝子タイプの菌株で強い病原性と発癌性が指摘されているため、2013年より全ての*H. pylori*感染胃炎患者に対する除菌治療が保険適用となっている。*H. pylori*の感染はその大部分がおよそ5歳から10歳以下の小児期にみられると報告されているが、日本の小児や若年者の*H. pylori*の感染率は急激な減少傾向が見られている。著者らは2010年と2011年に兵庫県篠山市で大規模な疫学調査を行った結果、0才から11才の児童園児1524人を対象として感染率が約1.8%であったこと、*H. pylori*の感染児と同居する両親は、感染児のいない家族の親と比べて有意に*H. pylori*の感染率が高いことなどを報告した¹⁾。さらに、*H. pylori*の感染児の親の糞便中に含まれる*H. pylori*の遺伝子型は母親、または両親と一致する例が多く検出されていることを報告した²⁾。*H. pylori*の家族内感染において母子感染が優位であることは家族から分離された菌株の遺伝子型の解析結果からも明らかにしている^{3,4)}。以上のことより日本国内では集団由来の感染や環境由来の感染がほぼ見られなくなり、代わって家族内感染が感染伝播の主要因となっていることが明らかである。しかし、*H. pylori*の感染ルートについては糞口感染や口-口感染が指摘されているが、本菌の腸管内生存性や、あるいは環境中の生存性など不明な点が多い。

本研究では小児を含む家族内*H. pylori*感染と腸内細菌叢の関係を分析するため、*H. pylori*の感染児および感染した母親または両親のいる家族を対象に糞便中に含まれる細菌の16Sメタゲノム解析を実施した。感染児と*H. pylori*の陽性および陰性の家族員の腸内細菌叢類似性や多様性の比較解析を実施して、腸内細菌叢構成と*H. pylori*の家族内感染との関連性を明らかにした。

方 法

本研究は杏林大学医学部の倫理委員会の許可を得て実施された。2010年から2011年の疫学調査を実施した兵庫県篠山市に在住の小児とその家族のうち*H. pylori*の感染児のいる5家族(表1)18検体を対象とした。*H. pylori*の感染は、糞便抗原テスト(テストメイト ピロリ抗原EIA、わかもと製薬) および*H. pylori*特異的16SrRNA遺伝子によるリアルタイムPCR法で判定した。

糞便DNAはIon 16S™ Metagenomics Kitを使い、Primer set V2-4-8およびPrimer set V3-6、7-9を用いてPCR増幅した。増幅産物をIon PGM次世代シーケンサーで解析後、Metagenomics 16S解析ツール(Thermo fisher社)にて各シーケンスのOTU (operational taxonomic unit) を決定し、細菌門から菌種レベルまでの構成比を算出した。QIIMEを用いて細菌叢間の α 多様性(Shannon index値の比較)および β 多様性(主座標分析: Principal Coordinate Analysis: PCoA)を18検体同一解析と4名以上の検体がある場合には各家族内で比較した。

結 果

1. 対象家族の*H. pylori*の感染状況

対象となった家族の*H. pylori*の感染状況を表1に示した。感染児(発端児)を含む5家族例の、両親、発端児および同胞から提供された糞便を対象とした。同胞と発端児がともに*H. pylori*に感染している家族はなく、

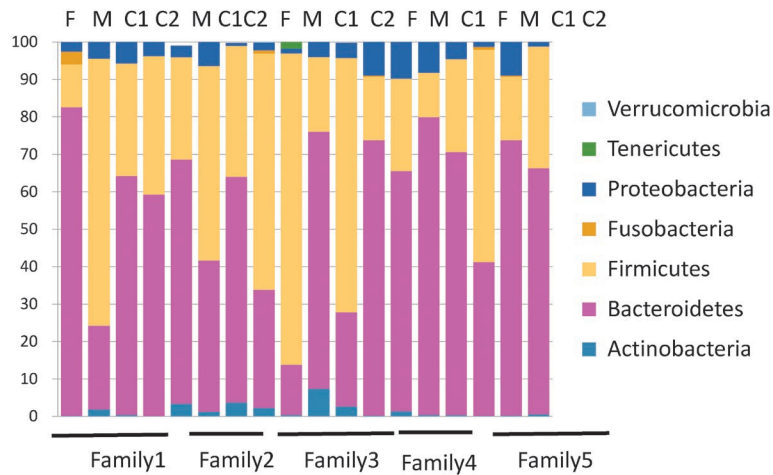


図1 家族の腸内細菌叢の構成-門レベル

F：父親、M：母親、C1：発端児、C2：同胞

表1 対象家族の *H. pylori* 感染状況

	陽性者	陰性者
家族1	発端児、父	母、同胞
家族2	発端児、母	同胞
家族3	発端児、母	父、同胞
家族4	発端児、父、母	なし
家族5	発端児、父、母	同胞

H. pylori 感染陰性の同胞4名、母親5名、父親4名（1家族未提出）、発端児5名、計18検体を対象とした。

2. *H. pylori* 感染児のいる5家族の腸内細菌叢の比較

H. pylori 感染児のいる5家族、18検体の腸内細菌叢の門レベルの結果を図1に示した。18検体中12検体がBacteroidetes門が最優勢菌となり、残り6検体がFirmicutes門が最優勢となった。

次に、18検体の β 多様性を比較するために、主成分分析を行った。18検体を合わせて分析することにより、家族内の腸内細菌叢構成の類似性と、家族間の多様性の比較を確認した。異なる家族間の腸内細菌叢構成を科レベル、属レベル、種レベルで β 多様性解析比較を行うと、家族ごとに類似した結果が得られ、PC1（第一主成分）の比率は、属>科>種の順で、それぞれ48.6%、27.2%、19.8%と種レベルの検体間多様性が最も少ない結果となった。種レベルの β 多様性の3次元解析の結果を図2に示した。家族1、2および5は家族員ごとの距離が近い位置にプロットされ、家族3と家族4の家族員間は広がった位置にプロットされた。家族員が最も近い位置にプロットされているのは家族2（黄色）、家族1（赤

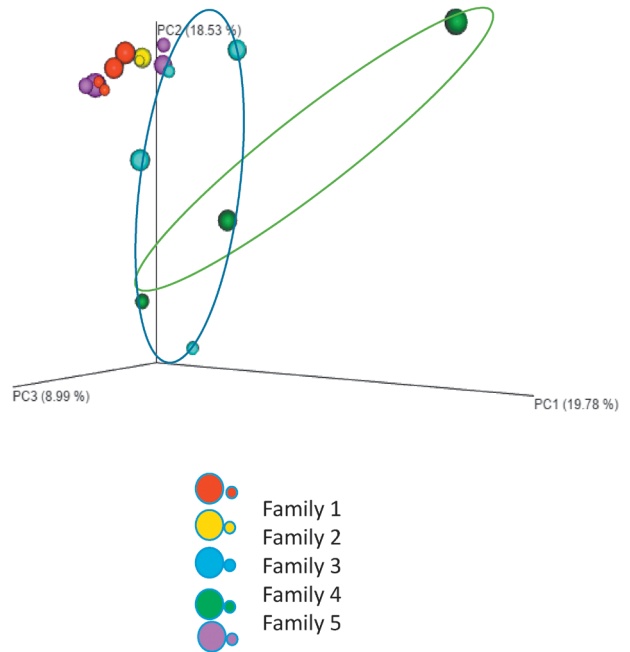


図2 5家族の腸内細菌叢の主成分分析（菌種レベル）

○：父親、母親、□：感染児、同胞

色)、家族5（桃色）であった、家族1と2は家族5の中間に位置した。

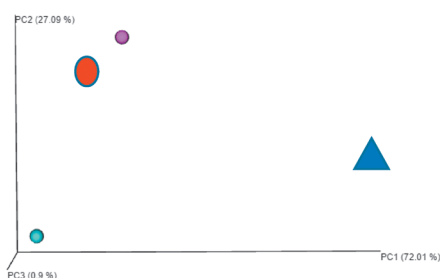
3. 家族員の腸内細菌叢の比較

同一家族で4検体のメタゲノム解析データを得た、家族1、家族3、家族5について主座標分析を行った（図3A-C）。家族1（図3A）の構成は *H. pylori* 感染陽性の父親と発端児、感染陰性の同胞と母親であるが、種レベルの分析では、*H. pylori* 感染発端児に最も近いのは *H.*

A: 家族 1



B: 家族 3



C: 家族 5

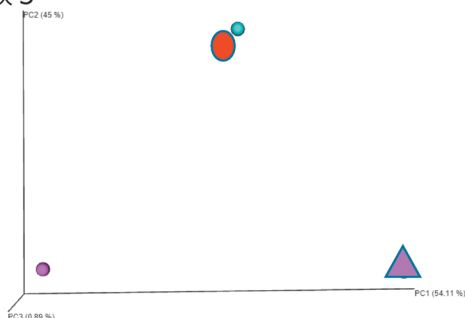


図3 家族 (A、家族1、B、家族2、C、家族3) の腸内細菌叢の類似性の比較-菌種レベル

△: 父親、○: 母親、○: 子供、赤およびピンク色は *H. pylori* 陽性者、青および水色は *H. pylori* 陰性者、PC1: 第一主成分、PC2: 第二主成分、PC3: 第三主成分

pylori 感染陰性の母親であった。科レベルの解析では、*H. pylori* 感染陰性の同胞と最も近かった。したがって、*H. pylori* 感染陽性の父親との類似性は低い結果となった。

次に、家族3 (図3B) は *H. pylori* 感染陽性の母親と感染陰性の父親、発端児、陰性同胞の構成であったが、発端児と最も近い腸内細菌叢の構成は *H. pylori* 感染陽性の母親であった。科レベルと、種レベルの両方で同じ傾向が観察された。

最後に家族5 (図3C) は、*H. pylori* 感染陽性の両親と発端児、*H. pylori* 感染陰性の同胞の4名から構成されたが、科レベルでは4名のプロットが離れて分布している、種レベルでは母親と陰性の子供のプロットが最も近

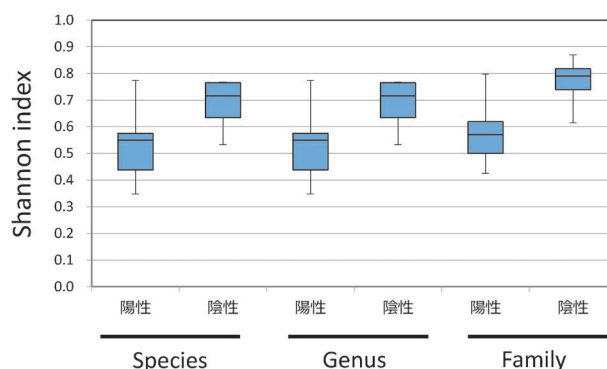


図4 *H. pylori* 陽性児と陰性児の腸内細菌叢の多様性比較

いところに位置した。したがって、発端児の腸内細菌叢構成は、両親や同胞とは比較的類似性が低いことが明らかとなった。

4. *H. pylori* 感染児と感染陰性児から分離された細菌種の比較

H. pylori 感染児、陰性児および成人の感染者、陰性者の腸内細菌叢の比較を行った。*H. pylori* および *Helicobacter* 属細菌を示す OTU は全検体から検出されなかった。

図1に示した門レベルの細菌叢構成から、*H. pylori* の感染児では Bacteroidetes 門が多い傾向が観察された。そこで、Bacteroidetes 門と Firmicutes 門の割合を比較するために、Bacteroidetes 門/Firmicutes 門値の平均は *H. pylori* の感染児 (5名) で 3.4 ± 2.2 次いで *H. pylori* 感染の大人 (7名) が 2.9 ± 2.3 であったのに対して、陰性の子供 (4名) は 1.4 ± 0.7 、陰性の大人 (2名) が 0.4 ± 0.1 と陰性者において低い傾向が観察された。

H. pylori 感染児5名と陰性児4名の腸内細菌叢の多様性の比較として、Shannon index を示した。*H. pylori* 感染児は陰性児と比べて、種レベル、属レベル、科レベルのいずれにおいても多様性が低い傾向が示された。

考 察

腸内細菌叢の構成は個人間の差が大きいとされており、疾患など特定因子の作用を検討するにあたっては違う個人をどのように評価するのが、細菌叢比較の難しい課題と考えられている。本研究では *H. pylori* 感染と陰性者が同居している家族を対象としており、腸内細菌叢に与える影響因子が比較的揃った検体であることから、感染の影響あるいは感染に対する影響を見る目的で腸内細菌叢の比較解析を実施した。その結果、5家族中

3家族、11名の細菌叢の菌種レベルのPCoA解析において極めて類似した構成であることが示された(図2)。検体を採取した地域および年齢層が限定されており、ほぼ同日に採取された糞便を対象としたことで、食物の影響などを除くことのできた結果であると考えられた。

5家族中で類似度の高い3家族のなかで、発端児と最も近い細菌叢構成を示したのは、*H. pylori*感染陰性の母親または、感染陰性同胞であった。腸内細菌叢構成の類似度が極めて高い家族内においては家族個人の腸内細菌叢の類似度の高さと*H. pylori*感染に相関性を認められなかった。この結果から、極めて類似した腸内細菌叢を持つ親から子への*H. pylori*感染の例では、腸内細菌叢は感染制御因子として働かないことが示唆された。

次に家族内の類似性がやや劣る家族(家族3)において、*H. pylori*感染児と最も近い細菌叢構成を示したのは、*H. pylori*感染陽性の母親であった。したがって、家族個人間の腸内細菌叢の類似度が低い家族内においては個人間の菌種構成の類似度の高さが*H. pylori*の家族内感染を容易にする一つの要因である可能性が示唆された。今後、家族の症例数を増やして検討していく必要性が示唆された。

今回検討した*H. pylori*感染と陰性者の腸内細菌叢比較からは、感染陽性者はBacteroidetes門/Firmicutes門値が高く、細菌叢の中のBacteroidetes門細菌の占有率が高い傾向が示されたものの有意な差を見出すことはできなかった。さらに症例数を加えての検討課題とされた。

要 約

慢性胃炎や胃潰瘍、および胃癌発症に関連する*H.*

*pylori*は小児期に感染し除菌されるまで持続感染する。日本国内では家族内感染が主な原因と考えられている。*H. pylori*の家族内感染に腸内細菌叢が影響を及ぼすかどうかを明らかにするために本研究を計画した。兵庫県篠山市で行ったコホート研究のサンプルから*H. pylori*感染児とその家族18人の糞便DNAを対象として、16Sメタゲノム解析を実施した。PCoA解析の結果腸内細菌叢の類似性が高い家族では、感染の陽性陰性に対して腸内細菌叢の差が認められないものの、類似性のやや低い家族内では、感染児と感染した母親の腸内細菌叢の類似性が高いという結果を得た。したがって、感染した親と類似性の高い細菌叢を保有することが、小児の*H. pylori*感染のリスク因子として家族内感染に作用する可能性が示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり助成を賜りました、公益財団法人三島海雲記念財団ならびに関係者の皆様に深く感謝申し上げます。

共同研究者の愛知医科大学菊地正悟教授、兵庫医科大学奥田真珠美教授、杏林大学神谷茂教授、米澤英雄講師に感謝致します。

参考文献

- 1) M. Okuda, et al.: *Helicobacter*, **20**, 133-138, 2015.
- 2) T. Osaki, et al.: *J. Med. Microbiol.*, **64**, 67-73, 2015.
- 3) T. Osaki, et al.: *J. Med. Microbiol.*, **62**, 761-765, 2013.
- 4) Y. Furuta, et al.: *PLoS ONE*, **10**(5), e0127197, 2015.