

## 胃癌予防をめざした胃内細菌叢の研究

大崎敬子<sup>1)</sup> 菅原大介<sup>2)</sup> 大野亜希子<sup>3)</sup>楠原光謹<sup>3)</sup> 蔵田 訓<sup>4)</sup> 米澤英雄<sup>1)</sup> 徳永健吾<sup>5)</sup>

1) 杏林大学医学部感染症学教室

2) 杏林大学医学部顕微解剖学教室

3) 杏林大学医学部消化器内科学教室

4) 杏林大学保健学部臨床検査技術学科

5) 杏林大学医学部総合医療学教室

## はじめに

*Helicobacter pylori*は微好気性発育するグラム陰性のらせん状桿菌で、ヒトを自然宿主として胃粘膜に感染する。感染の多くは小児期に起こり井戸水の使用や衛生環境の悪さなどが原因となることが知られている。しかし、現在の日本では衛生状態の改善により環境由来の感染が減り、家族内感染が主となっている<sup>1, 2)</sup>。

*H. pylori*感染が関連する疾患は、胃炎、胃・十二指腸潰瘍、胃癌、胃MALTリンパ腫などのほかに、免疫性血小板減少性紫斑病、鉄欠乏性貧血などの消化器外疾患がある<sup>3)</sup>。特に胃癌については、WHOの下部組織であるIARC（国際がん研究機関）が1994年に*H. pylori*を胃癌のリスク因子として認定し、2014年に胃癌予防のために除菌療法を推奨した。国内では2013年に*H. pylori*感染胃炎に対して保険適用が追加されたことにより、除菌治療が広く普及した<sup>3)</sup>。そして除菌治療症例の増加により国内の現感染者が減少してきた結果、注目されるようになった問題のひとつに除菌後胃癌がある。除菌後胃癌は、これまでのところ*H. pylori*がいなくなった後にも感染の影響が強く残り発生すると考えられているが、どのような因子が影響しているかは不明な点が多い。

*H. pylori*は持続感染して除菌治療が施されない限り、長期間胃内に生存し続け、胃酸分泌能の低下など胃の機能や胃内環境に影響をもたらす。さらに、除菌治療によって胃粘膜の病態が徐々に改善されることにより、除菌後の胃内環境にも変化がおきている。*H. pylori*を取り巻く胃内

環境として、胃内細菌叢に着目し、感染や疾患発現時に認められた知見を報告する。

*H. pylori*感染者の胃内細菌叢と胃癌

胃酸によって守られている胃において、細菌は長期間棲息できないと考えられていたが、*H. pylori*は自身が産生する酵素ウレアーゼを使って、胃粘膜に分泌される尿素を分解し、産生されたアンモニアによって胃酸を中和して棲息している。さらに、*H. pylori*の長期持続感染によって胃粘膜萎縮が進行すると、胃酸の分泌が低下し他の細菌が生存しうる環境となる。除菌治療を受けた患者の一部に、*H. pylori*以外のウレアーゼ産生細菌が存在し、尿素呼気試験偽陽性の原因となることを報告した<sup>4)</sup>。*H. pylori*陰性で、尿素呼気試験が陽性となった患者の胃液と咽頭から、ウレアーゼ活性を有する細菌として*Citrobacter freundii*、*Klebsiella pneumoniae*、*Enterobacter cloaca*、*Staphylococcus aureus*を示した<sup>4)</sup>。

高度胃粘膜萎縮症例の胃内細菌叢16Sメタゲノム解析を実施し、*H. pylori*培養陰性である既感染者と、培養陽性である*H. pylori*現感染者の胃内細菌叢の比較を行った。これまでの報告では、現感染者は*H. pylori*の構成比が高く、胃内細菌叢の最優勢菌種となると知られているが、萎縮の進んだ症例では、培養法が陽性である現感染者10例中2例について最優勢菌種が別の細菌に代わり、科レベルでは*Burkholderiaceae*、*Streptococcaceae*が最優勢となっていた。さらに、 $\beta$ 多様性解析の結果から、既感染者と現感染者は別の集団（クラスター）として区別された。

Liらは、除菌治療を受けた患者の胃内細菌叢を非感染の健常者、*H. pylori*感染慢性胃炎、胃癌の群に分けて $\beta$ 多様性解析を実施したところ、胃癌群は除菌後の群とより近く位置したと報告した<sup>5)</sup>。

*H. pylori*既感染で除菌治療を受け陰性化した胃癌患者16名と非癌患者20名の胃内細菌叢を比較した。ユニフラク UniFrac 距離を指標とする主成分分析の結果、早期胃癌は2つのクラスターに分かれた(クラスター A (7名)およびB (9名))。そこで、除菌後非癌患者を対照群 C (20名)として3群の胃内細菌の比較解析を行った。門レベルの解析ではクラスター A の *Fusobacterium* 門の占有率がB, C群と比べて有意に低かった。科レベルの解析では、クラスター A は他の群と比べて、*Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae*, *Enterobacteriaceae* の占有率が高く、*Streptococcaceae*, *Prevotellaceae* の占有率が低かった。さらに、属レベルの解析では、クラスター A は、*Lactobacillus* 属と、*Ruminococcus* 属 *Oscillospira* 属の占有率が他の群と比べて有意に高く、*Veillonella* 属、*Actinomyces* 属、*Streptococcus* 属など口腔細菌の占有率が低いという特徴が示された。

除菌治療をうけた胃癌患者の細菌叢は、腸内の細菌由来の占有率が高いクラスター A と口腔常在細菌由来の占有率が高いクラスター B に特徴が分かれた。また、3群を合わせて $\beta$ 多様性解析をすると、非癌患者の細菌叢が多く含まれるのはBであった(図1)。除菌歴のない陰性例は、自然除菌と考えられたが、クラスター A に3名、クラス

ター B に1例、非癌患者に1例それぞれ含まれていた。これらの結果から、クラスター A のタイプの胃内細菌叢はクラスター B のタイプと比して、胃癌発生と関連している可能性が示唆された。

### 自己免疫性胃炎患者の胃内細菌叢

*H. pylori*除菌後症例が増えたことにより、検出頻度が増した疾患のひとつに自己免疫性胃炎(AIG)がある。AIGは胃癌ハイリスク検診のD群(血清抗ピロリ菌抗体陰性、ペプシノゲン検査陽性)や除菌不成功例に診断されることが多く、その頻度は検診全体の約0.5%とされている。過去の*H. pylori*感染がAIGのイニシエーターとなっているという仮説<sup>6)</sup>と逆に感染によってAIGの発症が抑えられているとの仮説<sup>7)</sup>があり要因不明の疾患である。尿素呼吸気試験(UBT)で偽陽性となることがあるため、*H. pylori*感染が存在しないにも関わらず除菌され、さらに除菌判定でUBTが再度陽性となり、再除菌が行われている<sup>8)</sup>。また胃癌発生頻度が高いことも知られていることから、胃内細菌構成の変化がUBT偽陽性や、胃癌に関与していると考え、AIGの胃マイクロバイオームを検討した。

AIG 9例と、除菌後の慢性胃炎(GI) 13例について、胃体部と幽門部の胃生検組織の細菌叢を16Sメタゲノム法で解析した。その結果、門レベルの解析で、両方の群でFirmicutes門細菌が最優勢となっていた。AIGの胃体部でProteobacteria門がGI群と比較して有意に高い占有率であった。また、科レベルの解析で、AIGは胃体部、幽門部ともに*Streptococcaceae*, *Pasteurellaceae*がGI群と比較して有意に高い占有率であり、*Prevotellaceae*, *Veillonellaceae*は有意に低い占有率であった。また、属レベルの解析においても同様に、*Streptococcus*属の高い占有率と、*Prevotella*属細菌の低い占有率が示された。*Prevotella*属細菌はどちらも口腔内や腸管内に存在する細菌属であり、他の細菌の栄養となる短鎖脂肪酸を産生する細菌であるが、その占有率の違いが、胃内細菌叢の構成を変えている可能性が示唆された。またAIG群のみで*Citrobacter*属や*Klebsiella*属などのウレアーゼ産生菌を含む細菌属を認めており、これらの細菌がUBT偽陽性の原因となることが示唆された。

胃内細菌叢の構成比率を反映するWeighted UniFrac距離を用いたPrincipal Coordinate Analysis (PCoA) 解析において、AIG群と、GI群は別のクラスターとして示され、一方、細菌の構成のみ反映するUnweighted UniFrac距離を使った同じ解析では、両群は区別されなかった(図2)。この結果は両群の胃に存在する細菌叢には大きな差が認められずにそれらの構成比率に変化が生じている結果と考えられた。

Furutaらは除菌治療失敗後のAIG症例の胃内細菌を培

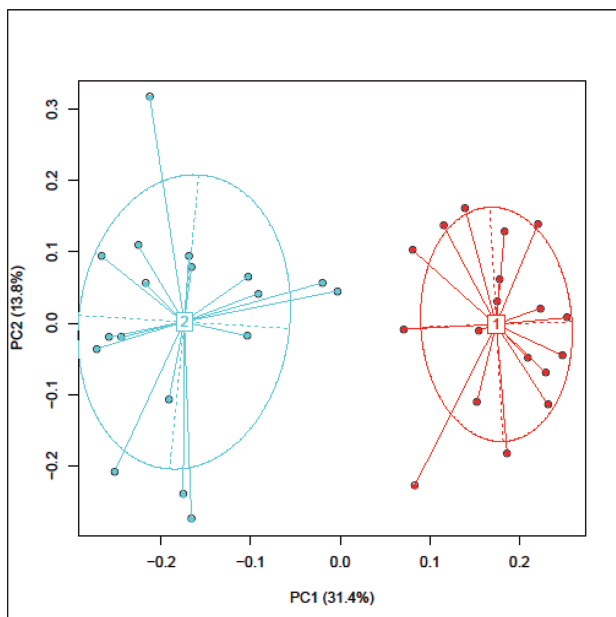


図1 Weighted UniFrac 指数を指標とした胃癌患者の胃内細菌叢のPAM クラスタリング解析 (1:クラスター A, 2:クラスター B)

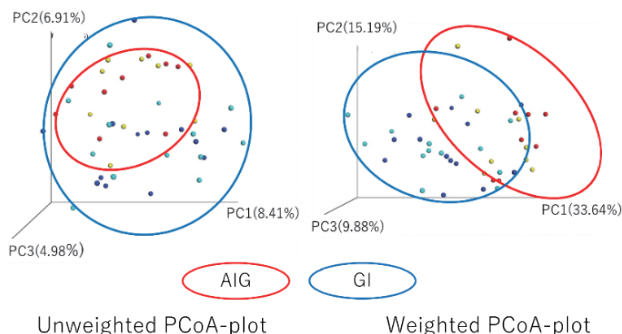


図2 自己免疫性胃炎および除菌後 *H. pylori* 陰性慢性萎縮性胃炎患者の胃内細菌叢の比較

養法で検出した。 *Klebsiella pneumoniae*, *α-Streptococcus* などのウレアーゼ陽性細菌を検出した<sup>8)</sup>。特に *Streptococcus* 属細菌の検出された患者の数は、胃炎患者のその数と比べて多いことが、私達の結果と一致していた。ウレアーゼは胃酸分泌が正常な胃の中では胃酸を中和するために必要であることから、*H. pylori* が存在していない胃において特に重要な性質となると考えられた。

#### *H. pylori* 感染実験動物モデルを用いた胃内細菌叢解析

スナネズミはげっ歯類の中では、*H. pylori* が長期間持続感染可能な動物として知られ、慢性胃炎の後に、発癌を認める動物モデルとして利用されている。感染8週後に平均  $10^{5.7}$  CFU/g mucus, 40週後に平均  $10^{4.7}$  CFU/g mucus で維持されていた。長期持続感染下のスナネズミ胃内細菌叢の変化を、細菌の属および群レベルと *H. pylori* 特異的なプライマーを用いて定量PCR法で評価した。1年の長期感染後の胃内細菌叢比較解析の結果、*Atopobium cluster*, *Bifidobacterium* spp., *C. coccoides* group, *C. leptum* subgroup, *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp. は感染非感染に関わらずスナネズミの胃から検出された。*Eubacterium cylindroides* グループと *Prevotella* spp. は非感染のスナネズミのみ検出された。さらに、*C. leptum* サブグループ, *C. coccoides* グループ, および *Bifidobacterium* spp. の菌数が *H. pylori* 感染群で有意に低下していた<sup>9)</sup>。

細菌に易感染性を示すMPSマウスを用いて、*H. pylori* の感染が成立することが確認されたため、胃内細菌叢に影響することを明らかにする目的で感染実験を実施した。MPSマウスは、生後4週目に離乳後、感染実験開始まで同一ケージ内で飼育し、群分けして用いた。*H. pylori* TK1402m 4株 ( $2.5 \times 10^8$  CFU) を2日間、連続経口投与した。MPSマウスの全頭に *H. pylori* の胃内感染を認め、感染5週後に平均  $10^{4.7}$  CFU/g mucus, 57週後に平均  $10^{4.7}$  CFU/g mucus で維持されていた。また、胃内細菌叢に占める *Helicobacter* 属の割合は、感染期間を通して0.1%から

4.5%であった。MPSマウス胃内細菌叢の最優勢であったのは、*Lactobacillus* 属, S24-7属であった。感染、非感染群の平均占有率の比較解析の結果、感染8週後に、門レベルの解析でBacteroidetesに、科レベルの解析で *Bacteroidaceae*, TM-7, *Candidatus*, *Homeothermus* に属レベルの解析で、*Clostridium* 属, *Desulfovibrio* 属に、それぞれ有意差が認められた。また、 $\alpha$ 多様性解析の結果、感染群の8週と比べて24週のChao1インデックスが有意に高かった。感染57週までの観察では、胃炎および胃癌を発生したMPSマウスは認められず、Ki67陽性細胞の出現状況はコントロール群と差を認めなかった。

*H. pylori* の感染菌数は、スナネズミモデルと、MPSマウスの感染モデルを比較すると、胃内菌数に大きな差はなく、強い炎症性の変化はスナネズミの胃では認め、MPSマウスには認められなかった。胃癌の発症には、胃炎の発症が重要な要素の一つと考えられ、今後はその炎症の惹起に、胃内細菌叢が示す役割について検討する必要があると考えられた。

#### おわりに

*H. pylori* 感染が胃内細菌叢に及ぼす影響は、感染胃粘膜の状況に応じて変化すると考えられた。今後は、胃癌発生までに見られる胃粘膜の変化として、炎症や萎縮の程度に着目し、その環境要因である胃内細菌叢の変化と合わせた解析が必要だと考えられた。

#### 引用文献

- 1) Osaki T, Konno M, Yonezawa H, et al. Analysis of intra-familial transmission of *Helicobacter pylori* in Japanese families. *Journal of medical microbiology*. 2015 ; 64 (Pt 1) : 67-73.
- 2) Okuda M, Osaki T, Lin Y, et al. Low prevalence and incidence of *Helicobacter pylori* infection in children : a population-based study in Japan. *Helicobacter*. 2015;20 (2) : 133-138.
- 3) Kato M, Ota H, Okuda M, et al. Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* infection in Japan : 2016 Revised Edition. *Helicobacter*. 2019 ; 24 (4) : e12597.
- 4) Osaki T, Mabe K, Hanawa T, Kamiya S. Urease-positive bacteria in the stomach induce a false-positive reaction in a urea breath test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Journal of medical microbiology*. 2008 ; 57 (Pt 7) : 814-819.
- 5) Li TH, Qin Y, Sham PC, Lau KS, Chu KM, Leung WK. Alterations in Gastric Microbiota After *H. pylori* Eradication and in Different Histological Stages of Gastric Carcinogenesis. *Scientific reports*. 2017 ; 7 : 44935.
- 6) Amedei A, Bergman MP, Appelmelk BJ, et al. Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* antigens and H + , K + --adenosine triphosphatase in human gastric autoimmunity. *The Journal of experimental medicine*. 2003 ; 198 (8) : 1147-1156.
- 7) Ohana M, Okazaki K, Oshima C, et al. Inhibitory effects of

*Helicobacter pylori* infection on murine autoimmune gastritis. *Gut*. 2003 ; 52 (8) : 1102-1110.

- 8) Furuta T, Baba S, Yamade M, et al. High incidence of autoimmune gastritis in patients misdiagnosed with two or more failures of *H. pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther*. 2018 ; 48 (3) : 370-377.
- 9) Osaki T, Matsuki T, Asahara T, et al. Comparative analysis of gastric bacterial microbiota in Mongolian gerbils after long-term infection with *Helicobacter pylori*. *Microbial pathogenesis*. 2012 ; 53 (1) : 12-18.

#### List of publications

1. Yonezawa H, Motegi M, Oishi A, Hojo F, Higashi S, Nozaki E, Oka K, Takahashi M, Osaki T, Kamiya S. Lantibiotics Produced by Oral Inhabitants as a Trigger for Dysbiosis of Human Intestinal Microbiota. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 25 ;

22 (7) : 3343. doi : 10.3390/ijms22073343. PMID : 33805848 ; PMCID : PMC8037337.

#### 口演記録

1. 米澤英雄, 大崎敬子, 塩谷昭子: *Helicobacter pylori*感染者および除菌後患者の胃内細菌叢β多様性解析とクラスター解析。第26回日本ヘリコバクター学会学術集会。浜松市。2021年1月8日。
2. 徳永健吾, 三好潤, 米澤英雄, 三好佐和子, 井田陽介, 岡本晋, 久松理一, 大崎敬子: 自己免疫性胃炎における胃マイクロバイオータの検討。第26回日本ヘリコバクター学会学術集会。浜松市。2021年1月8日。
3. 大崎敬子, 米澤英雄, 北条史, 蔵田訓, 岡健太郎, 高橋志達, 花輪智子, 神谷茂, 三戸部治郎: MPSマウス*Helicobacter pylori*感染モデルを用いた腸内細菌叢の解析。第94回日本細菌学会総会。オンライン。2021年3月23日。