

- Oshio, I., Osaki, T., Hanawa, T., Yonezawa, H., Zaman, C., Kurata, S. & Kamiya, S. (2009). Vertical *Helicobacter pylori* transmission from Mongolian gerbil mothers to pups. *J Med Microbiol* 58, 656–662.
- Raymond, J., Thiberg, J. M., Chevalier, C., Kalach, N., Bergeret, M., Labigne, A. & Dauga, C. (2004). Genetic and transmission analysis of *Helicobacter pylori* strains within a family. *Emerg Infect Dis* 10, 1816–1821.
- Scaletsky, I. C., Aranda, K. R., Garcia, G. T., Gonçalves, M. E., Cardoso, S. R., Iriya, K. & Silva, N. P. (2011). Application of real-time PCR stool assay for *Helicobacter pylori* detection and clarithromycin susceptibility testing in Brazilian children. *Helicobacter* 16, 311–315.
- Shirai, M., Kakada, J., Shibata, K., Morshed, M. G., Matsushita, T. & Nakazawa, T. (2000). Accumulation of polyphosphate granules in *Helicobacter pylori* cells under anaerobic conditions. *J Med Microbiol* 49, 513–519.
- Staples, M., Graham, R. M., Doyle, C. J., Smith, H. V. & Jennison, A. V. (2012). Prolonged and mixed non-O157 *Escherichia coli* infection in an Australian household. *Clin Microbiol Infect* 18, E140–E143.
- Walker, A. S., Eyre, D. W., Wyllie, D. H., Dingle, K. E., Harding, R. M., O'Connor, L., Griffiths, D., Vaughan, A., Finney, J. & other authors (2012). Characterisation of *Clostridium difficile* hospital ward-based transmission using extensive epidemiological data and molecular typing. *PLoS Med* 9, e1001172.
- Wirth, T., Wang, X., Linz, B., Novick, R. P., Lum, J. K., Blaser, M., Morelli, G., Falush, D. & Achtman, M. (2004). Distinguishing human ethnic groups by means of sequences from *Helicobacter pylori*: lessons from Ladakh. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4746–4751.
- Yamaoka, Y. (2009). *Helicobacter pylori* typing as a tool for tracking human migration. *Clin Microbiol Infect* 15, 829–834.



Original Article

Diagnostic accuracy of urine-based kits for detection of *Helicobacter pylori* antibody in children

Masumi Okuda,¹ Shigeru Kamiya,² Mina Booka,³ Shogo Kikuchi,⁵ Takako Osaki,² Tomoko Hiwatani,⁴ Kohei Maekawa¹ and Yoshihiro Fukuda¹

¹Department of General Medicine and Community Health Science, Hyogo College of Medicine, Sasayama, ²Department of Infectious Diseases, Kyorin University School of Medicine, Mitaka, ³Department of Pediatrics, Wakayama Medical University, ⁴Department of Pediatrics, Wakayama Rosai Hospital, Wakayama and ⁵Department of Public Health, Aichi Medical University School of Medicine, Nagakute, Japan

Abstract *Background:* Rapid urine-HpAb is reported to be a reliable test of *Helicobacter pylori* infection in adults, but there are no data on the application of the test in children. The aim of this study was to evaluate the accuracy of a urine-based enzyme-linked immunosorbent assay (urine-HpELISA) and immunochromatography (rapid urine-HpAb) kit for anti-*H. pylori* immunoglobulin G antibody in children. We compared its sensitivity and specificity in reference to the ¹³C-urea-breath test (UBT) and *H. pylori* stool antigen test (HpSA).

Methods: In total, 101 Japanese children without significant upper-abdominal symptoms were included (mean age, 7.1 years; range 2–15 years). Their sensitivity and specificity were evaluated in reference to the UBT and HpSA.

Results: Thirty-seven children were judged *H. pylori*-positive and 64 negative by the UBT and HpSA. No discrepancy in the results was observed between UBT and HpSA. Urine-HpELISA showed 91.9% sensitivity and 96.9% specificity with an accuracy of 95.0%. Rapid urine-HpAb showed 78.4% sensitivity and 100% specificity with an accuracy of 92.1%. Seven false negative results for rapid urine-HpAb were from children aged younger than 10 years, and their antibody titers of urine-HpELISA were lower than true positives.

Conclusions: For the diagnosis of *H. pylori* infection in Japanese children, both tests are non-invasive, inexpensive, reliable and easy-to-perform methods giving satisfactory accuracy, although the sensitivity of the rapid urine-HpAb kit was inferior to that of the urine-HpELISA kit, especially in children aged younger than 10 years, showing relatively low titer of *H. pylori* antibody.

Key words children, *Helicobacter pylori*, HpSA, ¹³C-urea-breath test, urine antibody.

Helicobacter pylori is a common pathogen causing chronic gastritis, and gastric and duodenal ulcers in adults^{1–3} and children.⁴ Many simple, non-invasive, inexpensive but accurate tests are available for the initial diagnosis and epidemiological evaluation of *H. pylori* infection. Serological tests for detection of *H. pylori*-specific immunoglobulin (Ig)G antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) have been developed and perform well in adults, with sensitivity and specificity values reported to be higher than 90%.⁵ However, their usefulness in children remains controversial.^{6–8} In our previous study, we reported that urine-HpELISA (URINELISA, Otsuka Pharmaceuticals, Tokyo, Japan) was a reliable method for diagnosis of *H. pylori* infection in Japanese children.⁹ The rapid urine antibody detection test (rapid urine-HpAb) detects the same antigen as urine-HpELISA, and is fast, non-invasive and convenient. It has been proved to be

reliable with excellent sensitivity and specificity in adults,^{10–12} but has yet to be evaluated in children. In this study, we evaluate the sensitivity and specificity of the rapid urine-HpAb test in reference to *H. pylori* stool antigen test (HpSA) and ¹³C-urea-breath test (UBT).

Methods

Study population

This study included 101 Japanese children living in Wakayama Prefecture (mean age, 7.1 ± 3.3; range 2–15 years). We had previously performed an epidemiological study at Wakayama Rosai Hospital on 484 children with HpSA, and found 31 positives.¹³ In the present study, we re-invited 37 children, 31 known positives and six known negatives, to participate. We also invited 64 children whose *H. pylori* status had not been examined. None of the children had significant upper-abdominal symptoms, a history of *H. pylori* eradication or renal disorders. They had not received any antibiotic or other significant medical treatment in the previous 4 weeks that might have affected the results. Informed consent was obtained from all parents. All the children

Correspondence: Masumi Okuda, MD PhD, Department of General Medicine and Community Health Science, Sasayama Medical Center, Hyogo College of Medicine, Kuro-oka 5, Sasayama, Hyogo 669-2321, Japan. Email: okuda@naxnet.or.jp

Received 29 September 2012; revised 13 December 2012; accepted 20 December 2012.

provided a urine sample on the day of the UBT and a fecal sample within 7 days of the UBT. The research protocol was reviewed and approved by the Ethics Committee of the institution.

Methods

UBT

Children were fasted at least 4 h before UBT and breath samples were collected before and 20 min after ingestion of ^{13}C -urea. Dosage of ^{13}C -urea was altered according to age: 50 mg for children younger than 6 years of age, 75 mg for those aged 7–12 years, and 100 mg for those over 13 years. An infrared spectrometer (UBiT- IR300, Otsuka Electronics, Hirakata, Japan) was used in this study and an increase of more than 3.5% was considered positive.¹⁴

Stool antigen test

Stool samples were stored at -20°C until use. An enzyme immunoassay kit (Premier Platinum HpSA, Meridian Diagnostics, Cincinnati, OH, USA) utilizing a polyclonal anti-*H. pylori* rabbit antibody adsorbed to microwells was used to detect *H. pylori* antigen in stool according to the manufacturer's instructions. Values greater than or equal to 0.120, between 0.100 and 0.119, and less than 0.100 were considered positive, equivocal, and negative, respectively.

Urine-HpELISA (URINELISA)

Single-void urine samples were obtained and stored at 2°C to 8°C until use. Urinary IgG antibodies to *H. pylori* were determined using a urine-HpELISA kit (URINELISA, Otsuka Pharmaceuticals) that utilizes a *vacA* and *cagA*-positive *H. pylori* strain isolated from a Japanese gastritis patient as the antigen source.¹⁵ Ninety-six-well microtiter plates coated with *H. pylori* antigen were used according to the manufacturer's instructions. Absorbance at 450 nm was measured and calculations were as follows: cut-off index (CI) reflects the ratio of absorbance of sample tested/cut-off value. Cut-off values were calculated as the mean absorbance of two positive controls/ $8.5 + \text{mean absorbance of three negative controls}$. CI values ≥ 1.0 were judged positive, and those < 1.0 were judged negative.

Rapid urine-HpAb (RAPIRUN)

Rapid urinary IgG antibodies to *H. pylori* were determined using immunochromatography (RAPIRUN, Otsuka Pharmaceuticals) using the same antigen as in URINELISA. This test is judged to be positive if red lines appear in both the control and test zone, and to be negative if a red line is observed only in the control zone. Without a visible red line in the control zone, the test is considered to be invalid.

Proteinuria test

As proteinuria may give a false positive reaction in the urine-based ELISA,¹⁶ BM test[®] (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) was also performed on urine-HpELISA-positive samples.

Table 1 Evaluation of rapid urine-HpAb (RAPIRUN) test compared to UBT and HpSA

Rapid urine-HpAb	Children with indicated <i>H. pylori</i> status UBT and HpSA		
	Positive	Negative	Total
Positive	29	0	29
Negative	7	64	71
Invalid	1	0	0
Total	37	64	101

HpSA, *H. pylori* stool antigen test; UBT, ^{13}C -urea-breath test.

Determination of *H. pylori* infection

H. pylori infection status was determined by positive results in both UBT and stool antigen test.

Results

Measurement of UBT and HpSA

Of 101 children, 37 were positive (mean age, 7.1 ± 3.4 ; range 2–15 years) and 64 were negative (mean age, 7.1 ± 3.3 ; range 2–14 years), as judged by UBT and HpSA (Table 1). No statistical difference in age was detected between positive and negative subjects. There were no equivocal results in the HpSA, and no discrepancy was observed between the two tests.

Rapid urine-HpAb and urine-HpELISA

Twenty-nine out of 37 *H. pylori*-positive children by UBT and HpSA were positive with rapid urine-HpAb and one was invalid, while all 64 *H. pylori*-negative children were negative (Table 1). Thus the rapid urine-HpAb showed 78.4% sensitivity (29/37) and 100% specificity (64/64) with an accuracy of 92.1% compared to UBT and HpSA (Table 2). In comparison, urine-HpELISA showed 91.9% sensitivity (34/37) and 96.9% specificity (62/64) with an accuracy of 95.0% (Table 2).

To evaluate whether age or antibody titers affected the results of the rapid urine-HpAb, the CI of the urine-HpELISA was plotted against age (Fig. 1). There was no significant correlation between the CI values and age in *H. pylori*-positive subjects (Fig. 1A). CI of urine-HpELISA of the true positive subjects with negative rapid urine-HpAb ranged from 0.35 to 3.3.

Sixty-two out of 64 true negative subjects showed CI values less than the cut-off value for urine-HpELISA, but all 64 subjects showed negative rapid urine-HpAb (Fig. 1B). It can also be noted

Table 2 Evaluation of urine-HpELISA (URINELISA) compared to UBT and HpSA

Urine-HpELISA	Children with indicated <i>H. pylori</i> status UBT and HpSA		
	Positive	Negative	Total
Positive	34	2	36
Negative	3	62	65
Total	37	64	101

HpSA, *H. pylori* stool antigen test; UBT, ^{13}C -urea-breath test.

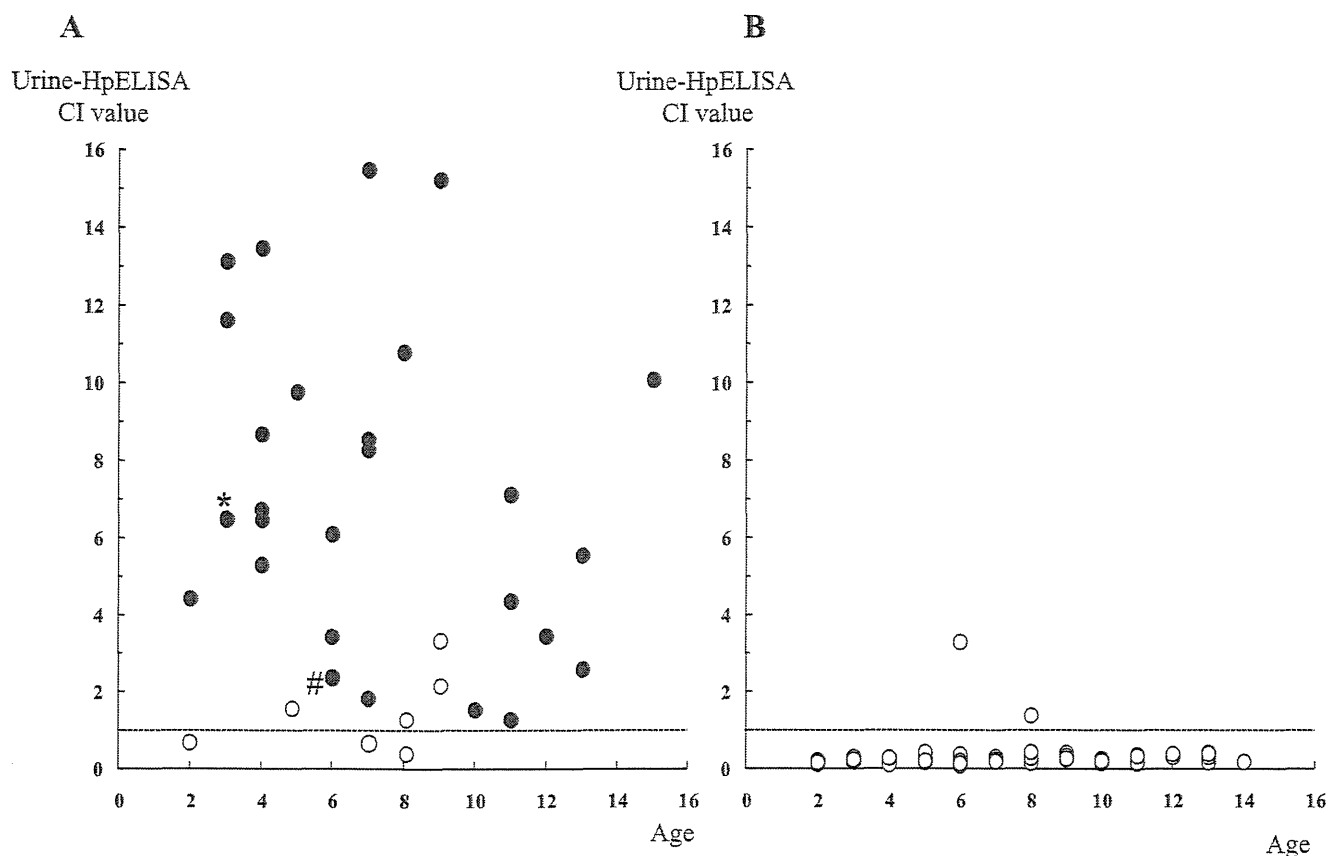


Fig. 1 Correlation between the cut-off index (CI) of urine-HpELISA, rapid urine-HpAb and the age of children. (a) *Helicobacter pylori*-positive group ($n = 36$) judged by ^{13}C -urea-breath test (UBT) and *H. pylori* stool antigen test (HpSA). (b) *H. pylori*-negative group ($n = 64$) judged by UBT and HpSA. CI was calculated as described in Methods. Horizontal dotted lines represent the cut-off value (CI = 1.0). The ordinate scales in (a) and (b) are different. (●) Rapid-urine-HpAb-test-positive subjects; (○) rapid-urine-HpAb-test-negative subjects. (*) CI values of the urine samples obtained from two children aged 3 years were 6.485 and 6.507. #, CI values of the urine samples obtained from two children aged 6 years were 2.371 and 2.397.

that six out of seven false negative urine-HpAb results showed CI values of <3.3 , suggesting a strong relation between antibody titer and sensitivity.

Sensitivity and specificity of the two tests according to age groups were compared (Table 3). In the under-10 age group, sensitivity of the rapid urine-HpAb was lower than that of urine-HpELISA (75.0 vs 89.3%) and specificity was equivalent. In the

over-10 age group, sensitivity and specificity of both tests were adequate. No proteinuria was detected in *H. pylori*-positive subjects.

Discussion

Diagnostic accuracy of the rapid urine-HpAb kit and the urine-HpELISA kit were evaluated in children and both kits gave

Table 3 Sensitivity and specificity of rapid urine-HpAb and urine-HpELISA according to age groups

	Rapid urine-HpAb		Urine-HpELISA	
	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity
Total	78.4	100	91.9	96.9
	29/37	64/64	34/37	62/64
<10 years old (%)	75.0	100	89.3	95.8
Positive/total	21/28	48/48	25/28	46/48
>10 years old (%)	88.9	100	100	100
Positive/total	8 [†] /9	16/16	9/9	16/16

[†]One of nine cases had an invalid result.

satisfactory results, although the sensitivity of the rapid urine-HpAb test was inferior to the urine-HpELISA kit, especially in children aged under 10 years.

A weak point of the current study was that subjects with stool antigen test results were included, which could be a bias. If the subjects had been invited according to urine *H. pylori* antibody status, it would have distorted the results. At the time of the invitation, information on urine *H. pylori* antibody status was lacking, in other words this was a blind study, so little bias by the selection of the subjects is expected. There was no discrepancy between results of UBT and HpSA. The results are thought to be reliable as a gold standard for sensitivity and specificity.

Various epidemiologic studies have revealed a significant relation between gastric cancer and *H. pylori* infection in the Japanese population.^{17,18} It is also reported that *H. pylori* infection is associated with the development of both intestinal-type and diffuse-type gastric cancer.¹⁹ In these studies, gastric cancer was shown to develop only in patients carrying *H. pylori*, which confirms that infection is a main cause of gastric cancer in Japan.

It is also proven that eradication of *H. pylori* infection reduces the occurrence of gastric cancer.^{20,21} In a high-risk region of China, a prospective, randomized, placebo-controlled, population-based primary prevention study showed that the incidence of gastric cancer was similar between participants receiving *H. pylori* eradication therapy and those receiving placebo during a period of 7.5 years.²² However, in the subgroup without precancerous lesions, eradication of *H. pylori* significantly decreased the development of gastric cancer. According to these findings, *H. pylori* eradication in the Japanese population will reduce the development of gastric cancer, and therapy before the development of atrophic gastritis is desirable. This makes the age of eradication for prevention of gastric cancer and the most effective screening test for *H. pylori* infection in children and young adults an important issue.

Urine antibody testing is a simple, low-cost and rapid process with minimal patient discomfort and seems ideal for screening of *H. pylori*. However, the accuracy of antibody tests for *H. pylori* in childhood has previously been considered controversial due to their low sensitivity. We have shown in a previous report that the sensitivity of a serum-HpELISA kit, HM-CAP, was only 51.4% (18/35) for children below 10 years compared to HpSA.⁸ However, an enzyme immunoassay test using serum samples based on Japanese strain-derived antigens, JHM-CAP, had significantly better performance than HM-CAP, which is based on US strain-derived antigens, in a study population of Japanese asymptomatic young children.²³ Similarly, we reported that a urine-HpELISA using *H. pylori* antigens derived from a Japanese strain had 94.4% sensitivity and 96.9% specificity with an accuracy of 96.0% in children.⁹ This shows that performance in children is highly dependent on the locality of the *H. pylori* strains used in the ELISA system.

Akamatsu *et al.* performed screening tests for *H. pylori* infection in a study population of 1224 high school students using the rapid urine-HpAb and found 64 positive subjects.²⁴ Thirty of these 64 *H. pylori* urine antibody-positive students had an upper

gastrointestinal endoscopy in the author's institution and 24 (80%) were diagnosed as *H. pylori*-positive by histology and culture. Among the remaining six rapid urine-HpAb-positive subjects, two subjects were endoscopically diagnosed severe atrophic gastritis, indicating 13.3% (4/30 subjects) of false positives in the rapid urine-HpAb test. In this study, as there are no reports on the reliability of a rapid urine-HpAb test in children, we evaluated a rapid urine-HpAb test in children and found that the sensitivity of the rapid urine-HpAb test was lower than urine-HpELISA. While urine-HpELISA was judged according to absorbance of samples, rapid urine-HpAb is detected by visualizing a positive reaction band. In 12 *H. pylori*-positive urine samples showing a CI value of less than 3.3 by urine-HpELISA, six had negative rapid urine-HpAb results, showing that low antibody titers of the specimens tend to result in a false negative. The difference in diagnostic accuracy between the rapid urine-HpAb and the urine-HpELISA tests was observed only in subjects aged younger than 10 years. Although negative results for relatively low antibody titer may be the main reason of the inferior sensitivity of the rapid urine-HpAb test, age of the subjects could have something to do with the false negative results.

From these findings, both kits can be used for children over 10 years of age. For children under 10 years of age, the urine-HpELISA kit may be preferable to the rapid urine-HpAb kit, and because of relatively low sensitivity, additional infection diagnosis with UBT or stool antigen test is recommended for those with negative urine results, especially for those with clinical significance.

In conclusion, for the diagnosis of *H. pylori* infection in Japanese children, both tests are non-invasive, inexpensive, reliable and easy-to-perform methods giving satisfactory accuracy, although the sensitivity of the rapid urine-HpAb kit was inferior to that of the urine-HpELISA kit, especially in children aged younger than 10 years, showing relatively low titer of *H. pylori* antibody.

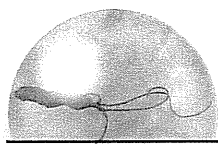
Acknowledgments

This project was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (#22590613 and #23590518) from the Japan Society for the Promotion of Science. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content of the paper.

References

- 1 Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; **1**: 1311–15.
- 2 Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of Gastrointestinal inflammation. *J. Infect. Dis.* 1990; **161**: 626–33.
- 3 Dooley CP, Cohen H, Fitzgibbons PL *et al.* Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic persons. *N. Engl. J. Med.* 1989; **321**: 1562–6.
- 4 Drumm B, Sherman P, Cutz E, Karnali M. Association of *Campylobacter pylori* on the gastric mucosa with antral gastritis in children. *N. Engl. J. Med.* 1987; **316**: 1557–61.
- 5 Goodwin CS, Mendall MM, Northfield TC. *Helicobacter pylori* infection. *Lancet* 1997; **349**: 265–9.

- 6 Khanna B, Cutler A, Israel NR *et al.* Use caution with serologic testing for *Helicobacter pylori* infection in children. *J. Infect. Dis.* 1998; **178**: 460–5.
- 7 Corvaglia L, Bontems P, Devaster J-M *et al.* Accuracy of serology and ¹³C-urea breath test for detection of *Helicobacter pylori* in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1999; **18**: 976–9.
- 8 Okuda M, Miyashiro E, Koike M *et al.* Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infection is not accurate for children aged below 10. *Pediatr. Int.* 2002; **44**: 387–90.
- 9 Okuda M, Nakazawa T, Booka M, Miyashiro E, Yosikawa N. Evaluation of a urine antibody test for *Helicobacter pylori* in Japanese children. *J. Pediatr.* 2004; **144**: 196–9.
- 10 Yamamoto S, Uemura N, Okamoto S, Yamaguchi S, Mashiba H, Tachikawa T. A new rapid test for detecting anti-*Helicobacter pylori* antibody excreted into urine. *Helicobacter* 2000; **5**: 160–4.
- 11 Graham DY, Reddy S. Rapid detection of anti-*Helicobacter pylori* IgG in urine using immunochromatography. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2001; **15**: 699–702.
- 12 Fujisawa T, Kaneko T, Kumagai T *et al.* Evaluation of urinary rapid test for *Helicobacter pylori* in general practice. *J. Clin. Lab. Anal.* 2001; **15** (3): 154–9.
- 13 Okuda M, Miyashiro E, Koike M, Okuda S, Minami K, Yoshikawa N. Breast-feeding prevents *Helicobacter pylori* infection in early childhood. *Pediatr. Int.* 2001; **43**: 714–15.
- 14 Kato S, Ozawa K, Konno M *et al.* Diagnostic accuracy of the ¹³C-urea breath test for childhood *Helicobacter pylori* infection: a multicenter Japanese study. *Am. J. Gastroenterol.* 2002; **97**: 1668–73.
- 15 Katsuragi K, Noda A, Tachikawa T *et al.* Highly sensitive urine-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 1998; **3**: 289–95.
- 16 Kato M, Asaka M, Saito M *et al.* Clinical usefulness of urine-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to *Helicobacter pylori*: a collaborative study in nine medical institutions in Japan. *Helicobacter* 2000; **5**: 109–19.
- 17 Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N. Engl. J. Med.* 1991; **325**: 1132–6.
- 18 Kikuchi S, Wada O, Nakajima T *et al.* Serum anti-*Helicobacter pylori* antibody and gastric carcinoma among young adults. Research Group on Prevention of Gastric Carcinoma among Young Adults. *Cancer* 1995; **75**: 2789–93.
- 19 Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S *et al.* *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N. Engl. J. Med.* 2001; **345**: 784–9.
- 20 Fukase K, Kato M, Kikuchi S *et al.* Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on incidence of metachronous gastric carcinoma after endoscopic resection of early gastric cancer: an open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2008; **372**: 392–7.
- 21 Take S, Mizuno M, Ishiki K *et al.* The long-term risk of gastric cancer after the successful eradication of *Helicobacter pylori*. *J. Gastroenterol.* 2011; **46**: 318–24.
- 22 Wong BC, Lam SK, Wong WM *et al.* *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004; **291**: 187–94.
- 23 Okuda M, Sugiyama T, Fukunaga K, Kondou M, Miyashiro E, Nakazawa T. A strain-specific antigen in Japanese *Helicobacter pylori* recognized in sera of Japanese children. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005; **12**: 1280–4.
- 24 Akamatsu T, Ichikawa S, Okudaira S *et al.* Introduction of an examination and treatment for *Helicobacter pylori* infection in high school health screening. *J. Gastroenterol.* 2011; **46**: 1353–60.



特集

Helicobacter pylori 基礎研究の最前線

1. 疫学

Helicobacter pylori の家族内感染に関する multi locus sequence typing (MLST) 解析

大崎敬子* 奥田真珠美** 菊地正悟# 今野武津子## 神谷 茂*

Helicobacter pylori (*H. pylori*) の感染は 5 歳以下の乳幼児期に成立するといわれており、わが国におけるおもな感染ルートは家族内ヒト-ヒト間感染と考えられている。*H. pylori* の感染小児のいる家族からの糞便や胃粘膜から分離培養した菌株を材料として、本菌のハウスキーピング遺伝子をターゲットとする multi locus sequence typing (MLST) を実施した。遺伝子タイプの違いから *H. pylori* の感染源を推定して、家族内感染の状況を明らかにした。

KEYWORDS

家族内感染, 感染ルート, 小児, multi locus sequence typing (MLST)

はじめに

Helicobacter pylori (*H. pylori*) のわが国における感染率は顕著な減少傾向がある¹⁾。その理由としては、上下水道の完備など生活環境の改善による環境由来の感染の減少がある¹⁾。また、本菌の持続感染は 5 歳までに確立すると考えられていて、乳幼児期においては両親の感染の有無が子供の感染を既定する要因のひとつであることから、両親の感染率の低下は子供の感染率の低下を導いていると推察される。感染症の起因菌の由来を検索するために遺伝子型別は有用な方法で、*H. pylori* 感染においても個々の家族員から分離される本菌の遺伝子型を調べ、家

族内での感染の状況を明らかにすることが可能である。

H. pylori の遺伝子型別については、実験技術の進歩とともに方法を変えて報告されている。家族から分離された菌株の遺伝子型別をおこなっている報告は、restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法²⁾³⁾、リボタイピング法⁴⁾、finger printing 法³⁾⁵⁾、遺伝子型特異的プライマーを組み合わせて PCR 法で確認する方法⁶⁾、パルスフィールド電気泳動⁷⁾などが知られる。国内例⁵⁾は報告が少ないが、家族内感染を示唆する報告があり、国外では家族外の感染を示唆する報告⁸⁾もある。

multi locus sequence typing (MLST) は病原細菌の流行状況の解析や疫学研究のために、数種類の遺伝子の

* OSAKI Takako, KAMIYA Shigeru/杏林大学医学部感染症学

** OKUDA Masumi/兵庫医科大学地域医療学・ささやま医療センター小児科

KIKUCHI Shogo/愛知医科大学公衆衛生学

KONNO Mutsuko/札幌厚生病院小児科

シーケンスを読んで複数菌株の遺伝子型を比較する方法として、広く普及している。2013 年 7 月現在、PubMLST サイト (<http://pubmlst.org>) において *H. pylori*, *H. cinadi* および *H. suis* を含む *Helicobacter* 属 3 菌種、腸内細菌科やグラム陽性球菌, *Vibrio* 属菌などを含む 35 菌種、13 菌属の MLST データベースが構築されている。*H. pylori* の場合には 7 個のハウスキーピング遺伝子と *vacA* 遺伝子の多型 (allele タイプ) がそれぞれプロファイル化されている。*H. pylori* MLST web サイトでは PCR 反応やシーケンスに用いるプライマーの情報や、すべての allele タイプや、それらを組み合わせた sequence タイプをダウンロードすることが可能である。さらに、新規の遺伝子配列をアップロードするためのツールなども整っている。

H. pylori のゲノムは菌株多様性が多いことが知られているが、MLST 解析によって得られる塩基配列約 3,400 bp を使って、世界中の *H. pylori* が七つのグループに大別され、先史時代の人類の足跡を追う手がかりとなるようなデータが報告されている^{9)~11)}。

小児の感染実態の解明のために兵庫県篠山市で実施された 3 年間のプロジェクトの例¹²⁾を中心に MLST の応用について説明する。

1. 家族内感染検索のための MLST 解析の実際

1) 対象者

2010~2011 年度に篠山市で実施した小児 *H. pylori* 研究の対象者およびその家族から、*H. pylori* 糞便抗原陽性の小児と同居の家族員が 2 名以上糞便抗原陽性を示した家族 (合計 3 家族) を対象として MLST 解析を実施した¹²⁾。

2) 糞便材料

無症状の小児を対象とする場合、*H. pylori* 感染が確定する前の胃内視鏡検査はむずかしく、侵襲性のない糞便や尿を使つての感染診断が望ましい。糞便はできるだけ新鮮なうちに凍結し、DNA 抽出時まで -30℃ 以下で保存した。糞便抗原試験を実施する場合にもできるだけ融解しないように、シャーベット状になったところで部分的

に取り出すなど注意しておこなった。

3) 糞便抗原試験

糞便中に *H. pylori* の抗原が含まれることは、テストメイトピロリ抗原 EIA (わかもと製薬) を用いて確認した。試験方法は EIA キット添付文書の記載に従って実施し、カットオフ値 0.1 以上を *H. pylori* 陽性と判定した。

4) 糞便 DNA の抽出

-30℃ 以下で凍結保存した糞便 0.2 g から、QIAamp DNA Stool Mini Kit (Quiagen) を用いて抽出した¹²⁾。抽出条件には Lysis buffer (ASL) に 0.3 g のガラスビーズ (0.1φ) を加えて懸濁し、75℃ 10 分加熱の前と後に 1,500 rpm, 30 秒, 3 サイクルのビーズ破碎処理 (マルチビーズショッカ-MB755U, YASUI KIKAI) を追加した。ビーズ破碎後のサンプルはキット添付文書の記載にしたがっておこない、200 μl の buffer AE を用いてカラムから DNA を回収した。糞便 DNA 中に *H. pylori* の DNA が含まれることの確認は、16srRNA 遺伝子をターゲットとする SYBR Ggreen リアルタイム PCR 法¹³⁾をおこなって確認した。糞便抗原陽性のサンプルからは全例 *H. pylori* の DNA が検出された。

5) *H. pylori* 菌株の分離と DNA 抽出

H. pylori 分離培養は、定法にしたがい¹⁴⁾、胃粘膜生検材料を、ヘリコポーター (日研生物) に入れて輸送後、ヘリコバクター寒天培地 (ニッスイ) に接種し、37℃、微好気条件下 (三菱ガス化学) にて 3~7 日培養した。発育した菌株からシングルコロニーを分離し増菌培養した後、MLST 解析に供した。*H. pylori* 分離菌株の DNA は Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) を用いて抽出した。

6) MLST 解析

抽出した DNA を template として、*atpA*, *efp*, *mutY*, *trpC*, *ureI*, *ppa*, *yphC* 遺伝子を表①のプライマーを用いて、PCR 法で増幅した。糞便 DNA を用いた PCR 法の場合、1 回の PCR 反応では十分な増幅産物が得られにくい

表① 糞便由来 DNA の MLST 解析に用いたプライマー*

Target gene	PCR プライマー		Product size	
<i>efp</i>	<i>efp</i> -for1	GGCAATTTGGATGAGCGAGCTC	558	1st
	<i>efp</i> -rev1	CTTCACCTTTTCAAGATACTC		1st
	<i>efp</i> -for2	GGGCTTGAAAATTGAATTGGGCGG	500	2nd**
	<i>efp</i> -rev2	GTATTGACTTTAATGATCTCACCC		2nd**
<i>trpC</i>	<i>trpC</i> -for8	AGCATCGCCCTCTAAAGGTT	618	1st
	<i>trpC</i> -rev6	AAGCCCGCACACTTTATTTTC		1st
	<i>trpC</i> -for9	TCGCCCTCCAAGGTTTGAT	564	2nd**
	<i>trpC</i> -rev9	TCAAATCCTTTTCTTTTCTTA		2nd**
<i>ppa</i>	<i>ppa</i> -for1-1	GAARTKAGCCATGACGCTRA	698	1st
	<i>ppa</i> -rev4	GGGTAAARATCGTTAAATTGTAG		1st
	<i>ppa</i> -for1-2	GAAGTGAGCCATGACGCTGA	490	2nd**
	<i>ppa</i> -rev1-2	CTCTTTGTTTTCAAACCCCTTG		2nd**
<i>mutY</i>	<i>mutY</i> -for4	TTATGAAGTCTCTATATCAGCGAAGT	529	1st
	<i>mutY</i> -rev4	TACCTAAACAATAAGGATTGAAAGG		1st
	<i>mutY</i> -for5	ATATCAGCGAAGTGATGAGC	516	2nd**
	<i>mutY</i> -rev5	CCCAAACAATAAGGATTGGAA		2nd**
<i>atpA</i>	<i>atpA</i> -for2	GGACTAGCGTTAAACGCACG	840	
	<i>atpA</i> -rev2	CTTGAAACCGACAAGCCAC		
<i>yphC</i>	<i>yphC</i> -rev3	CATTYACCCCTCCAATGATGC	721	
	<i>yphC</i> -for2	CACGCCTATTTTTTGAATAAAAC		
<i>ureI</i>	<i>ureI</i> -for	AGGTTATTCGTAAGGTGCG	721	
	<i>ureI</i> -rev2	GTTTAAATCCCTTAGATTGCC		

* : 参考文献 12 および <http://pubmlst.org/helicobacter> を参照した。

** : nested PCR でおこない、2 回目の PCR 用のプライマーはシーケンス用プライマーとしても用いた。

ため、nested PCR 法が必要であった(表①)。糞便には PCR に対する阻害物質が含まれているため、1stPCR ではとくに注意が必要となる。AmpDirect (Shimazu) を用いて糞便夾雑物の影響を最小限とするなどして 1stPCR を実施した後、混入している細菌 DNA の影響を減らすために、1stPCR の反応液を 10~50 倍に希釈した。希釈液を鋳型として実施した場合、2ndPCR は ExTaq (TAKARA) を用いて増幅可能であった。増幅産物は、WizardSV Gel and PCR Clean up System (Promega) を使って精製した後に、ABI BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits を用いて、キャピラリーシーケンス法で ABI 3730xl Analyzer を用いて塩基配列を決定した。

得られた塩基配列情報から、MLST データベース (<http://pubmlst.org/helicobacter>) 上で、それぞれの遺伝子の多型をプロファイルし、さらに各遺伝子多型の組み合わせにより菌株または糞便 DNA の遺伝子型 (Sequence Type : ST) を決定した。

2. 家族内 *H.pylori* 感染の MLST 解析の結果

H. pylori 陽性の子供と、その家族の糞便の MLST 解析の結果を表②に示した。糞便 DNA の全例から PCR 産物を得ることができたのは、これまでのところ *atpA*, *efp*, *mutY*, *trpC* の 4 遺伝子についてであった。*ureI*, *ppa*, *yphC* の 3 遺伝子については全例では増幅ができず、今後改良する必要が認められた。得られた 4 遺伝子の塩基配列を Web サイト上で入力して、allele タイプを決定した。これまで登録されている allele タイプと完全一致しない場合にも最も近似するタイプが指定される。さらに “Search *Helicobacter* PubMLST database by combinations of MLST loci” に入力して、ST を決定した。多くの場合、ST の候補は複数個現れ完全には一致しないこともある。ST を使って家族内感染の有無を推定する場合には、家族員と発端児を比較して、一致するものがひとつ以上含まれる場合に発端児に対して感染源となった可能性がある

表② *H. pylori* 糞便抗原陽性の子供の糞便 DNA を用いた MLST 解析

家族	多型番号*				最も近いシーケンス型 を示した家族
	<i>efp</i>	<i>mutY</i>	<i>ppa</i>	<i>trpC</i>	
A 発端児 (1 回目)**	1,908	703	1,934	454	父親
	181	703	838	181	母親
	1,908	703	1,934	454	
	181	703	945	ND	
	<i>H. pylori</i> —糞便抗原陰性				
B 発端児 (1 回目)**	1,807	1,540	502	1,468	母親
	1,807	1,540	502	457	母親
	1,908	1,540	502	1,468	
	1,908	703	945	181	
	<i>H. pylori</i> —糞便抗原陰性				
C 発端児 (1 回目)**	1,908	2,019	938	457	母親
	1,908	703	1,934	457	母親
	1,908	703	1,934	1,239	
	1,913	11	ND	1,060	
	<i>H. pylori</i> —糞便抗原陰性				
兄弟	<i>H. pylori</i> —糞便抗原陰性				

* : 最も近い配列または同じ配列の多型番号

** : 同じ子供から約 3 ヶ月の間隔を置いて 2 回糞便を採取した。

(Osaki T *et al.*, 2013¹²⁾ より引用)

判断し、一致するものがひとつも認められない場合には、発端児の感染に対しては無関係であったと判断した。その結果、家族 A においては、子供と父親が 4 遺伝子中 4 遺伝子一致し、父親から子への感染があったことが示唆された。また、2 回目採取した糞便は母の糞便と一致する ST であったため、子供には 2 株以上の菌株が混合感染していることが明らかとなった。さらに家族 B においては、子供と母親、同居の祖父が *H. pylori* 糞便抗原陽性であったが、MLST 解析の結果、祖父は 4 遺伝子すべての allele タイプが子供と異なり、ST の候補も一致が認められないことから、祖父は子供の *H. pylori* 感染とは無関係であったと決定した。そして、母親の糞便に含まれた DNA の MLST 解析の結果は子供と 4 遺伝子中 3 遺伝子が一致していて、ST 解析の結果から母子感染が起きていたことが示された。家族 C も家族 B と同じ家族構成で、子供と母親、同居の祖父が *H. pylori* 糞便抗原陽性で MLST 解析から、母子感染が示唆された。

胃粘膜生検を実施して培養された *H. pylori* 菌株を使って、母と子の保有する菌株の遺伝子タイプの比較を

実施した 1 家族例を表③に示した。7 遺伝子中 7 遺伝子の一致が認められて、母子が同じ遺伝子タイプの菌株に感染していることが明となり、母子感染が明らかとなった。

3. MLST 解析からわかる家族内感染の状況と問題点

H. pylori 感染小児のいる家族で、分離菌株や糞便を使って MLST 解析を実施することにより、家族内感染を示すことができた。ここで示されたのは母子感染と、父子感染であり同胞間感染は認めなかった。また同居の *H. pylori* 陽性の祖父は子供の感染と無関係であることが明らかとなった。

菌株 DNA と糞便 DNA を比較すると、菌株を使った解析のほうがより精度よく判定できることは明らかである。前述のように無症状の小児に対して内視鏡検査はむずかしいことから、糞便を使った検査も必要とされている。糞便 DNA の遺伝子解析を困難にしている原因は不明だが、以下のことが想定される。*H. pylori* は胃において棲息できる微好気性発育の細菌であるので、腸管に入って嫌気度が上昇するとともに、死滅したり、球状化

表③ 母および子から分離培養された *H. pylori* 菌株の MLST 解析の比較

遺伝子	母親	子供
<i>atpA</i>	1,984	1,984
<i>efp</i>	455	455
<i>mutY</i>	1,220	1,220
<i>ppa</i>	1,125	1,125
<i>trpC</i>	1,536	1,536
<i>ureI</i>	970	970
<i>yphC</i>	960	960

して培養不能状態に入る¹⁵⁾。そして糞便に混じって体外に排出されるが、糞便から培養法で本菌が検出されることはきわめてまれである。細菌の DNA は菌が死滅しても培養不能であっても、菌体内にとどまっている場合にはすぐに壊れることはない。しかし、腸管通過時間が延長することにより菌体が破壊してしまうと、菌体から外に出た DNA は消化管に存在する種々の酵素により断片化される。したがって糞便から集められる本菌の DNA は少量であるとともに完全な DNA が少ないといった特徴がある。これまで、感染者の糞便を使って 16SrRNA 遺伝子のリアルタイム PCR 法で糞便内の菌数を定量した経験によると、*H. pylori* DNA が多く含まれている糞便であっても 1 g あたり 10,000 個程度であった。しかもこの結果は、非常に短いサイズ (150 bp) の産物を計測しての評価であるから、PCR 法のターゲットの長さが変わると、さらに反応がむずかしくなり結果が変わる可能性がある。糞便 DNA を使った MLST 解析のうち *ureI*, *ppa*, *yphC* の 3 遺伝子については増幅ができていないサンプルが多くなっているのは、いずれの遺伝子についても 700 bp 以上の配列を増幅する必要があるため、増幅がむずかしくなっている。この問題の解決のためには、糞便の採取や保存状態の改善をしていく必要性が示された。

別の問題点として、糞便内には PCR 法阻害物質が存在することが知られるが、筆者らが使用した DNA 抽出キットには糞便内阻害物質の除去剤が含まれている。さらに Amp Direct を用いて残存している阻害物質を吸着しながら、阻害物質に抵抗性の Taq ポリメラーゼを用い

て PCR 反応をおこなっている。

さらに、糞便内にはきわめて多量 of 他種細菌由来の DNA (1 g 当たり約 10^{11} 個) が存在し、プライマーの特異度が要求されることはいうまでもない。混合する他種細菌 DNA の影響を取り除くためには、今のところ抽出した後の DNA を希釈する以外に方法がなく、適宜希釈をおこなっている。また、PCR 産物のクリーンアップが必要であることも記しておきたい。

おわりに

細菌の遺伝子型別は技術の進歩に伴い方法が変わり、その精度も上昇してきた。シーケンス情報が加わることで、バンドパターンの差異から判定する方法とくらべて、僅かな差を検出することができる。また MLST は web サイトを使ってすでに構築されたデータにアクセス可能であることで、使い勝手が良いという利点がある。すなわち、個人や一部の集団でのデータの蓄積だけに頼らずにもっと大きなデータベースから菌の遺伝子タイプを決定していくことが容易となっている。

今後、次世代シーケンサーの普及により、最終的には全ゲノム比較をおこなって遺伝子型を比較する時代が到来するかもしれない。しかし、*H. pylori* は変異の頻度が高い細菌として知られ¹⁶⁾¹⁷⁾、感染が長期化した後には、体内で変異が進んでいく可能性もある。小児の感染の原因となった保菌者を探すのは、期間の限られた研究であるかもしれない。



文 献

- 1) 菊地正悟：日本における *Helicobacter pylori* の疫学. *Helicobacter Research* 16 : 375-377, 2012
- 2) Nwokolo CU, Bickley J, Attard AR *et al* : Evidence of clonal variants of *Helicobacter pylori* in three generations of a duodenal ulcer disease family. *Gut* 33 : 1323-1327, 1992
- 3) Georgopoulos SD, Mentis AF, Spiliadis CA *et al* : *Helicobacter pylori* infection in spouses of patients with duodenal ulcers and comparison of ribosomal RNA gene patterns. *Gut* 39 : 634-638, 1996
- 4) Kivi M, Tindberg Y, Sörberg M *et al* : Concordance of *Heli-*

- Helicobacter pylori* strains within families. *J Clin Microbiol* **41** : 5604-5608, 2003
- 5) Konno M, Yokota S, Suga T *et al* : Predominance of mother-to-child transmission of *Helicobacter pylori* infection detected by random amplified polymorphic DNA fingerprinting analysis in Japanese families. *Pediatr Infect Dis J* **27** : 999-1003, 2008
 - 6) Owen RJ, Xerry J : Tracing clonality of *Helicobacter pylori* infecting family members from analysis of DNA sequences of three housekeeping genes (*ureI*, *atpA* and *ahpC*), deduced amino acid sequences, and pathogenicity-associated markers (*cagA* and *vacA*). *J Med Microbiol* **52** : 515-524, 2003
 - 7) Han SR, Zschausch HC, Meyer HG *et al* : *Helicobacter pylori* : clonal population structure and restricted transmission within families revealed by molecular typing. *J Clin Microbiol* **38** : 3646-3651, 2000
 - 8) Schwarz S, Morelli G, Kusecek B *et al* : Horizontal versus familial transmission of *Helicobacter pylori*. *PLoS Pathog* **4** : e1000180, 2008
 - 9) Falush D, Wirth T, Linz B *et al* : Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* **299** : 1582-1585, 2003
 - 10) Linz B, Balloux F, Moodley Y *et al* : An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* **445** : 915-918, 2007
 - 11) Moodley Y, Linz B, Yamaoka Y *et al* : The peopling of the Pacific from a bacterial perspective. *Science* **323** : 527-530, 2009
 - 12) Osaki T, Okuda M, Ueda J *et al* : Multilocus sequence typing of DNA from faecal specimens for the analysis of intra-familial transmission of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol* **62** : 761-765, 2013
 - 13) Osaki T, Hanawa T, Manzoku T *et al* : Mutation of *luxS* affects motility and infectivity of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of a Mongolian gerbil model. *J Med Microbiol* **55** : 1477-1485, 2006
 - 14) Osaki T, Mabe K, Hanawa T *et al* : Urease-positive bacteria in the stomach induce a false-positive reaction in a urea breath test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *J Med Microbiol* **57** : 814-819, 2008
 - 15) Shirai M, Kakada J, Shibata K Accumulation of polyphosphate granules in *Helicobacter pylori* cells under anaerobic conditions. *J Med Microbiol* **49** : 513-519, 2000
 - 16) Patra R, Chattopadhyay S, De R *et al* : Multiple infection and microdiversity among *Helicobacter pylori* isolates in a single host in India. *PLoS One* **7** : e43370, 2012
 - 17) Suerbaum S, Smith JM, Bapumia K *et al* : Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95** : 12619-12624, 1998

図説

Helicobacter pylori の病原因子Virulence factors of *Helicobacter pylori*

神谷 茂 大崎 敬子

はじめに

Helicobacter pylori は多数の病原因子を有する。本菌の病原機序はこれらの病原因子の発現とそれに伴う免疫応答を含む宿主反応に基づく。本菌には最も重要な病原因子は特定されておらず、multifactorial reaction が病態発現の背景となる。

1. *H. pylori* の病原因子

H. pylori 感染に際しての病原因子は菌側因子と宿主側因子に分けられる(表1)。以下に主な病原因子について解説する¹⁾

表1 *H. pylori* の病原因子

病原因子	作用
細菌側病原因子	
鞭毛	菌の運動性をつかさどる
ウレアーゼ	尿素を分解してアンモニアを産生し、胃酸を中和する
アドヘジン	胃上皮細胞への菌の付着に関与する
カタラーゼ	抗食食作用
superoxide dismutase (SOD)	抗食食作用
VacA	胃上皮細胞の空胞化、タイトジャンクションの脆弱化、T細胞抑制作用
cag pathogenicity island (PAI)	サイトカイン産生の誘導、type IV 分泌装置の形成
CagA	細胞骨格の変化、タイトジャンクションの機能不全、細胞の伸長化、細胞運動性の変化
OipA	oipA 'on' 状態が胃粘膜傷害と関係する可能性
LPS	胃上皮細胞との免疫交差反応を惹起する
熱ショックタンパク (HSP)	付着因子としての作用および免疫交差反応の惹起
NapA	白血球活性化因子
DupA	十二指腸潰瘍の発症に関与する可能性
宿主側病原因子	
サイトカイン (IL-6, IL-8 など)	炎症惹起
活性酸素	胃粘膜細胞の傷害
一酸化窒素 (NO)	O ₂ と反応しパーオキシナイトレート (DNA 障害あり) が生成される
DNA/RNA 編集酵素 (AID*)	発がん抑制遺伝子の変異の誘導

* activation-induced cytidine deaminase.

Shigeru Kamiya, Takako Osaki: Department of Infectious Diseases, Kyorin University School of Medicine 杏林大学医学部 感染症学

1) 細菌側病原因子

a. ウレアーゼ

ウレアーゼにより産生されるアンモニアは以下に示す VacA サイトトキシン活性を増強するとともに、アンモニアと好中球ミエロパーオキシダーゼによって生じる HOCl(次亜塩素酸)とが反応して産生されるモノクロラミン(NH₂Cl)は DNA 障害性をもつ²⁾。

b. アドヘジン(付着因子)

H. pylori の胃上皮細胞および胃粘液への付着は本菌の胃内定着の重要なステップとなる(図 1)。著者らは、*in vitro* 研究の結果、本菌の helical form と同様、本菌の viable but non-culturable(VNC)状態の coccoid form も胃上皮細胞に付着し、上皮細胞からの IL-8 産生を刺激することを明らかにした³⁾。しかし、胃上皮細胞への付着性および IL-8 産生誘導能は helical form の方が coccoid form に比べ高かった。

本菌のアドヘジン(付着因子)として Bab, ice, AlpA/B, HopZ, スルファチド結合アドヘジン, SabA などがこれまでに報告されている⁴⁾。blood group antigen-binding adhesin(Bab)は血液型抗原の一種 Lewis^b と結合するアドヘジンであり、*babA2* 遺伝子にコードされている⁵⁾。*babA2* 陽性菌株が感染した場合、好中球浸潤、胃粘膜萎縮、腸上皮化生などの胃粘膜病変が認められる。また、胃癌患者より分離される *H. pylori* 株では Lewis^b の発現率が高い。本菌表層に存在するシアル酸結合性アドヘジン(sialic acid-binding adhesin: SabA)はレセプターである sialyl-dimeric-Lewis^x glycosphingolipid(sLex)と結合する⁶⁾。本菌感染に基づく炎症反応時、胃上皮細胞表面の sLex 発現は亢進し、菌体表層の SabA と結合する。

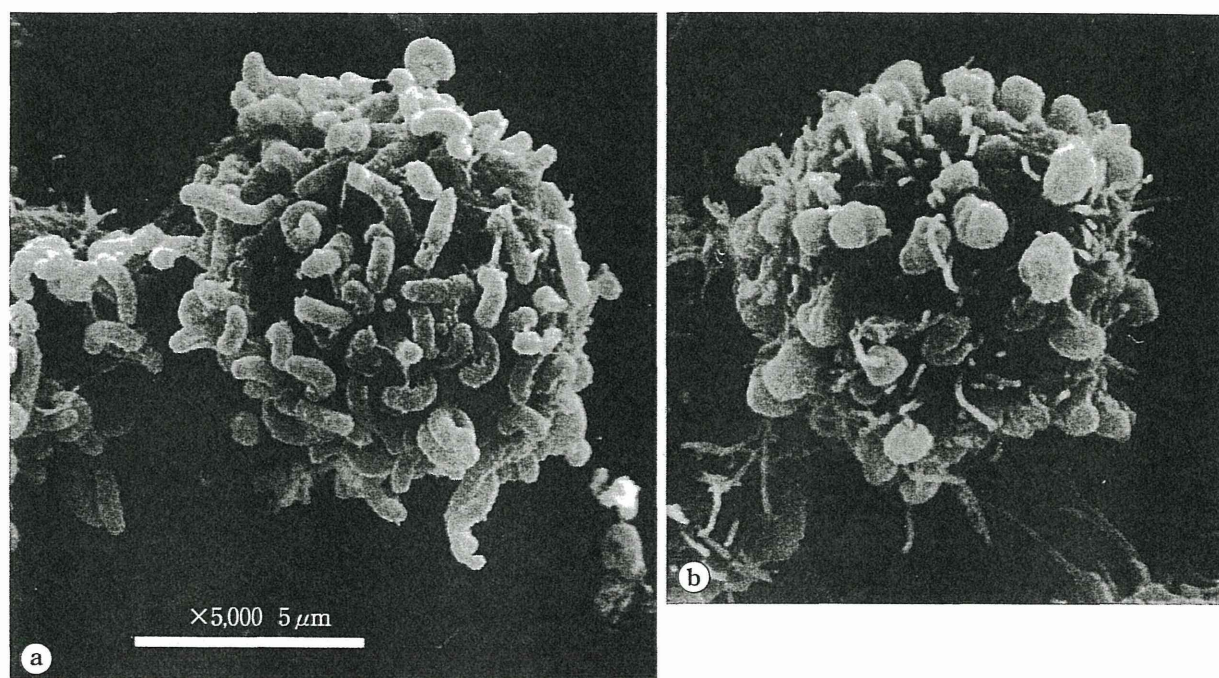


図 1 *H. pylori* の胃上皮細胞への付着 (*in vitro* 研究)

(a) helical form および (b) coccoid form の胃上皮細胞への付着(走査型電子顕微鏡所見)。

c. VacA サイトトキシン(細胞空胞化毒素)

すべての *H. pylori* 株は *vacA* 遺伝子をもち、VacA サイトトキシンタンパクを産生するが、約 40 % (東アジア由来株では 80-90 % 以上)の *H. pylori* は、活性型 VacA であり、上皮細胞に空胞化(vacuolation)を引き起こす(図 2)。VacA の 139 kDa 前駆体タンパクはシグナル領域(33 個のアミノ酸)、87 kDa サイトトキシン、50 kDa の外膜関連領域からなる。VacA のレセプターは receptor protein tyrosine phosphatase β (RPTP β)であり⁷⁾、RPTP β を欠損したマウスへ VacA を経口投与しても潰瘍が形成されないことが報告されている(RPTP β を発現したマウスでは潰瘍形成あり)⁸⁾。*vacA* 遺伝子は signal 領域(s1, s2), intermediate 領域(i1, i2)および mid 領域(m1, m2)のモザイク構造により異なるタイプを示す。s1/i1/m1 は活性型であり、s2/i2/m2 は不活化型となる。s1/i1/m2 は弱毒性を示し、s1/i2/m2 は空胞化を示さない。s1/i1/m1 や s1/i1/m2 タイプの菌株と胃癌や消化性潰瘍との関連が知られている⁹⁾。VacA は上述の空胞化毒素活性のほ

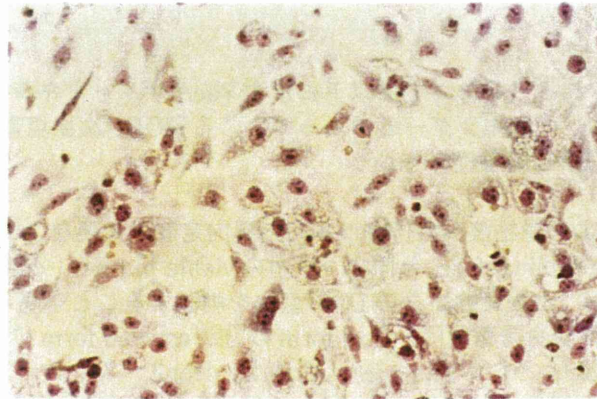


図2 VacAによるサル腎細胞(Vero)の細胞空胞化
ギムザ染色。

か、ミトコンドリア障害性とチトクロームC放出作用、細胞膜上における孔形成性、上皮細胞のタイトジャンクション脆弱化作用、マクロファージのファゴゾーム成熟の抑制、アポトーシス誘導能、T細胞の増殖抑制作用(Th1のdownregulationに傾く)などの様々な作用をもつ^{10,11)}(図3右)。

d. *cagA* および *cag* pathogenicity island (PAI)

約半数(東アジアでは80-90%以上)の菌株はcytotoxin-associated gene (*cagA*)遺伝子をもつ。*cagA*上流の遺伝子群(35-40kb)は*cag*遺伝子(A~T)のほかに*vir*, *tra*などのDNAトランスファー関連遺伝子や*ptl*(百日咳毒素の輸送に関与する)遺伝子を含むため、特に*cag* pathogenicity island (PAI)と呼ばれている。*cag* PAIにはIV型分泌装置(type IV secretion system: T4SS)を形成する遺伝子が存在する¹²⁾。これらの遺伝子にコードされたタンパクが本菌の内膜から外膜を貫くシリンジ状T4SSを形成する。*H. pylori*のeffector分子(後述のCagAおよびペプチドグリカン(PG))の宿主細胞内への移入にT4SSが使用される^{13,14)}。CagEはT4SSの構造タンパクであり、*cagE*の欠失によりeffector分子の細胞内移入は阻害される。CagLもT4SSの構造タンパクであり、アドヘジンとしても作用して $\alpha_5\beta_1$ インテグリンと結合し、effector分子の細胞内移入を活性化するとともに宿主細胞のfocal adhesion kinase (FAK)やSrcを活性化させる(図3左)。CagLはフィブロネクチンとも結合する。他のCagタンパク(CagA, CagI, CagY)は β_1 インテグリンと結合し、インテグリンheterodimersの立体構造を変化させ、effector分子の細胞内移入を亢進させる¹⁵⁾。

CagAは120-140kDaのタンパクであり、チロシンリン酸化を受けるC-端領域のEPIYA(グルタミン酸-プロリン-イソロイシン-チロシン-アラニン)モチーフを有する。現在までにEPIYAモチーフには4種類(EPIYA-A, B, C, D)が存在することが知られている。EPIYA-AおよびEPIYA-Bが世界中で主として最も検出されるタイプであり、EPIYA-Cは西洋欧州諸国(欧州, 北米, オーストラリア)で優位に検出され、EPIYA-Dは東アジア(日本, 韓国, 中国)で優位に検出される。EPIYA-CモチーフはEPIYA-A, EPIYA-Bに比べ、高度にリン酸化される。また、EPIYA-Cの数は菌株により異なり(1-3リピート)、西洋欧州株ではEPIYA-Cモチーフ数の多い菌株ほど胃癌のリスクが高いことが報告されている^{16,17)}。EPIYA-Dモチーフを有する菌株では他のモチーフ株に比べ、胃上皮細胞からのIL-8産生を高度に誘導することが報告されている^{18,19)}。

細胞内に移入したCagAはEPIYAモチーフにおいてAblおよびSrcファミリーのkinaseによりチロシンリン酸化を受ける(図3左)²⁰⁾。リン酸化CagAは真核細胞性phosphataseであるSHP-2および細胞外性シグナル調節kinase 1および2(Erk1/2)を活性化して、cell scattering, アクチン再構成および形態変化を引き起こす^{14,21-23)}。CagAのトランスフェクション実験より、リン酸化CagAとSHP-2の相互作用がErkシグナルpathwayの活性化により細胞伸長化(hummingbird phenomenon)を誘導することが明らかにされた²⁴⁾。東アジア由来のEPIYA-ABD型CagAは西欧由来のEPIYA-ABC型よりも強度にSHP-2と結合し、強固な形態変化を引き起こす²⁵⁾。Srcは本菌の感染初期に活性化され、急速に不活化されるのに対して、Ablは長期間活性化されることにより、CagAのリン酸化が行われる。リン酸化CagAはSrcのnegative regulatorであるC-terminal Src kinase (Csk)を介してSrcを抑制する。Srcの不活化はリン酸化CagAに対してnegative feedback loopを呈する。Srcの触媒活性の阻害はアクチン結合性タンパクであるcortactin, ezrin, vinculinなどのチロシン脱リン酸化を誘導して、結果的に細胞の再編成および伸長化を引き起こす²⁶⁾。培養細胞において、リン酸化CagAとSHP-2の結合はFAKの脱リン酸化および不活化を引き起こし、形態変化を誘導

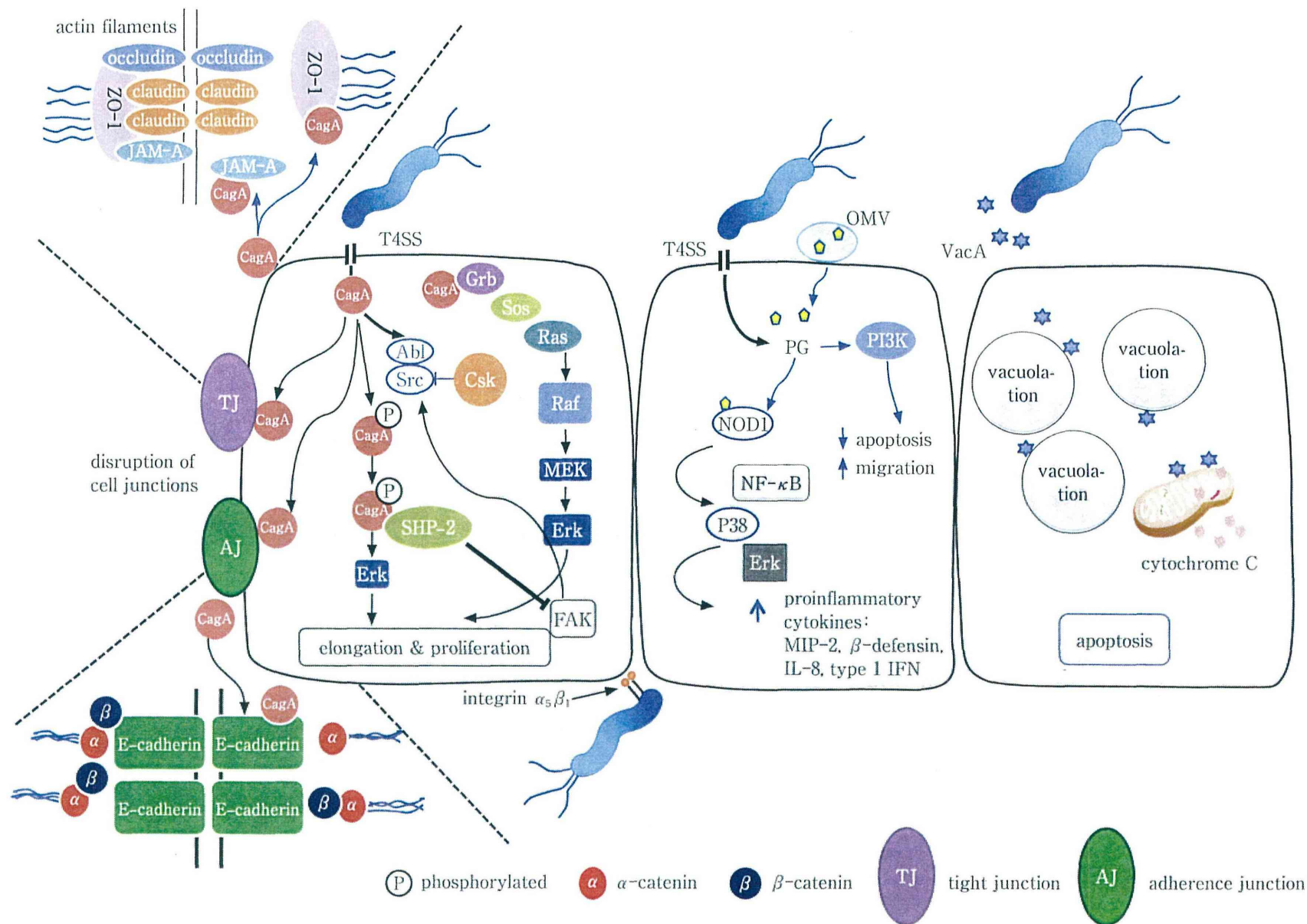


図3 CagA, ペプチドグリカン (PG) および VacA による細胞変化 (文献^{11,20)} より改変)

する²⁷⁾。

CagA は EPIYA モチーフのチロシンリン酸化を経ないで胃上皮細胞に様々な傷害性を誘導する。CagA の細胞内移入により, apical-junctional 複合体を破壊する (図 3 左)。また CagA はタイトジャンクション (TJ) 足場タンパク zona occludens 1 (ZO-1) および膜貫通性タンパクである junctional adhesion molecule A (JAM-A) に結合して, 初期の不完全な TJ の集合を誘導する²⁸⁾。加えて, CagA は adherence junctions (AJ) を傷害することにより, β -catenin の異常な活性化, バリアー機能の喪失, 細胞がん化に関連する細胞極性の変化などを引き起こす。更に, CagA は接着タンパクである E-cadherin, 肝細胞発育因子レセプター (c-Met), phospholipase PLC- γ , アダプタータンパク Grb2 などと反応して, 炎症性サイトカイン産生, 細胞分裂刺激, 細胞ジャンクションの破壊, 細胞極性の喪失などを誘導する^{28,29)}。リン酸化されない CagA は細胞極性の調節因子である PAR1b/MARK2 に直接結合し, この kinase 活性を阻害する。この結果, 宿主細胞分裂時の紡錘形成が阻害され, 細胞極性が失われる³⁰⁾。これらの現象は CagA multimerization (多量体化) (CM) サイトと名づけられた CagA の 16 アミノ酸繰り返しモチーフに依存していることが明らかにされた³¹⁾。本モチーフ (菌株によりモチーフ数は異なる) は PAR1b/MARK2 に結合し, CagA のホモ 2 量体化を引き起こし, SHP-2 結合性やその活性化を調節する³²⁾。

H. pylori の細胞壁成分ペプチドグリカン (PG) の γ -D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid (iE-DAP) は T4SS および外膜小胞 (outer membrane vesicle: OMV) を介して, 宿主細胞内に移入する (図 3 中央)^{33,34)}。PG は細胞内で病原体パターン認識分子である nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1) と結合し, これを活性化する。ついで細胞内シグナル分子である NF- κ B, P38 および Erk を介して炎症性サイトカインである MIP-2, β -defensin および IL-8 の産生を誘導する^{9,35)}。更に *H. pylori* の PG による NOD1 の活性化は Th1 細胞の分化を促進させる I 型インターフェロン (IFN- α や IFN- β など) の産生を調節する³⁶⁾。PG の細胞内移入は PI3K を活性化させ, 細胞遊走 cell migration を亢進させる。*H. pylori* の soluble lytic transglycosylase (PG の産生を調節する) をコードする *slt* の不活化は *H. pylori* 誘導性の PI3K シグナル化および cell migration を抑制することが明らかにされている³⁷⁾。*H. pylori* 遺伝子 HP0310 がコードするタンパクは PG 産生に必要な N-acetylglucosamine PG 残基を脱アセチル化する³⁸⁾。HP0310 の喪失は PG 産生を抑制するが, CagA に T4SS を介した細胞内移入を亢進させる³⁹⁾。すなわち CagA と PG という effector 分子同士の相互作用が認められている。HP0310 による PG の脱アセチル化は宿主免疫反応を mitigate させ, 本菌の持続感染と定着を許容させる⁴⁰⁾。

e. *dupA*

日本, 韓国, コロンビアでの分離 *H. pylori* 菌株 500 株 (胃炎 (Gi) 由来 120 株, 十二指腸潰瘍 (DU) 由来 140 株, 胃潰瘍 (GU) 由来 110 株, 胃癌 (Gca) 由来 130 株) を対象に, 疾患特異性を示す遺伝子が検索された結果, DU との関連性が認められた遺伝子が duodenal ulcer promoting gene A (*dupA*) と命名された⁴¹⁾。*dupA* 陽性 *H. pylori* 感染は DU 発症のリスクを高める一方, 萎縮性胃炎および胃癌発症のリスクを低下させる要因となりうる事が想定されている。

2) 宿主側病原因子

H. pylori の胃上皮細胞への付着や胃内定着は胃上皮細胞および免疫担当細胞より TNF α , IL-6, IL-8 などのサイトカイン分泌を誘導する。また本菌感染は活性酸素や iNOS (誘導性一酸化窒素合成酵素) を介した NO 産生を誘導する^{42,43)}。活性酸素や NO には DNA 障害作用が認められ, 胃粘膜傷害の一因となる。DNA/RNA 編集酵素として知られている activation-induced cytidine deaminase (AID) と胃癌との関連性が報告された⁴⁴⁾。*cagA* 陽性 *H. pylori* は胃上皮細胞への感染後, AID の誘導および発がん抑制遺伝子 *TP53* の変異を引き起こすことが明らかにされるとともに, *H. pylori* 陽性の胃癌組織には 78 % (21/27) の高率で AID タンパクが発現していた。

おわりに

H. pylori の病原因子について最新の知見を交えて図説した。本菌は T4SS および OMV を利用して CagA ならびに PG を effector 分子として細胞内に移入する。細胞内でのそれらの分子の作用について詳細な知見が得られており, 本菌の発がんメカニズムの解明に役立っている。今後新たな effector 分子が発見される可能性もあり, 本菌の病原性発現メカニズムの全貌解明が期待される。

文 献

- 1) 神谷 茂 : *Helicobacter pylori* 感染とその病態. 感染・炎症・免疫 **35**: 190-199, 2005.
- 2) Suzuki H, et al: Extensive DNA damage induced by monochloramine in gastric cells. *Cancer Lett* **115**: 243-248, 1997.
- 3) Osaki T, et al: Interleukin-8 induction and adhesion of the coccoid form of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol* **51**(4): 295-299, 2002.
- 4) Kamiya S, Yamaguchi H: Adherence of *Helicobacter pylori* to gastric cell. In: *Helicobacter pylori* Infection and Immunity (ed by Yamamoto Y, et al), p 121-134, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2002.
- 5) Gerhard M, et al: Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 12778-12783, 1999.
- 6) Mahdavi J, et al: *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* **297**: 573-578, 2002.
- 7) Yahiro K, et al: Activation of *H. pylori* vacA toxin by alkaline or acid conditions increase its binding to a 250-KD, receptor protein-tyrosine phosphatase β . *J Biol Chem* **274**: 36693-36699, 1999.
- 8) Fujikawa A, et al: Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z are resistant to gastric ulcer induction by VacA of *Helicobacter pylori*. *Nat Genet* **33**: 375-381, 2003.
- 9) Atherton JC, Blaser MJ: Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *J Clin Invest* **119**: 2475-2487, 2009.
- 10) Blaser MJ, Atherton JC: *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest* **113**: 321-333, 2004.
- 11) Wen S, Moss SF: *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Lett* **282**: 1-8, 2009.
- 12) Covacci A, et al: *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* **284**: 1328-1333, 1999.
- 13) Stein M, et al: Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 1263-1268, 2000.
- 14) Asahi M, et al: *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J Exp Med* **191**: 593-602, 2000.
- 15) Jimenez-Soto LF, et al: *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus exploits beta integrin in a novel RGD-independent manner. *PLoS Pathog* **5**: e1000684, 2009.
- 16) Basso D, et al: Clinical relevance of *Helicobacter pylori* cagA and vacA gene polymorphisms. *Gastroenterology* **135**: 91-99, 2008.
- 17) Schneider N, et al: Role of *Helicobacter pylori* CagA molecular variations in induction of host phenotypes with carcinogenic potential. *J Infect Dis* **199**: 1218-1221, 2009.
- 18) Hatakeyama M: Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nat Rev Cancer* **4**: 688-694, 2004.
- 19) Argent RH, et al: Differences in *Helicobacter pylori* CagA tyrosine phosphorylation motif patterns between western and East Asian strains, and influence on interleukin-8 secretion. *J Med Microbiol* **57**: 1062-1067, 2008.
- 20) Noto JM, Peek Jr RM: The *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Methods Mol Biol* **921**: 41-50, 2012.
- 21) Backert S, et al: Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol* **2**: 155-164, 2000.
- 22) Selbach M, et al: Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **277**: 6775-6778, 2002.
- 23) Higashi H, et al: SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* **295**: 683-686, 2002.
- 24) Higashi H, et al: *Helicobacter pylori* CagA induces Ras-independent morphogenetic response through Shp-2 recruitment and activation. *J Biol Chem* **279**: 17205-17216, 2004.
- 25) Higashi T, et al: Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 14428-14433, 2002.
- 26) Selbach M, et al: The *Helicobacter pylori* CagA protein induces tryrosine dephosphorylation of ezrin. *Proteomics* **4**: 2961-2968, 2004.

- 27) Tsutsumi R, et al: Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 complexed with *Helicobacter pylori* CagA. *Mol Cell Biol* **26**: 261-276, 2006.
- 28) Amieva MR, et al: Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* **300**: 1430-1434, 2003.
- 29) Suzuki M, et al: Interaction of CagA with Crk plays an important role in *Helicobacter pylori*-induced loss of gastric epithelial cell adhesion. *J Exp Med* **202**: 1235-1247, 2005.
- 30) Lu H, et al: Role of partitioning-defective 1/microtubule affinity-regulating kinases in the morphogenetic activity of *Helicobacter pylori* CagA. *J Biol Chem* **284**: 23024-23036, 2009.
- 31) Kurashima Y, et al: Deregulation of beta-catenin signal by *Helicobacter pylori* CagA requires the CagA-multimerization sequence. *Int J Cancer* **122**: 823-831, 2008.
- 32) Nesic D, et al: *Helicobacter pylori* CagA inhibits PAR1-MARK family kinases by mimicking host substrates. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 130-132, 2010.
- 33) Kaparakis M, et al: Bacterial membrane vesicles deliver peptidoglycan to NOD1 in epithelial cells. *Cell Microbiol* **12**: 372-385, 2010.
- 34) Viala J, et al: Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island. *Nat Immunol* **5**: 1166-1174, 2004.
- 35) Allison CC, et al: *Helicobacter pylori* induces MAPK phosphorylation and AP-1 activation via a NOD1-dependent mechanism. *J Immunol* **183**: 8099-8109, 2009.
- 36) Watanabe T, et al: NOD1 contributes to mouse host defense against *Helicobacter pylori* via induction of type I IFN and activation of the ISGF3 signaling pathway. *J Clin Invest* **120**: 1645-1662, 2010.
- 37) Nagy TA, et al: *Helicobacter pylori* regulates cellular migration and apoptosis by activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *J Infect Dis* **199**: 641-651, 2009.
- 38) Wang G, et al: Oxidative stress-induced peptidoglycan deacetylase in *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* **284**: 6790-6800, 2009.
- 39) Franco AT, et al: Delineation of a carcinogenic *Helicobacter pylori* proteome. *Mol Cell Proteomics* **8**: 1947-1958, 2009.
- 40) Wang G, et al: Peptidoglycan deacetylation in *Helicobacter pylori* contributes to bacterial survival by mitigating host immune responses. *Infect Immun* **78**: 4660-4666, 2010.
- 41) Lu H, et al: Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **128**: 833-848, 2005.
- 42) Mooney C, et al: Neutrophil activation by *Helicobacter pylori*. *Gut* **32**: 853-857, 1991.
- 43) Wilson KT, et al: *Helicobacter pylori* stimulates inducible nitric oxide synthase expression and activity in a murine macrophage cell line. *Gastroenterology* **111**: 1524-1533, 1996.
- 44) Matsumoto Y, et al: *Helicobacter pylori* infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nat Med* **13**: 470-476, 2007.

日本人小児の最近の ピロリ菌感染率と感染経路について

今野武津子¹、横田伸一²、高橋美智子¹、藤原伸一¹、大崎敬子³、神谷 茂³

索引用語 感染ルート、母子感染、夫婦間感染、RAPD fingerprinting、MLST

はじめに

Helicobacter pylori (*H. pylori*) の感染は主として胃酸分泌機構が確立されていない乳幼児期に成立し、除菌されない限り一生感染が持続する。上下水道が完備された先進国では、便で汚染された水などによる環境からの感染よりもヒトからヒトへの感染が主となる。その感染ルートは口—口、胃液—口、糞便—口とされている。

我々は小児の感染率と感染経路についてこれまで研究を行ってきた。その手法は家族の菌株を用いて random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting により遺伝子型を比較することで、家族の菌株の異同を検討し、家族内感染を証明するものである。今回これまでに得られた感染経路に関する成績をまとめて述べる。また、最近の北海道の小児の感染率についても最新の本学会学術集会での各施設からの成績とあわせて報告する。

1. 最近のわが国の小児の感染率

2011年から2012年にかけて北海道の農村のK町の小児の感染率を便中抗原 (*HpSA*) にて検査した。K町は札幌から70km離れた人口2,500人の農村で18歳以下の小児は約300人、親は農作業に従事しているため、子供の75%は保育園に通園している。K町の小児の感染率は4.3% (4/94) であった (図1)。また、保育士の感染率は20% (2/10) であり、2名の *H. pylori* 陽性の保育士は15年以上の勤務歴があった。別項で感染ルートの検索結果について述べる。

最近の本学会学術集会での各施設からの報告を表

1に示す。我が国の小児の感染率は地域差がほとんどなく、多くは2~6%であると報告された。2001年に多施設研究で行われた尿中抗体保有率は全体で9.2%と報告されたが¹⁾、この10数年間で顕著に低下しているのがわかる。これは親の世代の感染率が生活環境の改善と *H. pylori* の除菌により低下しているためであると考えられる。

2. 感染経路

1) 母子感染に関する prospective study

2005年に我々は *H. pylori* 陽性の母から出生した児を5年間便中抗原 (*HpSA*) で半年ごとにフォローし、母から児への *H. pylori* 感染について検討した²⁾。それまでの家族内感染に関する報告は、疫学的に *H. pylori* 抗体検査や尿素呼気試験などで、父母の陽性率から母子感染の優位性を示した報告³⁾ がほとんどで、菌株のDNA型別を検討して感染を直接証明した報告^{4~7)} は散見されるも、検討した菌株数が少なく prospective study は皆無であった。

我々は350例の妊婦中69例 (19.7%) に *H. pylori* IgG抗体陽性を確認し、そのうち出生後の児の検査に関する informed consent が得られた51例の児のうち、5歳までフォローできた44例について6か月ごとに便を郵送してもらい、便中抗原検査 (*HpSA*) で *H. pylori* の感染の有無を検討した。そのうち5例 (11%) に感染が確認された。その時点で母と児の胃液を採取し、菌株の分離培養を行い RAPD fingerprinting の手法を用いそのパターンにより菌株の異同を検討した。我々の RAPD 法を要約すると、平板プレートで純化されたコロニーからDNAを回収し、4種の primer [A04 (5'-ATCAGCGCACCA-3')、A07 (5'-TGCCTCGCACCA-3')、A08 (5'-GCCCCGTTAGCA-3') および A11 (5'-GATGGATTTGGG-3')] を用いて

¹ 札幌厚生病院小児科

² 札幌医科大学微生物学講座

³ 杏林大学医学部感染症学