

Quantitative Study of Helicobacter pylori in Gastric Mucus by Competitive Polymerase Chain Reaction Using Synthetic DNA Fragments

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 古田, 隆久 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1051

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 198号	学位授与年月日	平成 8年 3月26日
氏名	古田隆久		
論文題目	Quantitative Study of <i>Helicobacter pylori</i> in Gastric Mucus by Competitive Polymerase Chain Reaction Using Synthetic DNA Fragments (合成 DNA を用いた競合的 PCR 法による胃粘液中ヘリコバクター・ピロリの定量的検討)		

博士(医学) 古田 隆久

論文題目

Quantitative Study of *Helicobacter pylori* in Gastric Mucus by Competitive Polymerase Chain Reaction Using Synthetic DNA Fragments

(合成 DNA を用いた競合的 PCR 法による胃粘液中ヘリコバクター・ピロリの定量的検討)

論文の内容の要旨

【緒言】近年、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*: *H. pylori*) と上部消化管疾患との関連が明らかにされ、*H. pylori* の除菌の意義が高まっているが、治療に先立ちその正確な診断方法の確立が必要である。しかし、従来の診断方法では *H. pylori* を安定的に定量的に検出することは不可能であった。本研究は競合的 PCR (competitive PCR: cPCR) 法によって *H. pylori* を定量的に検出する方法を確立する事を目的とし、さらに得られた結果を従来の他の検査方法と比較し、本方法の有用性を検討した。

【対象・方法】内視鏡検査を受けた患者190例(胃潰瘍106例、十二指腸潰瘍79例、慢性胃炎5例)を対象とした。内視鏡検査時に胃粘膜組織を生検で、また、胃液を吸引採取した。生検組織より *H. pylori* の培養 (DENT 培地) 及び、ウレアーゼテストを行い、病理組織学的にも *H. pylori* を検索した。さらに、190例の内46例に対し、 ^{13}C 尿素呼気試験を行った。胃液は遠心分離後、上清より比色法にてアンモニア濃度を、ジアセチルモノオキシム法にて尿素濃度を測定し、さらに尿素とアンモニアのモル濃度比を求めた。また、沈殿の $100\mu\text{l}$ より DNA を抽出し、 $\text{TE}400\mu\text{l}$ に溶解した。Clayton 等の考察した *H. pylori* の DNA に対するプライマーである HPU18、HPU54 を用いて PCR を施行すると 132 bp のバンド (HpDNA) が増幅されるが、その同じプライマーで増幅され塩基長が異なる 66 bp の DNA を合成し (sDNA)、HpDNA 量の基準とした。また、PCR 反応の特異性を高めるためにプライマーの HPU18、HPU54 を 16 bp より 21 bp へと長くした。抽出した DNA の一定量に種々の濃度の sDNA を加え、cPCR 反応を施行した。PCR 産物を電気泳動し、バンドの濃度を測定し、132 bp (HpDNA) と 66 bp (sDNA) のバンドの濃度比を加えた sDNA の量をグラフにプロットし、濃度比が 1 となる場所の sDNA の量を求め、粘液 $100\mu\text{l}$ あたりの *H. pylori* の菌数を算出した。HpDNA と sDNA のバンドのいずれもが増幅されなかった場合は、反応チューブに加える *H. pylori* の DNA 抽出液の用量を減じて上述の cPCR を再び施行した。

得られた結果を培養法、ウレアーゼテスト、病理組織、及び ^{13}C 尿素呼気試験の結果と比較検討した。

【結果及び考察】cPCR 法を用いて胃粘液中に含まれる *H. pylori* を定量する事を可能とした。この方法を用いたところ、従来の PCR 法での検出においては偽陰性となりえた 5 症例においても *H. pylori* を定量的に検出することが可能となった。そして、この方法を用いて 190 例の患者の胃粘液中の *H. pylori* 数を検討したところ、胃液中尿素とアンモニアのモル濃度比 (U/A) と胃粘液中 *H. pylori* 数との間に有意な逆相関を認めた。RUT の陽性率、培養の陽性率、及び病理組織検査の陽性率は胃粘液中 *H. pylori* 数の増加とともに有意に増加した。さらに、胃粘液中 *H. pylori* 数と ^{13}C 尿素呼気試験の結果に有意な相関関係を認めた。

このように、cPCR 法による *H. pylori* の定量は従来の培養や RUT の結果などとよく相関し、*H. pylori* を安定的に定量する有用な方法であると思われる。cPCR 法においては competitor の DNA を同時に増幅するため、PCR 反応不良による偽陰性や、定量するために contamination 等によるごく

少数の菌の混入による偽陽性を排除する事が可能と考えられる。今回は胃液を検体としたことでサンプリングエラーによる偽陰性を減少できると考えられる。以上より、本方法は従来の検査方法、及び通常のPCR法による検出方法に比して、感度、特異性で優れた検査方法であると考えられる。

【結論】cPCR法を用いて胃粘液中 *H. pylori* を定量的に検出する方法を確立し、従来の他の検査方法と比較検討したところ、本方法は *H. pylori* の胃内感染を定量的に評価する方法として有用であった。

論文審査の結果の要旨

近年、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) の上部消化管感染は、各種疾患、特に胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、胃癌などを引き起こす原因として注目されている。

申請者は、*H. pylori* を患部の材料より安定して定量的に測定する方法を開発することを目的として競合的PCR (competitive PCR: cPCR) 法を導入した。そして、従来の数種の検査方法と比較し、cPCR法の有用性を浮き彫りにした。

申請者の論文内容、論文発表に対し審査会では次の諸点が新しい内容として評価された。

- 1) 胃粘液中に *H. pylori* を浮遊させてcPCRを行い、菌数をcPCR (pg) で表し、cPCR (pg) 値と菌数がほぼ直線関係にあることを確立した。
- 2) 患者の胃液中の *H. pylori* の存在、菌数をこの方法で測定し、従来のPCR法で偽陰性であった5症例についても定量的に検出可能にした。
- 3) 190例の患者(胃潰瘍106例、十二指腸潰瘍79例、慢性胃炎5例)の胃粘液中 *H. pylori* 数と胃液中尿素とアンモニアのモル濃度比(U/A)が有意な逆相関をすることを見いだした。
- 4) ラピッドウレアーゼテスト(RUT)、培養、及び病理組織検査等の陽性率は胃粘液中の *H. pylori* 数の増加に伴って有意に増加し、また¹³C尿素呼気試験の結果とも有意な相関関係を示した。

論文審査の過程で申請者に対し、次のような質疑がなされた。

- 1) *H. pylori* の感染経路について
- 2) 感染と年齢、更に *H. pylori* 陽性患者との関係について
- 3) 胃潰瘍発症と *H. pylori* の関係について
- 4) 胃癌の患者に *H. pylori* 陽性者が多いのはどうしてか
- 5) 粘膜に定着している *H. pylori* は常に胃粘液中に遊出してきているのか
- 6) 胃粘液を検索して *H. pylori* 感染の定量化が可能なのか
- 7) PCR と cPCR の *H. pylori* 検出率の感度の比較は胃液中でしてあるのか
- 8) 胃潰瘍等の治療薬と *H. pylori* 数との関係について
- 9) *H. pylori* を取り除くための対策はどのようになされているか
- 10) *H. pylori* には耐性菌はないのか、抗生物質と疾患治療薬との関連について
- 11) 完全に除菌された後の再感染の調査について

これらの質疑に対し申請者の解答はおおむね適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査委員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 吉田 孝人

副査 教授 金子 榮藏 副査 教授 橋本 久邦

副査 助教授 梅村 和夫 副査 助教授 木村 泰三