

飲料用井戸水中の *Helicobacter pylori* 存在に関する疫学的検討

¹⁾大分医科大学医学部医学科, ²⁾大分医科大学附属病院総合診療部, ³⁾大分県厚生連鶴見病院,

⁴⁾大分医科大学医学部感染分子病態制御講座

今西 康次¹⁾ 緒方 健志¹⁾ 松塚 敦子¹⁾ 田崎 貴子¹⁾
藤岡 利生²⁾ 明石 光伸³⁾ 牧野 芳大⁴⁾ 西園 晃^{4)*}

(平成 14 年 1 月 21 日受付)

(平成 14 年 9 月 26 日受理)

Key words : *Helicobacter pylori*, water-borne infection

要 旨

慢性活動性胃炎, 消化性潰瘍の原因のみならず, その長期にわたる感染が胃 MALT リンパ腫や胃癌の発生にも関係すると考えられている *Helicobacter pylori* の感染経路については口 口, 糞 口感染, 特に飲料水がその主なものと考えられているが不明な点も多い. 今回, 大分県内で飲用に供されている井戸水中の *H. pylori* 混入の可能性を探るために, 同県内 39 箇所 43 検体の井戸水(開放式, 閉鎖式, 湧き水式)について, *H. pylori* 特異的 PCR 法と培養による検討を行った. その結果, *ureA* 遺伝子領域で 4 カ所, 16SrRNA 領域で 1 カ所, *H. pylori* 遺伝子が検出されたが, 培養ではいずれも陰性であった. これより *H. pylori* の飲料水, 特に井戸水を介した感染の可能性が改めて示唆された.

[感染症誌 77 : 18 ~ 23, 2003]

序 文

Helicobacter pylori の日本における感染率は 40 歳以上の成人で 75% にも達し¹⁾, その持続感染は慢性活動性胃炎をはじめ, 消化性潰瘍, 胃 MALT リンパ腫, 胃癌などとの関連が明らかになっている. 感染経路については水平感染, なかでも家族内感染や水系感染を示唆する報告がある. Perez²⁾ らは *H. pylori* の感染率が A 型肝炎の年齢別抗体陽性率と並行していることから A 型肝炎と同様の糞 - 口感染を疑い, また Klein³⁾ らはペルー国リマ市における小児の *H. pylori* 感染率が高いのは公営水道が重要な感染源であろうと指摘し, 水系感染の存在を示唆している. Thomas⁴⁾ らは西アフ

リカのガンビアの幼児の糞便から *H. pylori* の培養にも成功し, 糞便中に *H. pylori* が排泄されることを示唆した. わが国では佐々木⁵⁾ らや堀内⁶⁾ らが, PCR 法を用いて井戸水から *H. pylori* の遺伝子断片を検出している.

今回我々は, *H. pylori* の感染様式の一つとして, 特に井戸水を感染源とした糞 口感染を推定し, 井戸水中における *H. pylori* の存在の有無を改めて明らかにし, さらに井戸の種類と井戸の深さがその存在に影響するかどうかについても検討した.

対象と方法

1. 対象とその選択

平成 13 年大分県厚生連健康管理センターの健診受診者にアンケート用紙を配布し, 井戸水使用の有無, 飲水歴, 胃・十二指腸病変の既往歴等についての調査を行った. 書面により同意と協力を

別刷請求先 : (〒879 5503) 大分県大分郡挾間町医大ヶ丘 1 1

大分医科大学医学部感染分子病態制御講座
西園 晃

得られた受診者の血清を用い、血中抗 *H. pylori* 抗体を測定し、抗体陽性であった受診者宅より井戸水を採取した。採取した井戸水は使用している井戸の様式により、開放式井戸水 (open type)、閉鎖式井戸水 (ボーリング式井戸水, closed type)、湧き水式井戸水 (spring water) であった。採取方法は、開放式井戸水は蛇口もしくは直接井戸から、閉鎖式井戸水は蛇口もしくはタンクから、湧き水式井戸水は直接採取した。井戸の深さについても聞き取り調査を行った。調査 39 箇所から 43 検体を採取した。検体間の汚染や実験者からの汚染がないように、ディスポーザブルグローブを用い、検体濃縮処理、PCR、電気泳動、培養はそれぞれ専用の実験室で実施した。実験者自身は *H. pylori* に感染していないことを尿素呼吸試験にて確認している。

2. *H. pylori* 特異的ゲノムの検出とその確認

井戸水の濾過・濃縮、菌体 DNA の抽出

H. pylori 遺伝子の検出は、佐々木らの方法⁵⁾に従った。採取した井戸水 5 l を、0.45 μm 径の Cellulose Acetate フィルター (Corning) で濾過した。濾過したフィルターを HBSS (Hanks Balanced Salt Solution, GIBCO-BRL) に浸潤後振盪し濾過物を溶解させ、31,200g で 10 分遠心して沈殿物を得た。次に、あらかじめヒツジ抗ウサギ IgG 抗体でコートされたイムノビーズ Dynabeads M-280 (日本 Dynal) にウサギ抗 *H. pylori* ポリクロナル抗体 (DAKO) を結合させた磁気ビーズを作製し、沈殿物を HBSS 1ml に溶解した液とビーズ 1×10^7 個 (25 μl) の割合で混合し、37 °C で 20 分 incubate した。ビーズを磁石で回収し HBSS で 3 回洗浄後、100mg/ml の lysozyme と、1% SDS を加え、37 °C で 1 時間転倒混和後、96 °C で 5 分間 incubate した。5 分間超音波破碎した後、フェノール、クロロホルム抽出後、エタノール沈殿を行いサンブル DNA を得、PCR 反応の鋳型とした。

H. pylori 特異的 PCR

PCR 反応は *H. pylori* 特異的 16SrRNA コード領域 DNA (以下 16SrRNA)、*ureA*、*ureB* に対するプライマーを用いて行った。プライマーの配列は以下のとおりである。

16SrRNA (1st sense N1 : 5'-GGAGGATGAA-GGTTTTAGGA, antisense N4 : 5'-TCTCAGC-ATAACCTGTTAGC, 2nd sense N1, antisense N3 : 5'-AGACTAAGCCCTCCAACAAC)

ureA (1st sense 2F2 : 5'-ATATTATGG-AAGAAGCGAGAGC, antisense 2R : 5'-ATGGA-AGTGTGAGCCGATTTG, 2nd sense 2F3 : 5'-CATGAAGTGGGTATTGAAGC, antisense 2R3 : 5'-AAGTGTGAGCCGATTTGAACCG)

ureB (sense HPU-2(F) : 5'-GGTCCTACTA-CAGGCGATAA, antisense HPU-1(R) : 5'-AGCAATAGCAGCCATAGTGT)

予想される増幅産物の長さは各々、16SrRNA 419bp、*ureA* 200bp、*ureB* 500bp である。PCR 反応は 50 μl の反応系で行い、Taq ポリメラーゼ (TAKARA Shuzo) を用い、反応時間は 1st PCR では 94 °C 2 分間の denature 後、94 °C 1 分間 (denature)、55 °C 2 分間 (annealing)、72 °C 2 分間 (extension) を 35 サイクル繰り返した。なお annealing 温度は *ureA* の場合のみ 54 °C とした。得られた 1st PCR 産物 2 μl を用い同様の反応系で 2nd PCR を行った。条件は 1st PCR に準じるが、annealing 温度は *ureA* で 58 °C 2 分間、*ureB* で 60 °C 2 分間、16SrRNA で 55 °C 2 分間とした。

増幅された PCR 産物 10 μl を 3% SeaKem GTG アガロースゲル (FMC) で電気泳動し、増幅産物を Ethidium bromide 染色後確認した。期待される長さの産物が確認できた場合、PCR 産物を SUPREC01 (TAKARA) にて精製後、ABI BigDye Termination kit (PE Applied Biosystems) によるジデオキシ法にて ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems) を用い遺伝子配列を決定した。

H. pylori の培養

遺伝子配列の決定により *H. pylori* の存在が確認された場合には、再び採水し同日のうちに上記と同様の濾過濃縮過程を行い、*H. pylori* 選択培地 (M-BHM ピロリ寒天培地、日研生物医学研究所) と 7% ウマ血液寒天培地 (Mueller Hinton II Agar, BBL Becton Dickinson and Company) を用いて、10% CO₂、5% O₂、85% N₂ の微好気 37 °C の

Table 1 Positive rate of *H. pylori* specific amplified product in the well water

PCR primer for the amplification of <i>H. pylori</i> genome	positive rate (%)
16SrRNA	1/43 (2.3%)
ureA	4/43 (9.3%)
ureB	0/43 (0.0%)

条件下で4日間の培養を行った。培養にあたっては5lの井戸水より得られた濾過濃縮産物を生理食塩水30mlに浮遊させた後、1,500gで20分間遠心し、沈殿物を再び1mlの生食に浮遊させた。その後、原液、10倍、100倍、1,000倍の段階希釈物を30 μ lずつ培地上に塗布した。

結 果

開放式井戸水20検体、閉鎖式井戸水19検体、湧き水式井戸水4検体の計43検体について検討した。PCRの結果、16SrRNAのプライマーを用いることで1検体(2.3%)に、ureAのプライマーを用いることで4検体(9.3%)に増幅産物が確認された(Table 1)。ureBのプライマーを用いたPCRでは、いずれの検体でも増幅産物は確認されなかった。

予想される長さの増幅産物が確認できた5検体について塩基配列の決定を行った。4検体(No. 25, 39, 45, 47)で、*H. pylori* ureA 遺伝子(26695 strain, map position: section 7, 2322-2123, ACCESION AE000529 AE000511)配列と99%のhomologyを示し、*H. pylori* ureA 遺伝子(J99 strain, map position: section 7, 2338-2139, ACCESION AE001446 AE001439)配列と97%のhomologyを示した(Fig. 1A)。また、1検体(No. 27)で*H. pylori* 16SrRNA 遺伝子(26695 strain, map position: section 122, 5826-6214, ACCESION AE000644 AE000511)配列と99%のhomologyを示し、*H. pylori* 16SrRNA 遺伝子(J99 strain, map position: section 117, 5285-5673, ACCESION AE001556 AE001439)配列と99%のhomologyを示した(Fig. 1B)。聞き取り調査によって得られた各々の井戸の種類・深さと*H. pylori* 遺伝子検出の相関を検討した(Table 2)。その内訳は開放式

井戸水20検体中2検体(10%)、閉鎖式井戸水19検体中2検体(10.5%)、湧き水式井戸水4検体中1検体(25%)であった。これら5検体の培養検査を行ったが*H. pylori*の培養には成功しなかった。

*H. pylori*の遺伝子が検出された5個所の検体に関して、井戸水使用者の*H. pylori*関連胃疾患既往があったのは1検体のみであった。

考 察

*H. pylori*は慢性活動性胃炎をはじめ、萎縮性胃炎、消化性潰瘍、胃MALTリンパ腫、胃癌などとの関連が疑われている。*H. pylori*感染は世界中に広がっており、その頻度は地域や社会生活環境により異なることが知られているが、その病態、感染経路、疾患の発生機序などはいまだ不明である。糞便、唾液、歯垢から*H. pylori*に特異的なDNAが検出されており、様々な感染経路の中でも、現在は糞口感染、口口感染が最も有力と考えられている。

近年、PCR法により*H. pylori*遺伝子が種々の検体から検出可能となり、*H. pylori*の自然環境中での存在も報告されはじめた。1996年にHultenら⁸⁾はペルーでの蛇口及び貯水槽での水から*H. pylori*遺伝子検出を16SrRNAの遺伝子断片を増幅することで行っている。佐々木ら⁵⁾は井戸水を含む環境中の各サンプルからureA遺伝子をnested PCRにより検出した。堀内ら⁶⁾は東京近郊の2つの井戸水から、*H. pylori*の16SrRNA遺伝子を検出したがureAは検出できなかったと報告している。われわれは今回、16SrRNAについては*H. pylori*に対する特異性が高く、また遺伝的変異の影響が少ない配列を新たに採用し、ureAに対するプライマーと併せて井戸水中の*H. pylori*ゲノムの存在を検討した。この方法により39箇所43検体中5箇所5検体から*H. pylori*の16SrRNA遺伝子もしくはureA遺伝子のいずれかを検出した。これまでの報告を含めureAと16SrRNAの両方では*H. pylori*の遺伝子断片は検出されておらず、いずれかのみで陽性の報告しかなく、我々の結果もいずれか一方のみでの検出となった。一方でしか検出できていない理由を今後検討する必要がある。

Thomas⁴⁾らは西アフリカのガンビア在住の子

Fig. 1 A : Alignments of *ureA* nucleotide sequence of *H. pylori* obtained from well samples. #25, 39, 45, 47 were positive for *ureA* PCR and determined for the nucleotide sequence. 26695 and J99 were the corresponding sequences of the referred strain from GeneBank (26695 strain : ACCESSION AE000529 AE000511, J99 strain : ACCESSION AE001446 AE001439)

B : Alignments of 16SrRNA nucleotide sequence of *H. pylori* obtained from well samples. #27 was positive for 16SrRNA PCR and determined for the nucleotide sequence. 26695 and J99 were the corresponding sequences of the referred strain from GeneBank (26695 strain : ACCESSION AE000644 AE000511, J99 strain : ACCESSION AE001556 AE001439)

26695	2322	CATGAAGTGGGTATTGAAGCGATGTTTCCTGATGGGACAAAACCTCGTAACCGTGCATACCCCTATTGAGGCCAATGGTAAATTAGTTCCT	2233
J99	2338C.....T.....G.....	2249
#25	1C.....	90
#39	1C.....	90
#45	1C.....	90
#47	1C.....	90
26695	2232	GGTGAGTTGTTCTTAAAAAATGAAGACATCACTATCAACGAAAGGCAAAAAAGCCGTTAGCGTGAAAGTTAAAAATGTTGGCGACAGCCG	2143
J99	2248C..G.....	2159
#25	91T.....	180
#39	91T.....	180
#45	91T.....	180
#47	91T.....	180
26695	2142	GTTCAAATCGGCTCACACTT	2123
J99	2158T.....	2139
#25	181	200
#39	181	200
#45	181	200
#47	181	200

A

26695	5826	TTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCCTCCACGCTTTCGCGCAATCAGCGTCAGTAATGTTCCAGCAGGTCGCTT	5915
J99	5285	5374
#37	1	89
26695	5916	CGCAATGAGTATTCTCTTGTATCTCTACGGATTTTACCCTACACCAAGAATTCCACCTACCTCTCCACACTCTAGAATAGTAGTTTCA	6005
J99	5375	5464
#37	90	179
26695	6006	AATGCAGTCTATGGTTAAGCCATAGGATTTACACCTGACTGACTATCCCGCTACGCGCTCTTTACGCCAGTGATTCCGAGTAACGC	6095
J99	5465	5554
#37	180	269
26695	6096	TTGCACCTCCGATTACCAGCGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTCTTATTCGTTAGATACCGTCATTATCTCTCTAACAAAAAGGAG	6185
J99	5555	5644
#37	270	359
26695	6186	TTTACAATCCTAAAACTTCATCCTCCAC	6214
J99	5645	5673
#37	360	388

B

供の糞便から 23 検体中 9 検体で *H. pylori* の分離培養に成功している。また Kelly⁹⁾らも、イギリスにおいて *H. pylori* 陽性の成人 25 検体中 12 検体で *H. pylori* を糞便から培養することに成功している。これらの報告は、人の糞便中に *H. pylori*

の生菌が存在することを示唆するものである。すなわち上下水道の整備が不十分な地域では、下水から水源への大腸菌や *H. pylori* の混入、および汚染の可能性が考えられる。*H. pylori* 感染との関係を明らかにするためには、今回陽性になった井戸

Table 2 Correlation between the presence of *H. pylori* and well type, depth

type	depth	number of samples	number of <i>ureA</i> gene detected	number of 16SrRNA gene detected
Open type	~ 10m	12		
	10 ~ 20m	4	1	1
	unknown	4		
Closed type	~ 50m	9	1	
	50 ~ 100m	6		
	100m ~	2		
	unknown	2	1	
Spring water	1m	4	1	
Total		43	4	1

水を飲用している人から採取した *H. pylori* と井戸水から採取した *H. pylori* の遺伝子レベルでの相同性を検討することも今後必要である。

佐々木らは、胃癌の発生率の高い地域での調査で、井戸水 52 検体中 8 検体から *H. pylori* 遺伝子を検出している。我々の調査においても井戸水 43 検体中 5 検体から *H. pylori* 遺伝子が検出された。このことは、他の地域においてもほぼ同程度の割合で井戸水から検出されることを示しており、自然環境中には普遍的に *H. pylori* が存在している可能性を示唆するものである。井戸水の飲用に限らず、日常生活をとりまく様々な環境の中に感染の機会があると考えられる。

開放式井戸では水面が直接外界と接しているため汚染の危険性が高く、閉鎖式井戸の方が衛生的には優れている¹⁰⁾とされる。したがって、開放式井戸である一般的な井戸と、閉鎖式井戸であるボーリング井戸では、前者のほうが汚染の危険性は高く、*H. pylori* の検出率も高いだろうと当初予想された。しかし Table 2 に示すように、開放式井戸水では 20 検体中 2 検体、閉鎖式井戸水では 19 検体中 2 検体から検出され、予想とは異なる結果となった。単に開放式か閉鎖式かという区別だけでは外界からの微生物混入の有無は判断できないことを示していると思われる。開放式井戸では深さと汚染は関連が低く、閉鎖式井戸でも浅ければ汚染の危険があると考えられる。

結論として、*H. pylori* は飲料水として使用され

ている井戸水中に存在しており、これらの飲用が感染経路となりうる可能性が十分考えられる。飲料用井戸水の *H. pylori* 感染源としてのさらなる検討が必要であると考えられる。

文 献

- 1) Asaka M, Kimura T, Kudo M, Takeda H, Mitani S, Miyazaki T, et al. : Relationship of *Helicobacter pylori* to serum pepsinogens in an asymptomatic Japanese population. *Gastroenterology* 1992 ; 102 : 760 6.
- 2) Perez-Perez GI, Taylor DN, Bodhidatta L, Wongsrichanalai J, Baze WB, Dunn BE, et al. : Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infections in Thailand. *J Infect Dis* 1990 ; 161 : 1237 41.
- 3) Klein PD, Graham DY, Gaillour A, Opekun AR, Smith EO : Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. *Gastrointestinal physiology working group. Lancet* 1991 ; 337 : 1503 6.
- 4) Thomas JE, Gibson GR, Darboe MK, Dale A, Weaver LT : Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. *Lancet* 1992 ; 340 : 1194 5.
- 5) Sasaki K, Tajiri Y, Sata M, Fujii Y, Matsubara F, Zhao M, et al. : *Helicobacter pylori* in the Natural Environment. *Scand J Infect Dis* 1999 ; 31 : 275 9.
- 6) Horiuchi T, Ohkusa T, Watanabe M, Kobayashi D, Miwa H, Eishi Y : *Helicobacter pylori* DNA in Drinking Water in Japan. *Microbiol. Immunol.* 2001 ; 45 (7) : 515 9.
- 7) Labignet AF, Cussac V, Courcoux P : Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. *J. Bacteriol.* 1991 ; 173 : 1920 31.

8) Hulten K, Han SW, Enroth H, Klein PD, Opekun AR, Gilman RH, *et al.* : *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. *Gastroenterology* 1996 ; 110 : 1031 - 5.

9) Kelly SM, Pitcher MCL, Farmery SM, Gibson

GR : Isolation of *Helicobacter pylori* from feces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. *Gastroenterology* 1994 ; 107 : 1671 - 4.

10) 齋藤和雄, 上田直利 : 井戸 新しい環境衛生 改訂第5版 . 南江堂, 東京, 1994 ; p. 138.

Possibility for the Presence of *Helicobacter pylori* in Drinking Well Water

Yasutsugu IMANISHI¹⁾, Takeshi OGATA¹⁾, Atsuko MATSUZUKA¹⁾,
Takako TAsAKI¹⁾, Toshio FUJIOKA²⁾, Mitsunobu AKASHI³⁾,
Yoshihiro MAKINO⁴⁾ & Akira NISHIZONO⁴⁾

¹⁾School of Medicine ²⁾Oita Medical University, Department of General Medicine Center ³⁾Oita Medical University hospital. Oita ken Kouseiren Tsurumi hospital

⁴⁾Department of Infectious Diseases Control Oita Medical University, Oita, Japan

Forty three well waters which are currently used as drinking water were studied for the presence of *Helicobacter pylori*. Using magnetic-beads purification and PCR amplification of *H. pylori*-specific gene, 4 of the 43 samples were positive for *H. pylori-ureA* gene (9.3%) and 1 of the 43 samples was positive for *H. pylori-16SrRNA* gene (2.3%) The presence of *H. pylori*-specific amplified product did not correlate with the type, depth and location of the wells. This study demonstrated that *H. pylori* can be transmitted via drinking water, especially well water in Japan.