

Helicobacter pylori による
胃粘膜細胞傷害性に関する基礎的検討

学位論文内容の要旨

I 研究目的

Helicobacter pylori (以下*H.pylori*)は、ヒト胃粘膜から分離培養されたグラム陰性桿菌であり、胃粘膜病変との関連が注目を集めている。しかし、その病原性については尚不明な点が多い。本研究では*H.pylori*の胃粘膜細胞に及ぼす影響を家兎より分離した遊離胃粘膜細胞を用いて *in vitro* の系で基礎的に検討した。

II 材料と方法

1. *H.pylori*の培養

胃粘膜病変を有する患者から分離培養した*H.pylori*の中からウレアーゼ活性の高いものを尿素培地10倍希釈法で選択した。菌体を微好気条件下(O₂5%, CO₂15%, N₂80%)、馬脱纖血5-7%を添加し、ブルセラ寒天を基礎培地とした血液寒天培地で96-120時間培養後、微好気条件下、馬血清を7-10%を添加したブルセラブロスで液体振盪培養を96rpm、48-72時間行った。

2. *H.pylori*抽出液の作成

菌体を界面活性剤n-octyl-glucosid 1%を加えたNa phosphate buffer中で溶菌し、遠沈した上清を透析後、*H.pylori*抽出液とした。

3. ウサギ遊離胃粘膜細胞の作成

日本白ウサギ(雄性1.5-2.0kg)の耳介外側の静脈にpentobarbitalを投与後胃を摘出し胃粘膜を剥離細切した。これをデイスパーゼ0.05%、コラゲナーゼ0.03%、Bovine serum albumin0.2%を添加したMedium199中で37℃、20分間インキュベート後、ピペッティングを行い再度20分間インキュベートし、遊離胃粘膜細胞を作成した。

4. 顆粒球の調整

ヒト前腕静脈からヘパリン加採血した血液試料を3.5%デキストランで沈降させ、上層を溶血後、Ficoll Hypaqueに重層した。遠沈して得た沈殿を洗浄しPhosphate buffer solution (PBS、pH7.4)で顆粒球浮遊液とした。

5. 細胞傷害実験

遊離胃粘膜細胞浮遊液に*H.pylori*抽出液、尿素及び*H.pylori*抽出液と50mM尿素を同時に添加し、37°C、30分間インキュベート後、細胞外液のLDH流出量、pH及びアンモニア濃度を測定した。

III 結果

1. *H.pylori*抽出液単独(終濃度0.54mg/ml)、尿素単独(終濃度50mM)ではコントロールに比較して有意な細胞傷害を認めなかったが*H.pylori*抽出液と尿素の両者を胃粘膜細胞浮遊液に添加した場合には著明な細胞傷害性を認め同時に、アンモニアの産生が認められた。細胞外液のpHは*H.pylori*抽出液と50mM尿素の両者を添加した場合にのみ、経時的な上昇を示した。

2. 尿素(50mM)の存在下で*H.pylori*抽出液の濃度を変化させて添加した場合、10倍希釈(終濃度0.054mg/ml)では100倍希釈(終濃度0.0054mg/ml)に比較して有意に強い細胞傷害性を示した。100倍希釈では10倍希釈に比較して細胞外液のアンモニア濃度は低値であった。

3. 外因性のアンモニア添加による細胞傷害性と*H.pylori*抽出液と50mM尿素を同時に添加した時の細胞傷害性はほぼ一致し、産生されたアンモニア濃度は細胞傷害を惹起した外因性のアンモニア濃度にほぼ等しかった。

4. *H.pylori*抽出液と50mM尿素の両者を添加した細胞浮遊液にウレアーゼ活性阻害剤 acetohydroxamic acid(AHA)を添加したところ、細胞傷害性、細胞外液のpH及びアンモニア濃度は濃度依存的に抑制された。

5. *H.pylori*抽出液単独、尿素単独、*H.pylori*抽出液と尿素とを同時に添加した細胞浮遊液にヒト由来の顆粒球を 1×10^6 cells /mlの割合で添加し、37°C、30分間インキュベートしたが、細胞外液のアンモニア濃度、及びpH及び胃粘膜細胞傷害性は顆粒球を添加しない場合に比較して差は認められなかった。

IV 考察

*H.pylori*の細胞傷害機序を詳細に検討した報告はきわめて少ない。今回の結果より*H.pylori*抽出液自体あるいは尿素自体の胃粘膜細胞への影響は30分間の反応時間ではほ

とどなみられないことが明らかになった。従って、*in vitro* の培養系では *H. pylori* の細胞傷害は尿素の存在下での *H. pylori* の抽出液の関与が大きいと考えられる。このように *H. pylori* と尿素とを同時に添加し、インキュベートした細胞外液には細胞傷害を起こすことが可能な濃度のアンモニアの産生がみられることより、この系で引き起こされる細胞傷害は産生されたアンモニアに基づくことが示唆された。*in vitro* で傷害性を発揮するアンモニア濃度は *in vivo* で胃粘膜を傷害性することが明らかになっているアンモニア濃度とほぼ一致した。*H. pylori* と尿素とを同時に添加した細胞浮遊液にウレアーゼ活性阻害剤 acetohydroxamic acid を加えると細胞外液のアンモニア濃度の低下、pH の下降がみられるとともに、胃粘膜細胞傷害が抑制されたことより *H. pylori* と尿素との併用添加によるアンモニアの産生には *H. pylori* の有するウレアーゼの関与が強く示唆された。*H. pylori* によって誘導される炎症細胞浸潤と胃粘膜病変の関わりが最近注目されている。そこで、今回の系で顆粒球をそれぞれ *H. pylori* の抽出液、尿素及び *H. pylori* と尿素の同時に添加群に加えたが、細胞外液のアンモニア濃度 pH 及び胃粘膜細胞傷害のいずれにも影響を与えなかった。アンモニアによる胃粘膜細胞傷害の機序は、ミトコンドリア内外の pH を上昇させ細胞の呼吸及びエネルギー機構を阻害すること、ATP 合成阻害と ATP 利用の増大とによる細胞内 ATP の減少を来すことによると報告されている。アンモニアは胃内腔で膜透過性のない解離型 NH_4^+ と膜透過性のある非解離型 NH_3 として存在するが今回の結果では、非解離型のアンモニアは pH の上昇に伴ってその割合が増加した。以上より *H. pylori* の有する高いウレアーゼ活性は血中及び食物由来の尿素を分解してアンモニアを産生し、*H. pylori* 周囲の pH を上昇させ、細胞傷害を惹起する。それとともに *H. pylori* の存在する粘液に近接した胃粘膜上皮は pH の上昇による非解離型アンモニアの影響を受け、細胞傷害がさらに強く惹起されるものと考えられる。

V 結語

1. *H. pylori* 抽出液単独では胃粘膜細胞に傷害を起こさなかった。
2. *H. pylori* と尿素とを共に作用させると明らかな胃粘膜細胞傷害が生じた。
3. *H. pylori* と尿素とを同時添加することによりアンモニアの産生が認められ、その濃度は細胞傷害を惹起するのに十分なものであった。
4. ウレアーゼ酵素活性阻害剤の添加により *H. pylori* と尿素併用時のアンモニアの産生が抑制され、同時に細胞外液中の pH 上昇と胃粘膜細胞傷害とが抑制された。

以上の結果から、家兎の胃粘膜から得た遊離胃粘膜細胞を用いた *in vitro* の検討によって、*H. pylori* の有する強力なウレアーゼ活性によって産生されるアンモニアが胃粘膜細胞傷害を惹起する可能性が強く示唆された。

学位論文審査の要旨

主査 教授 宮崎 保
副査 教授 石橋 輝雄
副査 教授 小林 邦彦

学位論文題名

Helicobacter pylori による

胃粘膜細胞傷害性に関する基礎的検討

I 研究目的

Helicobacter pylori (以下*H.pylori*)は、ヒト胃粘膜から初めて分離培養されたグラム陰性桿菌で、胃粘膜病変との関連が注目を集めている。本研究では*H.pylori*が胃粘膜に及ぼす影響を家兎遊離胃粘膜細胞を用いた*in vitro*の系で基礎的に検討した。

II 材料

1. *H.pylori*の培養：胃粘膜病変を有する患者から分離培養した*H.pylori*の中からウレアーゼ活性の高いものを選択し、菌体を微好気条件下(O₂ 5%, CO₂ 15%, N₂ 80%)で血液寒天培地で培養後、ブルセラブロスで液体振盪培養を行った。
2. *H.pylori*抽出液の作成：菌体をn-octyl-glucosid 1%を加えたNa phosphate buffer中で溶菌し、遠沈した上清を透析後、*H.pylori*抽出液とした。
3. 家兎遊離胃粘膜細胞の作成：家兎の耳介外側静脈にpentobarbitalを投与後、胃を摘出し胃粘膜を剥離細切した。これをデイスパーゼ0.05%、コラゲナーゼ0.03%、BSA0.2%を添加したMedium199中で37℃、20分間インキュベートを2度行い、遊離胃粘膜細胞を作成した。
4. 顆粒球の調整：ヒト前腕静脈からヘパリン採血した血液をデキストランで沈降させ上層を溶血後Ficoll Hypaqueに重層、遠沈後の沈殿を洗浄して顆粒球浮遊液とした。

III 方法

胃粘膜細胞浮遊液に*H.pylori*抽出液、尿素、*H.pylori*抽出液と50mM尿素的の両者等を添加し37℃、30分間インキュベート後、細胞外液へのLDH逸脱量、pH、アンモニア濃度を測定した。

IV 結果

1. *H.pylori*抽出液単独(終濃度0.54mg/ml)、尿素単独(終濃度50mM)ではコントロールに

比較して細胞傷害を認めなかったが*H.pylori*抽出液と尿素とを同時に添加した場合には著明な細胞傷害とアンモニアの産生とを認めた。

2. 尿素の存在下で*H.pylori*抽出液の濃度を変化させて添加した場合、10倍希釈では100倍希釈に比して有意に強い細胞傷害性を示した。100倍希釈以下では細胞外液のアンモニア濃度も低値であった。

3. 外因性のアンモニア添加による細胞傷害性と*H.pylori*抽出液と尿素との同時添加による細胞傷害性はほぼ一致した。

4. *H.pylori*抽出液と尿素を同時に添加した細胞浮遊液にウレアーゼ活性阻害剤 acetohydroxamic acid(AHA)を添加したところ細胞傷害性、細胞外液のpH、アンモニア濃度は抑制された。

5. 顆粒球の添加はアンモニア濃度、外液のpH、細胞傷害のいずれにも影響しなかった。

V 考察

本研究では*H.pylori*の抽出液及び尿素自体の胃粘膜細胞への影響は30分間の反応時間ではほとんどみられなかった。したがって、*in vitro*の系では*H.pylori*の細胞傷害性は尿素の存在下での*H.pylori*の抽出液の関与が考えられる。*H.pylori*と尿素との同時添加での細胞外液にはアンモニアの産生を認め、この系で惹起される細胞傷害はアンモニアに基づくものと推定された。*in vitro*で傷害性を発揮するアンモニア濃度は*in vivo*で胃粘膜を傷害することが明らかになっているアンモニア濃度とほぼ一致した。*H.pylori*と尿素を同時に添加した細胞浮遊液にウレアーゼ活性阻害剤 acetohydroxamic acid を添加すると細胞外液のアンモニア濃度、細胞傷害も抑制され、*H.pylori*と尿素の併用添加によるアンモニアの産生には*H.pylori*のウレアーゼ活性の関与が示唆された。*H.pylori*抽出液と*H.pylori*の菌体そのものとは顆粒球の反応性が異なることが考えられた。

胃内に多量の*H.pylori*が存在する場合、*H.pylori*の有する高いウレアーゼ活性が血中及び食物由来の尿素を分解してアンモニアを産生し、*H.pylori*周囲のpHを上昇させ、細胞傷害を惹起するとともに*H.pylori*の存在する粘液に近接した胃粘膜上皮はpHの上昇による膜透過性のアンモニアの影響を受け、さらに傷害されるものとが考えられた。

VI 結語

1. *H.pylori*抽出液単独では胃粘膜細胞に傷害を起こさなかった。
2. *H.pylori*抽出液と尿素とを共に作用させると明らかな胃粘膜細胞傷害が生じた。
3. *H.pylori*抽出液と尿素との同時添加によりアンモニアの産生が認められ、その濃度で細胞傷害の惹起が可能なものであった。
4. ウレアーゼ活性阻害剤の添加により*H.pylori*と尿素併用時のアンモニアの産生が抑制され、細胞外液中のpHの上昇と胃粘膜細胞傷害とが抑制された。

以上より、家兎遊離胃粘膜細胞を用いた *in vitro*の検討から、*H.pylori*の有するウレアーゼ活性が産生するアンモニアが胃粘膜細胞傷害を惹起する可能性が示唆された。

よって、本研究は博士（医学）の学位論文として妥当なものとして判断される。