

学位論文題名

Helicobacter pylori 感染病態における血清抗
Helicobacter pylori カタラーゼ抗体の存在意義

学位論文内容の要旨

(背景・目的)

ヒト胃粘膜から*Helicobacter pylori* (以下*H. pylori*) が発見, 同定されて以来, 本菌の持続感染が慢性胃炎, 胃潰瘍, 十二指腸潰瘍, 胃癌および胃MALTリンパ腫など様々な胃十二指腸疾患の発症に関わる主要因であることが明らかになってきた. 近年*H. pylori* 全ゲノムが明らかにされ様々な病原関連遺伝子が同定されているが疾患の多様性を菌側因子のみから説明することは困難で菌-感染宿主の相互作用の解析が重要と考えられている. ヒト胃粘膜には微生物に対し酸, 免疫系などの生体防御系が備わっているが*H. pylori* は胃粘膜局所で持続感染, 増殖し, 様々な病態を引き起こす. 一方, *H. pylori* 側も酸に対するウレアーゼ活性, 多形核白血球の殺菌作用に対するカタラーゼ活性など宿主の防御反応に対する回避機構が備わっている. 本研究の目的は菌-感染宿主の相互作用を*H. pylori* のカタラーゼを標的とし細菌の構造解析および宿主要因としての*H. pylori* カタラーゼ抗体産生を中心に解析し, 血清中の抗*H. pylori* カタラーゼ抗体の臨床的意義を明らかにしようとした.

(材料)

1996年から1999年までに当科を受診した*H. pylori* 陽性の120症例を対象とした. 内訳は胃潰瘍54例, 十二指腸潰瘍35例, 胃十二指腸潰瘍4例, 慢性胃炎18例, 胃癌5例, 胃MALTリンパ腫4例で男性83例, 女性37例であり平均年齢はそれぞれ49.1, 47.1歳であった.

(方法)

1. 血清中の抗*H. pylori* 抗体の測定

血清中の抗*H. pylori* 抗体はHM-CAPキット(協和メディックス)を用いて測定した.

2. 血清中の抗*H. pylori* カタラーゼ抗体の測定

血清中の抗*H. pylori* カタラーゼ抗体の測定は自作の抗原を用いて行った. *H. pylori* カタラーゼ構造遺伝子を蛋白発現プラスミドベクターpkk223-3に組み込み, 大腸菌に導入, 増殖させ, リコンビナントカタラーゼ蛋白を発現させ, 分取型プレップセル モデル491を用いてリコンビナントカタラーゼ蛋白を分取精製した. 精製蛋白を96穴プレートに固相化し, 患者血清はPBSで100倍に希釈し抗体を測定した. 抗*H. pylori* 抗体陰性の健常乳児150名の血清を用いて, その吸光度の平均値+2SDを求め, カットオフ値を設定し, 陽陰性を決定した.

3. 組織学的検索

内視鏡検査時に胃前庭部, 胃体部から生検し検鏡した. 多形核白血球, 単核球の浸潤程度は改訂シドニーシステムに従って0-3の4段階で評価した.

4. Polymerase chain reaction (PCR)

カタラーゼ構造遺伝子1747bpのうち5'末端より411bpから895bpまでの領域の485bpを増幅できるプライ

マーを合成しPCR反応を行った。

5. サザンブロット法

PCR法でカタラーゼ構造遺伝子が増幅できなかった10菌株と増幅できた10菌株、陽性対照として標準菌株ATCC43504につき、サザンブロットを行った。前述のプライマーを用いて増幅したカタラーゼ遺伝子PCR産物をジゴキシゲニン標識し、サザンブロットプローブを作成した。菌株DNAをEcoRI,あるいはHind IIIで消化しハイブリダイゼーションを行った。

6. ウェスタンブロット法

酸グリシン法で各菌体より蛋白を抽出後、抗*H. pylori*カタラーゼモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットを行いカタラーゼ蛋白の有無を確認した。

(結果)

1. 血清中の抗*H. pylori*カタラーゼ抗体

対象とした120例中69例(58%)のみ抗*H. pylori*カタラーゼ抗体が陽性を示した。

2. 血清抗*H. pylori*カタラーゼ抗体と胃粘膜組織炎症細胞浸潤の関連

抗*H. pylori*カタラーゼ抗体陽性例において胃前庭部では単核球浸潤程度が強度であった。一方、抗*H. pylori*カタラーゼ抗体陰性例において胃前庭部胃体部では多形核白血球浸潤が強度であった。抗*H. pylori*カタラーゼ抗体価と胃前庭部の単核球浸潤程度は有意に正の関連が認められた。

3. カタラーゼ構造遺伝子の検討

PCR法で*H. pylori*カタラーゼ構造遺伝子が増幅できなかった10菌株と増幅できた10菌株及び標準菌株ATCC43504について*H. pylori*カタラーゼ遺伝子の有無、周辺の変異をサザンブロット法を用いて検討した。抗*H. pylori*カタラーゼ抗体の有無と*H. pylori*カタラーゼ構造遺伝子あるいは周辺遺伝子の塩基の変異には直接的な関連は認められなかった。

4. ウェスタンブロット法

120菌株中6菌株(5%)に*H. pylori*カタラーゼ蛋白欠損株が認められた。*H. pylori*カタラーゼ蛋白の欠損した症例では血清抗*H. pylori*カタラーゼ抗体はすべて陰性であった。一方、カタラーゼ蛋白が産生されているにもかかわらず抗*H. pylori*カタラーゼ抗体陰性の患者からの菌体においてもカタラーゼ構造遺伝子あるいは周辺の遺伝子に特徴的な変異は見い出せなかった。

5. 抗*H. pylori*カタラーゼ抗体陽性者と陰性者の出現頻度と菌株の関連

抗*H. pylori*カタラーゼ抗体陽性者は*H. pylori*感染者の58%を占めており、標準株に比して*H. pylori*カタラーゼ構造遺伝子あるいは周辺遺伝子の塩基に変異を認めても全例、*H. pylori*カタラーゼ蛋白は産生されていた。抗*H. pylori*カタラーゼ抗体陰性者には*H. pylori*カタラーゼ蛋白を産生する群としない群が認められた。*H. pylori*カタラーゼ蛋白を産生する群は抗*H. pylori*カタラーゼ抗体陽性例と同様に*H. pylori*カタラーゼ構造遺伝子あるいは周辺遺伝子の塩基に変異を認めない菌株および変異を認める菌株が存在した。*H. pylori*カタラーゼ蛋白を産生しない菌株は対象検体の5%に認められ、これらは全例、標準株に比して*H. pylori*カタラーゼ構造遺伝子あるいは周辺遺伝子の塩基に変異を認めたが、その変異パターンはカタラーゼ蛋白を産生する菌株にも認められ、変異パターンからカタラーゼ蛋白非産生株を推定することはできなかった。

(考案)

*H. pylori*感染者120例中69例(58%)が抗*H. pylori*カタラーゼ抗体陽性を示し、組織学的に胃前庭部の著しい単核球浸潤を示した。51例(42%)が抗*H. pylori*カタラーゼ抗体陰性者であり、45例(37%)は*H. pylori*カタラーゼ蛋白産生株感染であり、胃前庭部の著しい多形核白血球浸潤を示したが、6例(5%)は*H. pylori*カタラーゼ蛋白欠損株感染であり胃前庭部の強い単核球浸潤を示した。以上より、*H. pylori*感染胃粘膜にみられる単核球浸潤および多形核白血球浸潤には*H. pylori*カタラーゼおよび宿主の抗*H. pylori*カタラーゼ抗体が関

与しており,*H. pylori* 感染胃粘膜病態の解明には*H. pylori* の菌株の病原性に関わる特定分子の解析とそれに対する宿主の免疫反応についての検討が必要であり,このようなアプローチから,*H. pylori* 感染による多彩な病態が初めて明らかにされる.

(結論)

H. pylori 感染胃粘膜病態の解明には*H. pylori* の菌株の病原性に関わる特定分子の解析とそれに対する宿主の免疫反応についての検討が必要である.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 守 内 哲 也

学 位 論 文 題 名

Helicobacter pylori 感染病態における血清抗 *Helicobacter pylori* カタラーゼ抗体の存在意義

ヒト胃粘膜には微生物に対し酸、免疫系などの生体防御系が備わっているが *Helicobacter pylori* (以下 *H.pylori*) は胃粘膜局所で持続感染、増殖し、様々な病態を引き起こす。本研究では菌-感染宿主の相互作用を *H.pylori* のカタラーゼを標的とし細菌の構造解析および宿主要因としての *H.pylori* カタラーゼ抗体産生を中心に解析し、血清中の抗 *H.pylori* カタラーゼ抗体の臨床的意義を明らかにしようとした。 *H.pylori* 陽性の120症例を対象とし血清中の抗 *H.pylori* カタラーゼ抗体を測定し、併せて組織学的検索を行った。また、得られた菌株をウエスタンブロット法、サザンブロット法を用いてカタラーゼ蛋白、カタラーゼ構造遺伝子及びその周囲の遺伝子の変異をあわせて検討した。その結果、 *H.pylori* 感染者120例中69例(58%)が抗 *H.pylori* カタラーゼ抗体陽性を示し、組織学的に胃前庭部の著しい単核球浸潤を示した。51例(42%)が抗 *H.pylori* カタラーゼ抗体陰性者であり、そのうち45例(37%)は *H.pylori* カタラーゼ蛋白を産生しており、胃前庭部の著しい多形核白血球浸潤を示したが、6例(5%)は *H.pylori* カタラーゼ蛋白が欠損しており胃前庭部の強い単核球浸潤を示した。以上より、 *H.pylori* 感染胃粘膜にみられる単核球浸潤および多形核白血球浸潤には *H.pylori* カタラーゼおよび宿主の抗 *H.pylori* カタラーゼ抗体が関与しており、 *H.pylori* 感染胃粘膜病態の解明には *H.pylori* の菌株の病原性に関わる特定分子の解析とそれに対する宿主の免疫反応についての検討が必要であることが明らかとなった。

公開発表にあたって、副査の癌研細胞制御守内教授より *H.pylori* のカタラーゼとヒトのカタラーゼの相同性に関する質問があった。申請者は、遺伝子のレベルでは50から60%の相同性を持っていると答えた。次に *H.pylori* のカタラーゼは菌由来かヒト由来かについての質問があった。申請者は、 *H.pylori* のカタラーゼは *H.pylori* 由来であると答えた。次に、カタラーゼ非産生菌は宿主側の活性酸素等の攻撃因子からどのように対処するかについて質問があった。申請者は、 *H.pylori* はカタラーゼ以外にもSODなどの攻撃因子をスカベンジするパスウェイが存在すると答えた。続いて副査の小児科小林教授より、カタラーゼ蛋白陰性、抗体陰性とカタラーゼ蛋白陽性、

抗体陽性の組織像が同じであるということより、カタラーゼ抗体が中和抗体として働いている可能性について質問があった。申請者は、試験管レベルで実際に血清抗カタラーゼ抗体が*H.pylori*のカタラーゼ活性を抑えることを説明し、中和抗体として作用している可能性があるかと答えた。次に単核球浸潤と多形核白血球浸潤の違いについて質問があった。申請者は、抗*H.pylori*カタラーゼ抗体陽性者に単核球浸潤が多い理由として血清抗*H.pylori*カタラーゼ抗体が*H.pylori*カタラーゼ活性を抑制しうることを試験管レベルで確認しており、一方、カタラーゼ蛋白非産生*H.pylori*株に感染した胃粘膜も同様に単核球浸潤を示す事よりカタラーゼ活性を抑制する事が、単核球浸潤に関連するものと思われる。その間の詳細な機序に関しては不明であると答えた。また、抗*H.pylori*カタラーゼ抗体陰性者に多形核白血球浸潤が多い理由として*H.pylori*の病原関連遺伝子群であるCagPAIのCagE遺伝子が感染胃粘膜上皮細胞からIL-8を産生させ多形核白血球浸潤に関わることが明らかにされており、その結果白血球浸潤が惹起されていると推定されるが、その機能と血清抗*H.pylori*カタラーゼ抗体陰性との関連は不明であり、おそらく血清抗*H.pylori*カタラーゼ抗体陰性は宿主の抗体産生能の異常と推測されると答えた。次に、胃体部と胃幽門部での違いはなぜ起こるのかという質問があった。申請者は、胃内の環境、特に酸の分泌を考えると、胃体部は胃幽門部に比べて活発な酸分泌領域でありその影響のため、胃幽門部は胃体部に比し、細菌による炎症所見が現れやすいと思われると答えた。最後に主査の第三内科浅香教授より、今後臨床応用を考える際にどのような事を考えているかについて質問があった。申請者は、これまでの菌と病変を点で結ぶ考え方から、その相互作用を視野にいれて観察したわけであり、これらの組織像と抗体価がどのように変化していくかを経時的に観察しこの抗体の役割をはっきりさせることが必要であると答えた。

本研究では*H.pylori*感染による病態解析には細菌の病原因子に関連する特定分子の構造解析とそれに対する宿主の反応との相互作用の検討が必要であることを示しており、審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。