

学位論文題名

*Helicobacter pylori* in Culture :  
An Ultrastructural study

(液体培地における *Helicobacter pylori* の超微形態学的検討)

学位論文内容の要旨

【緒言】 Marshall と Warren によるヒト胃上皮細胞からの *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) の分離と同定以来 (Lancet 8390 : 1984), この菌についての非常に多くの報告がなされている。現在, この細菌はグラム陰性の桿菌であり胃悪性疾患をはじめとする多くの胃疾患に関連すると考えられており, すでに遺伝子解析もなされている。しかし, この菌の超微形態については, いまだ明らかにされてはいない。そこで, 本研究においては *H.pylori* を液体培地中で培養し, 種々の電顕的手法を用いて菌の超微形態学的変化を観察し, その特徴を検討した。各培養日齢における菌の増殖能も観察した。

【材料と方法】 *H.pylori* (ATCC 43504) を10% 馬血清添加 Brucella Broth 培地に接種し, 37°C, 微好気性条件で7日間振とう培養した。各培養日齢における菌液を用いて走査電顕用標本作製し, HITACHI S-4500 を用いて観察し, 同時に MCID system を用いて菌の全長と幅を測定し, 平均値と標準偏差を計算した。菌体容積と表面積は全長と幅を用いて計算し, 統計処理は Mann-Whitney' U test を用いて行った。また, 型の如く透過電顕用標本作製し, HITACHI H-800 で観察した。一部の標本では抗 *H.pylori* 抗体を用いた免疫電顕も施行し, 観察した。1次抗体としてウサギ抗 *H.pylori* 抗体を, 2次抗体としてヒツジ10nm gold particle labeled antiserum を使用した。菌浮遊液を5% 加熱処理ヒツジ血液添加血液寒天培地上に接種し, 増殖能も検討した。

【結果】 培養期間中の *H.pylori* の形態変化 : 培養早期は一般に, 菌体はわずかに S 状に彎曲したラセン形態であったが, 3日目以降は急速に球状形態に移行した。

培養1日目のラセン *H.pylori* : 菌の全長, 幅, 体積および表面積はそれぞれ  $2.04 \pm 1.12 \mu\text{m}$ ,  $0.49 \pm 0.12 \mu\text{m}$ ,  $0.40 \mu\text{m}^3$  および  $3.6 \mu\text{m}^2$  であった。菌体表面は不規則で高さ・幅とも約 50nm の, 細胞壁膜からなる突起を有していた。細胞壁と細胞質膜の厚さはそれぞれ, 15nm と 10nm であった。固定液にタンニン酸を添加して検討したところ, 菌外膜の厚さは約 25nm であった。細胞質内に以下の2種類の顆粒を認めた。一つは内部に顆粒構造を有する明調顆粒 (直径  $0.15 \pm 0.06 \mu\text{m}$ ) ともう一つは高電子密度の暗調顆粒 (直径  $0.12 \pm 0.04 \mu\text{m}$ ) であった。鞭毛は一般に菌体の陥凹した一端に認められ, 径  $51.1 \pm 6.6\text{nm}$  で厚さ 12nm の鞭毛鞘を有していた。鞭毛鞘は細胞壁と連続していた。直径  $0.1 \mu\text{m}$  以下のノブが鞭毛の先端に存在していた。この構

造は時に隣接する菌体に接していた。

**培養 2 日目のラセン *H. pylori*** : ラセン形態の全長, 幅, 体積および表面積はそれぞれ  $1.71 \pm 0.96 \mu\text{m}$ ,  $0.38 \pm 0.12 \mu\text{m}$ ,  $0.21 \mu\text{m}^3$  および  $2.4 \mu\text{m}^2$  であった。菌体表面は培養 1 日目の菌体に比較してより平滑であり, 小球状の膜様構造物が表面に付着していた。膜間隙 (ペリプラズマ間隙) は拡大傾向にあった。細胞質内密度も培養 1 日目の菌体に比較して減少していた。顆粒は不明瞭化していた。鞭毛数は減少していた。

**培養 3 日目の球状 *H. pylori*** : 菌の大多数は球状形態を呈し, 直径, 体積および表面積はそれぞれ  $0.80 \pm 0.36 \mu\text{m}$ ,  $0.27 \mu\text{m}^3$  および  $2.4 \mu\text{m}^2$  であった。菌体表面は一般に不整であり, 鞭毛数は培養 2 日目の菌よりも減少していた。細胞質膜と顆粒構造は培養 1 日目のラセン状の菌体よりも不明瞭であった。これらの菌体は互いに接着しあう傾向が認められた。菌体表面が平滑で, 鞭毛が自らの菌体をきつく巻いている球状形態菌も認められ, その内部には透過電顕的にラセン形態に類似した細胞内構造も認められた。

**菌の増殖能** : 菌増殖能は培養 1 日目が  $3.5 \pm 2.4 \times 10^8$  CFU, 培養 2 日目が  $1.0 \pm 0.7 \times 10^7$  CFU, 培養 3 日目が  $6.3 \pm 4.5 \times 10^6$  CFU, 培養 4 日目が  $3.8 \pm 2.2 \times 10^6$  CFU, 培養 5 日目以降は 0 CFU であった。

【考案】本研究においては, *H. pylori* 菌株の培養期間中における菌体の超微形態学的変化を観察した。培養するにつれて, *H. pylori* は菌体の細胞壁表面構造が変化し, ラセン状菌から球状菌に変化した。球状菌の体積, 表面積はラセン状菌に比較して小さく, 菌体の構造物が膜構造を含め, 喪失することが示された。菌体内には顆粒が観察されたが, このような顆粒にはリン酸化合物が含まれているという報告もあり, 培養日齢の進展による顆粒の減少は, 菌のエネルギー源の減少を示唆しているものと思われた。ラセン状菌から球状菌への変化は, 一般に変性過程と考えられているが, 本研究で観察された大部分の球状菌の超微形態はラセン状菌に比べて不整で, 膜構造は破壊されており, 増殖能の検討でも変性菌であると考えられた。しかしながら, 一部の球状菌は顆粒が残存し, 菌体内の密度および構造物が保持されており, こうした球状菌の意義については今後の検討課題である。ヒト胃生検標本においても, ラセン状菌から球状菌までの種々の超微形態を有する *H. pylori* が観察されると報告されており, それらは今回 *in vitro* で観察された菌体の超微形態に類似しているものと考えられた。こうした多様な超微形態と胃疾患の関係についてはさらなる検討が必要である。なお, 本研究で明らかになった, 鞭毛の他菌体への付着様式は, 鞭毛が運動能のみならず, 菌体相互の付着や胃上皮細胞への付着など, 多くの役割を有していることがうかがえた。

【結論】*H. pylori* は培養により, ラセン状菌から球状菌に変化し, それに伴って一般に超微構造が不明瞭になった。球状菌の意義, 菌の超微構造と疾患の関係については, 今後さらなる検討が必要である。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博  
副 査 教 授 阿 部 和 厚  
副 査 教 授 長 嶋 和 郎

学 位 論 文 題 名

## Helicobacter pylori in Culture : An Ultrastructural study

(液体培地における *Helicobacter pylori* の超微形態学的検討)

本研究においては *Helicobacter pylori* (以下 *H.pylori* と略す) を液体培地中で培養し、種々の電顕的手法を用いて菌の超微形態学的変化を観察し、その特徴を検討した。各培養日齢における菌の増殖能も観察した。*H.pylori* を10%馬血清添加 Brucella Broth 培地に接種し、37°C、微好気性条件で7日間振とう培養した。各培養日齢における菌液を用いて走査および透過電顕用標本作製し、増殖能も検討した。また、*H.pylori* 菌株の培養期間中における菌体の超微形態学的変化を観察した。培養するにつれて、*H.pylori* は菌体の細胞壁表面構造が変化し、ラセン形態から球状形態に変化した。ラセン形態から球状形態への変化は、一般に変性過程と考えられているが、本研究で観察された大部分の球状形態の超微形態は膜構造は破壊されており、増殖能の検討でも変性菌であると考えられた。しかしながら、一部の球状形態は顆粒が残存し、菌体内の密度および構造物が保持されており、こうした球状形態の意義については今後の検討課題であると思われた。

公开发表にあたって、副査である生体機能構造学講座阿部教授から *H.pylori* は運動性についての質問があった。申請者は、鞭毛をヘリコプターのように回転させて前進していく運動形態をとると答えた。次に、*H.pylori* の動きについての質問があった。申請者は、この菌はコロニーを形成するので、運動性を有すると言っても鞭毛を有する他の菌に比較すると動きは遅いことが推測されると答えた。続いて、本研究の実験環境についての質問があった。申請者は、この培地の pH は 7.4 で胃内環境と異なるが、*H.pylori* はウレアーゼを産生して菌体周囲環境を中和して生存しやすくすると答えた。また、鞭毛付着部の構造についての質問があった。申請者は、培養1日目の菌体の鞭毛起始部には陥凹が認められ、鞭毛の推進力に力学的に適応した構造にはなっていると答えた。また、他の菌に比較して膜構造が薄い印象があるが、胃酸のような強酸性環境下での生存可能な理由についての質問があった。申請者は、一つはウレアーゼによって菌体周囲の強酸環境を和らげる能力を有していること、もう一つは lipopolysaccharide のような壁外構造物も関係しているのかもしれないと答えた。次に、副査である神経病態学講座長嶋教授から、生体内における超微形態についての質問があった。申請者は、ヒト胃内でもラセン形態および球状形態とも観察されているが、本研究で示した如く詳細な検討はなされていないと答えた。また、免疫電顕の際に用いた抗体の認識部位についての質問があった。申請者は、*H.pylori* の LPS 中の heat-stable O antigen であると答えた。また、培養3日目の球状形態の回復能についての質問があった。申請者は、ラセン形態比率グラフと増殖能グラフを両方とも対数で比較する必要があると答えた。また、球状形態の性状についての質問があった。申請者は、ラセン形態と球状形態を分離する必要がある。

しかしながら、まだ完全分離には成功しておらず、球状形態の性状はまだ、不明であると答えた。次に、培養液に何か栄養物の添加によってラセン形態を保持できるのではないかという質問があった。申請者は、球状変化の原因としては栄養欠乏、菌体外環境の悪化、抗生剤等が報告されているが、その原因は明らかではない。現在、検討中であると答えた。最後に、主査の内科学第3講座浅香教授から、球状形態の今後の研究の展望についての質問があった。申請者は、本研究では2種類の球状形態が存在することが示されたが、これら2種類の球状形態を分離する方法を考案する必要があるが、培養条件を変えることによって分離が可能となるかもしれないと答えた。

本研究は、種々の電顕的手法を用い、*H.pylori* の超微形態についての新知見を得たものであり、今後の *H.pylori* の超微形態と疾患との関わりとの解明に役立つことが期待されるため、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。