博士（医　学）　小　松　嘉　人

学位論文題名

血清抗 *Helicobacter pylori* 空胞化サイトトキシン抗体の臨床的意義

－とくに胃癌との関連－

学位論文内容の要旨

【緒言】

本研究では*H.pylori*菌側の病原性因子として注目されている細胞空胞化サイトトキシン（VacA）に着目した.VacAと疾患の関連性を調べるため，リコンビナントVacA蛋白を用いたEnzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）法によるヒト血清抗VacA抗体測定系を樹立し，患者血清のIgG型VacA抗体価及びサブクラス抗体価を測定することにより，その臨床的意義，特に胃癌との関連を明らかにしようとした.

【方法および結果】当科を受診した*H.pylori*陽性患者から得られた98血清検体を対象とした.疾患の内訳は胃癌症例35例，胃潰瘍症例32例，慢性胃炎症例31例で，平均年令はそれぞれ62.0歳，61.3歳，61.1歳であり，各群の平均年齢に統計学的な有意差はなかった.また，男性は69例，女性29例であった.血清は-80℃で凍結保存した.その後予備実験にて ELISA測定系を樹立し血清中の抗VacA抗体及び各サブクラス（IgG1～4）について吸光度を測定した.カットオフ値は*H.pylori*陰性血清28検体の測定吸光度値より平均値と標準偏差（SD）を算出し，平均値＋2SDを当測定系におけるカットオフ値に設定した.血清VacA抗体陽性率及び各血清VacA抗体サブクラス抗体陽性率の検討にはFisherの直接確率計算法を，抗体価と萎縮及び各疾患との相関の検討には直線回帰分析を用いた.いずれも$P<0.05$を推計学的に有意とした.
抗*H.pylori*抗体陽性98例中39例(39.8％)が抗VacA-IgG抗体が陽性を示し，疾患毎では胃癌が45.7％，慢性胃炎が41.9％，胃潰瘍が31.3％と胃癌が最も高かったが，各疾患の間には有意差は見られなかった.各サブクラスの測定結果よりIgG4抗体陽性率は胃癌症例において有意に他疾患より高いことが示された.またIgG1抗体陽性率においても胃癌症例は有意に胃潰瘍より高い陽性率を示した.また慢性胃炎との間にも有意差は認められなかったものの抗体価の中央値で胃癌に高い傾向が見られた．胃粘膜萎縮と関連の強い血清ペプシノーゲンI/II比と，抗VacA抗体陽性例における各疾患との関連性を胃癌例と非胃癌例にわけて比較検討したところ，胃癌例においては明らかな相関は

見られないものの，非胃癌例では相関係数-0.423（p＜0.05）と負の相関が見られた.

【考察】

本研究では*H.pylori*陽性患者血清を用いた抗VacA-IgG抗体価測定では，各疾患毎の陽性率は胃癌で45.7％，慢性胃炎で41.9％，胃潰瘍で31.3％と，胃癌患者で最も高い陽性率を示したが，各疾患の間には有意差は認められなかった.萎縮性胃炎や胃癌分離株で十二指腸潰瘍分離株より空胞化サイトトキシン活性が強いことから活性と胃粘膜の萎縮が関連する可能性が報告されているが，本研究では各疾患と抗VacA-IgG抗体陽性率の間には有意な差はみられず，空胞化サイトトキシン活性と抗VacA抗体価，粘膜萎縮の間の直接の関係を証明するには至っていない.将来的には抗VacA抗体高値の患者より分離された菌株毎の空胞化サイトトキシン活性を測定しその関係を直接的に明らかにする必要があると思われる.抗VacA抗体陽性例における抗体価と血清ペプシノーゲン（以下PG）I，II，I/II比の各値との関連を比較検討したところ，非胃癌では負の相関を示すため萎縮との関連が強い可能性が考えられるが，胃癌ではPGI/IIとの間に明らかな相関を認めなかった.

また胃癌と抗VacA-IgG抗体の関係をさらに詳細に検討するために抗VacA-IgG抗体サブクラスの測定を実施したところ抗VacA-IgG4抗体陽性率において，胃癌で26％（P<0.01）と他疾患に比し有意に高いことが示され，胃癌と抗VacA-IgG4抗体の強い関連が示唆された.胃癌と抗VacA-IgG4抗体の関係についての報告は本研究が初めての報告である．現在，種々の胃疾患においてのTh1とTh2の解析が進み，Th1とTh2が互いにバランスをとることで生理機能を維持し，そのバランスの破綻により様々な粘膜障害が発生してくる可能性が報告され，Th1，Th2の偏位は*H.pylori*感染の病期や病態により変動することが推定されており，胃炎や消化性潰瘍の場合はTh1優位の免疫状態が招来されるとされている．IgG4に関してはTh2からのIL-4の影響を受け産生が促進されるという報告や，長期間に渡る持続感染によりその産生がなされるという報告などが見られる.また癌との関連では肺癌における血清IgGサブクラス測定において，特に肺小細胞癌でIgG4分画が他の組織型の肺癌に比し高い値を示すという報告や甲状腺癌でサイログロブリンに対するIgG4抗体価が高値を示すという報告などが見られており，癌とIgG4抗体の関連が示唆される.また乳癌においてTh2細胞より産生されるIL-4が増加しているとの報告もあり，担癌患者においてはTh1/Th2バランスが崩れ，Th2にシフトしていると考えられる．従って本研究結果より胃癌においても同様にTh1，Th2バランスが崩れ，Th2に傾いており癌の病態に関与している可能性が考えられる.また抗VacA-IgG1抗体陽性率において胃癌は胃潰瘍に比し有意（P<0.01）に高かったことからもTh2へのシフトを示唆しているものと思われる.IgG1抗体陽性率は慢性胃炎でも同様に高値を示したが，IgG1の抗体価の平均値において有意ではないものの胃癌の方が高値を示したことも胃癌におけるTh2優位の状態を示唆している可能性があると思われる.

【結語】

1.リコンビナントVacA蛋白を用いてELISA法により，ヒト血清抗VacA抗体測定系を樹立した.

2.非胃癌では抗VacA抗体価とPG I/II比の間に負の相関を認めた.

3.胃癌において抗VacA-IgG4，IgG1抗体は有意に高い陽性率を示し，胃癌の病態にはTh2へシフトした免疫応答が関与する可能性が推測された.

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　浅　香　正　博

副　査　教　授　長　嶋　和　郎

副　査　教　授　小　林　邦　彦

学位論文題名

血清抗 *Helicobacter pylori* 空胞化サイトトキシン抗体の臨床的意義

－とくに胃癌との関連－

近年、*Helicobacter pylori* (*H.pylori*)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与していることが明らかになってきた.また最近では、*H.pylori*の全ゲノムが明らかにされ病原関連遺伝子や各種病原性因子が報告され *H.pylori* 感染と疾患の多様性につき研究がなされている.*H.pylori*感染による多様な疾患は、菌側因子あるいは、宿主側因子のみからは考えにくく、細菌-宿主の相互作用により起こると推測される.そこで、本研究ではリコンビナント空胞化サイトトキシン（以下VacA）蛋白を用いたELISA法によるヒト血清抗VacA抗体測定系を樹立し，患者血清のIgG型VacA抗体価及びサブクラス抗体価の測定結果から細菌-宿主の相互作用を検討し、疾患の多様性、特に胃癌との関連を調べようとした.対象は当科を受診した*H.pylori*陽性患者から得られた98血清検体で、疾患の内訳は胃癌症例35例，胃潰瘍症例32例，慢性胃炎症例31例であった.平均年令はそれぞれ62.0歳，61.3歳，61.1歳であり，各群の平均年齢に統計学的な有意差はなかった.また，男性は69例，女性29例であった.血清は-80℃で凍結保存した.その後予備実験にてELISA測定系を樹立し血清中の抗VacA抗体及び各サブクラス（IgG1～4）について吸光度を測定した.カットオフ値は*H.pylori*陰性血清28検体の測定吸光度値より平均値と標準偏差（SD）を算出し，平均値＋2SDを当測定系におけるカットオフ値に設定した.血清VacA抗体陽性率及び各血清VacA抗体サブクラス抗体陽性率の検討にはFisherの直接確率計算法を，抗体価と萎縮及び各疾患との相関の検討には直線回帰分析を用いた．抗*H.pylori*抗体陽性98例中39例(39.8％)が抗VacA-IgG抗体が陽性を示し，疾患毎では胃癌が45.7％，慢性胃炎が41.9％，胃潰瘍が31.3％と胃癌が最も高かったが，各疾患の間には有意差は見られなかった.各サブクラスの測定結果よりIgG4抗体陽性率は胃癌症例にお

いて有意に他疾患より高いことが示された.またIgG1抗体陽性率においても胃癌症例は有意に胃潰瘍より高い陽性率を示した.また慢性胃炎との間にも有意差は認められなかったもののEUの中央値で胃癌に高い傾向が見られた．胃粘膜萎縮と関連の強い血清ペプシノーゲンI/II比と，抗VacA抗体陽性例における各疾患との関連性を胃癌例と非胃癌例にわけて比較検討したところ，胃癌例においては明らかな相関は見られないものの，非胃癌例では相関係数-0.423（$p<0.05$）と負の相関が見られた.

リコンビナントVacA蛋白を用いた血清抗VacA抗体測定系の樹立は本研究が初めての試みである.萎縮性胃炎や胃癌分離株で十二指腸潰瘍分離株よりVacA活性が強いことから活性と胃粘膜の萎縮が関連する可能性が報告されているが，本研究では各疾患と抗VacA-IgG抗体陽性率の間には有意な差はみられず，VacA抗体価と粘膜萎縮の間の直接の関係を証明するには至っていない.抗VacA抗体陽性例におけるVacA抗体価と血清ペプシノーゲン(以下PG) I/II比との関連を比較検討したところ，非胃癌では負の相関を示すため萎縮との関連が強い可能性が考えられたが，胃癌ではPGI/IIとの間に明らかな相関を認めなかった.従って胃癌状態では、*H.pylori*に対する特異的な免疫応答の関与が推測された.また胃癌と抗VacA-IgG抗体の関係をさらに詳細に検討するために抗VacA-IgG抗体サブクラスの測定を実施したところ抗VacA-IgG4抗体陽性率において，胃癌で26%（$P<0.01$）と他疾患に比し有意に高いことが示され，胃癌と抗VacA-IgG4抗体の強い関連が示唆された.胃癌と抗VacA-IgG4抗体の関係については本研究が初めての報告である．この点からも胃癌における特異的な免疫応答の関与が示唆された.

公開発表にあたって、副査の小林教授から、リコンビナントVacA蛋白を用いて血清抗体価を簡便に測定できる系を樹立した興味深い仕事であり、今後の発展、応用を期待する旨のコメントとELISA測定の際の手技につき細かなアドバイスを頂いた後に、*H.pylori*抗体陽性例でVacAを有する割合、VacA抗体と菌種との関わり、IgG4の高値と疾患の関係につき質問があった.これに対し申請者は、すべての*H.pylori*菌株が*vacA*をもっているが、VacA蛋白を発現しているのは50-70%と報告されている.従って、抗体の出現の有無は菌側からの因子だけでは考えにくく、宿主側の要因も関連していると思うと回答した.また長嶋教授からは、抗体価が高い人は抗原量が多いと考えてよいか、また抗体価が高い人は癌に罹患しやすいのか、またVacAの細胞障害機序、感染の経過とVacA抗体の変遷について質問があった.申請者は抗原量と抗体価は直接関係はないこと、抗体価の高さと癌の直接の関係は不明なこと、VacAはvacuolar ATP aseと相同性があり、イオン輸送に変異を来し空胞を形成させること、萎縮が進んで*H.pylori*自体が減っても、VacA抗体価は低下せず持続すると答えた.最後に主査の浅香教授より、胃癌においてVacA抗体価の平均値が高いこと、IgG4が高いことは非常に興味深いがCagAに比し、VacAでは明確なdataが無いため、本研究の結果もまだ十分なものとは言えないため、樹立した測定系を用いて更なる研究が必要であるというコメントがあった.

本研究は、リコンビナントVacA蛋白を用いて血清VacA抗体測定系を初め

て樹立し、胃疾患患者血清を用いて抗VacA抗体を測定し、*H.pylori*感染と疾患の多様性、特に胃癌との関連を考える上で興味深い結果を得ている.審査員一同は、これらの研究を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した.