

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790344

研究課題名（和文） 細胞内ピロリ菌の形態・生息期間・形質の解析と病態への関与

研究課題名（英文） The relationships between chronic gastritis and intracellular *H. pylori* infection.

研究代表者

小林 大輔 (KOBAYASHI DAISUKE)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：70361699

研究成果の概要（和文）：

非担癌患者における胃粘膜の状態や外国人との比較をし、これらにおいても、*H. pylori* と慢性炎症の相関関係が成立することが確認され、粘膜固有層における細胞内 *H. pylori* 菌体が感染に伴う慢性炎症に発症・維持に深く関与していることが示された。

研究成果の概要（英文）：

Detection of *H. pylori* in the lamina propria in the case without gastric cancer and a Thai also correlate density of chronic gastritis. These results suggest that *H. pylori* in the lamina propria is thought to be deeply related with the development of *H. pylori*-induced chronic gastritis also in the cases without gastric cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1000000	300000	1300000
2010年度	1100000	330000	1430000
2011年度	800000	240000	1040000
年度			
年度			
総計	2900000	870000	3770000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：細胞内細菌感染、ヘリコバクター・ピロリ

1. 研究開始当初の背景

胃炎や胃潰瘍の治療としてピロリ菌の除菌が広く用いられているが、ピロリ菌の感染が粘膜に炎症を来す機序に関しては、未だに不明な点も多い。これまでに、上皮に接着したピロリ菌によって細胞内に注入されるCag

Aや、分泌されるVac AやOpi Aなどが、IL-8などのサイトカインの分泌を促し、好中球やリンパ球を誘導することが指摘されている(1-3)。一方で、通常ピロリ菌は粘液内および上皮細胞間にのみに存在し、上皮細胞内や粘膜固有層間質には侵入しないと考えられてい

るため、感染胃粘膜で優位であるTh1型の免疫反応や特異的抗体産生に必要な抗原提示の場がどこであるか、そして、ピロリ菌により惹起された慢性胃炎が如何にして維持されているかは不明であった。

われわれはこれまでに、新規ピロリ菌抗体を用いて胃粘膜固有層およびリンパ節内のマクロファージ内にピロリ菌が存在し、胃粘膜固有層の慢性炎症と相関することを示した4)。腸に持続感染する腸内細菌は高頻度に所属リンパ節にtranslocationを起こしており5)、所属リンパ節組織から培養される。胃に持続感染するピロリ菌も同様にリンパ節へのtranslocationを来している可能性を考え、胃癌切除時に郭清された所属リンパ節組織から培養を行ったところ、ピロリ菌が確認された。そこで、リンパ節内のピロリ菌を同定できるモノクローナル抗体(TMDU抗体)を作成し、胃癌切除材料の非癌部粘膜を染色すると、ピロリ菌は胃粘膜表層だけでなく、胃粘膜固有層の主にマクロファージ内に多数同定された。粘膜固有層内における細胞内ピロリ菌は、胃癌の組織型や進行度との相関はなく、慢性炎症の程度と相関していたことから、細胞内ピロリ菌が感染に伴う慢性胃炎の惹起・維持に関与していると考えている4)。

しかし、胃癌切除材料における胃粘膜は、特殊な環境下にあると考えられ、通常のピロリ菌感染胃炎の粘膜と同等に扱ってよいかという問題が残っており、定常的な関係であることを確かめる必要があると考えられた。

2. 研究の目的

胃生検材料を用いることにより、様々な背景を有する胃粘膜において、粘膜固有層における細胞内ピロリ菌の有無と炎症の関係を評価し、細胞内ピロリ菌の意義を解明し、ピロリ菌感染性慢性胃炎の発症機序との関わりを評価する。

3. 研究の方法

1ヶ月間に当院で採取された全胃生検材料242症例519検体とタイで採取された115症例236検体を対象とした。ホルマリン固定パラフィン包埋組織から染色用の3 μ m厚切片4枚と、real-time PCRに使用するDNA抽出用の10 μ m厚切片1枚を連続切片にて作製した。染色は、HE染色、Giemsa染色、2種類の抗体にて免疫染色を施行した。HE染色において、病理診断を確認し、各症例を担癌症例、悪性リンパ腫症例、非腫瘍症例に分類し、粘膜の性状を評価するために改訂版シドニー分類10)に基づき急性炎症、慢性炎症、腸上皮化生の程度を評価した。TMDU抗体で免疫染色をした標本は、表層粘液内および上皮内と、粘膜固有層内に分けて陽性像の有無を観察した。real-time PCRでは、各生検検体ごとのH. pyloriを定量するために生検材料1検体毎に、DEXPAT(TAKARA 9091)にてDNA抽出を行った。抽出後、H. pylori 16s ribosomal DNAを増幅対象としたreal-time PCRを施行し、H. pyloriのDNA定量解析を行った。

4. 研究成果

各疾患群との比較においては腫瘍の有無や病変の有無にかかわらず、粘膜固有層に陽性像が認められたことから、粘膜固有層内にピロリ菌が存在することが胃癌患者における特殊な状況ではないことが確認された。

表 1 疾患別の陽性率

	Non-tumor cases	Tumor cases		Malignant Lymphoma cases	
		Non-lesioned part	Lesioned part	Non-lesioned part	Lesioned part
Total numbers of the specimens	402	42	64	2	9
PCR (%)	153(38)	14(33)	16(25)	0(0)	0(0)
IHC					
TMDU-mAb(%)					
Mucous layer	148(37)	8(19)	9(14)	0(0)	1(11)
Lamina propria	144(36)	11(26)	13(20)	0(0)	3(33)
IHC					
DAKO-pAb(%)					
Mucous layer	121(32)	6(14)	7(11)	0(0)	1(11)
Lamina propria	14(3)	0(0)	0(0)	0(0)	1(11)
Giemsa stain(%)					
Mucous layer	127(32)	7(17)	7(11)	0(0)	1(11)
Lamina propria	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)

IHC : immunohistochemistry stain

非癌患者の生検材料において、ピロリ陽性検体においては大部分の検体において粘液層と粘膜固有層の双方で陽性像が得られた。粘液層のみ陽性であった検体と粘膜固有層のみ陽性であった検体を比較すると、粘液層のみ陽性像を認めた22検体においては、スコア2とスコア3を併せて13検体と急性炎症は強く、慢性炎症はスコア0とスコア1を併せて13検体であった。一方、粘膜固有層のみ陽性の18検体では、慢性炎症が強い症例が13検体で急性炎症は15検体が軽度であり、炎症のパターンが逆になっていた。

写真 1 (TMDU 抗体) 粘膜固有層のみに陽性

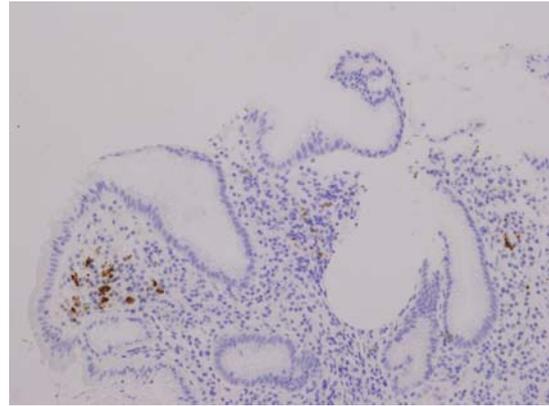
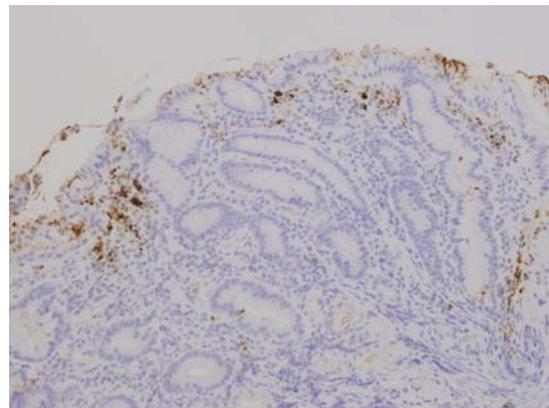


写真 2 (TMDU 抗体) 表層と粘膜固有層に陽性



炎症と粘膜固有層内ピロリ菌の関係を多変量解析を用いて統計的に解析すると、急性炎症の程度は粘液層と粘膜固有層のいずれとも相関関係にあるが、慢性炎症は粘液層では相関はみられず粘膜固有層の検出のみと相関を示した。これは我々が過去に行った担癌手術材料にて検討した結果と同様となった

表 2 陽性部位と炎症の相関関係

	Sydney system		
	PMN infiltration	Chronic inflammation	Intestinal metaplasia
Mucous layer	p<0.001	p=0.92	p=0.99
Lamina propria	p=0.024	p<0.001	p=0.68

※using analysis of covariance

タイの検体との比較においては、それぞれ日本、タイの平均年齢63.6歳、49.4歳、腫瘍症例117例、0例で、ピロリ菌の陽性率はPCR38.4%、13.1%、TMDU抗体39.3%、44.9%となり、タイの検体ではPCRでの検出率が低かった一方でTMDU抗体による検出率が高かった。陽性部位に関しては日本と同様に、6割程度が粘膜表層、粘膜固有層両方ともに陽性となった。シドニー分類の結果と比較すると、タイの検体においても粘膜固有層の陽性像と慢性炎症の程度に相関が見られた。

炎症の程度などにおいては日本と差異が見られたにもかかわらず、慢性炎症と固有層内ピロリ菌の関係は同様の相関関係が確認された。

従って、固有層内ピロリ菌と慢性炎症の程度は疾患や菌株、人種にかかわらず成立していることが確認され、慢性炎症の発症機序において重要な役割を担っていると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① 関根正喜、小林大輔、伊藤崇、内田佳介、関谷高弘、江石義信、新規作成したモノクローナル抗体による *H. pylori* の検出：病理診断における有用性と臨床病理学的意義、病理と臨床、査読有、vol. 60、No. 4、2012、287-293

[学会発表] (計 1 件)

- ② 江石義信、関根正喜、伊藤崇、関谷高弘、内田佳介、三輪彩、峰岸佳菜、小林大輔、新規作成したモノクローナル抗体による *H. pylori* の検出：病理診断における有用性と臨床病理学的意義、日本臨床検査医学会、2010

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 大輔 (KOBAYASHI DAISUKE)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：70361699

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：