

小児 *Helicobacter pylori* 感染性胃炎および十二指腸潰瘍 の除菌前後の胃粘膜における粘膜免疫学的検討

学位論文内容の要旨

緒言

Helicobacter pylori (以下 *H. pylori*) は胃粘膜に感染し、初感染は小児期と考えられている。宿主や環境の因子が病態に関与し、感染者は慢性に経過し、非萎縮性胃炎を経て、一部のものだけが萎縮性胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、胃癌などの症状を呈する。小児期に発症する *H. pylori* 胃炎は感染してからの期間が成人に比べて短いと考えられる。その検討は、単に小児期の *H. pylori* 感染症の病態を明らかにすることのみならず、広く *H. pylori* 感染における免疫反応の全体像を明らかにする端緒となる意味を持つと思われる。今回の研究では、小児における *H. pylori* による胃炎もしくは十二指腸潰瘍の患者の胃粘膜を材料に、除菌前後の変化について粘膜免疫応答の視点から比較検討した。

対象

1998年4月から2002年1月の間に、札幌厚生病院小児科外来にて、*H. pylori* 胃炎または *H. pylori* 十二指腸潰瘍と診断され除菌療法により除菌された11症例(男性6例、女性5例で、年齢は6歳から20歳で、平均14歳)を対象とした。確定診断は、いずれも除菌前の内視鏡所見、生検組織の病理学的所見、迅速ウレアーゼ試験、¹³C-尿素呼気試験によりなされた。除菌判定の内視鏡検査は、初回生検後より平均4ヶ月後(2-5ヶ月)に行われた。内視鏡検査の前に文書を用いた十分な説明のうえ、同意の得られた症例につき、検査と同時に胃粘膜を採取し、検体として用いた。また、胃炎のために内視鏡的生検を施行したが、最終的に *H. pylori* 感染が認められなかった症例および除菌に失敗した症例についても、比較検討の参考として観察した。統計学的分析は除菌前後の評価にて得られた数値を、Mann-Whitney U 検定を用いて行った。p<0.05 で有意差ありとした。

方法と結果

1. Th1/Th2 サイトカイン特異的 mRNA の発現

採取された胃粘膜を用いて IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10 の cytokine 特異的 mRNA 発現の有無をみたが、除菌の前後で差は無く、Th1 polarization や Th2 polarization は認められなかった。

2. 組織学的検討

胃粘膜生検組織は固定凍結包埋後、5 μ m 厚に薄切し、ヘマトキシリン-エオジン染色と免疫染色を行い、光学顕微鏡により観察した。任意の5視野(倍率400倍)につき100細胞あたりの陽性細胞数を除菌前後で比較した。前庭部と体部について Updated Sydney System に準じた形で、除菌前後の各項目の比較、統計学的検討を加えた。*H. pylori* に関しては、全例で除菌前で *H. pylori* が認められ、除菌後に消失していた。炎症については除菌前21検体中14検体が中等度、7検体が軽度であり、除菌後20検体中8検体が軽度、12検体が正常であり、有意差(P<0.001)をもって改善していた。活性についても除菌前21検体中7検体が中等度、9検体が軽度、5検体が正常であ

り、除菌後 20 検体中 1 検体が軽度、19 検体が正常であり、有意差($P < 0.001$)をもって改善していた。萎縮については、除菌前 21 検体中 6 検体が軽度、15 検体が正常であり、除菌後 20 検体中 3 検体で軽度、17 検体で正常であり、減少していたが有意差はなかった($P = 0.300$)。化生については、除菌前 21 検体中 3 検体が軽度、18 検体が正常であり、除菌後 20 検体すべてで正常であり、減少しているが有意差はなかった($P = 0.083$)。リンパ濾胞については、除菌前 21 検体中 8 検体にみられ、除菌後では 6 検体にみられた。

3. 胃粘膜への炎症性浸潤細胞の免疫組織化学的検討

抗 CD3 抗体、抗 CD45RA 抗体、抗 CD20 抗体、抗 CD68 抗体、抗 HLA-DP,DQ,DR 抗体を用いて酵素抗体法で発色させた。CD3 陽性 T 細胞は除菌前は 5 例中 5 例で浸潤しており、除菌後は 5 例とも粘膜内に残存もしくは増加しており、CD45RA 陽性ナイーブ T 細胞は除菌前に粘膜固有層への浸潤が 5 例中 5 例にみられた。除菌後は 4 例で残存、1 例で消退していた。CD20 陽性 B 細胞は、リンパ濾胞に浸潤しているのが特徴的かつ粘膜固有層にも多数の浸潤が 5 例中 5 例でみられた。除菌後は 1 例においては有意に減少していたが、4 例で粘膜固有層への浸潤は残存していた。HLA-DR 陽性細胞については除菌前は 5 例中 5 例で浸潤があり、除菌後は 1 例は有意に増加、2 例は有意に減少、2 例は変化がなかった。CD68 陽性マクロファージ細胞は除菌前は 5 例中 4 例で増加し、除菌後は 2 例で有意に減少し、3 例では増加していたが有意差はなかった。

4. Toll-like receptor (以下 TLR) の発現

抗ヒト TLR-2 抗体、抗ヒト TLR4 抗体を用いて検出した。除菌前では、5 例中全例で TLR-2、TLR-4 を発現したマクロファージが胃粘膜固有層だけではなく、粘膜上皮細胞間に浸潤していた。除菌後には、TLR-2 陽性細胞は 5 例中 4 例で減少していた。TLR-4 陽性細胞は 5 例中 1 例で不変、1 例で増加していたが、3 例で減少していた。非 *H. pylori* 胃炎では TLR-2、-4 ともに発現はなく、除菌失敗例では、これらの浸潤細胞は残存していた。

5. アポトーシスの検討

poly (ADP-ribose) polymerase (以下 PARP) 切断部位認識抗体を用いてアポトーシスを検出した。除菌前は 8 例中 6 例で胃粘膜上皮細胞にアポトーシスは認められず、免疫担当細胞にのみ観察された。一方、除菌後に 8 例中 7 例で胃粘膜上皮細胞のアポトーシスが增加していた。非 *H. pylori* 胃炎ではアポトーシスを認めず、除菌失敗例の一例でも除菌前に認めず、除菌後には認めたが有意差は無かった。

考察

以上の結果は、小児の胃粘膜では二次的免疫応答ではなく、自然免疫を主体に *H. pylori* の感染に対応していること示唆する。成人の *H. pylori* 感染症は Th1 型反応であるとされているが、感染による炎症の早期像をみたものではなく、慢性炎症をとらえているものと考えられ、本研究での小児では異なる結果が示された。これは感染早期における *H. pylori* に特異的な免疫反応をみていると考えられる。成人の *H. pylori* 感染胃粘膜上皮細胞のアポトーシスは正常粘膜に比べて増加しており、除菌により減少する。一方、今回の検討において、アポトーシスは除菌前には粘膜上皮細胞にみられず、除菌後に多く観察された。この違いの理由は明らかではないが、菌株による *cagA* やウレアーゼ活性の違いからはアポトーシスが出現する時間的差異は説明できない。ひとつの仮説としては、「*H. pylori* が胃粘膜に感染してまもない間はアポトーシスが誘導されない時期があり、一定期間の後にアポトーシスは亢進する。この場合はアポトーシスのみられない時期に除菌をしても、一旦アポトーシスは亢進する。除菌されずに慢性持続感染となった場合は、アポトーシスが亢進して、除菌により感染が終息するのにともないアポトーシスも消失する」といったことが考えられる。今後、小児例の除菌後の長期経過を追った検討および成人例、小児例の差異に関する詳細な検討が必要である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 佐々木 文 章
副 査 教 授 浅 香 正 博

学 位 論 文 題 名

小児 *Helicobacter pylori* 感染性胃炎および十二指腸潰瘍 の除菌前後の胃粘膜における粘膜免疫学的検討

Helicobacter pylori (以下 *H. pylori*) は幼小児期に胃粘膜に初感染して、以後、慢性持続感染すると考えられている。小児期の *H. pylori* 感染の病態ははまだ明らかでなく、その検討は *H. pylori* 感染の全体像を明らかにする端緒となる意味を持つ。今回の研究では、小児における *H. pylori* による胃炎もしくは十二指腸潰瘍の患者の胃粘膜を材料に、除菌前後の変化について粘膜免疫応答の視点から比較検討した。対象は札幌厚生病院小児科外来の患者 11 例 (平均年齢 14 歳) で、確定診断は、除菌前の内視鏡所見、生検組織の病理学的所見、迅速ウレアーゼ試験、¹³C-尿素呼気試験によりなされた。除菌判定の内視鏡検査は、初回生検後より平均 4 ヶ月後 (2~5 ヶ月) に行われた。胃粘膜検体は文書を用いた十分な説明のうえ、同意の得られた症例につき、検査と同時に採取された。生検胃粘膜は固定、凍結包埋、薄切、染色の後、光学顕微鏡により観察した。組織学的検討にはヘマトキシリン-エオジン染色を行い、前庭部と体部について Updated Sydney System の各項目に準じた形で、除菌前後の評価をした。*H. pylori* については全例で除菌前で認められ、除菌後に消失していた。炎症(inflammation)については除菌前 21 検体中 14 検体が中等度、7 検体が軽度であり、除菌後 20 検体中 8 検体が軽度、12 検体が正常で有意に改善($P<0.001$)。活性度(activity)についても除菌前 21 検体中 7 検体が中等度、9 検体が軽度、5 検体が正常、除菌後 20 検体中 1 検体が軽度、19 検体が正常で有意に改善($P<0.001$)。萎縮(atrophy)については、除菌前 21 検体中 6 検体が軽度、15 検体が正常、除菌後 20 検体中 3 検体が軽度、17 検体が正常で有意差なし。化生(metaplasia)については、除菌前 21 検体中 3 検体が軽度、18 検体が正常、除菌後 20 検体すべて正常で有意差なし。小児の胃粘膜では萎縮や化生は軽度であることが示された。生検胃粘膜を homegenize してサイトカイン特異的 mRNA の発現を比較した。成人では慢性炎症を反映して、Th1 型反応とされているが、今回の検討では一定の傾向はなかった。炎症性浸潤細胞について酵素抗体法で発色させ、任意の 5 視野 (倍率 400 倍) につき 100 細胞あたりの陽性細胞数をカウントして比較検討した。除菌前は CD3 陽性 T 細胞の浸潤

に伴い、CD45RA 陽性ナイーブ T 細胞の粘膜固有層への浸潤が 5 例中 5 例にみられ、除菌後は 1 例で減少、4 例で残存。CD20 陽性 B 細胞のリンパ濾胞と粘膜固有層への浸潤が除菌前 5 例中 5 例でみられ、除菌後は 1 例で減少、4 例で残存。HLA-DR 陽性細胞、CD68 陽性マクロファージ細胞は除菌前は増加していたが、除菌後は一定の傾向なし。Toll-like receptor (TLR)-2, -4 を発現したマクロファージが除菌前では胃粘膜固有層だけではなく、粘膜上皮細胞間に浸潤していたが、除菌後には減少していた。小児では二次的免疫応答ではなく、自然免疫を主体に *H.pylori* の感染に対応していることが示唆された。アポトーシスの検出は PARP(poly (ADP-ribose) polymerase)切断部位認識抗体を用いた。成人では *H. pylori* 感染胃粘膜上皮細胞のアポトーシスは増加しており、除菌により減少するが、今回は除菌前は上皮細胞にアポトーシスは認められず、免疫担当細胞のみ観察された。一方、除菌後に上皮細胞のアポトーシスが増加していた。この違いの理由は明らかではなく、現時点では年齢的な特徴と捉えざるを得ないが、今後、小児例の除菌後の長期経過を追った検討および成人例、小児例の差異に関する詳細な検討が必要である。

公開発表に際し、副査の佐々木文章教授より、除菌治療にも関わらず、なぜ除菌後にアポトーシスが亢進するかという点について、また副査の浅香正博教授から *H.pylori* 感染における病態において小児の反応、成人の反応は何によって規定されうるかについて、小児での胃体部、胃前庭部といった部位による炎症像の違いおよび予後との関連について、主査の小林邦彦教授からはサイトカインの発現が成人と異なる点について、アポトーシスの検出に別のアプローチがないかという質問がなされたが、いずれの質問に対しても申請者は過去の文献報告や自身の研究結果をもとに概ね妥当に回答した。

本研究は、*Helicobacter pylori* 感染における粘膜免疫反応が明らかに成人のそれとは異なることを見出し、今後の経時的な検討は本症の発症機序や治癒機序の解明に貢献することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が学位（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。