

学位論文題名

CagA in Barrett's esophagus in Colombia,
a country with a high prevalence of gastric cancer

(高率な胃癌発生国コロンビアでの
バレット食道患者における CagA について)

学位論文内容の要旨

<背景と目的>

Barrett 食道とは、食道の正常な扁平上皮が杯細胞を伴う円柱上皮によって置換された状態であり、北米、西欧国での白人男性で急速に増加している食道腺癌の前駆病変であると考えられ近年注目されている。Barrett 食道が起こる機序は、胃食道逆流現象に基づく胃酸、胆汁酸などの食道への暴露により、食道粘膜へ継続的に傷害が引き起こされるためと考えられている。

Helicobacter pylori (*H. pylori*) 感染は、胃粘膜に炎症を引き起こし萎縮性胃炎を生じ胃酸の分泌に直接影響している。*H. pylori* には、病原性因子に関連する *cag* pathogenicity island という遺伝子配列を持つものがある。その island に 120-145 K の Cytotoxic-associated gene A (*cagA*) が含まれるほか、この *cagA* は、*H. pylori* 体内にある CagA 蛋白を TypeIV secretion という分泌方法を介して胃細胞内に放出することで、胃癌や炎症に関与していると考えられている。*cag* pathogenicity island (*cagA* を含む) を有する *H. pylori* (CagA 抗体陽性) が、CagA 抗体陰性菌よりさらに強い炎症を引き起こすとされているので、CagA 抗体陽性 *H. pylori* 感染者では Gastroesophageal reflux disease (GERD) や Barrett 食道の頻度が少ないとされている。

GERD や食道腺癌は、萎縮性胃炎の多い国ではまれであるが、それは *H. pylori* 感染が胃酸分泌を減少させて食道への胃酸逆流が減少し、GERD や Barrett 食道への進展を抑制しているためと考えられている。一方で、Barrett 食道は *H. pylori* 感染や胃癌が多い地域でも認められている。コロンビアはそのような国の一つであり、*H. pylori* と GERD/Barrett 食道間の関係は、十分に研究されていない。今回、コロンビアの Barrett 食道と CagA 抗体陽性 *H. pylori* との関係を評価した。

<対象と方法>

1. 患者背景 (Barrett 食道患者とコントロール群) と検体

この研究は、コロンビアのボゴータ国立大学内科消化器分野の外来で内視鏡をうけた 51 人 (男性 39 人、女性 12 人、平均年齢 54.9 ± 13.4) の long segment の Barrett 食道患者 (胃食道接合部から少なくとも 3cm 以上の円柱上皮を持つもので、うち 1 人に高異形成、2 人に低異形成、4 人に十二指腸潰瘍を認めた) を対象とした。コントロール群は、潰瘍病変や食道炎、胃癌などのない *H. pylori* 感染胃炎のみのコロンビア人患者 24 人 (男性 8 人、女性 16 人、平均年齢 48.0 ± 10.2) とした。胃酸分泌抑制剤内服者は含まれているが、*H. pylori* 除菌者、胃や胆嚢に手術をした者、この研究への非同意者は除外している。この protocol は、コロンビア国立大学内科倫理委員会によって承認された。

粘膜生検検体は、下部食道、胃体部、胃幽門部から採取され、ホルマリン固定された。スライド標本か、パラフィン処理されたブロックがテキサス州ヒューストンのベイラー医科大学消化器粘膜病理研究室へ送られた。51 人全ての患者は、スライド標本の観察は可能であったが、組織の

パラフィンブロックは38人の患者で利用可能であった。全ての患者において、活動性、慢性炎症、腸上皮化生と萎縮について0 (absent/normal) to 5 (maximal intensity)からなる visual analogue scale によってスコア化を行った。

2. 抗 CagA 血清による免疫組織染色の有効性

CagA の有無のために使われた抗 CagA 血清は、生後数ヶ月、特異的抗原のないオス、メスの New Zealand white rabbits に、50 μ g 相当の *H. pylori* recombinant CagA を筋注して生成された。PCR によって *cagA* の有無が既知の *H. pylori* 感染 36 人の胃粘膜生検検体 (25 人の CagA 陽性患者と 11 人の CagA 陰性患者計 36 人のアメリカ人、コロンビア人患者) でこの抗体を検討した。この免疫組織染色では感度 100%、特異度 81.8%であった。コロンビア患者には、*H. pylori* 感染 CagA 陽性、陰性混合感染が知られており、特異度の差の一因と考えられる。

3. 統計分析

統計分析については、Sigma Stat(SPSS)を使用し、Fisher Exact test、または Chi Square test (both 2 tailed) を用いた。統計的有意差は p 値が、0.05 未満とした。

<結果>

1. Barrett 食道患者の *H. pylori* の有無

検体を Triple stain で染色し、消化器病理医(H.E.Z)と研修医(M.K)で検討した。Long segment の Barrett 食道患者 51 人中、32 人(62.7%)に *H. pylori* 感染を認めた。

2. Barrett 食道患者の CagA の有無

CagA の有無については、胃体部と胃幽門部の両方のブロックが利用可能な 23 人の Barrett 食道患者を免疫組織染色で評価した。染色法は、パラフィンブロックの組織を 4 μ m 切片して、proteinaseK、10mmol/L citrate buffer で抗原賦活化し、streptoavidin-biotin complex method で行った後、DAB で detect し、Alcian blue で counter stain を行った。Barrett 食道群 23 人中、8 人(34.8%)が CagA 陽性 *H. pylori* に感染していた。コントロール群では、79.2%(24 人中 19 人)が CagA 陽性 *H. pylori* に感染し、Barrett 食道群と有意差があった ($p=0.01$)。また、この研究では、Barrett 食道の CagA 陽性 *H. pylori* 感染患者全てが男性であった。

3. Barrett 食道患者の腸上皮化生

胃体部と胃幽門部の両方の胃検体が可能である患者(15 人の Barrett 食道患者群と 24 人のコントロール群)の中で、腸上皮化生の存在を比較した。コントロール群の 45.8%($n=11/24$)が腸上皮化生を認めたのに対し、Barrett 食道患者群では一例も認めなかった ($p=0.015$)。コントロール群で腸上皮化生を認めた 11 人中 9 人 (81.8%) は CagA 陽性 *H. pylori* 感染者であった。

<考察>

コロンビアの Barrett 食道患者の *H. pylori* 感染率は 62.7%で、米国の Barrett 食道患者の *H. pylori* 感染率 (10-30%) と比較すると高率であった。萎縮性胃炎の頻度は、コントロール群で 83.3% ($n=19/24$)、Barrett 食道群で 21.7% ($n=5/23$)であった。腸上皮化生は、萎縮性胃炎の進行病変と言われているが、コントロール群が 45.8%に認められたのに対し、Barrett 食道群では一例も認められなかった。コロンビアの Barrett 食道群では CagA 陽性率が 34.8%($n=8/23$)であり、コントロールの陽性率 (80%) に比して明らかに低かった。*H. pylori* 感染は胃粘膜の炎症を惹起するが、CagA 抗体陽性例は陰性例に比し、明らかに強い炎症を生じることが知られている。コロンビアは胃癌の多発国であり、米国に比して健常人の *H. pylori* 感染率および CagA 抗体陽性率も高いことが明らかになっている。Barrett 食道の発生には胃酸分泌が障害されていないことが必要といわれている。コロンビアにおいて Barrett 食道患者の *H. pylori* 陽性率は高かったが、CagA 抗体陽性率はコントロールより明らかに低く、そのため萎縮性胃炎の頻度が低くなり腸上皮化生の発生がみられなかったと考えられる。

<結語>

1. コロンビアの Barrett 食道患者は男性の比率が高く、多くの *H. pylori* 感染が認められた。

2. コロンビアの Barrett 食道患者群においては、*H. pylori* 感染が多かったが、CagA 陽性 *H. pylori* 感染患者は低率であった。

3. コロンビアの Barrett 食道患者群において萎縮性胃炎の発生頻度は低く、腸上皮化生を一例も認めなかった。

以上のことより、コロンビアにおける Barrett 食道は CagA 陰性の *H. pylori* 感染との関連性が重要と考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 玉 城 英 彦

副 査 教 授 小 池 隆 夫

学 位 論 文 題 名

CagA in Barrett's esophagus in Colombia, a country with a high prevalence of gastric cancer

(高率な胃癌発生国コロンビアでの
バレット食道患者における CagA について)

Barrett 食道とは、食道の正常な扁平上皮が杯細胞を伴う円柱上皮によって置換された状態であり、北米、西欧国での白人男性で急速に増加している食道腺癌の前駆病変であると考えられ近年注目されている。Barrett 食道が起こる機序は、胃食道逆流現象に基づく胃酸、胆汁酸などの食道への暴露により、食道粘膜へ継続的に傷害が引き起こされるためと考えられている。*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染は、胃粘膜に炎症を引き起こし萎縮性胃炎を生じ胃酸の分泌に直接影響している。*cag* pathogenicity island (*cagPAI*) という遺伝子配列をもつ *H. pylori* は、それをもたない *H. pylori* に比べ強い病原性があり、この遺伝子配列に含まれている cytotoxic-associated gene A (*cagA*) 遺伝子は、*cagPAI* の代表的なマーカーと考えられている。*cagPAI* を有する(したがって *cagA* 陽性の) *H. pylori* は、*cagA* 陰性菌より強い炎症を引き起こすため、*cagA* 陽性 *H. pylori* 感染者では gastroesophageal reflux disease (GERD) や Barrett 食道の頻度が少ないとされている。

一般的に GERD や食道腺癌は、萎縮性胃炎の多い国ではまれであるが、それは *H. pylori* 感染が胃酸分泌を減少させて食道への胃酸逆流が減少し、GERD や Barrett 食道への進展を抑制しているためと考えられている。一方で、Barrett 食道は *H. pylori* 感染や胃癌が多い地域でも認められている。コロンビアはそのような国の一つであり、*H. pylori* と GERD/Barrett 食道間の関係は、十分に研究されていない。そこで、本研究では、コロンビアにおける Barrett 食道と *cagA* 陽性 *H. pylori* との関係性を評価した。

本研究では、コロンビア国立大学内科消化器分野の外来で内視鏡をうけた 24 人のコントロール群 (潰瘍病変や食道炎、胃癌などのない *H. pylori* 感染胃炎のみの患者) と、51 人の long segment の Barrett 食道患者群 (胃食道接合部から少なくとも 3cm 以上の円柱上皮を持つもの) を対象とした。

はじめに El-zimaity Triple 染色を用いて Barrett 食道患者群における *H. pylori* 感染率を検討した。この群における *H. pylori* 感染率は 62.7% (n=32/51) であった。次に

Barrett 食道患者の *H. pylori* における *cagA* の有無について、本研究室で作成された抗 *CagA* 血清を用いて免疫組織染色を行い検討した。コントロール群では 79.2% (n=19/24)、Barrett 食道患者群では 34.8% (n=8/23) が *cagA* 陽性 *H. pylori* に感染しており、両群間に有意差を認めた ($p < 0.01$)。また Barrett 食道の *cagA* 陽性 *H. pylori* 感染者全てが男性であった。萎縮性胃炎の頻度は、コントロール群で 83.3% (n=19/24)、Barrett 食道患者群で 21.7% (n=5/23) であった ($p < 0.01$)。萎縮性胃炎の進行病変と言われている腸上皮化生の有無については、コントロール群の 45.8% (n=11/24) が腸上皮化生を認めたのに対し、Barrett 食道患者群では一例も認めなかった ($p < 0.01$)。これは、Barrett 食道患者群の *H. pylori* 陽性率がコントロール群とほぼ同様にもかかわらず、*H. pylori* の *cagA* 陽性率がコントロール群より明らかに低く、そのため萎縮性胃炎の頻度が低くなり腸上皮化生の発生がみられなかったと考えられた。

口頭発表に際し、副査の玉城教授より、本研究において、1) 学位申請者が果たした役割 2) 申請者が希望する追加研究について質問があった。これに対し申請者は、種々の染色や病理学的評価を用いて検討したと述べたと共に、希望する追加研究に関しては、コロンビアにおける健常人での *H. pylori* 感染率、*cagA* 陽性率、腸上皮化生などについて調べ、*H. pylori* の持つ他の病原因子との相互関係を評価すること、またコロンビア内において胃癌の low risk、high risk の地域差があり、そうした地域での比較検討を行いたいと述べた。次いで、副査の小池教授より、1) *cagA* 陽性、陰性 *H. pylori* 感染で萎縮性胃炎や胃癌の頻度、程度などの差はあるのか 2) *cagA* 陰性 *H. pylori* で除菌は必要か 3) Barrett 食道の発生に人種差はあるか などの質問があった。これに対して申請者は、*H. pylori* 感染や *cagA* の有無で、萎縮性胃炎や胃癌の頻度に差はあるが、たとえ *cagA* 陰性 *H. pylori* 感染であっても、除菌治療が推奨されるということ、また、白人が黒人の 4 倍、白人男性が白人女性の 8 倍高い食道腺癌率であることなどを回答した。続いて主査の浅香教授から、1) コロンビアと日本の *H. pylori* 感染率に違いはあるか 2) コロンビアの Barrett 食道患者を *H. pylori* 陰性群、*cagA* 陰性 *H. pylori* 陽性群、*cagA* 陽性 *H. pylori* 陽性群に分け、酸分泌などを比較したデータはあるか 3) *cagA* 陰性 *H. pylori* は Barrett 食道の発生に影響はあるか 4) 日本よりコロンビアは Barrett 食道が多いが、コロンビア人の胃酸分泌は日本人より高いか 5) コロンビアの *H. pylori* は日本の *H. pylori* と異なるか などの質問があった。これに対し申請者は、コロンビアは日本と同様の高率な *H. pylori* 感染国であるが、酸分泌についてコロンビアと日本、あるいは Barrett 食道患者を、*H. pylori* の有無に分け詳細に比較したデータはないこと、*cagA* 陰性 *H. pylori* 感染は Barrett 食道の発生機序に影響がありそうだということ、コロンビアと日本の菌株はタイプが異なり、例えばコロンビアでは *H. pylori* の病原因子の一つである *vacA* のサブタイプとして *slc* が多く、もう一つの病原因子の *iceA* では *iceA 2* が多い、日本は *vacA* では *sla*、*iceA* では *icA1* が多いと回答した。

本研究は、未知であったコロンビアの Barrett 食道患者と、*H. pylori* 感染、殊に *cagA* 遺伝子との関係を明らかにしたという点で高く評価され、今後の Barrett 食道患者と *H. pylori* との関係や Barrett 食道発生機序の解明が期待される。

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。