

博士論文（要約）

嫌気培養ピロリ菌による
宿主免疫応答に関する研究

蛭川 沙也加

【背景】

Helicobacter pylori (ヘリコバクターピロリ、ピロリ菌) は螺旋状のグラム陰性菌であり、数十年にわたり胃への持続感染を成立させ、胃炎や胃がんを引き起こすことが知られている。我が国において胃がんの死亡率は高く、毎年約5万人が命を落としている。胃がん患者の大半がピロリ菌陽性であることから、ピロリ菌感染症対策は胃がん罹患率を減少させるうえで重要である。

現在ピロリ菌の除菌には、プロトンポンプ阻害剤と抗菌薬が使用されている。しかし近年、薬剤耐性ピロリ菌の出現のため、除菌効率は年々低下している。よってピロリ菌感染症に対する新たな予防・治療対策は急務である。これまでに、ピロリ菌感染症予防ワクチンに関して多くの基礎研究が試行されている。しかし、ヒトにおいてもピロリ菌感染予防効果を示すワクチンの実用化は、未だ達成されていない。

ピロリ菌は通常、胃などの微好気性条件下で培養するとらせん状の形態 (Helical form) を示すが、小腸などの嫌気性条件下では、生きてはいるけれども培養できない VBNC (viable but non-culturable) 状態と考えられている球状の形態 (Cocci form) へと変化する。当研究室のマウスを用いた先行研究により、ピロリ菌が胃に定着し胃炎を起こすには、小腸内で球状に形態変化した Cocci form ピロリ菌が小腸パイエル板から取り込まれ、抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞が誘導されることが必要であることが報告されている (図 1)。そこで、予め Cocci form ピロリ菌をワクチン抗原として投与することにより、ピロリ菌に対する免疫を獲得できるのではないかと発案した。

実験動物を用いたピロリ菌感染予防ワクチンの基礎研究が多くなされているにも関わらず、未だ実用化に至っていない原因のひとつは、ピロリ菌感染時のヒトと実験動物の免疫応答が異なり、実験動物を用いて明らかにした事象がヒトの免疫応答の理解に結びつかないためであると考えられている。現在報告されているピロリ菌ワクチン基礎研究の多くは、実験にマウスを用いている。しかし、高病原性ピロリ菌はマウスの胃内に長期間に渡って定着しないことが報告されている。一方でスナネズミにピロリ菌を接種すると、数年に渡り胃に持続感染し、ヒト病態に類似した慢性胃炎や胃がんを引き起こすという報告がある。従って、ピロリ菌感染系としてスナネズミを用いることで、ヒトにおけるピロリ菌感染の免疫応答への理解に繋がる可能性が期待出来る。そこで本研究では、感染モデル動物としてスナネズミを用い、嫌気培養ピロリ菌による宿主免疫応答の解明を行うことを目的とした。

【方法、結果及び考察】

1. 嫌気培養によるピロリ菌形態変化

本研究ではピロリ菌 ATCC43504 株野生型を用いた。まず、微好気培養により得られた Helical form ピロリ菌を嫌気条件下にて培養し、経時的な形態変化を走査型電子顕微鏡によ

り観察して、嫌気培養菌液の至適培養日数を検討した。その結果、嫌気条件下で培養することによりピロリ菌の形態が Helical form から Coccoid form に変化し、さらに Coccoid form が崩れたような形態が観察された。Coccoid form が崩れたような新たな形態を Fragmented form と定義した。各形態の菌体数を測定したところ、嫌気培養 3 日目に菌液中に含まれる Coccoid form ピロリ菌の割合が最も高く、さらに培養を継続すると Fragmented form の割合が増大した。以降の実験では、微好気培養後の菌液を Helical form 画分、嫌気培養 3 日目の菌液を Coccoid form 画分、嫌気培養 7 日目の菌液を Fragmented form 画分として実験に使用した。

2. 嫌気培養ピロリ菌の基本的性状

嫌気培養菌の基本的性状を調べた。まず、各形態のピロリ菌が微好気条件下で培養可能であるかを調べるために、Helical form 画分、Coccoid form 画分、Fragmented form 画分の菌液を血液寒天培地に塗抹し、微好気条件下、37 °C で 2 日培養後のコロニー形成単位 (CFU) を測定した。その結果、それぞれの CFU は、Helical form 画分と比較して、Coccoid form 画分および Fragmented form 画分ではほぼ 0 % (それぞれ $1.5 \times 10^{-5}\%$ および $1.8 \times 10^{-3}\%$, $p < 0.05$) に減少した。微好気培養ピロリ菌はウレアーゼ活性を有し、胃内で尿素をアンモニアに変え、菌体周辺の微小環境の胃酸を中和することで低 pH 環境下においても生存する。形態変化した嫌気培養ピロリ菌が微好気培養菌と同様の活性を持つかを検討した結果、全ての形態画分において同程度のウレアーゼ活性を有することが判明した。次に、主要な病原因子タンパク質の発現量を Western blot で確認した。その結果、菌体の細胞付着因子である BabA、ウレアーゼ構成因子である UreA、発がんに関連する病原性因子である CagA、CagA を分泌する IV 型分泌装置 (TFSS) 構成タンパク質である VirB7 および VirB9 のいずれのタンパク質発現量も、全ての形態の画分において同程度であった。微好気培養ピロリ菌は、胃上皮細胞株 AGS と共培養すると、細胞表面に付着して TFSS から CagA を細胞内に注入する。細胞内の CagA は、宿主キナーゼによりチロシン残基がリン酸化されるとともに、宿主細胞の NF- κ B 転写因子を活性化する。嫌気培養菌が微好気培養菌と同様の TFSS 活性を有するのかを検討するために、各形態の菌体を AGS 細胞と共培養した後に、CagA のリン酸化レベルと NF- κ B 活性を評価した結果、Coccoid form 画分及び Fragmented form 画分と共培養した細胞では、リン酸化 CagA は検出されず、NF- κ B 活性も非感染細胞と同程度であった。従ってこれら嫌気培養ピロリ菌は TFSS に依存した病原性を示さないことが示唆された。

※博士論文第 2 章に該当する箇所はやむを得ない事由（博士論文の一部が、雑誌掲載等の形で刊行される予定である）のため、要約から除外している。