胃炎における *Helicobacter pylori* の関与

寺田総一郎^{*1)}, 根ヶ山 清^{*2)}, 森下鉄夫^{*1)}, 河西浩一^{*2)}

Significance of H. pylori in fections inchronic gastritis from the morphological viewpoint

Correlations between the amounts of *H. pylori* (HP) or the titers of anti-HP Ab in the sera of the patients with chronic gastritis and neutrophil infiltration in the gastric specimens were studied. HP was detected in 57% (24/42) of the patients with chronic gastritis. Neutrophil infiltration in lamina propria, epithelial cell layer and mucous layer were abundant according to the amount of HP in the gastric specimens ($P < 0.01$). In the HP(+) group by culture, titers of anti-HP Ab of sera were higher than in HP(-) group ($P < 0.02$).

By the ultrastructural studies, 60% of HP were floating in the mucous layer. On the other hand, 30% of HP attached to the gastric epithelial cells. In cases HP were observed frequently, vacuolar degeneration of the epithelial cells and loosening of tight junctions or bacterial invasion in the cells were common.

In conclusion, direct influences of HP to the gastric epithelial cells or their environment such as neutrophil infiltration was detected in the HP(+) chronic gastritis.

Soichiro Terada^{*1)}, Kiyoshi Negayama^{*2)},

Tetuo Morishita^{*1)}, Koichi Kawanishi^{*2)}

key words : chronic gastritis, *H. pylori*, neutrophils, anti-*H. pylori* Ab, ultrastructural studies

近年の *Helicobacter pylori* (HP) 感染の見直しにより、胃疾患における HP の病理的な役割に関する精力的な報告が増加しつつある。HP 感染は初期の間、十二指腸潰瘍や胃潰瘍の根本原因とされたが、HP が必ずしも潰瘍のみに分布せず胃内に不均一に分布していることから、最近では潰瘍のベースである慢性胃炎への関与が指摘されることが多い。さらに、HP 感染の多い地域は同時に胃癌の多発地域であることが疫学的に知られ¹⁾、

Cultural and morphological studies

Anti-*H. pylori* antibody titer (ELISA)

図 1 Methodology

precancerous stage としての HP 感染を伴った胃炎の検討も参考になると思われる。

本報告では、慢性胃炎症例を対象に、好中球を中心とする炎症細胞浸潤の程度や血清中の抗 HP 抗体の力価について検討し、一部の症例では胃組織の超微観察も行った。

対象と方法

(1) 慢性胃炎症例からの HP の検出

内視鏡的かつ組織学的に確認された慢性胃炎症例 42 例 (男性 23 例, 女性 19 例, 平均年齢 47.1 ± 15.1 歳) を対象とした。胃十二指腸ファイバースコープより得られた胃生検組織をただちにホモジナイズ後、スキロー寒天培地と 5% ヒツジ血液寒天培地上で 3~5 日間培養し、生化学的に HP であることを確認後、半定量的に菌数を測定した (図 1)。半定量的な菌数の測定には、得られた胃生検組織を 0.05 ml の滅菌生理食塩水に入れたただちにホモジナイズ後、その 0.015 ml を上述の培地に接種し、発育した菌量により (-)~(3+) の 4 段階にあらわし解析した。

^{*1)} Department of Internal Medicine, Shizuoka Red Cross Hospital, Shizuoka, 420 静岡赤十字病院内科

^{*2)} Department of Clinical Laboratory, Kagawa medical school 香川医科大学中央検査部

また、胃組織をホルマリン固定後、パラフィン包埋を行い、HE 染色ののち組織学的に HP の存在を確認した。

(2) 慢性胃炎症例の胃組織内好中球浸潤の検討

得られた胃生検組織の一部をホルマリン固定後、HE 染色を行い、光顕的に胃粘液層、粘膜上皮層、粘膜固有層にわけ好中球数を算出した。粘膜上皮層、粘膜固有層では、400 倍の強拡大で 10 視野をとり、－から+++までの 4 段階にわけ算出した(－:0/HPF. +:1~10/HPF. ++:11~50/HPF. +++:50 以上/HPF)。

一方、胃粘液層中の好中球数については切片中の全好中球数をカウントした。

(3) 慢性胃炎患者血清中の抗 HP 抗体の測定
胃生検の得られた時期とほぼ同時期の患者血清中の抗 HP 抗体について定量的に検討した。すなわち、患者血清 10 μ l を 200 倍に希釈し、プレート中で 37°C で 1 時間反応後、peroxidase-conjugated F(ab')₂ 抗ヒト IgG ヤギ血清を一次抗体とする ELISA 法(Porton, cambridge 社, Berkshire, UK)を行った。抗ヒト IgG ヤギ血清を各ウェルに 100 μ l 添加後、37°C で 30 分反応させ、発色剤(tetramethyl benzidine and urea peroxide)を付加し室温で 10 分反応させた。そして、2M 硫酸を各ウェルに 50 μ l 添加し発色反応を停止後 30 分以内に、450 nm の波長で吸光度を測定した。10 unit/ml 以上を抗 HP 抗体陽性とした。

(4) HP 感染と組織内好中球浸潤の関連

培養法によって得られた HP 菌量の半定量的な結果と胃生検組織内好中球浸潤について、Student's *t*-test を用い統計的に解析した。また、血清中抗 HP 抗体価と培養法による半定量的な結果との関連についても同様に解析した。

(5) 慢性胃炎症例の胃組織の電顕的観察

培養法によって HP の確認された胃生検の一部をただちに 2.5% glutaraldehyde 溶液で固定後、1% OsO₄ にて後固定しエポキシ包埋を行い、ウラン鉛の二重染色後、JEOL 1200 EX にて観察した。また、一部の症例では、2.5% glutaraldehyde 溶液で固定後、走査電顕による観察も行った。

統計学的検定には、Student's *t*-test を用いた。

図 2 Prevalence of *H. pylori* in chronic gastritis

結 果

(1) 慢性胃炎症例からの HP の検出

慢性胃炎症例 42 例中 24 例(57.1%)に培養法により HP が検出された。年齢別に HP の検出率をみると、高齢になるにつれ検出率の増加がみられた(図 2)。

HP 陽性胃炎と HP 陰性胃炎にわけ、慢性胃炎の内視鏡分類に従い検討したが、所見の差異等有意な差は明らかではなかった。

HP 以外の細菌について同定を試みたが、雑菌が多く今回の検討では菌種は明らかではなかった。

(2) 慢性胃炎症例の組織内好中球浸潤の検討

HP の菌量と胃組織中の好中球浸潤の程度について相関をみた。粘膜上皮層、粘膜固有層では、菌量が多くなるにつれ、好中球浸潤は強くなり($P < 0.01$)(図 3)、その傾向は胃粘膜層中の好中球数に対しても同様に観察された($P < 0.01$)(図 4)。

同様に血清中抗 HP 抗体価と培養法の結果との関連をみたが、HP 抗体陰性群では陽性群に比し有意に低力価であった($P < 0.02$)(図 5)。しかし、各培養陽性群間に有意な抗体価の差はなかった。

(3) 慢性胃炎症例の胃組織の電顕的観察

HP は電顕的にも胃粘液層中に観察された。HP のみられた患者胃電顕組織を対象に、HP 数を算出してみると、60%程度の HP は粘液層中に浮遊していたが(表 1)、30%の HP は胃粘膜上皮細胞の細胞膜に接着または定着していた。また、粘液層へ遊走した好中球に貪食された HP も 3%観察された。そして、培養的検討や超微像で

図3 Analysis of neutrophils infiltration in the gastric specimens

HP が非常に多く観察された症例では、超微的に細胞間隙に入ったものや(図6)、胃粘膜上皮細胞内に侵入したり(図7)、細胞内で壊死したHP像が観察された(図6)。

HP が多く認められた症例では、超微的にHPが少数しか観察されなかった症例にくらべ、胃粘膜上皮細胞の空胞性変化は強く、図8に示すように、しかもその変性はHPが接着もしくは定着した胃粘膜上皮細胞に強かった。そして、粘膜上皮

図4 Numbers of neutrophils in the mucous layer

表1 Distribution of *H. pylori* in the gastric specimens determined under transmission electron microscopy

	Number*	Rate(%)
HP floating in the mucous layer	122	66.3
HP phagocytized by neutrophils	6	3.3
HP facing the plasma membrane to that of gastric epithelia	38	20.6
HP adhered to epithelium forming "adhesion pedestal"	18	9.8
Total number of HP counted	184	100

* Number of HP was counted from three patients with chronic gastritis.

図5 Quantitative assay of anti-*H. pylori* Ab (IgG) according to the semiquantitative analysis of culture result

図 6 Necrotic forms of *H. pylori* (arrowheads) were seen within vacuoles of epithelial cell cytoplasm in gastric tissues.
M : mucous layer. E : epithelial layer. L : lamina propria

細胞間の tight junction も loose になっていた (図 8)。

一方、走査電顕により観察してみると、HP が胃粘膜に接着した部位では microvilli の配列の規則性が乱れ、疎になる部分がみられた。HP の菌体と胃粘膜上皮細胞の microvilli 間、そして microvilli 同士の間隙には glycocalyx が超微的に観察された。

考 察

慢性胃炎の病態における HP の果たす役割については、胃粘膜上皮細胞に直接的に作用すること、そして HP のウレアーゼ活性が強いことから NH_3 による細胞障害などが知られている²⁾。しかし、慢性胃炎という系の中で炎症細胞の一つである好中球の果たす役割は十分には知られていない。今回、筆者らは、HP の量と炎症細胞、特に

好中球浸潤の程度について詳細に調べたが、粘膜上皮層、粘膜固有層では他の報告者と同様、HP の量に比例し、好中球浸潤の程度は強い傾向にあった。

超微的な検討で、HP はおもに粘液層中に存在した。好中球と HP の直接的なコンタクトの像は捉えられなかったが、好中球に貪食された HP を電顕的にはじめて観察した³⁾。そして、この活性化好中球は上述の粘膜上皮層、粘膜固有層内の好中球と同様、粘液層中に HP の菌量に応じて遊走していることが判明した⁴⁾。なお、種々の activator により活性化された好中球が組織障害を惹起する活性酸素を産生し、それが慢性胃炎という系で多大な役割を果たすことは Suzuki ら⁵⁾の報告で明らかにされている。

一方、胃炎患者の血清中の抗 HP 抗体は、HP 陰性胃炎と陽性群の間には、有意差がみられたが、

図7 Living organisms(arrowheads)within epithelial cell cytoplasm
M : mucous layer. E : epithelial layer. L : lamina propria

陽性群間では図5に示す通り、有意な差は認められなかった⁶⁾。陽性群間で差が認められなかった原因として、胃全体のHP量をほぼみていると考えられる抗HP抗体価とpointでHPの量をみている培養法との研究方法の差や、HPが胃内に不均一に分布していることなどが考えられた。

研究者の一部は、HP感染の病的意義に関していまなお疑問をもっている。その理由として、胃炎そのものの定義がいまだに明確でないことや、古典的な胃炎の分類に矛盾点が多いことも混乱を招いているゆえんであろう。しかし、今回の組織学的検索においては、明らかにHPの多い部位には有意に炎症細胞浸潤が強くみられ、また、今回得られた好中球がHPを貪食しているという結果より、生体は明白に異物としてHPに対して反応しているものと考えられた。その意味で、1991年につくられたSydney分類⁷⁾は、HPをその

aetiologyとしてはじめて認知した分類であり、原因から胃炎を分類する立場が今後の主流となるものと思われる。また、炎症細胞の種類や程度で分類する臓器炎の一つとしての胃炎の捉えかたも、今後は必要であろう。

今回の超微視的検討では、HPの多く観察された症例で上皮細胞に強い空胞変性像が認められた⁸⁾。また、上皮細胞内にもまれではあるが、HP像がみられた。Fredericら⁹⁾は、細胞内に侵入したHPの病的意義について報告したが、その病的意義については今後の検討を待ちたい。

結 語

慢性胃炎症例を対象に胃組織からHPを培養法により検出した。ELISA法を用い患者血清中の抗HP抗体の検出を行い、さらに、組織学的に胃粘膜組織内の好中球浸潤や超微像についても解析

図 8 Vacuolar degeneration (arrowheads) occurred in gastric epithelial cell. Near this plasma membrane, many bodies of *H. pylori* were observed.
M : mucous layer, E : epithelial layer, L : lamina propria

した。

① 培養法による検討では、HP は慢性胃炎症例の 57% に検出された。

② 組織中の HP の菌量に応じて、胃粘液層、粘膜上皮層、粘膜固有層中の好中球浸潤は有意に多かった ($P < 0.01$)。

③ 培養法により HP が検出された慢性胃炎群では、陰性群にくらべて有意に抗 HP 抗体価が高値を示した ($P < 0.02$)。

④ 超微的に 60% の HP は胃粘液層中に浮遊しており、30% は胃粘膜上皮細胞に接着または定着していた。また、3% は胃粘液層中の好中球内に貪食されていた。HP が多数観察された症例では、超微的に胃粘膜上皮細胞の空胞変性はいちじるしく、細胞内への HP の侵入像も認められた。

本論文要旨は第 13 回日本炎症学会ワーク

ショップにて発表した。稿を終えるにあたり、日本炎症学会ワークショップに推挙、そして、さらには貴重なご助言をいただいた慶應義塾大学医学部内科学教室土屋雅春教授と東北大学医学部第二病理学教室名倉宏教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Forman, D., Sitas, F., Newell, D.G. et al. : Geographic association of *Helicobacter pylori* antibody prevalence and gastric cancer mortality in rural China. *Int. J. Cancer* 46 : 608-611, 1990.
- 2) Slomiany, B.L., Bilski, J., Sarosiek, J. et al. : *Campylobacter pyloridis* degrades mucin and undermines gastric mucosal integrity. *Biochem. Res. Commun.* 144 : 307-314, 1987.
- 3) Terada, S., Yamazaki, K., Kawanishi, K. : Distribution of *Helicobacter pylori* in gastric specimens and its mucosal attachment. *J. Clin. Electron Microscopy* 24(5-6) : 536-537, 1991.
- 4) 寺田総一郎, 根ヶ山清, 河西浩一 : *Helicobacter pylori*

- 陽性慢性胃炎における胃粘液層中の好中球の動態. 感染症学雑誌 66(9):1293-1294, 1992.
- 5) Suzuki, M., Miura, S., Suematsu, M. et al.: *Helicobacter pylori*-associated ammonia production enhances neutrophil-dependent gastric mucosal cell injury. Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol. 263: G719-725, 1992.
- 6) 根ヶ山清, 寺田総一郎, 河西浩一: *Helicobacter pylori* 感染の診断における血中抗 *H. pylori* 抗体価測定の臨床的意義. 感染症学雑誌 66(9):1293-1294, 1992.
- 7) The working party of *Helicobacter pylori*: The Sydney for the classification of gastritis. The world congress of gastroenterology. 26th-31st Sydney, Australia, August, 1990
- 8) Terada, S., Fujiwara, T., Kawanishi, K.: Pathogenic changes of gastric tissues of *Helicobacter pylori*-associated gastritis. J. Clin. Electron Microscopy 25(5-6): 460-461, 1992.
- 9) Frederic, A. W., Tarnawski, A., Dabros, W. et al.: *Campylobacter pylori* interactions with gastric cell tissue culture. J. Clin. Gastroenterol 12 (Suppl. 1): S99-S103, 1990.