

胃液 *Helicobacter pylori* 抗体の 慢性胃炎における臨床的意義

高山 義一 杉山 敏郎 横田 憲治

札幌医科大学内科学第1講座 (主任 谷内 昭 教授)

札幌医科大学微生物学講座 (主任 小熊恵二 教授)

Clinical Implications of Antibodies to *Helicobacter pylori* in Gastric Juice of Patients with Chronic Gastritis

Yoshikazu TAKAYAMA, Toshiro SUGIYAMA and Kenji YOKOTA

Department of Internal Medicine (Section 1), Sapporo Medical College

(Chief: Prof. A. YACHI)

Department of Microbiology, Sapporo Medical College

(Chief: Prof. K. OGUMA)

ABSTRACT Since the identification and isolation of spiral gram-negative bacterium from the human stomach, the bacterium, renamed *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), has been presumed to be a pathogen with an etiologic role in gastritis and peptic ulcer diseases. In this study, we investigated *H. pylori* antibody in the gastric juice of patients with gastro-duodenal diseases, since the local immune response of gastric mucosa might be associated with the pathophysiology of *H. pylori* infection in such diseases.

1) IgA type antibody to *H. pylori* was predominantly detected in gastric juice and the antibody profile was different from that of the antibody in serum. IgA type antibody to *H. pylori* possessed a secretory component. In addition, IgA type antibody was preferentially detected in the gastric juice of patients infected with *H. pylori* rather than non-infected patients. These observations suggest that *H. pylori* coexists with a specific IgA antibody in gastric juice, although the IgA antibody has a functional form, that is, being a secretory IgA.

2) The titer of IgA type CP3 antibody in gastric juice was correlated with the histological grade of gastritis, suggesting that a local immune response to *H. pylori* in gastric mucosa might be associated with the formation of gastritis.

3) The IgA type *H. pylori* antibody in gastric juice reacted specifically with *H. pylori* itself and the antibody was capable of agglutinating *H. pylori* in vitro, however, in the presence of a rather high concentration of the antibody. Further investigations are required to elucidate whether the IgA type antibody in gastric juice inhibits *H. pylori* from attaching to and invading the gastric mucosa and from forming colonies in the gastric mucosa.

(Received January 20, 1992 and accepted February 6, 1992)

Key words: *Helicobacter pylori*, Gastric juice, Mucosal immunity

1 緒 言

Warren and Marshall¹⁾ (1983)がヒト胃粘膜より分

離培養したグラム陰性らせん状桿菌は *Campylobacter pylori* と命名されていた²⁾が、Goodwin *et al.*³⁾ (1989)により菌体の脂肪酸構成などが毛長イタチの

Helicobacter mustelae に類似することが明らかにされ、それ以降本菌は *Helicobacter pylori* (以下 *H. pylori* 又は HP) と命名され、新菌種として取り扱われることが提唱された。

H. pylori は慢性胃炎および消化性潰瘍患者の胃粘膜より高率に検出され、その粘膜障害機序に関しては多くの報告⁴⁻⁸⁾がある。*H. pylori* の強いウレアーゼ活性により産生されるアンモニアによる胃粘膜障害の可能性^{4,5)}や、*H. pylori* 由来の種々の cytopathic factor の関与^{6,7)}や粘膜防御因子を低下せしめる要因⁸⁾も推測されている。

また、*H. pylori* に対する宿主免疫応答が存在することは、血清に主として IgG 型特異抗体が検出されること^{9,10)}より明らかであり、免疫現象が胃粘膜病変に関与することも考えられる。

本講座においても、吉田・杉山¹¹⁾は、抗 *H. pylori* モノクローナル抗体 (MoAb) を用いた enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) による血清 *H. pylori* 抗体の測定と、その臨床応用を報告した。それに引き続いて、本研究においては、*H. pylori* 感染と胃炎の組織学的程度、胃粘膜局所における免疫応答の指標としての胃液 *H. pylori* 抗体の関連性を追究した。

2 研究方法

2.1 対象

慈啓会病院および同交会病院 (いずれも札幌医大卒業後教育関連施設) において内視鏡検査を施行された患者のうち、胃・十二指腸に出血性病変がなく組織学的に診断された慢性胃炎 18 例 (年齢 19~74 歳, 平均 45 歳), 胃潰瘍 10 例 (stage H₂, S₁, S₂, 年齢 40~80 歳, 平均 59 歳), 十二指腸潰瘍 5 例 (stage H₂, S₁, S₂, 年齢 26~50 歳, 平均 35 歳) および正常対照 8 例 (年齢 19~72 歳, 平均 30 歳) の合計 41 例を対象とした。

2.2 胃液の採取および精製

早朝空腹時、被験者に胃管を挿入し、0.02 M リン酸緩衝食塩液 (PBS, pH 7.4) 500 ml を胃管より注入して胃液を緩衝し、可及的に採取した (130~330 ml 回収), INNaOH で pH 7.4 に調整後ろ過し、3,000 rpm 30 分遠沈した後、上清を回収した。この上清を脱イオン水を用いて 4℃, 48 時間透析した後、凍結乾燥し、保存した。

2.3 胃生検および *H. pylori* の検出

内視鏡検査を施行し胃前庭部小弯の近傍 3ヶ所から生検、2個は *H. pylori* 培養¹²⁾と BBL minitek 尿素ディスク (Becton Dickinson 社, CA, U.S.A.) を用

いるウレアーゼ検出¹²⁾ (ウレアーゼ法) に供した。残りの 1個は 10%ホルマリン固定後、パラフィン切片として、胃炎の組織学的程度の判定と、MoAb CP 1¹¹⁾ による免疫染色に供した。以下、*H. pylori* 培養法、ウレアーゼ法あるいは免疫染色法のいずれかの方法で陽性と判定される場合、“*H. pylori* 陽性”とし、いずれの方法でも陰性の場合には“*H. pylori* 陰性”とした。一方、内視鏡検査終了後 5 ml 採血し、血清として保存した。

2.4 *H. pylori* モノクローナル抗体

既報の *H. pylori* MoAb CP3¹³⁾を使用した。この MoAb は *H. pylori* と強く反応するが、*Campylobacter* (*C.*) *jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *Escherichia* (*E.*) *coli* とは全く反応しなかった。MoAb CP3 の免疫グロブリンクラスは IgM であり、その対応抗原は、25kD 分子である (CP3 抗原)¹³⁾。

2.5 胃液および血清中の *H. pylori* 抗体価の測定

2.5.1 菌体可溶性抗原の調整

ATCC 由来の *H. pylori* (ATCC 43504) を 10%ホルマリン固定後、ultrasonicator model W185 (Branson 社, CT, U.S.A.) により超音波破碎し、12,000 rpm, 30 分遠沈して上清を集め、可溶性抗原 (HP crude 抗原) として用いた。

2.5.2 HP crude 抗原に対する胃液抗体価の測定

吉田・杉山¹¹⁾の方法に準じた。2.5.1 で得た HP crude 抗原 (50 μg/ml) を ELISA プレート (Nunc 社, Denmark) に固相化し、2.2 で得た胃液 (100 μg/ml) 150 μl を反応させた。洗浄後、二次抗体は 1,000 倍希釈ペルオキシンダーゼ標識ウサギ抗ヒト IgA (α 鎖), IgM (μ 鎖) あるいは IgG (γ 鎖) 特異抗体 (DAKOPATTS, Denmark) を用い、o-phenylene diamine (0.4 mg/ml) を基質として発色させ、ELISA リーダーにより吸光度 (O. D. 492 nm) を測定した。

2.5.3 CP3 抗原に対する胃液 IgA 型抗体価の測定

MoAb CP3 精製抗体¹¹⁾ 20 μg/ml を ELISA プレートに固相化し、3% bovine serum albumin (BSA) で蛋白の非特異的吸着を阻止した後、HP crude 抗原 (500 μg/ml) を 4℃一晩反応させた。洗浄後に 2.2 で得た胃液 (100 μg/ml) を 4℃一晩反応させた。次いで 1,000 倍希釈ペルオキシンダーゼ標識抗ヒト IgA (α 鎖) 特異抗体 (DAKOPATTS, Denmark) を室温 2 時間反応させ、以後は 2.5.2 と同様の操作によった。

2.5.4 血清 *H. pylori* 抗体価の測定

胃液 *H. pylori* 抗体測定系と全く同様であるが、血清は 1% BSA-PBS により 2,000 倍に希釈して用いた。

H. pylori 抗体価は Goodwin *et al.*¹⁰⁾ の方法に従い、ELISA Unit (EU) により表した。詳細は吉田・杉山¹¹⁾ が既に報告しているが標準曲線は検体測定毎に作成した。

2.6 胃液中 albumin, 総 IgG および総 IgA 濃度の測定

胃液中 albumin 濃度は免疫比濁法¹⁴⁾ により、胃液中総 IgG および総 IgA 濃度は既報の enzyme immunoassay (EIA)¹⁵⁾ により測定した。

2.7 Western blot 法

2.7.1 胃液 IgA 型 *H. pylori* 抗体により検出される抗原プロフィールの検討

HP crude 抗原を 250 mM 2-mercaptoethanol (2 ME) で還元した後、12.5% sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel に、各レーン当り、150 μ g を電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。3% BSA でブロックした後、1 mg/ml に調整した胃液を 4℃一晩反応させた。洗浄後、ビオチン化ヤギ抗ヒト IgA (α 鎖) 特異抗体 (Vector 社, CA, U. S. A.), およびビオチン化ヤギ抗ヒト secretory component 特異抗体 (Vector 社, CA, U. S. A.) をそれぞれ 5 μ g/ml に調整し、室温 1 時間反応させた後、ペルオキシダーゼ標識ストレ

プトアビジン (Vector 社, CA, U. S. A.) を室温 1 時間反応させた。十分に洗浄し、4-chloro-1-naphtol (0.6 mg/ml) を基質として発色させた。

2.7.2 血清 IgG 型 *H. pylori* 抗体により検出される抗原プロフィールの検討

2.7.1 と反応系は全く同様であるが、血清は PBS で 300 倍に希釈したものをを用い、二次抗体にはビオチン化ヤギ抗ヒト IgG (γ 鎖) 特異抗体 (Vector 社, CA, U. S. A.) を 5 μ g/ml に調整して用いた。

2.8 慢性胃炎の組織学的分類

慢性胃炎は、10%ホルマリン固定胃前庭部生検組織を haematoxylin-eosin (HE) 染色し、Marshall and Warren¹⁶⁾ に従い分類した。すなわち、粘膜固有層に、単核球および炎症細胞浸潤がほとんど認められないものを grade 0、少数の単核球が存在するが、正常範囲内で、かつ浮腫、充血や上皮細胞の破壊などの炎症所見が認められないものを grade 1、単核球の浸潤が明らかに増強しているが多核白血球の浸潤は認めないものを grade 2、単核球の他に多核白血球の浸潤を認めるものを grade 3 とした。各 grade に相当する組織の代表例を Fig. 1 に示した。この研究においては Marshall and Warren¹⁶⁾ に従い、grade 0 および軽微な変化を示す

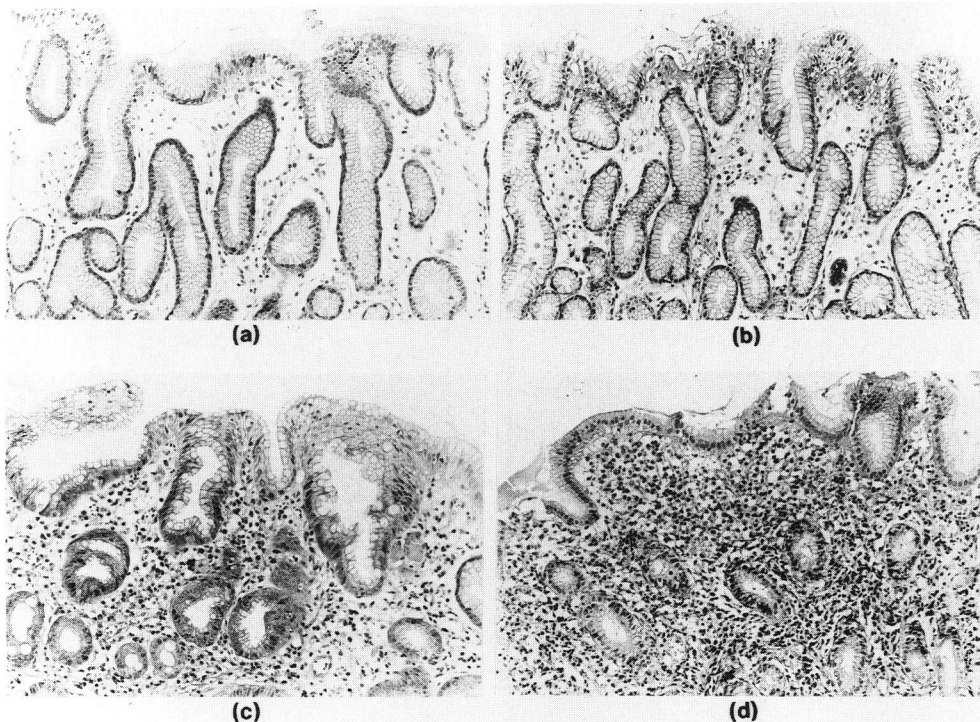


Fig. 1 Classification of histological grade for gastritis. grade 0 (a), grade 1 (b), grade 2 (c) and grade 3 (d).

grade 1 を含めて正常対照として 8 例 (2・1 に記載) を選んだ。また, grade 2 および 3 を胃炎とした。

2・9 胃液 *H. pylori* 抗体と *H. pylori* 菌体との反応性および凝集能

2・9・1 菌体標本の作成

10%馬血清加ブルセラ液体培地で培養された *H. pylori* を 10%ホルマリンで固定し, パラフィン切片として用いた。コントロールとして *C. jejuni* および *C. coli* を用いた。

2・9・2 胃液による免疫染色

2・9・1 で得られた *H. pylori*, *C. jejuni*, *C. coli* の菌体標本を既報¹¹⁾ に準じ酵素抗体法により検討した。胃液は PBS で 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整して用いた。コントロールとして, ① IgA 型 *H. pylori* 抗体が ELISA により検出されない胃液, ②過剰な *H. pylori* 菌による吸収操作を施した胃液, および③ヤギ抗ヒト IgA 抗体 (Cappel 社, PA, U. S. A.) を CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia 社, Sweden) に結合したアフィニティービーズにより, IgA 成分を完全に除去した胃液を用いた。

2・9・3 胃液による *H. pylori* 凝集

10%馬血清加ブルセラ液体培地で培養された *H.*

pylori 菌を 10%ホルマリンで固定した後, PBS に浮遊させ, 濁度を比色計を用いて測定して, 菌数を $10^7/\text{ml}$ に調整した。この浮遊液 100 μl を 96 穴 U 底プレート (Becton Dickinson 社, CA, U. S. A.) に移し, 総 IgA 濃度 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整した胃液を段階希釈したものを 100 μl 加え混和した。4 $^{\circ}\text{C}$ 一晩反応させた後に菌の凝集を観察した。

2・10 推計学的方法

検定には Wilcoxon ノンパラメトリックテストを用いた。

3 研究成績

3・1 血清および胃液 *H. pylori* 抗体の検出および免疫グロブリンクラス

慢性胃炎 18 例, 消化性潰瘍 15 例 (胃潰瘍 10 例, 十二指腸潰瘍 5 例), 正常対照 8 例の計 41 例について, 血清および胃液 *H. pylori* 抗体を免疫グロブリンクラス別に測定した (Fig. 2)。胃液 *H. pylori* 抗体は正常対照群においては, IgA, IgG, IgM いずれのクラスも低値を示したのに対して, 慢性胃炎および消化性潰瘍群においては, IgA 型 *H. pylori* 抗体が IgG あるいは IgM 型のそれに比較して高値を示した。また同一被検者 41

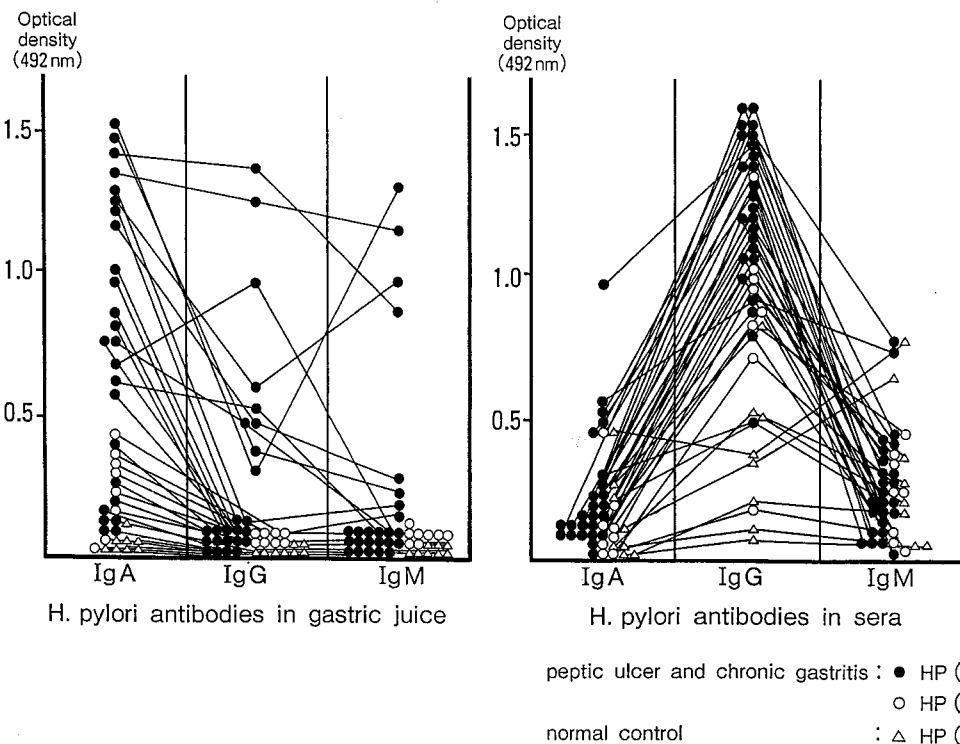


Fig. 2 Immunoglobulin class of *H. pylori* antibodies in gastric juice and sera by enzyme immunoassay.

Table 1 Albumin concentration ratio and active secretion index of IgG and IgA in gastric juice.

Case	albumin concentration ratio	active secretion index of IgG	active secretion index of IgA
1. T. Y.	0.037	0.985	21.90
2. H. D.	0.044	0.920	5.09
3. S. T.	0.012	1.086	13.34
4. T. I.	0.032	1.761	17.05
5. M. H.	0.030	0.953	12.12
mean	0.031	1.081	13.90

albumin concentration ratio = $\frac{\text{gastric albumin concentration (mg/mg}\cdot\text{protein)}}{\text{serum albumin concentration (mg/mg}\cdot\text{protein)}}$

active secretion index of IgG = $\frac{\text{gastric IgG/gastric albumin}}{\text{serum IgG/serum albumin}}$

active secretion index of IgA = $\frac{\text{gastric IgA/gastric albumin}}{\text{serum IgA/serum albumin}}$

例について、血清中の *H. pylori* 抗体を免疫グロブリンクラス別に測定したところ、慢性胃炎、消化性潰瘍群において IgG 型抗 *H. pylori* 抗体が IgM あるいは IgA 型抗体に比較し明らかに高値を示した。また *H. pylori* 陽性、*H. pylori* 陰性と胃液抗体価との関連を検討すると、*H. pylori* 陽性患者の 68.0% (17 例/25 例) で IgA 型抗体価が O. D. 0.5 以上の高値を示した。これは IgG および IgM 型抗体価がそれぞれ O. D. 0.5 以上を示す頻度 20.0% (5 例/25 例) および 16.0% (4 例/25 例) に比較して高かった。

3.2 血清の胃液中への漏出度と胃液中 IgG および IgA の由来

胃液中に IgG 型 *H. pylori* 抗体が高値を示す例がみられた (Fig. 2) ので、O. D. 0.5 以上を示した 5 症例の胃液について Delacroix *et al.*¹⁷⁾ の方法に準じて、albumin, IgG, IgA を測定し、albumin を基準として IgG および IgA の active secretion index を算出した (Table 1)。この 5 症例の血清の胃液中への漏出による混入は、albumin を指標とすると胃液総蛋白中の 1.2~4.4% (平均 3.1%) にすぎず微量であった。また、albumin の secretion index を 1 と仮定すると、IgG のそれは 0.920~1.761 (平均 1.081) であり、胃液中の IgG は 5 症例いずれも血清からの漏出と推定された。一方、IgA については 5.09~21.90 (平均 13.90) であり、胃液中の IgA は胃粘膜局所において産生、分泌されたものと推定された。

3.3 血清 *H. pylori* 抗体価

血清 CP3 抗体測定系の *H. pylori* 感染血清診断上の意義は既に吉田・杉山¹¹⁾ が報告しており、ここでも血清 IgG 型 CP3 抗体価を用い、そのカットオフ値¹¹⁾を 69

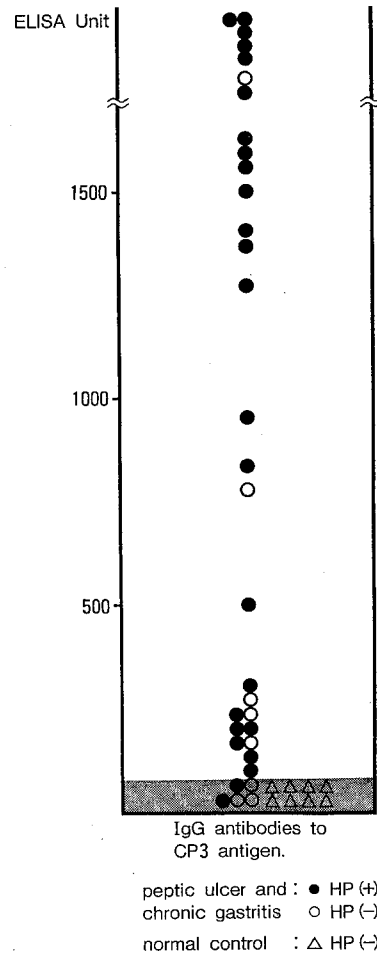


Fig. 3 IgG antibodies against CP3 antigen in sera by enzyme immunoassay.

EUとした。消化性潰瘍および慢性胃炎群では *H. pylori* 陽性の92.0% (23例/25例)が抗体陽性であり、一方、*H. pylori* 陰性の8例中5例が抗体陽性であった。正常対照群8例は全例 *H. pylori* 陰性であり抗体も陰性であった (Fig. 3)。

3・4 HP crude 抗原および CP3 抗原に対する胃液 IgA 抗体価の比較

HP crude 抗原および CP 3 抗原に対する胃液 IgA 型 *H. pylori* 抗体を定量した (Fig. 4)。 *H. pylori* 陰性の胃液では、両抗体価共に低値を示した。 *H. pylori* 陽性25例については、HP crude 抗体価が 919 ± 2406 EU (mean \pm S. D., 以下同様) であるのに比較して CP3 抗体価は 624 ± 1241 EU と、両抗体価の間に有意差を認めなかった。血清 *H. pylori* 抗体との比較上、胃液 IgA

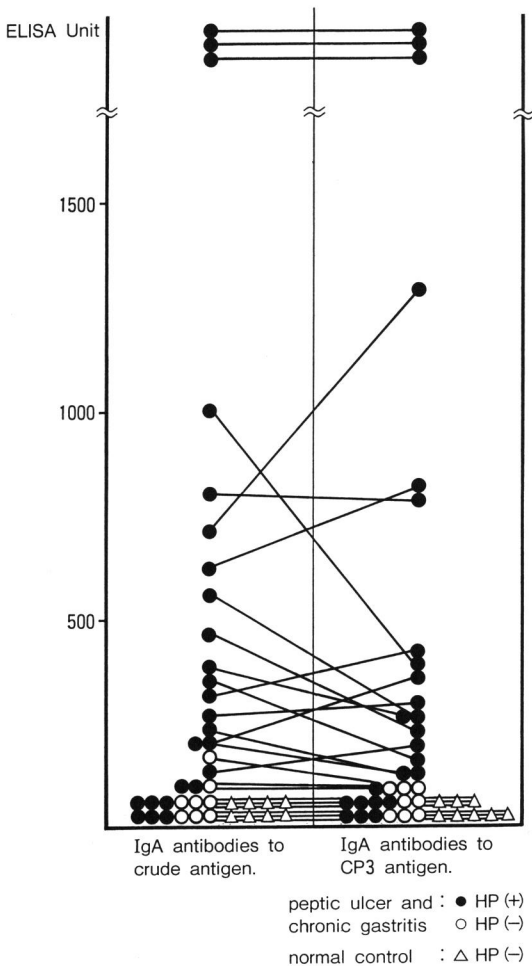


Fig. 4 Comparison between the antibodies to *H. pylori* crude antigen and to CP3 antigen.

抗体価においても、CP3 抗体価を用いた。

3・5 胃液 IgA 型 *H. pylori* 抗体の対応抗原プロフィールの検討

慢性胃炎および胃潰瘍患者の胃液 IgA 型 *H. pylori* 抗体と、同一患者の血清 IgG 型 *H. pylori* 抗体の対応抗原プロフィールを Western blot 法により比較した。 Fig. 5 に代表例を示したが、胃液 IgA 型 *H. pylori* 抗体の対応抗原プロフィールは血清 IgG 型 *H. pylori* 抗体のそれとは異なり、その主要な対応抗原は 60 kD, 30 kD, 25 kD 分子であった。

次に、胃液中 IgA 型 *H. pylori* 抗体が secretory IgA か否かを検討した。HP crude 抗原に胃液 (1 mg/ml) を反応させ、二次抗体として抗ヒト IgA 抗体あるいは抗ヒト secretory component 抗体を反応させた。その結果、二次抗体が異なるにもかかわらず抗原プロフィールはほぼ同一であった (Fig. 6)。すなわち、胃液 IgA 型 *H. pylori* 抗体は secretory component を保有していると推測され、secretory IgA 型が主体と考えられた。

3・6 胃病変における血清および胃液 CP3 抗体価

3・6・1 正常対照群

正常対照群では、8例全例が *H. pylori* 陰性であっ

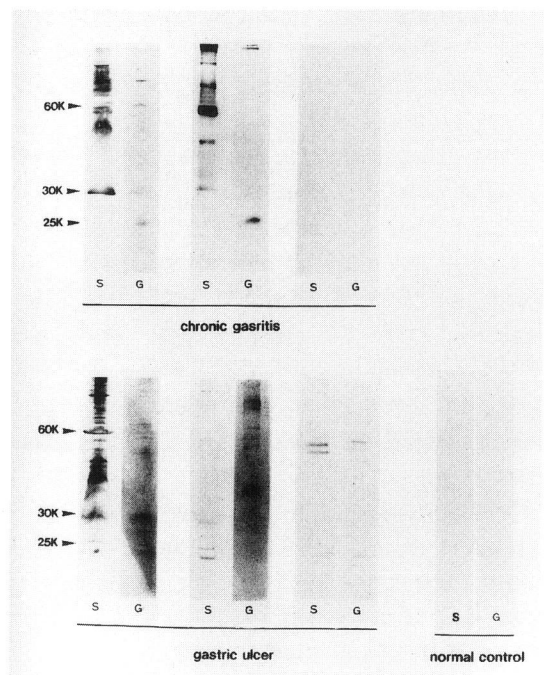


Fig. 5 *H. pylori* antibody profiles of serum and gastric juice by Western blot analysis. (S: serum, G: gastric juice)

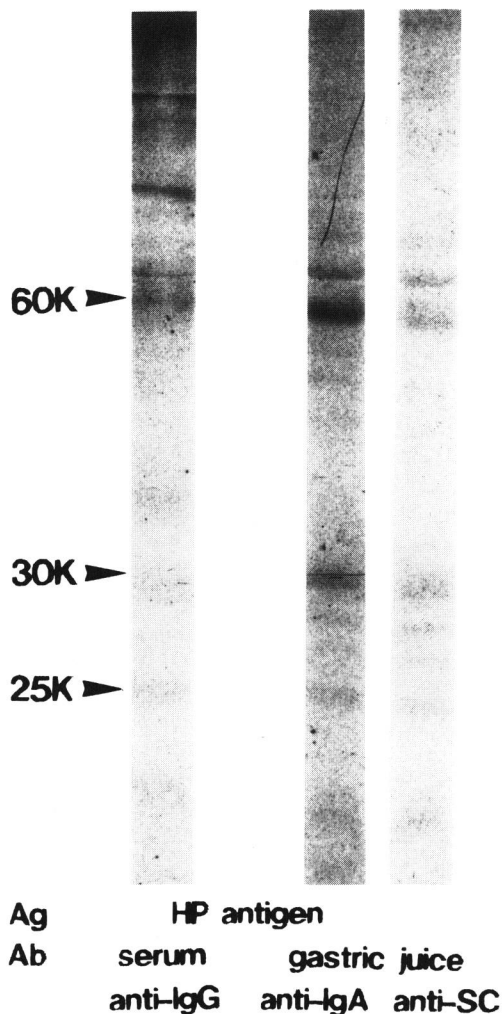


Fig. 6 Immunoglobulin form of IgA type *H. pylori* antibodies in gastric juice by Western blot.

た. 血清 IgG 型 CP3 抗体価および胃液 IgA 型 CP3 抗体価は後に述べる疾患群と比較して著しい低値を示した (Table 2).

3・6・2 慢性胃炎群

慢性胃炎群では 72.2% (13 例/18 例) が *H. pylori* 陽性であり, 血清 IgG 型 CP3 抗体価は, 1241 ± 1515 EU と正常対照群と比較して高値を示した. 胃液 IgA 型 CP3 抗体価は, 384 ± 648 EU と正常対照群と比較して著明に高値を示した (Table 3).

3・6・3 胃潰瘍群

胃潰瘍群では 10 例全例に随伴する胃炎を認め, かつ全例が *H. pylori* 陽性であった. 血清 IgG 型 CP3 抗体価は 1237 ± 1393 EU と高値を示した. 胃液 IgA 型 CP3 抗体価は, 863 ± 1855 EU というれも正常対照群と比較して高値を示した (Table 4).

3・6・4 十二指腸潰瘍群

十二指腸潰瘍群では 5 例全例に随伴する胃炎を認め, 5 例中 2 例が *H. pylori* 陽性であった. これらの 5 例については, 血清 IgG 型 CP3 抗体価は, 正常対照群と比較して高値を示した. 胃液 IgA 型 CP3 抗体価は高値を示す例が 5 例中 3 例に認められた (Table 5).

3・7 *H. pylori* 陽性, 陰性と血清および胃液 CP3 抗体価

全症例をまとめて, *H. pylori* 陽性, 陰性と抗体価を比較し, Table 6 に示した. *H. pylori* 陽性 25 例の血清 IgG 型 CP3 抗体価は 1536 ± 1831 EU であり, 一方, *H. pylori* 陰性 16 例では CP3 抗体価は 232 ± 469 EU であり, *H. pylori* 陽性例で抗体価は有意に高かった. また *H. pylori* 陽性 25 例の胃液 IgA 型 CP3 抗体価は 601 ± 1222 EU, *H. pylori* 陰性 16 例では 16 ± 19 EU であり, *H. pylori* 陽性例で胃液抗体価は有意に高かった.

Table 2 Comparison between histological grade for gastritis and titers of CP3 antibodies in normal controls.

Case (age, sex)	Histological grade	<i>H. pylori</i> detection	CP3 IgG antibodies in serum	CP3 IgA antibodies in gastric juice
1. (72, F)	1	(-)	16	1
2. (20, M)	1	(-)	18	6
3. (35, M)	1	(-)	38	0
4. (21, M)	1	(-)	26	5
5. (23, M)	0	(-)	13	6
6. (29, M)	0	(-)	61	2
7. (19, M)	0	(-)	20	12
8. (19, M)	0	(-)	55	3
mean \pm S. D. (ELISA Unit)			31 \pm 17	4 \pm 4

Table 3 Comparison between histological grade for gastritis and titers of CP3 antibodies in patients with chronic gastritis.

Case (age, sex)	Histological grade	H. pylori detection	CP3 IgG antibodies in serum	CP3 IgA antibodies in gastric juice
1. (73, M)	3	(+)	1511	391
2. (73, M)	3	(+)	1640	2072
3. (65, M)	3	(+)	831	199
4. (72, M)	3	(+)	244	33
5. (62, M)	3	(+)	513	417
6. (21, M)	3	(+)	210	65
7. (22, M)	3	(+)	1411	29
8. (20, M)	3	(+)	317	18
9. (20, M)	3	(+)	4238	1304
10. (43, F)	3	(+)	1280	1822
11. (54, M)	3	(+)	1388	202
12. (44, F)	3	(-)	235	17
13. (62, M)	2	(+)	5729	243
14. (22, M)	2	(+)	54	10
15. (74, M)	2	(-)	1892	37
16. (42, M)	2	(-)	17	2
17. (22, M)	2	(-)	797	32
18. (19, M)	2	(-)	35	19
mean±S. D. (ELISA Unit)			1241±1515	384±648

Table 4 Comparison between histological grade for gastritis and titers of CP3 antibodies in patients with gastric ulcer.

Case (age, sex)	Histological grade	H. pylori detection	CP3 IgG antibodies in serum	CP3 IgA antibodies in gastric juice
1. (73, F)	3	(+)	176	6074
2. (56, M)	3	(+)	2196	820
3. (63, M)	3	(+)	220	255
4. (47, M)	3	(+)	95	41
5. (74, M)	3	(+)	1665	99
6. (41, M)	3	(+)	4327	60
7. (42, M)	3	(+)	114	106
8. (72, F)	3	(+)	1661	800
9. (40, M)	3	(+)	1894	375
10. (80, F)	2	(+)	23	4
mean±S. D. (ELISA Unit)			1237±1393	863±1855

Table 5 Comparison between histological grade for gastritis and titers of CP3 antibodies in patients with duodenal ulcer.

Case (age, sex)	Histological grade	H. pylori detection	CP3 IgG antibodies in serum	CP3 IgA antibodies in gastric juice
1. (41, M)	3	(+)	963	4
2. (50, M)	3	(+)	7241	166
3. (26, M)	3	(-)	286	55
4. (29, F)	3	(-)	140	2
5. (30, M)	2	(-)	67	57
mean±S. D. (ELISA Unit)			1740±3095	56±67

Table 6 Comparison between detection of *H. pylori* and titers of CP3 antibodies.

H. pylori detection	CP3 IgG antibodies in serum	CP3 IgA antibodies in gastric juice
Positive (n=25)	1536±1831 ^a	601±1222 ^c
Negative (n=16)	232±469 ^b	16±19 ^d

a, b, c and d; mean±S.D. (ELISA Unit)

a vs b, c vs d; p<0.05

Table 7 Comparison between histological grade for gastritis and titers of CP3 antibodies.

Histological grade	CP3 IgG antibodies in serum	CP3 IgA antibodies in gastric juice
grade 2 and 3 (n=33)	1300±1733 ^a	479±1127 ^c
grade 0 and 1 (n=8)	31±17 ^b	4±4 ^d

a, b, c and d; mean±S.D. (ELISA Unit)

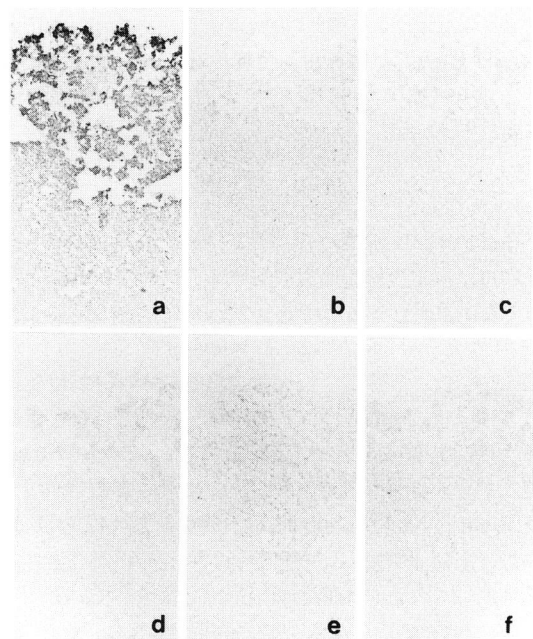
a vs b, c vs d; p<0.05

3・8 胃炎の組織学的程度と血清および胃液 CP3 抗体価

次に、これらの症例の胃炎の組織学的程度と抗体価を比較した(Table 7)。胃炎群 (grade 2 & 3) 33 例の血清 IgG 型 CP3 抗体価は 1300±1733EU であり、一方、正常対照群 (grade 0 & 1) 8 例では、31±17EU であり胃炎群で、血清抗体価は有意に高かった。また、胃炎群 33 例の胃液 IgA 型 CP3 抗体価は 479±1127EU であり、一方、正常対照群 8 例では CP3 抗体価は 4±4EU と低値を示し血清抗体価と同様、胃炎群で胃液 IgA 型 CP3 抗体価は有意に高かった。

3・9 胃液 IgA 型 *H. pylori* 抗体と *H. pylori* 菌との反応性および凝集能

上述の胃液中の IgA 型抗体が、*H. pylori* 菌体と反応するか否かを免疫染色法により検討すると、胃液 IgA 型 CP3 抗体価の高い胃液 (3 例) を用いた場合には菌体はすべて明瞭に染色された(Fig. 7. a)。一方、IgA 型 CP3 抗体陰性の胃液 (Fig. 7. b)、IgA 型 CP3 抗体陽性の胃液を過剰な *H. pylori* により吸収した胃液 (Fig. 7. c) および IgA 分画を完全に除去した胃液 (Fig. 7. d) ではいずれも菌体は染色されなかった。一方、IgA 型 CP3 抗体陽性で、*H. pylori* 菌体と反応する胃液は、Fig. 7. e, f に示すように *C. jejuni* 菌あるいは *C. coli* 菌とは反応を示さなかった。以上より、胃液 IgA 型抗体は *H. pylori* 菌と特異的に反応することが明らかとなっ

**Fig. 7** Reactivity of IgA type *H. pylori* antibody in gastric juice to *H. pylori* (a, b, c and d), *C. jejuni* (e) and *C. coli* (f).

- H. pylori* antibody positive-gastric juice.
- H. pylori* antibody negative-gastric juice.
- H. pylori* antibody positive-gastric juice absorbed with excess *H. pylori*.
- H. pylori* antibody positive-gastric juice absorbed with IgA affinity beads.
- H. pylori* antibody positive-gastric juice.
- H. pylori* antibody positive-gastric juice.

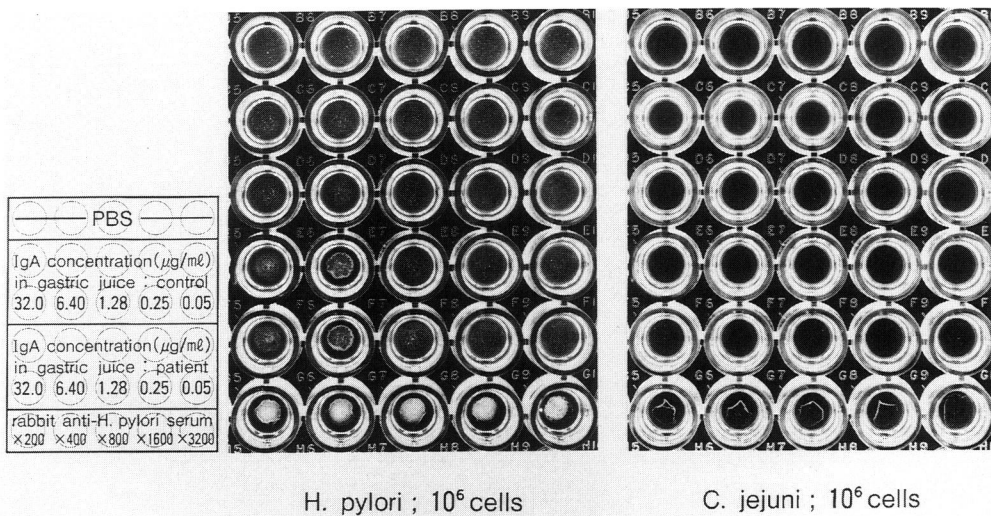


Fig. 8 Direct agglutination test of gastric juice to *H. pylori*.

た。

さらに胃液 IgA 型 *H. pylori* 抗体が *H. pylori* に対して凝集能を示すことが明らかにされた。その反応は Fig. 8 に示すように、3 例について胃液 IgA 抗体は、総 IgA 濃度 6.40–32.0 µg/ml の範囲で *H. pylori* を特異的に凝集した。

4 考 察

Bacteria の消化管への感染と病態形成を検索する場合には、宿主の局所免疫応答という視点からも検索することが重要と考えられる。Rathbone *et al.*¹⁸⁾ は、胃液中の *H. pylori* 抗体を *H. pylori* 粗抗原を用いた ELISA により測定し、慢性胃炎患者の胃液中に IgA 型 *H. pylori* 抗体を検出している。しかし、*H. pylori* 粗抗原を用いた場合には、交叉反応により *Campylobacter* 属に対する抗体も測定される可能性があるという。また Wyatt and Rathbone¹⁹⁾ は、慢性活動性胃炎 (B 型胃炎) において IgA に被覆された *H. pylori* が高率に検出され、これと組織像との関連性を報告している。

本研究では、局所免疫応答を検討するため、まず、胃液 *H. pylori* 抗体の特異性の高い抗体測定系を設定し、胃液 *H. pylori* 抗体と胃炎の組織学的程度との関連や *H. pylori* 菌体との反応性を明らかにし、その病態における意義を追究しようとした。

まず血清および胃液 *H. pylori* 抗体の存在および抗体クラスを確認するために、ELISA による免疫グロブリンクラス別抗体測定系を確立した。

慢性胃炎および消化性潰瘍患者の血清中の *H. pylori*

抗体は IgG 型が主体であることはすでに吉田・杉山¹¹⁾ が報告している。一方、慢性胃炎および消化性潰瘍患者の胃液中の *H. pylori* 抗体については、IgA 型が主体であった。

この点はさらに、Western blot 法によって検討した。胃液 IgA 型 *H. pylori* 抗体の抗原プロフィールは血清 IgG 型 *H. pylori* 抗体のそれと大きく異なり、mucosal immune system が作動していることが示唆された。さらに、胃液 *H. pylori* 抗体が secretory IgA 型として存在することも確認された。

吉田・杉山¹¹⁾ は慢性胃炎および消化性潰瘍に随伴する胃炎の組織学的程度と *H. pylori* の検出頻度及び血清 IgG 型 CP3 抗体価との間に関連性を認めたが、本研究ではさらに、胃液 CP3 抗体価との関連性を詳細に検討した。その結果、胃液 IgA 型 CP3 抗体価は、*H. pylori* 陽性群で有意に高く、また組織学的程度との比較でも胃炎群で有意に高値を示した。この点、胃炎の病態形成には *H. pylori* 感染に伴う胃粘膜における局所免疫反応が関与しているものと推測された。

臨床診断上、IgG 型血清抗体と IgA 型胃液抗体のいずれが感染の指標としてすぐれているかについては、この段階では結論し難い。胃液 IgA 型 *H. pylori* 抗体 (Fig. 4) については、正常対照者数が少ないため、正確なカットオフ値を設けることは困難である。しかし、仮りに、それを 12EU とすると、*H. pylori* 陽性者における胃液 IgA 型抗体陽性率は 88.0% (22 例/25 例) となり、血清 IgG 型抗体の 92.0% (3・3 に記述) にほぼ匹敵する値が得られた。いずれにしても当然、両抗体

の意義は異なると予想されるので、症例の経過による変動を対比しつつ、検討する予定である。

次に、胃液 IgA 型 *H. pylori* 抗体機能面をさぐるべく、*H. pylori* 菌体に及ぼす作用を胃液による *H. pylori* 凝集反応により検討した。少数例の検討ではあるが、胃液 IgA 型 *H. pylori* 抗体は、*H. pylori* に特異的に反応し、さらに *H. pylori* に対し凝集反応を示した。しかしながら、その凝集素価は IgA 濃度に換算して 6.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であって、凝集素価は低いと推察された。Secretory IgA (SIgA) の機能のひとつとして、一般に各種病原ウィルスや細菌に対する防御抗体としての役割が知られているが、SIgA は細菌凝集能が高く、粘膜への付着、侵入、コロニー形成を阻止する働きがあると考えられている²⁰⁾。上述の *in vitro* の結果からは、そのような機序で胃液 *H. pylori* 抗体が感染防御的に作用しているかどうかは疑問視せざるを得ない。

興味深いことには、本研究において、胃液 IgA 型 *H. pylori* 抗体陽性でも胃粘膜にむしろ高頻度に *H. pylori* が検出される症例が経験された。このことから胃液あるいは粘液層内で *H. pylori* と IgA 型 *H. pylori* 抗体が共存し得、抗体存在下においても菌が生存し、胃粘膜へ付着、侵入し得るといふ、特異なエスケープ機構が推測された。その場合、強酸状態のために SIgA が十分に機能し得ないのか、または単に SIgA 産生量の問題なのか等、不明な点が多い。最近、Blaser は長期間にわたる胃粘膜での *H. pylori* 感染と、その免疫反応の持続状態から *H. pylori* 感染を slow viral infection 類似の "slow bacterial infection" の状態と考えるべきかもしれないと述べている (私信)。

この点については胃液 IgA 型抗体の機能をさらに検討すると共に、*H. pylori* 自身の産出する種々の因子と細胞性免疫を含めた局所免疫反応との関連についても解析する必要がある。

5 要 約

- 1) 慢性胃炎および消化性潰瘍患者の胃液中に *H. pylori* 特異抗体は secretory IgA として存在し、*H. pylori* に対し胃粘膜局所免疫が作動していることが明らかにされた。
- 2) 胃液 IgA 型 *H. pylori* 抗体は *H. pylori* が胃粘膜に検出される例で高頻度に検出され、菌と共存状態にあることが推測された。
- 3) 胃液 IgA 型 CP3 抗体価は、胃炎の組織学的程度と有意に相関し、胃炎の病態形成には、*H. pylori* 感染と胃粘膜局所の免疫応答も関与している可能性が

推測された。

- 4) 胃液 IgA 型 *H. pylori* 抗体は *in vitro* において、*H. pylori* 菌と特異的に反応した。さらに胃液 IgA 型抗体は *H. pylori* に対して弱い凝集能も保持していた。しかし *in vivo* における感染防御能についてはさらに検討が必要と考えられた。

謝 辞

御指導、御校閲いただいた本学内科学第1講座谷内昭教授、矢花 剛助教授、今井 浩三助教授、御懇切な御教示、御協力をいただいた本学微生物学講座小熊恵二教授、並びに御協力いただいた諸先生に深謝いたします。本研究は、文部省科学研究費補助金一般研究 B(01480227 谷内)並びに北海道老年医学研究振興会研究費(谷内)の補助による。

文 献

1. Warren, J. R. and Marshall, B. J.: Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **Lancet** **1**, 1273-1275 (1983)
2. Marshall, B. J. and Goodwin, C. S.: Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **37**, 68 (1987)
3. Goodwin, C. S., Armstrong, J. A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M. D., Sly, L., McConnell, W. and Harper, W. E. S.: Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov., as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **39**, 397-405, (1989)
4. Marshall, B. J. and Langton, S. R.: Urea hydrolysis in patients with *Campylobacter pyloridis* infection. **Lancet** **1**, 965-966 (1986)
5. Hazell, S. L. and Lee, A.: *Campylobacter pyloridis*, urease, hydrogen ion back diffusion, and gastric ulcers. **Lancet** **2**, 15-17 (1986)
6. Figura, N., Guglielmetti, P., Rossolini, A., Barberi, A., Cusi, G., Musmanno, R. A., Russi, M., and Quaranta, S.: Cytotoxin production by *Campylobacter pylori* strains isolated from patients with peptic ulcers and from patients with chronic gastritis only. **J. Clin. Microbiol.** **27**, 225-226 (1989)
7. Leunk, R. D., Johnson, P. T., David, B. C., Kraft, W. G. and Morgan, D. R.: Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. **J. Med. Microbiol.** **26**, 93-99 (1988)

8. Sarosiek, J., Slomiany, A. and Slomiany, B. L.: Evidence for weakening of gastric mucus integrity by *Campylobacter pylori*, **Scand. J. Gastroenterol.** **23**, 585-590 (1988)
9. Rathbone, B. J., Wyatt, J. I., Worsley, B. W., Trejdosiewicz, L. K., Heatley, R. V. and Losowsky, M. S.: Immune response to *Campylobacter pyloridis*. **Lancet** **1**, 1217 (1985)
10. Goodwin, C. R., Blincow, E., Peterson, G., Sanderson, C., Cheng, W., Marshall, B. J., Warren, J. R. and McCulloch, R.: Enzyme-linked immunosorbent assay for *Campylobacter pyloridis*: Correlation with presence of *C. pyloridis* in the gastric mucosa. **J. Infect. Dis.** **155**, 488-494 (1987)
11. 吉田 博清, 杉山 敏郎: 胃疾患における *Campylobacter pylori* 感染の免疫学的検討. **札幌医誌** **59**, 227-237 (1990)
12. 横田 憲治, 小熊 恵二, 吉田 博清, 高山 義一, 杉山 敏郎, 矢花 剛, 谷内 昭, 樽林 陽一, 磯貝 浩, 磯貝 恵美子: 胃壁中の *Campylobacter pylori* の同定法の検討と血中抗菌抗体価の測定. **感染症誌** **64**, 597-603 (1990)
13. 杉山 敏郎, 吉田 博清, 今井 浩三, 矢花 剛, 谷内 昭, 横田 憲治, 小熊 恵二: 抗 *Campylobacter pylori* モノクローナル抗体の作製. **日消誌** **85**, 1128 (1988)
14. Teppo, A. M.: Immunoturbidimetry of albumin and immunoglobulin G in urine. **Clin. Chem.** **28**, 1359-1361 (1982)
15. 高橋 勉: Enzyme-immunossay 法によるヒト唾液中分泌型 IgA の測定について. **日大歯学** **58**, 627-635 (1984)
16. Marshall, B. J. and Warren, J. R.: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet** **1**, 1311-1315 (1984)
17. Delacroix, D. L., Hodgson, H. J. F., McPherson, A., Dive, C. and Vaerman, J. P.: Selective transport of polymeric immunoglobulin A in bile. **J. Clin. Invest.** **70**, 230-241 (1982)
18. Rathbone, B. J., Wyatt, J. I., Worsley, B. W., Shires, S. E., Trejdosiewicz, L. K., Heatley, R. V. and Losowsky, M. S.: Systemic and local antibody responses to gastric *Campylobacter pyloridis* in non-ulcer dyspepsia. **Gut** **27**, 642-647 (1986)
19. Wyatt, J. I. and Rathbone, B. J.: Immune response of the gastric mucosa to *Campylobacter pylori*. **Scand. J. Gastroenterol.** **23** (Suppl. 142), 44-49 (1988)
20. Williams, R. C. and Gibbons, R. J.: Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: A mechanism of antigen disposal. **Science** **177**, 697-699 (1972)

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第1講座 高山義一