

| | |
|---------|---|
| 氏名 | くしやこうじ 櫛谷 幸嗣 |
| 学位 | 博士 (医学) |
| 学位記番号 | 新大院博(医)第23号 |
| 学位授与の日付 | 平成17年 3月23日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 博士論文名 | A Study on the Regulation and Energy Requirements of <i>Helicobacter pylori</i> Motility and Its Inhibitors (ヘリコバクター・ピロリがもつ運動性の調節とエネルギー 要求性そして阻害薬に関する研究) |
| 論文審査委員 | 主査 教授 青柳 豊 副査 教授 山本 達男 副査 教授 下條 文武 |

博士論文の要旨

【目的】

ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) は胃粘膜に持続感染するグラム陰性細菌で、胃炎や消化性潰瘍の原因となり、胃癌の細菌性リスク因子でもある。菌端に4～6本の鞭毛をもっていて、強い運動性を示すが、この運動性はヘリコバクター・ピロリの胃粘膜への定着に必須であると考えられている。また、前庭部・胃体部間でのヘリコバクター・ピロリの移動が除菌治療で問題になる場合も報告されている。申請者らは、このようなヘリコバクター・ピロリの運動性について、調節とエネルギー要求について解析するとともに阻害薬の研究を行った。

【材料と方法】

- 1) ヘリコバクター・ピロリの分離： 胃生検組織を分離培地に塗布し、37℃で4～6日間10%酸素の存在下で微好気培養した。分離菌は-80℃で冷凍保存した。
- 2) 液体培地中での運動性解析： 10%ウシ胎児血清 (FBS) 添加の Brain Heart Infusion (BHI) ブロス中で、位相差顕微鏡下 37℃で解析した。運動速度はプログラムC-イメージングC-MEN を使った運動解析装置で解析し、0.05 秒の解析を15回(合計0.75秒)測定して速度 ($\mu\text{m/s}$) を求めた。平均速度は、異なった5視野で約300の細菌について測定した結果から求めた。非運動細菌の速度はホルマリン処理した細菌のブラウン運動 ($0.4 \pm 0.3 \mu\text{m/s}$) とし、その10倍以上の速度 ($> 4.0 \mu\text{m/s}$) を運動性陽性と判定した。
- 3) 軟寒天培地を使った運動性解析： 0.3%寒天を含んだ BHI 寒天平板の中央にヘリコバクター・ピロリを植菌し、37℃で3～4日間微好気培養し、出現した遊走集落を肉眼で判定した。
- 4) 薬剤感受性試験： 米国 NCCLS の標準法に従って、Mueller-Hinton 培地に5%ヒツ

ジ血液を加えた培地を用いた寒天平板希釈法で試験し、最小発育阻止濃度 (MIC、 $\mu\text{g/ml}$) を求めた。

- 5) 走化性試験：ヘリコバクター・ピロリを 10%FBS 添加 BHI プロス (pH 7.4) 中に 5×10^7 CFU/ml で浮遊させ、そこに pH を調節した培地を入れた 10 μl キャピラリーを挿入し、37°C で微好気培養後、キャピラリー内に移動した細菌数を計数板を使って測定した。
- 6) 電子顕微鏡解析：グルタルアルデヒドとオスミウム酸で固定後、臨界点乾燥、白金・パラジウムコーティングを行い、走査型電子顕微鏡で観察した。

【結果および考察】

- 1) 弱酸性 (pH 6.0) による走化性と運動速度の調節：ヘリコバクター・ピロリを pH 7.4 に浮遊後、pH 4.0、pH 5.0、pH 6.0、pH 7.4 に調節したキャピラリー内への走化性を検討した結果、pH 6.0 で顕著な走化性が確認された。また、各 pH の遊走速度を求めた結果、pH 6.0 で最も早い平均遊走速度 (95 $\mu\text{m/s}$) が測定された。胃粘膜を被う粘液層には重炭酸イオンの濃度勾配によって、pH が 1.5 から中性の pH 勾配がある。従って、ヘリコバクター・ピロリは粘膜上皮に近い pH 6.0 近傍の粘液層内を高速で移動していることが考えられた。
- 2) 運動阻害薬を用いた解析：プロトン-イオノフォア (CCCP; carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone)、 Na^+ チャネル阻害剤 (アミロライド)、ソディウム-イオノフォア (モネンシン) ATP 合成阻害剤 (オルトバナジウム酸ナトリウム) について、40 μM の濃度でヘリコバクター・ピロリに対する運動阻害効果を検討した結果、CCCP で最も強い運動阻害効果が得られた。CCCP による阻害効果は 10 μM の濃度でも顕著であった。以上の結果から、ヘリコバクター・ピロリがプロトン駆動型の鞭毛モーターをもつことが考えられた。
- 3) 胃粘膜微小循環改善薬による遊走阻害：胃粘膜微小循環改善薬トロキシピド (2.9 $\mu\text{g/ml}$) がヘリコバクター・ピロリ遊走阻止作用を示すことを見いだした。トロキシピドの最小発育阻止濃度は $\geq 256 \mu\text{g/ml}$ であったので、その阻害作用は遊走性に特異的であると考えられた。
- 4) 胃粘膜での鞭毛形態の解析：ヒト胃粘膜に感染したヘリコバクター・ピロリの鞭毛形態を走査型電子顕微鏡で観察した結果、4~6本の鞭毛が束になり太い一本のらせん鞭毛を形成していた。これが粘膜上で遊走する菌の鞭毛形態であると考えられた。

【結論】

ヘリコバクター・ピロリは、4~6本の鞭毛を一本の太いらせん鞭毛に束ねることで強い回転運動をし、粘膜上方の弱酸性 (pH 6.0) の粘液内を平均遊走速度 95 $\mu\text{m/s}$ で移動していることが考えられた。その鞭毛モーターはプロトン駆動型で、酸性環境にすむヘリコバクター・ピロリには都合のよいメカニズムであった。胃粘膜微小循環改善薬 (トロキシピド) がヘリコバクター・ピロリの運動性を阻害することを見いだしたが、運動性阻害薬と酸抑制薬・抗菌薬の組み合わせも今後検討すべき除菌療法の 1 つであると考えられた。