

胃・十二指腸疾患から分離した *Helicobacter pylori* の 遺伝子型による好中球機能に対する影響

德里夏提・依米提 (デイリシャト・イミド)

広島大学医学部臨床検査医学 (主任: 神辺真之教授)

受付 平成 12 年 12 月 12 日

受理 平成 13 年 1 月 22 日

最近, *Helicobacter pylori* (以下 *H. pylori*) が各種胃・十二指腸疾患の病因のひとつに挙げられている。*H. pylori* の細胞障害性には, *H. pylori* の産生する空胞化サイトトキシン (VacA) ならびにサイトトキシン関連蛋白 (CagA) の好中球機能に対する影響が重要であると言われている。本研究は, *H. pylori* の胃・十二指腸疾患における胃粘膜障害の機序を解明するため, 胃・十二指腸疾患患者より *H. pylori* を分離後, 培養し, その培養上清の好中球生存率および遊走能に対する効果を, *vacA* ならびに *cagA* 遺伝子の存在との関連下に検討した。

培養株は *vacA*⁺ *cagA*⁺ 型株または *vacA*⁺ *cagA*⁻ 型株の二通りのみであった。*cagA* の存在する *H. pylori* 培養上清は *cagA* の存在しないものより強く好中球の遊走能を活性化させた。一方, *vacA*⁺ *cagA*⁺ 型株 または *vacA*⁺ *cagA*⁻ 型株の培養上清は, 好中球生存率に影響を与えなかった。以上の結果は, *vacA*⁺ *cagA*⁺ 型, *vacA*⁺ *cagA*⁻ 型いずれの *H. pylori* 株も好中球の生存率へは影響を与えないが, どちらも好中球遊走活性化能を持つこと, さらには *vacA*⁺ *cagA*⁻ 型株よりも *vacA*⁺ *cagA*⁺ 型株の方が強い活性化能を持つことを示している。本研究の成果は従来の *H. pylori* の胃粘膜障害で報告されている, 直接的障害説および好中球を経由しての間接的障害説を実証する上での一助となる。

Key words : *Helicobacter pylori* (ヘリコバクターピロリ), Polymorphonuclear leukocytes (好中球), Chemotaxis (遊走能), Vacuolating cytotoxin gene: *vacA* (空胞化サイトトキシン遺伝子), Cytotoxin associated protein gene: *cagA* (サイトトキシン関連蛋白遺伝子)

これまでに, *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) は胃粘膜に高率に感染して, 胃潰瘍や慢性胃炎など, 胃粘膜障害の重要な病因であることが証明されている^{1,25)}。胃粘膜に高率に感染し¹⁹⁾, さらに, この細菌が胃癌の病因との報告もあり^{8,13)}, *H. pylori* の胃粘膜障害への機序の解明は重要な課題となっている。その胃粘膜に対する障害の機序は, *H. pylori* 感染により胃粘膜上皮間や粘膜固有層に著しい多核白血球と同時にリンパ球や単球浸潤が特徴的であること⁴⁾, また, 感染局所組織での炎症サイトカイン産生の亢進などの関与が既に示唆されている⁵⁾。*H. pylori* は胃粘膜表層粘液と被蓋細胞に感染し, ささまざまな代謝産物と酵素を放出する。そのなかでもムチナーゼ, リパーゼ, ホスホオリパーゼ, プロテアーゼ, そして空胞化サイトトキシン (vacuolating cytotoxin: VacA) とサイトトキシン関連

蛋白 (cytotoxin-associated protein: CagA) などは胃粘液粘性を低下させる結果, 胃粘液バリアーを破壊させると思われる。したがって, *H. pylori* により, まずマクロファージが活性化され, TNF- α や IL-1 などのサイトカインが産生される。その後 *H. pylori* 由来の, 細胞に空胞化をきたす物質 VacA とその連動している蛋白の CagA⁶⁾ が, 好中球遊走因子として重要な役割を果たしている interleukin-8 (IL-8) を産生する^{12,21,23,30)}。また, 白血球の遊走および活性因子として, *H. pylori* 由来の蛋白である *H. pylori* neutrophil-activating protein (HP-NAP) と N-formyl-methionylleucylphenylalanine (FNIP) や lipopolysaccharide が産生されることも報告されている³²⁾。さらに好中球 (polymorphonuclear leukocytes: PMNs) をはじめとした多核白血球, リンパ球, マクロファージなどの主要な

細胞性メデイエーターが胃粘膜に遊走, 浸潤, 活性化し, 血管透過性を亢進させる。その結果産生される活性化酸素や蛋白分解酵素などの多くの細胞障害物質が細胞体外に放出され, それらが *H. pylori* より分泌された VacA¹⁴⁾と共に胃粘膜組織を破壊する。このような機序が胃粘膜における炎症反応の重要な機序と考えられている。

本研究の目的は上述のように諸説報告されている, *H. pylori* の胃・十二指腸疾患における胃粘膜障害の機序の解明である。

対象および方法

1. 対象

H. pylori の検査を含む内視鏡検査を施行した胃炎患者31例, 十二指腸潰瘍患者18例, 胃癌患者22例, 手術後の残胃患者20例を選んだ。平均年齢65.1±11歳で, 男女比は男性の方が約2.5倍と女性より多い (Table 1)。

2. 方法

1) *H. pylori* の培養および培養上清の調製

上部消化管内視鏡検査にて採取した胃粘膜を選択培地であるスキロー培地²²⁾に接種し, 微好気性条件下 (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) にて5-7日間培養し, 発育したコロニーをさらに血液寒天培地にて4-5日間増殖させた。発育した菌株を *H. pylori* 同定のための API CAMPY キット (BIOMERIUX S. A., France 製) を用いて同定した。また, *H. pylori* が発育したコロニーを1白金耳取り, 5%牛胎児血清 (fetal bovine serum: FBS) 加 Brucell broth 培養液 2 ml の中に植菌し, 6日間培養した後, 温室にて8000×g, 15分間遠心し, 得られた上清と *H. pylori* 菌沈殿を実験に供した。

コントロールとして10% FBS 加 Brucell broth 培養液を用いた。

2) ヒト好中球の調製

H. pylori とヒト好中球の関係を検討するためにヒト好中球を調製した。まず, 成人より採取したヘパリン加末梢血を Monoiooly resolving Medium (Flow 社製)

に重層し, 温室にて300×g, 30分間遠心した。遠心後, 好中球層をパスツールピペットにて採取し, 0.1 M, pH 7.0 のリン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline) にて洗浄した。その後, 細胞濃度が1×10⁷/ml になるように10% FBS 加 RPMI 1640 培地溶液に好中球を再浮遊させた。好中球を trypan blue 染色により95%以上の生存率を確認したものを実験に用いた。

3) PCR による *H. pylori* 遺伝子型の検出

(1) Brucell broth 培養液中の *H. pylori* を遠心し, 得られた沈殿から DNA 抽出キット (セパージン三光純薬) を使ってクロモソーム DNA を抽出した。エタノール沈殿後, 260 nm における吸光度を測定し, DNA 濃度を求めた。そして, PCR 反応より *vacA* と *cagA* の遺伝子を増幅後, 遺伝子型株の検出を行った。

(2) PCR の条件

H. pylori 菌増幅領域と用いたプライマーの配列に関して, *cagA* の場合は Dz3 (5'-AGTAAGGAGAAA-CAATGA-3') R009 (5'-AATAA-GCCTTAGAGTCTTTTT-GGAAATC-3'); 得られた産物塩基配列は 1,350 bp), *vacA* 遺伝子プライマーは F6 (5'-GCTTCTCTTACCACCAATGC-3') と R20 (5'-TGCTAGGGTTGTTCCATG-3'); 得られた産物塩基配列は 1,160 bp) を使用した²⁾。PCR は 50 μl 容量で行い, その反応液組成は 10 mg *H. pylori* から抽したクロモソーム DNA, 200 mM dNTPs, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris, 2.5 U Amplitaq (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn), 30 pmol プライマーとした。PCR プログラムは *vacA* の場合は, 熱変成94℃にて45秒, アニーリング55℃にて45秒, 伸長反応72℃にて45秒を35サイクル行った。さらに, 終了時に伸長10分の反応を加えた。一方, *cagA* の場合はアニーリングの際のみ異なり 50℃にて45秒の PCR を行った。PCR 産物は1.5%アガロースで電気泳動し, 臭化エチジウムブロマイド染色により検出した (Fig. 1)。

Table 1. Patient characteristics

	N=91	Age	Male : Female
chronic gastritis	31	56.4±10	19 : 12
duodenal ulcer	18	53.7±10	13 : 5
gastric cancer	22	68.6±14	17 : 5
remnant gastritis	20	61.8±10	16 : 4
Total	91	65.1±11	65 : 26

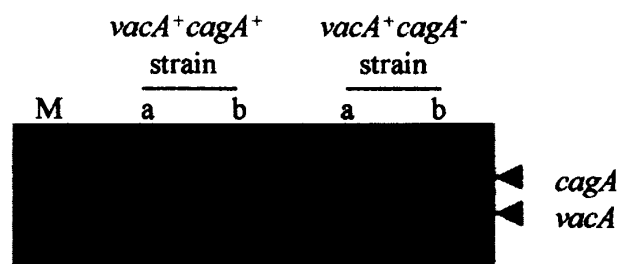


Fig. 1. PCR typing of *vacA* and *cagA* from *H. pylori*.

4) 好中球に対する影響

健康人から分離した好中球を 1×10^7 /ml になるように 10% FBS 加 RPMI 1640 溶液に浮遊させた 96-well plate に、 $100 \mu\text{l}$ 好中球 1×10^6 個/ml および各 *H. pylori* 培養上清 $20 \mu\text{l}$ を加え、 37°C 、5% CO_2 下にて 24 時間培養した。培養後、好中球を trypan blue にて生存率を確認した。

コントロールとしては Brucell broth 染色にて 95% 以上の生存率を確認したヒト由来好中球を用いた。

5) 好中球遊走能 (chemotaxis) の測定

Boyden chamber 法¹⁶⁾に従い、modified Boyden chamber にて好中球遊走能を測定した。chamber (Neuro probe 社製) の下層に、走化性因子としての *H. pylori* 培養上清液 $150 \mu\text{l}$ を入れ、口径 $5 \mu\text{m}$ のフィルター (Neuro probe 社製) を装着した後、上層に健康人から分離した好中球 1×10^6 個/ml 入れ、 37°C 、5% CO_2 下に 60 分間培養した。培養後、フィルターを Diff-Quik 染色液 (国際試薬社製) で染色した。フィルターを光学顕微鏡 1,000 倍の倍率にて、3 視野に遊走した好中球をカウントし、好中球遊走能値とした。同時に *H. pylori* 培養上清液のかわりに、コントロールとして 5% FBS 加 Brucella broth 培養液を用い、その時のフィルター下面に遊走された好中球数をカウントすることにより *H. pylori* 培養上清によってヒト好中球の遊走能と比較した²⁰⁾。

成績は、平均値 \pm SD (standard deviation of means) で表した。検定は、Mann-Whitny U test を用い、p 値が 0.05 以下の場合に有意差があると判断した。

結 果

1. 胃疾患における *H. pylori* 分離陽性率および *vacA* と *cagA* 遺伝子検出

H. pylori 分離陽性率は対象疾患 91 例中 72 例 (79.1%) であった (Table 2)。十二指腸潰瘍例は全例 18 例 (100%) 陽性であったが、慢性胃炎例は 31 例中 28 例 (90.3%)、手術後残存胃例は 20 例中 12 例 (60%) であった。胃癌は 22 例中 14 例 (63.6%) と、良性的他

3 疾患群に比較してやや低率傾向であったが、統計的有意差は認められなかった。

cagA⁺ 型株と *vacA*⁺ 型株の陽性率は、*vacA*⁺ 型株については *H. pylori* の陽性例 72 例全例において陽性であった。*cagA*⁺ 型株は慢性胃炎例で 28 例中 25 例 (89.3%)、胃癌においては 14 例中 11 例 (78.6%) と、十二指腸潰瘍例および手術後残存胃例の全例陽性に比較して、低率傾向を示した。

2. *H. pylori* 培養上清濾過液の好中球生存率に及ぼす影響

10^6 個 ($100 \mu\text{l}$) 好中球溶液 96-well plate に $20 \mu\text{l}$ *vacA*⁺ *cagA*⁺ 型の *H. pylori* 培養上清液と *vacA*⁺ *cagA*⁻ 型の *H. pylori* 培養上清濾過液を別々に加え、24 時間 37°C 、5% CO_2 下にて培養した好中球を trypan blue により染色し、再度その生存率を測定した。その結果、*vacA*⁺ *cagA*⁺ 型、*vacA*⁺ *cagA*⁻ 型によるそれぞれの好中球の生存率は $85 \pm 3\%$ 、 $87 \pm 5\%$ と差がなかった。コントロール群における好中球の生存率は 95% と *H. pylori* 培養上清群と統計的有意差は認められなかった (Fig. 2, 3)。なお、各胃・十二指腸疾患から分離した株の間で好中球の生存率に有意差はなかった。

3. *H. pylori* 培養上清液の好中球遊走能に及ぼす影響

10% FBS 加 RPMI 1640 培地溶液を走化性因子として、1 時間培養を行った後の好中球のフィルターに遊走された数は 91 個/3 視野 (倍率 1,000 倍) であった。これをコントロールとした時の慢性胃炎例、十二指腸潰瘍例、胃癌例と手術後残存胃例より分離した *vacA*⁺ *cagA*⁺ 型株の *H. pylori* 培養上清液による好中球遊走能は、慢性胃炎例が 135 個/3 視野、十二指腸潰瘍例が 138 個/3 視野、胃癌例が 133 個/3 視野、手術後残存胃例が 141 個/3 視野と統計的に有意に活性化された。また、6 例の *vacA*⁺ *cagA*⁻ 型株も 119 個/3 視野とコントロールに比較して、統計的に有意な活性化を認めた。また、*vacA*⁺ *cagA*⁺ 型株と *vacA*⁺ *cagA*⁻ 型株間では *vacA*⁺ *cagA*⁺ 型株の方が活性化が強いことが統計的有意差として認められた (Fig. 4)。

Table 2. Isolation of *H. pylori* and detection of *cagA* and *vacA* genes by PCR

Diseases	N	<i>H. pylori</i> (+)	<i>cagA</i> (+)	<i>vacA</i> (+)
Chronic gastritis	n=31	28 (90.3%)	25 (89.3%)	28 (100%)
Duodenal ulcer	n=18	18 (100%)	18 (100%)	18 (100%)
Gastritic cancer	n=22	14 (63.6%)	11 (78.6%)	14 (100%)
Remnant stomach	n=20	12 (60%)	12 (100%)	12 (100%)
Total	n=91	72 (79.1%)	66 (91.7%)	72 (100%)

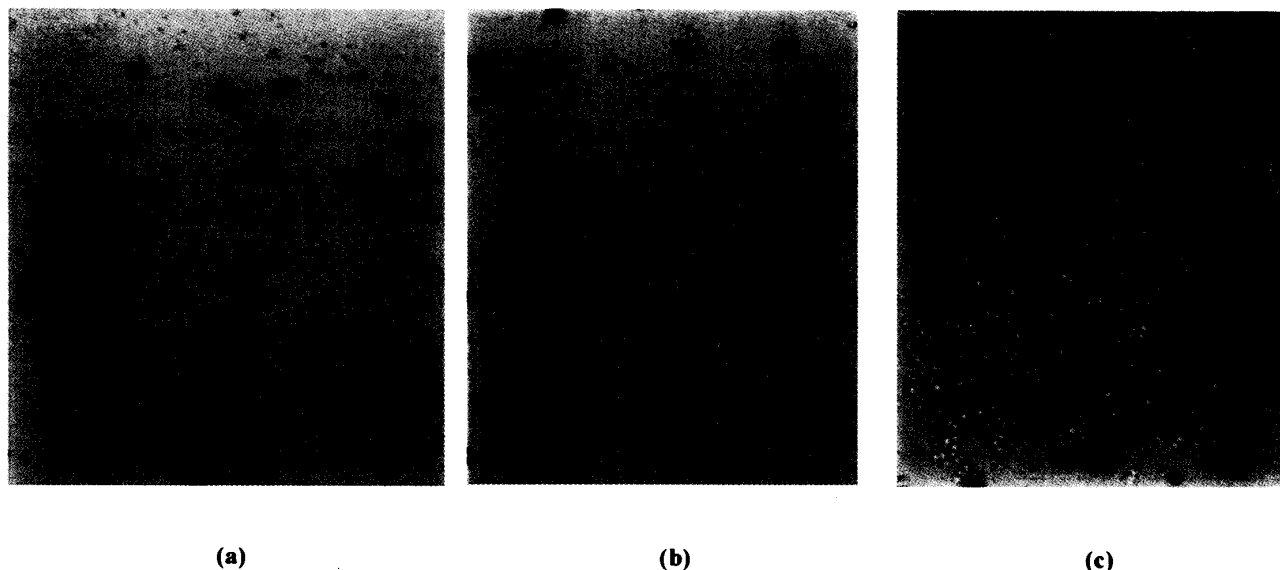


Fig. 2. Incubation of PMNs with culture supernatants of *Helicobacter pylori*. PMNs were stained in purple by Giemsa staining.

- (a): Brucella broth medium with 24 hours incubation of PMNs.
- (b): Incubated with culture supernatant of *H. pylori vacA+ cagA+* type.
- (c): Incubated with culture supernatant of *H. pylori vacA+ cagA-* type.

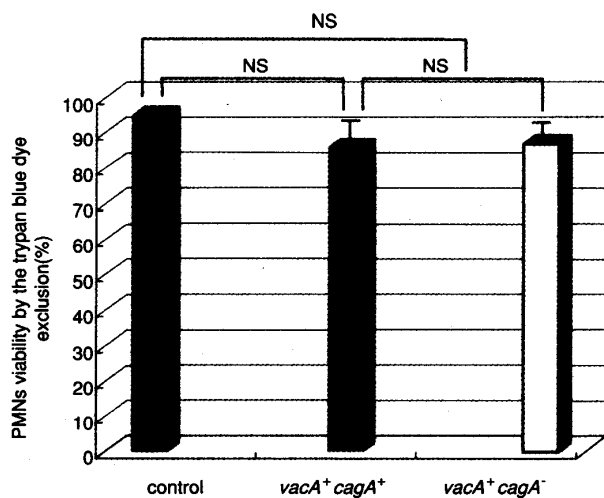


Fig. 3. Survival rate of PMNs after incubation with culture supernatants of *H. pylori*. There was no difference in the viability of PMNs.

- survival rates were 95% or more of leukocytes before test
- *vacA+ cagA+*, N=66
- *vacA+ cagA-*, N=6

考 察

生体は一般に、細菌を含むさまざまな外的刺激に対する自己防衛の手段として、非特異的防御機構とそれ

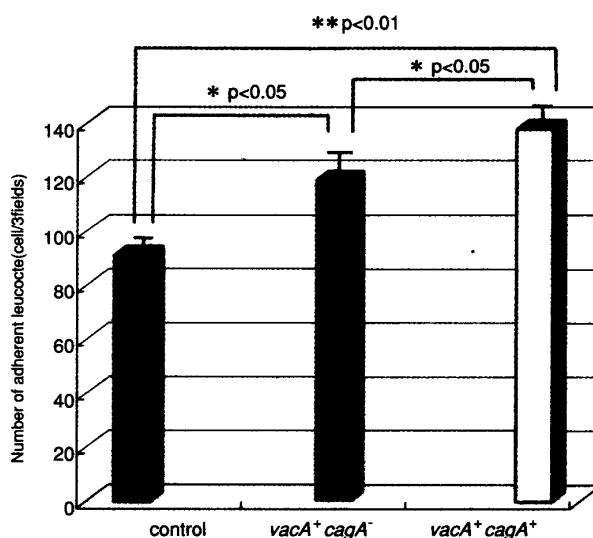


Fig. 4. Chemotaxis of PMNs assayed by Boyden chamber methods after incubation with *H. pylori* isolated from patients with gastric and duodenal diseases.

- N=10
- N=6
- N=66

に引き続いて起こる特異的防御機構を有している。したがって、非特異的生体防御機構の主役である好中球やマクロファージなどの貪食細胞機能の活性化は重要と考えられる。活性化された好中球は、いくつかの重要な因子を放出し、生体を防御する。しかしながら、組

織障害における役割も重要視されている。そのなかでも、活性酸素やエラスターゼなどの酵素は重要な役割を担っている¹¹⁾。*H. pylori* に感染した胃粘膜には、形質細胞、リンパ球、マクロファージ、好中球など多彩な炎症機能をもった細胞が集積する。その中でも、好中球は活性化に伴い強力な細胞障害物質である活性酸素を放出し、胃粘膜上皮細胞に直接障害を与えることが予想される。すなわち、胃粘膜生検組織中の好中球集積および活性酸素産生量は *H. pylori* 感染例において有意に上昇していることは明らかである^{7,27)}。しかし、近年 Cytotoxin-associated gene (*cagA*) 陽性の *H. pylori* が強力に IL-8 産生を誘導し、それが胃粘膜上皮細胞障害を引き起こす原因であるという報告がある¹⁸⁾。さらに、*H. pylori* の感染胃粘膜では、白血球が流血中から微小循環系の後毛細血管細胞静脈の内皮細胞表面に膠着し、内皮下腔に潜り込み、血管へ遊走するという報告もある¹⁶⁾。著者が検討したところ、*H. pylori* の *vacA*⁺ *cagA*⁺ 型株と *vacA*⁺ *cagA*⁻ 型株のそれぞれの培養上清において、好中球遊走能は共に有意に上昇し、*H. pylori* より放出される物質の中には、単球や好中球に対して走化性をもつ因子が含まれていることを示した³⁾、という報告と一致する結果を得た (Fig. 4)。

H. pylori の病原性因子として、*H. pylori* の培養上清中には培養細胞株に空胞化を引き起こすサイトトキシン (VacA) が分泌され、それが本菌の病原因子として機能するとの報告がある¹⁵⁾。特に、消化性潰瘍患者から分離された *H. pylori* 培養上清に本因子が高頻度に見出されることから、潰瘍形成などの胃粘膜病変と本因子の相関が多く報告されている^{28,29)}。著者が検討したところでは、*H. pylori* 由来の毒素であり、*H. pylori* の胃粘膜の直接的障害因子と見なされている空胞化サイトトキシン (VacA) に関する遺伝子 *vacA* は全症例で陽性となった。一方、サイトトキシン関連蛋白質 (CagA) に関する遺伝子 *cagA* については、胃炎例で 3 例 (9.7%) および胃癌例で 3 例 (21.4%) は陰性であった。

このような *vacA* と *cagA* の胃および十二指腸疾患の陽性率の違いや、VacA は胃・十二指腸粘膜細胞に空胞化を起こす機能を持つことから *vacA* の方が *cagA* よりも胃粘膜障害への影響は大と推定できる。しかし、著者の *in vitro* による *cagA* 陰性例と陽性例における trypan blue 染色による好中球の生存率の違いに関する検討成績では差は認められなかった。また、コントロール例と、*H. pylori* 培養上清を投与した群との比較では *H. pylori* 培養上清を投与した群の生存

率がコントロールに比してやや低率であったが、有意差はなかった。

このような著者の検討成績と違った、*vacA* および *cagA* が細胞の生存率に影響するという報告²⁰⁾もある。著者が標的とした細胞が防御機能を持った好中球であったため、生存率が比較的高率に保たれたと思われる。著者の *vacA* および *cagA* の好中球の生存率に及ぼす結果から、*vacA* および *cagA* の胃粘膜障害への影響は否定できるとは言えない。次に、諸家の報告^{8-10,17,24,31)}にもあるような、*H. pylori* の好中球の活性化を惹起しての間接的な胃粘膜障害説に関しては、著者の検討成績でも証明できた。すなわち、*H. pylori* の *vacA*⁺ *cagA*⁺ 型株と *vacA*⁺ *cagA*⁻ 型株は好中球の遊走能を共に活性化することを各種胃および十二指腸疾患例分離株で示した。特に、好中球の遊走能の活性化に関しては *vacA* より *cagA* の方が強い影響力を持つことがわかった³⁾。

遊走能の活性化された好中球は、諸家の報告²⁶⁾にもあるように、生体の防御反応という良い面だけでなく、脱顆粒を起こして胃粘膜を障害する成分、NO やフリーラジカル (CO₂⁻, H₂O₂, OH⁻)、活性酵素などを誘導するという悪い面も持っていることも推定できる。

なお、*H. pylori* の持つ遊走化因子については、現在まで、25-35 kDa の大きさを持つ蛋白分画に好中球、単球遊走化因子が存在することや⁸⁾、15 kDa の蛋白質 (HP-NAP) が好中球と血管内皮との接着に関与する接着分子 CD 11b/CD 18 (Mac-1) の発現を増強することなどが報告され¹⁶⁾、*H. pylori* の感染により好中球や単球が胃粘膜局所に浸潤するメカニズムの存在が指摘されている。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました神辺 眞之教授に深く感謝の意を表します。また、本研究に御協力頂きました検査部各位に心より御礼を申し上げます。そして、今回の研究にあたり、臨床菌株提供に協力して頂きました第一内科春間 賢先生をはじめ *H. pylori* 研究グループの皆様には深甚なる謝意を表します。

なお、本研究の内容は第46回日本臨床病理学会総会（熊本市，1999年）および第6回アジア臨床病理学会議（韓国，釜山市，2000年）にて発表した。後者の会議において著者らの研究グループは Dade Behring Prize（優秀賞）を受賞した。

参 考 文 献

1. **Blaser, M. J.** 1987. Gastric Campylobacter-like organisms, gastritis and peptic ulcer disease. *Gastroenterology* 93 : 371-383.
2. **Burnett, D., Chamba, A., Hill, S. L. and Stockley, R. A.** 1987. Neutrophils from subjects with chronic obstructive lung disease show enhanced chemotaxis and extracellular proteolysis. *Lancet* 7 : 1043-1046.
3. **Covacci, A., Censin, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burroni, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Xiang, Z. and Figura, N.** 1993. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90 : 5791-5795.
4. **Cover, T. L. and Blaser, M. J.** 1992. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* 267 : 10570-10575.
5. **Crabtree, J. E., Farmery, S. M., Lindley, I. J., Figura, N., Peichl, P. and Tompkins, D. S.** 1994. CagA/cytotoxic strains of *Helicobacter pylori* and interleukin-8 in gastric epithelial cell lines. *J. Clin. Pathol.* 47 : 945-950.
6. **Crabtree, J. E., Wyatt, J. I., Trejdosiewicz, L. K., Peichl, P., Nichols, P. H., Ramsay, N., Primrose, J. N. and Lindley, I. J.** 1994. Interleukin-8 expression in *Helicobacter pylori* infected, normal, and neoplastic gastroduodenal mucosa. *J. Clin. Pathol.* 47 : 61-66.
7. **Crabtree, J. E., Covacci, A., Farmery, S. M., Xiang, Z., Tompkins, D. S., Perry, S., Lindley, I. J. and Rappuoli, R.** 1995. *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype. *J. Clin. Pathol.* 48 : 41-45.
8. **Dixon, M. F.** 1991. *Helicobacter pylori* and peptic ulceration: histopathological aspects. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 6 : 125-130.
9. **Evans, D. J. Jr., Evans, D. G., Takemura, T., Nakano, H., Lampert, H. C., Graham, D. Y., Granger, D. N. and Kvietys, P. R.** 1995. Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Infect. Immun.* 63 : 2213-2220.
10. **Evans, D. J. Jr., Evans, D. G., Lampert, H. C. and Nakano, H.** 1995. Identification of four new prokaryotic bacterioferritins, from *Helicobacter pylori*, *Anabaena variabilis* and *Treponema pallidum*, by analysis of gene sequences. *Gene* 153 : 123-127.
11. **Genta, R. M., Lew, G. M. and Graham, D. Y.** 1993. Changes in the gastric mucosa following eradication of *Helicobacter pylori*. *Mod. Pathol.* 6 : 281-291.
12. **Gionchetti, P., Vaira, D., Campieri, M., Holtton, J., Menegatti, M. J., Belluzzi, A., Bertinelli, E., Ferretti, M., Brignola, C. and Miglioli, M.** 1994. Enhanced mucosal interleukin-6 and 8 in *Helicobacter pylori*-positive dyspeptic patients. *Am. J. Gastroenterol.* 89 : 883-887.
13. **Graham, D. Y., Lew, G. M., Klein, P. D., Evans, D. E., Evans, D. J. Jr., Saeed, Z. A. and Malaty, H. M.** 1992. Effect of treatment of *Helicobacter pylori* infection of long-term recurrence of gastric or duodenal ulcer. A randomized controlled study. *Ann. Intern. Med.* 116 : 705-708.
14. **Harvath, L., Falk, W. and Leonard, E. J.** 1980. Rapid quantitation of neutrophil chemotaxis: Use of a polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate membrane in a multiwell assembly. *J. Immunol. Methods* 37 : 39-45.
15. **Kuipers, E. J., Perez-Perez, G. I., Meuwissen, S. G. and Blaser, M. J.** 1995. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the cagA status. *J. Natl. Cancer. Inst.* 87 : 1777-1780.
16. **Leunk, R. D., Johnson, P. T., David, B. C., Kraft, W. G. and Morgan, D. R.** 1988. Cytotoxin activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* 26 : 93-99.
17. **Liu, W., Okajima, K., Murakami, K., Harada, N., Isobe, H. and Irie, T.** 1998. Role of neutrophil elastase in stress-induced gastric mucosal injury in rats. *J. Lap. Clin. Med.* 132 : 432-439.
18. **Mai, U. E., Perez-Perez, G. I., Allen, J. B., Wahl, S. M., Blaser, M. J. and Smith, P. D.** 1992. Surface proteins from *Helicobacter pylori* exhibit chemotactic activity for human leukocytes and are present in gastric mucosa. *J. Exp. Med.* 175 : 517-525.
19. **Marshall, B. J. and Warren, J. R.** 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1 : 1311-1315.
20. **McGovern, T. W., Talley, N. J., Kephart, G. M., Carpenter, H. A. and Gleich, G. J.** 1991. Eosinophil infiltration and degranulation in *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis. *Dig. Dis.* 36 : 435-440.
21. **Mooney, C., Keenan, J., Munster, D., Wilson, I., Allardyce, R., Bagshaw, P., Chapman, B. and Chadwick, V.** 1991. Neutrophil activation by *Helicobacter pylori*. *Gut* 32 : 853-857.
22. 成川新一, 今井直史, 坂間重宏, 原沢 功, 鈴木卓, 中村正夫 1990. *Campylobacter pylori* 用寒天平板培地の検討. *臨床病理* 38 : 104-106.

23. **Noach, L. A., Bosma, N. B., Jansen, J., Hoek, F. J., van-Deventer, S. J. and Tytgat, G. N.** 1994. Mucosal tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Scand. J. Gastroenterol.* **29** : 425–429.
24. **Parsonnet, J., Friedman, G. D., Orentreich, N. and Vogelman, H.** 1997. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* **40** : 297–301.
25. **Rauws, E. A., Langenberg, W., Houthoff, H. J., Zanen, H. C. and Tytgat, G. N.** 1988. *Campylobacter pylori*-associated chronic active antral gastritis: a prospective study of its prevalence and the effects of anti-bacterial and anti-ulcer treatment. *Gastroenterology* **94** : 33–40.
26. **Rudi, J., Kuck, D., Strand, S., von-Herbay, A., Mariani, S. M., Krammer, P. H., Galle, P. R. and Stremmel, W.** 1998. Involvement of the CD 95 (APO-1/Fas) receptor and ligand system in *Helicobacter pylori*-induced gastric epithelial. *J. Clin. Invest.* **102** : 1506–1514.
27. **Sipponen, P. and Stolte, M.** 1997. Clinical impact of routine biopsies of the gastric antrum and body (editorial). *Endoscopy* **29** : 671–678.
28. **Smoot, D. T., Wynn, Z., Elliott, T. B., Allen, C. R., Mekasha, G., Naab, T. and Ashktorab, H.** 1999. Effects of *Helicobacter pylori* on proliferation of gastric epithelial cell in vitro. *Am. J. Gastroenterol.* **94** : 1508–1511.
29. **Tee, W., Lambert, J. R. and Dwyer, B.** 1995. Cytotoxin production by *Helicobacter pylori* from patients with upper gastrointestinal tract diseases. *J. Clin. Microbiol.* **33** : 1203–1205.
30. **Telford, J. L., Ghiara, P., Dell'Orco, M., Comanducci, M., Burrioni, D., Bugnoli, M., Tecce, M. F., Censini, S., Covacci, A. and Xiang, Z.** 1994. Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J. Exp. Med.* **179** : 1653–1658.
31. **Watanabe, T., Tada, M., Nagai, H., Sasaki, S. and Nakao, M.** 1998. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in Mongolian Gerbils. *Gastroenterology* **115** : 642–648.
32. **Xiang, Z., Censini, S., Bayeli, P. F., Telford, J. L., Figura, N., Rappuoli, R. and Covacci, A.** 1995. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect. Immun.* **63** : 94–98.

Effect of *Helicobacter pylori* from Gastric Diseases with Two Different Genotypes on the Polmorphonuclear Leukocytes Function

Delixiati YIMITI

Department of Clinical Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, Hiroshima University

(Director: Prof. Masayuki KAMBE)

Helicobacter pylori (*H. pylori*) produces cytokines and other unknown substances which are implicated to the cause of gastric mucosal injury. In the present study, we examined the effects of culture supernatants of *H. pylori* (two strains; *vacA*⁺ *cagA*⁺ and *vacA*⁺ *cagA*⁻) on the migration and the viability of polymorphonuclear leukocytes.

H. pylori was isolated from gastric specimens of patients with chronic gastritis and gastric ulcer using *H. pylori*-selection plate and co-culture system with Brocell broth. The specimens were sedimented, streaked on the *H. pylori*-selection plate, and incubated for 5-7 days under a microaerophilic condition. The isolated strains were transferred to liquid culture and incubated for another 6 days with Brucell broth. The resultant culture was concentrated with ultrafiltration.

The genotypes of *vacA* and *cagA* were determined by PCR. The effects of the culture supernatant of *H. pylori* on the chemotaxis and cell viability of PMNs from healthy man were assayed by Boyden chamber method and supravital trypan blue staining, respectively.

The culture supernatant from both strains stimulated the PMNs-migration. The number of PMNs in the Boyden chamber was 136 ± 4 cells/high power field in *vacA*⁺ *cagA*⁺ strain and 119 ± 3 cells/ high power field in *vacA*⁺ *cagA*⁻ strain ($p < 0.05$, $p < 0.01$), indicating that leukocyte migration was significantly stronger in *vacA*⁺ *cagA*⁻ strain. The survival rate of PMNs after adding the supernatant in the culture was $85 \pm 3\%$ in *vacA*⁺ *cagA*⁻ and $87 \pm 5\%$ in *vacA*⁺ *cagA*⁻ strain (not significant).

These results indicate that *H. pylori* produces the chemotactic factor for PMNs, and the chemotactic effect was stronger in *vacA*⁺ *cagA*⁺ than in *vacA*⁺ *cagA*⁻. However, both strains of *H. pylori* did not produce lethally-cytotoxic substance on the PMNs.