

動物モデルを用いたヘリコバクター・ピロリ感染症の治療法の開発

喜多正和

京都市立医科大学大学院医学研究科実験動物センター

1. ヘリコバクター感染症

ヒトに感染症をおこす代表的なヘリコバクター属の細菌は *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) である。*H. pylori* はグラム陰性のらせん状の桿菌で、4～8本の鞭毛をもつ。微好気性で栄養要求が厳しく、酸素濃度5%、二酸化炭素濃度5～10%の条件で専用の培地でしか増殖できない、分離や培養が難しい細菌である。自然環境では動物の胃内だけで増殖可能で、ウレアーゼを産生することにより胃酸を中和して酸性条件下でも生存できる。しかしながら、胃生検組織や糞便から coccoid form と呼ばれる球菌様のものが分離されることがあり、本菌の感染に関与していると考えられている。

H. pylori 感染は胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍から萎縮性胃炎、さらには胃癌、MALTリンパ腫などの胃悪性腫瘍の発生とも関連性が深いことが知られている。わが国において、50歳以上の *H. pylori* 感染率は血清抗体価の保有者から推測すると80%以上と非常に高く、*H. pylori* 感染の認められる有症状者に対する除菌療法が積極的に行われるようになってきている。1995年、日本消化器病学会より除菌ガイドラインが発表され、2000年には日本ヘリコバクター学会より「ヘリコバクター・ピロリ感染の診断と治療のガイドライン」が発表されている。また、除菌療法の保険適用は、これまで胃潰瘍、十二指腸潰瘍、MALTリンパ腫などが対象であったが、2013年には慢性胃炎も追加となっている。一方、国際的には、*H. pylori* 感染症に対する除菌療法により、消化性潰瘍の再発抑制効果が認められることが明らかとなっており、1994年には、アメリカ国立衛生研究所 (NIH) は「*H. pylori* に感染している胃、十二指腸潰瘍患者は初回、あるいは再発にかかわらず抗菌剤を併用して治療すべきである」との統一見解を発表している。また、1996年には、ヨーロッパの *H. pylori* 研究グループは、消化性潰瘍以外に、早期胃癌切除後 (内視鏡

的粘膜切除後)、胃 MALT リンパ腫に対しても除菌治療の対象とすることを推奨している。さらに、世界保健機関 (WHO) の専門組織である国際がん研究機関は2014年、「胃がんの8割がピロリ菌の感染が原因で、胃がん対策はピロリ菌除菌を中心にすべき」とする報告書をまとめている。しかしながら、*H. pylori* 感染者でも無症状で組織学的胃炎の状態で一生涯を終える者の方が多い。臨床的な病態に進行するには宿主側の要因、感染期間、環境因子などに加え、CagAなどの多様な菌側の病原因子が関与すると考えられ、*H. pylori* 感染症の病態形成の機序を解明するためには動物モデルが必要である。

一方、ヒト以外の動物からも多数のヘリコバクター属の菌が検出されている。胃から分離されたものとしては、*H. heilmannii* がネコ、イヌ、サルから、*H. felis* がネコ、イヌから、*H. mustelae* がハムスターから、*H. nemestrinae* がブタオザルから、*H. acironyx* がチーターから検出されている。また、*H. hepaticus* と *H. bilis* がマウスの肝と腸管、*H. canis* がイヌの腸管、*H. pullorum* がトリの肝と腸管から分離されている。

2. マウスを用いた *H. pylori* 感染症モデル

H. pylori 感染症における病態形成機序の解明、ならびに *H. pylori* 感染症に対する治療法の開発のためには *H. pylori* 感染動物モデルが必要であり、現在までに *H. pylori* 感染に成功した動物としては、無菌ミニブタ [1]、無菌ビーグル犬 [2]、アカゲザル [3]、カニタイザル [3]、ニホンザル [4]、ヌードマウス [5]、正常マウス [6]、遺伝子組換えマウス [7]、スナネズミ (ジャービル) [8] などの報告がある。しかしながら、ミニブタ、ビーグル犬、サルなどの実験動物は飼育環境や飼育スペースの問題があるとともに、使用する薬物が多量に必要なこと、さらには多くの例数を必要とする実験には適さない。一方、マウスやスナネズミ用いたモデルではこれらの問題がなく、



遺伝的にも近交系が樹立されており、同一条件下での例数を増やした実験が可能であることなどから、感染動物モデルとしての価値が高い。

マウスなどのげっ歯類は最も良く利用される実験動物であるが、当初、マウスにはヒトから分離された *H. pylori* は感染しないと考えられていた。その理由の一つとして免疫学的な機構が想定されていたので、Karita らは免疫不全マウスであるヌードマウスを用いることにより、*H. pylori* を感染させることに成功した [5]。ヌードマウス胃への感染は少なくとも 20 週間は継続し、感染 4 週目から単核球をはじめとした炎症細胞の浸潤が認められたが、胃・十二指腸潰瘍を形成するまでには至らなかった。ヌードマウスにおいては、*H. pylori* 感染により慢性胃炎は惹起されるものの、その炎症の程度は軽度であり、免疫が関与するワクチン開発を目的とする実験には不適であった。

そこで、正常マウスを用いた *H. pylori* 感染モデルの開発が進められ、Marchetti らは *H. pylori* 臨床分離株を 1 回経口投与することにより CD1 マウスの胃粘膜に高率に感染させることに成功した [6]。*H. pylori* 臨床分離株は少なくとも 8 週間は胃に定着し、感染したマウスの胃から菌を再度分離し、別のマウスに感染させると、その感染力が増強していた。この時、同時に標準株である NCTC11637 株も感染させたが、感染は成立しなかった。これらの結果から、実験動物に *H. pylori* 感染を成立させるためには、宿主側の要因ももちろんであるが、菌側の要因、特に菌株の種類や菌の状態なども重要であることが示唆される。

その後、安定した *H. pylori* 感染マウスモデルを確立するため、Lee らはシドニー株と呼ばれるマウスの感染に適した菌株を樹立した [9]。シドニー株は本来、臨床分離株であるが、マウスに繰り返し感染させることにより、マウスに馴化させた感染性ならびに病原性が強く形質が安定した株である。病原性因子として知られている VacA 陽性 CagA 陽性で、感染率は 100%、マウス胃には $10^6 \sim 10^7$ colony forming units (CFU)/g 長期間定着すると報告されている。感染部位は胃粘膜全体に及ぶが、特に幽門部と胃体部の境界部に多く検出され、この部位は胃潰瘍の好発部位と一致する。感染 8 ヶ月間の観察によると、胃粘膜病変は徐々に進行し、慢性胃炎の病態を呈する。著明な炎症性細胞の胃粘膜内浸潤をとまない、リンパ濾胞の形成、さらには胃粘膜の萎縮が認められている。また、感染率にマウス系統差が認められ、BALB/c、DBA/2、C3H/He マウスにも感染するが、C57BL/6 マウスがもっとも胃内定着菌数が多く、感染モデルとして優れている。

われわれも、シドニー株を含めた多くの臨床分離株を用いて、*H. pylori* 感染マウスモデルを作成することを試みたが、シドニー株は報告されているほど感染率が高い株ではなかった。また、*H. pylori* 感染症における病原因子を解析する目的で、各種サイトカイン遺伝子欠損マウスを用いて以下のような知見を得ている。

H. pylori 感染症におけるサイトカインの関与については臨床例を中心に多数の報告があるが、*H. pylori* 感染症において生体における感染防御機構や病態形成機構を解明するには動物モデルを用いる方法が有効である。さらに *H. pylori* 感染症におけるサイトカインの役割を解明する手段として各種サイトカイン遺伝子欠損 (KO) マウスを用いることは非常に重要な研究手段である。そこで、われわれは *H. pylori* 感染症におけるサイトカインの役割を解明するため KO マウスを用いて検討した。その結果、Th1 サイトカインである IFN- γ KO マウスでは正常マウスに比べ、感染率が有意に高くなり、胃内菌数も有意に多かった [10]。これらの結果は、IFN- γ が感染防御に働いていることを示している。しかしながら、胃炎などの病変を比較してみると、*H. pylori* 感染により正常マウスでは細胞浸潤を伴う胃炎を発症したのに対し、IFN- γ KO マウスではまったく胃炎を発症しなかった (図 1)。すなわち、IFN- γ は菌の胃内定着に対しては感染防御因子として作用するが、炎症に対しては増悪因子として作用していることになり、急性感染期と慢性感染期とではその役割が変化する可能性が示唆された。また、TNF- α KO マウスでは、胃内菌数は正常マウスに比べ有意に多かったものの炎症の程度はほぼ同程度であり、胃炎の発症には TNF- α は関与していないと考えられる。一方、Th2 サイトカインである IL-4 KO マウスでは正常マウスに比べ強い細胞浸潤をとまなう胃炎が惹起され、IFN- γ KO マウスとまったく逆の結果が報告されている [10]。さらに、IL-10 KO マウスを用いた研究では、IL-10 の欠損により胃内菌数は正常マウスに比べ少なくなるものの、より強い胃炎や腸炎を起こすことが報告されており [12]、菌の胃内定着におけるサイトカインの役割と炎症におけるサイトカインの役割を区別して考える必要があることが示唆される。また、*H. pylori* 感染においては Th1 優位のサイトカインが産生され、病態形成においても Th2 サイトカインよりも Th1 サイトカインが重要な役割を果たしていると考えられる。近年、Th1 および Th2 サイトカイン以外の炎症性サイトカインとして IL-17 が発見された。IL-17 KO マウスにおいては、*H. pylori* 感染 6 ヶ月後でも胃粘膜にほとんど炎症病変が認められなかったことより、*H.*

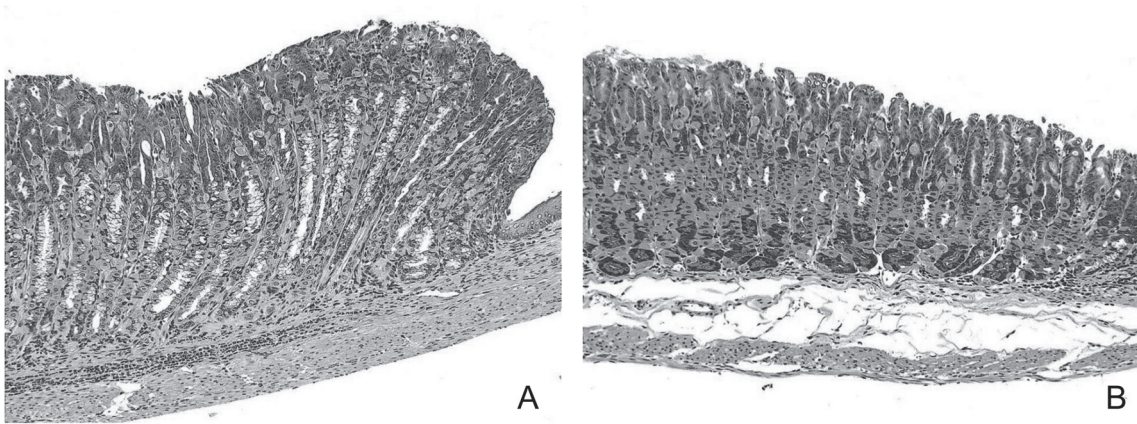


図1. 正常 (A) および IFN-gamma 遺伝子欠損マウス (B) の胃粘膜病変

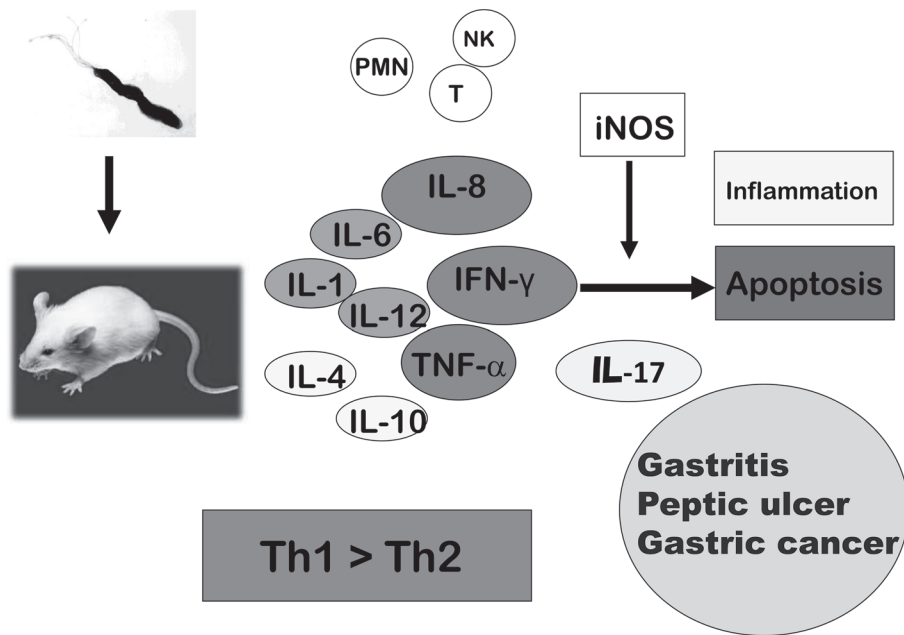


図2. *H. pylori* 感染症におけるサイトカインの役割

pylori 感染症においては、従来知られていた Th1 サイトカインに加え、新規に発見された炎症性サイトカインである IL-17 も胃炎の発症に重要な役割を果たしていることが示唆された¹³⁾。これらの解析結果は、今後の新規治療薬の開発に有用であると考えられる (図2)。

3. マウス感染モデルを用いた薬剤耐性菌に対する代替療法の開発

H. pylori 感染症の除菌療法として、酸分泌抑制剤 (PPI) と抗生物質 2 剤の triple therapy などが実施されているが、近年、クラリスロマイシンやメトロニダゾールなどの抗生物質に対する耐性菌の出現が問題となっている。そこで、*H. pylori* 感染症に対する新たな補完・代替療法を開発する目的で漢方薬の薬



表 1. マウス感染モデルを用いた薬剤耐性 *H.pylori* に対する生薬の治療効果

	Number of colonies (X10 CFU/g tissue)	Detection by PCR
Control	1520 ± 370	positive
<i>Coptidis Rhizoma</i> (黄連)	0 ± 0**	negative
<i>Rhei Rhizoma</i> (大黄)	1660 ± 207	positive
<i>Artemisiae Capillari Flos</i> (茵陳蒿)	114 ± 61**	positive
<i>Glycyrrhizae Radix</i> (甘草)	0 ± 0**	negative
<i>Caryophylli Flos</i> (丁子)	0 ± 0**	negative

* p<0.05, ** p<0.01

剤耐性 *H. pylori* に対する抗菌効果を *in vitro* および *in vivo* で検討した。その結果、1) 補中益気湯は薬剤感受性菌および耐性菌に対して同様の抗菌効果を示すこと、2) 補中益気湯の抗菌効果は *in vitro* および *in vivo* で認められること、3) 補中益気湯は抗生物質と併用することにより抗菌効果が増強され、完全に除菌することが可能であることなどを明らかにした。

さらに、18種類の生薬を対象に *H. pylori* に対する抗菌効果を検討した結果、黄連、甘草、丁子が1 mg/ml以上の濃度で強い抗菌活性を示し、薬剤耐性菌に対しても同様の効果を示した。また、クラリスロマイシン感受性株をそれぞれの薬剤含有培地にて継代培養した結果、クラリスロマイシン耐性菌は出現したが、漢方薬耐性菌は出現しなかった。また、マウスにこれらの生薬を経口投与した結果、胃内菌数は生薬投与群では非投与群に比較して有意に抑制されていた(表1)。以上の結果、漢方薬および生薬は *H. pylori* 感染6ヵ月後でも胃粘膜にほとんど炎症病変が認められなかったことより、*H. pylori* に対して抗菌効果を示すこと、またその効果は抗生物質に対する耐性菌に対しても有効で、長期使用によっても新たな耐性菌の出現が認められないことが明らかとなり、*H. pylori* 感染症に対する補完・代替療法として有用であることが示唆された。

4. スナネズミを用いた *H. pylori* 感染症モデル

スナネズミ (Mongolian gerbil) は、てんかん発作を起こしやすい実験動物として、てんかんの研究のほか、脳梗塞/脳虚血および老化やアルツハイマーなどの脳に関する研究、腫瘍に関する研究に用いられていたが、Yokotaらは正常スナネズミに *H. pylori* 感染が容易に成立することを報告した[8]。マウスでは感染が困難であった NCTC11637 株を1回経口投与

するだけで、胃粘膜への *H. pylori* 感染が成立し、少なくとも2ヶ月は定着することを観察している。その後、Hirayamaらもスナネズミに *H. pylori* 感染が容易に成立し、感染6ヶ月後にはマウス感染モデルでは観察されなかった胃潰瘍が発生することを報告した[14]。一方、*H. pylori* 感染と胃癌との関連については、ヒト以外の動物を用いた数多くの実験にも関わらず証明ができないままであったが、疫学調査の結果から明らかになっていった。そして1994年には国際がん研究所 (IARC) が発行している IARC 発癌リスク一覧に、グループ1 (definite carcinogen: 発癌性がある) の発癌物質として記載された。その後、日本から有用な成果が相次いで報告された。1998年には、Watanabeらは長期間飼育した *H. pylori* 感染スナネズミに胃癌が発生したことを報告し、コッホの原則に基づく最初の証明とされた。この年にはさらに Tatematsu らによって、発癌物質投与とピロリ菌感染を組み合わせた、より効率の高い動物胃癌モデルが確立されている[15]。スナネズミに化学発癌物質である MNU や MNNG を経口投与すると、腺胃に胃癌が発生する。これらの化学発癌物質を投与したスナネズミに *H. pylori* を感染させると、胃癌発生率は有意に上昇する。スナネズミに発生する胃癌は組織学的にも多彩で、高分化型腺癌、低分化型腺癌および印環細胞癌の発生も認められ、ヒト胃癌のモデルとして有用であると考えられている[16-18]。また、このスナネズミ発癌モデルを用いて、数多くの発癌予防効果の実験が行われている[19]。

5. *H. pylori* 感染症動物モデルの選択

H. pylori 感染症動物モデルの標準化のために、スイスのローザンヌで開催された *H. pylori* 感染症に対するワクチン開発に向けた会議において、以下のよ

うな基準が提案されている。1) 胃粘膜に *H. pylori* が定着し、コロニーとして検出され、かつ幽門部や胃体部にヒトと類似した病変を誘起すること、2) 胃重量あたりの *H. pylori* 菌数が十分認められること、3) 胃上皮細胞への接着が認められること、4) 長期間、持続的に感染していること、5) *In vitro* で継代培養を繰り返しても、動物に感染できる安定な菌株を用いること [20]。これらの基準を満たす実験系として、シドニー株を用いたマウス感染モデルがあげられるが、スナネズミ感染モデルでは残念ながらすべての基準は満たさない。

当然ながら、実験目的に合わせて感染モデルを選択すべきである。例えば、薬物の除菌効果や除菌治療の開発あるいはワクチンの開発が目的であればマウス感染モデルが適している。しかしながら、除菌効果と同時に胃粘膜病変の発生予防や治療効果を検討する場合にはスナネズミ感染モデルが適している。

特に、胃潰瘍や胃癌を作成することはマウス感染モデルでは現在のところ困難であり、スナネズミ感染モデルしか使用できない。近年、*CagA* 遺伝子トランスジェニックマウスを用いて、マウスに胃癌を発生させることに成功しているが、感染症モデルではないため、動物モデルとしては利用が限定される [21]。ただし、マウスではすでに多くの薬剤投与実験が実施されているため、投与薬剤量を想定しやすいが、スナネズミではまだ薬剤投与実験の実施数が少ないため、薬剤の用量設定が難しいという問題はあ

る。一方、慢性胃炎などの病態機序の解明や治療機序の解明が目的である場合、マウス感染モデルが適している。げっ歯類の中では、酵素、受容体、リガンドをはじめ生理機能や免疫機能、さらには遺伝子解析が最も進んでいる動物であり、さまざまな抗体を含む種々の試薬が入手しやすい。さらに、数多くの遺伝子組換えマウスを利用することができるため、生体レベルでの解析が可能である。それに対し、スナネズミにおいてはマウスほどの解析は行われておらず、まだまだ基礎的な情報が不足している。

マウス、スナネズミ以外の動物モデルとして、*H. pylori* 感染ラットモデルの開発も進められている。ラットは胃炎および胃潰瘍の研究や治療薬の評価などに最も使用されている実験動物である。しかしながら、正常ラットに *H. pylori* 感染が成功した例はなく、現在のところ *H. pylori* 感染動物モデルとしてはほとんど利用されていない。今後、さらなる *H. pylori* 感染動物モデルの開発研究が進展し、ヒトの *H. pylori* 感染症に対する新規の予防法および治療法

文 献

1. Engstrand L, Gustavsson S, Jörgensen A, Schwan A, Scheynius A.: Inoculation of barrier-born pigs with *Helicobacter pylori*: a useful animal model for gastritis type B. *Infect Immun.* 58(6): 1763–8. 1990
2. Radin MJ, Eaton KA, Krakowka S, Morgan DR, Lee A, Otto G, Fox J.: *Helicobacter pylori* gastric infection in gnotobiotic beagle dogs. *Infect Immun.* 58(8): 2606–12. 1990
3. Euler AR, Zurenko GE, Moe JB, Ulrich RG, Yagi Y.: Evaluation of two monkey species (*Macaca mulatta* and *Macaca fascicularis*) as possible models for human *Helicobacter pylori* disease. *J Clin Microbiol.* 28(10): 2285–90. 1990
4. Shuto R, Fujioka T, Kubota T, Nasu M.: Experimental gastritis induced by *Helicobacter pylori* in Japanese monkeys. *Infect Immun.* 61(3): 933–9. 1993
5. Karita M, Kouchiyama T, Okita K, Nakazawa T.: New small animal model for human gastric *Helicobacter pylori* infection: success in both nude and euthymic mice. *Am J Gastroenterol.* 86(11): 1596–603. 1991
6. Marchetti M, Aricò B, Burrioni D, Figura N, Rappuoli R, Ghiara P.: Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science.* 267(5204): 1655–8. 1995
7. Falk PG, Bry L, Holgersson J, Gordon JI.: Expression of a human alpha-1,3/4-fucosyltransferase in the pit cell lineage of FVB/N mouse stomach results in production of Leb-containing glycoconjugates: a potential transgenic mouse model for studying *Helicobacter pylori* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(5): 1515–9. 1995
8. Yachi A, Oguma K, Yokota K, Kurebayashi Y, Takayama Y, Hayashi S, Isogai H, Isogai E, Imai K, Yabana T.: Colonization of *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa of Mongolian gerbils. *Microbiol Immunol.* 35(6): 475–80. 1991
9. Lee A, O'Rourke J, De Ungria MC, Robertson B, Daskalopoulos G, Dixon MF.: A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology.* 112(4): 1386–97. 1997
10. Sawai N, Kita M, Kodama T, Tanahashi T, Yamaoka Y, Tagawa Y, Iwakura Y, Imanishi J.: Role of gamma interferon in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. *Infect*



- Immun. 67(1): 279–85. 1999
11. Smythies LE, Waites KB, Lindsey JR, Harris PR, Ghiara P, Smith PD.: *Helicobacter pylori*-induced mucosal inflammation is Th1 mediated and exacerbated in IL-4, but not IFN-gamma, gene-deficient mice. *J Immunol.* 165(2): 1022–9. 2000
 12. Chen W, Shu D, Chadwick VS.: *Helicobacter pylori* infection: mechanism of colonization and functional dyspepsia Reduced colonization of gastric mucosa by *Helicobacter pylori* in mice deficient in interleukin-10. *J Gastroenterol Hepatol.* 16(4): 377–83. 2001
 13. Shiomi S, Toriie A, Imamura S, Konishi H, Mitsufuji S, Iwakura Y, Yamaoka Y, Ota H, Yamamoto T, Imanishi J, Kita M.: IL-17 is involved in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. *Helicobacter.* 13(6): 518–24. 2008
 14. Hirayama F, Takagi S, Kusuhara H, Iwao E, Yokoyama Y, Ikeda Y.: Induction of gastric ulcer and intestinal metaplasia in mongolian gerbils infected with *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol.* 31(5): 755–7. 1996
 15. Tatematsu M, Yamamoto M, Shimizu N, Yoshikawa A, Fukami H, Kaminishi M, Oohara T, Sugiyama A, Ikeno T.: Induction of glandular stomach cancers in *Helicobacter pylori*-sensitive Mongolian gerbils treated with N-methyl-N-nitrosourea and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in drinking water. *Jpn J Cancer Res.* 89(2): 97–104. 1998
 16. 豊田武士, 立松正衛: スナネズミモデルによる *H. pylori* 関連胃癌発生機構の解明, 別冊「医学のあゆみ」感染症と発癌の分子メカニズム, 61–64, 2009
 17. Cao X, Tsukamoto T, Nozaki K, Tanaka H, Shimizu N, Kaminishi M, Kumagai T, Tatematsu M.: Earlier *Helicobacter pylori* infection increases the risk for the N-methyl-N-nitrosourea-induced stomach carcinogenesis in Mongolian gerbils. *Jpn J Cancer Res.* 93(12): 1293–8. 2002
 18. Kato S, Tsukamoto T, Mizoshita T, Tanaka H, Kumagai T, Ota H, Katsuyama T, Asaka M, Tatematsu M.: High salt diets dose-dependently promote gastric chemical carcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils associated with a shift in mucin production from glandular to surface mucous cells. *Int J Cancer.* 119(7): 1558–66. 2006
 19. Toyoda T, Tsukamoto T, Mizoshita T, Nishibe S, Deyama T, Takenaka Y, Hirano N, Tanaka H, Takasu S, Ban H, Kumagai T, Inada K, Utsunomiya H, Tatematsu M.: Inhibitory effect of nordihydroguaiaretic acid, a plant lignan, on *Helicobacter pylori*-associated gastric carcinogenesis in Mongolian gerbils. *Cancer Sci.* 98(11): 1689–95. 2007
 20. Michetti P, Wadström T, Kraehenbuhl JP, Lee A, Kreiss C, Blum AL.: Frontiers in *Helicobacter pylori* research: pathogenesis, host response, vaccine development and new therapeutic approaches. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 8(7): 717–22. 1996
 21. Ohnishi N, Yuasa H, Tanaka S, Sawa H, Miura M, Matsui A, Higashi H, Musashi M, Iwabuchi K, Suzuki M, Yamada G, Azuma T, Hatakeyama M.: Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(3): 1003–8. 2008