

氏名(本籍)	川戸克仁(東京都)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	乙第25号
学位授与年月日	平成27年3月5日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	Optimization of infectious conditions with <i>Helicobacter pylori</i> in the infection-highly resistant Mongolian gerbils supplied in Japan (日本で供給されている <i>Helicobacter pylori</i> 難感染性のスナネズミにおける最適な感染条件に関する研究)
論文審査委員	(主査) 山本 静雄 (副査) 小西 良子 古畑 勝則

論文内容の要旨

はじめに

1983年にWarrenとMarshallによって初めてヒトの胃粘膜から分離された *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) の動物実験には、BALB/cヌードマウスあるいはBALB/c無菌マウスなどが用いられたこともあるが、スナネズミがヒトの *H. pylori* 感染の病態を最もよく反映することから現在ではスナネズミが用いられている。

本邦では、*H. pylori* が容易に感染するスナネズミを最も多く供給していた繁殖会社(A社)が、2012年中頃からその供給を中止したため、現在は他の1社(B社)から供給されているスナネズミしか入手できない。しかし、B社から供給されているスナネズミには従来の *H. pylori* の接種条件ではほとんど感染しないため、現在わが国ではスナネズミを用いた *H. pylori* の研究を行うことが困難な状況下にある。

本研究では、B社から供給されている *H. pylori* 難感染性のスナネズミに感染を容易にさせる条件を検討した。本研究の概要は以下の通りである。

本研究には、A社(27匹)及びB社(162匹)の雄性スナネズミ合計189匹を用いた。供試した *H. pylori* の菌株は、東海大学医学部感染症研究室の古賀康裕教授から分与された1株及び一般財団法人東京顕微鏡院から分与された臨床分離株5株である。本研究では *H. pylori* の接種量は 5×10^7 CFU/ml とし、その接種及び各種溶液のスナネズミへの経口投与には経口ゾンデを用いた。

本研究における *H. pylori* の感染の有無は、*H. pylori* に対する血清中のIgM及びIgG抗体の上昇によって判定した。その血清抗体の上昇が *H. pylori* の感染成立の指標となることは、B社のスナネズミ

を用いて次の方法で確認を行った。*H. pylori* 接種 2 週間後のスナネズミの胃の組織を培養して *H. pylori* の感染が確認された個体と確認されなかった個体の両方について血清抗体との関係を検討した。*H. pylori* の感染が成立し易い群では、前処置として pH1.7 の胃液約 0.1ml を中性付近まで上昇させるために 0.1%炭酸水素ナトリウム溶液、pH 9.5 (重曹) 0.3ml を投与したスナネズミ (10 匹) へ brain heart infusion (BHI) 培地で調製した *H. pylori* を 1 日 1 回、2 日間連続接種した。他方、*H. pylori* が感染しにくい群では、スナネズミ (20 匹) へ famotidine を投与した後に滅菌生理食塩水 (生理食塩水) で調製した *H. pylori* を 1 日 1 回接種した。これらのスナネズミは、*H. pylori* 接種の 2 週間後に麻酔下の採血によって安楽死させ、血清中の IgM 及び IgG 抗体を ELISA で測定した。それと同時に、摘出した胃の組織へ滅菌した PBS、pH7.4 を加えてホモジナイズし、それをウマ血清加 BHI 寒天培地で培養した。その結果、前処置で 0.1%重曹 0.3ml を投与した 10 匹のスナネズミのうち血清中の IgM 及び IgG 抗体が有意に上昇した 9 匹のスナネズミ全ての胃から *H. pylori* が分離された。一方、famotidine を投与したスナネズミのうち *H. pylori* 接種後に血清中の IgM 及び IgG 抗体が有意に上昇しなかった 18 匹から無作為に選んだ 10 匹のスナネズミの胃からは全く *H. pylori* が分離されなかった。これによって *H. pylori* に対する血清中の IgM 及び IgG 抗体の上昇が *H. pylori* の感染成立の判定を行う指標になることが確認された。それ故に、以下の実験では血清抗体の上昇を指標として *H. pylori* の感染を判定した。

A 社及び B 社のスナネズミへ生理食塩水あるいは BHI 培地で調製した *H. pylori* をそれぞれ接種した場合の感染率を比較した結果、A 社のスナネズミ (27 匹) は全例が生理食塩水で調製した *H. pylori* に感染したが、B 社のそれ (40 匹) では全例で感染が成立しなかった。また、BHI 培地で調製した *H. pylori* を B 社のスナネズミへ接種した場合には、42% (5/12) に感染が確認された。感染が成立しなかった原因として、BHI 培地で調製した *H. pylori* の接種で 42%に感染が認められたことならびに *H. pylori* はウレアーゼを分泌して尿素をアンモニアと二酸化炭素に分解することで強酸性の胃内を自らが生存可能な環境に変えることから、胃内の pH が関係することが推察された。そこで、*H. pylori* を接種する前に、H₂-ブロッカーである famotidine あるいは重曹を用いて胃内の pH を上げる前処置を試みた。その条件下で行った感染実験の結果及びすでに得られていた成績を併せた結果は次の通りであった。(1) BHI 培地 (pH7.2) で調製した *H. pylori* を接種したところ、42% (5/12) で感染が認められた。(2) *H. pylori* 接種 3 時間前に 10 mg/kg (体重) の famotidine を投与した後に、生理食塩水で調製した *H. pylori* を接種した結果、10% (2/20) に感染が認められた。(3) 0.02%に尿素を含有した BHI 培地 (pH7.3) で調製した *H. pylori* を接種したところ、70% (7/10) で感染が確認された。(4) *H. pylori* 接種 10 分前に 0.1%の重曹 0.3ml を投与して胃内の pH を中性付近に調整した後、生理食塩水で調製した *H. pylori* を 1 日 1 回接種したところ、70% (7/10) で感染が認められ、これを 2 日間連続接種したときには 80% (8/10) に感染が認められた。(5)(4)と同様に、0.1%重曹を投与した後に、BHI 培地で調製した *H. pylori* を 1 日 1 回接種した結果、80% (8/10) に感染が認められ、これを 2 日間連続接種したときには 90% (9/10) で感染が確認された。

次に、継代の少ない臨床分離株の感染性を検討するために、生理食塩水で調製した *H. pylori* を B 社の無処置のスナネズミ各 3 匹へそれぞれ接種したところ、5 株のうち 2 株で 3 匹中各 1 匹に感染が確認された (13.3%) が、他の 3 株では感染が成立しなかった。

絶食させたスナネズミ 10 匹の胃液の pH は平均 1.7 で、その量は約 0.1ml であった。pH1.7 の 0.08M 塩酸 0.1ml に 0.1%重曹 0.3ml 及び BHI 培地 1.0ml を加えたときの pH は 6.9 に上昇した。そのことから、前処置によって胃内の pH が中性付近まで上昇したことで、継代を重ねた *H. pylori* の感染率が上がったものと考えられた。その明確な機序は不明であるが、接種された *H. pylori* が胃粘膜に定着する際に、初めはその生存に必要な量のアンモニアを生成させるに十分なウレアーゼを分泌できないために、*H. pylori* が定着する部位の pH を生存可能な pH にまで上昇させることができないことが定着を困難にしたと考えられた。また、継代の少ない *H. pylori* 臨床分離株が、継代を重ねた菌株よりもわずかに感染し易いと思われる成績が得られたが、その感染率 (13.3%) は低く、継代を重ねた菌株との相違は明らかにできなかった。

以上のように、本研究では、菌体を生理食塩水に浮遊させた菌液を接種する一般的な接種方法では *H. pylori* の感染がきわめて困難な B 社のスナネズミにおいて、*H. pylori* の感染率を高める条件として菌接種前に胃内の pH を中性付近に調整する前処置が有効であることを確認した。

論文審査の結果の要旨

1983 年に Warren と Marshall によって初めてヒトの胃粘膜から分離された *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) の感染実験には、ヒトの *H. pylori* 感染の病態を最もよく反映するスナネズミが用いられている。本邦では、*H. pylori* が容易に感染するスナネズミを最も多く供給していた繁殖会社 (A 社) が、2012 年中頃からその供給を中止したため、他の 1 社 (B 社) から供給されているスナネズミしか入手できない現状にある。しかし、B 社のスナネズミは従来の *H. pylori* の接種条件ではほとんど感染しないため、現在わが国ではスナネズミを用いた *H. pylori* の研究を行うことが困難な状況下にある。

著者は、B 社から供給されている *H. pylori* 難感染性のスナネズミに感染を容易にさせる条件を検討し、菌接種前に胃内の pH を中性付近まで上昇させる前処置を施すことで著しく感染率が高くなる成績を得た。本研究の概要は以下の通りである。

本研究には、A 社 (27 匹) 及び B 社 (162 匹) の雄性スナネズミ合計 189 匹を用いた。供試した *H. pylori* の菌株は、東海大学医学部感染症研究室の古賀康裕教授から分与された 1 株及び一般財団法人東京顕微鏡院から分与された臨床分離株 5 株である。本研究における *H. pylori* の接種量は 5×10^7 CFU/ml とし、その接種及び各種溶液のスナネズミへの経口投与には経口ゾンデを用いた。

著者は、感染実験に不可欠な感染の有無の判定に *H. pylori* に対する血清中の IgM 及び IgG 抗体の上昇が正確な指標になることを確認した。すなわち、*H. pylori* 接種 2 週間後のスナネズミを用いて、胃の組織からの *H. pylori* の分離培養の結果と血清抗体との関係を次の方法で検討した。*H. pylori* の感染が成立し易い群では、前処置として pH1.7 の胃液約 0.1ml を中性付近まで上昇させるために、0.1%

炭酸水素ナトリウム溶液、pH 9.5 (重曹) 0.3ml を投与したスナネズミ (10 匹) へ brain heart infusion (BHI) 培地で調製した *H. pylori* を 1 日 1 回、2 日間連続接種した。他方、*H. pylori* が感染しにくい群では、スナネズミ (20 匹) へ famotidine を投与した後に滅菌生理食塩水 (生理食塩水) で調製した *H. pylori* を 1 日 1 回接種した。これらのスナネズミは *H. pylori* 接種の 2 週間後に麻酔下の採血によって安楽死させ、血清中の IgM 及び IgG 抗体は ELISA で測定した。それと同時に、摘出した胃の組織へ滅菌した PBS、pH7.4 を加えてホモジナイズし、それをウマ血清加 BHI 寒天培地で培養した。その結果、前処置で 0.1% 重曹 0.3ml を投与した 10 匹のスナネズミのうち血清中の IgM 及び IgG 抗体が有意に上昇した 9 匹のスナネズミ全ての胃から *H. pylori* が分離された。一方、famotidine を投与したスナネズミのうち *H. pylori* 接種後に血清中の IgM 及び IgG 抗体が有意に上昇しなかった 18 匹から無作為に選んだ 10 匹のスナネズミの胃からは全く *H. pylori* が分離されなかった。これらの結果から、*H. pylori* に対する血清中の IgM 及び IgG 抗体の上昇が *H. pylori* の感染成立の判定を行う指標になることが確認された。それ故に、著者は以下の実験における *H. pylori* の感染を血清抗体の上昇によって判定した。

著者は、A 社及び B 社のスナネズミへ生理食塩水あるいは BHI 培地で調製した *H. pylori* をそれぞれ接種してそれらの感染率を比較した。その結果、A 社のスナネズミ (27 匹) は全例が生理食塩水で調製した *H. pylori* に感染したが、B 社のそれ (40 匹) では全例で感染が成立しない成績を得た。また、BHI 培地で調製した *H. pylori* を B 社のスナネズミへ接種したところ、42% (5/12) に感染が確認された。そこで著者は、BHI 培地で調製した *H. pylori* の接種で 42% に感染が認められたことならびに *H. pylori* がウレアーゼを分泌して尿素をアンモニアと二酸化炭素に分解することで強酸性の胃内を自らが生存可能な環境に変えることから、*H. pylori* の感染に胃内の pH が関係すると推察した。それを確認するために、著者は B 社のスナネズミを用いて以下のいくつかの条件下で *H. pylori* の感染実験を行った。すでに得られていた実験成績も併せた結果は次の通りである。(1) BHI 培地 (pH6.8) で調製した *H. pylori* を接種したところ、42% (5/12) で感染が認められた。(2) *H. pylori* 接種 3 時間前に 10 mg/kg (body weight) の famotidine を投与した後に、生理食塩水で調製した *H. pylori* を接種した結果、10% (2/20) に感染が認められた。(3) 0.2 mg/ml の尿素を含有した BHI 培地 (pH6.8) で調製した *H. pylori* を接種したところ、70% (7/10) で感染が確認された。(4) *H. pylori* 接種 10 分前に 0.1% の重曹 0.3ml を投与して胃内の pH を中性付近に調整した後、生理食塩水で調製した *H. pylori* を 1 日 1 回接種したところ 70% (7/10) で感染が認められ、これを 2 日間連続接種したときには 80% (8/10) に感染が認められた。(5) (4) と同様に、0.1% 重曹を投与した後に、BHI 培地で調製した *H. pylori* を 1 日 1 回接種した場合に 80% (8/10) に感染が認められ、これを 2 日間連続接種したときには 90% (9/10) で感染が確認された。

次に、継代の少ない臨床分離株 5 株のスナネズミへの感染性を検討するために、生理食塩水で調製した 5 株の *H. pylori* を B 社の無処置のスナネズミ各 3 匹へそれぞれ接種したところ、5 株のうち 2 株で 3 匹中各 1 匹に感染が確認された (13.3%) が、他の 3 株では感染が成立しなかった。

著者の検討では、絶食させたスナネズミ 10 匹の胃液の pH は平均 1.7 で、その量は約 0.1ml であった。また、pH1.7 の 0.08M 塩酸 0.1ml に 0.1%重曹 0.3ml 及び BHI 培地 1.0ml を加えたときの pH は 6.9 に上昇した。それらのことから、著者は、スナネズミへの重曹投与による前処置によって、*in vitro* と同様に、胃内の pH が中性付近まで上昇したことで *H. pylori* の感染率が上昇したと考えた。著者はこの機序について、接種された *H. pylori* が胃粘膜に定着する際に、初めはその生存に必要な量のアンモニアを生成させるに十分なウレアーゼを分泌できないために、*H. pylori* が定着する部位の pH を生存可能な pH にまで上昇させることができないことが定着を困難にしたと推察している。また、継代の少ない *H. pylori* 臨床分離株が、継代を重ねた菌株よりもわずかに感染し易いと思われる成績が得られたが、その感染率（13.3%）は低く、継代を重ねた菌株との違いは明らかにできなかった。

上述のように、著者は菌体を生理食塩水に浮遊させた菌液を接種する一般的な接種方法では *H. pylori* の感染が困難な B 社のスナネズミにおいて、*H. pylori* の感染率を高める条件として菌接種前に胃内の pH を中性付近に調整する前処置が有効であるとの成績を得た。

本研究の成果は、再びわが国でスナネズミを用いた *H. pylori* の感染実験を可能とし、消化器感染症の研究の進展に寄与するところ大であり、博士（学術）の学位を授与するに値するものと本博士論文審査員全員が判断した。