

Helicobacter pylori 感染スナネズミにおける 魚粉の胃炎促進作用

Fish Meal Significantly Enhanced Helicobacter pylori-induced Gastritis in Mongolian Gerbils

寺本由里香¹, 谷川 徹也², 飯室 正樹², 若林 敬二², 福山 正文¹

¹ 麻布大学大学院環境保健学研究科, 神奈川県相模原市淵野辺 1-17-71

² 国立がんセンター研究所がん予防研究部, 東京都中央区築地 5-1-1

Yurika TERAMOTO¹, Tetsuya TANIGAWA², Masaki IIMURO², Keiji WAKABAYASHI² and Masafumi FUKUYAMA¹

¹Graduate School of Environmental Health, Azabu University, 1-17-71 Fuchinobe, Sagami-hara 229-8501, Japan

²Cancer Prevention Division, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan

Abstract: Epidemiological and laboratory animal studies have suggested a positive association between *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinogenesis. In Japan, gastric cancer is the most common and leading cause of cancer death. This study was designed to investigate the effects of fish meal on *H. pylori*-induced gastritis in Mongolian gerbils in order to find dietary factors associated with gastric carcinogenesis. Male 7 week-old Mongolian gerbils were inoculated with *H. pylori* (ATCC43504) 0.5 ml (0.5×10^9 CFUs) by gavage and a dietary regimen maintained as follows for 4 weeks: 0% fish meal (casein instead of fish meal in conventional diet); 10% fish meal (conventional diet); 20% fish meal (conventional diet plus 10% fish meal). All animals were sacrificed at 4 weeks after inoculation with *H. pylori*. In all gerbils inoculated with *H. pylori*, about 10^5 viable bacteria were counted, without any significant intergroup differences. In macroscopic findings, gastric edema and hemorrhage were observed in 10 and 5, 95 and 55, and 95 and 85% of animals in the 0, 10, and 20% fish meal diet groups, respectively. Histopathological examinations indicated that a fish meal diet significantly increased activity and inflammation indices of the stomach in a dose-dependent manner. These results suggest that some dietary factors in a fish meal diet enhance *H. pylori*-induced gastritis and may be dietary factors which enhance gastric carcinogenesis.

Key words: *Helicobacter pylori*, Mongolian gerbil, gastritis, fish meal

序 文

胃がんは、世界で最も多いがん死亡原因の一つであり、1996年には新たに百万人以上の人が胃がんと診断された。我が国においても、依然、主要ながん死亡原因であり、平成9年度には、約5万人が胃がん で亡くなっており、胃発がん機構の解明及びその予

防法の確立は重要かつ緊急な研究課題である¹⁾。最近、胃発がんと *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染との関係が指摘されている²⁻⁴⁾。1983年に Warren と Marshall により、ヒト胃粘膜から *H. pylori* が分離同定されて以来⁵⁾、1991年に同菌感染者では、胃がんを発生するリスクが非感染者の2.8～6倍も高いという疫学研究が発表されている²⁻⁴⁾。しかし、*H. pylori*

はヒト以外の動物に感染させることが難しく、動物実験の裏付けが欠けていた。1996年に平山らにより報告されたスナネズミを用いた *H. pylori* 感染モデルは、1回の培養菌液の経口胃内投与で長期持続感染が可能で、感染後約4週間で胃粘膜に炎症を認め、3～6ヶ月後には胃潰瘍及び腸上皮化生が観察され、ヒト *H. pylori* 感染臨床像に類似していることから、この動物実験モデルを用いた胃発がん研究が進められている^{6,7)}。更に、1998年以降、発がん物質と *H. pylori* 感染の組み合わせによるスナネズミでの胃発がんが相次いで報告され⁸⁻¹⁰⁾、*H. pylori* 感染と胃発がんの関連が動物実験モデルを用いて証明された。他方、胃がんの発生には、食物などの環境因子が大きく関わっていることが指摘されている。特に、日本で胃がんが多い原因の一つとして、塩魚、干魚及び焼き魚のような高塩食品の摂取や、亜硝酸塩、硝酸塩を多く含む食品の摂取によるのではないかと指摘する報告もみられる¹¹⁾。そこで、本研究では、胃病変に対する食品に含まれる魚の成分の影響をスナネズミ *H. pylori* 感染モデルを用いて検討した。

材料及び方法

1. 動物・飼料及び飼育条件・菌株

スナネズミ (Mongolian gerbils, MGS/Sea) 雄 6週令 75匹をセアック吉富 (株) より購入し、1週間通常固形飼料 (日本クレア製) と脱イオン水を自由摂取させることにより予備飼育した。動物の飼育は、バリアーシステムの飼育室にて、室温 25度、湿度 55%、明暗交代12時間の条件下で行った。動物は透明なポリカーボネイト製ケージに5匹ずつ収容し、床敷きにはハードチップを用いた。

実験動物用飼料として下記の3種類の飼料を用いた。

0% 魚粉飼料：通常粉末飼料中に動物性蛋白質源として重量比 10% 含まれている魚粉を、カゼインに置換した飼料。

10% 魚粉飼料：通常粉末飼料。

20% 魚粉飼料：通常粉末飼料 90% 及び魚粉 10% を混合した飼料。

各飼料組成の分析試験結果を Table 1 に示す。

試験菌株には、American Type Culture Collection (USA) より購入した *H. pylori* の標準株である *H. pylori*

Table 1. Compositions of the Diets

	0% fish meal diet (%)	10% fish meal diet (%)	20% fish meal diet (%)
Water	8.2	7.3	7.2
Protein (crude)	28.0	25.0	29.2
Fat (crude)	3.6	4.7	4.7
Fiber (crude)	3.0	4.0	3.6
Ash (crude)	3.8	6.0	7.7
Nitrogen free extract	53.4	53.0	47.6
Sodium chloride	0.7	0.9	1.0
Energy (kcal/100g)	370	370	364

ATCC43504 株を用いた。凍結保存した *H. pylori* ATCC43504 株の菌液を、10% の非働化ウマ血清 (阪大微生物病研究会製) を加えた Brucella broth (BBL 製) に接種し、CampyPak Plus (BBL 製) を用いたガスパックシステムにて 37°C、24 時間微好気条件下で振とう培養した。

2. 実験プロトコール

7週齢のスナネズミ 60匹に24時間絶食後、増菌培養した *H. pylori* 菌液 (1.0×10^9 CFU/ml) 0.5 ml をゾンデを用いて強制的に胃内投与した。残りの 15匹には非感染対照群として Brucella broth のみ感染群と同様に胃内投与した。投与後4時間絶食とした。その後 Figure 1 に示すとおり、感染動物は 20匹ずつ 1～3群、非感染動物は 4～6群に分け、それぞれ 1と4群は 0% 魚粉飼料、2と5群は 10% 魚粉飼料、3と6群は 20% 魚粉飼料を実験終了まで自由摂取させた。

3. 解剖方法

動物の解剖は *H. pylori* 感染 4週間後に以下の手順で行った。スナネズミをエーテルにて麻酔し、心採血による脱血致死後開腹し、諸臓器を肉眼的に観察した。肝臓、腎臓及び脾臓については摘出して重量測定した。胃は汚染しないように素早く摘出し、大弯より切開した後に軽く胃内容物を取り除き、肉眼的所見として胃粘膜における浮腫及び出血点を記録観察し、その後写真撮影を行った。摘出した胃を中心線に沿って左右対称になるように二つに分割し、一方を胃内細菌数測定へ、他方を病理組織学的検討に用いた。病理組織学的検討用の胃組織片は、カルノア液 (30% ク

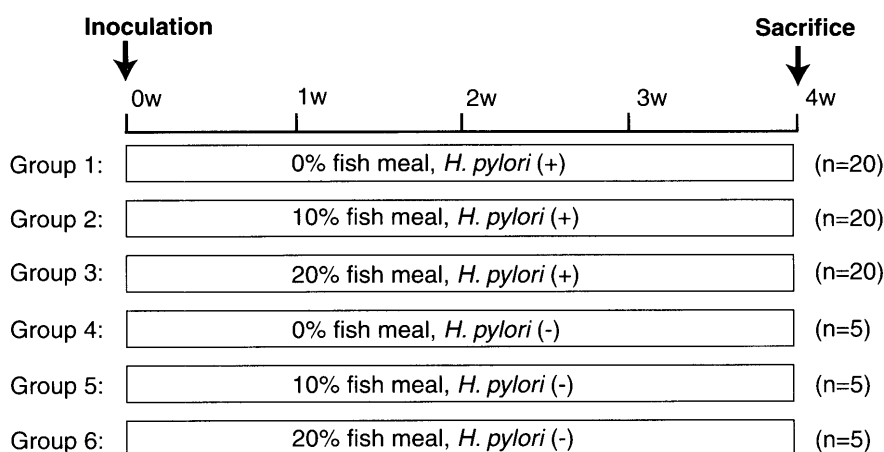


Fig. 1. Experimental protocol in the present study

ロロフォルム, 60% エタノール, 10% 塩酸) にて2時間固定し, パラフィン包埋後薄切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施した。

4. 胃内生菌数測定方法

半分に分割した胃粘膜をスパーテルで掻き取った後, リン酸緩衝液 (PH7.4) 中にてホモジナイズした。懸濁液をリン酸緩衝液にて段階希釈を行い 10^1 , 10^2 及び 10^3 希釈液を $100 \mu\text{l}$ ずつスキロー培地 (日水製) に接種し, CampyPak Plus を用いたガスパックシステムにて, 37°C , 7日間微好気条件下で培養した。グラム染色にて菌の観察, 及び CLO test (国際試薬製) にてウレアーゼ活性の確認後, 胃内生菌数を算出した。

5. 病理組織学的胃炎定量法

HE 染色を施した病理組織切片を顕微鏡にて観察し, Sydney 分類¹²⁾ に準じて胃炎を Activity と Inflammation の2項目について, 以下に示すとおりスコアリングを行い半定量的に評価した。

1. Activity: 400倍視野での上皮内に浸潤した好中球数を直接計数することによってスコア化した。

2. Inflammation: 400倍視野において最も炎症の強い箇所にて小円形細胞 (リンパ球及び形質細胞) を観察し, 以下に示す判定基準によりスコア化した。

0: 間質内に小円形細胞を生理範囲内に認める。

1+: 小円形細胞が少量間質内に観察される。

2+: 中等量の小円形細胞が間質内に観察されて上

皮内にも浸潤を認める

3+: 大量の小円形細胞の浸潤を認める。

6. 統計処理

病変の発生率には χ^2 検定法を, その他の数量には Welch の t 検定法をそれぞれ用いた。 $P > 0.05$ を統計的有意と判断した。

結果

1. 一般状態, 体重及び摂餌量

試験期間中における動物の一般状態は, *H. pylori* 感染群, 非感染対照群のいずれの群間においても, 特記すべき変化は認められなかった。試験期間を通じて, 体重及び摂餌量には各群間での差は認められなかった ($P > 0.05$)。また, 解剖時の肝臓, 腎臓及び脾臓の重量についても各群間で有意差を認めなかった (データ不掲載)。

2. *H. pylori* の胃内生菌数

H. pylori 感染群の全ての動物の胃から *H. pylori* が検出され, 非感染対照群からは検出されなかった。各感染群から検出された生菌数は Table 2 に示すとおり, Group 2 の 10% 魚粉飼料感染群から最も多く菌が検出されたが, それぞれの感染群において有意差は認めなかった ($P > 0.05$)。

Table 2. *H. pylori* Colonization

Group	Diet	<i>H. pylori</i> Inoculation	No. of colonies of <i>H. pylori</i> (log CFUs/stomach) ^{a)}
1	0% fish meal	+	4.8 ± 0.5
2	10% fish meal	+	5.7 ± 0.4
3	20% fish meal	+	5.4 ± 0.4
4	0% fish meal	-	
5	10% fish meal	-	
6	20% fish meal	-	

^{a)} Mean ± SD

Table 3. Macroscopic Lesions in the Glandular Stomachs of Mongolian Gerbils

Group	Diet	Number of animals (%) with	
		Edema	Hemorrhage
1	0% fish meal	2/20 (10)	1/20 (5)
2	10% fish meal	19/20 (95) ^{a)}	11/20 (55) ^{a)}
3	20% fish meal	19/20 (95) ^{a)}	17/20 (75) ^{a)}
4	0% fish meal	0/5 (0)	0/5 (0)
5	10% fish meal	0/5 (0)	0/5 (0)
6	20% fish meal	0/5 (0)	0/5 (0)

^{a)} Significantly different from 0% fish meal diet group by χ^2 test ($P < 0.01$).

3. 肉眼的胃炎状態

各群の肉眼的に認められた胃炎の状態を Table 3 に示した。10%魚粉飼料感染群では20匹中19匹 (95%) の胃に、20%魚粉飼料感染群では20匹中19匹 (95%) の胃に浮腫が認められたのに対し、0%魚粉飼料感染群では20匹中2匹 (10%) の胃にのみ浮腫が認められるにとどまった。また、点状出血は、10%魚粉飼料感染群では20匹中11匹 (55%) の胃に、20%魚粉飼料感染群では20匹中17匹 (85%) の胃に点状出血が認められた。一方、0%魚粉飼料感染群では20匹中1匹 (5%) の胃にのみ観察された。*H. pylori*非感染群では、魚粉の有無に関係なく、すべての動物には肉眼的に胃炎を示唆する所見は認められなかった。

4. 組織学的胃炎

病理組織学的胃炎スコアは、材料及び方法に記した Sydney 分類で算定した。Activity の平均値は0%魚粉飼料感染群 14.7, 10%魚粉飼料感染群 76.4, 20%魚粉飼料感染群 124.6 であり、魚粉含有量に従って有意

に上昇していた。また、Inflammation の平均値は0%魚粉飼料感染群 1.0, 10%魚粉飼料感染群 1.4, 20%魚粉飼料感染群で 2.7 であった。

代表的な胃炎の肉眼像と HE 染色組織像は Figure 2 に示すとおり、0%魚粉飼料感染群では肉眼的な浮腫、出血などは認められず、組織学的にもごく軽度な胃炎像が認められるのみであった。10%魚粉飼料感染群では胃粘膜の浮腫、出血、組織学的胃炎が観察された。20%魚粉飼料感染群では、著しい浮腫と出血斑、強い炎症細胞の浸潤、上皮細胞の剥奪が認められた。

考 察

本研究では、飼料中に含まれる魚粉含有量に比例して *H. pylori* 感染スナネズミ胃炎が増強することを示した。また、魚粉単独では、スナネズミの胃に変化を与えないこと、また、魚粉投与は *H. pylori* の胃内生菌数に変化を与えないことがわかった。この魚粉中における胃炎促進物質としてまず考えられるのは NaCl である。Takahashi らは、N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine によって initiate されたラット腺胃発がんが、NaCl によって用量依存性に促進されたと報告している¹³⁾。しかし、今回の著者が使用した魚粉飼料中に含まれる NaCl 量は、0%魚粉飼料が 0.7%、10%魚粉飼料が 0.9%、20%魚粉飼料が 1.0% であり、Takahashi らが示した胃発がんを促進する 5%又は 10% に比べると非常に少ない濃度である。よって、魚粉中の胃炎促進作用物質が NaCl とは考えにくい。第 2 にニトロソ化合物の関与があげられる。Weisburger らは、亜硝酸塩処理したサンマの抽出物をラットに週 3 回 6ヶ月間投与すると、12 ~ 18ヶ月後にはすべてのラットの胃に腸上皮化生や腺上皮の過形成を認め、12匹中 8 匹のラットに胃腫瘍を認めたと報告している¹⁴⁾。今回の実験に用いた魚粉は、北洋産のタラを熱加工したものが使われており、魚粉中の二級アミンが食品中に含まれる硝酸塩や亜硝酸塩、もしくは胃粘膜の炎症によって生ずる NO と反応してある種のニトロソ化合物を形成した可能性は否定できない。現在著者らは、魚粉中のどのような化合物が *H. pylori* 感染胃炎モデルにおいて、胃炎促進作用を示すのかを検討中である。

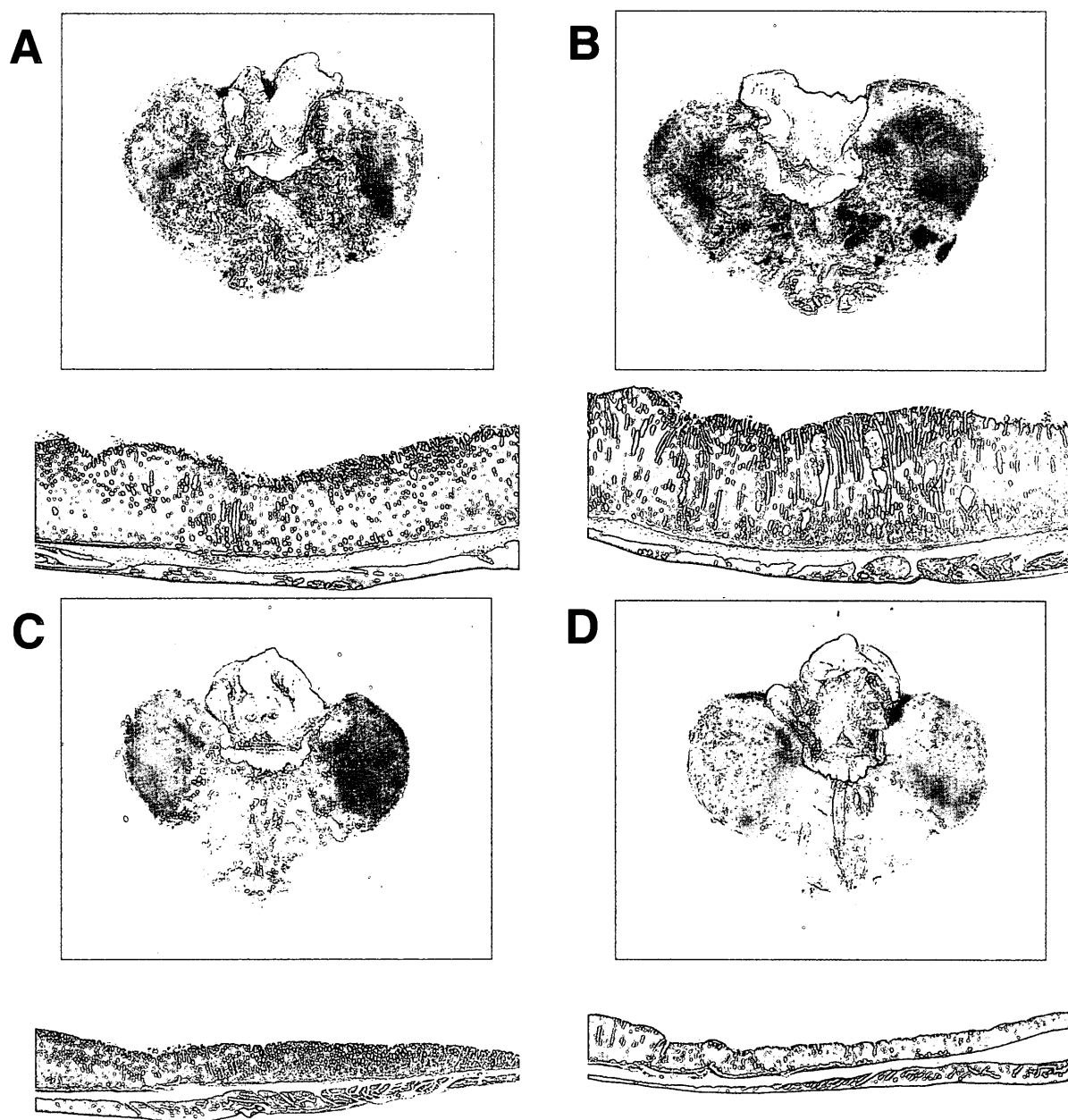


Fig. 2. Macroscopic and microscopic views of gastric mucosae of Mongolian gerbils inoculated with or without *H. pylori* (H&E staining, original magnification $\times 8$). A. 10% fish meal diet with *H. pylori* infection (Group 2); B. 20% fish meal diet with *H. pylori* infection (Group 3); C. 0% fish meal diet with *H. pylori* infection (Group 1); D. 10% fish meal diet without *H. pylori* infection (Group 5). Hyperplastic changes with severe neutrophil and mononuclear cell infiltration in both the mucosa and submucosa are apparent in the *H. pylori*-infected Mongolian gerbils fed 10% and 20% fish meal diet in a dose-dependent manner. A very weak degree of localized inflammation is apparent in the 0% fish meal case.

謝 辞

最後に、本研究の全般に渡りご指導を賜りました国立がんセンター研究所がん予防研究部川森俊人室長、太田俊久氏に深甚なる謝意を表します。また、実験にご協力いただきました麻布大学大学院環境保健学研究科学生滝口昌延氏に深謝いたします。

引用文献

- 1) The Editorial Board of the Cancer Statistics in Japan. (1999). *Cancer statistics in Japan-1999*. Foundation for Promotion of Cancer Research, Tokyo.
- 2) Forman, D., Newell, D. G., Fullerton, F., Yarnell, J. W.,

- Stacey, A. R., Wald, N. and Sitas, F. *Br Med J* **302**: 1302-1305 (1991).
- 3) Nomura, A., Stemmermann, G. N., Chyou, P. H., Katou, I., Perez-Perez, G. I. and Blaser, M. J. *N Engl J Med* **325**: 1132-1136 (1991).
- 4) Parsonnet, J., Friendman, G. D., Vandersteen, D. P., Chang, Y., Vogelman, J. H., Orentreich, N. and Sibley, R. K. *N Engl J Med* **325**: 1127-1131 (1991).
- 5) Warren, J. R. and Marshall, B. *Lancet* **1**: 1273-1275 (1983).
- 6) Hirayama, F., Takagi, S., Yokoyama, Y., Iwao, E. and Ikeda, Y. *J Gastroenterol* **31**: 24S-28S (1996a).
- 7) Hirayama, F., Takagi, S., Kusuhara, H., Iwao, E., Yokoyama, Y. and Ikeda, Y. *J Gastroenterol* **31**: 755-757 (1996b).
- 8) Hirayama, F., Takagi, S., Iwao, E., Yokoyama, Y., Haga, K. and Hanada, S. *J Gastroenterol* **34**: 450-454 (1999).
- 9) Shimizu, N., Inada, K., Nakanishi, H., Tsukamoto, T., Ikehara, Y., Kaminishi, M., Kuramoto, S., Sugiyama, A., Katsuyama, T. and Tatematsu, M. *Carcinogenesis* **20**: 669-676 (1999).
- 10) Sugiyama, A., Maruta, F., Ikeno, T., Ishida, K., Kawasaki, S., Katsuyama, T., Shimizu, N. and Tatematsu, M. *Cancer Res* **58**: 2067-2069 (1998).
- 11) Nomura, A. Stomach cancer. In "*Cancer Epidemiology and Prevention*," ed. D. Schottenfeld and Fraumeni, J. F. Jr. (ed.) New York Oxford University Press. 707-724 (1996).
- 12) Dixon, M. F., Genta, R. M., Yardly, J. H., Correa, P. and participants in the international workshop on histopathology of gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* **20**: 1161-1181 (1996).
- 13) Takahashi, M., Nishikawa, A., Furukawa, F., Enami, T., Hasegawa, T., Hayashi, Y. *Carcinogenesis* **15**: 1429-1432 (1994).
- 14) Weisburger, J. H., Marquardt, H., Hirota, N., Mori, H. and Williams, G. M. *J Natl Cancer Inst* **64**: 163-167 (1980).