

[別紙1]

## 論文の内容の要旨

論文題目 : ヘリコバクターピロリ菌感染実験胃発癌モデルの作成

氏名 : 清水伸幸

【研究背景】癌の治療・予防を考えるうえで、癌の発生に関する研究は必須である。胃癌における前癌病変は、大腸癌における腺腫のように一般に受け入れられている病変が存在しなかったが、最近では *Helicobacter pylori* (以下 Hp) 感染が胃発癌と密接に関与していると考えられている。1983年に Warren と Marshall は、慢性活動性胃炎患者の胃内に生息するグラム陰性らせん桿菌 “small curved and S-shaped bacilli” を確認したことを報告した。やがてこの細菌は Hp と改名され、Hp 感染と各種胃疾患との関連について多くの検討がなされ、胃炎・消化性潰瘍・腸上皮化生・胃癌・胃リンパ腫との関連が報告された。ヒトにおける Hp 感染と胃癌発生との関連について、1991年に報告された血清抗体価を用いたコホート研究で、Hp 感染は胃癌発生に関連があるということが示された。これらの疫学調査データをもとに WHO/IARC は Hp を胃癌に対する “definite carcinogen” と報告し、Hp は胃癌発生の主要な原因として注目を浴びるようになった。これらのヒト胃癌と Hp 感染との関連についての報告は主に疫学的検討に基づいたものであり、動物実験などによる両者の関連性の証明は極めて重要である。本研究では Hp 感染の胃癌発生に及ぼす影響についての実験的検討について報告する。

これまでの感染実験は、Hp 感染と胃癌発生についての関連を証明する実験モデルには至っていなかった。スナネズミの Hp 感染モデルは感染の安定性と発生する病変のヒト類似性で注目を浴びている。一方で、スナネズミには実験動物としての情報はほとんどなかった為、我々は最初に化学発癌実験系の確立を行い、ラットの腺胃に癌を発生させるニトロソ化合物 *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (以下、MNNG) と、マウス腺胃に腺癌を誘発する *N*-methyl-*N*-nitrosourea (以下、MNU) を用いた化学発癌実験系を確立した。この実験をもとに、MNU 誘発腺胃癌発生に対する Hp 感染の影響を検討したところ、30ppm の MNU を投与した後 Hp を感染させた群で 18 匹中 6 匹、Hp を感染後 10ppm の MNU を投与した群で 19 匹中 7 匹に癌の発生を認め、対照群に対して統計学的に有意な発癌率の上昇を認めた。

【実験 A】 Hp 感染が MNU 以外の発癌剤による実験胃発癌に対しても発癌増強作用を有することを確認する目的で、化学発癌剤として MNNG を使用した実験を施行した。

7 週齢雄性 SPF スナネズミを、P 2 レベルの動物管理施設にて飼育し実験を施行した。MNNG は、自由飲水の形で投与した。投与菌株は Hp の標準株である ATCC 43504 を使用した。Hp 感染のプロモーター作用の確認のために MNNG を 300 (1・2 群) または 60ppm (3・4 群) の濃度で 10 週間投与の後に Hp 菌液を投与した (1・3 群)。また、Hp 感染の共イニシエーター作用の確認のために、Hp 菌液 (5・7 群) を投与した後、MNNG を 100 (5・6 群) または 20ppm (7・8 群) の濃度で 30 週間投与した。Hp 感染単独の胃粘膜変化の確認のために、Hp 菌液のみを投与する群 (9 群) と、全ての対照として培養液のみを投与する群を設け (10 群)、実験 50 週で標本を採取した。胃標本の固定は 4%パラフォルムアルデヒドもしくは 1%酢酸加 95%エタノールとした。病理学的検索として、HE 染色・AB-PAS 染色と抗 Hp 抗体による免疫染色を行った。Hp 感染の確認のために粘膜の培養を併せて施行した。採取した血液は少量の EDTA を混入して血清を採取し、抗 Hp 抗体価の測定は、ELISA の系を用いた。

培養法による Hp 感染の確認では、1 群で 25 匹中 13 匹、3 群で 24 匹中 18 匹、5 群で 26 匹中 15 匹、7 群で 25 匹中 24 匹、9 群で 20 匹中 18 匹で確認された。1・3・7 群の癌発生率 (44.4、24.0、60.0%) は、それぞれの対照群に対し統計学的に有意な上昇を認めた。1・3・5・7 群において癌の発生した個体の血清抗体価の平均値はそれぞれ、115.6、310.1、63.9、208.2 (A.I.) であり、癌の発生しなかった個体の抗体価は 32.1、103.4、81.7、123.5 (A.I.)

で、担癌個体の血清抗体価は 1・3・7 群で非担癌個体より統計学的に有意に高値を示していた。

スナネズミは Hp 感染が安定し、ヒト類似の胃病変が発生するため Hp 感染と胃癌発生との関連を示す有効な動物モデルと考えられる。ここに示した MNNG 実験系でも、MNU を用いた実験と同様に Hp 感染が化学発癌を増強することが示され、Hp 感染が発癌剤の種類によらず発癌増強作用を示すことを示唆していると考えられる。また我々は、マウスの実験系で発生する低分化型腺癌の割合は投与する発癌剤の濃度に依存することを示してきたが、本実験でも高濃度の MNNG を投与した群で低分化型腺癌の割合が多く、発生する胃癌の組織型は Hp 感染自体によるのではなく、化学発癌剤に依存していることが想定された。Hp 感染の病原性に関する宿主側の反応として、Th1 反応が Hp 感染に伴う胃炎や胃潰瘍形成に重要な役割を果たしていることが報告されている。今回の実験では血清抗体価が高い個体ほど発癌しやすいことが示され、胃炎や潰瘍形成とは異なり液性免疫 (Th2 反応) が胃発癌に関与している可能性が考えられた。Hp 感染後に 100ppm の MNNG を投与した群では約半数の個体で Hp が除菌され、発癌の増強作用が消失していた。すなわち、Hp 除菌療法は胃発癌に対する予防方法として有効である可能性も示唆された。

【実験 B】疫学的調査と上記実験で、Hp 感染が胃発癌に関与していることは疑う余地が無い。両者の因果関係を示すために、MNU と Hp 感染による実験胃発癌に及ぼす Hp 除菌の影響について検討した。

7 週齢雄性スナネズミを P 2 レベルの動物管理施設にて飼育し実験を施行した。MNU は自由飲水の形で投与した。30ppm の MNU を隔週で 10 週間投与し、Hp 菌液 (1・2 群) もしくは液体培地 (3 群) を投与した。2 群の動物に対しては実験 21 週に除菌を施した。また、Hp 菌液 (4・5 群) もしくは液体培地 (6 群) を投与後、10ppm の MNU 溶液を 20 週間投与した。5 群の動物に対しては実験 21 週に除菌を施した。実験 50 週で標本を採取した。

5 群の 24 匹中 2 匹で Hp 感染が確認されたため、以降の検討からはこの 2 標本は除外した。血清抗 Hp 抗体価は、1・2・3・4・5・6 群でそれぞれ、136.1、11.4、2.3、466.7、100.6、2.5 (A.I.) であり、各実験の群間で有意差を認めた。腺癌の発生は、1 群では 23 匹中 15 匹であり、3 群の発癌率 (15 匹中 1 匹) に対して、有意に発癌率の増強を認めた。除菌を施行した 2 群の発癌率は 24 匹中 5 匹であり、1 群に対して発癌率は有意に低下した。4 群の発癌率は 26 匹中 9 匹であり、6 群 (18 匹中 1 匹) に対して有意な発癌率の上昇を認め、5 群の発癌率は 22

匹中 2 匹であり、4 群に対して有意な発癌率の低下を認めた。

本実験では除菌により Hp 感染のもつスナネズミ化学発癌増強作用が減弱、ないし消失することが判明し、Hp 除菌が胃癌発生の予防法として有効である可能性が示された。特に非除菌群では全ての標本に著明な炎症所見が有り、除菌群では炎症所見がなかったことより、Hp 感染の胃癌発生に対する増強作用は炎症を介したものであることが示唆された。また、本実験では共イニシエーター作用は証明できず、主としてプロモーター作用による発癌増強作用が示された。現在、Hp 除菌の適応を決定することは急務の課題となっており、宿主側の要因による除菌者・非除菌者の選別が重要と考えられる。そのために、本モデルと他のモデルとの比較検討が重要な意義を持つてくるものと考えている。また Hp 感染の時期や除菌の時期が発癌増強作用と組織型に対して影響を与えている可能性もあり、本モデルを一部改変することにより、Hp 感染により生じる種々の胃病変の検討を行い得るものと考えている。

【まとめ】疫学的調査の結果をもとに IARC が Hp 感染を『胃癌発生に対する確定的な発癌要因』と報告してから、Hp 感染と胃癌発生との関連は消化管疾患における主要な研究課題となってきた。我々も実験的検討を重ねてきており、Hp 感染が胃癌発生に関与していることは疑う余地が無い。Hp 感染そのものが発癌作用を有するか、Hp 感染により生じた胃粘膜の炎症が重要なのかについては、いまだ明確な答えは得られていない。抗 Hp 血清抗体価の高い個体において発癌が高頻度に認められるなど、宿主の反応が重要な役割を果たしていることは考慮すべきである。

今回の一連の検討により、化学発癌剤によるスナネズミ腺胃癌の発生が Hp 感染により増強されることが明らかとなった。小動物における腺胃実験発癌は一般的に高分化型腺癌が多く、その一方で前癌病変と考えられてきた萎縮性胃炎や腸上皮化生の発生はまれであり、ヒト胃癌のモデルとして不十分な点が多かった。スナネズミにおいて低分化型腺癌も誘発され、萎縮性胃炎や腸上皮化生が観察されたことは、ヒト胃癌のモデルとしての有用性を示すものと考えられる。さらに、Hp 除菌により Hp 関連胃発癌は軽減されることが判明し、Hp 除菌が胃癌発生の予防方法となりうることも示された。今後は、本実験系を一部改変することにより、Hp 感染の胃癌発生に影響を及ぼす因子の解析と、慢性炎症・腸上皮化生・萎縮性胃炎と胃癌との関連も解明されていくことが期待される。