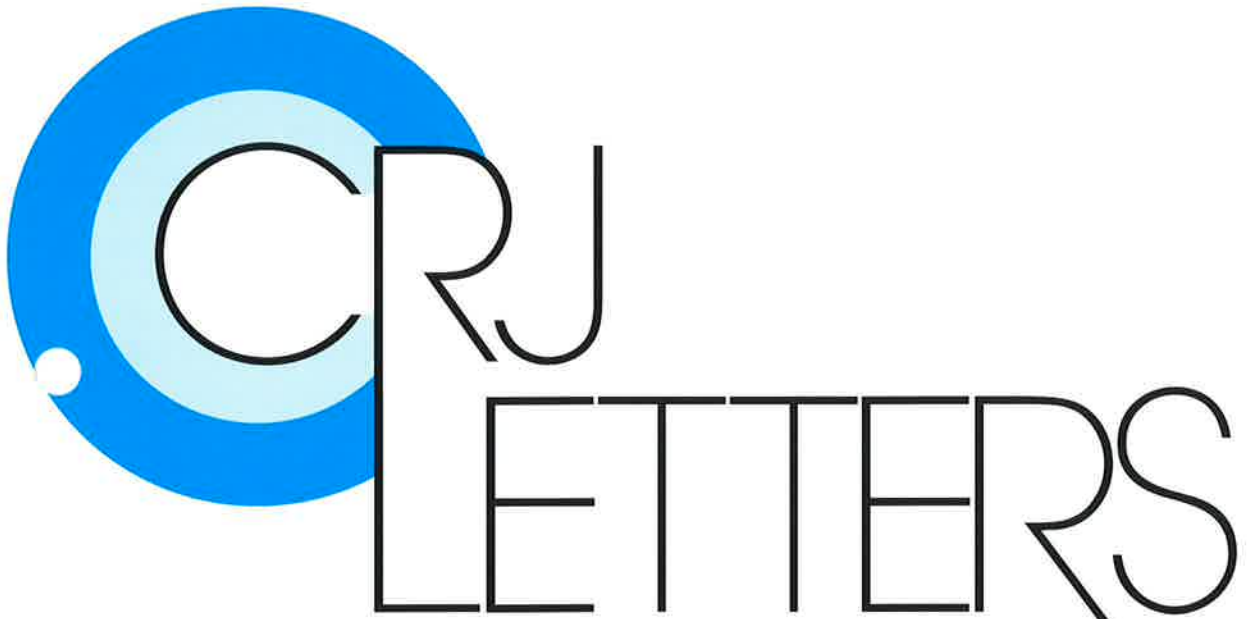


Vol.6 No.1

March 1993



CRJ  
LETTERS

— 卷頭論文 —

ヘリコバクター・ピロリ感染ヌードマウス・モデルの確立



CHARLES RIVER  
JAPAN, INC.

# ヘリコバクター・ピロリ感染ヌードマウス・モデルの確立

山口大学第一内科 荻田幹夫／沖田 極

## I. はじめに

1983年、Marshallにより、胃粘液中にグラム陰性らせん状桿菌の発見がなされ、同菌と胃炎および胃・十二指腸潰瘍との関係が指摘された。その後、同菌は*Helicobacter pylori*(以下、Hpとする)と命名され、胃十二指腸疾患との関連性が深いことが、臨床的にますます明らかになってきた。また、同菌は今日では、胃癌との関連性も指摘されるようになってきている。

このように、同菌は臨床的に、胃十二指腸疾患と深いつながりをもつことが指摘されているが、その病原性については、今日でも不明な点が多い。というのも、同菌は宿主に対して特異性があり、当初、人の胃粘液中にしか棲まないとされていたため、動物実験による同菌の病原性の検討が困難であったからである。しかし、本菌はサルや無菌ブタを宿主にできることがわかったが、やはり、その宿主も特別なことから、いまだに、Hpの病原性については十分な検討がなされていない。

そこで、筆者は1990年、Hpの病原性についての十分な検討を行うために、ヌードマウスを用いてHp感染rodent modelの確立を目指し、成功した。そして、本モデルを用いてその感染機序を明らかにするとともに、Hp感染によって引き起こされた胃・十二指腸における組織学的変化について検討した。さらに、本モデルを用いて、Hpに対して抗菌効果をもつとされている薬剤について、その抗菌効果を定量的に検討した。

## II. 実験内容

### 1. 動物

用いた動物は、6週令、雄のBALB/cヌードマウスとBALB/cマウスである。なお、BALB/cヌードマウスの飼育は、laminar flow rackで行った。Foodと水は、いずれも高圧滅菌したものを用いた。



著者プロフィール  
医学博士。1984年山口大学医学部卒業。1988年同大学大学院終了後、現在に至る。主たる研究テーマは、ヘリコバクター・ピロリの病因に関する研究。消化管癌の内視鏡的治療に関する研究。趣味は映画および音楽鑑賞、ゴルフ。

### 2. 菌液

菌液は、10%子牛血清を加えたBrucella broth (BBL社)を用いて作成した。菌液作成の条件は、微好気下、37℃、24時間で行った。用いた菌株は、胃炎患者からの分離株、CPY2052、胃潰瘍患者からの分離株、CPY3401およびCPY1351と標準株、NCTC11637を用いた。なお、これらHp菌株の同定は、あらかじめ、その生化学的特性に基づいて行っている。

### 3. 実験計画

#### 1) 感染実験

それぞれの菌液は、 $2 \times 10^8$ 個/mlに調整して、soft tubeを用いて、ヌードマウス(35匹×4群)およびマウス(35匹×4群)の胃内に直接投与した。そして、菌液投与後1、2、3、4、10、20、40週にわたりfollow upを行い、各ヌードマウスおよびマウスの半胃粘膜におけるHp菌の量を検討した。なお、コントロール群には、Brucella brothを投与した。さらに、菌液投与後の各ヌードマウスおよびマウスの胃および十二指腸の組織学的変化についても、検討した。

#### 2) 抗Hp効果判定の定量実験

上述のごとく作成したHp(CPY2052)感染ヌードマウス(25匹×4群)を用いて、アモキシシリン、メトロニダゾール、ピスマス製剤、メチレンブルーのHpに対する抗菌効果を定量的に検討した。即ち、図1のごとく、菌液投与後4週目から1週間毎日、各薬剤のCPY2052に対するMICの100倍量を、soft tubeを用いて直接胃内に投与した。そして、薬剤投与後0、1、2、3、4週目にわたって、半胃粘膜中のHpの菌量を測定して、コントロール群35匹と比較検討した。なお、コントロール群は、菌液投与後、薬剤などの投与は行っていない。また、薬剤の投与に関しては、上述した各薬剤をそれぞれ1剤ずつ投与した群に加えて、アモキシシリン、メトロニダゾール、ピスマス製剤の3剤を同時に、1週間毎日投与した3剤併用群25匹を加えた。さらに、薬剤によるHpの除菌により、Hpにより引き起こされた胃および十二指腸における組織学的変化に、どのような影響があるのかを検討した。

### III. 結果

#### 1. 培養結果

図2に示すように、CPY2052を投与したヌードマウス群は、菌液投与後すべてのヌードマウスの胃粘

膜にHpの存在が確認できた。そして、菌液投与後4週目までは、投与後週数とともに、胃底腺および幽門腺領域ともに単位面積あたりのHpの菌数はしだいに増加し、菌液投与後4週目以降はプラトーに達する

図1 各種薬剤の抗Hp効果判定の定量実験手順…菌液 (CPY2052、 $10^8$ 個/ml) 投与後4週目より1週間、各種薬剤のMICの100倍量を投与し、各種薬剤投与後0~4週にわたって、各種薬剤投与群とコントロール群のそれぞれのヌードマウスの半胃粘膜の菌量を算出し、各種薬剤投与群とコントロール群との半胃粘膜の菌量を比較検討した。

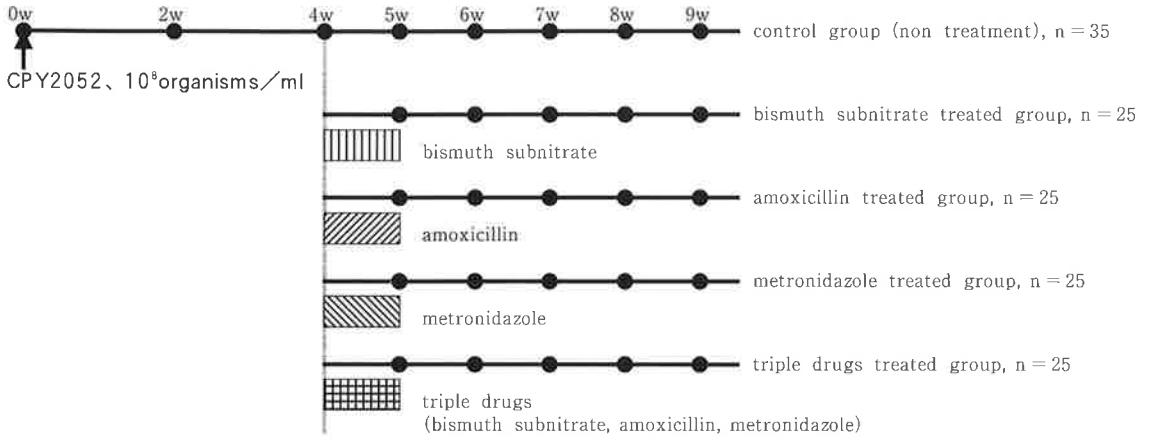
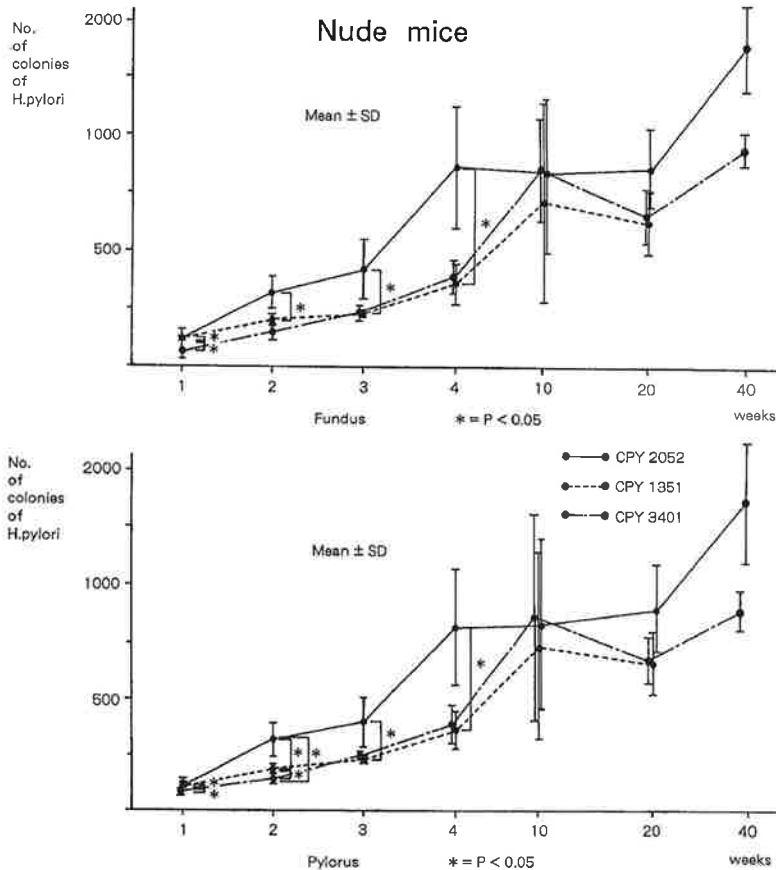


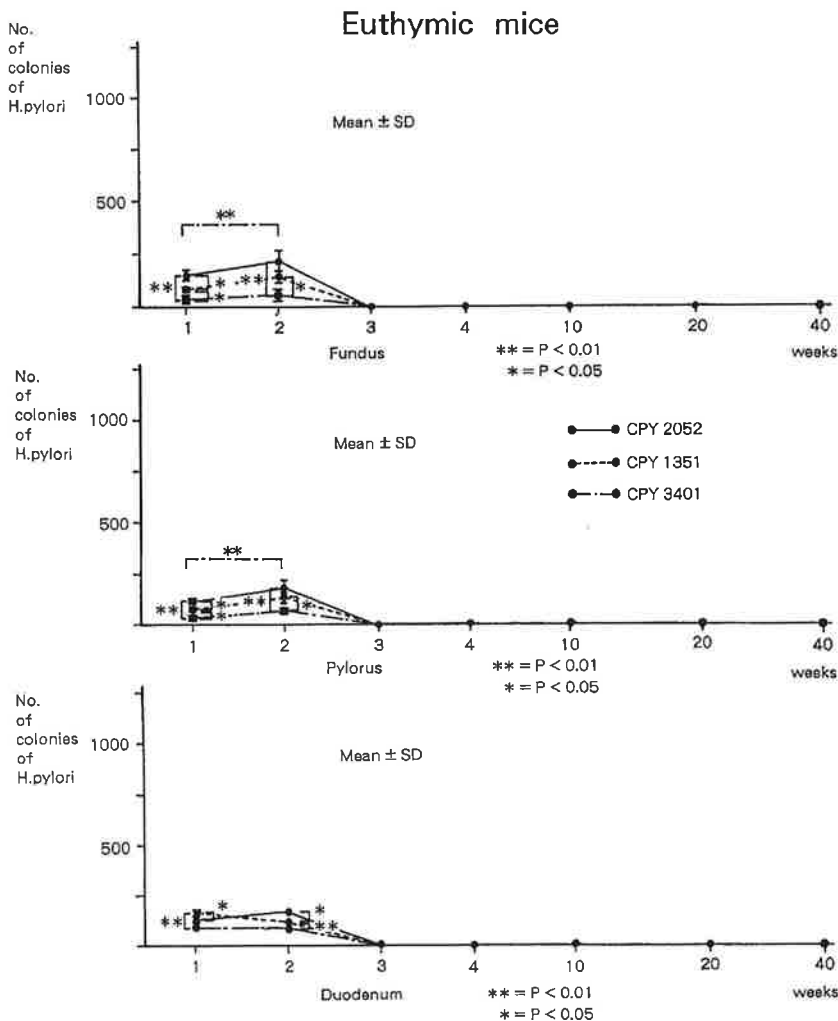
図2 ヌードマウスでの菌液 (CPY2052、CPY3401、CPY1351) 投与の経過週数と、胃底腺領域および幽門腺領域での単位面積あたりHp菌数との関係



傾向が認められた。CPY3401およびCPY1351についても、CPY2052と同様に、菌液投与後すべてのヌードマウスの胃粘膜にHpの存在が確認できたとともに、菌液投与後10週目までは、投与後週数とともに単位面積あたりのHpの菌数はしだいに増加し、菌液投与後10週目以降はプラトーに達する傾向が認められた。なお、NCTC11637投与群およびコントロール群においては、Hpの存在は認められなかった。

CPY2052、CPY3401およびCPY1351のそれぞれの菌液を投与したマウス群では、図3に示すように、菌液投与後1、2週目では、胃底腺、幽門腺領域および十二指腸粘膜の培養の結果、Hpが認められたが、3週目以降ではHpの存在は認められなかった。また、マウスでのNCTC11637投与群およびコントロール群においても、Hpの存在は認められなかった。

図3 マウスでの菌液（CPY2052、CPY3401、CPY1351）投与の経過週数と、胃底腺領域、幽門腺領域および十二指腸粘膜での単位面積あたりHp菌数との関係



## 2.組織学的変化

Hpを投与し、Hpが胃粘膜に生着したヌードマウス群（CPY2052、CPY3401およびCPY1351投与群）では、菌液投与後1週目では全例に、図4、5に示すように、びらんや十二指腸のvilliの膨化が認められた。さらに、菌液投与後4週目からは、図6、7に示すように、胃、十二指腸の粘膜固有層に小円形細胞の浸潤が認められるようになってきた。菌液投与後10週目以降になると、粘膜下層に著しい小円形細胞の浸潤が認められるようになった（図8）。一方、Hpが胃粘膜に生着しなかったヌードマウス群（NCTC11637投与群）では、菌液投与後1週目では全例に胃びらんや十二指腸のvilliの膨化が認められたが、2週目以降にそれらは消失した。なお、コントロール群では上述のような変化は認められなかった。

NCTC11637、CPY2052、CPY3401およびCPY1351のそれぞれの菌液を投与したマウス群では、菌液投与後2週目までは全例に胃びらんや十二指腸のvilliの膨化が認められたが、3週目以降には、それらは消失した。小円形細胞の浸潤については、コントロール群と比べて、特に差はなかった。なお、コントロール群では、上述のような変化は認められなかった。

## 3.Hpの組織学的存在部位

Hpが胃粘膜に生着したヌードマウス群（CPY2052、CPY3401およびCPY1351投与群）で、Giemsa染色標本（図9）および走査電子顕微鏡標本（図10）における検討で、Hpが胃の粘液中に存在することが判明した。

#### 4.各種薬剤のCPY2052 に対するMIC

アモキシシリン、ピスマス製剤、メトロニダゾールおよびメチレンブルーのHp (CPY2052) に対するそれぞれのMICは、0.03、3、1.5、37.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

#### 5.Hp感染ヌードマウスモデルを用いた抗Hp剤の抗Hp効果の定量的検討

図1に示した検討の結果、図11、12に示すごとく、アモキシシリン投与群およびピスマス製剤投与群は、コントロール群と比較して、薬剤投与後0、1、2週目までは半胃粘膜中のHpの菌量は有意に抑制され、その後、有意の差は消失した。また、図13に示すごとく、メトロニダゾール群は、コントロール群と比較して、薬剤投与直後のみ半胃粘膜中のHpの菌量は

有意に抑制されたが、その後、有意の差は消失した。メチレンブルー投与群は、図14に示すごとく、コントロール群と比較して、薬剤投与後1、2、3週目までは半胃粘膜中のHpの菌量は有意に抑制されたが、その後、有意の差は消失した。3剤併用群は、薬剤投与直後から今回での検討期間中すべてで、コントロール群と比較して、半胃粘膜中のHpの菌量は有意に抑制された(図15)。そして、各薬剤投与群の薬剤投与後の組織学的変化は、いずれの群も図16、17に示すごとく、コントロール群と比較して、胃びらん

図4 CPY2052 投与後1週間目のヌードマウスの胃底腺領域にできたびらん



図6 CPY2052 投与後4週間目のヌードマウスの胃粘膜固有層における小円形細胞浸潤と毛細血管の拡張

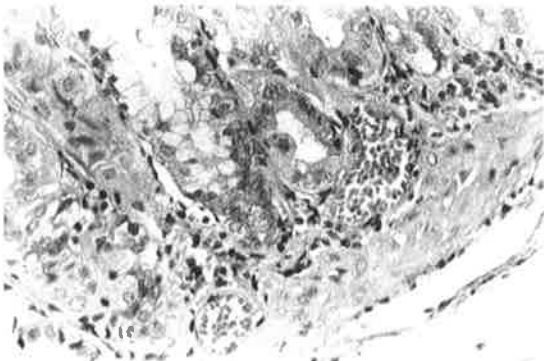


図5 CPY2052 投与後1週間目のヌードマウスの十二指腸粘膜にできたvilliの膨化

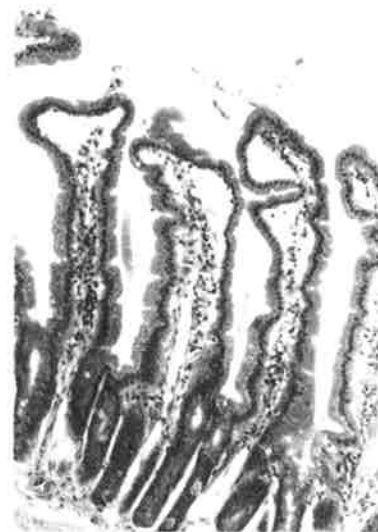


図7 CPY2052 投与後4週間目のヌードマウスの十二指腸粘膜固有層における小円形細胞浸潤と毛細血管の拡張

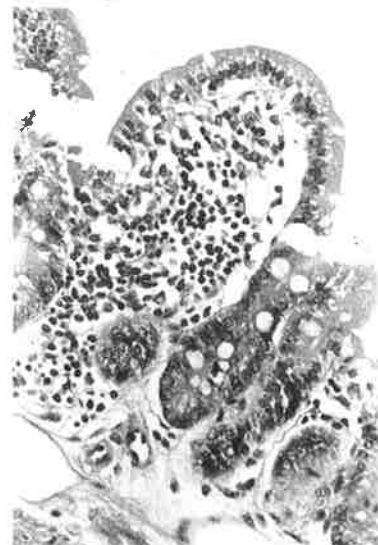


図8 CPY2052 投与後10週間目のヌードマウスの胃粘膜下層における小円形細胞浸潤

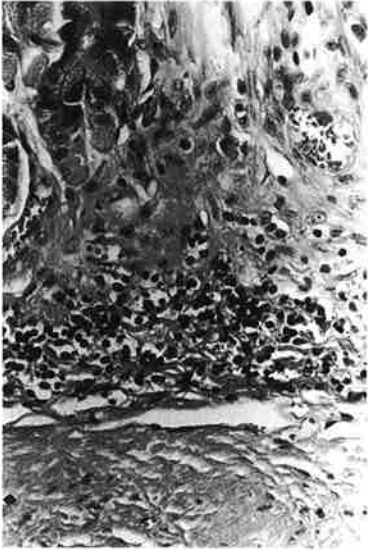


図10 CPY2052 投与後1週間目のヌードマウスの胃粘液中に認められた、Hpと思われる、らせん状桿菌（走査電子顕微鏡）

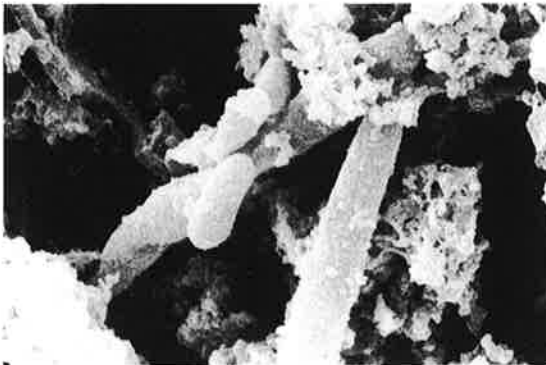


図12 Hp 感染ヌードマウスモデルを用いた、次硝酸ビスマス投与群とコントロール群の菌液投与後の経過週数と半胃粘膜のHp 菌量の比較

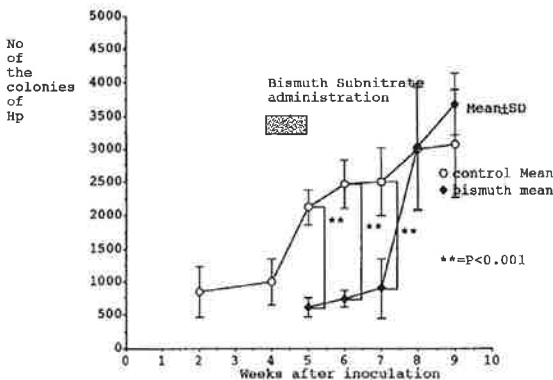


図9 CPY2052 投与後1週間目のヌードマウスの胃粘液および壊死物質中に発見された、Hpと思われる、らせん状桿菌（Giemsa 染色）

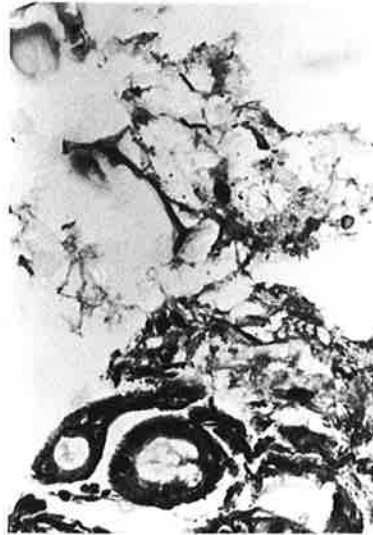


図11 Hp 感染ヌードマウスモデルを用いた、アモキシシリン投与群とコントロール群における、菌液投与後の経過週数と半胃粘膜のHp 菌量の比較

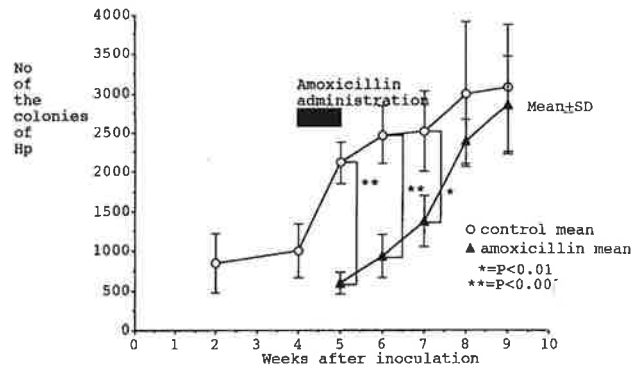
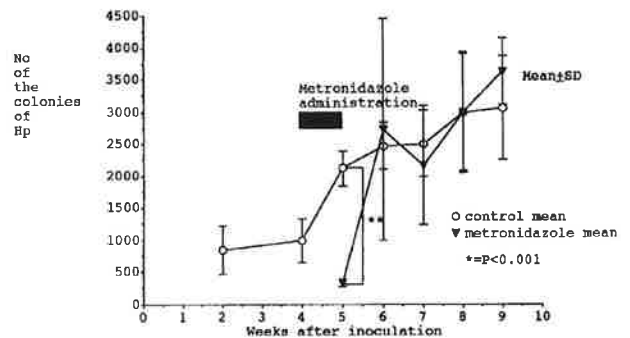


図13 Hp 感染ヌードマウスモデルを用いた、メトロニダゾール投与群とコントロール群の菌液投与後の経過週数と半胃粘膜のHp 菌量の比較





は消失し、小円形細胞の浸潤は抑制される傾向が認められた。

#### IV. 考 察

以上、今まで他の多くの施設で試みられたにもかかわらず、できないとされていた、ヌードマウスを用いたHp感染rodent modelの確立に成功した。で

は、何故、筆者が本モデルの確立に成功したのだろうか。その理由を他の報告と比較してみると、いくつかの理由が考えられた。即ち、本モデルの作成は、Hpの菌液を作成して、その菌液を直接マウスの胃内に投与するという単純なものであるが、この際、作成した菌液をただちに投与することと、投与する菌液は濃度の濃いものを投与することが、キーポイント

図14 Hp感染ヌードマウスモデルを用いた、メチレンブルー投与群とコントロール群の菌液投与後の経過週数と半胃粘膜のHp菌量の比較

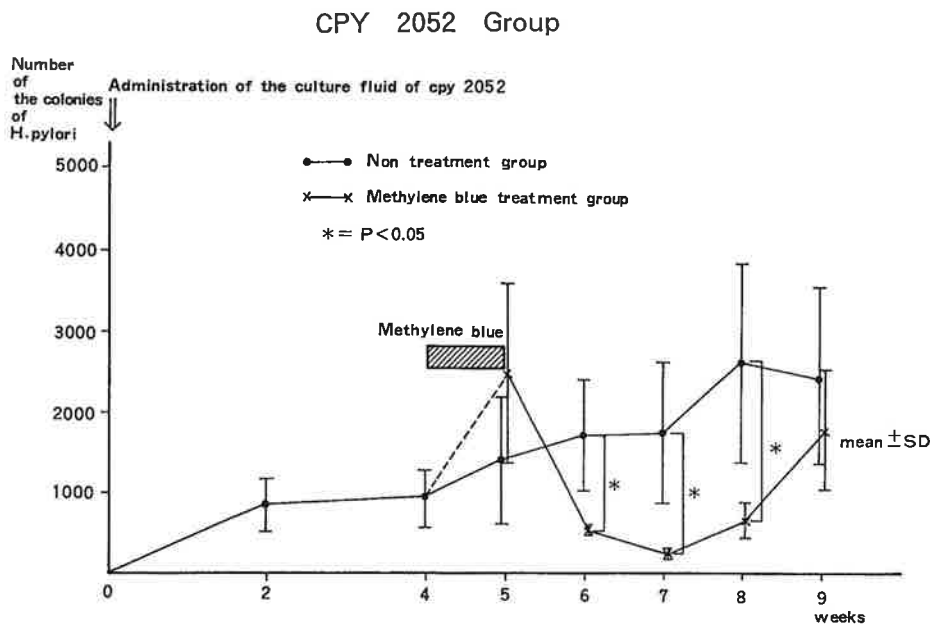
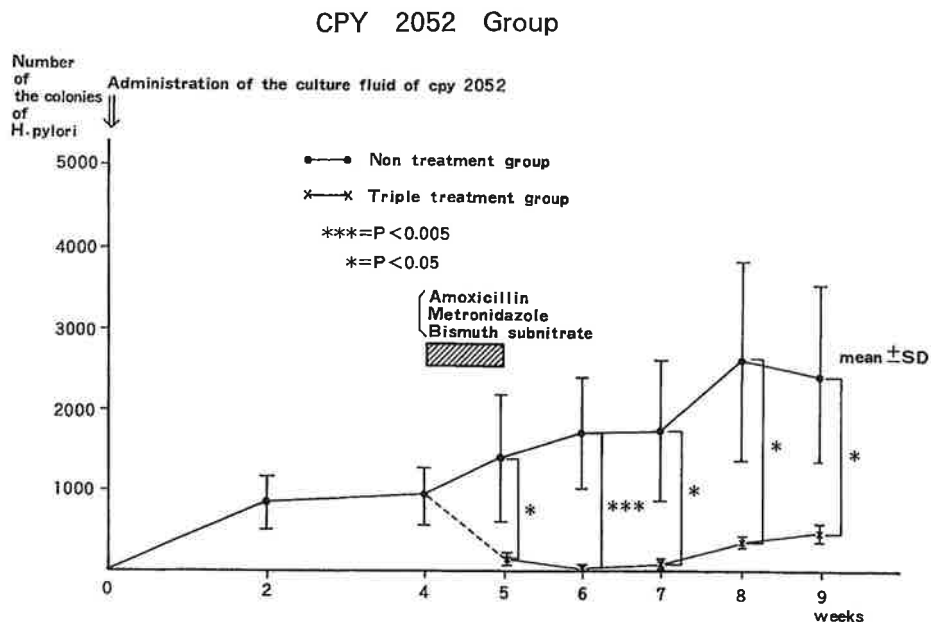


図15 Hp感染ヌードマウスモデルを用いた、3剤併用投与群とコントロール群の菌液投与後の経過週数と半胃粘膜のHp菌量の比較



トと思われる。また、Hpの培養の前段階の材料の採取では、切除した胃粘膜を生食などで洗浄しないようにすることが大切である。というのは、本モデルでのHpの存在部位は、その大部分が胃の粘液中に存在するため、胃の洗浄を行うことは胃粘液中に存在するHpを洗い流してしまうおそれがある。以上、本モデル作成において、このような留意点が上げられる。このようにしてできた本モデルは、今までの特殊なモデルと違い、安価で扱いやすいモデルであることから、今後、Hpの病原性を追究していく上で非常に重要なモデルとなりうると考えている。

今回、ヌードマウスおよびマウスの両方にHpの菌液を経口投与し、ヌードマウスでは投与後連続的にHpは胃粘液中に生着し、マウスでは投与後一時的に(投与後1、2週目) Hpは胃粘液中に生着したが、その

後、胃粘液中には認められなかった。このことは、ヒトでHpが胃粘膜上に存在するとIgG、IgAなどの免疫グロブリンが上昇し、Hpの胃粘膜への生着には生体の免疫機構が関与していることが指摘されているが、この機構を裏付けているのかもしれない。即ち、マウスに投与したHpは一旦はマウスの胃粘膜上に生着するも、免疫機構が働いてHpが胃粘膜から排除されたと考える推論である。また、このことも、以前報告したが、Hpの胃粘膜への生着には生体の免疫機構が関与しているのではなく、マウスの胃粘液中にはLactobacillusなどの菌があらかじめ存在することから、このような先住菌がHpのマウスの胃液中への生着を妨げているのかもしれない。さらに、この現象の理由として、マウスにおいては、ただ単に、Hp菌液投与後、投与したHpが2週間生き延びたけれど

図16 CPY2052投与後5週間目のメチレンブルー投与群とコントロール群における、ヌードマウスの胃粘膜上皮の比較  
(左：コントロール群；びらんが認められる。右：メチレンブルー投与群；びらんが消失し、再生上皮が認められる。)

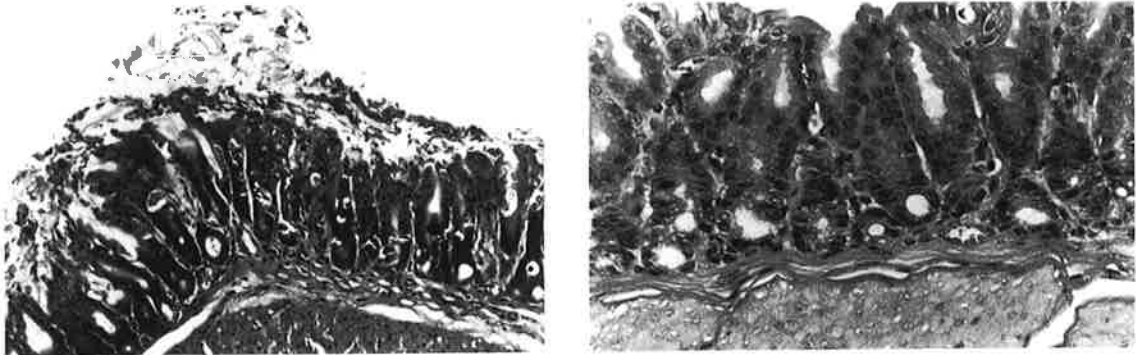
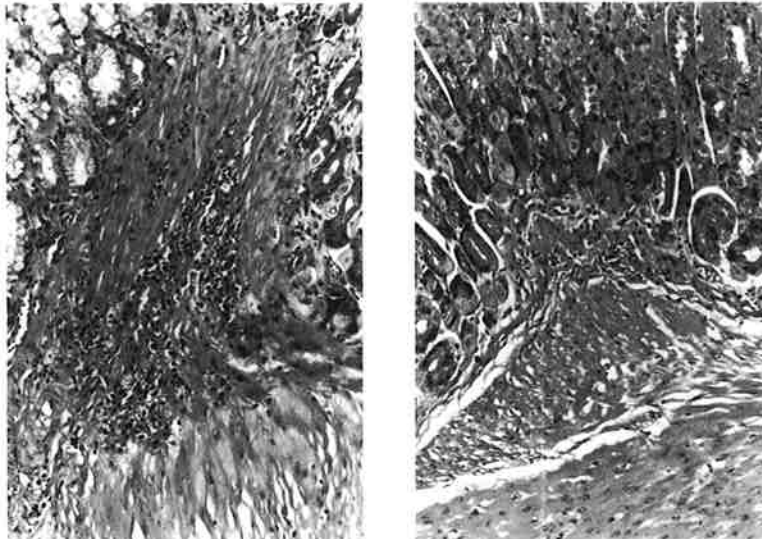


図17 CPY2052投与後9週間目のメチレンブルー投与群とコントロール群における、ヌードマウスの胃粘膜下層の比較  
(左：コントロール群；著明な小円形細胞浸潤が認められる。右：メチレンブルー投与群；小円形細胞浸潤はほとんど認められない。)





も3週間目には消失したのであって、Hpはマウスの胃粘液中には生着しなかったと考えることもできる。そして、これら事象の解明には、今後 germ free mouse や SPF mouse での Hp の感染実験を行うことが必要と考えている。

最後に、本モデルを用いた抗Hp剤の抗Hp効果についての定量的評価についての検討であるが、現在、in vitroでHpに対して効果のある薬剤は多数あるが、いずれも臨床的には、その効果は十分とは言えない。そして、そのため、抗Hp剤の効果をより発揮させるために、その抗Hp剤を長期間にわたって投与するために、重篤な副作用が少なからず生じているのが現状である。また、その効果の判定法も、臨床的には内視鏡時の生検標本を用いたHpの培養によっているので false negative となることが多く、同方法による判定では、胃全体のHpの存在について正確に言及することは不可能である。また、胃粘膜におけるHpの存在を胃全体を対象として定量的に確認する方法としてC14-Urea breath testがあるにはあるが、同方法は放射性同位元素を用いることや、Hpの存在を間接的に証明する方法であるという点で問題点も多い。このようなことから、本モデルを用いた抗Hp剤の効果に関する検討は、現在、直接に抗Hp剤の効果を定量的に検討できる唯一の方法である。そして、今回の実験でのアモキシシリン、メトロニダゾール、ビスマス製剤、メチレンブルーなどの抗Hp剤の本モデルを用いた定量的検討は、人におけるこれらの薬剤の抗Hp効果をよく反映していた。その中でも、現在、世界的にHpの除菌に最も効果があるとされている3剤併用療法は、本モデルでの定量的評価法でも、効果があることが理論的に証明できた。このことから、今後、本モデルは、さらに効果的な抗Hp療法を検討する上で非常に役に立つモデルになりうると思われる。

## V. 結 論

筆者が作成したHp感染ヌードマウスモデルは、Hpの病原性を追究する上でも、現在よりもさらに新しい効果的な抗Hp療法を開発する上でも、非常に重要なモデルとなりうると考えている。

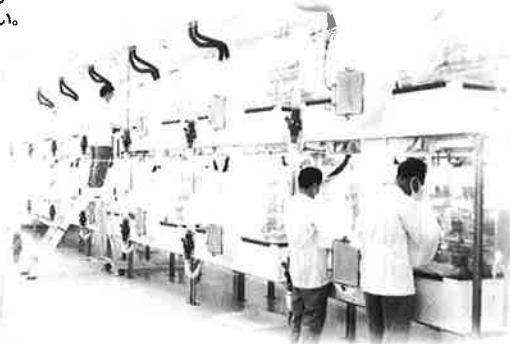
## 参考文献

1. Warren JR, Marshall B. : Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet 1983 : 1 : 1273 - 75
2. Fox JG, Edrisc BM, Cabot EB, et al. : Campylobacter-like organisms isolated from gastric mucosa of ferrets. Am J Vet Res 1986 : 47 : 236 - 9
3. Curry A. : Spiral organisms in the baboon stomach. Lancet 1988 : 2 : 634
4. Krakowka S, Morgan DR, Kraft WG, et al. : Establishment of gastric Campylobacter pylori infection in the neonatal gnotobiotic piglet. Infect Immun 1987 : 55 : 2789 - 96
5. Baskerville A, Newell DG. : Naturally occurring chronic gastritis and C. pylori infection in the Rhesus monkey : A potential test system for gastritis in man. Gut 1988 : 29 : 465 - 72
6. Karita M. et al. : New small animal model for human Helicobacter pylori infection : Success in both nude and euthymic mice. Am J Gastroenterol 1991 : 86 : 1596 - 1603
7. Andersen, LP. : Cytoprotective agents and C. pylori associated acid peptic diseases. Scand. J. Gastroenterol. 1988 : 23 (suppl. 142) : 110 - 113

# 日本チャールス・リバー(株)の 実験動物関連受託サービス

受託サービスに絶対の信頼を誇るアイソレータ・システムが  
大切な実験動物を感染から守ります。

微生物学的に明確ではない動物も  
お預かりできます。ご相談ください。



日本チャールス・リバー(株)は、  
The Jackson Laboratory of  
Mice (Jax Mice)の国内唯一  
の輸入代理店です。Jax Mice  
の輸入およびクリーンアップ、  
繁殖供給を承ります。

## 提供サービス例

### 使用予定マウス、ラットの受託飼育

チャールス・リバー・グループが経験と実績を誇る「アイソレータ・システム」で、微生物的にも遺伝的にもコンタミネーションを防止します。

### 海外作出マウス、ラットの輸入と受託飼育

チャールス・リバー・グループのWorld-wide Networkを活用して輸入し、「アイソレータ・システム」で飼育。大切な動物を安全確実にお届けできます。

### 使用予定マウス、ラットのクリーン化と受託飼育

クリーン化は、チャールス・リバー・グループが誇る帝王切開法のほか、体外授精法も可能です。「アイソレータ・システム」で飼育します。

### 使用予定マウスおよび各種マウスの凍結受精卵の作成と供給

トランスジェニック・マウスの作成などにご利用ください。

### 手術動物/投薬動物の作成と供給

チャールス・リバーの生産動物が対象ですが、他の動物のご使用をご希望の場合も、ご相談ください。手術の内容については、別途お問い合わせください。

### スピードコンジェニックマウスの作成

当社独自のスピードコンジェニックマウス作成サポート技術 MaxBax をご紹介いたします。

### 血清、血漿の供給

当社の飼育動物を使用し、ご注文ごとに新鮮な血清、血漿をお届けします。

お問い合わせは

第二営業部 TEL 045(474)9336 FAX 045(474)9341  
東京営業所 TEL 045(474)9340 FAX 045(474)9341  
大阪営業所 TEL 06(6543)3901 FAX 06(6543)3908  
筑波営業所 TEL 029(854)9925 FAX 029(854)9935

  
日本チャールス・リバー株式会社

本社 〒222-0033 横浜市港北区新横浜2-3-8 (東仲24新横浜ビルB-4F)

<http://www.crj.co.jp>

Charles River and The Jackson Laboratory Cooperate in International Supply of Mouse Research Models Since 2001

# JAX® | MICE

Setting the Gold Standard for Genetic Purity™

## C57BL/6J

国内生産のお知らせ

2003年4月より販売スタート



The  
Jackson  
Laboratory

600 Main Street, Bar Harbor, Maine 04609 USA  
<http://www.jax.org>

Photograph: © Copyright 2002 The Jackson Laboratory. All rights reserved.  
JAX® is a registered trademark of The Jackson Laboratory.

日本チャールス・リバー株式会社

〒222-0033 横浜市港北区新横浜2-3-8 東伸24新横浜ビルB-4F  
TEL 045(474)9340 FAX 045(474)9341

<http://www.crj.co.jp>

お問い合わせは

第一営業部 TEL 045(474)9340 FAX 045(474)9341  
東京営業所 TEL 045(474)9340 FAX 045(474)9341  
大阪営業所 TEL 06(6543)3901 FAX 06(6543)3908  
筑波営業所 TEL 0298(54)9925 FAX 0298(54)9935

CRJ LETTERS Vol.16 No.1 この小冊子に関するご意見、ご要望を下記までお寄せください。

発行日：平成15年5月

発行所：日本チャールス・リバー株式会社

〒222-0033 横浜市港北区新横浜2-3-8 東伸24新横浜ビルB-4階  
電話045(474)9340

企画・編集：日本チャールス・リバー株式会社 制作：株式会社 オービックO.A



# 日本チャールス・リバー株式会社

・弊社の英文社名は Charles River Japan, Inc. です

お問合せ、ご注文は下記にて承ります。

国内飼育動物	受注センター	☎045(474)9350	FAX 045(474)9351
輸入動物	開発営業部	☎045(474)9340	FAX 045(474)9341
受託サービス他	第二営業部	☎045(474)9336	FAX 045(474)9341

<http://www.crj.co.jp>