

〈総説〉

実験動物とヘリコバクター

帝京大学医療技術学部臨床検査学科 教授

後藤一雄

はじめに

オーストラリアの病理医Warren JR と内科医Marshall BJは胃炎や消化性潰瘍の患者の胃内にらせん菌がいることを1984年、*Lancet*誌に論文として発表し、本菌を*Campylobacter pyloridis*と提唱した¹⁾。のちに属名が新設され現在では*Helicobacter pylori*（以下ピロリ菌）と呼ばれている。両博士はこの業績で2005年にノーベル医学生理学賞を受賞している。ピロリ菌は当然この発見以前からヒトの胃に定着していたと考えられるが、それまで発見されていなかったのは、その培養方法が単に好気培養ではなく、微好気環境（5-7 % O₂, 5-10 % CO₂）が必要だったこと、培養時間に1週間程度要したことにある。そしてなにより、ヒトの胃内の低pH環境下では菌が定着しないであろうとの先入観が、それまで発見されてこなかった最大の要因であろう。さらには、胃炎の病理組織をHE染色してもピロリ菌は染色されず、鍍銀染色によってはじめて染色されることも菌の発見を遅らせた原因にひとつである。

実験動物のヘリコバクター研究

ピロリ菌の発見以降、実験動物学分・獣医学分野の研究者は、1) ピロリ菌が感染する実験動物の探索、2) 動物固有のヘリコバクターの探索に注力した。前者はヒトのピロリ菌感染モデルを作出し、感染機序の解明や治療薬の開発を目的としている。ピロリ菌が感染する動物は、アカゲザル²⁾、ニホンザル³⁾、無菌マウス⁴⁾、のほか、スナネズミ (*Meriones unguiculatus*)⁵⁾などが知られている。このうち

サル類や無菌マウスはその扱いが難しいことから一般化せず、もっぱらスナネズミが使われてきた。スナネズミ感染系を用いて、ピロリ菌が胃がんを誘発することを示した報告もある⁶⁾。また1997年にオーストラリアのLeeらによってヒト由来のピロリ菌をマウスに適応させて感染できるようになった株（Sydney strain）が開発され、ピロリ菌の感染機序の解明に用いられるようになった⁷⁾。

スナネズミのヘリコバクター

スナネズミはげっ歯目に属し、モンゴルから中国北東部の砂地に生息している。我々はスナネズミの胃にピロリ菌を実験的に定着させることができるために、自然感染している可能性、およびピロリ菌に感染したスナネズミがヒトへの感染源となっている可能性を考え、スナネズミのヘリコバクター汚染調査を実施することにした。我々は文科省国際学術研究の研究費を受けて、中国新疆ウイグル自治区の砂漠地帯でスナネズミを捕獲しピロリ菌を



図1 砂漠を貫く道路



図2 道路を行くと居住区に到着する



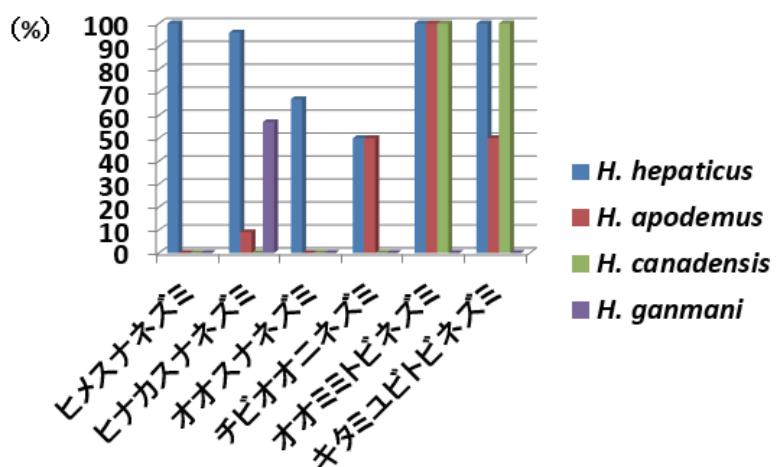
図4 巣穴にトラップをしかける



図3 居住区周辺の様子



図5 捕獲したスナネズミ

図6 中国で捕獲されたげっ歯類における*Helicobacter*属菌感染状況

含めたヘリコバクター属菌の保有調査を行った。行程はカシュガルからホータン市までタクラマカン砂漠の縁を車で移動する道のりである。図1-図5は砂漠の様子とスナネズミのトラップを仕掛ける様子を示している。

捕獲したスナネズミから糞便を採取し、

DNA抽出後、ヘリコバクター属菌特異的プライマーでDNA増幅後、増幅産物の塩基配列を決定し、配列をデータベースで相同性検索をすることで菌の同定を行った⁸⁾。その結果を図6に示す。

その結果すべてのスナネズミからヘリコバ

クター属菌が検出されたが、ピロリ菌の感染は確認できず、自然感染していないことが確かめられた。

マウスのヘリコバクター

1994年。マウス肝炎の原因菌として*Helicobacter hepaticus*が報告された⁹⁾。本菌はピロリ菌と異なり、腸管・肝臓に存在する病原菌である。それまで我々は担癌ヌードマウスでたびたび肝臓の壊死斑を経験していたが、原因がつかめないでいた。ヌードマウスは胸腺を欠き、胸腺で分化するT細胞がないため、異種細胞を皮膚に移植しても拒絶されずに生着する。この性質を利用して、ヌードマウスにヒトのがん細胞を移植し、担癌ヌードマウスを使ってがん治療薬のスクリーニング検査が行われている。我々が経験した担癌ヌードマウスの肝臓壊死斑部位を好気培養しても菌が検出され

ず、また病変部位の病理標本をHE染色しても、菌が確認されなかった。(ここでも病理切片の染色はHE染色のみで、銀染色を施さなかったことが、*Helicobacter hepaticus*を見逃していた原因である)。担癌ヌードマウスでみられた肝臓の壊死斑を図7に示す。我々は*H. hepaticus*の報告をうけて、壊死斑の見られた肝臓の病理標本を銀染色したところ本菌が肝臓の毛細胆管に存在していることを明らかにし、我が国においてもマウスに本菌が存在することを証明した。壊死斑を示すマウス肝臓の病理標本の銀染色の結果を図8に示す。

さらに我々は本菌がマウスで継代されたヒト腫瘍株を介して感染し、本菌に汚染されたがん細胞を一度凍結融解することで菌が死滅することを確認した¹⁰⁾。ヒト腫瘍株の*H. hepaticus*汚染結果を図9に、がん細胞凍結による本菌の死滅状況を図10に示す。

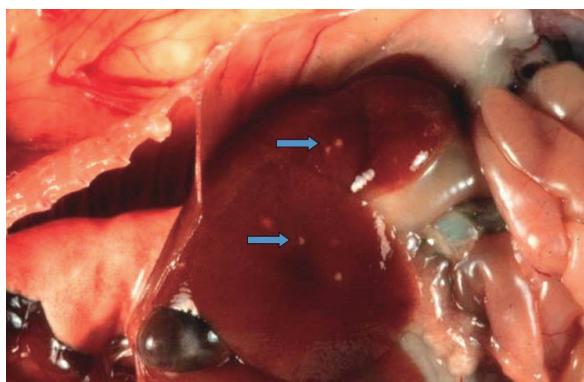


図7 担癌ヌードマウスで観察された壊死斑

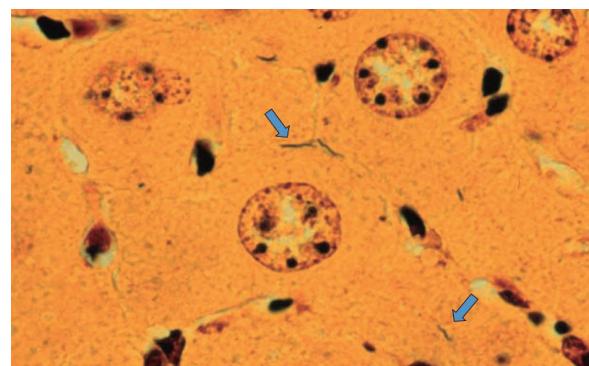


図8 *H. hepaticus*感染肝臓病理切片の銀染色結果

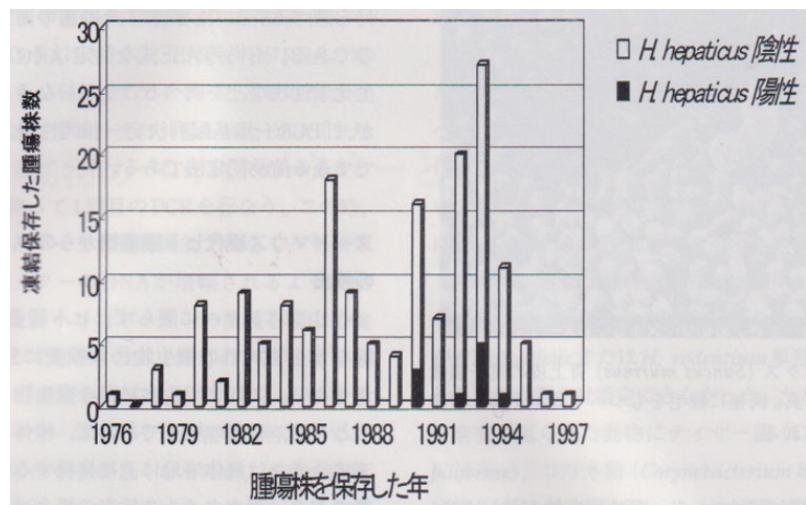


図8 ヒト腫瘍株を保存した年代ごとの*H. hepaticus*汚染がん細胞株数

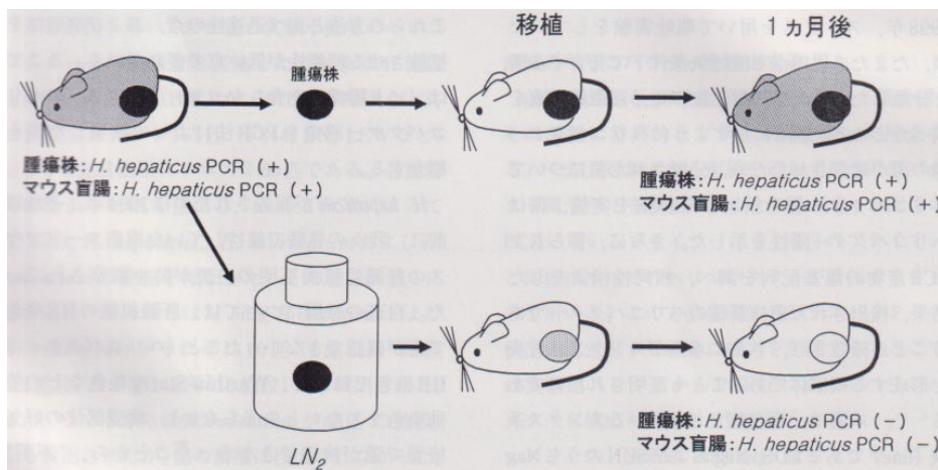


図9 *H. hepaticus* 感染担癌ヌードマウスから汚染がん細胞株を採取し、汚染がん細胞株を直接、マウスに移植した場合、がん細胞株を移植されたマウスの盲腸およびがん細胞株ではPCR法で菌陽性となるが、液体窒素 (LN_2) で一度保存したがん細胞株用いることで移植されたマウスは感染を免れる。

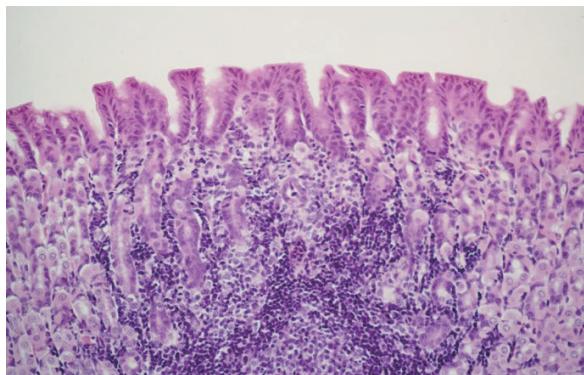


図10 スンクス（コントロール群）でみられた胃炎。

ジャコウネズミのヘリコバクター

我々はピロリ菌が実験的に感染する実験動物を探査している過程で、ジャコウネズミの胃から新種のヘリコバクターを分離したので紹介する。まずジャコウネズミ（学名：*Suncus murinus*）はトガリネズミ科に属し、胃の組織学的な構造は、重層扁平上皮からなる前胃と腺胃からなる後胃で構成されるマウス・ラットと異なり、ヒトと同様にすべて腺胃からできている。ジャコウネズミにピロリ菌を感染させたところ、菌を感染させていないコントロール群で胃炎が見つかり、さらに胃炎部位の培養（微好気培養、1週間）で、菌が検出された。胃炎の組織像を図11に示す。また、胃

の電顕像を図12に示す。

検出された菌について16SリボゾームRNAの塩基配列、生化学的性状等から本菌が新種の菌であることが推察され、我々は本菌を *Helicobacter suncus* と命名した¹¹⁾、さらに本菌はジャコウネズミSUN系統にのみ感染しており、他の地域由来のジャコウネズミには感染していないことが確かめられた¹²⁾。Gueneauらによって示されたウレアーゼ塩基配列を基にした他ヘリコバクター属菌との系統樹解析結果を図13に示す¹³⁾。本菌とピロリ菌とは別の群に属していた。

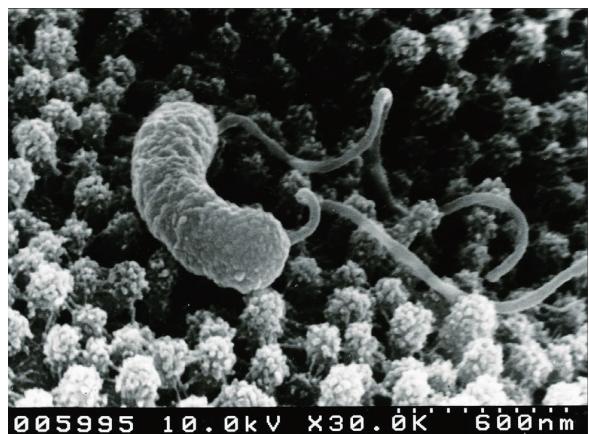


図11 スンクス（コントロール群）の胃表面の電顕像。両極に鞭毛をもったヘリコバクター属菌が確認できる。

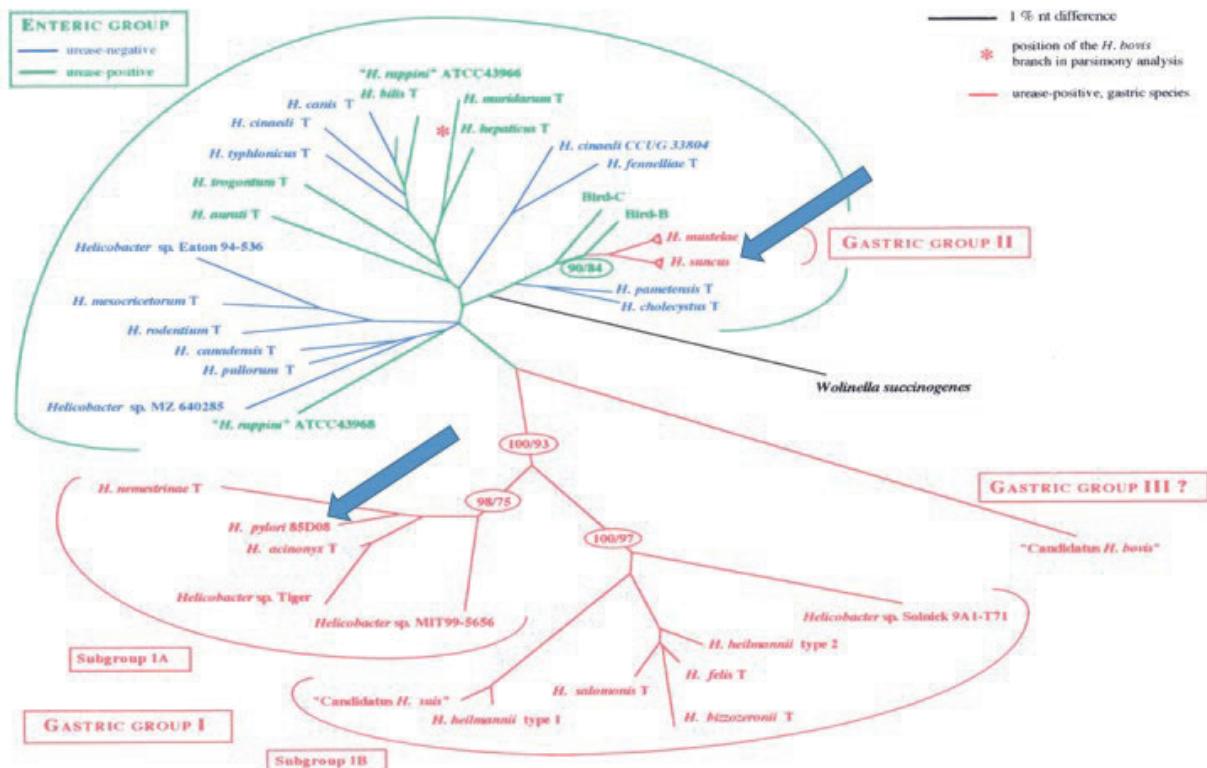


図13 ウレアーゼ塩基配列を基にした他ヘリコバクター属菌との系統樹解析。矢印はピロリ菌と*H.suncus*の位置を示す (Gueneau, et al. 2002)。

当初の目的であったジャコウネズミへのピロリ菌の実験的な感染は残念ながらかなわなかった。

特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) とピロリ菌

ピロリ菌に感染した特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) 患者の約6割において、ヘリコバクター・ピロリ菌の除菌により血小板数が増加

することがあきらかとなり、ピロリ菌陽性のITP患者には、まず除菌を行うことが勧められている¹⁴⁾。この現象の原因はまだ解明されておらず、我々は原因解明の一環としてまず、ピロリ菌 (Sydney strain) を実験感染させることでマウスの血小板数に変化があるか、いくつかのマウス系統を用いて実験を行った。実験に用いたマウス系統はBALB/c、C57BL/6およびDBA/2系統である。結果を表1に示す。用い

表1 ピロリ菌 (Sydney strain) に感染したマウス系統の抗体価、赤血球数および血小板数の比較

マウス系統	HP接種	使用数	HP-PCR(糞便)陽性数	HP-ELISA OD(抗体検査)	赤血球数 ($\times 10^4$ cells/ μ l)	血小板数 ($\times 10^4$ cells/ μ l)
BALB/c	あり	9	8/9	0.57±0.28	1068±143	102.2±14.7
	なし	10	ND*	0.12±0.02	1092±95	121.8±13.3
C57BL/6	あり	10	10/10	0.60±0.47	957±7	99.6±17.0
	なし	10	ND	0.12±0.02	989±97	104.4±18.2
DBA/2	あり	7	6/7	0.83±1.01	1110±108	111.6±16.2
		10	ND	0.13±0.04	1003±43	107.8±14.3

*ND: 実施せず
赤字:p<0.05

た系統のうちBALB/cにおいては感染によって血小板数が減少したが、他の系統では減少せず、ピロリ菌感染に対する応答で系統差が認められた¹⁵⁾。この結果をもとに今後ITPとピロリ菌との関係を検証していきたい。

最後に

ピロリ菌が発見されて40年以上が経過し、現在までに実験動物や野生動物にも病原体としてのヘリコバクター属菌が多数報告されてきた。現在ではヒトではピロリ菌の除菌法が確立され、また実験用SPFマウス・ラットでは *H. hepaticus*, *H. bilis*などマウスに病気を起こすヘリコバクター菌種の検査は一般化している。過去の病原体になりつつあったヘリコバクターだが、ここにきて特発性血小板減少性紫斑病との関連で再脚光をあびる菌となりつつある。Warren JR と Marshall BJによってピロリ菌が発見された経緯は、興味深いものであり、“研究の目の付け所”の大切さは見習いたいところである。

本内容は第9回日本ワンヘルスサイエンス学会学術集会で講演したものまとめたものである。

参考文献

- 1) Marshall BJ, Warren JR: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 323, 1311-1315.
- 2) 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 *Helicobactet pylori* disease. *J Clin Microbiol* 1990; 28 (10), 2285-2290.
- 3) Shuto R, Fujioka T, Kubota T, Nasu M: Experimental gastritis induced by *Helicobacter pylori* in Japanese monkeys. *Infect Immun* 1993; 61(3), 933-939.
- 4) Karita M, Cantero Q, Okita K: Establishment of a small animal model for human *Helicobacter pylori* infection using germ-free mouse. *Am J Gastroenterol* 1994; 89(2), 208-21.
- 5) Yachi A, Oguma K, Yokota K, Kurobayashi 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* 1991;35(6), 475-480.
- 6) Watanabe T, Tada M, Nagai H, Sasaki S, Nakao M: *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in Mongolian gerbils. *Gastroenterology* 1998; 115, 642-648.
- 7) Sander O, Van Zanten J, Kolesnikow T, Leung V, O'Rourke J, Lee A: Gastric transitional zones, areas where *Helicobacter* treatment fails: Results of a treatment trial using the Sydney strain mouse model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(7), 2249-2255.
- 8) Goto K, Jian W, Zheng Q, Oku Y, Kamiya H, Itoh T, Ito M: Epidemiology of *Helicobacter* infection in wild rodents in the Xinjian-Uygur autonomous region of China. *Curr Microbiol* 2004; 49(3), 221-223.
- 9) Fox J, Dewhirst F, Tully J, Paster B, Yan L, Taylor N, Collins J M, Gorelick P, Ward J: *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinalmucosal scrapings from mice. *J Clin Microbiol* 1994; 32(5) 1238-1245.
- 10) Goto K, Ishihara K, Kzuoka A, Ohnishi Y, Itoh T: Contamination of transplantable human tumor-bearing lines by *Helicobacter hepaticus* and its elimination. *J Clin Microbiol* 2001; 39(10), 3703-3704.
- 11) Goto K, Ebukuro S, Ohashi H, Itoh T: Pathogenicity of *Helicobacter* species isolated from the stomach of the house musk shrew (*Suncus murinus*). *Comp Med* 2000; 50(1), 73-77.
- 12) Goto K, Ohashi H, Takakura A, Itoh T: Current status of *Helicobacter* contamination of laboratory mice, rats, gerbils, and house musk shrews in Japan. *Curr Microbiol* 2000; 41(3), 161-166.
- 13) Gueneau P, Loiseaux-De Goer S: Helicobacter: molecular phylogeny and the origin of gastric colonization in the genus. *Infec Genet Evol* 2002; 1, 215-223.
- 14) Stasi R, Sarpatwari A, Segal J, Osborn J, Evangelista M, Cooper N, Provan D, Newland A, Amadori S, Busssel J: Effect of eradication of *Helicobacter pylori* infection in patients with immune thrombocytopenic purpura: a systematic review. *Blood* 2009; 113(6), 1231-1240.
- 15) Fukuda T, Asou E, Nogi K, Yasuda M, Goto K: Association between *Helicobacter pylori* infection and platelet count in mice. *Exp Anim* 2018;67(4), 487-492.

***Helicobacter* species infecting laboratory animals**

Professor, Faculty of Medical Technology, Teikyo University

Kazuo Goto

Summary *Helicobactrt pylori* was discovered in the human stomach in 1983 by two Australian researchers Robin Warren, a pathologist, and Barry J. Marshall, a microbiologist. Since then, research in experimental animals has focused on identifying animal-specific Helicobacter strains and determining which animals are susceptible to infection, with the aim of establishing reliable animal models for *H. pylori* infection. Following the establishment of Helicobacter culture methods, animal-specific Helicobacter spp. have been extensively investigated. Consequently, species have been isolated from mice, rats, dogs, cats, and wild animals including tigers and dolphins. Although these Helicobacter species had existed previously, their presence went unrecognized in the absence of established culture methods. In our search for animals naturally infected with *H. pylori*, we identified a novel species, *H. suncus*, in the stomach of *Suncus murinus* that causes gastritis. We established that this bacterium, similar to *H. pylori*, resides in the stomach of *S. murinus*, causes gastritis, and can be eradicated by antibiotic treatment. We also demonstrated that infection prevalence varied depending on the geographical origin of the animal.

Furthermore, we had long observed unexplained hepatic necrotic foci in nude mice bearing subcutaneously transplanted human cancer cells. In 1994, Fox et al. identified a Helicobacter species, *H. hepaticus*, that caused lesions in the mouse liver. Subsequent testing confirmed that *H. hepaticus* was responsible for hepatic necrotic lesions. The bacteria were not detectable in hematoxylin-eosin-stained pathological specimens, as they do not stain with this method; silver staining would have enabled their earlier identification. Further research demonstrated that the infection spreads through the passage of cancer cells in mice. In contrast, *H. pylori* does not infect conventional mice.

In addition to primates, germ-free mice and gerbils are the only animals in which *H. pylori* colonizes the stomach and establishes infection. Currently, gerbils are used exclusively in infection experiments, as germ-free mice are difficult to handle. Because gerbils can be infected with *H. pylori*, we hypothesized that wild gerbils might harbor this bacterium. An epidemiological survey was conducted to determine whether wild gerbils were infected with *H. pylori*. However, no *H. pylori* infection was detected. Instead, a Helicobacter species specific to gerbils was identified, demonstrating that *H. pylori* is unique to humans.

Recent studies have shown that, among patients with immune thrombocytopenia who are *H. pylori*-positive, eradication therapy with antibiotics increases platelet count in over half of the cases. Consequently, eradication therapy is now routinely administered to *H. pylori*-positive patients, although the specific mechanisms remain unclear. We confirmed that infecting mouse stomach with *H. pylori* (SS1 strain) reduces platelet counts, depending on the mouse strain. We expect this infection model will help elucidate the mechanisms underlying this phenomenon.

Helicobacter is an ancient pathogen whose association with a new phenomenon positions it as a

subject of enduring research interest.

Key words: gerbil, Helicobacter, *H. hepaticus*, immune, mouse, thrombocytopenia,
Suncus murinus