

学位論文題名

High salt diets dose-dependently promote gastric chemical carcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils associated with a shift in mucin production from glandular to surface mucous cells

(食塩の *Helicobacter pylori* 感染スナネズミにおける胃発癌促進作用の用量依存性、および *Helicobacter pylori* 感染、胃炎、胃粘液への影響の検討)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】食塩は疫学的に胃癌のリスクファクターであり、動物実験で食塩は胃発癌の promoter であると証明されている。しかしその作用機序や、胃発癌の重要な因子である *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) との関連は未だ明らかではない。胃粘液は surface mucous cell mucin (SMCM) および gland mucous cell mucin (GMCM) の 2 種類のムチンから成っている。近年 *H. pylori* 感染への胃粘液の関与を示す知見が得られており、食塩の作用機序として胃粘液へ影響を及ぼすことが考えられる。今回、スナネズミ胃発癌モデルを用いて種々の投与量・方式で食塩を摂取させ、胃発癌、*H. pylori* 感染、胃炎および胃粘液への影響を検討した。

【材料と方法】6週齢雄スナネズミを N-methyl-N-nitrosourea (MNU) 投与群、非投与群に分け、投与群は MNU 30ppm を隔週で 10 週まで飲水中投与し、非投与群はその間滅菌水を投与した。11 週目に両群の一部を *H. pylori* (ATCC 43504) に感染させ、MNU 投与 (以下 MNU(+)) / *H. pylori* 感染 (以下 *H. pylori*(+)) 群、MNU(+)/*H. pylori* 非感染 (以下 *H. pylori*(-)) 群、MNU 非投与 (以下 MNU(-)) / *H. pylori*(+) 群、MNU(-)/*H. pylori*(-) 群に分けた。この 4 群を 12 週目よりそれぞれ通常食 (Na 濃度 0.32%)、2.5% 食塩食、5% 食塩食、10% 食塩食、通常食 + 飽和食塩水 (濃度 29%) 4ml/kg 週 1 回胃内投与の 5 条件に分け、計 50 週間飼育した。

50 週飼育後に屠殺し、腺胃組織標本を作成して胃発癌率および胃炎の評価を行った。胃炎は好中球浸潤、単核細胞浸潤、腸上皮化生、異所性腺管増殖についてそれぞれ 0 (none), 1 (mild), 2 (moderate), 3 (severe) の 4 段階でスコア化した。屠殺時に採血し、血清 *H. pylori* 抗体価、ガストリンを測定した。また MNU(-)/*H. pylori*(+)/通常食群および MNU(-)/*H. pylori*(+)/10% 食塩食群で、homogenize した腺胃の一部を *H. pylori* 選択培地で 37°C、微好気性条件下にて 5 日間培養し、発育した *H. pylori* コロニー数を計数した。さらに MNU(-)/*H. pylori*(+)/通常食群、MNU(-)/*H. pylori*(+)/10% 食塩食群、MNU(-)/*H. pylori*(-)/通常食群および MNU(-)/*H. pylori*(-)/10% 食塩食群で、homogenize した腺胃組織の一部よ

り RNA の抽出とエタノール沈殿法による胃粘液の分離抽出を行った。RNA からそれぞれ SMCM, GMCM のコア蛋白である MUC5AC, MUC6 の realtime RT-PCR を施行し、MUC5AC, MUC6 の mRNA を測定した。胃粘液は PVDF メンブレン上にブロットし、メンブレンを SMCM を染色する Galactose-oxidase cold thionine Schiff (GOTS) 染色, GMCM を染色する抗ムチン免疫染色で染色し、NIH Image で比色定量を行った。

【結果】MNU(+)/*H. pylori*(+)群の胃発癌率は、通常食群 15%, 2.5%食塩食群 33%, 5%食塩食群 36%, 10%食塩食群 63%で、食塩摂取量と有意に相関した($p < 0.01$)。通常食+飽和食塩水間欠投与群は 24%で、通常食群と有意差はなかった。MNU(+)/*H. pylori*(-)群では、5%食塩食群で 4%、その他の群では 0%で、食塩摂取量と発癌率に相関はなかった。MNU(-)群では胃癌は発生しなかった。

胃炎の評価では、MNU(-)/*H. pylori*(+)/食塩食群で MNU(-)/*H. pylori*(+)/通常食群より有意に好中球浸潤が強かった($p < 0.05$)。また異所性腺管増殖が MNU(+)/*H. pylori*(+)/食塩食群で MNU(+)/*H. pylori*(+)/通常食群より($p < 0.01$)、MNU(-)/*H. pylori*(+)/食塩食群でも MNU(-)/*H. pylori*(+)/通常食群より($p < 0.05$)、いずれも有意に高度であった。抗 *H. pylori* 抗体価は MNU(-)/*H. pylori*(+)群で食塩摂取量と有意に相関した($p < 0.0001$)。血清ガストリンは MNU(-)/*H. pylori*(+)/食塩食の各群で MNU(-)/*H. pylori*(+)/通常食群より有意に高値であった($p < 0.005$)。*H. pylori* 培養では、MNU(-)/*H. pylori*(+)/通常食群よりも MNU(-)/*H. pylori*(+)/10%食塩食群で有意にコロニー発育数が多かった($p < 0.05$)。

胃粘液では、高食塩食による MUC5AC, MUC6 の mRNA 発現量の有意な変化はなかったが、比色定量では高食塩食により *H. pylori*(-)群で有意な SMCM の増加($p < 0.005$)と GMCM の減少($p < 0.05$)、*H. pylori*(+)群で SMCM の増加傾向と GMCM の有意な減少($p < 0.05$)を認めた。

【考察】本実験で食塩は *H. pylori* 感染スナネズミでの胃発癌を用量依存性に促進した。*H. pylori* 非感染下ではこの作用はみられず、則ち食塩は胃発癌において *H. pylori* の co-promoter と考えられる。よって食塩摂取量抑制が *H. pylori* 感染スナネズミでの胃発癌抑制に有効であり、ヒトでも減塩により *H. pylori* 感染者の胃発癌が減少する可能性が示唆された。一方で飽和食塩水少量間欠投与で胃発癌率は上昇せず、曝露される食塩の濃度より食塩の総摂取量が重要と考えられた。

胃炎の評価では *H. pylori*(+)群で食塩は好中球浸潤、異所性腺管増殖を促進し、血清抗 *H. pylori* 抗体価は MNU(-)/*H. pylori*(+)群において食塩摂取量と相関して上昇した。また培養では高食塩食は *H. pylori* を有意に増殖させた。したがって食塩は *H. pylori* 感染、胃炎を増悪させると考えられる。

食塩の胃発癌促進機序は不明であるが、胃粘膜細胞を直接傷害し胃粘膜再生・増殖を亢進させる、或いは界面活性作用による表層胃粘液バリアーの粘性低下、破壊によって carcinogen の胃粘膜への到達を促進する等の仮説がある。またブタ胃ムチンの経口投与が食塩のラット胃発癌促進作用を阻害するとの報告もあり、胃粘液・ムチンは食塩の胃発癌促進と関係すると考えられる。ヒトや齧歯類の胃では SMCM と GMCM が重層構造をとって表層胃粘液バリアーを形成する。*H. pylori* は胃内で SMGM 内と表層粘液細胞表面にのみ生存していること、GMCM が含む GlcNAc α 残基は *H. pylori* に対し抗菌作用を持つ事がわかっているが、本実験で食塩は *H. pylori* の生息可能域である SMGM を増加させ、同時に *H. pylori*

に抗菌的に働く GMCM を減少させた。則ち食塩は胃粘液環境を *H. pylori* 増殖に有利に変化させる。その結果 *H. pylori* 感染が増悪し、胃炎増悪、最終的に胃発癌に至ると考えられる。mRNA 発現からはこのムチン量変化はコア蛋白ではなく、糖鎖の変化と考えられる。

【結語】食塩は胃粘液環境を *H. pylori* 増殖に有利に変化させ、*H. pylori* 感染下で用量依存性に胃発癌を促進する。食塩が *H. pylori* 感染、胃炎の増悪を通じて胃発癌を促進する可能性と、減塩がヒト胃癌を減少させる可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 近 藤 哲
副 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 秋 田 弘 俊

学位論文題名

High salt diets dose-dependently promote gastric chemical carcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils associated with a shift in mucin production from glandular to surface mucous cells

(食塩の *Helicobacter pylori* 感染スナネズミにおける胃発癌促進作用の用量依存性、および *Helicobacter pylori* 感染、胃炎、胃粘液への影響の検討)

食塩は疫学的に胃癌のリスクファクターであり、動物実験で食塩は胃発癌の promoter であると証明されている。しかしその作用機序や、胃発癌の重要な因子である *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) との関連は未だ明らかではない。胃粘液は *H. pylori* の生息を可能とする surface mucous cell mucin (SMCM) および *H. pylori* に抗菌的に働く gland mucous cell mucin (GMCM) の 2 種類のムチンから成り、近年 *H. pylori* 感染への関与を示す知見が得られており、食塩の作用機序として胃粘液へ影響を及ぼすことが考えられた。申請者らは 6 週齢雄スナネズミに N-methyl-N-nitrosourea (MNU), *H. pylori* を投与するスナネズミ胃発癌モデルを用い、通常食 (Na 濃度 0.32%), 2.5% 食塩食, 5% 食塩食, 10% 食塩食, 通常食 + 飽和食塩水 (濃度 29%) 4ml/kg 週 1 回胃内投与の各条件に分けて飼育した。50 週飼育後に屠殺し、胃発癌率, 胃炎スコア, *H. pylori* 培養, 血清 *H. pylori* 抗体価, SMCM および GMCM のコア蛋白 mRNA 定量, SMCM および GMCM の比色定量を行った。その結果、MNU(+)/*H. pylori*(+) 群の胃発癌率は食塩摂取量増加と有意に相関して上昇した ($p < 0.01$)。MNU(+)/*H. pylori*(-) 群では胃癌は 1 例のみで食塩摂取量と発癌率に相関はなく、MNU(-) 群では胃癌は発生しなかった。胃炎の評価では食塩食は *H. pylori* 感染群で好中球浸潤および異所性腺管増殖を有意に亢進させた。抗 *H. pylori* 抗体価は MNU(-)/*H. pylori*(+) 群で食塩摂取量と有意に相関して上昇した ($p < 0.0001$)。 *H. pylori* 培養では、MNU(-)/*H. pylori*(+)/通常食群よりも MNU(-)/*H. pylori*(+)/10% 食塩食群で有意にコロニー発育数が多かった ($p < 0.05$)。ムチンコア蛋白の mRNA 発現量は食塩によって変化しなかったが、比色定量では 10% 食塩食によ

り *H. pylori*(-)群で有意な SMCM の増加($p<0.005$)と GMCMM の減少($p<0.05$)、*H. pylori*(+)群で SMCM の増加傾向と GMCMM の有意な減少($p<0.05$)を認めた。以上の結果より、食塩は *H. pylori* 感染下でのみ用量依存性に胃発癌を促進し、また胃粘液環境を *H. pylori* に有利に変化させ *H. pylori* 感染・胃炎を増悪させた。よって食塩が胃粘液環境変化・*H. pylori* 感染増悪・胃炎増悪を介して胃発癌を促進している可能性および減塩がヒト胃発癌抑制に有効である可能性が示唆された。

口頭発表に際し、副査の秋田教授より本研究で ATCC43504 を用いた理由および別の *H. pylori* 菌株での胃発癌、胃癌の分化度と食塩と *H. pylori* との関係、研究結果の臨床応用への展望、ヒトでの食塩と胃発癌に関する cohort study についての質問があった。これに対して申請者は、ATCC43504 は胃癌多発国である本邦で最も頻度の高い *cagA* および *vacA* 陽性株であること、動物実験では未検証ではあるが *cagA* 陰性株では本実験とは異なる結果となる可能性が過去の報告からは考えられること、食塩と胃癌の分化度の相関は現在まで報告されていないこと、本研究の結果からは *H. pylori* 除菌が胃癌予防には最も有効であり除菌不能例でも減塩により発癌率を低下させ得ると考えられること、過去の日本での cohort study では食塩と胃発癌との相関が示されていることを回答した。次いで主査の近藤教授より、実験動物にスナネズミを用いた理由、スナネズミでの *H. pylori* 除菌の胃発癌への影響、実験での食塩濃度と実際のヒトの食塩摂取量とのバランス、本研究での慢性胃炎・胃酸分泌の検討の有無、*H. pylori* 感染期間・飼育期間についての質問があった。これに対して申請者は、スナネズミ胃に *H. pylori* が安定して感染し萎縮性胃炎・腸上皮化生といったヒト胃粘膜と極めて類似した病変を生じることよりモデル動物として最適と考えられること、*H. pylori* 除菌によりスナネズミ胃発癌が抑制されること、イクラ醤油漬(食塩濃度 10%強)など高食塩濃度の食品が日常的に摂取されており本研究での食塩濃度設定が妥当であること、胃内の pH は測定していないが食塩により慢性胃炎増悪・血清ガストリン上昇がみとめられ低酸状態であったと考えられること、本実験での感染期間・飼育期間はスナネズミの平均寿命(およそ 3 年)を考慮するとヒトの数十年間に相当し十分な期間と考えられることを回答した。更に副査の浅香教授より、発癌剤と *H. pylori* の投与順序を変えたデザインでの食塩の影響の検討の有無、日本国内での胃発癌率の地域差の原因について質問があった。これに対して申請者は、*H. pylori*→発癌剤の順で投与した食塩の発癌実験は未施行であること、*H. pylori* 菌株の地域分布および食塩摂取量の差が胃発癌率の地域差の原因と考えられることを回答した。

本研究は胃発癌に対する食塩と *H. pylori* の役割と作用機序を明らかにし、減塩が胃発癌を抑制することを示した。本研究を基に、*H. pylori* 除菌、減塩といった具体的な胃発癌予防や、新しい胃癌の化学予防法の開発が期待される。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽・取得単位なども併せて申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。