

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19590696
 研究課題名（和文） ヘリコバクターピロリ感染症の病態機構解明と耐性菌に対する代替療法の開発
 研究課題名（英文） Analysis of the mechanism of gastric inflammation caused by *Helicobacter pylori* infection and development of alternative medicine
 研究代表者
 喜多 正和（KITA MASAKAZU）
 京都府立医科大学・医学研究科・准教授
 研究者番号：60153087

研究成果の概要（和文）：*Helicobacter pylori*（以下 *H. pylori*）は胃炎、胃潰瘍など、胃十二指腸疾患の原因菌であることが知られているが、その機序は不明な点が多い。本研究において、遺伝子欠損マウスを用いることにより、IL-17 が重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、18種類の生薬の抗菌効果を *in vitro* および *in vivo* で検討した結果、黄连、甘草、丁子は *H. pylori* に対して抗菌効果を示すこと、またその効果は抗生物質に対する耐性菌に対しても有効で、長期使用によっても新たな耐性菌の出現が認められないことが明らかとなり、薬剤耐性 *H. pylori* 感染症に対する補完・代替療法として有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is the major cause of chronic active gastritis and peptic ulcer disease. Although it is suspected that cytokines are involved in gastric inflammation induced by *H. pylori*, the mechanisms have not been clearly defined. In this study, the contributions of IL-17 to the induction of gastric inflammation and to the protection from *H. pylori* infection were investigated using IL-17 gene-knockout (IL-17^{-/-}) mice. Our results suggest that IL-17 may play an important role in the inflammatory response to the *H. pylori* infection and ultimately influence the outcome of the *H. pylori* associated disease. On the other hand, the antibacterial effect of 18 herbal medicines was evaluated *in vitro* and *in vivo*. Rhei Rhizoma, Artemisiae Capillari Flos and Caryophylli Flos were bactericidal against *H. pylori* without the development of acquired resistance, suggesting that herbal medicines may have potential as complementary and alternative medicines for treatment of antibiotic-resistant *H. pylori* infection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般

キーワード：ヘリコバクター、サイトカイン、耐性菌、漢方薬、代替療法

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter pylori (*H. pylori*) 感染は胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍から萎縮性胃炎、さらには胃癌、MALT リンパ腫などの胃悪性腫瘍の発生とも関連性が深いことが知られてきた。わが国において、40 歳以上の *H. pylori* 感染率は血清抗体価の保有者から推測すると 80%以上と非常に高く、*H. pylori* 感染の認められる有症状者に対する除菌療法が積極的に行われるようになってきている。また、*H. pylori* 感染症に対する除菌療法により、消化性潰瘍の再発抑制効果が認められることが明らかとなっており、1994 年には、アメリカ国立衛生研究所 (NIH) は「*H. pylori* に感染している胃、十二指腸潰瘍患者は初回、あるいは再発にかかわらず抗菌剤を併用して治療すべきである」との統一見解を発表している。さらに 1996 年には、ヨーロッパの *H. pylori* 研究グループは、消化性潰瘍以外に、早期胃癌切除後 (内視鏡的粘膜切除後)、胃 MALT リンパ腫に対しても除菌治療の対象とすることを推奨している。このように除菌治療の適応が拡大されてきている反面、いまだに確立された除菌療法がないのも事実である。わが国においても、古典的 3 剤療法から 2 種類の抗菌薬 (クラリスロマイシン、アモキシシリン、メトロニダゾール他) にプロトンポンプ阻害薬 (PPI) を併用した新 3 剤併用療法へと治療法が改善され、除菌率も 80~90%と高率になってきている。しかし、一方で治療に用いる抗菌剤に対し耐性を示す *H. pylori* の出現が問題になってきており、特に除菌失敗例において薬剤耐性菌の出現頻度は高率であることが明らかとなっている。現在のところ、アモキシシリン耐性菌の出現頻度は非常に低率であるが、クラリスロマイシン耐性菌は 10%以上、メトロニダゾール耐性菌についてはわが国で 20~30%、諸外国においては 30%以上と報告されており、この 10 年間でその出現率が上昇していることが指摘されている。以上のように、抗菌薬を用いる現代西洋医学的治療法には限界があり、西洋医学の欠点を補う意味での補完・代替療法を検討する必要性がある。

漢方薬は複数の生薬の組み合わせによる製剤であり、歴史的に副作用や毒性が少なくなるような生薬の組み合わせや使い方が工夫されてきた。漢方薬の中には抗炎症作用や

抗菌作用、あるいは免疫増強作用を示す生薬も多く含まれており、*H. pylori* 感染症に対して有効である可能性の高い漢方薬も存在すると考えられる。しかしながら、*H. pylori* 感染症に対する漢方薬の効果を検討した報告は国内外でほとんどなく、また、現在多くの漢方薬が保険適用され医療用に用いられている現状を考慮すると、*H. pylori* 感染症に対する漢方薬の効果を検討する価値は高いと考えられる。

2. 研究の目的

薬剤耐性 *H. pylori* 感染に対する治療法の開発は今後必須の課題であり、薬剤耐性 *H. pylori* に有効な新しい治療法を開発する目的で、われわれは漢方薬あるいは植物由来抗菌物質を用いて *H. pylori* 感染に対する効果を *in vitro* および *in vivo* で検討した。その結果、補中益気湯などの漢方薬に薬剤耐性 *H. pylori* に対する抗菌作用があること、また、エッセンシャルオイルの一つであるレモンバーベナ (*Lippia alternifolia*) およびレモングラス (*Cymbopogon citratus*) にも薬剤耐性 *H. pylori* に対する抗菌作用があることを明らかにした。しかしながら、その抗菌作用の機構については不明な点が多い。薬剤耐性 *H. pylori* に有効な補完・代替療法と言えるには、その作用機構を解明することが必要であり、本研究では、薬剤耐性 *H. pylori* に対して有効であると考えられる補完・代替療法の開発とその作用機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヘリコバクターピロリ感染症の病態機構解明

マウスは、6 週令の野生型 C57BL/6 マウス、IL-17 遺伝子欠損マウスを用いた。*H. pylori* 菌株として *cagA* および *vacA* 遺伝子陽性である CPY2052 株を用いた。CPY2052 株は、ヘリコバクター用 Anaeropack System (80% N₂、15% CO₂、5% O₂) を用い、*H. pylori* 選択培地 (栄研化学) 上で 37 °C、5 日間培養した。コロニーをさらに brain-heart infusion (BHI) 液体培地 (15% FBS とグリセリン含有) で培養後、2 X 10⁸ CFU/ml に調製した 0.2ml の *H. pylori* 菌液を、あらかじめ 4 時間絶食させたマウスに胃ゾンデを用いて経口感染させた。感染 1、2、3、4、6、12 ヶ月後にマウスを安楽死させ、胃を摘出した。摘出した胃を長軸にそって二分割し、一方を胃内定着

菌数（胃内コロニー数）の測定に、他方は病理組織学的評価（炎症の程度）に用いた。

胃内コロニー数は、胃の半分を PBS 1 ml にて homogenize し、100 μ l を HSBHI 寒天培地上で、Anaeropack System を用い 37 $^{\circ}$ C、5 日間培養し、形成されたコロニーを計測した。なお、コロニーが目的のコロニーであるかどうかは以下の特異的 primer を用いた PCR 法にて確認した。

他方の検体は、10%ホルマリンで固定、パラフィンで包埋後、5 μ m で薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色を行なった。炎症の程度は、鏡検にてシドニーシステムに従いスコア化を行い、評価を加えた。

（2）薬剤耐性菌に対する代替療法の開発

①最小発育阻止濃度（MICs）の測定：

通常の 2 段階希釈法で最小発育阻止濃度を測定した。BHI 培地を用い、18 種類の生薬を段階希釈し、 1×10^6 CFU/ml の *H. pylori* を添加後、24 時間培養し、残存している菌を Helicobacter 選択分離培地で 5 日間好気培養をしてコロニー数を計測した。

②漢方薬の投与とマウス胃内生菌数の測定：

マウスを 4 時間絶食後、*H. pylori* 1×10^8 CFU を胃ゾンデを用いて経口感染させた。生薬は感染直後より 14 日間経口投与し、抗生物質は感染当日より 7 日間投与した。感染 4 週後と 12 週後に、マウスより胃を摘出し、胃粘膜層を回収し、胃内菌数を測定した。

4. 研究成果

（1）ヘリコバクターピロリ感染症の病態機構解明

われわれはこれまでにヒト *H. pylori* 感染症例において、感染局所に IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ などのサイトカインが産生されること、これらのサイトカインが病態形成に関与している可能性があることなどを報告している (Gastroenterology 1996., Scand J. Gastroenterol 1997, Gut 1997, Gut 1998, Helicobacter 1998.)。また、これらサイトカインの病態形成における役割についてサイトカインノックアウトマウス感染モデルを用いて検討した結果、IFN- γ が胃炎発症に重要な役割を果たしていること、TNF- α は感染防御に関与しているが、胃炎発症にはほとんど関与していないことなどを明らかにしている (Infect. Immun 1999, Microbiol. Immunol. 2004)。さらに、胃がん患者の胃がん病変においては IL-8 よりはむしろ IL-6 が高発現していることを報告している (Helicobacter 2001)。

本研究では、*H. pylori* 感染症における IL-17 の役割を明らかにするため、IL-17A 遺伝子欠損マウスを用いて検討した。その結

果、IL-17A 遺伝子欠損マウスにおいては、*H. pylori* 感染 6 ヶ月後でも胃粘膜にほとんど炎症病変が認められなかった (図 1、2)。また、炎症浸潤細胞の中でも好中球浸潤だけが有意に抑制され、感染局所のミエロペルオキシダーゼ活性が有意に低下していたことより、IL-17 の欠損により好中球の浸潤が抑制された結果、炎症反応が抑制されていると考えられた。以上の結果、*H. pylori* 感染症においては、従来知られていた Th1 サイトカインに加え、新規に発見された炎症性サイトカインである IL-17 も胃炎の発症に重要な役割を果たしていることが示唆された。

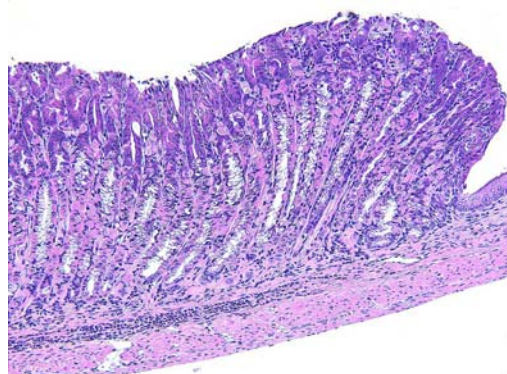


図 1、野生型マウスの胃粘膜病変

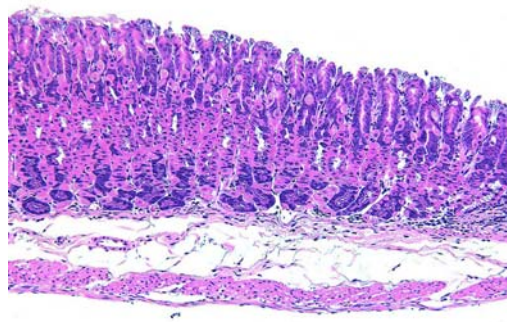


図 2、IL-17 遺伝子欠損マウスの胃粘膜病変

（2）薬剤耐性菌に対する代替療法の開発

漢方薬に関して、われわれはすでに漢方製剤の中で抗菌効果のあることが報告されている補中益気湯に注目し、*H. pylori* に対する抗菌効果を *in vitro* および *in vivo* で検討した。その結果、1) 補中益気湯は薬剤感受性菌および耐性菌に対して同様の抗菌効果を示すこと、2) 補中益気湯の抗菌効果は *in vitro* および *in vivo* で認められること、3) 補中益気湯は抗生物質と併用することにより抗菌効果が増強され、完全に除菌することが可能であることなどを明らかにしている (Microbiol. Immunol. 2002)。

本研究では、*H. pylori* に対して漢方薬が抗菌活性を有するかどうかを *in vitro* および *in vivo* で検討した。18 種類の生薬を対象に *H. pylori* に対する抗菌効果を検討した結果、黄連、甘草、丁子が 1mg/ml 以上の濃度で強い抗菌活性を示し、薬剤耐性菌に対しても同様の効果を示した。また、クラリスロマイシン感受性株をそれぞれの薬剤含有培地にて継代培養した結果、クラリスロマイシン耐性菌は出現したが、漢方薬耐性菌は出現しなかった。さらに、マウスにこれらの生薬を経口投与した結果、胃内菌数は生薬投与群では非投与群と比較して有意に抑制されていた (図 3)。以上の結果、漢方薬は *H. pylori* に対して抗菌効果を示すこと、またその効果は抗生物質に対する耐性菌に対しても有効で、長期使用によっても新たな耐性菌の出現が認められないことが明らかとなり、薬剤耐性 *H. pylori* 感染症に対する補完・代替療法として有用であることが示唆された。

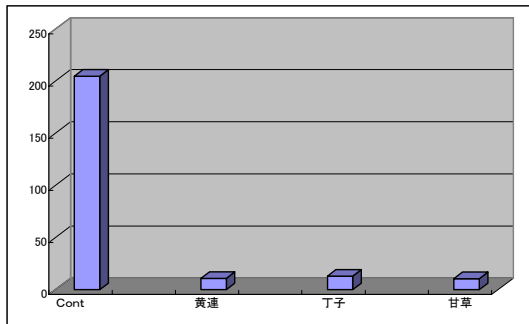


図 3、生薬の *in vivo* における抗菌効果

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Sugimoto M, Sakai K, Kita M, Imanishi J, Yamaoka Y. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in long-term hemodialysis patients. *Kidney Int.* 査読有, 75(1), 2009, 96-103.
- ② Sakai K, Kita M, Sawai N, Shiomi S, Sumida Y, Kanemasa K, Mitsufuji S, Imanishi J, Yamaoka Y. Levels of interleukin-18 are markedly increased in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa among patients with specific IL18 genotype s. *J Infect Dis.* 査読有, 197, 2008, 1752-1761.
- ③ Shiomi S, Toriie A, Imamura S, Konishi H, Mitsufuji S, Iwakura Y,

Yamaoka Y, Ota H, Yamamoto T, Imanishi J, Kita M. IL-17 is involved in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. *Helicobacter*, 査読有, 57, 2008, 518-524.

- ④ Lu H, Wu JY, Beswick EJ, Ohno T, Odenbreit S, Haas R, Reyes VE, Kita M, Graham DY, Yamaoka Y. Functional and intracellular signaling differences associated with the *Helicobacter pylori* AlpAB adhesin from Western and East Asian strains. *J Biol Chem.* 査読有, 282, 2007, 6242-6254.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 喜多正和、塩見 聡、今西二郎、*Helicobacter pylori* 感染症における IL-17A の関与、第 170 回日仏生物学会、平成 21 年 6 月 13 日、東京
- ② 喜多正和、塩見 聡、今西二郎、ヘリコバクターピロリ誘発胃炎マウスモデルにおける IL-17 の役割、日本実験動物学会、平成 20 年 5 月 17 日、仙台
- ③ 喜多正和、塩見 聡、今西二郎、*Helicobacter pylori* 感染により発症する胃炎における IL-17 の役割、日本インターフェロン・サイトカイン学会、平成 19 年 7 月 6 日、京都

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

喜多 正和 (KITA MASAKAZU)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：60153087

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：