

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590890

研究課題名(和文) 薬剤耐性ヘリコバクターピロリ感染症に対する補完代替療法

研究課題名(英文) Alternative therapies for antibiotic-resistant *Helicobacter pylori* infection

研究代表者

喜多 正和 (KITA, Masakazu)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60153087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：ヘリコバクターピロリ(ピロリ菌)は胃炎、胃潰瘍、胃がんなどの原因菌であることが知られているが、現在、クラリスロマイシンやメトロニダゾールに対する耐性菌の出現が問題となっている。本研究では、18種類の生薬の薬剤耐性ピロリ菌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、*in vitro* においては5種類以上の生薬が薬剤耐性ピロリ菌に対して抗菌効果を示したが、*in vivo* においてはオウレン、チョウジ、カンゾウのみに除菌効果が認められた。以上の結果、これらの生薬は薬剤耐性ピロリ菌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*) infection is highly associated with the occurrence of gastrointestinal diseases, including gastric inflammation, peptic ulcer and gastric cancer. The standard triple therapy consisting of PPI and two antibiotics is widely used as the regimen for treatment of infection, but the increased resistance of *H. pylori* to clarithromycin and metronidazole has significantly reduced the eradication rate. In this study, the antimicrobial effect of 18 herbal medicines was evaluated *in vitro* and *in vivo*. Several herbal medicines inhibited the growth of antibiotic-resistant strains of *H. pylori* at a dose of 1 mg/ml *in vitro*. On the other hand, the density of *H. pylori* in the stomach of mice treated with 3 herbal medicines (*Coptidis Rhizoma*, *Glycyrrhizae Radix* and *Caryophylli Flos*) was significantly reduced. These results suggest that herbal medicines may have potential as complementary and alternative medicines for treatment of antibiotic-resistant *H. pylori* infection.

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：代替医療 ヘリコバクター 薬剤耐性 マウスモデル 生薬

## 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いる。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。

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* の出現が最近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

すると思われる。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はほとんどなく、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 (生薬) 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る。薬剤耐性 *H. pylori* に有効な新しい治療法を開発する目的で、われわれはすでに漢方薬を用いて *H. pylori* 感染に対する効果を *in vitro* および *in vivo* で検討してきた。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を明らかにしている。しかしながら、漢方薬のどの成分が抗菌作用を示すかは不明である。本研究では、他の細菌に対して抗菌効果を示すこと、あるいは抗炎症作用を示すことが報告されている生薬の中から 18 種類の生薬を選択し、薬剤耐性 *H. pylori* に対する抗菌効果を *in vitro* および *in vivo* で検討した。また、生薬の生体内における作用機序を解明するため、まず、薬剤耐性 *H. pylori* 感染後の胃内組織におけるサイトカインの発現を検討するとともに、マウス胃粘膜上皮細胞を *in vitro* で培養し、薬剤耐性 *H. pylori* 感染後に誘発されるサイトカインを比較検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 薬剤耐性 *H. pylori* に対する抗菌効果

生薬としてオウギ、ハンゲ、カンゾウ、ニンジン、ダイオウ、マオウ、シャクヤク、ケイヒ、ボタンビ、オウレン、インチンコウ、サイコ、ソヨウ、ポウフウ、キョウニン、カッコン、チョウジ、コウボク (株ツムラより提供) の 18 種類を使用した。各種生薬の *in vitro* における抗菌効果を検討するため、*H. pylori* (CPY2052) の菌液 ( $1 \times 10^7$  CFU) と

生薬を混合し 24 時間振盪させた後、血液寒天培地に塗布し微好気下に 7 日間培養し、コロニー数をカウントした。また、生薬の濃度を 0.0001 ~ 1mg/ml に調整し、有効濃度を検討するとともに、菌との接触時間を 0 時間、3 時間、6 時間、12 時間、24 時間とした場合の抗菌効果についても検討した。

#### ( 2 ) *in vivo* における抗菌効果の検討

6 週齢の C57BL/6 マウスに *H. pylori* を経口投与し感染させ、直後よりダイオウ、オウレン、インチンコウ、チョウジ、カンゾウを自由飲水させた。経口感染より 4 週後に胃を摘出し、*H. pylori* 感染の有無を HP 選択培地による培養および PCR 法を用いて検討した。また、生薬の治療効果を検討するため、*H. pylori* 感染 1 ヶ月後より生薬を経口投与し、経時的に胃に定着している菌数を測定するとともに病理組織学的検査を実施した。

#### ( 3 ) 胃粘膜におけるサイトカイン産生

*H. pylori* 感染後の胃粘膜および脾臓を採取し、組織中のサイトカイン mRNA 発現の変動を realtime PCR (RT-PCR) 法で測定するとともに、組織中に発現しているサイトカインを ELISA で定量的に測定し、比較検討した。さらに、IL-17A 遺伝子欠損マウスに CPY2052 株を感染させ、胃内菌数および組織学的変化を比較検討することにより、*in vivo* におけるサイトカインの役割を検討した。

#### ( 4 ) 培養胃粘膜上皮細胞におけるサイトカイン産生

正常 C57BL/6 マウスおよび IL-17A 遺伝子欠損マウスの胃を摘出し、ディスパーゼで細胞を分離後、D-MEM/Ham's F-12 培地で胃粘膜上皮細胞を培養した。*H. pylori* を感染させ、24 時間後に発現しているサイトカイン mRNA をマイクロアレイを用いて網羅的に比較検討した。

### 4 . 研究成果

#### ( 1 ) 生薬の抗菌効果 *in vitro*

実験に使用した 18 種の生薬の内、少なくとも 10 種類以上の生薬が *H. pylori* に対して、抗菌効果を示したが、ダイオウ、オウレン、インチンコウ、チョウジ、カンゾウの抗菌効果が最も強かった。また、生薬の濃度は 1 mg/ml 以上で有意な抗菌効果を示し、接触時間は 6 時間以上が有効と考えられた。

#### ( 2 ) 生薬の抗菌効果 *in vivo*

*In vitro* の実験で薬剤耐性 *H. pylori* に強い抗菌効果を示した 5 種類の生薬を薬剤耐性 *H. pylori* 感染マウスに同時投与した結果、オウレン、インチンコウ、チョウジ、カンゾウが有意な抗菌効果を示した。一方、薬剤耐性 *H. pylori* 感染 1 ヶ月後からこれらの生薬による治療を開始した結果、オウレン、チョウジ、カンゾウのみが有意な治療効果を示し、カンゾウ投与による完全除菌率は 60% と最も高かった ( 表 1 )。また、非治療群のマウスにおいては、胃粘膜および粘膜下組織に細胞浸潤を伴う炎症像が認められたが、カンゾウによる治療群のマウスではほとんど炎症は認められなかった。

表 1、薬剤耐性 *H. pylori* に対する生薬の治療効果

	感染 12 週後	
	胃内菌数	除菌率
対照	1170 ± 110	0/10 (0%)
オウレン	11 ± 12**	3/10 (30%)
カンゾウ	4 ± 6**	6/10 (60%)**
チョウジ	13 ± 19**	4/10 (40%)*

\*p<0.05 \*\*p<0.01

#### ( 3 ) *H. pylori* 感染胃粘膜におけるサイトカイン産生

*H. pylori* 感染における胃炎などの病態形成に關与するサイトカインを明らかにするため、*H. pylori* 感染後の胃粘膜におけるサイトカイン産生を検討した結果、IL-1, IL-6, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  などのサイトカイン

産生が認められた。また、培養胃粘膜上皮からもこれらのサイトカインが産生されることが明らかとなった。一方、IL-17A 遺伝子欠損マウスを用いた実験から、IL-17A が病態形成に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

以上の結果、カンゾウ、オウレン、チョウジなどの生薬は薬剤耐性 *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。

#### 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 1 件)

喜多正和、ヘリコバクター・ピロリ感染症におけるサイトカインの役割、日仏生物学会誌, 52:81-89, 2012.

〔学会発表〕(計 5 件)

喜多正和、西家章弘、今西二郎、*H. pylori* 感染症に対する生薬の治療効果、第 179 回日仏生物学会、2013 年 11 月 30 日、仙台

喜多正和、西家章弘、今西二郎、クラリスロマイシン耐性ヘリコバクター・ピロリ感染症に対する生薬の抗菌効果、第 60 回日本実験動物学会総会、2013 年 5 月 17 日、つくば

喜多正和、西家章弘、今西二郎、薬剤耐性 *H. pylori* 感染に対する生薬の抗菌効果、第 177 回日仏生物学会、2012 年 12 月 1 日、京都

喜多正和、西家章弘、今西二郎、薬剤耐性 *H. pylori* 感染症に対する補完代替療法、第 116 回関西実験動物研究会、2012 年 12 月 14 日、京都

Kita M. Role of IL-17A in *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Inflammatory Responses in a Mouse Model. International Union of Microbiological Science (IUMS)

2011 Congress, 2011 Sep.7: Sapporo.

〔図書〕(計 1 件)

喜多正和、ヘリコバクター感染症モデル、野本明男、喜多正和編、疾患モデルの作製と利用「糖尿病・肥満/感染症」、東京、エル・アイ・シー、pp203-210, 2012.

〔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)  
京都府立医科大学大学院医学研究科・  
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：