

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460109

研究課題名(和文) グルタミン酸によるヘリコバクター・ピロリ関連胃病変の発生と定着抑制機序の解明

研究課題名(英文) Ameliorative effect of glutamate on Helicobacter pylori-related gastropathy

研究代表者

天ヶ瀬 紀久子 (Amagase, Kikuko)

京都薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：60278447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：グルタミン酸は食餌中のうま味成分として知られ、小麦や大豆などに多く含まれるアミノ酸であり、消化管粘膜の恒常性維持に寄与している。本研究では、グルタミン酸のヘリコバクター・ピロリ誘起胃粘膜病変に対する効果について検討した。グルタミン酸の前処置は、マウスにおけるヘリコバクター・ピロリ菌による胃炎を抑制した。この作用は、グルタミン酸の抗菌作用ではなく、グルタミン酸による胃粘液増加作用がヘリコバクター・ピロリ菌の胃内定着を抑制したことによると考えられた。グルタミン酸は、ヘリコバクター・ピロリ関連胃粘膜病変の予防および治療に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： Helicobacter pylori (H. pylori) is a major cause of chronic gastritis, gastroduodenal ulcers, and gastric cancer. Glutamate is known to be a major of umami substances and traditionally prefer in Asian countries. We found that the feeding of MSG-containing diet for 3 weeks, starting from 1 week before H. pylori inoculation, protected gastric mucosa against H. pylori-induced gastritis. MSG significantly prevented the colonization of H. pylori in the gastric mucosa, but did not have any effect on the growth of H. pylori on agar plate in vitro.

This action may be attributable to inhibition of inflammatory responses and colonization of H. pylori. MSG increases mucus production and TFF-1 expression in the gastric mucosa. Thus, it is assumed that preventive effect of MSG on the colonization of H. pylori in the gastric mucosa may be attributable to increase in mucus production and TFF-1 expression.

研究分野：薬理学・薬物治療学

キーワード：Helicobacter pylori ヘリコバクターピロリ関連胃疾患 グルタミン酸

## 1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) は、強力なウレアーゼ活性を有するグラム陰性ラセン桿菌であり、アンモニアを産生するため、胃粘膜に定着できると考えられている。ヘリコバクター・ピロリの持続感染は、胃炎や胃・十二指腸潰瘍、さらには胃がんの発症に深く関与していることが知られており、現在臨床においては、ヘリコバクター・ピロリ感染が確認された場合には、積極的に除菌治療を行うことが一般的である。近年、ヘリコバクター・ピロリの感染およびそれに起因する胃疾患の発症を予防する目的で、乳酸菌製品や天然物由来成分、機能性食品などが注目されている。

グルタミン酸は食餌性タンパク質の中で最も多く含有される必須アミノ酸であり、生体内でも合成され、神経伝達などに関与していることが知られている。一方、グルタミン酸はわが国では古来より昆布などのうま味成分として知られており、食品添加物としても広く使用されている。グルタミン酸は最も血中移行量が少ないアミノ酸であり、食餌中の含有量が多いにもかかわらず、食餌の摂取によりグルタミン酸の血中濃度は変動しない。これはグルタミン酸が血中への移行前に消化管内でその大部分が利用されているためであり、実際、ブタを用いた検討において、食餌由来のグルタミン酸の95%以上が消化管粘膜上皮での代謝エネルギー産生や他のアミノ酸およびタンパク質の合成に利用されることが確認されている。したがって、グルタミン酸は消化管粘膜局所において、その機能の調節・維持に関与しているものと推察される。これまでの消化管機能との関連における基礎研究において、グルタミン酸が胃酸分泌を亢進すること、胃の迷走神経を活性化すること、また十二指腸粘液分泌を亢進することにより粘液層の厚さを増大させることなどが報告されている。しかし、グルタミン酸のヘリコバクター・ピロリ感染への影響や胃炎などの病態との関連については不明である。

## 2. 研究の目的

グルタミン酸は様々な生理機能の調節に関与しているほか、食餌中のうま味成分として、食品添加物として使用されている。これまでの研究で、グルタミン酸の摂取が、スナネズミにおけるヘリコバクター・ピロリ誘起胃炎の発生が抑制すること、またヘリコバクター・ピロリ菌自体の胃粘膜への定着

を阻害することを見出した。そこで本研究は、グルタミン酸のヘリコバクター・ピロリにより誘起される胃炎の抑制ならびに胃粘膜への定着阻害のメカニズムを解明し、グルタミン酸のヘリコバクター・ピロリ関連疾患への応用を目指すことである。

## 3. 研究の方法

使用動物：雄性 C57BL/6 マウス (8週齢) を用いた。グルタミン酸含有飼料は、グルタミン酸非含有の標準食に、1 又は 5% の濃度になるようにグルタミン酸を含有させた飼料を購入して使用した。

ヘリコバクター・ピロリ菌：ヒト臨床株 (TN2GF4 株) を使用した。ヘリコバクター・ピロリ菌の接種は、マウスを 24 時間絶食後に、 $1 \times 10^9$  CFU /mouse を経口接種した。胃粘膜病変の観察：ヘリコバクター・ピロリ菌接種 2 週間後に、胃を摘出し、解剖顕微鏡下にびらん、浮腫、炎症を観察した (本事業で購入した顕微鏡システムを使用)。

組織学的検討：摘出した胃より病理組織標本を作製し、PAS 粘液染色を施し、胃粘液量の変化を検討した。また HE 染色により胃粘膜丈や浮腫等の観察を行った。

TFF 発現の検討：消化管の粘液産生細胞によって産生され、粘膜保護や修復に関与している Trefoil factor (TFF)、特に TFF1 の発現について免疫組織学的に検討した。

ウレアーゼ活性の測定：CLO テスト (迅速ウレアーゼ法; *H. pylori* のウレアーゼによりゲル中の尿素が分解し、アンモニア産生によるゲルの色調変化による *H. pylori* 有無の検査法) により測定した。

好中球活性の測定：炎症の指標として、摘出した胃粘膜中のミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性を o-dianisidine 法によりプレートリーダーを用いて測定した。また、病理組織学的検討として、DAB 染色によりペルオキシダーゼ活性染色を行うことにより、胃における炎症部位を検討した。

## 4. 研究成果

(1) ヘリコバクター・ピロリ誘起胃粘膜病変に対するグルタミン酸の効果

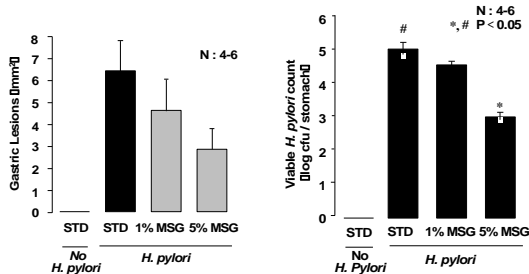
24 時間絶食したマウスにヘリコバクター・ピロリ菌 (TN2GF4 臨床分離株) を接種し、2 週間後に胃炎の発生を検討した。肉眼的に胃粘膜には、出血やびらんなどが観察され、本モデルをヘリコバクター・ピロリ誘起胃炎モデルとして用いることとした。

1 または 5% グルタミン酸含有飼料を 7 日間

摂食後、ヘリコバクター・ピロリを接種した。対照群にはグルタミン酸非含有の標準飼料を与えた。ヘリコバクター・ピロリ接種2週間後に、標準飼料摂食群およびグルタミン酸含有飼料摂食群のマウスから胃を摘出し、胃炎の程度を評価（本事業において購入した実体顕微鏡デジタル観察システムを使用）した。標準飼料を与えたヘリコバクター・ピロリ非感染群を用意し、ヘリコバクター・ピロリ感染（標準飼料摂食）群と比較検討した。

その結果、標準飼料摂食群と比較して5%グルタミン酸含有飼料摂食群において胃炎の顕著な改善が認められた。炎症の指標であるミエロペルオキシダーゼ活性を、グルタミン酸含有飼料摂食群では、標準飼料摂食群と比較して、有意な抑制がみとめられた。胃内ヘリコバクター・ピロリ生菌数は標準飼料摂食群と比較して、5%グルタミン酸含有飼料摂食群では有意に低下していた。

以上の結果、グルタミン酸をヘリコバクター・ピロリ感染前から摂食することにより、ヘリコバクター・ピロリの定着が阻害され、胃炎の発生が抑制することが明らかとなった。



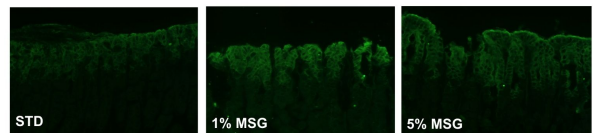
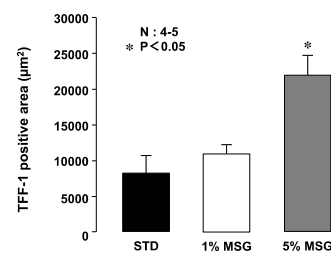
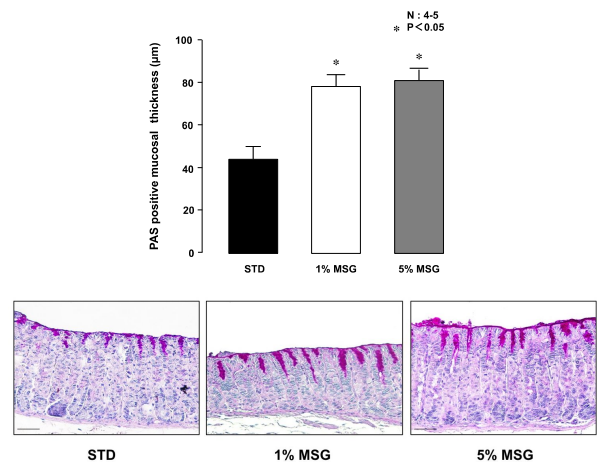
Animals were inoculated orally with *H. pylori* TN2GF4 (1×10<sup>9</sup> CFU /mouse) and sacrificed 14 days later. 1%, 5% MSG-containing diet, and standard diet (STD) were fed for 21 days, starting from 7 days before *H. pylori*-inoculation.

## (2) グルタミン酸のヘリコバクター・ピロリ菌の胃粘膜定着阻害機序

マウスにグルタミン酸含有飼料を7日間摂食後、胃を摘出した。対照群にはグルタミン酸非含有の標準飼料を与えた。摘出した胃をミンスした後、ヘリコバクター・ピロリ菌と混合し、ヘリコバクター・ピロリ選択寒天培地にて培養した結果、標準飼料摂食群とグルタミン酸含有飼料摂食群の間で、菌の増殖に有意な差は認められなかった。グルタミン酸含有飼料を摂食したマウスの胃粘膜を組織学的に観察したところ、PAS 陽性粘液の粘

膜丈が、標準飼料摂食群と比較して有意に大きかった。また粘液分泌に關与している Trefoil Factor-1 (TFF-1)の発現を免疫組織学的に検討したところ、TFF-1 陽性細胞はグルタミン酸含有飼料摂食群において、明らかに増大していた。

以上から、グルタミン酸の摂食は、ヘリコバクター・ピロリ誘起胃粘膜病変を抑制することが判明した。これはグルタミン酸による抗菌作用によるものではなく、グルタミン酸の前処置による胃粘液の増加によって、ヘリコバクター・ピロリ菌の定着阻害が關与しているものと考えられた。またこの胃粘液の増加には、TFF-1 の発現増大が關与しているものと推察された。ゆえに、グルタミン酸は、ヘリコバクター・ピロリ関連胃粘膜病変の予防および治療に有用である可能性が示唆された。



Animals were fed 1%, 5% monosodium glutamate (MSG)-containing diet, and standard diet (STD) for a week. The mucus production was determined by PAS-staining. The expression of TFF-1 was determined immunohistochemically using an anti-TFF-1 antibody.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

Hamouda N, Sano T, Oikawa Y, Ozaki T, Shimakawa M, Matsumoto K, Amagase K, Higuchi K, Kato S. Apoptosis, Dysbiosis and Expression of Inflammatory Cytokines are Sequential Events in the Development of 5Fluorouracil induced Intestinal Mucositis in Mice. Basic Clin Pharmacol Toxicol. (2017) (in press)

天ヶ瀬紀久子、中村英志、加藤伸一、竹内孝治：グルタミン酸の消化管粘膜保護薬としての可能性。薬学雑誌，査読有，135(6)，779-782 (2015)。

〔学会発表〕(計 4件)

加納嘉太郎、北居香菜子、宗本尚子、中井千秋、松本健次郎、天ヶ瀬紀久子、加藤伸一：*Helicobacter pylori* 誘起胃粘膜病変に対するグルタミン酸の保護効果。日本薬学会第 137 年会 (仙台)，2017.3。

天ヶ瀬紀久子、岡田沙知、加納嘉太郎、松本健次郎、加藤伸一：グルタミンおよびグルタミン酸の薬剤起因性消化管傷害に対する保護効果。日本薬学会第 136 年会 (横浜)，2016.3。

天ヶ瀬紀久子：薬剤誘起消化管粘膜傷害の病態解析と予防・治療薬に関する探索研究。生体機能と創薬シンポジウム 2015 (千葉)，2015.8。

天ヶ瀬紀久子、播磨弘樹、山崎華歩、中村英志、竹内孝治、松本健次郎、加藤伸一：*Helicobacter pylori* 誘起胃粘膜病変に対するグルタミン酸の保護効果。第 33 回 Cytoprotection 研究会 (京都)，2015.3。

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

天ヶ瀬 紀久子 (AMAGASE, Kikuko)

京都薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：6 0 2 7 8 4 4 7

(2)研究分担者

加藤 伸一 (KATO, Shinichi)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：9 0 2 8 1 5 0 0

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

加納嘉太郎 (KANOU, Yoshitaro)

北居香菜子 (KITAI, Kanako)