

黄連解毒湯による *Helicobacter pylori* 感染症発症阻害の機序

A.M.A. KABIR, 相場 勇志, 古賀 泰裕, 田中 和生*

東海大学医学部・感染症学部門

Preventive action of Oren-gedoku-to (Huang-Lian-Jie-Du-Tang) on *Helicobacter pylori* infectious disease

A.M.A. KABIR, Yuji AIBA, Yasuhiro KOGA and Kazuo TANAKA*

Department of Infectious Diseases, Tokai University School of Medicine

(Received December 12, 1997. Accepted February 26, 1998.)

Abstract

Oren-gedoku-to (Huan-Lian-Jie-Du-Tang, OGT) has been widely used for patients having abdominal discomfort due to diseases such as gastritis and peptic ulcer. It has recently been revealed that *Helicobacter pylori*, a microaerophilic and gram-negative bacillus, causes gastritis and peptic ulcer diseases. Thus, in this study, an anti-*H.pylori* effect of OGT was examined using *in vitro* experiments and an *in vivo* animal model of *H.pylori* infection. OGT inhibited both the attachment of the bacteria to the gastric epithelial cells and the urease activity of *H.pylori*. Moreover, OGT inhibited the growth of *H.pylori* *in vitro*. In addition, the oral administration of OGT significantly reduced the number of *H.pylori* in the stomach of the germfree mouse infected with the bacteria in a dose dependent manner. These data suggested the possibility of OGT being used as the agent against *H.pylori*.

Key words Oren-gedoku-to, *Helicobacter pylori*, Germfree mouse.

Abbreviations CFU, colony-forming unit; Hp, *Helicobacter pylori*; OGT, Oren-gedoku-to (Huang-Lian-Jie-Du-Tang) 黄連解毒湯; MIC, minimum inhibitory concentration.

緒 言

Helicobacter pylori (以下 Hp) は微好気性、グラム陰性の螺旋状短桿菌で、胃・十二指腸潰瘍、胃炎の起因菌であり MALT lymphoma などの胃リンパ腫の発症にも病原微生物として関与していることが報告されている^{1,3)}。従って、胃・十二指腸潰瘍、胃炎などは感染症としてとらえることが出来る。一般に感染症の発症は、①病原微生物の標的組織への接着・定着による感染の成立、②微生物の増殖、③組織傷害、の3段階から成る。従って、ある薬剤が感染症に対して有効であるということを示す為には、その薬剤がこの3段階の中のどの段階に作用しているかを *in vitro*, *in vivo* 実験系で明らかにする

必要がある。ところが、この *in vivo* において Hp に対する有効性を示す為には、感染時期が明らかで、かつその感染が持続する Hp 感染動物モデルの確立が必須となるが、この動物モデルの確立が従来極めて困難であった。今までの研究では主に無菌ミニブタ、無菌ビーグル犬、カニクイザル、アカゲザル、ニホンザルなどの大動物で Hp 感染が報告されているが^{4,8)} 動物モデルとして汎用されるマウスのモデルでは、T細胞を欠くヌードマウスを用いた系⁹⁾ か、あるいは特定の臨床分離株を用いた系¹⁰⁾ のいずれかに限られていた。最近、我々は無菌 BALB/c マウスに 10^8 CFU (colony forming unit) の Hp を3日間連日経口感染させたところ、Hp の菌株に関わらず感染が成立し、胃粘膜病変が発症し、かつこの感染状態が6ヶ月以上持続することを観察した¹¹⁾。この動

*〒259-1193 神奈川県伊勢原市望星台
Bouseidai, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan

物感染モデルは免疫系の不全がない近交系マウスを用いており、それ故に Hp 感染から胃粘膜病変の成立にいたるまでの宿主側因子の関与を詳細に検討することが可能である。そこで、本研究ではこの無菌マウスを用いた感染モデルを利用し、漢方薬、特に黄連解毒湯が Hp 感染症の成立に及ぼす影響を検討した。

従来、胃・十二指腸潰瘍治療薬としてはヒスタミンレセプター阻害剤、プロトンポンプ阻害剤、粘膜保護剤などが用いられていたが、Hp が胃・十二指腸潰瘍の病原因子であることが明らかとなつて以来、積極的な Hp の除菌が行われるようになってきた。^{12,13)} この目的から抗生物質の投与がなされるようになってきたが、単独の抗生物質では十分な抗菌が得られず複数の抗生物質の投与、あるいは抗生物質と抗 Hp 活性を持つプロトンポンプ阻害剤等の併用による抗菌作用の強化が計られた。本研究の目的は、Hp 除菌をも目的とした潰瘍治療薬の一つとしての漢方薬の可能性を検討することである。実験にあたり、まず上部消化管の不定愁訴に対して有効とされている漢方薬について Hp に対する最小発育阻止濃度を調べ、その中で最も有効に Hp 発育の阻止を示した黄連解毒湯について Hp 感染症に対する除菌剤としての有用性について検討した。

材料と方法

(1) 細菌：Hp (*Helicobacter pylori*) #112, #124, #130, #132, #1101, #1107 及び #1029 はいずれも臨床分離株であり、東海大学病院で上部消化管内視鏡施行時に得られた生検組織より分離・培養して得た。臨床検体からの分離には分離培地として Skirrow 平板培地を用い、細菌学的同定にはグラム染色後の形態学的検査、及び API CAMPY Kit (Biomerieux, Marcy-l'Etoile, France) により行った。Hp NCTC #11637 は National Collection of Type Culture (London, UK) より購入した。Colony forming unit (CFU) の測定はこれらの Hp を 7% 馬血液加 BHI (brain/heart infusion) 寒天平板培地 (Difco Laboratories, Michigan, USA) で培養して行った。また、このコロニーから得られた Hp を 5% ウシ胎児血清加 Brucella broth 培養液 (Difco Laboratories) にて 37°C にて 72 時間培養し、培養後培養液を 3000 g で 15 分間遠心し、Hp を回収し、このペレットに 10% スキムミルク、1% グルタミン酸ナトリウム加培養液を添加したものを菌液として実験使用時まで -70°C にて保存した。各菌株 *Cag A* 遺伝子の有無は PCR 法により調べた。¹⁴⁾ また、Vacuolating toxin (VT) の産生は RK13 (家兎腎細胞株) に対する細胞傷害の有無で調べた。¹⁵⁾

(2) 漢方薬：安中散料 (EK-5), 小柴胡湯 (EK-9), 半夏瀉心湯 (EK-14), 黄連解毒湯 (EK-15), 六君子湯 (EK-43) のエキス原末は鐘紡株式会社漢方研究所 (大阪) より供与されたものを用いた。用いた各漢方製剤のロット番号、構成生薬名、及びその量は以下の通りである。

安中散料 (lot ; 19 G) : 桂皮 (4.0 g), 延胡索 (3.0 g), 牡蛎 (3.0 g), 茴香 (1.5 g), 縮砂 (1.0 g), 甘草 (1.0 g), 良姜 (0.5 g)

小柴胡湯 (lot ; Q1702) : 柴胡 (7.0 g), 半夏 (5.0 g), 黄芩 (3.0 g), 大棗 (3.0 g), 人参 (3.0 g), 甘草 (2.0 g), 生姜 (1.0 g)

半夏瀉心湯 (lot ; KS106) : 半夏 (5.0 g), 甘草 (2.5 g), 人参 (2.5 g), 大棗 (2.5 g), 生姜 (2.5 g), 黄連 (1.0 g)

黄連解毒湯 (lot ; 00111) : 黄芩 (3.0 g), 山梔子 (2.0 g), 黄連 (1.5 g), 黄柏 (1.5 g)

六君子湯 (lot ; 2YG) : 人参 (4.0 g), 白朮 (4.0 g), 茯苓 (4.0 g), 半夏 (4.0 g), 陳皮 (2.0 g), 大棗 (2.0 g), 甘草 (1.0 g), 生姜 (0.5 g)

In vitro の実験に用いたエキスは各漢方薬エキス末を phosphate buffer saline (PBS) に溶解し、ミリポアフィルター (0.22 μ m, ミリポアジャパン, 東京) にて濾過滅菌して実験に用いた。この濾過後の水溶性エキスを煮沸し、乾燥させた後再び乾燥エキス末の重量を測定し、濾過前の重量に対する比率を算出し、エキス末試料の水溶性分画の比率とした。特に説明しない限り、エキス末の重量を漢方薬の重量とした。

(3) 最小発育阻止濃度 Minimum Inhibitory Concentration (MIC) : 各株の Hp を 5% 馬血液加 Mueller-Hinton 寒天培地に、各種漢方薬のエキスを 2 段階希釈法により最終濃度 10 (10/2⁰) ~ 0.01 (10/2¹⁰) mg/ml で添加し、これに各種 Hp 株を 10⁶ CFU/ml を 10 μ l 接種し、4 日間培養した。培養終了時において Hp の増殖が認められない最小濃度をその漢方薬の MIC とした。

(4) Hp-胃上皮接着能 : マウスより胃を採取し、3% Dispase 含有リン酸緩衝液にて 45 分間処理した後、上皮細胞層を剥離した。パイペッティングにより上皮細胞を単離した後、ガーゼフィルターを通した。これを 5% ウシ胎児血清加 RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, New York) にて 3 日間培養した後、1000 rpm, 10 分間遠心して生細胞を回収し、胃上皮細胞浮遊液とした。次に Brucella broth にて培養した Hp を 3000 rpm, 15 分の遠心にて回収し、これを細胞蛍光標識キット (PKH2, 大日本製薬, 東京, 励起波長 504 nm) を用いて標識した。標識操作は添付マニュアルに準じて行った。この PKH2 標識 Hp を Brucella broth にて 1×10⁸/ml に調製し、こ

の中に各種濃度の黄連解毒湯を添加し、0~12 時間培養した。培養終了後、胃上皮細胞浮遊液 1×10^6 /ml (RPMI 1640) と PKH2 標識 Hp 1×10^8 /ml (黄連解毒湯添加 Brucella broth) を 1:1 (Volume) で混合し、37°C にて更に 1 時間混合培養した。この後、混合液を遠心し、ペレットに 10 % sucrose 液を加え、攪拌の後、1000 rpm、10 分遠心し、胃上皮細胞およびこれに接着した標識 Hp を回収した。このペレットを 200 μ l に調製し、96 穴平底マイクロプレートのウェルに移し、蛍光強度を蛍光 ELISA リーダー (Fluoroscan II, 大日本製薬) にて測定した (励起波長 490 nm)。測定値は PKH2 標識 Hp と各濃度の黄連解毒湯との作用時間が 0 時間のときの蛍光強度を 100 % とした蛍光強度の減少度で表し、これを Hp の接着度とした。

(5) ウレアーゼ活性の測定: Hp のウレアーゼ活性に黄連解毒湯がどのように影響するかを試験管内にて調べた。黄連解毒湯を添加した 5 % ウシ胎児血清加 Brucella broth に Hp #130 を加え、37°C 微好気条件にて培養し、経時的に菌を採取し、菌体蛋白量あたりのウレアーゼを測定した。¹⁶⁾ ウレアーゼ活性は産生アンモニア量を測定することにより求めた。アンモニア産生量はアンモニアテストワコー (和光純薬, 大阪) を用いて測定し、1 分間あたり 1 μ mol の NH_3 産生量を 1 unit として表示した。

(6) 試験管内 Hp 増殖抑制試験: 5 % ウシ胎児血清加 Brucella broth に濾過滅菌した黄連解毒湯エキスを添加し、これに Hp #130 を 1×10^5 CFU 接種し、37°C 微好気

培養し、経時的にその菌数を測定した。

(7) 無菌マウスを用いた実験: 無菌マウスは日本クレア (東京) より購入し、アイソレーター内で滅菌水・滅菌飼料にて飼育・管理した。4~5 週齢の雄無菌 BALB/c マウスにリン酸緩衝液にて調製した 1×10^9 /CFU の Hp #130 (0.5 ml) をマウス用胃ゾンデにて連日 3 日間経口感染させた。Hp 最終感染日より 5 週間後より黄連解毒湯の投与を開始した。黄連解毒湯は滅菌飲用水に溶解し、マウス用胃ゾンデを用いて連日 2 週間投与した。投与終了日の 1 日後にマウスを屠殺し、胃を採取し、これをホモジナイズして菌数を測定し、これを胃内の総菌数とした。また、胃内の Hp には胃上皮に定着しているものと、胃粘液層にとどまっているものとがあるが、胃上皮に定着している Hp のみの菌数は、胃採取後、これをリン酸緩衝液にて 3 回洗浄し、胃粘液層が十分に洗浄・除去されたことを肉眼的に確認した後にこれをホモジナイズして菌数を測定した。

実験結果

1. 各種漢方薬エキスの MIC

実験にあたり、各種漢方薬エキスが *in vitro* で Hp 増殖に及ぼす効果を、抗生物質感受性試験と同様に Mueller-Hinton 培地を用いて検討した。Hp の菌種としては臨床分離株 7 種、実験室株 1 種を用いた。また、漢方薬としては胃炎などに由来する上部消化管不定愁訴に対して既に効果が認められている 5 種の漢方薬を用いた。そ

Table I Minimum inhibitory concentration (MIC) of the Kampo medicines on the various *Helicobacter pylori* strains^{a)}

<i>H. pylori</i> strain	Cag A	VT ^{b)}	Anchu-san-ryou (安中散料) (75.8 %) ^{c)}	Shou-saiko-to (小柴胡湯) (72.0 %)	Hange-shashin-to (半夏瀉心湯) (85.0 %)	Oren-gedoku-to (黄連解毒湯) (76.6 %)	Rikkunshi-to (六君子湯) (79.2 %)
Clinical isolate 112	+	—	10	5	5	2.5	>10
124	+	+	10	5	5	2.5	>10
130	+	+	5	5	5	1.25	>10
132	—	+	10	5	5	2.5	>10
1101	—	—	2.5	1.25	2.5	0.63	>10
1107	nt ^{d)}	nt	10	5	5	2.5	>10
1029	+	+	2.5	1.25	2.5	0.63	>10
NCTC 11637	+	—	2.5	1.25	2.5	0.63	>10
Range of MIC			2.5~10	1.25~5	2.5~5	0.63~2.5	>10

(mg/ml)

a) Examined in 5 % horse-blood added Mueller-Hinton soft agar

b) vt ; vacuolating toxin

c) [(content solved in the water) / (Weight of the powder of Kampo medicine before filtration)] $\times 100$ (%)

d) nt ; not tested

の結果、黄連解毒湯は用いたすべての菌株について、その菌株の *Cag A* 遺伝子、VT 産生の有無に関わらず 0.63 ~ 2.5 mg/ml の範囲にて Mueller-Hinton 培地における Hp の増殖を阻止した (Table I)。一方、安中散料、小柴胡湯、半夏瀉心湯の各種 Hp 菌株に対する MIC はそれぞれ、2.5 ~ 10 mg/ml, 1.25 ~ 5 mg/ml, 2.5 ~ 5 mg/ml であり、黄連解毒湯に比し低い Hp 増殖阻止能を示した。また六君子湯には Hp 増殖阻止能は全く認められなかった。この実験で黄連解毒湯には Hp 増殖阻止能があることが示されたので、以後の実験はこの黄連解毒湯について、Hp 感染症に対する治療効果を詳細に検討した。また、以後の実験では Hp 菌種としては *Cag A* 遺伝子、VT 産生がともに陽性である #130 株を用いた。

2. 黄連解毒湯が Hp と胃上皮細胞との接着に及ぼす影響

Hp による感染症が成立する第一段階は Hp が胃上皮と接着することである。そこで、黄連解毒湯が Hp と胃上皮細胞との接着に及ぼす影響を調べた。その結果、予め黄連解毒湯添加培養液（黄連解毒湯濃度 0.32 ~ 1.25 mg/ml）で前培養していた胃上皮細胞 1×10^6 /ml と PKH2 標識 Hp 1×10^8 CFU/ml を反応させたところ、前培養液中の黄連解毒湯の濃度、および前培養の時間の長さに依存した胃上皮と Hp との接着阻害が観察された (Fig. 1)。

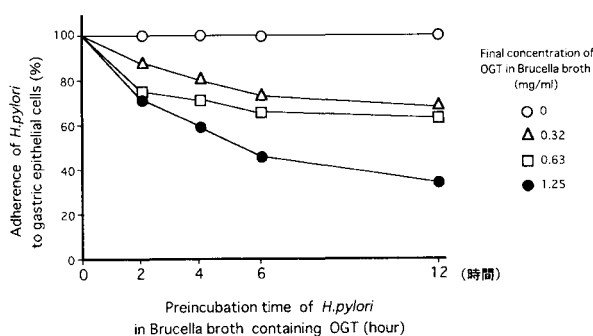


Fig. 1 Inhibitory effect of Oren-gedoku-to (OGT) on the adherence of *H. pylori* to gastric epithelial cells. *H. pylori* was cultured in Brucella broth containing various concentrations of OGT for 0-12 hours. Then, *H. pylori* was collected, and their activities to adhere to gastric epithelial cells was *in vitro* examined. Each symbol indicates the mean ($n=3-5$).

3. 黄連解毒湯 Hp ウレアーゼ活性に及ぼす影響

Hp が胃上皮に接着した後、胃壁に定着し生育するためにはウレアーゼが必須である。そこで次の実験では黄連解毒湯の Hp ウレアーゼ活性に及ぼす影響を調べた。黄連解毒湯を各種濃度で添加した Brucella broth に Hp

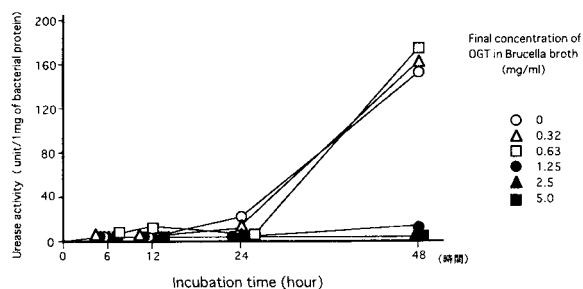


Fig. 2 Urease activity of *H. pylori*. *H. pylori* was cultured in Brucella broth containing various concentrations of OGT. At various hours after the incubation, *H. pylori* was collected, and their urease activity was measured. Each symbol indicates the mean ($n=3-5$).

#130 を 10^5 CFU/ml となるように接種して、培養し、経時的に菌体を採取し、菌体蛋白量あたりのウレアーゼ活性を調べた。その結果、Fig. 2 に示すように 1.25 mg/ml 以上の濃度で黄連解毒湯は培養開始 48 時間後の Hp のウレアーゼ活性を著明に抑制し、Hp の胃壁への定着を抑制することが観察された。

4. 黄連解毒湯の Hp 増殖に及ぼす影響

黄連解毒湯の Hp 増殖抑制効果を更に詳細に検討するために、黄連解毒湯を各種濃度で添加した Brucella broth に Hp #130 を 10^5 CFU/ml となるように接種し、培養後経時的に菌数を測定した。Fig. 3 に示すように、黄連解毒湯は Brucella broth においても Hp の増殖を阻止し 1.25 ~ 2.5 mg/ml の範囲では静菌効果を示し、5 mg/ml の濃度では殺菌的に働くことが観察された。

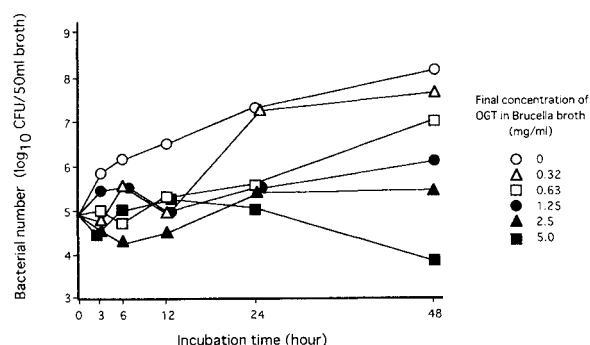


Fig. 3 Inhibition of *H. pylori* growth by OGT. Hundreds of thousands of *H. pylori* was cultured in Brucella broth containing various concentrations of OGT. At various hours after the incubation, *H. pylori* was collected, and their number was measured by the colony assay using a brain/heart infusion soft agar. Each symbol indicates the mean ($n=3-5$).

5. 黄連解毒湯の Hp 感染マウス胃内 Hp 菌数に及ぼす影響

黄連解毒湯は感染症成立のための要素である①細菌の接着・定着, ②細菌の増殖, ③組織傷害の三つの段階のうち初めの二つのステップを阻止し, 黄連解毒湯に Hp 除菌の効果があることが *in vitro* の上記の実験より示唆された。そこで, 次の実験では Hp 感染マウスを用いて, 黄連解毒湯の Hp 菌数に及ぼす影響を検討した。Hp #1301 $\times 10^9$ CFU を無菌 BALB/c マウスに連日 3 日間経口接種すると, 接種後 9 週以上経過しても胃内には約 10^5 CFU/胃組織 1g の Hp が存在する。¹¹⁾ この Hp 感染マウスに Hp 経口接種 5 週後より黄連解毒湯を連日経口投与し, 投与 2 週後の胃内の Hp 菌数を測定した (Fig. 4)。その結果, 10 mg/マウス投与群の Hp 菌数は $10^{4.6}$ CFU/g と黄連解毒湯非投与対照群の胃内菌数 ($10^{5.1}$ CFU) より有意に減少しており, 20 mg 投与群では胃内菌数 ($10^{3.6}$ CFU) は非投与群の菌数の 1/30 にまで低下していた。次に, 胃粘膜傷害に直接関与している胃上皮に定着している Hp 菌数を測定したところ, 黄連解毒湯非投与群, 10 mg/マウス投与群, 20 mg/マウス投与群ではそれぞれ, $10^{4.3}$ CFU, $10^{3.7}$ CFU, $10^{3.0}$ CFU/g であり, 胃上皮内定着菌数も黄連解毒湯投与により有意に低下していた。

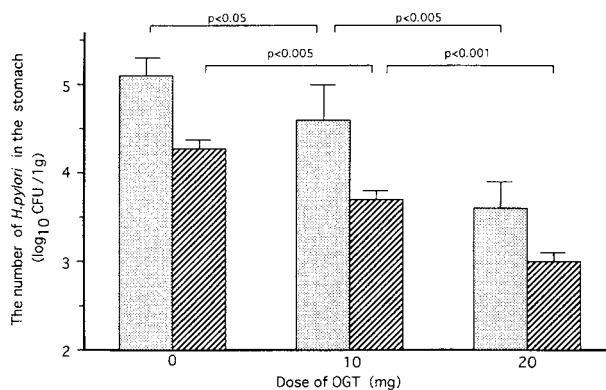


Fig. 4 The numbers of CFU of *H. pylori* in the stomach. Germfree BALB/c mice, which had been orally inoculated with 1×10^9 CFU of *H. pylori* 5 weeks before, were treated with OGT (10 mg, 20 mg; $n=10$ in each) everyday for 2 weeks. The day after the final treatment, the mice were sacrificed and the stomachs were harvested. The organs from 5 mice were assayed to measure the numbers of *H. pylori* in the whole stomachs including mucous layers (dotted column, $n=5$). The organs from other mice were thoroughly irrigated with phosphate buffer saline 3 times in order to exclude mucous layers, then the numbers of *H. pylori* attached to the gastric cells were measured (hatched column, $n=5$). Bars represent the standard errors. Statistical analysis was done using Student's *t*-test.

考 察

この研究で我々は胃炎などによる上部消化器症状に対して有効であるとされている五つの漢方薬 (安中散料, 小柴胡湯, 半夏瀉心湯, 黄連解毒湯, 六君子湯) について抗生物質の MIC 測定に準じた方法を用いて, まず Hp に対する抗菌効果のスクリーニングを行った。その結果, 黄連解毒湯に最も高い有効性が認められた為, 更に黄連解毒湯の Hp 感染症に対する薬剤としての妥当性, その作用機序を検討した。その結果, Fig. 5 に示すように Hp による感染症発症機序の始めのステップである Hp の胃粘膜への接着・定着, および Hp の胃粘膜での増殖を黄連解毒湯が阻止することが明らかとなった。最近, 黄連解毒湯をはじめとする漢方薬の Hp 除菌における有効性に関する論文も報告されているが, その殆どが *in vitro*,^{17,18)} あるいは臨床成績^{19,20)} に基づいた報告である。本研究では, 我々が作成した Hp 感染のマウスモデルを用いてさらに *in vivo* においても黄連解毒湯が有効であることを示し, Hp 感染症の発症機序からみた黄連解毒湯の作用機序の一部を明らかとした。しかしながら, この感染 Hp がどのようにして胃粘膜傷害を引き起こすかは未だ不明であり, この機構を解明し, これに黄連解毒湯がどのように関与するかが今後の課題として残っている。

感染症の成立は Fig. 5 に示すように, 病原微生物の標的細胞への接着・定着, 微生物の増殖, 標的細胞・臓器

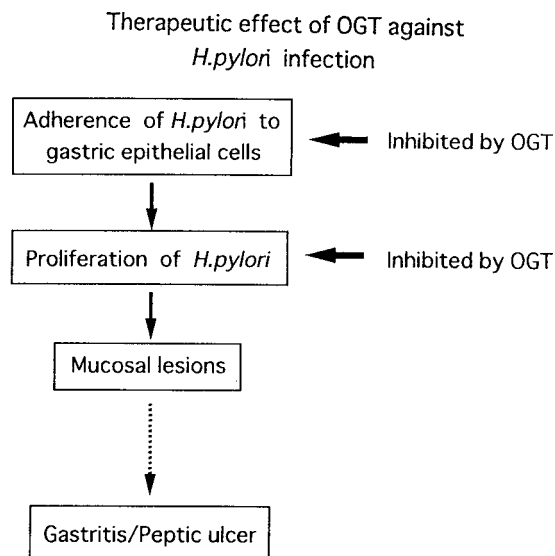


Fig. 5 Scheme demonstrating the action site of OGT in *H. pylori* infection. OGT inhibits the adherence of *H. pylori* to gastric epithelial cells and the proliferation of *H. pylori*.

の傷害, という段階からなる。これらの各ステップは微生物側因子と宿主側因子との相互関係により決定されるものであり, この二つの因子を考慮した動物モデルなくしては感染症の研究は不可能である。従って, Hp 感染症においても動物モデルなくしては病因の解明は不可能であり, 病因の解明なくしてはこれに対する薬剤の評価もありえない。胃上皮細胞上の Hp 感染レセプターとしては phosphatidylethanolamine,²²⁾ GM3 ガングリオシド,²³⁾ LewisB 抗原²⁴⁾ などが現在考えられている。これらの物質はいずれもヒト以外の動物の細胞上にも発現しており, 理論上は種々の実験動物にも Hp は感染しうると考えられていたが, 実際に感染した Hp 動物モデルとしては無菌ミニブタ, 無菌ビーグル犬, サルなどに限られていた。^{4, 7)} これらの動物では確かに感染は成立するが, 実験動物としては一般的ではなく, それ故, 感染症発症の大きな因子である宿主側因子の解析が非常に困難である。Hp 感染症発症に関与する宿主側因子の解析の目的では, 免疫学などの分野で最も一般的であり, 各種の抗体あるいは種々の生体側因子のアッセイ系が確立しているマウスを利用するのが最善の方法であることから, マウスへの Hp 感染実験が試みられた。Karita らはヌードマウスに Hp が感染することを報告した。⁹⁾ しかしヌードマウスは元来 T 細胞系を欠くマウスであるので Hp に対する生体側の反応を正しく把握することは困難と思われた。そこで SPF (specific pathogen free) マウスへの Hp への感染が試みられた。ところがこの SPF マウスへの Hp 感染は極めて困難であることが判明した。その中で, Marchetti らは臨床検体から SPF マウスの胃に定着する株を分離し,¹⁰⁾ 細菌株によっては SPF マウスにも定着が可能であることを示した。最近, 我々は SPF マウスに通常の Hp が接着・定着出来ない原因としてマウス腸管の細菌叢のなかの lactobacilli が Hp の胃上皮への接着・定着を阻止していることを明らかにし, 従って, lactobacilli をはじめとする消化管細菌叢が欠如している無菌 (germfree, GF) マウスには実験室株, 臨床分離株を問わず実験したすべての Hp の株が接着・定着し, アポトーシス等の胃粘膜傷害を引き起こすことを観察した。¹¹⁾ そこで, 本研究ではこの GF マウスを用いた Hp 感染モデルにて黄連解毒湯の Hp 除菌効果を明らかにした。

Hp 陽性の消化性潰瘍症例に対する Hp 除菌治療はすでに治療法として確立しているが, その薬剤の選択には今までも種々の変遷がみられる。従来より欧米でおこなわれているビスマス製剤を中心とした triple therapy²⁴⁾ (ビスマス, メトロニダゾール, テトラサイクリン) では高い除菌率は認められるものの下痢, ビスマスによる腎

障害, メトロニダゾールに対する耐性菌出現などがあり我が国で一般に用いられることはなかった。その後, 強い酸分泌抑制を示すプロトンポンプ阻害剤と抗菌剤 1 剤とを組み合わせた dual therapy が登場し, 更にこの dual therapy より除菌率をあげることを目指して dual therapy にさらに抗菌剤 1 剤, あるいはニトロイミダゾールを加えた new triple therapy が現在では検討されている。²⁵⁾ オメプラゾールに代表されるプロトンポンプ阻害剤は強い酸分泌抑制とともに, Hp に対する抗菌活性 (オメプラゾールの MIC₅₀: 12.5~200 µg/ml)²⁶⁾ および Hp が産生するウレアーゼの活性を阻害する²⁷⁾ ことから現在では Hp 除菌治療の中心薬剤となっている。従って, オメプラゾールと比べ, MIC は高いものの, 黄連解毒湯も同様の抗 Hp 活性, 抗ウレアーゼ活性をもっており, 従来の除菌治療法に黄連解毒湯を加えることにより, 除菌率の上乗せ効果は十分期待できるものと考えられる。

Hp に対する漢方薬の抗菌活性については今までにもいくつかの報告がある。寺田らは漢方薬の黄連解毒湯, 半夏瀉心湯, 生薬の黄連, 黄柏の MIC₅₀ を測定し, それぞれ 300, 1500, 50, 150 µg/ml であったと報告している。¹⁷⁾ 李らは同様の黄連解毒湯, 半夏瀉心湯, 黄連, 黄柏について MIC を測定しそれぞれ 4000, 4000, 125, 250 µg/ml であったと報告している。¹⁸⁾ また西澤らは黄連解毒湯, 黄連湯, 黄柏の MIC₅₀ を測定し, それぞれ 300, 500, 30, 100 µg/ml であったとし, 寺田らの報告と合致した結果を得ている。¹⁹⁾ 更に, 東田らは黄連解毒湯, 半夏瀉心湯の MIC₅₀, MIC₉₀ を測定し, それぞれ 2000, 4000 µg/ml 以上であり黄連, 黄柏, 大黃の MIC₉₀ はいずれも 800 µg/ml 以下であったと報告している。²⁰⁾ MIC 測定に用いられた菌種, 実験条件などによる差異はあるものの, これらの結果は本研究で得られた結果と同様黄連解毒湯に抗 Hp 作用があることを示しており, その機序として黄連解毒湯の主要構成生薬である黄連, 黄柏による除菌を示唆している。黄連・黄柏は主成分として berberin を含み, berberin やこれを主成分とするフェロペリンには黄色ブドウ球菌, 腸炎ビブリオ, キャンピロバクタに対する抗菌作用が報告されており,²⁸⁾ 黄連解毒湯による抗 Hp 活性は黄連・黄柏の主成分である berberin による核酸, 蛋白合成阻害によるものではないかと推察される。

一方, Imamura らは消化管疾患に用いられる 12 種の方剤エキスと 44 種の生薬エキスの Hp の増殖, ウレアーゼ活性に及ぼす効果を検討し, 方剤エキスは Hp の増殖, ウレアーゼ活性には影響を与えなかったが, 生薬エキスでは大黃, 生姜, 木香, 苦参, 石菖根, 阿仙薬, アロエ末, 山奈, 芍薬に 5 mg/ml の濃度で Hp 増殖抑制があり,

赤芽柏、楊梅皮に 0.125 mg/ml の濃度でウレアーゼ活性阻害効果があることを報告している。²⁹⁾ 単一の生薬として使用するのではなく、種々の生薬を組み合わせた方剤として使用する漢方薬の特性を生かし、本研究で用いた黄連解毒湯の構成生薬にさらに質的、量的改良を加えることにより、さらに優れた Hp 増殖抑制、ウレアーゼ活性阻害効果を持つ漢方薬が出来ることが期待されるのではなかろうか。

結 論

従来より黄連解毒湯が Hp の胃への接着・定着を抑制し、かつ Hp の増殖をも抑制することが報告されていたが、本研究ではこれを確認し、さらに、無菌マウスを用いた Hp 感染動物実験においても黄連解毒湯の経口投与により胃内の Hp 菌数が減少した。以上より黄連解毒湯は Hp 感染症に対して有効であり、その機序として、Hp の胃上皮への接着抑制、及び Hp の増殖の抑制が考えられた。

References

- 1) Warren, J.R. and Marshall, B.: Undefined curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1, 1273-1275, 1983.
- 2) Marshall, B.J. and Warren, J.R.: Undefined curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1, 1311-1314.
- 3) Marshall, B.J.: *Helicobacter pylori*. *Am. J. gastroenterol.* 89, S116-128, 1994.
- 4) Krakowka, S., Morgan, D.R., Kraft, W.G., and Leunk, R.D.: Establishment of gastric *Campylobacter pylori* infection in the neonatal gnotobiotic piglet. *Infect. Immun.* 55, 2789-2796, 1987.
- 5) Radin, M.J., Eaton, K.A., Krakowka, S., Morgan D.R., Lee, A., Otto, G., and Fox, J.: *Helicobacter pylori* gastric infection in gnotobiotic beagle dogs. *Infect. Immun.* 58, 2606-2612, 1990.
- 6) Euler, A.R., Zurenko, G.E., Moe, J.B., Ulrich, R.G., and Yagi, Y.: Evaluation two monkey species (*Macacamuratta* and *Macaca fascicularis*) as possible models for human *Helicobacter pylori* disease. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2285-2290, 1990.
- 7) Shuto, R., Fujioka, T., Kubota, T., and Nasu, M.: Experimental gastritis induced by *Helicobacter pylori* in Japanese monkeys. *Infect. Immun.* 61, 933-939, 1993.
- 8) Fujioka, T., and Kodama, R.: Animal model for chronic gastritis associated with *Helicobacter pylori* -long-term follow up study in *H.pylori* infected Japanese monkeys. in "*Helicobacter pylori* no saishin chiken" (Ed. Nihon Shoukaki-byou Gakkai) Nakayamaa Shoten, Tokyo, pp. 84-91, 1995.
- 9) Karita, M., Kouchiyama, M., Okita, K., and Nakazawa, T.: New small animal model for human gastric *Helicobacter pylori* infection: success in both nude and euthymic mice. *Am. J. Gastroenterol.* 86, 1596-1603, 1991.
- 10) Marchetti, M., Arico, B., Barroini, D., Figura, N., Rappuoli, R., and Ghiara, P.: Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* 267, 1655, 1995.
- 11) Kabir, A.M.A., Aiba, Y., Takagi, A., Kamiya, S., Miwa, T., and Koga, Y.: Prevention of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. *Gut* 41, 49-55, 1997.
- 12) Labentz, J. and Borsch, G.: Evidence for the essential of *Helicobacter pylori* in gastric ulcer disease. *Gut* 35, 19-22, 1994.
- 13) Marshall, B.J., Goodwin, C.S., and Warren, J.R.: Prospective double-blind trial of duodenal ulcer relapse after eradication of *Campylobacter pylori*. *Lancet* 2, 1437-1442, 1988.
- 14) Peek, Jr. R.M., Miller, G.G., Tham, K.T., Perez-Perez, G.I., Cover, T.L., Atherton, J.C., Dunn, D., and Blaser, M.J.: Detection of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa. *J. Clin. Microbiol.* 33, 28-32, 1995.
- 15) Kamiya, S., Kai, M., Ozawa, A., Kobayashi, H., Shirai, T., Harasawa, S., and Miwa, T.: Characteristics of vacuolating toxin produced by *Helicobacter pylori*. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 6 (suppl), 523-527, 1994.
- 16) Takebe, S., and Kobashi, K.: Acid urease from *Lactobacillus* of rat intestine. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 693-699, 1988.
- 17) Terada, S., Negayama, K., Kiuchi, K., Inaoka, Y., and Kasai, K.: Kanpo seizai no *Helicobacter pylori* ni taisuru koukin-kouka ni tsuite. *J. Medical. Pharmaceutic. Soc. WAKAN-YAKU.* 7, 276-277, 1990.
寺田総一郎, 根ヶ山清, 木内洋之, 稲岡義宣, 河西浩一: 漢方製剤の *Helicobacter pylori* に対する抗菌効果について. 和漢医薬学会誌 7, 276-277, 1990.
- 18) Li, S., Tada, M., Shiroishi, H., and Okita, K.: *Helicobacter pylori* ni taisuru Kanpo-seizai to shouyaku-ekisu no koukin kouka ni tsuiteno kentou. *Gastroenterology (Japan)* 15, 21-218, 1991.
李千, 多田正弘, 白石裕美, 沖田極: *Helicobacter pylori* に対する漢方製剤と生薬エキスの抗菌効果についての検討. 消化器科 15, 21-218, 1991.
- 19) Nishizawa, Y., Nishizawa, Y., Yoshioka, F., Nosaka, S., Nagano, F., Amakata, Y., and Fushiki, S.: The effect of eradication of *Helicobacter pylori* in *Helicobacter pylori* infected patients with gastric ulcer by Oren-gedoku-to. *Rinshou-Shoukaki Naika* 12, 1163-1172, 1997.
- 20) Tohda, G., Kane, T., Suzuki, C., Kosaka, S., Takahashi, T., Okuno, T., and Ishizaki, T.: The effect of a Kanpo formula in combination with Amoxicillin and Omeprazole in Eradicating *Helicobacter pylori*. *Nippon Toyo Igaku Zasshi (Jap. J. Oriental Med.)* 47, 803-812, 1997.
- 21) Gold, B.J., Hueca, M., Sherman, P.M., and Lingwood, C.A.: *Helicobacter mustelae* and *Helicobacter pylori* bind to common lipid receptors in vitro. *Infect. Immun.* 61, 2632-2638, 1993.
- 22) Slomiany, B.L., Pitrowaki, J., Samanta, A., VanHorn, K., Mutry, V.K.N., and Slomiany, A.: *Campylobacter pylori* colonization factor shown specificity for lactosylceramide sulfate and GM3 ganglioside. *Biochem. Intern.* 19, 929-936, 1989.
- 23) Boren, T., Falk, P., Roth, K.A., Larson, G., and Normark, S.: Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* 262, 1892-1895, 1993.
- 24) Chiba, N., Rao, B.V., Rademaker, J.W., and Hunt, R.H.: Meta-analysis of the efficacy of antibiotic therapy in eradicating *Helicobacter pylori*. *Am. J. Gastroenterol.* 87, 1716-1727, 1992.
- 25) Takimoto, T., Sato, K., and Kimura, K.: *Helicobacter pylori* no jokin-senryaku. In "*Helicobacter pylori* -Saishin-chiken karano houkou" (Ed. Harasawa, S., and Takahashi, S.) Iyaku-Journal, Osaka, pp. 214-220, 1996.

- 瀧本拓哉, 佐藤貴一, 木村健: *Helicobacter pylori* の除菌戦略, 「ヘリコバクター・ピロリー最新知見からの報告」(原澤茂, 高橋信一編), 医薬ジャーナル社, 大阪, pp. 214-220, 1996.
- 26) Fujioka, T., and Kubota, T.: *In vitro* activity of proton pump inhibitors against *Helicobacter pylori* and their clinical use for eradication therapy. in "*Helicobacter pylori* no saishin chicken" (Ed. Nihon Shoukaki-byou Gakkai) Nakayama Shoten, Tokyo, pp. 279-286, 1995.
- 27) Nagata, K., Satoh, H., Iwaki, T., Shimoyama, T., and Tamura, T.: Potent inhibitory action of the gastric proton pump inhibitor Lansoprazole against urease activity of *Helicobacter pylori*: Unique action selective for *H. pylori* cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**, 769-774, 1993.
- 28) Inoue, Y., Ashihara, R., and Taguchi, M.: Ferroberin A no koukin-kassei ni kansuru kenkyuu. *Kiso to Rinshou* **27**, 1739-1751, 1993. 井上喜雄, 葦原利衣, 田口雅裕: フェロベリン A の抗菌活性に関する研究. 基礎と臨床 **27**, 1739-1751, 1993.
- 29) Imamura, L., Tsuchiya, M., Inada, A., Nakanashi, T., and Kobashi, K.: Inhibition of urease and growth of *Helicobacter pylori* by herb extracts. *J. Traditional Medicines* **12**, 129-136, 1995.