

学 位 論 文 題 名

Antibacterial Activity of Plaunotol, a Cytoprotective
Antiulcer Agent, against *Helicobacter pylori*

(粘膜防御系抗潰瘍剤プラウノトールの *Helicobacter pylori* に対する抗菌作用)

学位論文内容の要旨

胃潰瘍の発生機序は胃粘膜に対する攻撃因子と防御因子のバランスの失調によると考えられていた。1983年に Warren と Marshall が胃炎患者の胃前庭部粘膜から *Helicobacter pylori* を分離・同定して以来、本菌と胃炎や胃潰瘍との関連が疑われるようになった。*H. pylori* 感染の関与が注目されるに至った理由は、その除菌によって胃・十二指腸潰瘍の再発が抑制されたことにある。米国国立衛生研究所は *H. pylori* の除菌について、「*H. pylori* 陽性の消化性潰瘍の治療には初発、再発を問わず、酸分泌抑制剤と抗生剤との併用が必要である」と勧告した。本菌を除菌することは非常に難しく、臨床では抗生剤2剤あるいは3剤併用で治療が試みられている。従って、副作用の少ない優れた抗 *H. pylori* 剤の開発が望まれている。近年、抗潰瘍剤の中に本菌に対して抗菌作用を示すものがあることが明らかとなった。プラウノトールはタイ国産の植物の葉より得られる非環状ジテルペン系の粘膜防御系の胃炎・胃潰瘍治療剤である。本剤にも抗 *H. pylori* 作用があると推定される。

このように本菌が注目を集めたにもかかわらず、動物実験の難しさから本菌に関する研究は遅れていた。最近になってヌードマウスを用いて本菌の病原性の解析あるいは本菌に対する薬剤の治療効果の評価が可能になった。

本研究は、従来から抗潰瘍剤として使用されていたプラウノトールが *H. pylori* に対して抗菌作用を持つことを見だし、その作用点を検討し、さらに動物モデルを用いて本剤の治療効果の評価を試みたものである。

1. 粘膜防御系薬剤の *H. pylori* に対する抗菌活性

市販されているプラウノトールおよび同系のテプレノン、ベネキサート、ソファルコン、セトラキサート、ゲファルナートの *H. pylori* に対する抗菌活性を比較した。これらの薬剤の中では、プラウノトールが最も優れた抗菌活性を示した。そこで次に *H. pylori* に対するプラウノトールの殺菌効果を調べた。対数増殖期の菌を、リン酸緩衝液に約 10^7 CFU/ml になるように調製し、これにプラウノトールを添加した。本剤の 6 μ g/ml 添加により 30 分以内に、また 12 μ g/ml では 10 分以内に濁度の減少に伴って生菌数が減少した。この条件下で走査型電子顕微鏡を用いて菌の形態変化を観察したところ、菌体の萎縮並びに内容物の遊出像が認められた。また他の細菌に対するプラウノトールの殺菌効果を検討したところ、グラム陽性菌と界面活性剤や脂肪酸などに感受性を示す一部のグラム陰性菌 (*Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*) に対して殺菌効果を示した。

2. プ라우ノトールの *H. pylori* に対する殺菌作用の機序

プラウノトールが *H. pylori*、グラム陽性菌およびある種のグラム陰性菌に対して短時間に殺菌作用を示し、電子顕微鏡観察により菌体の萎縮および溶菌が認められたことから、プラウノトールは細菌細胞膜に作用するものと推察された。そこで *H. pylori* 細胞膜の主要なリン脂質であるフォスファチジルエタノールアミンとカルジオリピンでリポソームを作り、プラウノトールの殺菌作用が阻害されるか否かを検討した。その結果、リポソーム 2.5 μ g/ml の濃度で殺菌作用は 100% 阻害された。更にプラウノトールとその疎水性が異なる誘導体 (M-4, M-5, M-6) の殺菌作用を検討した。殺菌作用はプラウノトール、M-6、M-5、M-4 の順に強く、疎水性の強さと一致した。更にリン脂質に対するプラウノトールの作用を調べるために、グルコースを封入したリポソームからのグルコースの遊出量を測定した。このリン脂質に対する作用の強さもまた、プラウノトール、M-6、M-5、M-4 の順であった。これらのことよりプ

ラウノトールの殺菌作用と抗菌作用は *H. pylori* の細胞膜リン脂質に対する作用に起因することが示唆された。

次に、*H. pylori* 細胞膜に対するプラウノトールの作用メカニズムを検討するため、細胞膜の透過性の変化を本剤作用後の *H. pylori* 菌体から遊出する物質量を測定することにより調べた。菌体からの遊出物はプラウノトールの濃度に応じて増加した。細胞膜の流動性について電子スピン共鳴法で測定したところ、薬剤濃度に応じて流動性が上昇した。これらの成績はプラウノトールの作用によって菌体膜の透過性が上昇し、細胞内容物が流出する結果、細菌細胞が死ぬものと推察された。

3. ヌードマウスを用いた *H. pylori* 感染系に対するプラウノトールの治療効果

絶食させたヌードマウスに *H. pylori* を経口感染させ、長期間胃に定着する感染モデルを確立した。この感染系を用いて臨床で用いられている抗生剤（アモキシシリン、クラリスロマイシン）の治療効果を検討したところ、投与量に応じて胃内の生菌数が減少した。またプラウノトールが抗潰瘍作用を示す量において有意に胃内の生菌数を減少させた。次にプラウノトールと抗生剤との併用効果を検討した。*In vitro* でプラウノトールとアモキシシリンあるいはクラリスロマイシンとの併用によって抗菌活性の相加あるいは相乗効果が認められた。動物モデルにおいて抗生剤単剤では菌数の減少が観察されない薬剤量にプラウノトールを併用すると、無治療群に比べて有意に胃内菌数が減少した。このように *in vivo* でもプラウノトールと抗生剤の相加作用が認められた。

以上のことから、プラウノトールは *H. pylori* に対して抗菌力を持ち、細胞膜の透過性を上昇させることにより、細菌細胞を死に至らしめることが示唆された。また、ヌードマウスを用いた実験系で胃内の細菌数を減少させる効果を示し、*in vitro* と *in vivo* で抗生剤との併用効果が観察された。以上の成績は胃潰瘍の治療にプラウノトールと抗生剤を併用することの意義を支持するものである。

学位論文審査の要旨

主査	教授	喜田	宏
副査	教授	斉藤	昌之
副査	教授	高島	郁夫
副査	助教授	杉本	千尋

学位論文題名

Antibacterial Activity of PlauNOTOL, a Cytoprotective Antiulcer Agent, against *Helicobacter pylori*

(粘膜防御系抗潰瘍剤プラウノトールの *Helicobacter pylori* に対する抗菌作用)

胃潰瘍の発生に *Helicobacter pylori* 感染が関与すると考えられている。*H. pylori* の除菌により胃・十二指腸潰瘍の再発が抑制されるからである。従って、臨床では *H. pylori* 陽性の消化性潰瘍の治療に、酸分泌抑制剤と抗生物質の併用が試みられている。しかし、本菌を完全に除去することが困難であるため、副作用の少ない優れた抗 *H. pylori* 剤の開発が望まれている。

本研究は、非環状ジテルペン系の粘膜防御系の胃炎・胃潰瘍治療剤であるプラウノトールが *H. pylori* に対して抗菌作用を持つことを見出し、次にその作用機序を解析し、さらに動物モデル系を確立して本剤の治療効果の評価を試みたものである。

プラウノトールおよび同系のテプレノン、ベネキサート、ソファルコン、セトラキサート、ゲファルナートの *H. pylori* に対する作用を調べた結果、プラウノトールが最も低濃度で溶菌を起こすことが判明した。*H. pylori* 細胞膜の主要なリン脂質であるフォスファチジルエタノールアミンとカルジオリピンで調製したリポソームがプラウノトールの殺菌作用を効果的に阻害したことから、プラウノトールは *H. pylori* の細胞膜リン脂質に作用するものと推定した。プラウノトールの *H. pylori* 細胞膜に対する作用機序の解析により、本剤が細胞膜の透過性と流動性を上昇させるため、細胞内容物が流出し、*H. pylori* 細胞が死に至るものと解された。

絶食させたヌードマウスに *H. pylori* を経口感染させ、本菌が胃に定着するモデル系を確立した。この感染系を用いて、抗生物質アモキシシリンおよびクラリスロマイシンの治療効果を検討したところ、投与量に応じて胃内の生菌数が減少した。プラウノトールは抗潰瘍作用を示す量で胃内の生菌数を減少させた。さらに、プラウノトールと抗生物質との併用により、*in vitro* で抗菌活性の相加あるいは相乗効果が認められた。動物モデル系において抗生物質のみでは菌数を減少させない量でもこれにプラウノトールを併用すると、胃内菌数が減少した。

以上の成果はプラウノトールに抗 *H. pylori* 活性があり、その作用機序は菌細胞膜

の透過性を上昇させることによる殺菌であることを明らかにするとともに、胃潰瘍の治療に本剤と抗生物質を併用することの意義を支持するものである。よって審査員一同は古賀哲文氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格を有するものと認めた。