胃粘膜保護因子増強剤および各種抗菌剤の ヘリコバクター・ピロリに対する抗菌作用

成川新一・柳川 明・堀 誠治・嶋田基五郎・水島 裕*

Effect of anti-ulcer terpenes and some antimicrobial agents on the growth of Helicobacter pylori

The effect of anti-ulcer agents, some antimicrobial agents and synthetic dyes on the growth of *Helicobacter pylori* was studied using 21 strains of our isolates and the standard strain of *H. pylori* NCTC 11638. The oldest orally active beta-lactam, penicillin V and recently developed macrolide, roxithromycin inhibited the growth at remarkably low concentrations, but the activities of two new quinolones were moderate. Also methylene blue showed moderate inhibitory activity but indigo carmine did not. Among the cytoprotective anti-ulcer agents, sucralfate showed no inhibitory activity, whereas the two terpenoid anti-ulcer agents, plaunotol and teprenone inhibited the growth, suggesting the possibility that the anti-*H. pylori* activity participates in the mode of action. The hypothesis is supported by the fact that plaunotol exerted bactericidal action even when contacted for 3 h at its minimal inhibitory concentration.

Shinichi Narikawa・Akira Yanagawa・Seiji Hori・
Jingoro Shimada・Yutaka Mizushima*

key words: *Helicobacter pylori*, penicillin V, roxithromycin, plaunotol, teprenone

Warren ならびに Marshall により発見された *Helicobacter pylori*¹⁾ (*H. pylori*) は、ヒトに慢性胃炎や消化性潰瘍を起こさせる病原菌として注目を集めている。ことに、胃粘膜病変と *H. pylori* の関連性については、*H. pylori* が胃幽門前庭部に特異的に見出されるグラム陰性細菌²⁾ であること、胃炎・消化性潰瘍などの胃粘膜から高率に検出されること³⁾ などから、強くその発症に係わっていることが考えられてきた⁴⁻⁶⁾。

一方、こういった *H. pylori* の駆除を目的として、βラクタム系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質、マクロライド系抗生物質、そしてニューキノロン系抗菌剤⁷⁾ などが使用されているものの、その駆除効果は疑問視されている。また、

H. pylori に対し弱い抗菌活性しか示さないビスマス塩と抗菌剤を組み合わせて経口投与すると、*H. pylori* 駆除に有効であり、完全に駆除された状態がつづく限り潰瘍の再発が起こりにくいと報告されている⁸⁾。強力な抗菌剤がなぜ胃に定着した *H. pylori* を駆除できないのか、その理由は明らかではない。

筆者らは、いわゆる胃粘膜防御因子増強剤と称される抗潰瘍剤が、胃粘膜の保護作用とともにその作用機作の一つとして *H. pylori* の増殖を抑制することにより、上部消化管の炎症を治癒に導く可能性があると推定した^{9a, b)}。それらの化合物に加え、駆除効果が期待できる種々の化合物を選定し、*H. pylori* に対する抗菌活性を MIC(最小発育阻止濃度)測定法により検討した。

材料と方法

(1) 検体からの菌分離および同定

被験菌は、聖マリアンナ医科大学病院において胃炎ならびに消化性潰瘍患者から内視鏡的生検法により胃粘膜を採取し、Skirrow 培地を用いた微好気性培養により分離した¹⁰⁾。性状検査は Itoh らの方法¹¹⁾ で実施し、別個の患者から分離された総計 21 株(*H. pylori* SM 1~21) および標準株 *H. pylori* NCTC 11638 株を被験菌とした。

(2) 使用培地および培養法

各被験菌は、brain heart infusion agar (Difco) に 7% ウマ血液、0.25% 酵母エキス(Difco)を加えて作成した平板培地に接種し、嫌気ジャー内で *H. pylori* 培養に至適とされる 6% O₂, 10% CO₂, 84% N₂ の組成を持つ混合ガスを調製し、高湿度下に 37°C, 72時間培養した¹⁰⁾。

(3) 薬剤の溶解方法

plaunotol (商品名: ケルナック) は、ブラウノイ抽出精製油の plaunotol として 20 mg 相当を 1 ml の dimethyl sulfoxide¹²⁾ に溶解し、リン酸緩衝食

* Institute of Medical Science, St. Marianna University School of Medicine, 2-16-1 Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki 216, Japan 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター

表 1 Susceptibility of 22 strains of *Helicobacter pylori* to beta-lactam antibiotics

agents used	No. of strains inhibited at concentrations shown below ($\mu\text{g/ml}$)								
	≤ 0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	>12.5
penicillin V	0	6*	6	2	5	2	1	0	0
cefaclor	0	0	2	10*	5	0	1	4	0

A total of 21 strains of clinical isolates and the standard strain *H. pylori* NCTC 11638 were used. The asterisk shows including the standard strain.

表 2 Susceptibility of 22 strains of *Helicobacter pylori* to new quinolones

agents used	No. of strains inhibited at concentrations shown below ($\mu\text{g/ml}$)										
	≤ 0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100
norfloxacin	0	0	0	0	2*	16	3	0	0	1	0
ofloxacin	0	1	3*	13	4	0	0	1	0	0	0

A total of 21 strains of clinical isolates and the standard strain *H. pylori* NCTC 11638 were used. The asterisk shows an inclusion of the standard strain.

表 3 Susceptibility of 22 strains of *Helicobacter pylori* to macrolide antibiotics

agents used	No. of strains inhibited at concentrations shown below ($\mu\text{g/ml}$)						
	≤ 0.025	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	≥ 1.56
erythromycin	0	2	0	9*	9	2	0
roxithromycin	0	14*	4	2	2	0	0

A total of 21 strains of clinical isolates and the standard strain *H. pylori* NCTC 11638 were used. The asterisk shows an inclusion of the standard strain.

塩水(PBS) 9 ml で希釈して原液(2,000 $\mu\text{g/ml}$)とした。teprenone(商品名：セルベックス)は、20mg を dimethyl sulfoxide に溶解し、0.1% Tween 80 加 PBS 9 ml を加えて原液(2,000 $\mu\text{g/ml}$)とした。sucralfate, 蔗糖硫酸エステル・アルミニウム塩(商品名：アルサルミン)は水に難溶なので、それにかえて水に対する溶解性が高い蔗糖硫酸エステル・ナトリウム塩 20 mg を 1 ml の 20% 食塩水溶液に溶解し、PBS 9 ml を加えて原液(2,000 $\mu\text{g/ml}$)とした。

(4) MIC 測定法

各薬剤の MIC は、日本化学療法学会の寒天平板希釈法¹³⁾に従い測定した。培養菌は、brain heart infusion (Difco) に McFarland No. 2 の濁度になるように懸濁させ(約 10^8 colony-forming units/ml), この菌液の 5 μl ずつをマルチイノキュレーター(佐久間製作所)を用いて、2 倍段階希釈の薬剤添加平板培地に接種した¹⁰⁾。培地と培養

法は前述と同一とし、被験菌の発育を阻止した各薬剤の最小濃度を判定した¹³⁾。

結 果

(1) β ラクタム系抗生剤の MIC(表 1)

penicillin V の MIC は、いずれの菌株に対しても 0.1~3.13 $\mu\text{g/ml}$ の感受性を示し、MIC の中央値は 0.2 $\mu\text{g/ml}$ であった。cefaclor の MIC は、0.2~6.25 $\mu\text{g/ml}$ の感受性を示し、中央値は 0.39 $\mu\text{g/ml}$ であった。

(2) ニューキノロン剤の MIC(表 2)

norfloxacin と ofloxacin の両剤に共通の耐性株がみられた。その他の菌株はニューキノロン剤感受性で、norfloxacin は MIC 1.56~6.25 $\mu\text{g/ml}$ で中央値は 3.13 $\mu\text{g/ml}$, ofloxacin は MIC 0.2~1.56 $\mu\text{g/ml}$ で中央値は 0.78 $\mu\text{g/ml}$ であった。

(3) マクロライド系抗生物質の MIC(表 3)

erythromycin の MIC は 0.05~0.78 $\mu\text{g/ml}$ の

表 4 Susceptibility of 22 strains of *Helicobacter pylori* to methylene blue and indigo carmine

agents used	No. of strains inhibited at concentrations shown below ($\mu\text{g/ml}$)				
	≤ 25	50	100	200	> 200
methylene blue	0	3*	14	5	0
indigo carmine	0	0	0	0	22

A total of 21 strains of clinical isolates and the standard strain *H. pylori* NCTC 11638 were used. The asterisk shows an inclusion of the standard strain.

表 5 Susceptibility of 22 strains of *Helicobacter pylori* to anti-ulcer agents

agents used	No. of strains inhibited at concentrations shown below ($\mu\text{g/ml}$)								
	≤ 6.25	12.5	25	50	100	200	400	800	> 800
plaunotol	0	7	15*	0	0	0	nt**	nt	nt
teprenone	0	0	0	0	4*	5	9	2	2
sucralfate	0	0	0	0	0	0	0	0	22*

A total of 21 strains of clinical isolates and the standard strain *H. pylori* NCTC 11638 were used. The asterisk shows an inclusion of the standard strain.

** nt : not tested.

表 6 Effect of contact period on the bactericidal activity of anti-ulcer terpenes against *Helicobacter pylori*

strains tested	incubation time (hr)	relative viable cell counts (% of control)										
		drug free control	plaunotol ($\mu\text{g/ml}$)					teprenone ($\mu\text{g/ml}$)				
			25	50	100	200	400	100	200	400	800	1600
SM7*	0	1.32×10^4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	3	1.08×10^4	0	0	0	0	0	24.1	22.2	7.4	5.6	3.7
	24	1.60×10^3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NCTC 11638**	0	3.92×10^4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	3	3.40×10^4	0	0	0	0	0	11.7	5.9	5.9	5.9	5.9
	24	7.80×10^3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

The relative viable cell counts were represented as follows; the numbers of colony forming units/ml in the presence of drug/ the numbers of colony forming units of the corresponding drug free controls.

*: The clinical isolate of our laboratory. **: The standard strain of *H. pylori*. The MICs for both strains are 25 $\mu\text{g/ml}$ for plaunotol and 100 $\mu\text{g/ml}$ for teprenone.

感受性を示し、中央値は 0.29 $\mu\text{g/ml}$ であった。roxithromycin の MIC は、0.05~0.78 $\mu\text{g/ml}$ 、中央値 0.05 $\mu\text{g/ml}$ の感受性を示した。

(4) 色素剤の MIC(表 4)

本試験に使用した 22 株の *H. pylori* は、すべてが indigo carmine 耐性で 200 $\mu\text{g/ml}$ の indigo carmine 添加培地に生育したが、methylene blue を 50~100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で添加した培地では、すべての菌株が生育を阻止され、中央値は 50 $\mu\text{g/ml}$ であった。

(5) 防御系消化器用薬の MIC(表 5)

テルペン系の plaunotol と teprenone は、*H. pylori* に対し抗菌活性を示し、前者の MIC は 12.5~25 $\mu\text{g/ml}$ 、後者のそれは 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上で 800 $\mu\text{g/ml}$ でも阻止されない菌株が 2 株あり、中央値は 400 $\mu\text{g/ml}$ であった。sucralfate は、200 $\mu\text{g/ml}$ でも *H. pylori* の生育をまったく阻止しなかった。この試験で明らかになったことの一つに、テルペン系薬剤の溶血性がある。teprenone と sucralfate は、寒天平板培地に添加したウマ脱

繊維血液の赤血球に対して溶血性を示さなかったが、plaunotol は 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で 3 日間培養したあとには、すべての平板で完全溶血がみられた。

(6) 殺菌に及ぼす接触時間の影響(表 6)

H. pylori 2 菌株を用い、MIC 濃度の plaunotol と teprenone に一定時間接触させ、殺菌効果を検討した。その結果、plaunotol は MIC 濃度で 3 時間接触させただけで両菌株を完全に死滅させたが、teprenone が MIC 濃度で菌を完全に死滅させるには、3 時間以上 24 時間以内の時間が必要であった。

考 察

今回試験した薬剤は、経口投与用の抗生物質と合成抗菌剤、色素および胃粘膜防御因子増強剤である。*H. pylori* 感染により惹起される病態と直接の関係有する胃粘膜防御因子増強剤は、テルペン系に属する plaunotol と teprenone、および蔗糖硫酸エステル・アルミニウム塩の sucralfate である。このなかで sucralfate は、すでに McNulty¹⁴⁾ が報告しているように、MIC が 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で *H. pylori* の増殖を抑制する作用は認められなかった。また、色素 indigo carmine も *H. pylori* に対する抗菌活性は認められなかったが、Shigeda らの報告¹⁵⁾と同様に、methylene blue には中程度の抗菌効果が確認された。一方、抗生物質およびニューキノロン系抗菌剤は、いずれも強力ないし中程度の抗菌活性を示した。とりわけ、 β ラクタム系のなかでももっともふるい経口剤である penicillin V と最新のマクロライド、roxithromycin が低濃度で生育を阻止したことは、注目値する。

しかし、経口投与した抗菌剤が、厚い粘液に被覆された胃粘膜上皮に生息する *H. pylori* を完全に短期間で駆除することはきわめてむずかしい。したがって、MIC が本菌感染症に対する治療効果を的確に予知させる指標にならない点に問題がある。

二つのテルペン系薬剤は、4 個のメバロン酸を前駆物質とする直鎖ジテルペンに属している。今回は試験を見送った gefarnate(商品名: ゲファニール)も、前二者と構造上の類似性があり、直鎖のジテルペンアルコールに 1 個のイソプレニ単位

がエーテル結合した構造を持っている。したがって、これらのテルペン系胃粘膜防御因子増強剤は、共通の作用機作を持っていることが推定される。今回の実験における MIC および接触による殺菌効果からみて、plaunotol および teprenone は、*H. pylori* が感受性と判定される抗菌活性を有している。*in vitro* では plaunotol は teprenone より *H. pylori* の増殖を強く阻害し、菌を死滅させるために必要な時間も短かった。

ただし、これをもって plaunotol のほうが teprenone より抗菌活性が強いと即断することは禁物である。この種の水に不溶の化合物は、培地中に共存する界面活性物質、蛋白質などにより抗菌活性を変動させるからである。一方、plaunotol の MIC が、ウマ赤血球に対し溶血性を示す濃度と接近していることは、抗菌力が溶血性、すなわち、界面活性作用による非特異的な生体膜破壊作用に由来する可能性があることを示唆している。

胃粘膜上皮は hydrophobic な分厚い粘液層で被覆されているので、hydrophilic な低分子化合物が多量に粘液を浸透し、粘膜上皮に到達することは困難と考えられている。したがって、hydrophilic な経口投与用抗菌活性物質が、胃内で粘液層を透過して *H. pylori* が定着増殖している粘膜局所まで到達し、一定時間滞留することはむずかしいと推定される。まして、*H. pylori* が増殖しているのは、胃粘膜上皮に無数に存在する胃小窩である。多くの抗菌活性物質が *H. pylori* を胃内から完全に駆除できない理由は、抗菌剤耐性に変異しやすいという本菌の性質¹⁶⁾もさることながら、粘液層が障壁となって、十分な量の薬剤が感染局所へ到達できないためと思われる¹⁷⁾。

ジテルペン系の胃粘膜防御因子増強剤は、用法が経口であり、胃内へは投与された全量が流入する。しかも、これらの薬物は hydrophobic であるから、胃内で微細なエマルジョンとなって分散すると仮定すると、相当量が疎水性の胃粘液層を透過し、*H. pylori* 感染局所と直接接触するであろう。したがって、ジテルペン系薬物の作用機作は、*H. pylori* に対する抗菌活性が一端を担っている可能性は否定できない。

ジテルペン系薬物に対し *H. pylori* が感受性と判断される理由は、用法が経口であるため感染局所の濃度が血中濃度を基準とするときよりも高い

価に到達すると考えられるからである。その限界値⁷⁾を明らかにするために、今後の研究が待たれる。これらの薬物について粘液透過性およびその結果としての粘膜上皮における濃度を測定することは、作用機作を推定するうえできわめて有用と予測される。

文 献

- 1) Warren, J.R., Marshall, B.: Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1: 1273, 1983.
- 2) Jones, D.N., Curry, A., Fox, A.J.: An ultrastructural study of the gastric *Campylobacter*-like organism "*Campylobacter pyloridis*". *J. Med. Microbiol.* 131: 2335-2341, 1985.
- 3) Chen, X.G., Correa, P., Offerhaus, J., et al.: Ultrastructure of the gastric mucosa harbouring *Campylobacter*-like organisms. *Am. J. Clin. Pathol.* 86: 575-582, 1986.
- 4) Leunk, R.D., Johnson, P.T., David, B.C., Kraft, W.C., Morgan D.R.: Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* 26: 93-100, 1988.
- 5) Hazell, S.L., Lee, A.: *Campylobacter pyloridis*, urease, hydrogen ion back diffusion, and gastric ulcer. *Lancet* 2: 15-17, 1986.
- 6) Morris, A., Nicolson, G.: Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. *Am. J. Gastroenterol.* 82: 192-199, 1987.
- 7) Goodwin, C.S., Blake, P., Blincow, E.: The minimum inhibitory and bactericidal concentrations of antibiotics and anti-ulcer agents, against *Campylobacter pyloridis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 17: 309-314, 1986.
- 8) Rauws, E.A.J., Tytgat, G.N.J.: Cure of duodenal ulcer associated with eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 335: 1233-1235, 1990.
- 9a) Andersen, L.P.: Cytoprotective agents and *C. pylori* associated acid peptic diseases. *Scand. J. Gastroenterol.* 23(suppl. 142): 110-113, 1988.
- 9b) Kondo, I., Nagata, T., Numata, K., et al.: The *in vitro* antibacterial activity of sofalcone, an antiulcer drug, against *Campylobacter pylori* (abstract 46)., presented at the First Meeting of the European *Campylobacter pylori* Study Group, Bordeaux, France, October 1988.
- 10) 成川新一・他: *Campylobacter pylori* 用寒天平板培地の検討. *臨床病理* 38(1): 104-106, 1990.
- 11) Itoh, T., et al.: Isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa and characterization of the isolates. *Microbiol. Immunol.* 31: 603-614, 1987.
- 12) 医科学研究所学会・編: 抗菌作用の測定法, 細菌学実習提要, 改訂5版, 丸善, 1976, p 367-377.
- 13) 日本化学療法学会委員(責任者, 三橋 進): 最小発育阻止濃度(MIC)測定法, 再改訂について, *Chemotherapy* 29: 76-77, 1981.
- 14) McNulty, C.A.M.: Treatment of *C. pylori* infection: microbiological viewpoint. *Campylobacter pylori* in gastric and peptic ulcer disease. (ed. Blaser, M.J.), Igakushoin, New York/Tokyo, 1989, p 195-207.
- 15) Shigeeda, M., et al.: The significance of methylene blue on anti-*Campylobacter pylori* agent. Proceedings of the 2nd Tokyo International Symposium on *Campylobacter pylori*, Taisho Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, 1990, p 280-285.
- 16) Goodwin, C.S., Marshall, B.J., Blincow, E.D., et al.: Prevention of nitroimidazole resistance in *Campylobacter pylori* by coadministration of colloidalbismuth subcitrate: Clinical and *in vitro* studies. *J. Clin. Pathol.* 41: 207-210, 1988.
- 17) Buck, G.E., Gourley, W.K., Lee, W.K., et al.: Relation of *Campylobacter pyloridis* to gastritis and peptic ulcer. *J. Infect. Dis.* 153: 664-669, 1986.