

ピロリ菌感染に及ぼすココアの影響

神谷 茂 (杏林大学医学部教授)

1. はじめに

胃炎・胃十二指腸潰瘍さらには胃癌との関連があるといわれて非常に注目されているヘリコバクター・ピロリ感染（以下ピロリ菌）におよぼすココアの効果についてお話したいと思う。さらに後半ではO157病原性大腸菌に対する効果についても若干のデータがあるので報告する。

“科学の分野では幸運は準備の出来ているヒトだけに訪ねる。” (パスツール)

2. ピロリ菌の発見の歴史

ピロリ菌の発見の歴史をみると、この言葉が本菌発見の裏話を忠実に示しているものと思われる。オーストラリアの病理学者ウォーレンと消化器病を専門とするマーシャルが1983年に本菌を発見した。彼らは慢性胃炎患者の胃の粘膜には必ず細菌が存在することを信じて、まず研究費(グラント)をオーストラリア政府から獲得し、とにかく100例の患者の胃粘膜からのサンプルを培養するということを決定した。何度やっても失敗し、34例目まで失敗して35例目にたまたま、通常は2日間の培養をしていたが、イースター・ホリデーの旅行に出掛けたため、5日間培養に切り替え放って置き、旅行から帰ってきてマーシャルがこのプレートを見たところ、小さなコロニーが出来ていた。それまではカンピロバクターの2日間培養を踏襲していたために全く発見出来なかったのが、それ以後5日間培養することによってかなりの率で、このピロリ菌が分離されることになったわけである。

3. ピロリ菌の特徴

胃粘膜表面のH/E染色によれば菌が胃の上皮細胞に付着しているのが判る。多くの日本の病理学者たちが、自分が若いときこのようなものの存在を確認していたと言われるが、それが細菌であるとは決して思わなかったとのことである。それは、ひとえにオーストラリアのウォーレンとマーシャルの業績がいかに偉大であったかということ語るものであろう。実際に分離培養されるピロリ菌は培地において非常に小さなコロニーしか形成しない。

ヘリコというのはヘリカルの意味でらせん形の形態をしており、端在性に4本から6本の鞭毛を持っている。普通の菌と違い、断端部にターミナルバブと呼ばれる重りのような形態を持っているが、この機能に関してはまだ判っていない。また、鞭毛は二重膜構造になっており、胃酸に曝される胃に棲む細菌であるが故に鞭毛のフラジェリタンパク繊維を守るための膜構造がある。

4. ピロリ菌感染の疫学的研究と疾患との関連性

図1はアメリカのグラハムのデータで、横軸は年齢、縦軸は抗体の陽性率、即ち、ピロリ菌の存在を意味するものと考えて良いかと思う。オーストラリア、フランス、アメリカなどの先進国では

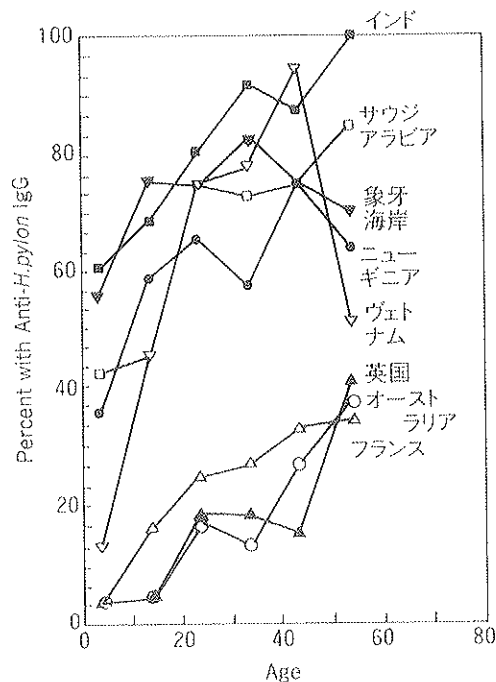


図1 先進国と開発途上国における年代別H.pylori抗体陽性率
(Graham et al., 1992)

あまり感染率が高くなく、40～50歳でせいぜい30%位の感染率である。これに対してインド、サウジアラビア、アイボリーコースト、ニューギニア、ベトナムのような発展途上国では若いときから感染率が高く、20代、30代で80%以上の感染率を示している。わが国はあとで述べるように中間のタイプである。

また民族間の差がないかどうかを、黒人とヒスパニックと白人とで調べたところ、黒人が非常に高いということが判ったが(マラディのデータ)、この高さが何に起因するかはまだはっきり判っていない。

同じようなデータはグラハムによっても調べられている。白人と黒人を年収、抗体陽性の面から調べると、白人は年収が高ければ高いほど陽性率は低くなり、黒人はそのような差は見られない。ということは、民族間に人種的な差によるものがあるのかも知れないし、同時に富める者も貧しい者も黒人に共通する生活習慣などに何か感染のカギがあるのかも知れない。

わが国の感染率のデータとしては北大第三内科の浅香教授が報告している(1992年)。40歳以上の年齢層では70から80%ときわめて高い感染率であるのに対し、0から30歳までは20から30%という低い率ではほぼ欧米なみである。40歳以上の中年、それ以上の世代が生まれた時期というのは、第二次世界大戦終了後の10年以内位だろうということなので、生活、衛生状況があまりよくなかったときに生まれ育った人たちはピロリ菌の感染が非常に高いということがわかる。

このピロリ菌の感染経路についてはまだ判っていない。もちろん胃の粘膜に本菌がいるということは、判っているわけだが、ピロリ菌の媒介動物がいないかどうか論議されている。図2は感染原因と媒介動物について現在考えられているものについてまとめたものだが、最近、米国の研究者たちが猫による感染があるということを報告して非常に話題になった。しかしながら先週、リスボンで開かれた第10回国際ヘリコバクター・ピロリ会議では、家猫からの感染はあり得ないという報告が行われた。猫以外の家畜からの感染についても可能性はあるけれどもはっきり判っていない。次に環境からの感染はどうであろうか。いわゆる水とか糞便、これは一つの可能性がある。という

のはここに見られるように通常のピロリ菌はらせん状の菌だが、小腸や大腸では球形のコッコイドフォームに形態変化する。コッコイドフォームは糞便中に排泄されるわけであり、これが果たして芽胞のようにサバイバルフォームとして他の未感染のヒトに経口移入し、胃の中で持続感染するかどうかということは多くの研究者が研究を続けているところであるがまだ確かな答えはない。

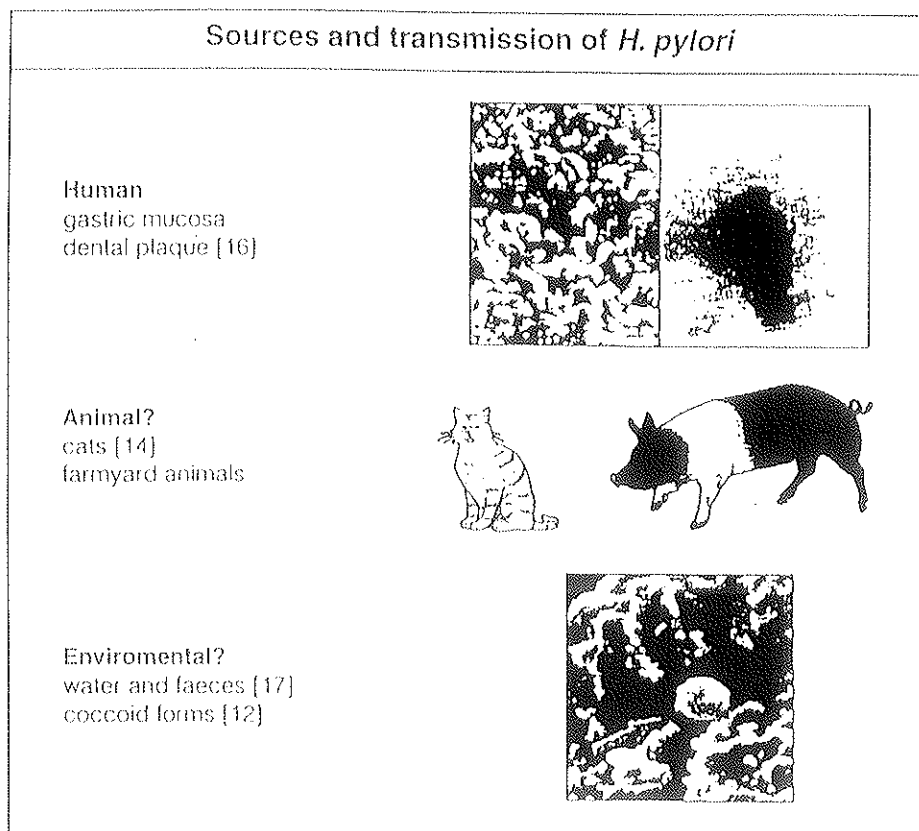


図2 Sources and transmission of *H. pylori*

5. ピロリ菌の病原因子と全遺伝子構造

ピロリ菌の病原因子としては、鞭毛、ウレアーゼ、接着因子、毒素、毒素関連タンパク、熱ショックタンパク、サイトカイン、活性酸素などたいへん多いが、今回は主にこの付着因子とサイトカインに関するココアの影響、効果というものを調べたので報告する。

約半数の菌株はバキユオレーティングトキシンという毒素を持っており、これは培養細胞の細胞質に空胞化を引き起こす毒素である。本年8月には、Nature誌に、米国のゲノム研究所のトゥームを中心とした6研究機関合同プロジェクトチームが本菌の全遺伝子構造を報告しており、全1,667,867塩基配列中に1,590個の遺伝子が特定された。

6. ピロリ菌感染と胃十二指腸潰瘍との関連性と除菌効果

胃十二指腸潰瘍患者からは平均88%のピロリ菌が検出される。胃潰瘍からは64%、十二指腸潰瘍からは85%といった高い率で分離されるが、胃炎がない健常なヒトからはわずか9%しかピロリ菌が分離されないという報告がある。

一方、ピロリ菌というのは潰瘍の再発因子、もしくは治療遷延因子といわれている。すなわち、ピロリ菌がいる患者に抗生物質を服用させると、除菌が成功した15人の患者から十二指腸潰瘍の再

発が起こる確率は27%であるが、まだピロリ菌が存在するような除菌が不成功なヒトたちは80%が再発したという(コグランのデータ)。このように除菌後潰瘍の再発率が激減したという報告が最近では数多い。

7. コッホの4原則

コッホの4原則がある。まず菌の存在を証明し、次に菌を分離する。さらにその菌を動物へ感染して同じような症状がでる。最後にその感染動物から菌を再分離するということである。この4原則が成り立って初めて病気がその病原体によるものであるといえるというのがコッホの4原則である。慢性胃炎とピロリ菌はこの4原則がほぼ成立する。しかしながら、消化性潰瘍に関して第3原則がまだ成り立たなかったが、最近日本の研究者を中心にして、スナネズミという動物を使い、潰瘍が形成されたという報告が相次いでおり、潰瘍に関して同じようにコッホの4原則が成り立ちつつある。胃癌に関してはまだ動物実験が成功していない。また第1、第2原則が必ずしも成立しないという状況である。

8. ピロリ菌感染の人体実験

ボランティア・スタディでは、ピロリ菌を発見したウォーレンの弟子であった若い消化器病医のマーシャルが培養したピロリ菌を飲んだ実験がある。飲んで7日後に不快感を訴え、10日後に胃の生検をやったところピロリ菌陽性で、炎症が認められたが、幸い14日後には治癒した。一方ニュージーランドのモリスがその後に追加経口接種実験をしたところ、1年後にもピロリ菌が依然陽性で慢性胃炎が続いていた。現在モリスは治療の結果、寛解したというが、ピロリ菌感染と胃癌との関連性が取りざたされている現在このようなボランティア・スタディは行われていない。

9. ピロリ菌感染と胃癌、マルトリリンパ腫

胃癌との関連性については1991年から報告されている。ハワイ在住の日系アメリカ人の109名ずつの胃癌患者とを比較したところ胃癌患者では94%でピロリ菌抗体が陽性であったのに対して健康人は76%しか陽性ではなかったというデータがある。また英国国民を対象にしたホーマンのデータでも同じような結果が示されている。日本においても国立がんセンターを中心として胃癌とピロリ菌が関係あるかということをも10年間臨床治験をやっている最中である。

また、マルトリリンパ腫という胃粘膜下の腫瘍性の疾患があるが、この腫瘍はピロリ菌を除菌すると大きさが小さくなっていくという特徴がある。よってピロリ菌を治療することによって腫瘍性の病変そのものが縮小していくということがこのマルトリリンパ腫においては知られている。

10. ヒト胃粘膜上皮へのピロリ菌の付着とココアによるその抑制

図3は各国の年間1人あたりのチョコレートの消費量と胃癌の年間死亡10万人比を示したものだが、日本人は胃癌が多くてチョコレートの消費量はスイスなどと比べると非常に少ないのが特徴である。

胃癌をはじめとする胃十二指腸疾患とピロリ菌との関連性はが想定されているため、ピロリ菌感

染とココアとの関連性を調べて見ようとしたわけである。まず付着の実験を行った。ヒト胃癌由来のHGC-27という細胞とピロリ菌1029株のFITCラベルしたものを混ぜ合わせてその付着を見た。0.1%ココア存在下でこれらを混ぜ合わせて37°C 60分インキュベート、PBS洗浄後に光顕下で付着性をチェックした。比較として、コーヒー、ウーロン茶、紅茶、緑茶もチェックした。

対照区では細胞に付着したピロリ菌の蛍光がたくさん検出されたのに対し、ココア処理によってほとんど菌の付着が検出されないという結果を得た。ピロリ菌の付着をココアが抑制する効果があるということが示唆された。

次に同じ濃度で、コーヒー、緑茶、ウーロン茶、紅茶そしてココアによる影響をみたところ、コーヒー、緑茶などはあまり抑制効果は認められず、ウーロン茶、紅茶には抑制効果が見られた。ココアはきわめて強い抑制効果をもつことが明らかになった。同じ濃度での比較ではココアが最も付着抑制率が高かったことが判った。

図4は、横軸に希釈倍数をとりココア、コーヒー、紅茶、ウーロン茶、緑茶の付着抑制効果をみたものだが、嗜好性飲料のなかでココアが一番付着抑制効果が強いことが判る。

培養細胞ではなくヒトの胃生検で採取した胃粘膜組織へのピロリ菌付着に対するココアによる抑制効果を調べたところ培養細胞での結果と同じように対照区に比べココアを処理した場合には付着が抑制されることが認められた。

次に付着実験をフローサイトメーターを用いて解析した。

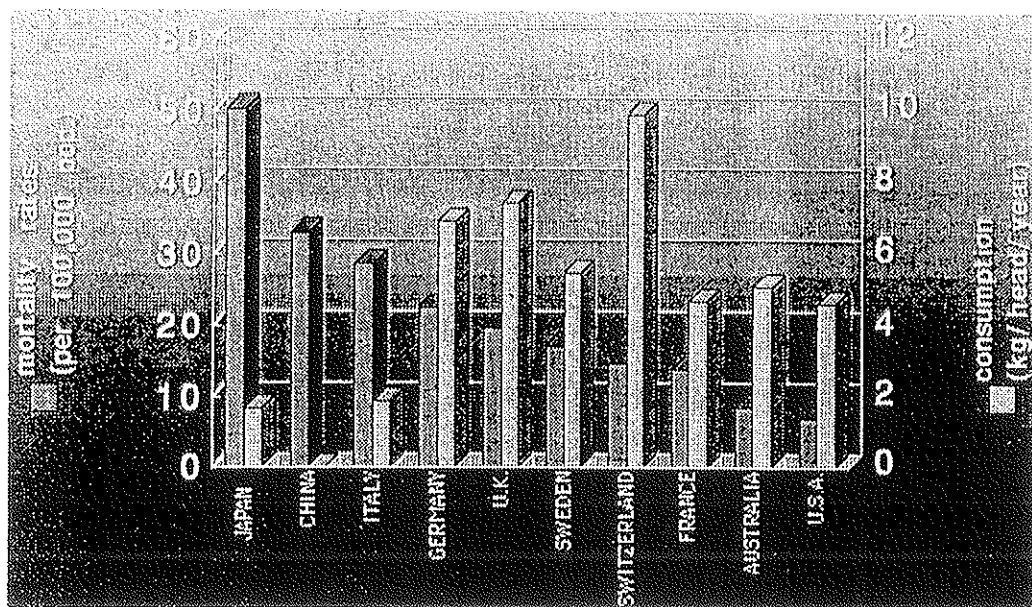


図3 Relation between mortality rates of stomach cancer and consumption of chocolate

実験方法はPIHK-2という親脂性の蛍光色素でピロリ菌をラベルしてその後この菌をココアで前処理するもしくはMKN-45という胃癌由来の細胞をココアで前処理する。そして各々対応する細胞もしくはピロリ菌をインキュベーションする。その後、洗浄し、フローサイトメーターでその付着性をチェックするというものである。

図5の左図は対照の付着していないMKN-45細胞、右図は蛍光色素でラベルしたピロリ菌が付着した細胞のフローサイトメーターでの蛍光パターンを示している。横軸は蛍光強度を表し、蛍光強

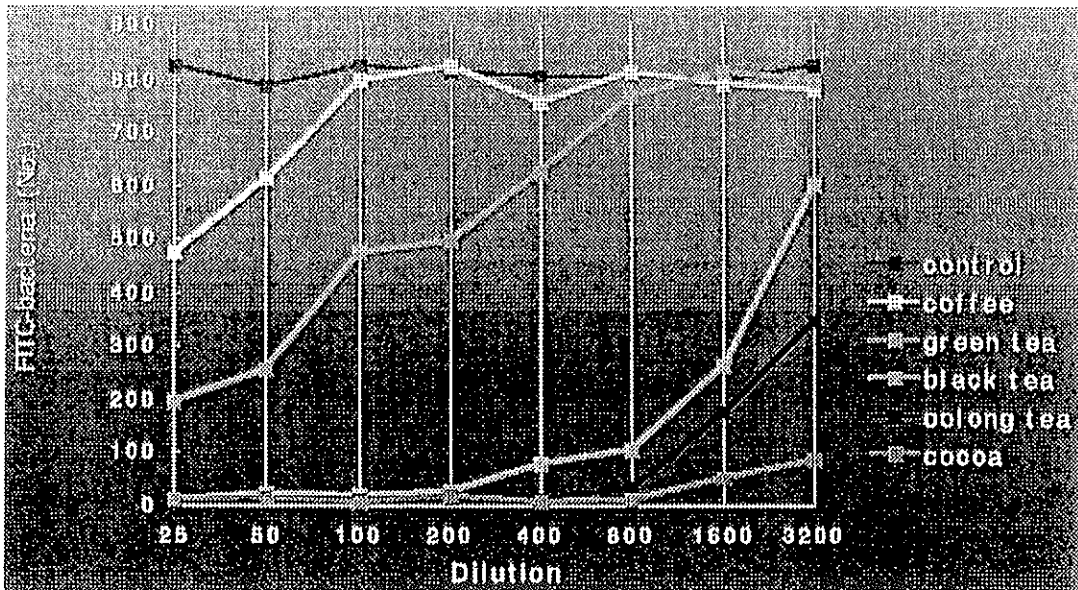


図4 Dose response in the effect of coffee, teas and cocoa on adhesion of *Helicobacter pylori* to HGC-27 cells

度が強ければ強いほど菌が付着した細胞であることが判る。

ココアの熱水抽出液を0.5%にしてMKN-45胃癌細胞をココアで前処理した後に蛍光色素でラベルしたピロリ菌と混ぜて付着性をみた。コントロールでは739が平均蛍光強度であるのに対して、ココアで細胞を前処理すると平均蛍光強度169と77%付着が抑制される。一方、ピロリ菌をココアで前処理すると平均蛍光強度は43になって94%という高い抑制率が認められた。即ち、ピロリ菌をココアで前処理しても細胞を前処理してもいずれも抑制効果があるということが判ったわけである。

胃癌由来の細胞をココアもしくはウーロン茶、紅茶、コーヒー、緑茶などで前処理したところ、

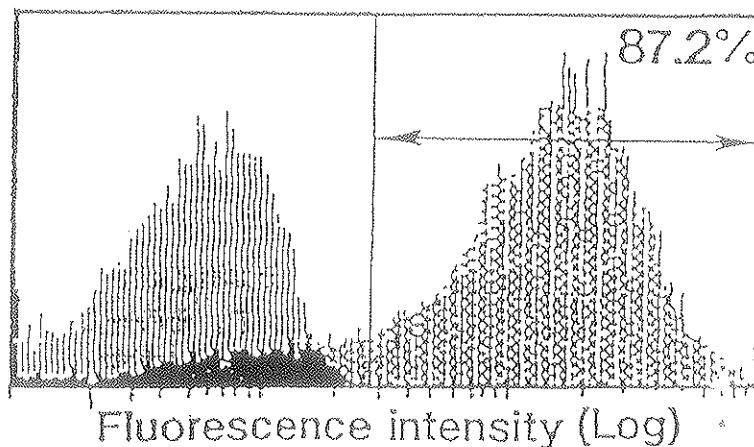


図5 Flow cytometric analysis of adhesion of *Helicobacter pylori* strain NCTC11638 to human gastric carcinoma MKN45 cells. VI MKN45 cells after incubation with *H.pylori*; III control MKN45 cells.

嗜好性飲料はある程度付着抑制効果を示していることが判り、またそれらの中ではココアの抑制率が大きいことが判った。

同じような実験をピロリ菌に対してココアをはじめとする各嗜好飲料で前処理しフローサイトメーターで調べた。その結果、各嗜好飲料間で付着抑制にきわめて大きな差が出た。さらにココア、緑茶、紅茶、ウーロン茶における蛍光強度をみたところ、ピロリ菌をココアで前処理することによ

って蛍光強度が明らかに減少している。他の嗜好飲料にもある程度の付着抑制効果がみられ、紅茶にはココアほどではないが強い付着抑制効果が認められるものの、緑茶、コーヒー、ウーロン茶の効果は弱い。この実験からもココアがピロリ菌の付着抑制効果が最も強いというデータが得られた。

図6は、ココアのピロリ菌に対する付着抑制過程に関する仮説を示している。通常ピロリ菌の表面にあるアドヘジンという付着因子が胃の上皮細胞のリセプターと結合することによってピロリ菌の付着が可能になるのだが、付着の過程にココアが存在するとピロリ菌の付着因子にココアの成分が結合し胃粘膜上皮への付着が抑制を受けると考えられる。あるいは、ココアが胃の上皮に存在するリセプターと結合することによってピロリ菌の付着を抑制するのではないとも考えられる。このような仮説を証明するためどのようなアドヘジンやリセプターがココアの付着抑制効果と関係するかを明らかにする必要があると考えており、今後こうした点について研究を進めていきたいと思っている。

ピロリ菌感染症の病態はまだはっきり判っていない。けれども、いま注目されているのがインターロイキン8である。これはいろいろな免疫担当細胞から産生されるものだが、胃の上皮細胞からも産生される好中球の走化因子で、好中球の血中から組織への移行を誘導する作用をもっている。インターロイキン8によって胃上皮組織へ引き寄せられた好中球がいろいろな酵素やオキシジェン・ラジカルなどの活性酸素などを産生し、炎症を惹起するということが判っている。

胃癌由来の細胞を培養し、これにピロリ菌を接種すると、ピロリ菌付着後、胃上皮細胞からインターロイキン8が培養液中に産生されるので、このインターロイキン8を酵素免疫測定法(ELISA)

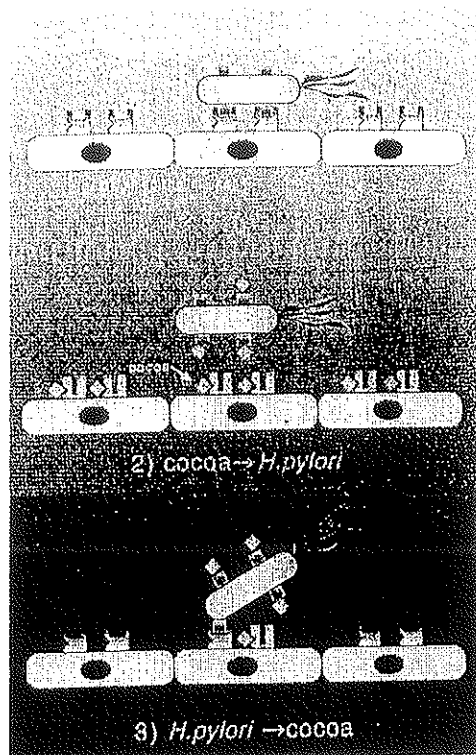


図6 Mechanism for inhibition of adhesion of *Helicobacter pylori* to gastric epithelium by cocoa extracts

を用いて測定するというものである。

ココアの熱湯抽出液を0.5%を最高濃度とした段階希釈溶液存在下の状態で培養すると産生され

るインターロイキン8の量がかなり低く抑えられていることが判った。0.5%濃度存在下では全くインターロイキン8の産生がみられない。このようにピロリ菌によるインターロイキン8の産生誘導についてもココアが抑制することが判った。

11. O157病原性大腸菌とココアの影響

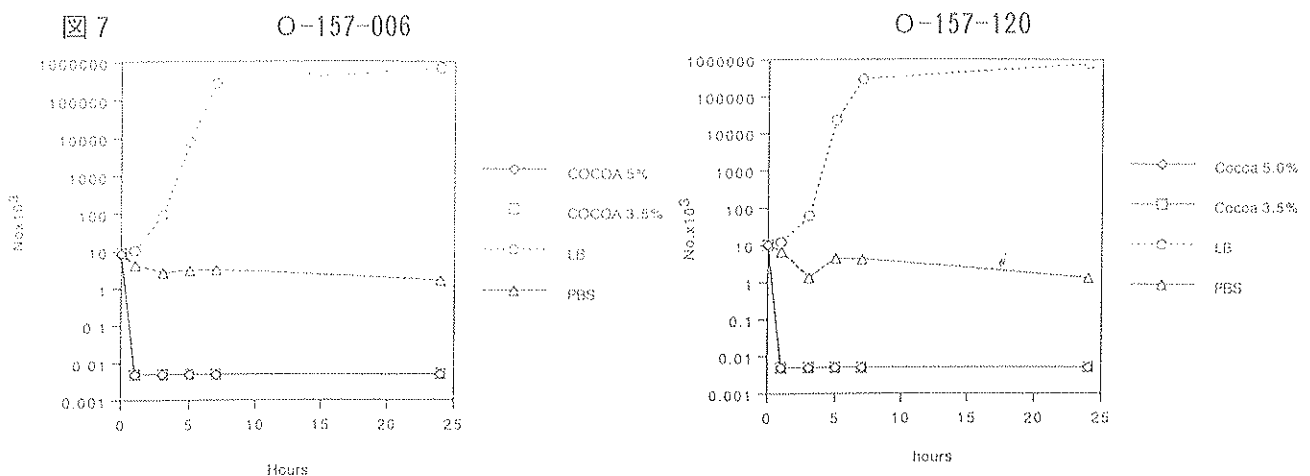
次に大腸菌の話に移りたいと思う。大腸菌は非病原性大腸菌と病原性大腸菌に大きく分かれる。非病原性といえども、腸管以外の異所性の部位にまぎれ込むと肺炎とか膀胱炎、腎盂腎炎といった疾患を誘発する。病原性大腸菌の中でEHECというのが腸管出血性大腸菌のことである。

O157という言葉の頭文字のOはドイツ語ohne Hauchbildung（鞭毛を欠くため遊走出来ないコロニー形成を意味する）から取られた。運動性がないという意味から、鞭毛抗原ではなくして菌体表面抗原を示している。大腸菌の外側にはリポ多糖と呼ばれる外膜がありその一番外側に糖鎖のO-side chainというのがあり、この抗原性がO-1から付けられていった157番目の大腸菌という意味である。

図7はO157の増殖抑制実験を示したものである。O157:H7の大腸菌を10⁴個試験管の中に入れてPBSをコントロールとし、また、ポジティブ・コントロールとして栄養分の豊富な増殖培地L-ブ Rossを用いた。ココア熱水抽出液を最終濃度3.5%、5%の条件で実験した結果、3.5%および5%ココアの液に大腸菌を入れるとわずか1時間で完全に死滅したという実験結果を得た。

O157から分泌されるペロ毒素はきわめて強力な毒素で、下痢だけに止まらず、溶血性尿毒症候群や脳症などの重篤な疾患を引き起こす。これが昨年大流行の死者の発生に繋がったわけで、志賀菌様毒素あるいは志賀毒素とも呼ばれている。

大腸菌のLPSはリポポリサッカライドとも呼ばれ、菌外膜の成分である。LPSとペロ毒素とが共同して生体に作用を及ぼすという説がある。すなわちペロ毒素だけが悪いのではなくLPSによって刺激を受けたマクロファージを介するインターロイキン1とかTNFという炎症性サイトカインなどと協同して血管内皮細胞を障害するとする仮説である。



12. 大腸菌LPSの作用とココアによる抑制

このLPSに注目してその測定系を構築し、その作用に対するココアの影響を検討した。実験系はヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を用い、これをLPS、インターロイキン-1β、TNF-αなどで

刺激すると細胞表面にELAM-1などの接着（付着）因子が発現される。こうした接着（付着）因子が発現した血管内皮細胞と一緒にU937白血球細胞のような白血球由来細胞を反応させると白血球系細胞は血管内皮細胞に接着（付着）することになる。このような実験系をつくりLPSに対するココアの影響をみた。

コントロールとして未刺激の血管内皮細胞にはU937細胞は全く接着（付着）しない。LPSという大腸菌やピロリ菌などのグラム陰性菌の菌体の外膜成分である多糖を添加すると血管内皮細胞表面に接着（付着）分子が発現されて白血球細胞が数多く接着（付着）している。このような系にココアを存在させると全く接着（付着）が起こらないことが判った。即ちココアはLPSのその生物活性を中和することができるわけである。

このようなココアの効果というのはLPSで刺激した場合のみに有効であって、同じように血管内皮細胞へ作用して接着（付着）分子の発現を刺激するインターロイキン- 1β あるいはTNF- α で刺激した場合には効果を示さない(図8)。即ち、ココアの効果は他のサイトカインによる刺激に対してはなんら抑制することなく、グラム陰性菌外膜由来のリポポリサッカライドLPSによる刺激効果だけを特異的、選択的に抑制することが判った。

13. 一酸化窒素 (NO) とココアの影響

最後にNO、一酸化窒素について触れたい。NOは非常に多くの病気との関係から現在特に注目されている。LPSやインターフェロン γ をはじめとするさまざまなサイトカインはマクロファージからのNO産生を刺激することが知られている。このNOが組織や細胞を障害したりあるいは殺菌物質として働いていると考えられている。

J774.1マウスマクロファージ様細胞を用いてこれにLPSとインターフェロン γ を添加するとこのようにNOの産生が非常に強く認められるのに対し、ココアの熱水抽出液500倍や100倍希釈のも

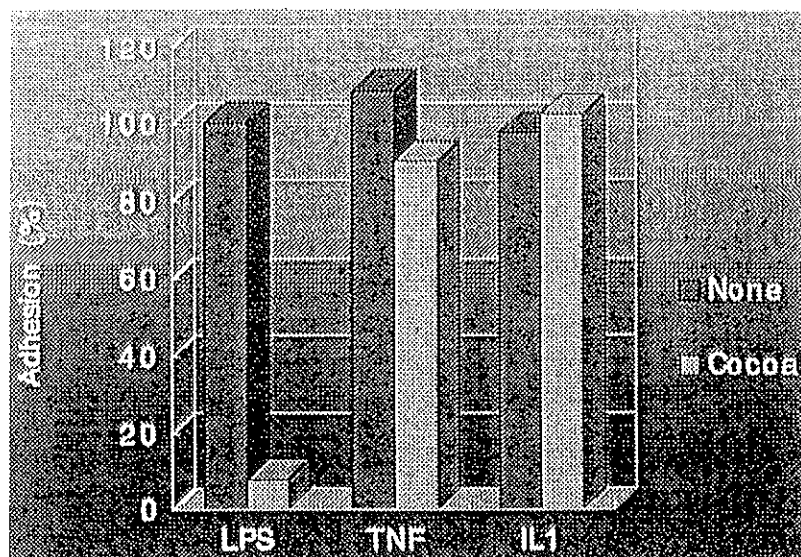


図8 Inhibitory effect of cocoa on adhesion of U937 to HUVEC is LPS-specific.

のを加えるとこのNO産生がきわめて強く抑制される(図9)。

晩年のパストールの写真(肖像画)を見ると右半身マヒに陥った様子がうかがえる。しかしなが

ら彼はマヒを免れた左半身を使い、一生懸命研究を続けたと伝えられている。

14. まとめ

最後にまたバスツールの言葉を引用させていただく。

“単純にして決定的な方法で証明し得えないようなことは一切進めるな”

バスツールはこの言葉を若い研究者たちに厳しく言っていたとのことである。この言葉を忘れな

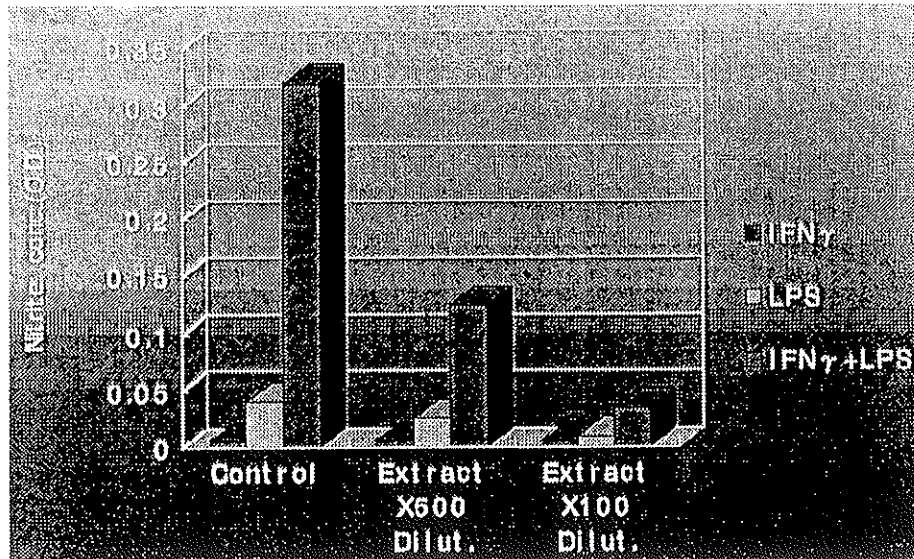


図9 Effects of cocoa extracts on the production of NO in J774.1 cells (murine macrophage like cell line) treated with LPS or LPS+IFN γ

いでさらに研究を押し進めたいと思っている。

まとめてみるとココアにはピロリ菌が胃の上皮細胞へ付着するのを抑える効果がある。そのターゲットはピロリ菌の菌体表面に主にあるけれども、同時に胃の上皮細胞へも何らかの抑制効果を示す。さらにはインターロイキン8という炎症性のサイトカインの産生や、O157病原性大腸菌の増殖をもココアは完全に抑制する。また、ピロリ菌、大腸菌に共通してみられるLPSの生物活性がココアによって抑制されることが判った。

神谷 茂 (杏林大学医学部教授)

昭和53年金沢大学医学部卒業。同助手、講師を経て平成3年東海大学医学部助教授。この間英国MRCクリニカルリサーチセンターへ2年間にわたり海外出張。平成6年より杏林大学医学部微生物学教室教授。医学博士。