The Japanese Society of Pharmacognosy

生薬学雑誌 **65** (1), 43-49 (2011)

トチノキ（*Aesculus turbinata* BLUME）種皮ポリフェノールによる *Helicobacter pylori* の胃癌細胞株 MKN 45 への接着抑制作用

國方 敏夫[a]*, 河野 恵三[a], 牛尾 慎平[a], 木村 英人[b], 小川 智史[b], 福田 恵温[a]

[a] (株)林原生物化学研究所研究センター医薬研究部門

[b] 寿製菓(株) 研究開発室

Inhibitory Effects of Polyphenolic Compounds from Seed Shells of the Japanese Horse Chestnut (*Aesculus turbinata* BLUME) on Adherence of *Helicobacter pylori* to a Stomach Cancer Cell Line MKN 45

Toshio Kunikata[a]*, Keizo Kohno[a], Shimpei Ushio[a], Hideto Kimura[b], Satoshi Ogawa[b] and Shigeharu Fukuda[a]

[a] *Biomedical Institute, Research Center, Hayashibara Biochemical Labs., Inc., 675-1 Fujisaki, Naka-ku, Okayama 702-8006, Japan*

[b] *Kotobuki Seika Co., Ltd., 2028 Hatagasaki, Yonago, Tottori 683-0845, Japan*

(Received May 21, 2010)

Polyphenolic compounds have been shown to have growth inhibitory action on *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Previously, we demonstrated that seed shells of the Japanese horse chestnut (*Aesculus turbinata* BLUME) are rich in polymerized polyphenol compounds. In this study, we have examined the effects of polyphenolic compounds from the seed shells of the Japanese horse chestnut on adherence of *H. pylori* to MKN 45 cells, a human stomach cancer cell line. Polyphenolic compounds, which are composed of monomeric forms of (+)-catechin and (−)-epicatechin and polymeric proanthocyanidins, reportedly inhibited the colony formation of *H. pylori* on agar plates (minimal inhibitory concentration: 180 μg/ml). Interestingly, the polyphenolic compounds also inhibited adherence of *H. pylori* to MKN 45 cells at concentrations that showed no growth inhibitory action on *H. pylori*. When the polyphenolic compounds were further fractionated by gel filtration chromatography depending on the degrees of polymerization, fractions including polymeric proanthocyanidins exhibited higher inhibitory effects compared with a fraction containing lower-molecular weight compounds. MKN 45 cells reportedly produced IL-8 spontaneously, and IL-8 production was increased by *H. pylori* infection. We found that polymeric proanthocyanidins significantly and dose-dependently reduced the *H. pylori*-induced IL-8 production as well as the spontaneous IL-8 production. Our results raise the possibility that polymeric proanthocyanidins contained in the seed shells of the Japanese horse chestnut may prevent infection and inflammatory responses by *H. pylori*.

Keywords: *Aesculus turbinata* BLUME; *Helicobacter pylori*; polyphenol; adherence; MKN 45

NII-Electronic Library Service

The Japanese Society of Pharmacognosy

Helicobacter pylori (*H. pylori*) は，らせん状のグラム陰性桿菌で，胃粘液中に浮遊するか，胃上皮細胞に付着して増殖する．1983年に Warren と Marshall らが胃炎患者の胃粘膜に寄生する *H. pylori* の分離培養に成功[1]して以来急速に研究が進み，*H. pylori* の感染が慢性萎縮性胃炎や胃潰瘍，十二指腸潰瘍，胃癌などの発症に深く関与していることが明らかになってきた．先進国では近年の衛生面の改善により保菌者は減少傾向にあるものの，高年齢層での感染率は依然として高く，日本においても，40歳以上では70%以上が感染者と言われている．*H. pylori* の除菌により関連病態の多くが改善されることから，長期にわたり胃に感染していることが，発症のリスクファクターと考えられており，除菌が最良の治療法とされている．現在はプロトンポンプ阻害剤と抗生物質2剤（アモキシシリン，クラリスロマイシン）による3剤併用による除菌療法が行われているが，耐性菌の増加による除菌率の低下も懸念されている．我々はこれまでに，タデ藍 (*Polygonum tinctorium* Lour.) から抗 *H. pylori* 活性を有する化合物を単離し[2]，これらが感染動物実験モデルにおいて，胃粘膜への *H. pylori* 感染を有意に抑制することを報告[3]しており，副作用の少ない抗 *H. pylori* 化合物の検索を行ってきた．

トチノキ (*Aesculus turbinata* BLUME) 種子，すなわちトチノミは，古くはコメの代用としてドングリなどと共に主食の一角をなし，また乾燥することによって長期間保存ができることから飢饉の際などの非常食として利用されていたと考えられている．トチノミはエスシンと呼ばれるサポニンを多く含むことから，ヨーロッパを中心にその抽出物の生理機能に関する研究が進められており，炎症や腫脹の治療用として医薬品や化粧品に用いられている．我々はこれまでに，トチノミの生理活性を検索し，皮剥ぎしたトチノミから単離したエスシン誘導体が，血糖値上昇抑制作用[4]や，糖質分解酵素の阻害活性を有すること[5]，トチノミの皮，すなわちトチノキ種皮より得られたポリフェノールが糖質消化酵素の阻害活性を有すること[6]，さらにはブタ膵臓由来リパーゼの阻害作用を有すること[7]などを報告してきた．また，これらの作用成分を検索，分画する段階で，トチノキ種皮に含まれるポリフェノール成分は (+)-カテキンや (−)-エピカテキンを構成単位として，A-タイプのインターフラバン結合を有するプロアントシアニジン重合体であり，このような重合ポリフェノールの割合が他の植物種皮から得られたポリフェノールと比べて極めて高いことを見出した[6]．

これまでにトチノキ種皮にも含まれるクエルセチンや (+)-カテキンなどのポリフェノールには抗 *H. pylori* 作用があること[8,9]や，抗潰瘍作用があること[10~12]などが報告されているが，*H. pylori* 感染の初期段階と考えられる胃粘膜細胞への接着制御に着目した報告は見られない．そこで今回，トチノキ種皮ポリフェノールの新たな作用検索として，*in vitro* における *H. pylori* の胃癌細胞への接着抑制効果について検討した．また，プロアントシアニジンの重合度による抑制効果についても検討を行った．

1. 材料と方法

1.1 標　　品

トチノキ種皮ポリフェノールは寿製菓株式会社（鳥取県米子市）において分離，精製された．トチノキの種皮10 g（水分含量11.5%）を乳鉢にて粉砕し，蒸留水200 ml を加えて2時間，加熱還流を行った．抽出液を濾過後，残渣に蒸留水200 ml を加え，再度同様の操作を行った．抽出液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮して，乾固物1.56 g を得た．この抽出物を Diaion HP-20（30 mm Inner Diameter (ID)×300 mm, 日本錬水，東京）を用いたカラムクロマトグラフィーに供し，蒸留水500 ml, 次にメタノール500 ml で溶出した．得られたメタノール溶出画分を減圧濃縮し，乾固物0.67 g を得た．これを Chromatorex ODS 1024T カラム（30 mm ID×300 mm, 富士シリシア化学，春日井）に供し，5%メタノール500 ml で洗浄後，50%メタノール500 ml で溶出した．得られた50%メタノール溶出画分を減圧濃縮し，乾固物0.54 g を得た（以下，ODS 分画物）．さらにこの乾固物を Takahata ら[13]の方法に準じて Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにて分離した．乾固物をエタノールに溶解し，Sephadex LH-20 カラム（30 mm ID×300 mm, GE Healthcare UK, Buckinghamshire, UK）に供し，エタノール2,100 ml, メタノール2,100 ml, 70% アセトン2,100 ml の順で溶出した．各溶出液を減圧濃縮し，エタノール溶出画分 (F1)，メタノール溶出画分 (F2)，70% アセトン溶出画分 (F3) の乾固物を得た．総ポリフェノール量は Folin-Ciocalteu 法により測定し，(−)-エピカテキン換算量で示した．各画分におけるポリフェノール量は Table 1 に示す通りであった．

順相 HPLC および matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometer (MALDI-TOF/MS) による構造解析の結果から，ODS 分画物は (+)-カテキンおよび (−)-エピカテキンからなる縮合型

Table 1. Fractionation of polyphenolic compounds from seed shells of the Japanese horse chestnut (*Aesculus turbinate* BLUME).

Purification step	Dry weight (mg)	Polyphenolic content (mg)
Hot water extract	1,560	580
Diaion HP-20	670	480
Chromatorex ODS1024T	540	440
Sephadex LH-20		
Ethanol eluate (Fl)	20	10
Methanol eluate (F2)	270	290
70% Acetone eluate (F3)	100	90

Polyphenolic compounds were fractionated from 10 g of seed shells using HP-20, ODS and Sephadex column chromatography. Polyphenolic contents were determined as (−)-epicatechin equivalents using Folin-Ciocalteu reagent.

NII-Electronic Library Service

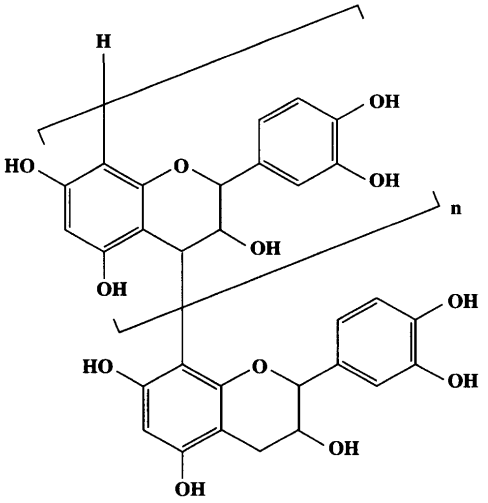

Fig. 1. Chemical structure of proanthocyanidine isolated from seed shells of the Japanese horse chestnut (*Aesculus turbinate* BLUME).

タンニン（プロアントシアニジン，Fig. 1）が主成分で，F1はクエルセチン配糖体，カテキンおよびエピカテキンからなる3量体などの低分子ポリフェノール，F2は19 mer以上の中重合度のプロアントシアニジン，F3は23 mer以上の高重合度のプロアントシアニジンを主成分とする画分と推定された[6]．各標品は固形重量をベースとして10%エタノール溶液により4 mg/mlに溶解したものを，さらに使用溶媒で各濃度に希釈し，使用した．

1.2 *Helicobacter pylori*

H. pylori は，標準株であるATCC 43504株を用いた．*H. pylori* の培養には10% fetal bovine serum（FBS, HyClone, South Logan, UT）を含むBBL Brucella broth（Becton Dickinson, Sparks, MD）を用いた．またコロニー形成を伴う試験には10% horse serum（Invitrogen, Carlsbad, CA）および1% agar（BBL Becton Dickinson, Sparks, MD）を含むBrucella broth（以下Brucella agar）を用いた．培養はアネロパック微好気（三菱ガス化学，東京）による微好気条件下，37℃で行った．

1.3 最小生育阻止濃度（minimal inhibitory concentration: MIC）の測定

各濃度に調製した標品500 μlに対し，Brucella agar 4.5 mlを添加し，寒天平板を作成した．寒天平板上にphosphate-buffered saline（PBS）によりA550 nmの吸光度がおよそ0.3となるように調製した菌液50 μlを滴下し，平板表面に広げた．7日間の培養後，菌生育の有無を実体顕微鏡下で確認し，菌の生育が認められない最小濃度をMICとした．

1.4 MKN 45細胞への *H. pylori* 接着抑制作用

MKN 45細胞（ヒト胃癌細胞株）へ接着した *H. pylori* 量を測定する系として，Cell-enzyme immunoassay（Cell-EIA）を用いた．MKN 45細胞は10% FBSを含むRPMI 1640培地を用いて37℃，5% CO_2 環境下で培養した．96穴マイクロプレート（Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ）に 1×10^5 個/wellで播種し，3日間培養した．PBSによりA550 nmの吸光度がおよそ0.2となるように調製した *H. pylori* 菌液とPBSにより各濃度に調製した標品を等量混和し，37℃で30分プレインキュベートした．培地を除去後，*H. pylori* を含む標品液100 μlをそれぞれ各ウェルに添加し，37℃，2時間インキュベートした．なお感染条件を検討した結果，A550 nmの吸光度がおよそ0.1となるように調製した *H. pylori* 菌液をPBSにより10倍段階希釈したものをMKN 45細胞に100 μlずつ添加し，感染時間を2時間とした場合において，添加した菌量に依存的な *H. pylori* の検出が可能であった．

H. pylori を含む標品液を除去後，4%パラホルムアルデヒド溶液を添加し，室温で，1時間固定した．0.05% Tween 20を含むPBSで洗浄後，3%過酸化水素溶液を添加し，室温で30分処理した．洗浄後，ビオチン標識-ウサギ抗 *H. pylori* ポリクローナル抗体（ViroStat, Portland, ME）を添加し，室温，60分反応させた．洗浄後，horseradish peroxidase（HRP）標識-ストレプトアビジン（DAKO, Glostrup, Denmark）を添加し，室温，60分反応させた．洗浄後，QuantaBlu™ Fluorogenic Peroxidase Substrate Kit（PIERCE, Rockford, IL）により発色させ，MKN 45細胞に付着した *H. pylori* を検出した．

MKN 45細胞は，標品による細胞障害性の有無を確認するため，標品反応後の細胞にalamarBlue®（TREK DIAGONOSTIC SYSTEMS, Cleave Land, OH）を添加し一定時間後の蛍光強度を測定した．

1.5 *H. pylori* に対する直接作用

PBSによりA550 nmの吸光度がおよそ0.2となるように調製した *H. pylori* 菌液とPBSにより各濃度に調製した標品を等量混和し，37℃で2.5時間インキュベートした．*H. pylori* を含む標品液をPBSにより適宜希釈し，Brucella agar平板上に50 μlを滴下し，平板表面に広げた．37℃，5日間培養後，平板表面のコロニー数を計測した．標品を添加しない場合のコロニー数を100%として，各濃度の標品添加時のコロニー数を%で示した．

1.6 *H. pylori* 感染MKN 45細胞からのIL-8産生抑制作用

H. pylori 感染MKN 45細胞からのIL-8産生はNozawaらの系[14]に従った．MKN 45細胞を24穴プレート（Becton Dickinson Labware）に 3×10^5 個/wellで播種し，3日間培養した．上清を除去し，FBSを含まないRPMI 1640培地（以下，FBS（−）RPMI 1640培地）で洗浄した後，同培地でさらに一晩培養した．上清を除去後，FBS（−）RPMI 1640培地により各濃度に調製した標品を400 μl/well添加し，37℃で1時間インキュベートした．FBS（−）RPMI 1640培地によりA550 nmの吸光度がおよそ1.0となるように調製した *H. pylori* 菌液200 μlを各ウェルに添加し，さらに6時間インキュベートした．上清中のIL-8量はELISA（ヒトIL-8スクリーニングセット，

NII-Electronic Library Service

Thermo Scientific, Rockford, IL）により測定した．

1.7 有意差検定

データは平均値±SDで示し，T検定によりコントロールに対する有意差を検定した．

2. 結　　果

2.1 ODS分画物のMIC

トチノキ種皮ポリフェノールのODS分画物について，*H. pylori*に対する抗菌作用を検討した．ODS分画物を100～120 μg/ml含むBrucella agar平板上でも，培養7日目に*H. pylori*の生育が観察されたが，コロニーの大きさはコントロールよりも小さなものであった．140 μg/mlの濃度では肉眼的にコロニーの確認は出来ず，実体顕微鏡による観察下で，極めて小さなコロニーが認められた．180 μg/mlでは*H. pylori*の生育は確認できなかった．従って，ODS分画物の*H. pylori*に対するMICは180 μg/mlであった．以上の結果は，これまでの報告と同様にトチノキ種皮ポリフェノールも*H. pylori*に対して抗菌作用を有していることを示すものであった．

2.2 MKN 45細胞への*H. pylori*接着抑制作用

トチノキ種皮ポリフェノールによる，*H. pylori*の胃癌細胞株MKN 45への接着に及ぼす影響についてCell-EIAにより検討した．データには示さないが，各標品とも100 μg/mlではMKN 45細胞に対し，増殖には影響は及ぼさないものの，プレートに付着した細胞が剥離しやすくなるといった現象が認められたため，Cell-EIAによる試験は50 μg/ml以下の濃度で実施した．

ODS分画物は3.1 μg/ml以上の濃度で，濃度依存的にMKN 45細胞に対する*H. pylori*の接着を有意に抑制した（Fig. 2）．一方，ODS分画物と*H. pylori*の共存下で2.5時間反応させることで，*H. pylori*のコロニー形成率は50 μg/mlで70%程度，100 μg/mlで10%程度に低下していたが，25 μg/ml以下の濃度では，*H. pylori*に対する抗菌作用は認められなかった（Fig. 3）．この結果から，低濃度のトチノキ種皮ポリフェノールによる*H. pylori*のMKN 45細胞への接着抑制作用は，*H. pylori*に対する抗菌作用によるものではないことが示唆された．

さらにSephadex分画画分（F1～F3）においては，低分子ポリフェノール画分であるF1では強い接着抑制作用は認められなかったが，重合ポリフェノール画分であるF2およびF3は，濃度依存的にMKN 45細胞に対する*H. pylori*の接着を抑制した（Fig. 4）．また，重合度のより高いF3において，F2よりも低濃度での接着抑制作用が認められた．

2.3 *H. pylori*感染MKN 45細胞からのIL-8産生抑制作用

MKN 45細胞からのIL-8の産生は*H. pylori*の感染により亢進するが，*H. pylori*感染前にMKN 45細胞をあらかじめトチノキ種皮ポリフェノールで処理することにより，濃度依存的にIL-8産生を抑制した（Fig. 5）．またMKN 45細胞は，*H. pylori*非感染時にも自発的にIL-8を産生していたが，ODS分画物，F2およびF3で処理した場合においては，自発的なIL-8の産生はさらに低下していた．

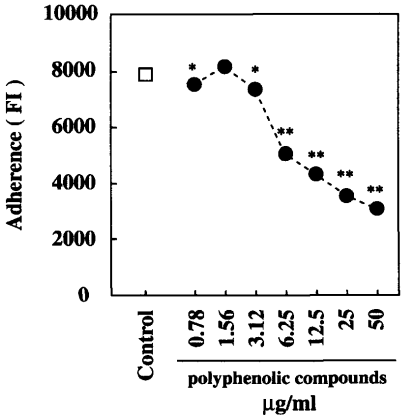

Fig. 2. Inhibitory effects of polyphenolic compounds (ODS fraction ●) prepared from seed shells of the Japanese horse chestnut on adherence of *H. pylori* to MKN 45 cells. Adherence of *H. pylori* to MKN 45 cells was assessed by Cell-EIA using biotin-labelled rabbit anti-*H. pylori* polyclonal antibodies. Results were expressed as Fluorescence intensity (FI) (mean±SD of triplicate cultures). Control (□) shows FI obtained by adherence of *H. pylori* to MKN 45 cells in the absence of polyphenolic compounds. $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.005$ compared with control culture.

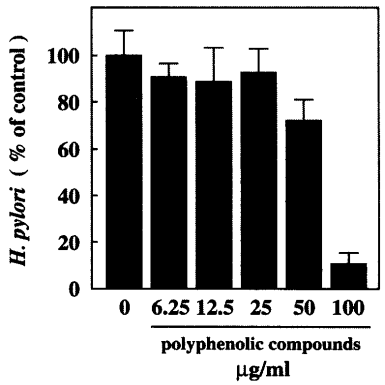

Fig. 3. Antibacterial effect of polyphenolic compounds (ODS fraction) to *H. pylori*. *H. pylori* were mixed with various concentrations of ODS fraction and incubated for 2.5 h at 37℃. ODS fraction-treated *H. pylori* were cultured on agar plate for 5 days, and resulting colonies were counted. Results were expressed as a percentage of colony counts (mean±SD of triplicate cultures).

3. 考　　察

*H. pylori*は体内において胃上皮細胞に付着して増殖し，リンパ球や好中球などの浸潤を特徴とする胃炎を誘発するが，除菌によって病態の改善が見られることから，*H. pylori*の感染が発症の原因となっていると考えられてい

NII-Electronic Library Service

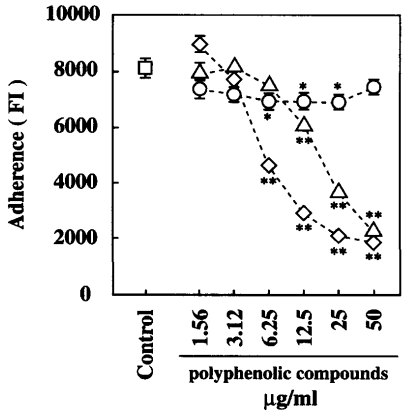

Fig. 4. Polymeric proanthocyanidins exhibit higher inhibitory effects on adherence of *H. pylori* to MKN 45 cells. Adherence-inhibitory effects of polyphenolic compounds fractionated by gel filtration chromatography (F1 ○, F2 and F3 ◇) were examined by Cell-EIA as described in Fig. 2. Results were expressed as FI (mean±SD of triplicate cultures). Control (□) shows FI obtained by the adherence of *H. pylori* to MKN 45 cells in the absence of polyphenolic compounds. $*p<0.05$, $**p<0.005$ compared with Control culture.

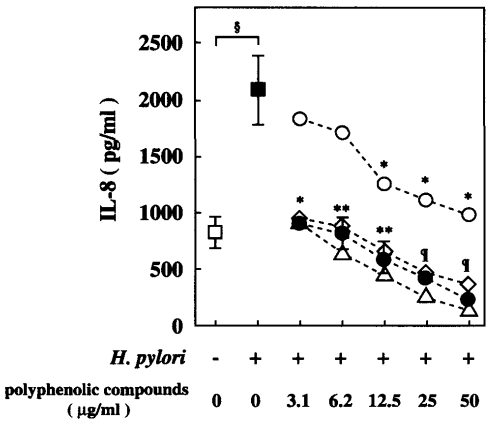

Fig. 5. Inhibitory effects of polyphenolic compounds on IL-8 production by *H. pylori*-infected MKN 45 cells. MKN 45 cells were exposed to polyphenolic compounds (ODS fraction ●, F1 ○, F2 △ and F3 ◇) for 1 h, and then cocultured with *H. pylori* for 6 h. Levels of IL-8 in the cultured supernatants were determined by sandwich ELISA. IL-8 production by MKN 45 cells was significantly induced by *H. pylori* infection ($^{\$}p<0.0005$). $*p<0.05$, $**p<0.01$, ¶ $p<0.005$ compared with control culture (■).

る．感染の第一段階は，*H. pylori* の胃粘膜組織への接着であるが，トチノキ種皮ポリフェノールに，*H. pylori* に対する抗菌作用だけでなく，胃粘膜細胞への接着を抑制する作用が認められれば，有効性がより高まると考え，本研究では *in vitro* において，胃癌細胞株 MKN 45 に対する *H. pylori* の接着抑制作用を検討した．

はじめにトチノキ種皮抽出物を ODS クロマトにて分画した標品の，*H. pylori* に対する最小生育阻止濃度（MIC）を測定した．ポリフェノールを含まない通常の寒天平板上では，培養 3 日目頃からコロニーの形成が認められ，培養 4 日目頃にはコロニー計測が充分可能となるのに対し，今回の試験では培養期間を 7 日に延長した上で，実体顕微鏡下での確認を行った．結果として分画物 180μg/ml を含む寒天平板上での生育が完全に阻害された．しかし，100μg/ml 以上の濃度でも寒天平板上に認められるコロニーは極めて小さく，さらに 140μg/ml 以上では肉眼での観察は困難であった．また，160μg/ml の ODS 分画物を含む寒天平板上に認められたコロニーを回収し，通常の培養を試みたが増殖が見られなかった．本来桿菌である *H. pylori* が，ポリフェノールの添加培養により球菌状に形態が変化し[8]，球菌状に変化した *H. pylori* は増殖が出来ない[15] ことが報告されている．これらの報告と，今回認められた現象から，トチノキ種皮ポリフェノールは，180μg/ml 以上の濃度で殺菌作用を有するだけでなく，100μg/ml 以上でも菌の形態に変化を与えることによって，*H. pylori* に対して充分な抗菌作用を示すと考えられる．

次に，*H. pylori* の胃癌細胞株 MKN 45 に対するトチノキ種皮ポリフェノールの接着抑制作用を，培養した MKN 45 細胞に ODS 分画物と *H. pylori* を同時添加し，2 時間後の MKN 45 細胞に接着した *H. pylori* 量を Cell-EIA 系で判定することにより検討した．その結果，ODS 分画物が *H. pylori* の MKN 45 細胞への接着を濃度依存的に，しかも抗菌作用が認められない低濃度で抑制することがわかった．さらに，Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにより分画した画分（F1～F3）についても接着抑制作用を確認した結果，F1 では高濃度でもあまり接着抑制作用は認められなかったが，F2 および F3 に ODS 分画物同様，濃度依存的な接着抑制作用が認められた．さらに，F3 は，F2 よりも低濃度で高い接着抑制作用が認められた．今回，最も高い接着抑制作用が認められた F3 は，特に重合度の高いポリフェノールが含まれる画分であり，カテキン，エピカテキンといった低分子のものよりも，これらの重合体であるプロアントシアニジンで作用が高く，さらにプロアントシアニジンにおいても，重合度の高いものの方がより高い接着抑制作用を有することが示された．斉藤ら[16] は，豆類種皮の重合ポリフェノールの割合を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーで検討し，最も重合ポリフェノールが多いもので 63% と報告している．我々はこれまでに，トチノキ種皮ポリフェノールに含まれる全ポリフェノールのうち，97% が重合ポリフェノールであることを明らかにしており[6]，トチノキ種皮ポリフェノールでは重合ポリフェノールの割合がかなり高いと考えている．これらの結果から，他の植物と比較して，トチノキ種皮が高い抗 *H. pylori* 作用を有する素材として有効である可能性が示唆された．

一方，前述の通りトチノキ種皮ポリフェノールには，*H.*

NII-Electronic Library Service

The Japanese Society of Pharmacognosy

pylori に対する強い抗菌作用が認められている．今回行った試験系において，両者の共存時間がプレインキュベートと合わせて2.5時間と比較的長いことから，接着抑制は抗菌作用によるものである可能性も考えられた．そこで，両者を2.5時間共存させた後の *H. pylori* を培養し，コロニー形成試験により生存率を測定した．その結果，ODS分画物50 μg/mlでは *H. pylori* の生存率は70%程度まで低下していたが，25 μg/ml以下の濃度では生存率にほとんど変化が見られなかった．このことから，25 μg/ml以下の濃度で見られる接着抑制作用は，*H. pylori* に対する抗菌作用である可能性は低いと考えられる．

H. pylori の細胞への感染には，まず血液型抗原結合アドヘジン（blood group antigen-binding adhesin: BabA）と呼ばれる *H. pylori* 膜外タンパク質と，上皮細胞表面やムチン糖タンパク質に発現するルイスB（Lewis B: Le^b）抗原の結合（BabA/Le^b結合）が関与していると考えられている[17,18]．さらに *H. pylori* 感染によって，*H. pylori* が有するシアル酸結合アドヘジン（sialic acid-binding adhesin: SabA）のリガンドである sialyl $Lewis^x$（sLe^x）糖鎖の発現が上昇し，SabA/sLe^x結合によって持続的な感染が成立すると言われている[19,20]．また，*H. pylori* の菌体表層部にはウレアーゼが局在し，尿素からのアンモニア産生が可能となっている．このアンモニアによって局所的に胃液を中和することで，胃内部の酸性条件下でも生存が可能となっているが，このウレアーゼがアドヘジンとして作用していると言われている[21,22]．その他にも，*H. pylori* と細胞との接着には，フコース[23]や硫酸化糖[24]の関与が報告されているが，一方で関連を否定する報告[25~28]も多く，未だ不明な点が多い．

ポリフェノールはタンパク質と結合して変性させる収斂作用を有するが，その結合力はタンパク質の分子量や等電点だけでなく，ポリフェノールの分子量や重合度にも左右されるといわれており[29,30]，このポリフェノールによる収斂効果が，菌体あるいは細胞表面の接着関連因子を変性させ，その結果として接着抑制作用が認められた可能性も考えられる．今回認められたトチノキ種皮ポリフェノールによる接着抑制が，どういった接着関連因子に作用しているのかは，今後の検討課題と考えている．

H. Shmuely ら[31]は *H. pylori* 感染者から分離した83種の *H. pylori* 菌株を対象に，タンニン様物質が豊富なクランベリージュースの高分子量画分について接着抑制作用を検討し，単独あるいは既存の抗生物質との併用で，多くの菌株に対し，高い接着抑制効果が認められたことを報告している．今回の我々の試験は *H. pylori* 標準株1種類によるものであるが，トチノキ種皮ポリフェノールの特に重合度の高い画分と *H. pylori* に対する抗生物質を併用することにより，臨床分離株に対する高い効果が充分に期待できると思われる．今後，臨床分離株を含めたより多くの菌株に対する抗生物質との併用による接着抑制効果の確認と，実際の動物感染モデルにおける感染抑制効果についても検討したいと考えている．

H. pylori は胃上皮細胞への接着により，IL-8などのケモカイン産生を誘導することによって感染局所へのリンパ球や好中球などの浸潤を促し，胃粘膜の炎症を引き起こす[32,33]．抗潰瘍薬であるラフチジン[(+/−)-2-(furfurylsulfinyl)-N-(4-(4-(piperidinomethyl)-2-pyridyl)oxy-(Z)-2-butenyl) acetamide]は，*H. pylori* 接着によって誘導されるMKN 45細胞からのIL-8の産生を低下させるが，その作用は *H. pylori* の接着抑制によるものとされている[14]．今回，同様の系を用いてMKN 45細胞からのIL-8産生量を測定したところ，トチノキ種皮ポリフェノール処理により，*H. pylori* 感染によって増強されるMKN 45細胞からのIL-8産生が有意に抑制されることが確認された．MKN 45細胞と *H. pylori* との接着抑制作用が高い標品でIL-8産生抑制作用が高い傾向にあることから，このIL-8産生抑制作用はトチノキ種皮ポリフェノールによる接着抑制作用が関与している可能性が示唆された．また，MKN 45細胞は *H. pylori* が感染していない場合にも一定量のIL-8を産生するが，トチノキ種皮ポリフェノールで処理することにより，その自発的な産生も抑制することが確認された．今回試験に用いたポリフェノール濃度では，MKN 45細胞に対する傷害性は認められないことから，トチノキ種皮ポリフェノールは，*H. pylori* の接着を抑制するだけでなく，MKN 45細胞にも直接作用し，MKN 45細胞が恒常的に産生しているIL-8も抑制したものと思われる．このことから，トチノキ種皮ポリフェノールは宿主側に対する抗炎症作用にも効果を示す可能性が示された．

トチノミは古来より食品として摂取されていることからも，*H. pylori* が関与する様々な病気予防のための安全で手軽な機能性食品素材としての有用性が高いと考えられる．

文　献

1) Warren J.R., Marshall B., *Lancet,* **i**, 1273-1275 (1983).
2) Hashimoto T., Aga H., Chaen H., Fukuda S., Kurimoto M., *Natural Medicines,* **53**, 27-31 (1999).
3) Kataoka M., Hirata K., Kunikata T., Ushio S., Iwaki K., Ohashi K., Ikeda M., Kurimoto M., *J. Gastroenterol.,* **36**, 5-9 (2001).
4) Kimura H., Watanabe A., Jisaka M., Yamamoto T., Kimura Y., Katsube T., Yokota K., *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi,* **51**, 672-679 (2004).
5) Kimura H., Jisaka M., Kimura Y., Katsube T., Yokota K., *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi,* **53**, 31-38 (2006).
6) Ogawa S., Kimura H., Niimi A., Jisaka M., Katsube T., Yokota K., *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi,* **56**, 95-102 (2009).
7) Kimura H., Ogawa S., Niimi A., Jisaka M., Katsube T., Yokota K., *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi,* **56**, 483-489 (2009).
8) Matsushima M., Suzuki T., Masui A., Kasai K., Kouchi T., Takagi A., Shirai T., Mine T., *J. Gastroenterol. Hepatol.,* **23** (Suppl.), S175-S180 (2008).
9) Beil W., Birkholz C., Sewing K.F., *Arzneimittelforschung,* **45**, 697-700 (1995).

NII-Electronic Library Service

10) Yamahara J., Shintani Y., Konoshima T., Sawada T., Fujimura H., *Yakugaku Zasshi,* **95**, 1179-1182 (1975).
11) Borrelli F., Izzo A.A., *Phytother. Res.,* **14**, 581-591 (2000).
12) Matsubara S., Shibata H., Ishikawa F., Yokokura T., Takahashi M., Sugimura T., Wakabayashi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **310**, 715-719 (2003).
13) Takahata Y., Ohnishi-Kameyama M., Furuta S., Takahashi M., Suda I., *J. Agric. Food Chem.,* **49**, 5843-5847 (2001).
14) Nozawa Y., Nishihara K., Akizawa Y., Orimoto N., Nakano M., Uji T., Ajioka H., Kanda A., Matsuura N., Kiniwa M., *J. Gastroenterol. Hepatol.,* **19**, 506-511 (2004).
15) Chan W.Y., Hui P.K., Leung K.M., Chow J., Kwok F., Ng C.S., *Am. J. Clin. Pathol.,* **102**, 503-507 (1994).
16) Saito Y., Nishi S., Koaze H., Hironaka K., Kojima M., *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi,* **54**, 563-567 (2007).
17) Borén T., Falk P., Roth K.A., Larson G., Normark S., *Science,* **262**, 1892-1895 (1993).
18) Ilver D., Arnqvist A., Ogren J., Frick I.M., Kersulyte D., Incecik E.T., Berg D.E., Covacci A., Engstrand L., Borén T., *Science,* **279**, 373-377 (1998).
19) Marcos N.T., Magalhães A., Ferreira B., Oliveira M.J., Carvalho A.S., Mendes N., Gilmartin T., Head S.R., Figueiredo C., David L., Santos-Silva F., Reis C.A., *J. Clin. Invest.,* **118**, 2325-2336 (2008).
20) Mahdavi J., Sondén B., Hurtig M., Olfat F.O., Forsberg L., Roche N., Angström J., Larsson T., Teneberg S., Karlsson K., Altraja S., Wadström T., Kersulyte D., Berg D.E., Dubois A., Petersson C., Magnusson K., Norberg T., Lindh F., Lundskog B.B., Arnqvist A., Hammarström L., Borén T., *Science,* **297**, 573-578 (2002).
21) Eaton K.A., Krakowka S., *Infect. Immun.,* **62**, 3604-3607 (1994).
22) Fauchere J.L., Blaser M.J., *Microb. Pathog.,* **9**, 427-439 (1990).
23) Falk P., Roth K.A., Borén T., Westblom T.U., Gordon J.I., Normark S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **90**, 2035-2039 (1993).
24) Slomiany B.L., Piotrowski J., Samanta A., VanHorn K., Murty V.L., Slomiany A., *Biochem. Int.,* **19**, 929-936 (1989).
25) Clyne M., Drumn B., *Infect. Immun.,* **64**, 2817-2820 (1996).
26) Niv Y., Fraser G., Delpre G., Neeman A., Leiser A., Samra Z., Scapa E., Gilon E., Bar-Shany S., *Am. J. Gastroenterol.,* **91**, 101-104 (1996).
27) Kamisago S., Iwamori M., Tai T., Mitamura K., Yazaki Y., Sugano K., *Infect. Immun.,* **64**, 624-628 (1996).
28) Kobayashi Y., Okazaki K., Murakami K., *Infect. Immun.,* **61**, 4058-4063 (1993).
29) Hagerman A.E., Butler L.G., *J. Biol. Chem.,* **256**, 4494-4497 (1981).
30) Jöbstl E., O'Connell J., Fairclough J.P., Williamson M.P., *Biomacromolecules,* **5**, 942-949 (2004).
31) Shmuely H., Burger O., Neeman I., Yahav J., Samra Z., Niv Y., Sharon N., Weiss E., Athamna A., Tabak M., Ofek I., *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.,* **50**, 231-235 (2004).
32) Tummura M.K.R., Cover T.L., Blaser M.J., *Infect. Immun.,* **61**, 1799-1809 (1993).
33) Crabtree J.E., Farmery S.M., Lindley I.J., Figura N., Peichl P., Tompkins D.S., *J. Clin. Pathol.,* **47**, 945-950 (1994).

NII-Electronic Library Service