

Helicobacter pylori 感染マウスに対する大豆ペプチドの影響

朴 雅美・井上正康*

大阪市立大学大学院医学研究科

Effect of Soybean Peptide Fractions on the *Helicobacter pylori*-infected Mice

Ah-Mee PARK and Masayasu INOUE

Osaka City University Medical School, Osaka 545-8585

ABSTRACT

Helicobacter pylori (*H. pylori*), a gram-negative and microaerobic bacterium, plays important roles in the pathogenesis of gastritis, peptic ulcer and gastric cancer. We previously reported that some fractions of soy bean peptides have bacteriostatic effect on *H. pylori* *in vitro*. The present work studied the effect of soy bean peptide fractions on the growth of *H. pylori* infected in mice. Effect of oral administration of fraction S peptides on the growth of *H. pylori* infected in c57BL/6j mice was analyzed *in vitro*. *H. pylori* infectivity and antioxidants were assayed. Plasma levels of antibody against *H. pylori* and reactive oxygen species generated by blood neutrophils increased in *H. pylori*-infected mice. Administration of S fraction of soy bean enhanced these changes induced by *H. pylori*. Plasma levels of ascorbic acid were increased by the conformation of *H. pylori* infection and administration of fraction S peptides. These results suggest that, although the fraction S peptides of soy bean exhibited the appearance actions against *H. pylori*, such effect is not achieved in infected mice. *In vivo* effects of other peptides fractions of soy bean on the infected *H. pylori* should be studied further. *Soy Protein Research, Japan* 4, 77-82, 2001.

Key words : *Helicobacter pylori*, soybean peptide, antioxidant, antibacterial

Helicobacter pylori (*H. pylori*) は胃の粘膜層に生息する螺旋状桿菌で、胃炎や胃潰瘍さらには胃がんの原因ともなりうる細菌として知られている^{1,2)}。本菌は酸素ストレスの強い環境下では球状化して増殖能が低下する。桿状体では O_2^- を、球状体では $\cdot OH$ を産生することがこれまでの我々の研究から明らかになっている³⁾。

また、*H. pylori* 感染により胃粘膜への好中球などの浸潤が起こることや種々のサイトカインや iNOS などが増加することで炎症部位では、NO、 O_2^- 、ONOO $^-$ などが増加する。

本菌の除菌は主に抗生物質 2 剤とプロトンポンプインヒビターを用いて行われる。また、アスコルビン酸や緑茶のカテキン類などにも抗菌作用があることが知られており⁴⁾、我々が通常摂取している食物中にも抗

*〒 545-8585 大阪市阿倍野区旭町 1-4-3

菌作用を有するものが存在する可能性がある。本菌の生息場所や傷害作用の面から考え、食物由来の抗菌作用成分の検討は非常に重要と考えられる。

昨年度の研究結果から大豆ペプチドの不溶性画分中に *H. pylori* に抗菌作用を有するものが見つかった⁵⁾。そこで本研究では *H. pylori* 感染マウスに大豆ペプチド S 画分を投与することによる除菌効果や活性酸素代謝動態への影響を検討した。

方 法

H. pylori 感染マウスの作成と S 画分投与

菌株は *H. pylori* シドニー株を用いた。6 週齢の雌性 c57BL/6j に経口ゾンデを用いて胃腔内に *H. pylori* 1×10^9 個投与を 1 日 1 回、6 日間行った。非感染群、感染群を各々 2 群に分け、それぞれの一群を S 画分投与群とし、18 週齢から飲料水中に 5% となるよう S 画分を混ぜ自由摂水とし 7 週間飼育した。

感染の確認

感染後 12 週間後 (18 週齢) および S 画分投与後 7 週間 (24 週齢) のマウスから採血を行い、ELISA 法⁶⁾ により抗体価の測定を行った。また、25 週齢で屠殺後、胃を尿素、フェノールレッドを含む pH 6.5 の寒天に入れ *H. pylori* のウレアーゼ活性によるフェノールレッドの色変化を指標に感染の確認を行った。

マウス全血の活性酸素産生測定

全血をマウスオプソニン化ザイモザンで刺激したときの化学発光プローブ L012 (0.4 mM) の化学発光値を Luminescence Reader (アロカ社) で測定した⁷⁾。

アスコルビン酸の測定

屠殺後、肝、腎、全血および血漿各々を終濃度 5% トリクロロ酢酸 (TCA) により除たん白を行い、HPLC により測定した。

血漿中 NOx 濃度の測定

血漿中 NO_3^- を還元酵素により NO_2^- に変換した後、50% メタノールで除たん白し、同仁化学研究所のグリース試薬キットにより測定した。

遊離チオール濃度の測定

肝、腎、全血および血漿各々を終濃度 5% TCA により除たん白したサンプルを用い、SH はジチオビス 2-ニトロ安息香酸 (DTNB) の 412 nm の吸光度測定により、グルタチオン (GSH) は酸化型グルタチオン還元酵素共存下での DTNB の 412 nm の吸光度変化速度測定により濃度を算出した。

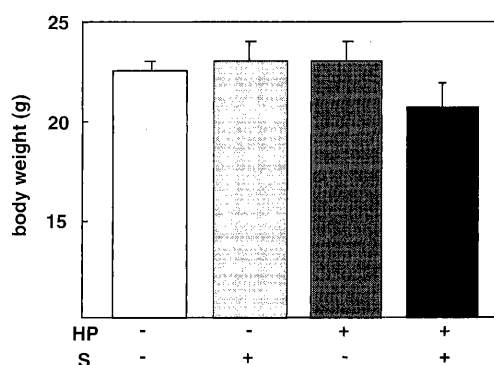


Fig. 1. Effect of *H. pylori*-infection and peptide fraction S on the body weight of mice. C57BL/6j mice aged 6-weeks were infected 6 times with 10^9 *H. pylori* by intragastric inoculation. After 12 weeks of *H. pylori* infections, peptide fraction S was administered daily with 5% in water for 7 weeks. At mice aged 25 weeks, body weight was measured. Each value represents mean \pm SD.

結果と考察

H. pylori 感染マウスの体重変化

S 画分を投与した *H. pylori* 感染マウスにおいて体重の減少が認められた (Fig. 1)。本群では半数に脱毛も認められたことから、何らかの強いストレスがかかっていたことが考えられるが、このストレスが *H. pylori* 感染と S 画分投与によるものか否かは不明である。

屠殺後、胃を摘出し内容物を生理食塩水で洗浄した。胃にはほとんど炎症像が認められなかった。*H. pylori* 感染モデルでは、感染後約半年以降で炎症などが認められるとの報告がなされていることと一致している。

S 画分投与による *H. pylori* 除菌効果の検討

H. pylori 感染後 18 週齢のマウス血清中の *H. pylori* に対する抗体価を測定することで *H. pylori* の感染が確認された (Fig. 2a)。その後 S 画分を 6 週間投与した後の同抗体価を Fig. 2b に示した。*H. pylori* 感染群では S 画分投与により、抗体価が増加した。抗体価の増加が胃内での *H. pylori* 菌数の増加を直接反映しているかは不明であるため、屠殺後に胃のウレアーゼ活性を指標とした感染チェックを行ったところ、同様の結果が得られた (data not shown)。このことから、*in vitro* では *H. pylori* に対して抗菌活性を示した S 画分であったが、感染マウスに対しては *H. pylori* 抗菌活性を示さないことが明らかとなった。

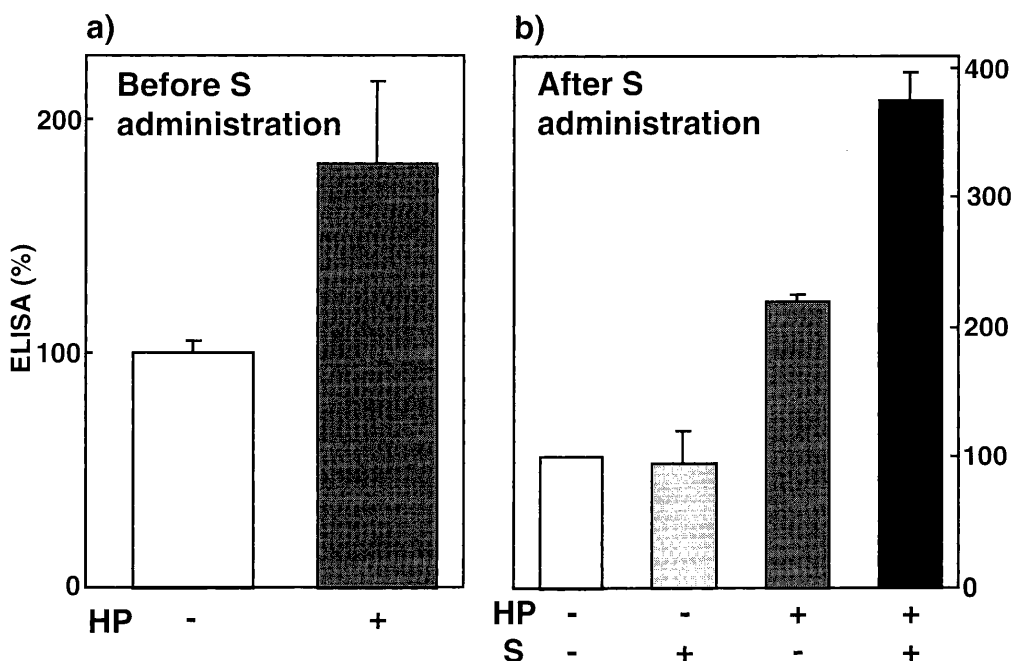


Fig. 2. Effect of peptide fraction S on antibody to *H. pylori* in *H. pylori*-infected mice. After 12 weeks of *H. pylori* infections (a) and after 6 weeks of the administration of peptide fraction S (b), plasma levels of antibody to this bacterium were determined. Other conditions were as in Fig. 1. Each value represents mean ± SD.

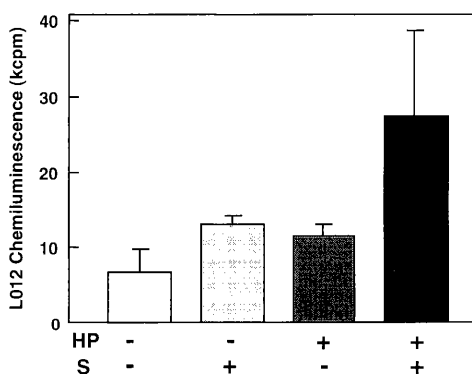


Fig. 3. Effects of *H. pylori*-infection and peptide fraction S on whole blood active oxygen generation by neutrophils. Generation of active oxygen species by blood neutrophils was monitored by the chemiluminescence method using 0.4 mM L012 at 37°C. Each value represents mean ± SD. Other conditions were as in Fig. 1.

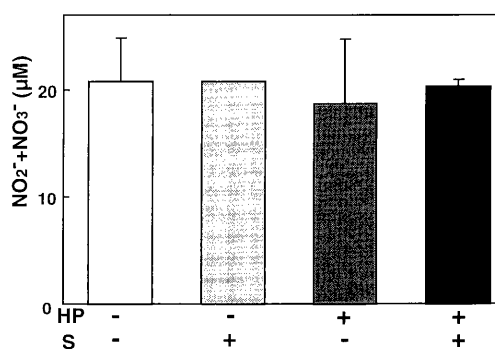


Fig. 4. Changes in plasma levels of NO metabolites. At the age of 25 weeks, plasma levels of NO metabolites (NO₂⁻ + NO₃⁻, NO_x) were measured by Griess method. Each value represents mean ± SD. Other conditions were as in Fig. 1.

マウス全血の活性酸素産生測定

コントロールに比べて感染群では活性酸素産生が1.7倍に増加していた。また、*H. pylori* 感染+, S画分+では約4倍に増加していた (Fig. 3)。この増加は、*H. pylori* 感染だけでなく本群のストレスとも関連があると考えられる。

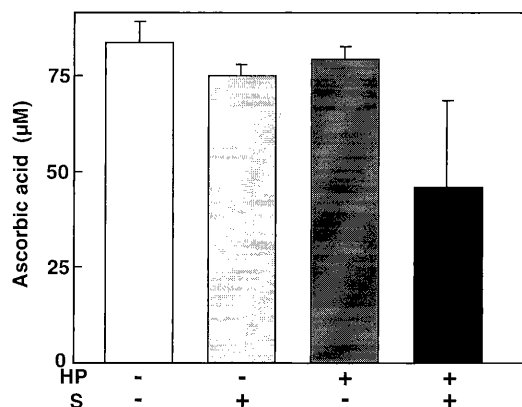


Fig. 5. Effects of *H. pylori*-infection and peptide fraction S on plasma levels of ascorbic acid. Plasma levels of ascorbic acid were measured by HPLC method. Each value represents mean \pm SD. Other conditions were as in Fig. 1.

血漿中 NOx 濃度の測定

いずれの群でも NOx の増加はみられなかった (Fig. 4)。*H. pylori* 感染により胃内で iNOS の誘導が起こることが分かっているが、今回測定を行った血漿中では変化がないことが分かった。

血中および血漿中のアスコルビン酸および遊離チオールの測定

H. pylori 感染により、胃内のアスコルビン酸濃度が低下することが報告されているが、血漿中のアスコルビン酸濃度に関しては一定した結果が報告されていない。本実験では感染による低下は認められなかったが、*H. pylori* 感染+, S画分+群では著明な低下が認められた (Fig. 5)。特に血漿中の *H. pylori* 抗体価が高かったマウスではアスコルビン酸濃度が低下していた。このことから感染の強度とアスコルビン酸の濃度には相関性がある可能性が示唆された。また、同マウスでは活性酸素産生が著明に増加していた。

遊離チオールは全血では4群で差は認められなかった (Fig. 6a)。しかし、血漿中SHはS画分投与、非投与に関係なく *H. pylori* 感染マウスで減少していた (Fig. 6b)。

肝、腎でのアスコルビン酸および遊離チオールの測定

腎では、SH, GSH, アスコルビン酸濃度いずれも *H. pylori* 感染により低下していた (Fig. 7)。このこと

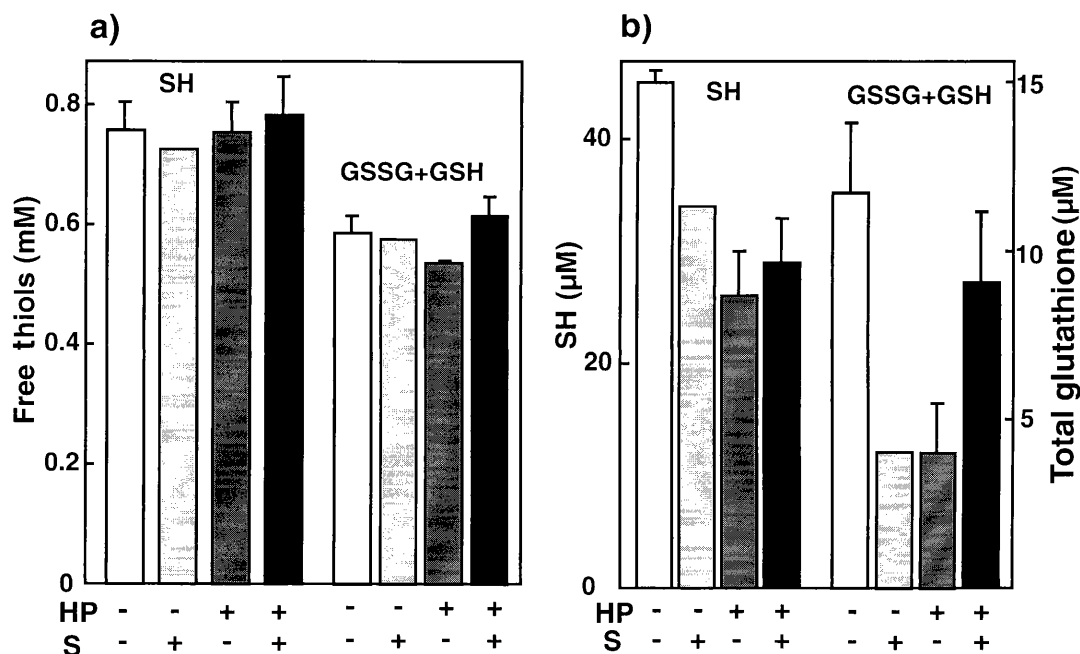


Fig. 6. Effects of *H. pylori*-infection and peptide fraction S on glutathione status in blood and plasma. At the age of 25 weeks, levels of glutathione and free thiols in whole blood (a) and plasma (b) were determined. Each value represents mean \pm SD. Other conditions were as in Fig. 1.

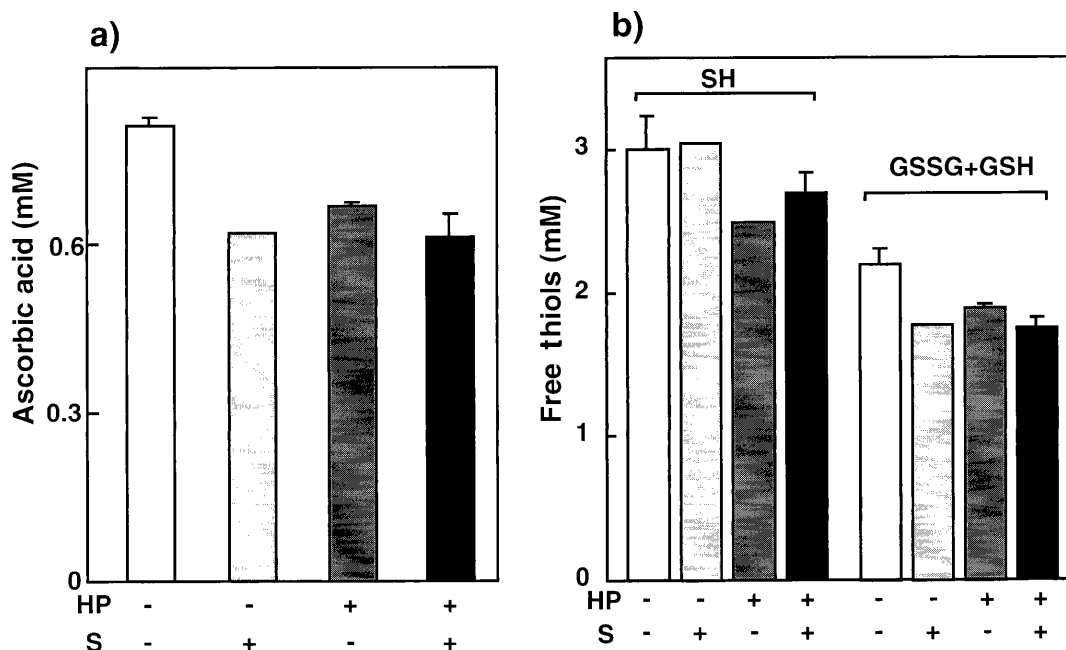


Fig. 7. Effects of *H. pylori*-infection and peptide fraction S on the renal levels of antioxidants. At the age of 25 weeks, renal levels of ascorbic acid (a) and glutathione (b) were determined as in Fig. 5. Each value represents mean \pm SD.

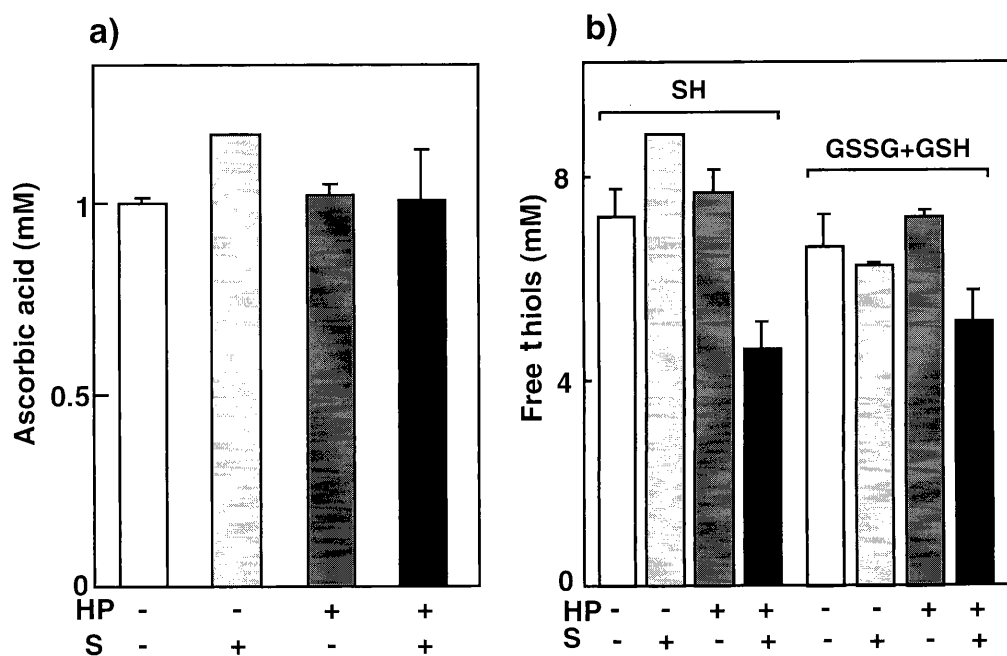


Fig. 8. Effects of *H. pylori*-infection and peptide fraction S on the hepatic levels of antioxidants. At the age of 25 weeks, hepatic levels of ascorbic acid (a) and glutathione (b) were determined as in Fig. 5. Each value represents mean \pm SD.

から、腎は感染による活性酸素毒性の影響を受け易いと考えられた。

肝では *H. pylori* 感染+, S 画分+群でグルタチオンの低下が認められた。生体内で酸化されたアスコルビン

酸は肝でグルタチオンを利用して還元され再利用される。このことから本群での肝グルタチオン濃度の低下が血漿中のアスコルビン酸濃度の低下と関連していることが考えられた (Fig. 8)。

要 約

大豆の不溶性ペプチド S 画分は *in vitro* では *H. pylori* に対して強い抗菌活性を示した。しかし、*H. pylori* 感染マウスに対しては抗菌作用は認められなかった。本研究で *H. pylori* 感染により血中と腎で抗酸化物質の著明な低下が認められ、一部のものに対しては S 画分による回復が認められたが、悪化しているものもあった。本研究では S 画分のみの影響を検討したが、他の大豆ペプチドの *H. pylori* やその感染マウスに対する検討も必要である。

文 献

- 1) Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, Gelb AB, Warnke RA, Jellum E, Orentlich N, Vogelmann JH and Friedman GD (1994) : *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med*, **330**, 1267-1271.
- 2) Hahm KB, Lee KJ, Kim JH, Cho SW and Chung MH (1998) : *Helicobacter pylori* infection, oxidative DNA damage, gastric carcinogenesis, and reversibility by rebamipide. *Dig Dis Sci*, **43**, 72S-77S.
- 3) Nakamura A, Park A, Nagata K, Sato EF, Kashiba M, Tamura T and Inoue M (2000) : Oxidative cellular damage associated with transformation of *Helicobacter pylori* from a bacillary to a coccoid form *Free Radical Biol Med*, **28**, 1611-1618.
- 4) Zhang HM, Wasaka N, Maeda O and Yamamoto T (1997) : Vitamin C Inhibits the growth of bacterial risk factor for gastric carcinoma: *Helicobacter pylori*. *Cancer*, **80**, 1897-1903.
- 5) 朴 雅美, 井上正康 (2000) : *Helicobacter pylori* に対する大豆ペプチドの影響. 大豆たん白質研究, **3**, 63-66.
- 6) Wang X, Sturegard E, Rupar R, Nilsson HO, Aleljung PA, Carlen B, Willen R and Wadstrom T (1997) : Infection of BALB/c A mice by spiral and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol*, **46**, 657-663.
- 7) Imada I, Sato FE, Miyamoto M, Ichimori Y, Minamiyama Y, Konaka T and Inoue M (1999) : Analysis of reactive oxygen species generated by neutrophils using a chemiluminescence probe L-012. *Anal Biochem*, **271**, 53-58.