

氏 名	ほそ だ こう いち 細 田 浩 一
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 480 号
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 18 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	ビタミン D ₃ 分解産物中に見出された抗ピロリ菌物質の同定および その特性
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 浜 本 敏 郎 (委 員) 教 授 國 田 智 教 授 武 藤 弘 行

論文内容の要旨

1 研究目的

ピロリ菌は、ヒトに感染し慢性萎縮性胃炎および消化性潰瘍を惹起する病原性細菌である。従って、上記した消化器病を予防・治療する上で本菌の除菌は重要である。しかしながら、ピロリ菌除菌治療に汎用される広域スペクトルの抗菌薬は、常在細菌叢のバランスを崩し、本菌感染者に対して口内炎や下痢などの副作用をしばしば誘発する。この治療上の問題を解決するには、ピロリ菌に対して選択的且つ効果的に作用する抗菌薬の開発が必要である。以前の研究において筆者らは、ピロリ菌細胞膜脂質のミリストイルホスファチジルエタノールアミン (MPE) に対して結合親和性を示し、本菌の膜構造を不安定化させ、ついには本菌を殺菌するステロイド化合物をいくつか発見した。それらステロイド化合物の中には、セコステロイドと呼ばれるビタミン D₃ およびその誘導体も含まれた。しかしながら、ビタミン D₃ およびその誘導体は、化学構造的に非常に不安定な物質であり、熱や光によって容易に分解されることから、ビタミン D₃ およびその誘導体の抗ピロリ菌作用が、それらの分子自身の直接作用であるのか、或いはビタミン D₃ およびその誘導体から生じる何らかの分解産物に由来する間接的な作用であるのかを見極める必要があった。そこで、本研究において筆者らは、ビタミン D₃ およびその誘導体の抗ピロリ菌活性について詳細な検討をおこなった。

2 研究方法

菌数 (CFU) は、定法に従って測定された。菌液濁度は、波長 660 nm の吸光度によって測定された。疎水性物質は、有機溶媒分配法によって抽出され、薄層クロマトグラフィー (TLC) によって解析された。溶液中の遊離型コレステロール (FC) は、塩化第二鉄-硫酸法によって定量された。クーマシー・ブリリアント・ブルー (CBB) を用いて菌細胞が染色された。CBB 包含 PE ベシクルは、CBB 溶液中で PE ベシクルを超音波処理することにより調製された。CBB 包含 PE ベシクルの崩壊は、ベシクル上清の CBB を波長 590 nm の吸光度を測定することによって評価された。ビタミン D₃ およびその誘導体の分解は、70°C の蒸留水中でおこなわれた。ビタミン D₃ 分解産物 (VDP1 および VDP2) は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法によって精製された。ヒト細胞の生存性は、MTT 試薬を用いて評価された。ヒト細胞の培養上清中のサイトケラチン分解産物

(ccK18) は、酵素結合免疫吸着法 (ELISA) によって定量された。ヒト細胞の一過性受容体電位パニロイド 6 型 (TRPV6) タンパク質は、ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 後のウェスタン・ブロット法により検出された。VDP1 の化学構造は、核磁気共鳴 (NMR) 法によって決定された。VDP1 の化学合成は、塩化ルテニウムを触媒としたビタミン D₃ の酸化反応によってなされた。精製 VDP1 および合成 VDP1 の化学構造は、ガスクロマトグラフ質量分析 (GC-MS) によって比較された。

3 研究成果

本研究において筆者らは、ビタミン D₃ 誘導体の抗ピロリ菌活性は、それら誘導体自身の活性であること、ビタミン D₃ の抗ピロリ菌活性は、その分子自身の活性ではなく、蒸留水中で生じるビタミン D₃ 分解産物に由来すること、その分解産物の一つである VDP1 が、ピロリ菌の主要な膜構成脂質成分の MPE に対して結合親和性を示し、本菌を溶菌させること、VDP1 の溶菌作用はピロリ菌に対して選択的であり、腸内細菌科細菌を含む他の一般的な細菌種に対しては認められないこと、VDP1 は、既存の抗生物質よりも極めて迅速にピロリ菌を殺菌すること、ヒト細胞に対するビタミン D₃ 様活性を欠如することを明らかにした。

4 考察

本研究において検討したビタミン D₃ 誘導体 (25-ヒドロキシビタミン D₃ および 1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D₃) は、血中カルシウムイオン濃度の恒常性維持及び骨代謝において重要な役割を果たす、いわゆるステロイドホルモンの一種である。筆者らは、これらビタミン D₃ 誘導体に、ホルモン活性とは別に、抗ピロリ菌活性があることを発見した。ピロリ菌の人への自然感染は、腸管免疫の未熟な乳児あるいは小児において成立し、腸管免疫の成熟した成人ではほとんど成立しないとされている。また、これとは別に、栄養学的観点からの研究は、血中ビタミン D₃ 誘導体濃度の極端に低い小児が、特に貧困層において、少なからず認められていることを示している。筆者らの研究を含むこれらの研究成果は、小児におけるピロリ菌感染陽性率と血中ビタミン D₃ 誘導体濃度との関係を疫学的に調査する必要性を示唆するかもしれない。

PE は、細菌細胞膜を構成する最も主要なグリセロリン脂質成分である。腸内細菌科細菌を含む一般的な細菌種の PE の飽和脂肪酸側鎖は、パルミチン酸であるのに対して、ピロリ菌 PE の飽和脂肪酸側鎖は、ミリスチン酸である。即ち、ピロリ菌細胞膜を構成する PE 組成は、他の一般的な細菌の細胞膜を構成する PE 組成とは全く異なる。本研究において同定されたビタミン D₃ 分解産物の VDP1 は、ミリストイル PE (MPE) に対して結合親和性を示し、ピロリ菌の細胞膜構造の不安定化を誘導し、本菌を選択的に溶菌させることが明らかとなった。このことは、VDP1 が、ヒトの常在細菌叢には全く影響せず、ピロリ菌を選択的に除菌する狭域スペクトルの抗菌薬となり得る可能性を示す。また PE の脂肪酸組成として保持しているのかは不明であるが、ピロリ菌以外の他のヘリコバクター属細菌もミリスチン酸を主要な脂肪酸組成として菌体に保持することが報告されている。このことは、MPE を主要な PE 分子種として保持する他のヘリコバクター属細菌に対しても、VDP1 が優れた抗菌効果を発揮する可能性を示唆する。今後、さらなる研究として、ピロリ菌感染マウスモデルを構築し、生体内における VDP1 のピロリ菌除菌効果を検討すると共に、他のヘリコバクター属細菌に対する VDP1 の抗菌活性についても検討する必要がある。

5 結論

本研究において筆者らは、腸内細菌科細菌を含む一般的な細菌種の生存には全く影響せず、ピロリ菌に対して優れた殺菌効果を発揮する抗菌物質 (VDP1) をビタミン D₃ 分解産物中に見出し、その物質の精製および化学構造の決定に成功した。このことは、VDP1 が、ピロリ菌除菌治療に特化した抗菌薬の開発において、有用な基本母核構造体となり得ることを示す。

論文審査の結果の要旨

本研究はピロリ菌の除菌のための新たな薬剤の開発を目的として、従来、ピロリ菌に対して特異的抗菌作用をもつとされるステロイド化合物の中で、ビタミン D に着目し、その抗菌作用を調べる中で、ビタミン D₃ より、むしろその分解産物に強い抗菌作用があることを見出し、分解産物のうちの一つ VDP1 を精製し、化学構造を決定した。これは既知の化合物であったが、ピロリ菌に対して殺菌的に働き、ヒト培養細胞に対して毒性が比較的小さく、かつビタミン D 様作用もないことを明らかにした。VDP1 自体の培地中でのピロリ菌に対する最小殺菌濃度は比較的大きいが、これらの性質から、ピロリ菌特異的な除菌を行う誘導体を得る端緒となる可能性は大きいと認められる。委員より、1) 主論文の共同研究者が行った化合物同定に関する部分のデータの体裁および、2) 考察中、先行研究でビタミン D 投与とピロリ菌の疫学的研究について本研究とは作用機序が異なるのではないか、と指摘があったが、適正に修正されたので合格とした。

最終試験の結果の要旨

研究の背景の説明などで、ピロリ菌の性質のみならず、ピロリ菌感染の臨床的扱いや、現行の除菌法の問題点などについて十分な知識があることが認められた。今後の研究の進め方について、ピロリ菌の動物感染モデルが困難であることから、類縁菌を用いた動物感染モデルを検討するなど、この分野で研究を推進していく上で十分な知識と技能を備えていると認められ、合格とした。