

## プロバイオティクスと卵黄抗体併用の ピロリ菌抑制効果について

古賀 泰裕\* 梅田 浩二\*\* 兒玉 義勝\*\*

Hyuk-Joon Choi\*\*\* Seung-Hwan Jeong\*\*\*\*

### はじめに

1982年、オーストラリアの Warren と Marshall により慢性胃炎患者の胃粘膜からピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) が発見された。その後の研究によりピロリ菌は世界の人口の半分に感染しており、胃十二指腸潰瘍および胃癌発症の主要な原因となる病原菌であることがわかった。さらに特発性血小板減少症などの胃十二指腸以外の疾病にも深く関与していることが明らかになっている。ピロリ菌除菌は、これらの胃十二指腸疾患の発症あるいは再発のリスクを下げるうえで大きな効果がある<sup>1)</sup>。さらに2009年、日本ヘリコバクター学会より発表された「*H. pylori* 感染の診断と治療のガイドライン2009改訂版」では、胃十二指腸潰瘍、萎縮性胃炎、機能性ディスペプシア、特発性血小板減少症を伴う *H. pylori* 感染症は、レベル I という明確なエビデンスが証明されており、推奨グレード分類 A の“強い科学的根拠があり除菌を行うよう強く勧められる”に指定されている。

現在、ピロリ菌の一次除菌療法とされるのがクラリスロマイシン (CAM) + アモキシシリン (AMPC) + プロトンポンプ阻害剤 (PPI) 3 剤の 7 日間投与である。一方、国内での CAM に対する耐性ピロリ菌の増加は著しく、最近では耐性率が 20% を越えるまでになり、この結果、除菌成功率は当初の 90% 以上から 70% 台にまで低下している。従って CAM をメトロニダゾール (MNZ) に変えたレシピが二次除菌療法とされ、一次除菌療法の失敗例では保険適用となっている<sup>2)</sup>。しか

し MNZ は開発途上国では耐性化が顕著で、分離されたピロリ菌株の多くが MNZ 耐性である。日本でも MNZ の使用が増せば、早晚、MNZ 耐性ピロリ菌が急増すると予想される。

一方、多くのピロリ菌感染者はこれら上部消化管疾患をまだ未発症のいわゆる健康なピロリ菌保菌者である。これらの人々には組織学的胃炎はあるものの、臨床的に特に問題となる病変は生じていない。しかし、これらピロリ菌保菌者も非保菌者に比べれば消化性潰瘍および胃癌発症のリスクは明らかに高く、除菌を含めた何らかの対処をすべきであるが、対象者が全国で数千万人と膨大な数にのぼるため全員に抗生物質除菌を実施するのは困難である。従って抗生物質にかわるもの、たとえばプロバイオティクス (Pb) が検討されるべきである。

Pb とは、口腔内から肛門に至る広義の消化管に存在する常在細菌群に働きかけて、あるいは単独で、生体に有益な効果をもたらす生きた細菌のことを指す用語である。一般に Pb は消化管粘膜に分布することで病原菌が粘膜に付着することを物理的に阻害し、かつ乳酸、酢酸などを分泌することでそれらの有害菌の増殖を阻止あるいは死滅させる<sup>3)</sup>。ピロリ菌抑制に働く Pb は胃酸に対する耐性を持つ事で強酸性の胃に生きてとどまることで、有効なピロリ菌抑制効果を発揮すると予想される。この考えに基づいて乳酸桿菌株のスクリーニングから選出されたのが、高い胃酸耐性を持つ LG752 株 (*Lactobacillus gasseri* GL-752) である。これまで Pb 単独使用によるピロリ菌抑制についての各国での臨床試験では筆者らのものも含め、多くが胃粘膜炎症の軽減および胃内定住ピロリ菌数減少を報告しているが、抗生物質を含む三剤使用による除菌療法のような完全除菌を得るのは困難であった。一方、先に述べたように、近年、耐性菌の増加のため除菌療法の成功率が低下して

\*東海大学医学部感染症研究室  
(神奈川県伊勢原市下糟屋143)

\*\*株式会社イーダブルニュートリション・ジャパン  
(岐阜市佐野839-7)

\*\*\*BK bio, Co., Ltd., #405 Starwood B/D 5439-1,  
Sangdaewon-dong, Jungwon-gu, Seongnam-si,  
Gyeonggi-do, Korea

\*\*\*\*Namyang Dairy Products Co., Ltd., #160 Bongam-ri,  
Janggi-myeon, Gongju City, Chungnam, Korea

いるが、これにPbを併用することで除菌率の有意な改善が得られている<sup>4)</sup>。

我々は、抗生物質多用による耐性化の広がりを防ぎかつ医療資源に頼らずに、集団におけるピロリ菌コントロールを行うために、現行のPbに抗ピロリ菌効果を有する食品成分を併用することでピロリ菌抑制を強化する方策を検討した。ピロリ菌体表面に発現するウレアーゼ (urease) は、胃内腔のウレア (urea) を分解してアンモニアを作ることによって周囲胃液の酸を中和しピロリ菌の生存を維持する。また、ウレアーゼはピロリ菌の胃粘膜の接着にも関与することが報告されている<sup>5)</sup>。このウレアーゼを免疫したニワトリの卵黄から精製された抗体は、抗ウレアーゼIgYと呼ばれ、ヒト臨床試験において尿素呼気試験で有意なピロリ菌抑制効果が得られている<sup>5)</sup>。今回の臨床試験では、ピロリ菌感染ボランティアを用いて、抗ピロリ菌PbであるLG752株と抗ウレアーゼIgYとを併用した場合のピロリ菌抑制効果について検討した。

## I. 材 料 と 方 法

### 1. 菌株および卵黄抗体

LG752株は、東海大学医学部付属病院での内視鏡検査時に採取したヒト胃液から分離された(照会番号A-090217)。菌種同定は16S rRNA 遺伝子の塩基配列約1,500bp 決定により行った(登録番号SIID7705, 株式会社テクノスルガ・ラボ, 静岡市清水区長崎330番地)。無菌マウスのピロリ菌感染実験には *Helicobacter pylori* No.130 (*CagA*<sup>+</sup> および *VacA*<sup>+</sup>) 株を用いた。ヨーグルト由来の乳酸桿菌として、韓国製市販ヘリコバクター関連ドリンクタイプヨーグルトより、LBS寒天培地を用いて分離しアピ50CH(シスメック・ビオメリュー株式会社, 東京)により *Lactobacillus bulgaricus* と同定したものをを用いた。抗ウレアーゼIgYとして、Ovalgen Hp<sup>®</sup>(株式会社イーダブルニュートリション・ジャパン, 岐阜市)を用いた。Ovalgen Hpは、精製 *H. pylori* Ureaseを免疫した鶏が生んだ卵の卵黄から抽出された。対照として非免疫の鶏の卵黄から抽出したIgYをコントロールIgYとして用いた。

### 2. 緩衝液中での耐酸性試験

乳酸桿菌株の耐酸性を調べるために、0.1M塩酸を適量加えることでpH2のクエン酸緩衝液(0.1

Mクエン酸ナトリウム)を調整した。恒温槽で37℃に維持した上記緩衝液に、乳酸桿菌株を $\sim 10^7$  cfu/mlになるように加えて培養し、その後、経時的に培養液の一部を採取し、LBS培地を用いて生菌数を測定した。

### 3. *H. pylori* 感染マウス

4週齢BALB/c無菌マウスに *H. pylori* を $10^9$  cfu, 連日3日間経口接種し、胃への感染を成立させた。食品成分の経口投与は感染成立4週間後(8週齢)から行い、LG752は $10^9$  cfuを1週間ごとに計4回、Ovalgen Hpは1mgを毎日、いずれも計4週間連続投与した。

## 4. 臨床試験

### 1) 被験者

乳酸桿菌と抗ウレアーゼIgY併用のピロリ菌抑制効果を調べる、ランダム化盲検対照比較臨床試験を平成21年9月~11月に実施した。被験候補者は一般より公募した。選択基準として、健康成人でピロリ菌便中抗原陽性であること、除外基準として、治療を要する胃の器質的疾患あるいは胃切除の既往のある者、抗生剤を現在あるいは1ヵ月以内に服用した者、胃酸分泌抑制剤あるいは抗炎症剤を定期的に服用している者、牛乳および鶏卵にアレルギーのある者とした。その結果、被験者として50名が登録された。

### 2) 方法

2009年9月、124名の試験参加希望者についてメリディアンHpSA ELISA(TFB社, 東京)を用いて便中ピロリ菌抗原の有無を調べたところ、50名の者がピロリ菌抗原陽性と判明し被験者として登録した。試験参加の同意書が得られた被験者は無作為にA(Active)群25名とC(Control)群25名に分けられた。A群は、韓国製市販ヘリコバクター関連ドリンクタイプヨーグルト150mlにLG752 $10^9$  cfuとOvalgen Hp1gを添加したものを、1日1回、8週間連続摂取した。C群は、同じ市販ヨーグルト150mlを摂取した。摂取開始時(0 week), 4週間後, 終了時(8週間後)の計3回、テストメイトピロリ抗原EIAキット(わかもと製薬, 東京)を用いて便中ピロリ菌抗原量を測定した。

## II. 結 果

### 1. 乳酸桿菌株の耐酸性 (Fig. 1)

乳酸桿菌LG752株(●)とヨーグルト分離乳酸

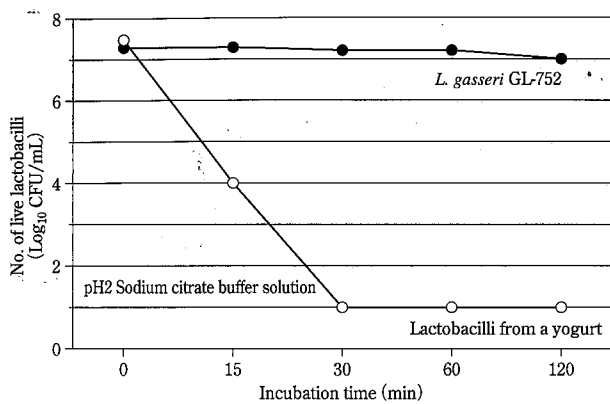


Fig. 1 Resistance of lactobacilli to acidity

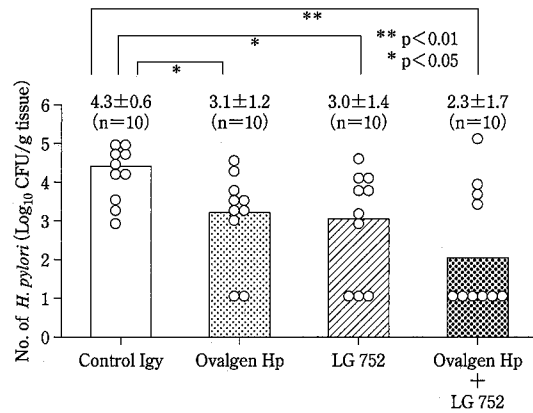


Fig. 2 Effect of Ovalgen Hp/LG752 on the number of *H. pylori* in the stomach

Table 1 Baseline characteristics of the subjects

	Subject group		Difference <sup>a)</sup>
	Active	Control	
No. of subjects	25	25	
Age (y; mean ± SD)	47.6 ± 10.1	48.0 ± 11.2	NS <sup>b)</sup>
Male/Female	14/11	15/10	
OD value at start (Merridian kit)	1.830 ± 0.894 <sup>c)</sup>	1.773 ± 0.868	NS

a) Difference between groups was statistically examined by Student's *t*  
 b) Not significant  
 c) mean ± SD

桿菌株 (○) を pH2 クエン酸緩衝液に浮遊させて培養し経時的にその生残菌数を測定したところ、LG752 株は培養120分後においても生残数は $\sim 10^7$ /mL と殆ど減少していなかった。一方、ヨーグルト分離乳酸桿菌株は30分後には、 $\sim 10^7$ /mL から検出限界以下 ( $< 10^2$ ) 以下となった。すなわち、同数で開始した両乳酸桿菌株は、pH2 の環境で30分後には、LG752 株はヨーグルト分離株に比べて100万倍以上の生菌数を維持していた。

## 2. ピロリ菌感染マウスに対する LG752 株と Ovalgen Hp の併用効果 (Fig. 2)

ピロリ菌感染マウスに Ovalgen Hp 投与を4週間継続したところ、胃粘膜組織 1g に分布していたピロリ菌数は、コントロール IgY の単独投与をおこなった群に比べて10分の1以下に減少した。LG752 の単独投与をおこなった群も同程度の減少を示した。一方、Ovalgen Hp と LG752 を併用投与した群ではコントロール IgY 群に比べ100分の1に著しく減少した。併用により相乗的ピロリ菌抑制効果が得られることがわかった。

## 3. ピロリ菌感染者に対する LG752 株と Ovalgen Hp の併用効果

無作為に割り付けられた A 群と C 群の試験開始時の、各種パラメータ値を Table 1 に示した。被験者数はいずれの群も25名と同等で、男女比もほぼ同じであった。平均年齢および OD 値で表した便中ピロリ菌抗原量は両群間で有意差はなかった。

試験開始後、A 群では計4名が (2名、試験期間中に胃 X 線検査受診; 1名、メリディアン HpSA ELISA 陽性/テストメイトピロリ抗原 EIA 陰性; 1名、理由不明)、C 群では計4名 (3名、メリディアン陽性/テストメイト陰性; 1名、胃 X 線検査受診) が途中脱落となった。

Table 2 に試験結果をまとめた。A 群では試験完了者は21名であった。便中ピロリ菌抗原 OD 値は、開始時 (0 week) 平均値1.37が8 week には1.15へと低下傾向を示した。1名 (コード番号 N-23) は0, 4, 8 week の OD 値が0.145, 0.090, 0.051と完全除菌を示した (OD 値0.1以下を除菌

Table 2 Change of fecal *H. pylori* antigen level

	Subject group (Whole)		Difference between groups	Subject group (Baseline OD > 0.75) <sup>a)</sup>		Difference <sup>b)</sup> between groups
	Active	Control		Active	Control	
No. of subjects who completed the study	21	21		12	12	
OD at 0 week	1.37 ± 1.11 <sup>c)</sup>	1.41 ± 1.07	NS <sup>d)</sup>	2.09 ± 0.93	2.18 ± 0.75	NS
OD at 4 week	1.27 ± 1.06	1.56 ± 1.15	NS	1.88 ± 1.00	2.37 ± 0.82	NS
OD at 8 week	1.15 ± 0.82	1.74 ± 1.21	$P = 0.034$	1.53 ± 0.88	2.64 ± 0.75	$P = 0.001$
Difference between						
4 week ~ 0 week	NS	NS		NS	NS	
8 week ~ 0 week	NS	$P = 0.0002$		$P = 0.038$	$P = 0.004$	

a) Stratified analysis was done using subjects whose baseline OD value was > 0.75

b) Difference between groups and within the group were statistically examined by Student's *t* and Wilcoxon signed-rank tests, respectively

c) Mean ± SD

d) Not significant

と判定)。一方、C群(完了者21名)では1.41から1.74へと逆に有意に上昇した。完全除菌例はなかった。次に両群間の比較では、0 weekでは差はなかったが、8 weekではA群がC群に比べ有意に低値となった(1.15 vs 1.74;  $p = 0.034$ )。これらの結果は、LG752とOvalgen Hpの8週間併用が、便中ピロリ菌抗原量を有意に低下させることを明らかにした。

次に、ピロリ菌感染密度が比較的高い被験者に限定した層別化解析を行うために、暫定的に試験開始時OD値0.75以上の者について分析した(Table 2)。対象者は両群とも12名であった。A群では0, 8 weekそれぞれ2.09, 1.53と有意に低下し、明らかなピロリ菌抑制効果を示した( $p = 0.038$ )。一方、C群では0, 8 weekそれぞれ2.18, 2.64と逆に増加し全くピロリ菌抑制効果は認められなかった。8 weekでの両群間の比較でも、A群(1.53)はC群(2.64)に比べ明らかに有意な低値( $p = 0.001$ )を示した。

### Ⅲ. 考

### 察

今回用いた乳酸桿菌株LG752は、一般のヨーグルトに含まれている *Lactobacillus bulgaricus* に比べ高い酸耐性を有し、強酸環境の胃で働くPbとしての適性を示した。乳酸菌は代謝産物として乳酸を放出して外部環境を酸性化するため、一般に酸に対して耐性能を持つ。強い酸耐性を持つ乳酸桿菌株として知られているLG21 (*Lactobacillus gasseri* OLL2716) 株の酸耐性機構のマイクロアレイ解析では、細胞膜にある輸送関連遺伝子、エネ

ルギー代謝関連遺伝子などの発現増加、および転写調節遺伝子群の発現低下が観察された<sup>6)</sup>。LG752においても、強酸環境下で細胞内pHを中性に維持してviabilityを保つために多数の遺伝子からなる調節機序が働いていることが推察される。

Pbがピロリ菌抑制に働くとの臨床研究は、Pb単独投与と除菌治療薬との併用の事例に大きく分けられる。Pb単独投与では多くの場合、尿素呼吸試験における改善が報告され、胃内のピロリ菌数が減少していることが推察されるが、完全除菌に至る症例はわずかである。一方、抗生物質除菌治療薬にPbを併用した場合は、除菌率を10~20%上乗せできることが可能との報告がある<sup>4)</sup>。本研究の特徴は、Pbを抗生物質ではなく、同じ食品成分であるIgYと併用することで医療資源に頼らずに抗ピロリ菌効果を増強したところにある。本研究で用いたOvalgen Hpは、ピロリ菌の病原因子であるウレアーゼを抗原として作製したIgYで、動物実験およびヒト臨床試験において胃内ピロリ菌に対する抑制効果を持つことが認められている<sup>5)</sup>。本研究の動物実験では、PbとIgYの併用はこれらの単独使用をさらに上回る相乗的ピロリ菌抑制効果を持つことを確認した。

本研究での臨床試験では、市販ヨーグルトにPbとIgYを加えたものを毎日服用したActive群21名は開始時に比べ8週間後には便中のピロリ菌抗原量が減少傾向を示した。一方、市販ヨーグルトのみを服用したControl群では8週間後にはむしろ有意に増加した。そして8週間後での便中ピロリ菌抗原量は、Active群がControl群に比べ有

意の低値を示した。さらに開始時の便中ピロリ菌抗原量が高値 (OD>0.75) の被験者12名に限定した層別化解析では、この傾向はさらに明らかとなり、PbとIgYの併用が確かなピロリ菌抑制効果を発揮することが確認できた。

本臨床試験では被験者数の制限からPbあるいはIgY単独服用群を設けなかったため、動物実験で得られた併用の相乗効果は確認できなかった。今回、Control群では試験期間中に便中ピロリ菌抗原量がむしろ増加するという結果を得た。暑さ寒さ、過食、刺激物の摂取などの外的ストレスは、胃粘膜防御能を弱めて胃内定住ピロリ菌数を増やし便中ピロリ菌抗原量の増加につながることを予想される。本臨床試験は9月から12月にかけて実施されたためControl群ではこのような影響を受けたのかもしれない。それにも拘らずPb/IgY群では有意の減少が得られたことは本併用療法の高い有効性を支持するものである。

## ま と め

プロバイオティクスと卵黄抗体という食品成分の併用によるピロリ菌抑制効果の高い有効性がヒト臨床試験で確認された。

## 引用文献

- 1) 上村直美: 臨床編・消化器領域・胃十二指腸疾患. 医科プロバイオティクス学 (古賀泰裕編; シナジー出版, 東京), 286-296, 2009.
- 2) 日本ヘリコバクター学会: *H. pylori* 感染の診断と治療のガイドライン2009改訂版. 日本ヘリコバクター学会誌 Vol. 10 Supplement, 2009年.
- 3) 古賀泰裕: プロバイオティクスの医療への展開. 日本医事新報 第4350号, 66-68, 2007.
- 4) 神谷茂: *Helicobacter pylori* 感染症とプロバイオティクス. 日本細菌学雑誌, 62: 271-277, 2007.
- 5) 児玉義勝: 鶏卵卵黄抗体 (IgY) と感染症予防. *Foods & Food Ingredients Journal of Japan*, Vol.211, 939-947, 2006.
- 6) 佐々木泰子: 抗ピロリ菌活性を持つ乳酸菌のアレイ解析と耐酸性機構. *バイオサイエンスとインダストリー*, Vol. 62, 17-20, 2004.