

## 論文の内容の要旨

論文提出者氏名	小林 惇 一
論文審査担当者	主 査      梅 村 武 司 副 査      竹 下 敏 一・田 中 直 樹・浅 香 正 博
論文題目	
Cholestenone functions as an antibiotic against <i>Helicobacter pylori</i> by inhibiting biosynthesis of the cell wall component CGL (コレステノン <sup>®</sup> はピロリ菌の細胞壁成分である CGL の生合成を阻害することにより抗菌活性を示す)	
<p><b>【背景と目的】</b> <i>Helicobacter pylori</i> (<i>H. pylori</i>) は胃癌の起因菌で、世界人口の約半数が感染している。胃癌の予防を目的に除菌治療が行われており、現在はプロトンポンプ阻害薬とクラリスロマイシンやアモキシシリンなどの抗生剤が使用されている。しかしながら、<i>H. pylori</i> の薬剤耐性、特にクラリスロマイシンの耐性が問題となり、今後は除菌治療の成功率は低下することが予想される。</p> <p><i>H. pylori</i> は細胞壁に cholesteryl-<math>\alpha</math>-D-glucopyranoside (CGL) に代表される <math>\alpha</math>-cholesteryl glucosides (<math>\alpha</math>CGs) を含んでいる。CGL は <i>H. pylori</i> の生存に必須であり (Kawakubo et al, Science 305, 1003-1006, 2004), <math>\alpha</math>-glucosyltransferase (<math>\alpha</math>CgT) の作用により、コレステロールの 3 位の水酸基にグルコースが <math>\alpha</math>1,3 結合することで生合成される。我々はコレステロールの 3 位にある水酸基は CGL の生合成に重要であると考え、「コレステロールの 3 位の水酸基がケト基に置き換わったコレステロール類似物質であるコレステノンは <math>\alpha</math>CgT の基質となれず、その結果 CGL の生合成が阻害されることで <i>H. pylori</i> に対して抗菌作用を示す」という仮説を立て、下記の解析を行った。</p> <p><b>【方法】</b> <i>H. pylori</i> として標準株である ATCC 43504, クラリスロマイシン耐性臨床分離株 “2460”, マウスに感染可能な SS1 株を用いた。菌の培養は 10% 不活化ウマ血清を添加した Brucella broth にて 35 °C, 15% CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間前培養を行った後、Mueller Hinton broth に各種添加物を混じた培地を用いて 96 穴プレートで 4 日間, 35 °C, 15% CO<sub>2</sub> の条件下で本培養を行った。菌量は 600 nm における吸光度で測定した。また、光学顕微鏡下における菌の形態観察も行った。次に CGL を含む脂質分画を評価するため、薄層クロマトグラフィー並びに抗 CGL 抗体を用いた免疫染色を行った。最後にマウスを用いた感染実験として、5 週齢の C57BL/6 マウス (n = 54) に <i>H. pylori</i> SS1 株 (3x10<sup>7</sup> 個 x2 回投与) を感染させ、コレステノン (0.5% w/w) を含む食餌を与えた群と含まない食餌を与えた群に分けて飼育した。4 週間投与後、胃粘膜を採取し、CGL 合成酵素をコードする <math>\alpha</math>CgT 遺伝子の量を定量 PCR にて解析したと共に (n = 48), HE 染色にて胃粘膜の形態を観察した (n = 6)。</p> <p><b>【結果】</b> 蛍光コレステロールを添加した培養アッセイで、<i>H. pylori</i> (ATCC 43504) は外因性コレステロールを取り込んでいることが確認された。続いてコレステロール、コレスタノール、<math>\beta</math>-シトステロール、コレステノンを添加した培養アッセイではコレステノンでのみ明らかに <i>H. pylori</i> (ATCC 43504) の増殖が抑制された。この結果は、臨床的に分離したクラリスロマイシン耐性株である “2460” でも同様であった。また、<i>H. pylori</i> の形態も螺旋状から球状に変化していた。150 <math>\mu</math>M コレステロール濃度下でコレステノンが <i>H. pylori</i> の増殖を抑制できるか検討を行った。その結果、コレステノンは濃度依存的に <i>H. pylori</i> の増殖を抑制することが確認された。不活化ウマ血清、コレステロール、コレステノンを添加して培養した <i>H. pylori</i> (ATCC 43504) から脂質成分を抽出し、薄層クロマトグラフィーで分析した。ウマ血清の添加では CGL とその誘導体である CAG と CPG が、コレステロールと培養した菌体では CGL と CAG が確認された。一方、コレステノンと培養した菌体では CGL と CAG の減少が示され、さらに CGL の減少は抗 CGL 抗体を用いた免疫染色でも明らかであった。マウスを用いた感染実験で、コレステノン投与群はコレステノン非投与群と比較して有意に感染菌数が減少しており、コレステノンの経口投与による <i>H. pylori</i> の除菌効果が確認された。また、HE 染色では形態学的にいずれの群にも異常所見は認められなかった。</p> <p><b>【結論】</b> コレステノンはクラリスロマイシン耐性株も含めて <i>H. pylori</i> に対して抗菌活性を示すことが認められた。コレステノンは安全な物質と考えられ、CGL の生合成を阻害するという従来の抗菌剤とは異なる作用機序で抗菌作用を示すことから、ピロリ菌に対する新たな抗菌薬となる可能性がある。</p>	