



Title	胃・十二指腸潰瘍と殺菌力のある温泉成分との関連性
Author(s)	
Citation	令和6（2024）年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書. 2025
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/101280
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

令和6年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな 氏名	かみがわ ひより 上河姫代俐	学部 学科	薬学部 薬学科	学年	2年
ふりがな 共同 研究者氏名	うちはし なつき 内橋那月	学部 学科	薬学部 薬学科	学年	2年
	のせ ゆうじろう 能勢裕之郎		薬学部 薬学科		2年
	まきえだ れな 楳枝怜菜		薬学部 薬学科		2年
アドバイザー教員 氏名	池田賢二、 大石美奈子	所属	薬学研究科		
研究課題名	胃・十二指腸潰瘍と殺菌力のある温泉成分との関連性				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				

〈研究背景・目的〉

前年の飲泉の身体への影響に関する研究活動において、現時点で飲泉による効果が期待されている疾病的各都道府県の患者数と飲泉含有成分の関係性について Pearson 相関分析を行ったところ、メタホウ酸が胃・十二指腸潰瘍に対して良い影響と悪い影響の双方があることが分かった。胃・十二指腸潰瘍は生活習慣が原因となる他にピロリ菌感染により発症するとされている。ピロリ菌は細胞に対する毒素を出すだけでなく、ウレアーゼという酵素をもち、これが尿素を分解してアンモニアを産生することで胃壁等を傷つけ、潰瘍を引き起こすとされているがピロリ菌が産生するアンモニアの濃度・量は明らかにされていない。メタホウ酸には殺菌力があることからメタホウ酸を含む温泉水を飲用することでピロリ菌が死滅し、潰瘍に良い影響を与えると考察したが、同様に殺菌力のあるハロゲンについては潰瘍に対する影響が見られなかったことから、この影響は殺菌効果以外の要因で生じている可能性も考えられた。さらに有害性については、メタホウ酸の過剰摂取により強力な殺菌力によって胃細胞が傷つき、潰瘍を生じている可能性が考えられた。以上の考察を検証すべく、本課題に取り組む。本研究では *in vitro* 試験法により、まずアンモニアが細胞に対して障害性を示し始める濃度、およびメタホウ酸が細胞に対し適量摂取による有効性と過剰摂取による障害性を示し始める濃度のボーダーラインを明らかにする。これらの結果をもとに、産生されたアンモニア存在下でメタホウ酸はどう作用し、胃腸の潰瘍症状をさらに悪化、または緩和させるのかについて明らかにすることを目的とする。成分の潰瘍への影響、また最適な成分服用量が明らかになることで、各成分を含む温泉水の適切な飲用によって潰瘍症状の軽快や悪化防止、さらには未病段階での健康を維持することにも貢献でき、国民の健康に寄与、および医療費削減のための良好な情報提供が可能になると考えられる。

〈研究材料〉

- ・細胞株：マウスの小腸上皮細胞株 IEC-6
- ・培地：10%FBS、L-グルタミン、ピルビン酸ナトリウム、ヌクレオシド含有 MEM α
- ・細胞生存率測定試料：WST-8[1]

※細胞中の脱水素酵素により產生される NADH は 1-Methoxy PMS を介して WST-8 を橙色のホルマザンに還元し、このホルマザンの色素量は生細胞数に比例することから、WST-8 添加後にホルマザンの吸収波長である 450nm の吸光度を測定することで細胞生存率を求めた。

・吸光度測定：マイクロプレートリーダー

・pH 値測定：定着型 pH メーター ※pH4.01、7.00、9.21 の pH 標準液を用いて校正を行った。

・アンモニア溶液：胃酸[2] (pH1.2) を中和するアンモニア溶液濃度 $6.31 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ を 1 倍濃度とし、培地を用いて各濃度に希釈調整した溶液を用いた。4 倍濃度の溶液は pH10.36 であった。

・ホウ酸溶液：メタホウ酸は加熱脱水してメタホウ酸に変化するため温泉水中ではホウ酸として存在していると考え、本試験ではメタホウ酸の代用としてホウ酸を用いた。日本有数のメタホウ酸含有量である新安比温泉[3]のメタホウ酸濃度 6320mg/1kg 水をホウ酸に換算した濃度 $4.81 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ を 1 倍濃度とし、培地を用いて各濃度に希釈調整した溶液を用いた。4 倍濃度の溶液は pH7.01 であった。

〈研究方法〉

1. 事前準備：初期播種細胞数の決定

まず、播種後 3、4 日後に毒性試験を行うこととし、その試験時に細胞が対数増殖期にあり、かつ 96well プレートに 100μL/well ずつ播種した場合、その細胞数が 80% コンフルエントになるよう調節するため、初期播種細胞数の決定試験を行った。 9×10^4 、 4.5×10^4 、 2.25×10^4 、 1.125×10^4 cell/well (それぞれ 96well プレートにおける 8000、4000、2000、1000cell/well に相当する) と段階希釈した 4 種類の濃度の細胞懸濁液をそれぞれ 12well プレート計 4 枚に 1 ml ずつ播種し 3 日間 37°C でインキュベートし、約 24 時間おきに細胞数がプラトーになるまで計 4 日間、各濃度 3well ずつ血球計算盤で細胞数を測定して平均値を求め、細胞増殖曲線を作成した。また今回の実験では胃腸内環境を再現すべく、MEMα に模擬的に作成した胃酸を混合して使用することにしていたが、緩衝作用により胃酸の効果が得られないこと、また胃酸のみでの細胞培養は困難であることから使用しなかった。

2. 本試験：アンモニア・ホウ酸による毒性試験

①アンモニア・ホウ酸それぞれの細胞への影響

1 で求めた初期播種細胞数で 96well プレートに 100μL ずつ計 33well に播種、ブランクとして培地のみを 100μL ずつ計 3well に添加し 2、3 日間インキュベートした。その後アンモニア溶液とホウ酸溶液を表 1 の 5 段階希釈した濃度 (1 回目の試験では 1 倍濃度を中間濃度として 5 段階の濃度で実施、2 回目は 1 回目の結果をもとに細胞生存率が 50% 前後となる 2 つの濃度間を細分化した 5 段階の濃度で実施した) で各濃度 3well ずつ、つまり各溶液 15well ずつ計 30well に添加し、陰性対照として残り 3well には各溶液を添加せず培地を交換し、ブランク 3well も培地を交換して再度 24 時間インキュベートした。その後 WST-8 を各 well 10μL ずつ加え 3~4 時間インキュベートした後にマイクロプレートリーダーで 450nm の吸光度を測定し、この結果から下記の式により細胞生存率を算出して各被検物質濃度に対してグラフを作成し、生存率が 50% になる値を IC50(50% 細胞傷害率)とした[1]。

$$\text{細胞生存率}(\%) = [(A_s - A_b) / (A_c - A_b)] \times 100$$

A_s : 検体の吸光度(細胞、被検物質および WST-8 含)

A_c : 陰性対照の吸光度(細胞および WST-8 含、被検物質無し)

A_b : ブランクの吸光度(培地および WST-8 含、細胞無し)

表 1 アンモニア溶液、ホウ酸溶液の濃度

	1 回目	2 回目
アンモニア溶液	4, 2, 1, 0.5, 0.25 倍	1, 0.875, 0.75, 0.625, 0.5 倍
ホウ酸溶液	4, 2, 1, 0.5, 0.25 倍	4, 3.5, 3, 2.5, 2 倍

②アンモニア存在下でのホウ酸の細胞への影響

次に①でアンモニア添加時に細胞生存率が50%を下回った最高濃度と上回った最低濃度の2種類の濃度のアンモニア存在下で、①の1回目と同様の5段階濃度のホウ酸を添加することによる細胞障害性を調べた。①と同様に計36wellに細胞を播種、ブランクとして計6wellに培地のみを添加し2、3日間インキュベートした後、各濃度の2倍濃度のアンモニア溶液2種類とホウ酸溶液5種類を50μLずつ混合することで適当な倍数濃度の混合溶液100μLを調製し、計10種類の混合溶液を3wellずつ計30wellに添加した。尚、アンモニア存在条件を再現すべく先にアンモニア溶液を50μL添加し、その後ホウ酸溶液を50μL添加する予定であったが、両方添加した後ピペットを行なうとプレートに付着した細胞がはがれてしまったため、予め各溶液を混合してからプレートに添加することとした。残り6wellは陰性対照として3wellずつを2種類のアンモニア溶液100μLに交換し、ブランク6wellも同様に3wellずつを2種類のアンモニア溶液100μLに交換して再度24時間インキュベートし、①と同様にWST-8を加え3~4時間インキュベートして吸光度を測定し、細胞生存率を算出した。

〈結果と考察〉

1. 事前準備：初期播種細胞数の決定

段階希釈した4種類の濃度の細胞の増殖曲線を以下の図1~4に示す。

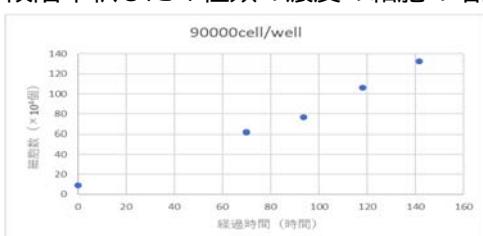


図1 9×10^4 cell/well の細胞増殖曲線

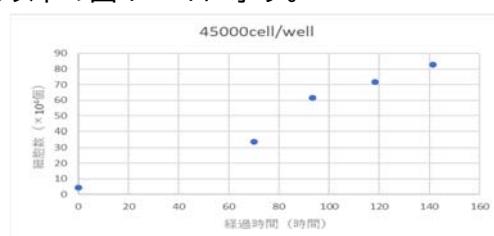


図2 4.5×10^4 cell/well の細胞増殖曲線

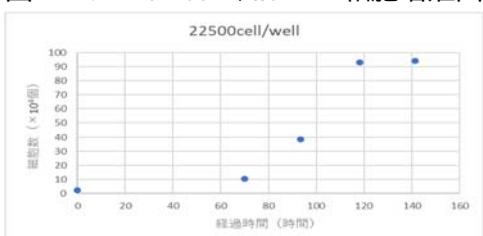


図3 2.25×10^4 cell/well の細胞増殖曲線

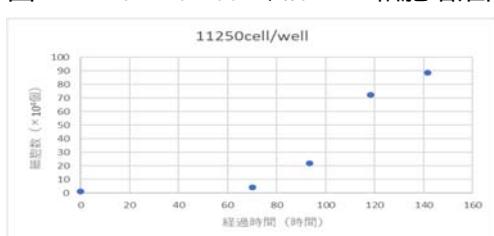


図4 1.125×10^4 cell/well の細胞増殖曲線

毒性試験における最適細胞数である12wellプレートの80%コンフルエントは約 3.2×10^4 cell/wellである。ゆえに図2より、初期播種細胞数を 4.5×10^4 cell/wellとすると播種後3日目に最適細胞数になり、また図3より、初期播種細胞数は 2.25×10^4 cell/wellとすると4日目に最適細胞数になることが分かった。よって以下の本試験ではこれらの初期播種細胞数を採用することとした。

2. 本試験：アンモニア・ホウ酸による毒性試験

①アンモニア・ホウ酸それぞれの細胞への影響

まず、アンモニア溶液とホウ酸溶液を表1の濃度で添加した時の細胞生存率(%)を図5, 6に示す。

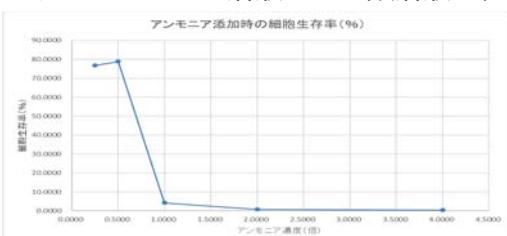


図5 アンモニア添加時の細胞生存率(1回目)

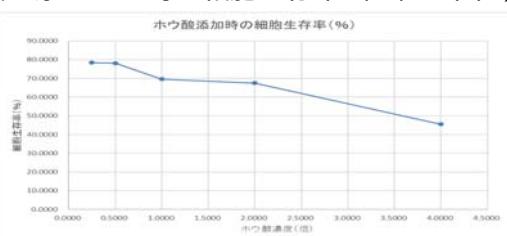


図6 ホウ酸添加時の細胞生存率(1回目)

図5より、アンモニアは0.5倍から1倍濃度の間で細胞生存率が急激に低下しており、0.5倍濃度で

の生存率は約 79%と傷害性が小さいのに対し 1 倍では約 4%と障害性が大きかった。0.5 倍濃度で生存率が増加しているのは細胞の個体差が原因であると考えられる。また図 6 よりホウ酸は 2 倍から 4 倍の間で細胞生存率が大きく低下しており、2 倍濃度での生存率は約 68%と傷害性が小さいのに対し 4 倍では約 46%と障害性が見られた。よってこれらの濃度間に細胞が障害を受けるボーダーラインがあると考え、表 1 の 5 段階濃度で再度実験を行った。このときの細胞生存率を図 7、8 に示す。

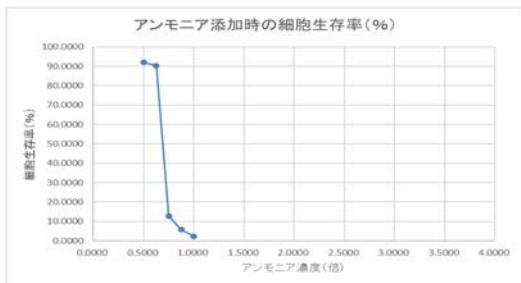


図 7 アンモニア添加時の細胞生存率(2回目)

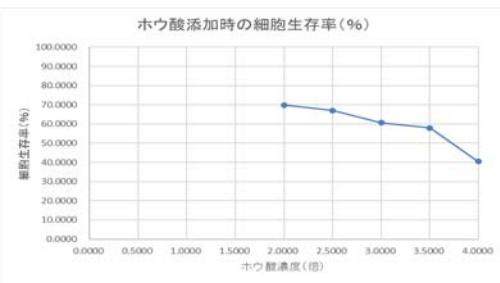


図 8 ホウ酸添加時の細胞生存率(2回目)

図 7 より、アンモニアはやはり 0.625 倍から 0.75 倍濃度の間で細胞生存率が急激に低下しており、0.625 倍濃度での生存率は約 90%と傷害性が小さいのに対し、0.75 倍では約 13%と障害性が大きかった。また図 8 より、ホウ酸は 3.5 倍から 4 倍の間で細胞生存率が大きく低下しており、3.5 倍濃度での生存率は約 58%と傷害性が小さいのに対し、4 倍では約 40%と障害性が大きかった。つまり、アンモニアは胃酸を中和できる濃度の 0.625 倍と 0.75 倍の濃度の間で細胞傷害性が大きく変化し、ホウ酸は新安比温泉のメタホウ酸濃度の 4 倍濃度で細胞傷害性を有意に示すことが分かった。

②アンモニア存在下でのホウ酸の細胞への影響

次に、アンモニア添加時に細胞生存率が 50%を下回った最高濃度である 0.75 倍濃度と、上回った最低濃度である 0.625 倍濃度の 2 種類の濃度のアンモニア存在下で 4 倍～0.25 倍の 5 段階濃度のホウ酸が存在している場合の細胞生存率(%)を図 9、10 に示す。

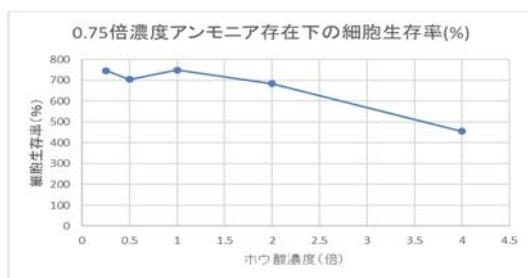


図 9 0.75 倍濃度 NH3 存在下の細胞生存率(%)

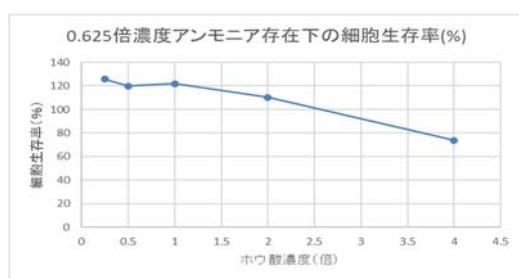


図 10 0.625 倍濃度 NH3 存在下の細胞生存率(%)

図 9において、細胞生存率が 100%を超えてしまった。これは、陰性対照について、細胞生存率が 50%を下回った最高濃度のアンモニアを添加することで吸光度 A_c の値が小さくなつたことが原因であると考えられる。よって、細胞生存率を 100%の範囲にするため、陰性対照を「ホウ酸を添加していないアンモニア存在下の細胞」ではなく、「アンモニア・ホウ酸をともに添加していない条件下の細胞」として再度細胞生存率を求め、グラフを作成した。その結果を図 11、12 に示す。

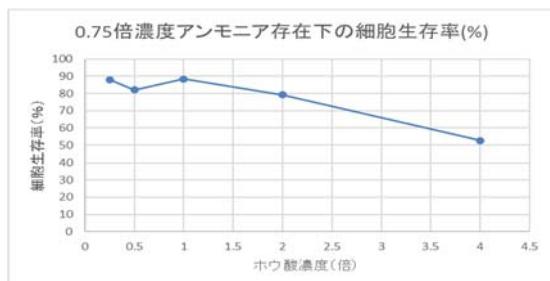


図 11 0.75 倍濃度 NH3 存在下の細胞生存率(%)

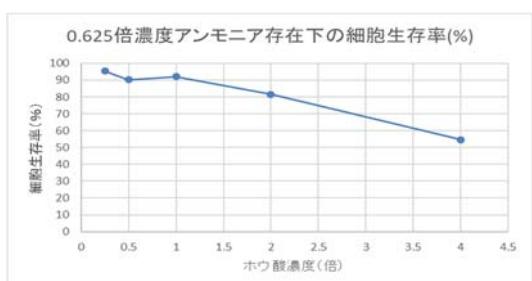


図 12 0.625 倍濃度 NH3 存在下の細胞生存率(%)

上図より細胞生存率はすべて 100%以下に収まり、適切であると言える。これらの図より、2 種類のアンモニア存在下では同様な形のグラフとなった。しかしアンモニア濃度が高い図 11 の方が細胞生存率がわずかに低いことから、アンモニアによる傷害性がより大きかったと考えられる。塩基性のアンモニアと酸性のホウ酸は培地内で反応し、中和される。0.75 倍のアンモニアの濃度は、1 倍濃度のホウ酸の濃度にほぼ一致する。よって 1 倍よりも濃い濃度のホウ酸存在条件下では中和されず残存したホウ酸の影響が、1 倍よりも薄い濃度のホウ酸存在条件下では残存したアンモニアの影響がより有意にみられると考えられる。例えば 1 倍よりも濃い濃度のホウ酸存在条件下では、アンモニアによってホウ酸の酸性度が打ち消され多少 pH 値が上昇し、中性側に移動するためホウ酸による pH 値への影響力は小さくなる。またホウ酸濃度が低下していくにつれて細胞生存率がほぼ比例的に上昇していることから、ホウ酸の量に従って細胞は傷害されていると言える。そして 1 倍よりも薄い濃度のホウ酸存在条件下では、ホウ酸によってアンモニアの塩基性度が打ち消され多少 pH 値が低下し、中性側に移動するためアンモニアによる pH 値への影響力は小さくなる。尚、ホウ酸が 0.5 倍濃度である点は図 9、10 ともにわずかに低下していたが、これは播種時にわずかに細胞数が他の well に比べて少なかったことによる誤差であると考えられる。以上を踏まえこれらの結果をアンモニア非存在下で実施した図 6 と比較すると、細胞生存率は 10%程度上昇していたことが分かる。これは、アンモニア存在下であるためにホウ酸とアンモニアが反応して中和されたことでそれぞれの影響力が相殺されて減少したことで、細胞への障害性が低下したのではないかと考えられる。つまり、本試験において細胞生存率には pH 条件が関与していることが示唆された。アンモニア・ホウ酸それぞれの pH 以外の化学的性質も生存率に関与している可能性も考えられるが、本試験からは考察できなかった。

〈今後の展望〉

本研究では、予算や安全性、倫理的な問題によりピロリ菌を用いた実験ができなかつたため、ピロリ菌が産生するアンモニアの濃度や量を明らかにできず、メタホウ酸の殺菌力によってピロリ菌が死滅したことで潰瘍が緩和した可能性も検証できなかつた。そのため今後はピロリ菌が潰瘍にどの程度影響しているのか、そしてメタホウ酸がピロリ菌に対しどのような影響を及ぼすのか明らかにしたい。また、ピロリ菌存在条件を再現するために、アンモニアを先に添加した後にメタホウ酸を加える予定だったが、ピペットティングの際にプレートに付着していた細胞が剥がれてしまったことから、予め混合したものを添加したため、今後は異なる方法を模索し、ピロリ菌存在条件を再現したうえでメタホウ酸による潰瘍への影響を明らかにしたい。また、*in vivo* 試験を実施できなかつたため、生体内の影響について考慮できていない。今回使用したマウス細胞とヒト細胞におけるアンモニアやメタホウ酸の影響の違いも不明であるため、今後の研究で明らかにしていきたい。今回、細胞生存率には pH が関係していると結論づけたが、pH 以外のアンモニア・ホウ酸自体の化学的性質が潰瘍に影響しているのかは検証できなかつたため、今後の研究課題としたい。

〈参考文献〉

- [1] 同仁化学研究所. 細胞増殖/細胞毒性アッセイキット Cell Counting Kit-8.
<https://www.dojindo.co.jp/technical/protocol/p01.pdf>, (参照日 : 2024-12-06)
- [2] 竹村有美 他. 半固体化栄養材の人工胃液中での物性変化. 静脈経腸栄養. 2011, 26 卷, 5 号, p. 1255-1264. <https://doi.org/10.11244/jjspan.26.1255>, (参照日 : 2024-12-06)
- [3] 水広場. 新安比温泉 清流閣.
<https://www.mizuhiroba.jp/waterdb/detail/o107.html?srsltid=AfmB0orR0vbftENhfFvPs0jjihq0woqomN4JboMTrxaovVIGLZjgASS>, (参照日 : 2024-12-06)