

スパイスが胃粘膜に及ぼす影響

渡 辺 達 夫 ・ * 鈴 木 裕 一

(静岡県立大学食品栄養科学部助教授, *同教授)

1. はじめに

従来、香辛料は刺激物であり、胃の粘膜を侵すものと考えられてきた。しかし、近年、ハンガリーの Szolcsanyi らが、トウガラシの辛味成分のカプサイシンが、胃粘膜の保護作用を有すると提唱して以来膨大な研究が行われ、トウガラシや辛味成分のカプサイシンは、食品とともに摂取する限り、胃粘膜を保護することと、損なわれた胃の回復を促進する事が明らかとなってきた^{1,2)}。本研究では、胃粘膜標本を用いて、胃粘膜の保護作用を検討できる簡便なシステムを構築し、種々の香辛料ならびに香辛料中の成分が胃粘膜に対して及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。従来用いられてきた被検物質を動物に投与するという、手間がかかり、動物にも苦痛をもたらす方法ではなく、摘出粘膜を用いた実験系を構築することにより、多数の試料の検討が可能になるものと考えられる。さらに、in vivoでの化合物の受容機構を詳細に研究できるという特徴を持つ³⁾。

カプサイシンに対する特異的受容体が動物やヒトに存在することが長年推察されていたが、1997年にラットから遺伝子がクローニングされ、カプサイシン受容体 Vanilloid Receptor subtype1 (VR1) と名付けられた⁴⁾。カプサイシンによる胃粘膜保護作用には、カプサイシン感受性神経が大きく関わっていることが知られているが^{1,2)}、最近、胃にも VR1 の存在することが明らかにされている⁵⁾。そこで、実験系の確立と共に、VR1

の関与も併せて検討した。

2. 実験方法

(1) 標本：雄性モルモット (400 ~ 500g) は、実験に用いるまで餌及び水は自由摂取で飼育した。エーテル麻酔後脱血させ、腹壁皮膚を正中切開して胃を切り出し、直ちに切り開いた。幽門部を切り出し顕微鏡下で筋層の大部分を剥離し、主として粘膜及び粘膜下層からなる標本作製した。

盲腸粘膜標本は、雄性 ddy マウス (40-50g) から、モルモットと同様の手法により作成した。

(2) 電気生理的パラメーターの測定：標本をシート状にし、窓面積 0.2cm²、代用液 5ml を含む 2 つの Ussing type チャンバーの間に装着した (図 1)。電位差測定用にはチャンバーの両側に一対のカロメル電極と、通電用に Ag/AgCl 電極を、それぞれ塩橋を介して装着した。これらを Voltage Clamp System (CEZ9100; 日本光電製) に接続し、短絡電流 (Isc) を測定した。Isc は粘膜側より漿膜側への電流の流れを正とし、経上皮コンダクタンス (Gt) は ± 5 mV の外電圧負荷による電流の変化量よりオームの法則を用いて求めた。温度は恒温槽からの環流にて 37℃ に保持した。標本を装着した後、試料を漿膜側あるいは粘膜側に投与してその影響を調べた。

(3) 代用液：標準代用液は、119 mM NaCl, 21 mM NaHCO₃, 2.4 mM K₂HPO₄, 0.6 mM KH₂PO₄, 1.2 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂ 及び 10 mM Glucose を含む組成とし、95 % O₂ / 5 %

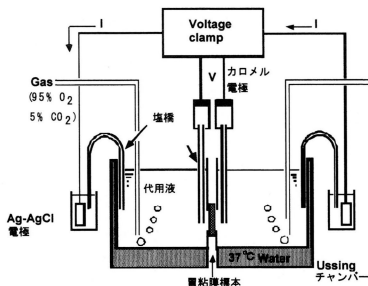


図1 Ussing チャンバーを用いた短絡電流・経上皮コンダクタンス測定系

CO₂ ガスでバブリングを行った (pH= 7.4)。デオキシコール酸 (Na 塩) は標準代用液に溶解して 6mM とし、粘膜側液に入れ替えて用いた。

(4) 試薬：カプサイシン及びカプサゼピン (Capsazepine, CPZ) はジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解させ、それぞれ 3mM 及び 30mM の濃縮保存液より投与した。テトロドトキシン (TTX) は水に溶解させて 300 μ M の濃縮保存液より投与した。ショウガとサンショウの抽出液は、丸善製薬製のジンジャースパイシク乳化物とサンショウ抽出液 BG を用いた。6- ジンゲロールはアセトニトリルに溶解させ、3.4mM の濃縮保存液より投与した。

3. 結 果

3.1 モルモット胃でのカプサイシンの作用

モルモット胃幽門部において、基線状態の短絡電流 (Isc) と経上皮コンダクタンス (Gt) はそれぞれ $62 \pm 5 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$, $13.2 \pm 0.8 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ (平均 $\pm$ SE, n = 8) であった。漿膜側にカプサイシン (3 μ M) を投与すると Isc に上昇が引き起こされた (図 2A)。Isc の上昇は、初期に急上昇し、いったんなだらかになり肩を形成した後

再びゆるやかに上昇した。投与後 1 分過ぎにピークを形成し、その後徐々に低下しおよそ 7 分程度で基線のレベルに戻った。このカプサイシンによる Isc 上昇は Gt 上昇を伴った (図 2B)。

カプサイシンによる VR1 受容体の活性化はカプサゼピンで抑制されることが知られている^{4,6)}。そこで、カプサイシンによる反応に対するカプサゼピンの効果を検討した。カプサゼピン (30 μ M, 漿膜側) 前処理によりカプサイシンによる Isc と Gt の上昇はともに大きく抑制された (図 2)。カプサイシンは VR1 受容体活性化により効果をもたらしていると考えられる。

VR1 受容体は主として感覚神経終末に存在すると考えられている⁷⁾。そこで、神経伝導遮断薬であるテトロドトキシンのカプサイシン誘発性電気反応に対する効果を検討した。テトロドトキシン (300 nM, 漿膜側) 前処理により、カプサイシン誘発性の Isc と Gt の上昇は、有意差はないものの低下する傾向が見られた (図 2)。特に、カプサイシン投与から Isc が最大となるまでの時間は、テトロドトキシン未処理の際は 71.7 ± 4.9 秒であったのに対し、テトロドトキシン処理群では 112 ± 3.9 秒 (n=8, p < 0.05) と有意な遅延が

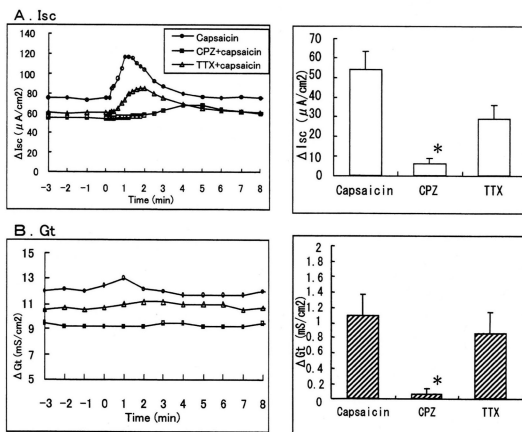


図2 モルモット胃幽門部におけるカプサイシン誘発性の短絡電流 (I_{sc}) 及び軽上皮コンダクタンス (G_t) 上昇反応と、それに対するカプサイゼビン (CPZ) とテトロドトキシン (TTX) 前処理の抑制効果
 同一の動物より得られた隣接部位標本を用いて測定した。A. 短絡電流 (I_{sc})、経上皮コンダクタンス (G_t)。カプサイシン (3 μM) を0分で漿膜側に投与した。カプサイゼビン (30 μM) およびテトロドトキシン (300nM) はカプサイシン投与15～20分前に漿膜側液に加えた。左図には、反応の典型例を示した。右図はカプサイシン投与後のI_{sc}およびG_tの増加量を示した (平均±SE, n=8)。*カプサイシンと比較し有意差あり, p<0.01

認められた。ピークに達してから基線までに復帰する時間に両群間の差は見られなかった。これらのことより、テトロドトキシン感受性成分がI_{sc}上昇のはじめの相において存在すること、及びかなりのテトロドトキシン非感受性のI_{sc}上昇成分も存在すること、が明らかとなった。

デオキシコール酸は高濃度で腸管の粘膜障害を引き起こすことが知られている⁸⁾。そこで、デオキシコール酸による胃粘膜損傷へのカプサイシンの影響を調べた。粘膜側液をデオキシコール酸 (6 mM) を含む液に入れ替えると、I_{sc}は一過性に上昇したが間もなく投与前のレベルに回復した。これに対し、G_tは次第に上昇していき、10分後にはほぼ定常状態となった。これに対し、カプサイシン (3 μM) をデオキシコール酸投与30～40

分前に漿膜側に投与すると、粘膜側デオキシコール酸投与後のI_{sc}変化はあまり影響を受けないものの (図3A), G_t上昇は著明に促進された (図3B)。

3.2 マウス盲腸でのスパイス類の効果

モルモットの胃から調製した標本を用いることにより、上述のようにカプサイシンによる応答を調べることができた。しかし、モルモットより小型でより取り扱いの容易なマウスやラットの胃の粘膜標本にて長時間をかけて検討したが、カプサイシン投与による明瞭な応答を確認することはできなかった。序で述べたように、①胃にはカプサイシン受容体が存在すること、また、上述のように②カプサイシン受容体の阻害剤によりモルモット胃粘膜標本でのカプサイシンによる応答が阻

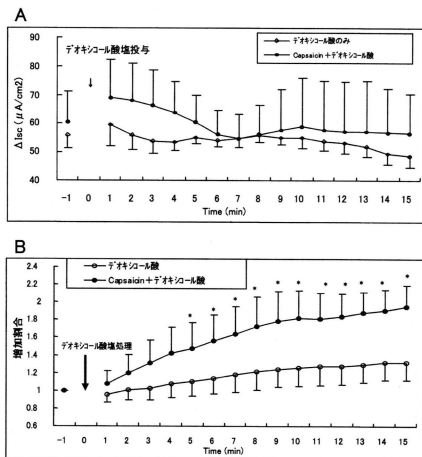


図3 カプサイシン処理の有無が粘膜側デオキシコール酸誘発性短絡電流 (Isc) 及び経上皮コンダクタンス (Gt) 変化に及ぼす影響。矢印の所で粘膜側をデオキシコール酸 6mM を含む液に入れ替え、その後の Isc 及び Gt 変化を記録した。カプサイシン群ではカプサイシン (3 μM) をデオキシコール酸処理 30 ~ 40 分前に投与した。A: Isc, B: Gt 上昇を、デオキシコール酸投与 1 分前の Gt 値を 1 として比で表した。* $p < 0.05$, $n = 4$

されたことから、この反応にもカプサイシン受容体の関与が推察されたこと、さらに、③予備的な研究により盲腸にもカプサイシン受容体の存在が予想されたことおよび④我々が盲腸での実験経験が豊富であり、胃に比べ盲腸標本での実験の方が容易でカプサイシン類での反応例をもっていること、の4つの理由により、マウス盲腸粘膜標本を用いて、スパイス類の胃粘膜への影響を調べる一助とした。

ショウガ抽出液、サンショウ抽出液をそれぞれ、5 または 10 μl を漿膜側または粘膜側に投与した。ショウガ抽出液の漿膜側への投与により、カプサイシン投与時と同様の大きな Isc の増大が見られた (図 4A)。さらにその後にカプサイシン (漿膜側, 3 μM) したところ、通常見られる

カプサイシン誘発性の Isc と Gt の上昇は消失した。従って、ショウガ抽出液の効果の少なくとも一部は、VR1 受容体活性化を介するものと考えられる。サンショウ抽出液の投与では反応が認められなかった。サンショウ投与後に 3 μM のカプサイシンを投与したところ、おおきな Isc 上昇が観察されたことから、サンショウ抽出液では少なくとも VR1 受容体の活性化が起きないことが明らかとなった (図 4B)。

ショウガ中の辛味成分の本体と考えられる 6-ジングロールの影響を次に調べた。ジングロールは、漿膜側に投与したときに大きな Isc 上昇を引き起こした。また、反応は、カプサイゼン、テロドトキシンにより抑制された (図 5)。これらのことから、盲腸標本でのジングロールによる

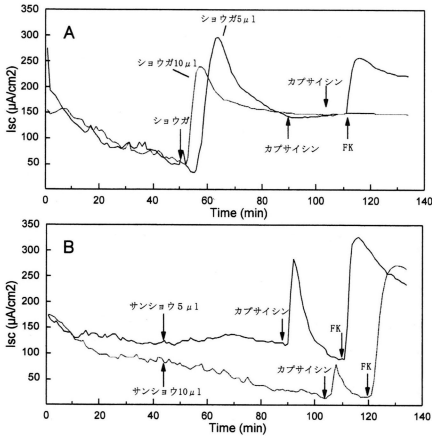


図4 ショウガ (A) またはサンショウ (B) 抽出液がマウス盲腸粘膜標本の短絡電流 (Isc) に及ぼす影響
試料はすべて漿膜側に投与した。カプサイシンは 3 μM 、フォルスコリン (FK) は 10 μM の濃度で用いた。

Isc 上昇は、VR1 受容体を解する反応であることが推察された。

4. 考 察

胃幽門部においてカプサイシンの漿膜投与により VR1 受容体を介した短絡電流 (Isc) と経上皮コンダクタンス (Gt) 上昇反応が引き起こされた。この Isc 上昇は Cl^- を主とした陰イオン分泌活性化を反映すると考えられるが、この点は今後さらに確かめる必要がある^{3,9)}。

カプサイシンによる Isc 上昇は一部テトロドトキシンで抑制された。VR1 受容体は主として知覚神経終末に存在することが知られている。今回の結果は VR1 受容体活性化により、軸索反射、あるいはシナプスを介した壁内神経の反射を介して、反応の少なくとも一部は引き起こされた事を示唆している。テトロドトキシン抵抗性の Isc 上

昇は、知覚神経終末 VR1 受容体の刺激がテトロドトキシンに感受性の Na チャネル活性化による活動電位発生を介さず、VR1 を通って流入した Ca^{2+} により直接神経伝達物質を放出させ、その結果陰イオン分泌が引き起こされた可能性がある。あるいは VR1 受容体が上皮細胞にも存在し、その活性化が陰イオン分泌を引き起こした可能性も否定できない。

本研究で、管腔側デオキシコール酸による Gt 上昇が、カプサイシン前処理により促進されることが示された。Gt は、主としてタイト結合部位透過性を反映し、その上昇は粘膜障害のひとつの指標とみなせる。従って、カプサイシン処理によりデオキシコール酸による粘膜障害が増強 (増悪) されたことを示唆している。この結果はカプサイシンが粘膜防御機構を阻害することを意味しているかもしれない。あるいは、デオキシコール

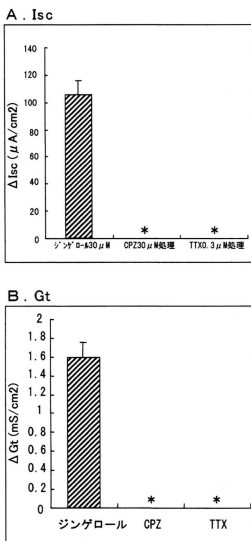


図5 マウス盲腸粘膜標本におけるジンゲロール誘発性の短絡電流 (Isc) 及び経上皮コンダクタンス (Gt) 上昇反応と、それに対するカプサイゼン (CPZ) とテトロドトキシン (TTX) 前処理の抑制効果
同一の動物より得られた隣接部位標本を用いて測定した。A. 短絡電流 (Isc), B. 経上皮コンダクタンス (Gt)。ジンゲロール (30 μM) を0分で粘膜側に投与した。カプサイゼン (30 μM) 及びテトロドトキシン (0.3 μM) はジンゲロール投与後 15 ~ 20 分前に粘膜側液に加えた。図はジンゲロール投与後の Isc および Gt の増加量を示した (平均 $\pm$ SE, ジンゲロール: $n = 6$, CPZ と TTX: それぞれ $n = 3$)。* ジンゲロールと比較し有意差あり, $p < 0.01$ 。

酸による障害は粘膜防御機構を活性化し、それが適度のカプサイシン量では増強するが、今回与えたカプサイシン濃度が高すぎるため、むしろその防御機構をすでに脱感作してしまったことを示しているのかもしれない。いずれにしても、カプサイシンの有無によるデオキシコール酸誘発性粘膜障害の差が何によるのか明らかにすることにより、VR1 受容体活性化、あるいはスパイス類の粘膜

防御機構解明への手掛かりが得られるものと考えられる。また一方では、カプサイシンによる陰イオン分泌活性化が、粘膜防御とどのように関わりを持つかも明らかにされなければならない。また本研究では粘膜障害を引き起こす目的でデオキシコール酸を用いた。その他、例えば酸、エタノール、高浸透圧液等も粘膜障害を引き起こすことが知られている。これらの粘膜障害に対してもスパイス類が防御作用を持つのか否か検討する必要がある。

本研究でモルモット幽門部を用いた理由は;

- 1) ラットやマウスに比較して同一動物の標本を多く採れるためである。このため、同一動物により得られた標本をコントロールとすることができ、動物個体間の差という問題が回避でき、薬物等の効果がより詳細に評価できる。また2) この標本を用いたこれまでの我々の研究の蓄積があったこともその理由である³⁾。今後は胃体部(胃腺部)や他の動物の胃での検討も必要であろう。

マウス盲腸粘膜標本での実験で、ショウガとサンショウの抽出液の効果を検討し、ショウガ抽出物及びショウガ辛味成分の6-ジンゲロールがVR1 受容体経由で強い Isc 上昇を引き起こすことを見だした。盲腸は、胃と同じく消化管であり、ともに VR1 受容体の存在が推察されること、及び胃と盲腸から調製した粘膜標本において、カプサイシンに対する反応が示されたことから、盲腸で反応を示したショウガ抽出物やジンゲロールも胃において同様の作用を発揮することが予想される。カプサイシン受容体が存在する三叉神経節の細胞を用いた系で、コショウの辛味成分ピペリンやショウガの辛味成分ジンゲロンがカプサイシンと同様に細胞内へのイオンの流入を引き起こしたという報告¹⁰⁾があることから、ショウガがトウガラシと同様に胃粘膜保護作用を持つ可能性が

推察される。

5. 結 論

本研究により, in vitro で Ussing Chamber 法を用いることにより, 胃粘膜に VR1 受容体が存在すること, カプサイシンなどのスパイスの胃粘膜に及ぼす効果, 特に胃粘膜保護作用について, その機序を含めて検討できることが明らかとなった。さらに, 盲腸粘膜を用いた検討により, ショウガが胃粘膜保護作用を発揮する可能性が推察された。

謝辞

本研究に, 多大なる助成を賜りました浦上食品・食文化振興財団に対し, 心からお礼申し上げます。

文献

- 1) Abdel-Salam, OME, Szolcsani, J. and Mozsik, Gy: Capsaicin and the stomach. A review of experimental and clinical data. *J Physiol. (Paris)*, **91**, 151-171 (1997)
- 2) Holzer, P: Neural emergency system in the stomach, *Gastroenterology*, **114**, 823-839 (1998)
- 3) Suzuki, AG, Kameyama, J-I, Tsukamoto, M, Kaneko, K, and Suzuki, Y: Stimulation of Cl⁻ and HCO₃⁻ secretion by intramural cholinergic neurons in guinea pig antrum in vitro. *Am. J. Physiol.*, **264**, G118-G125 (1993)
- 4) Caterina, MJ, Schumacher, MA, Tominaga, M, Rosen, TA, Levine, JD, and Julius, D: The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway, *Nature*, **389**, 816-824 (1997)
- 5) Nozawa, Y, Nishihara, K, Yamamoto, A, Nakano, M, Ajioka, H, and Matsuura, N: Distribution and characterization of vanilloid receptors in the rat stomach. *Neurosci. Lett.*, **309**, 33-36 (2001)
- 6) Szallasi, A, and Blumberg, PM: Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms, *Pharmacol. Rev.*, **51**, 159-207 (1999)
- 7) Caterina, MJ, and Julius, D: The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway, *Ann. Rev. Neurosci.*, **24**, 487-517 (2001)
- 8) Gookin, JL, Rhoads, JM, and Argenzio, RA: Inducible nitric oxide synthase mediates early epithelial repair of porcine ileum. *Am. J. Physiol.*, **283**, G157-G168 (2002)
- 9) Vanner, S, and MacNaughton, WK: Capsaicin-sensitive afferent nerves activate submucosal secretomotor neurons in guinea pig ileum. *Am. J. Physiol.*, **269**, G203-G209 (1995)
- 10) Liu, L, and Simon, SA: Similarities and differences in the currents activated by capsaicin, piperine, and zingerone in rat trigeminal ganglion cells. *J. Neurophysiol.*, **76**, 1858-1869 (1996)

Effect of spices on gastric mucosal membrane

Tatsuo Watanabe and Yuichi Suzuki

(School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka)

Protective effect of capsaicin, a pungent principle of hot pepper, on gastric mucosal membrane has been extensively studied by using *in vivo* experiments, and the effect is known to be exerted through capsaicin-sensitive neurons in the stomach. However, whether other spices have similar protective effect has been rarely investigated. The aim of this study is to establish an *in vitro* experiment system that can estimate protective effects of spice or spice ingredients on the gastric mucosa, and to evaluate the effects of capsaicin, sansho and ginger by using this system.

At first, we tried to make an *in vitro* estimating system for gastric membrane protection. In mucosal membrane preparation from guinea pig antrum mounted in Ussing chambers, capsaicin applied to the serosal side increased both the short-circuit current (Isc) and the transepithelial conductance (Gt). These increments induced by capsaicin were fully blocked by the pretreatment of capsazepine, a vanilloid receptor competitive antagonist, and partially inhibited by tetrodotoxin, a nerve conduction blocker.

Next, we tested the effects of ginger and sansho extracts on mucosal membrane preparation of mouse cecum. Sansho extracts evoked no Isc response. Ginger extracts and 6-gingerol, a major pungent compound of ginger, caused a marked Isc increase. These increases were blocked by both the pretreatment of capsazepine and tetrodotoxin.

In conclusion, we constructed an *in vitro* evaluating system on mucosal membrane protection by using guinea pig antrum and Ussing chamber. In this system, capsaicin increased Isc and Gt through VR1 activation. Ginger also caused both Isc and Gt increases through VR1 on mouse cecum mucosa.