

中高年者の薬剤耐性ピロリ菌 (*H. pylori*) の細菌学的、分子論的調査と 三次・四次除菌レジメンの開発

慶應義塾大学医学部 内科学 (消化器)

准教授 鈴木 秀和

(共同研究者)

慶應義塾大学医学部 内科学 (消化器) 森 英毅

慶應義塾大学医学部 内科学 (消化器) 三好 佐和子

慶應義塾大学医学部 内科学 (消化器) 福原 誠一郎

慶應義塾大学病院 予防医療センター 松崎 潤太郎

慶應義塾大学病院 腫瘍センター 西澤 俊宏

慶應義塾大学医学部 内科学 (消化器) 正岡 建洋

はじめに

背景：2013年2月に、ヘリコバクター・ピロリ感染胃炎に対する*H. pylori*除菌療法が保険適用になったことで、中高年を中心とした約5,000万人が本治療の対象になった。現在、わが国では、一次除菌としてプロトンポンプ阻害薬 (PPI) 倍量+アモキシシリン (AMPC) +クラリスロマイシン (CAM)、二次除菌としてPPI倍量+AMPC+メトロニダゾール (MNZ) が健康保険で実施されている。しかし、一次除菌率は約75%、二次除菌率は約85%であり、CAMおよびMNZに耐性で除菌できない症例は僅かながら存在する。今後、耐性菌や除菌対象者集団の増加が予想され、三次・四次除菌療法の確立は急務であると考えられる。特に感染者の主たる集団である中高年層では、胃癌予防にも関心が強く、当院の三次除菌対象者の70%以上は中高年者となっているが、CAM/MNZ耐性例に対する三次除菌のプロトコールについてのコンセンサスは得られていないのが実情である。我々は、一次・二次除菌治療の不成功症例に、新規ニューキノロン系抗菌薬のシタフロキサシン (STFX) をPPI4倍量+AMPCに加えて7日間投与することで、除菌率は85% (per-protocol) という高い成績をえた。一方、キノロン系抗菌薬は菌体内のDNA複製に必須なDNA gyraseを標的とするが、DNA gyrase subunit A (gyrA) の特定の点変異を有する*H. pylori* 菌株に対しては、STFX含有レジメンの除菌率が65%ほどに低下することも示した。さて、欧米を中心に行われているリファブチン (RBT) を用いた三次除菌では、PPI+AMPC+RBTの除菌率は38-85%と報告されている。RBTはDNA依存性RNAポリメラーゼ、特にその β サブユニットを標的としているが、我々はそのコード遺伝子であるrpoBに特定の点変異を有する場合、RBTのMIC値が上昇することを示した。本研究では、*H. pylori* の抗菌薬 (CAM, MNZ, STFX, RBT) に対するMIC (最小発育阻止濃度) を測定し、耐

性遺伝子の探索を行うことにより、一次除菌、二次除菌レジメンの再検討を行うとともに、テーラード型の三次・四次除菌レジメンを開発することを目的とする。慶應義塾大学病院消化器内科外来にて、*H. pylori* 除菌治療を受ける中高年（40歳以上）の患者に十分なインフォームドコンセントの上、上部消化管内視鏡検査を行い、*H. pylori* を分離培養した。分離された菌株の抗菌薬（CAM, MNZ, STFX, RBT）に対するMIC（最小発育阻止濃度）を寒天平板希釈法にて測定し、各菌株の耐性率を検討した。また、薬剤耐性遺伝子についてはSTFXを用いて除菌治療を行う際には*gyrA*変異を、RBTを用いて除菌治療を行う場合には *rpoB*変異をDNA sequencing法により同定を行い（表1）、一次除菌、二次除菌不成功患者の*H. pylori* に対する薬剤耐性と除菌率に関する臨床情報を解析した。

表 1

Antibiotics	MIC in susceptible strains	Mechanizm of resistance	method of mutation detection
Clarithromycin	$\leq 0.25 \mu\text{g/mL}$		
Metronidazole	$\leq 8 \mu\text{g/mL}$		
Rifabutin	$\leq 0.12 \mu\text{g/mL}$	<i>rpoB</i>	DNA sequencing
Sitafloxacin	$\leq 0.06 \mu\text{g/mL}$	<i>gyrA</i>	DNA sequencing

結 果

結果①：中高年の二次除菌不成功者における*H. pylori* 菌株の薬剤耐性の特徴

二次除菌不成功者から分離された菌株の抗菌薬（CAM, MNZ, STFX, RBT）に対するMIC（最小発育阻止濃度）を測定し、各菌株の耐性率を検討した。結果は下記に記す。二次除菌不成功例では、一次除菌で使用するCAMに対する耐性菌株の割合が90.9%、二次除菌で使用するMNZに対する耐性菌株の割合が68.9%と高率であった。三次除菌薬として使用する有力な候補として、STFX、RBTが考慮されるが、STFXに対する耐性株の割合は58.3%、RBTに対する耐性株の割合は0%であった。

表 2

Antibiotics	MIC in susceptible strains	Resistance strains/whole strains(%)
Clarithromycin	$\leq 0.25 \mu\text{g/mL}$	93/103(90.9)
Metronidazole	$\leq 8 \mu\text{g/mL}$	71/103(68.9)
Rifabutin	$\leq 0.12 \mu\text{g/mL}$	0/52(0)
Sitafloxacin	$\leq 0.06 \mu\text{g/mL}$	60/103(58.3)

結果②：STFX含有レジメンを使用した患者のSTFX MIC、*gyrA*遺伝子変異と除菌率

三次除菌薬としてSTFXを使用した患者のSTFX MIC、*gyrA* 遺伝子変異と除菌率の関係を解析した。全体の除菌率は80.0% (72/90) であった。STFX MICによる検討では、STFX感受性株で除菌率は86.8% (33/38)、STFX非感受性株で76.9% (40/52) であった。一方で*gyrA* 遺伝子変異の有無による検討では、変異なしで除菌率は93.9% (31/33)、変異ありで73.7% (42/57) であった。

表 3

STFX MIC Cut off MIC = 0.12		<i>gyrA</i> mutation	
	Eradication Rate(%)		Eradication Rate(%)
Sensitive	33/38(86.8)	Negative	31/33(93.9)
Resistant	40/52(76.9)	Positive	42/57(73.7)

結果③RBT含有レジメンを使用した患者のRBT MIC、*rpoB*遺伝子変異と除菌率

三次除菌薬としてRBTを使用した患者のRBT MIC、*rpoB*遺伝子変異と除菌率の関係を解析した。全体の除菌率は86.8% (11/13) であった。対象者全例の*H. pylori* 菌株がRBT感受性であり、*rpoB*遺伝子変異を有さなかった。

表 4

RBT MIC Cut off MIC = 0.25		<i>rpoB</i> mutation	
	Eradication Rate(%)		Eradication Rate(%)
Sensitive	11/13(86.8)	Negative	11/13(86.8)
Resistant	0/0(-)	Positive	0/0(-)

考 察

まず、本研究における中高年の二次除菌不成功者における*H. pylori* 菌株の薬剤耐性の特徴を検討したところ、一次除菌で使用するCAMに対する耐性株の割合が90.9%、二次除菌で使用するMNZに対する耐性株の割合が68.9%と高率であった。小林らの全国調査では2006年におけるCAM耐性株の割合は約30%、MNZ耐性株の割合は約4%とされている。*H. pylori* 除菌治療におけるKey Drugは一次除菌、二次除菌に使用するAMPCであることは周知の事実であるが、一方でCAM耐性株、MNZ耐性株を有する患者が高率に二次除菌不成功となっており、一次・二次除菌レジメンにおけるCAM、MNZの重要性が再確認された。

三次除菌薬として使用する有力な薬剤の候補として、STFX, RBTが考慮されるが、STFXに対する耐性株の割合は58.3%、RBTに対する耐性株の割合は0%であった。STFXは我々の報告以後、既に三次除菌薬として広く日本中で使用されている薬剤である。STFX耐性の重要な

役割を占める *gyrA* 遺伝子変異を有する *H. pylori* 菌株に対しても、STFX 含有レジメンの除菌率は約65%とある一定の除菌率を有しており、既存のキノロン系薬剤の中では、成功率が高く、安全性も確認されている。今回の検討でも、STFX に対する耐性株の割合は58.3%と比較的高率であったが、STFX 含有レジメンの全体の除菌率は80.0% (72/90) であり、STFX 非感受性株の除菌率は76.9%、*gyrA* 遺伝子変異を有する株で73.7%と耐性を有する株に対しても高い除菌率を示した。さらに *gyrA* 遺伝子変異のない株に対しては93.9%と非常に高い除菌率を示しており、STFX 感受性株に関しては三次除菌の第一選択はSTFXを含む除菌レジメンで問題ないと考えられる。

一方で、RBTを用いた三次除菌の報告例は海外で散見されるものの日本での報告例はない。RBTはリファンピシン誘導体であり、主に結核、非定型抗酸菌症に使用される薬剤であるため、一般消化器内科医が使用するケースが少なく、使用に慣れていないことや、稀であるがブドウ膜炎などの特殊な副作用が報告されていることが忌避されている理由と考えられる。しかし、今回我々の検討ではRBTを含む三次除菌レジメンを使用した全例の *H. pylori* 菌株はRBT 感受性株であり、*rpoB* 遺伝子変異を有しなかった。RBTを含む三次除菌レジメンの除菌率は86.8% (11/13) と高い除菌率を示し、今後有望な三次・四次除菌レジメンとして考慮される有力な試験結果を示せたといえる。

今回、我々はピロリ菌の各種抗菌薬に対する耐性について、細菌学的かつ耐性関連遺伝子変異の分子論的に調査することで、除菌適用が拡大したことで急速に増加すると考えられる薬剤耐性ピロリ菌の実態を評価し、現時点での一次・二次除菌レジメンの妥当性を再評価した。さらに、個々の耐性菌に最適な三次、四次除菌レジメンを提案するテーラーメード除菌戦略の可能性も示した。これにより、中高年を中心としたピロリ菌感染者の隅々にまで及ぶ完全除菌を達成し、最終的に国民病ともいわれる胃がんを撲滅することが実現できると考える。

要 約

中高年の二次除菌不成功者における *H. pylori* 菌株では、CAMに対する耐性株の割合が90.9%、MNZに対する耐性株の割合が68.9%と高率であり、一次・二次除菌レジメンにおけるCAM、MNZの重要性が再確認された。STFXに対する耐性菌株の割合は58.3%と比較的高率であったが、STFX 含有レジメンの全体の除菌率は80.0% (72/90) と十分な成績であり、*gyrA* 遺伝子変異のない株に対しては93.9%と非常に高い除菌率を示した。STFX 感受性株に関しては三次除菌の第一選択はSTFXを含む除菌レジメンを使用すべきである。

今回解析を行えた菌株は全てRBT感受性であり、さらにRBTを含む三次除菌レジメンを使用した全例の *H. pylori* 菌株は *rpoB* 遺伝子変異を有しなかった。RBTを含む三次除菌レジメンの除菌率は86.8% (11/13) と高い除菌率を示し、今後有望な三次・四次除菌レジメンとして考慮される。

文 献

1. Nishizawa, T., Nishizawa, Y., Yahagi, N., Kanai, T., Takahashi, M., **Suzuki, H.*** Effect of supplementation with rebamipide for *Helicobacter pylori* eradication therapy: a systematic review and meta-analysis. J. Gastroenterol. Hepatol. (in press)
2. Nishizawa, T., **Suzuki, H.*** Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance and molecular testing. Front. Mol. Biosci. 1:19. doi: 10.3389/fmolb.2014.00019.
3. Fukuhara, S., Matsuzaki, J., Tsugawa, H., Masaoka, T., Miyoshi, S., Mori, H., Fukushima, Y., Yasui, M., Kanai, T., **Suzuki, H.*** Musosal expression of aquaporin-4 in the stomach of histamine type 2 receptor knockout mice and *Helicobacter pylori*-infected mice. J. Gastroenterol. Hepatol. (in press)
4. Nishizawa, T., Maekawa, T., Watanabe, N., Harada, N., Hosoda, Y., Yoshinaga, M., Yoshio, T., Ohta, H., Inoue, S., Toyokawa, T., Yamashita, H., Saito, H., Kuwai, T., Katayama, S., Masuda, E., Miyabayashi, H., Kimura, T., Nishizawa, Y., Takahashi, M., **Suzuki, H.*** Clarithromycin versus metronidazole as first-line *Helicobacter pylori* eradication: A multicenter, prospective, randomized controlled study in Japan. J. Clin. Gastroenterol. 2014 Jun 11. [Epub ahead of print]
5. Nishizawa, T., **Suzuki, H.***, Takahashi, M., Suzuki, M., Hibi, T. Delay of second-line eradication therapy for *H. pylori* can increase eradication failure. J. Gastroenterol. Hepatol. 28 (10) :1608-1610, 2013
6. Hirata, K., **Suzuki, H.***, Matsuzaki, J., Masaoka, M., Saito, Y., Nishizawa, T., Iwasaki, E., Fukuhara, S., Okada, S., Hibi, T. Improvement of reflux symptom related quality of life after *Helicobacter pylori* eradication therapy. J. Clin. Biochem. Nutri. 52 (2) :172-178, 2013.
7. Asaoka, D., Nagahara, A., Matsuhisa, T., Takahashi, S., Tokunaga, K., Kawai, T., **Suzuki, H.**, Suzuki, M., Nishizawa, T., Kurihara, N., Ito, M., Sasaki, H., Omata, F., Mizuno, S., Torii, A., Ohkusa, T., Mine, T., Sakaki, N. Trends of second-line eradication therapy for *Helicobacter pylori* in Japan: A Multicenter Study in the Tokyo Metropolitan Area. Helicobacter 18 (6) :468-472, 2013.
8. Masaoka, T., **Suzuki, H.*** Do we need to eradicate *H. pylori* in patients with GORD? United European Gastroenterology Journal 1 (4) :223-225, 2013.
9. **Suzuki, H.***, Moayyedi, P. *Helicobacter pylori* infection in functional dyspepsia. Nature Rev. Gastroenterol. Hepatol. 10 (3) :168-74, 2013.