

厚生労働省研究費補助金（がん対策推進総合研究事業）
分担研究報告書

若年者除菌治療のための糞便 DNA を用いた *Helicobacter pylori* クラリスロマイシン
耐性関連遺伝子変異の検出と分離菌株の薬剤耐性

研究分担者 神谷 茂 杏林大学医学部感染症学 教授

研究要旨

若年者における *Helicobacter pylori* 感染の状況ならびに薬剤耐性菌保有状況を調べることは今後の感染症対策に重要である。本研究では、除菌治療薬のうちクラリスロマイシンに対する薬剤耐性関連遺伝子変異の保有状況を調べた。若年感染者では内視鏡検査を実施せずに耐性菌保有を明らかにする方法が必要であることから、糞便 DNA を材料とする遺伝子検査方法と分離菌株を用いた遺伝子検査法および薬剤感受性試験法を比較した。さらに患者の除菌治療結果と、耐性関連遺伝子変異の保有状況について比較した。

薬剤感受性試験法による耐性菌検査の結果と比較して、糞便 DNA の遺伝子変異検出の感度は 80%、特異度 84.8% であり、菌株 DNA を用いた検査では感度 80%、特異度 100% であった。クラリスロマイシンを含めた 3 剤による除菌治療が不成功となった 7 例のうち、糞便と菌株両方の検査で耐性菌と判定されたのは 3 例、2 例は菌株のみ耐性、1 例は糞便のみ耐性遺伝子変異が検出された。

糞便 DNA を使った耐性菌の検出方法は患者の耐性菌の保有を明らかにするために有用で、除菌治療の結果予測にも役立つ方法であることが示唆された。

共同研究者

大崎敬子、ザマンシンシア、米澤英雄
杏林大学医学部感染症学教室
間部克裕、加藤元嗣
北海道大学医学部がん予防内科

Introduction

H. pylori は主として 5 歳以下の小児期に感染し、長期間持続感染すると考えられている。*H. pylori* の感染ルートについては国内では環境由来感染や集団からの感染が減少し、家族内感染が優勢で、中でも母子感染が高頻度に認められる。従って、次の世代への感染を防ぐためには、出産や育児にかかる年齢以前の感染者を減らすことが重要な課題のひとつとされ、若年者層の除菌治療の必要性が指摘されている。

本邦ではこれまで、若年感染者に対す

る対策は行われてこなかった。さらに、若年感染者に対して内視鏡検査の施行が困難であることから、分離菌株を使って行われる薬剤感受性検査のデータが少なく、若年者の薬剤耐性菌の保有状況については明らかにされていない。今後の若年者に対する除菌療法の拡大には耐性菌出現状況の把握が必要とされる。

本研究では若年者の除菌治療効果判定のために、糞便 DNA、分離菌株およびその菌株 DNA を用いてクラリスロマイシン (CAM) 耐性菌の検出結果について比較検討し報告する。加えて、患者の CAM 耐性菌保有状況が抗菌薬治療成績に及ぼす影響について知見を得るために、薬剤感受性試験からみた各除菌治療群の CAM 耐性菌出現状況と治療結果について比較検討した。

A. 研究方法

【菌株の分離】本研究は北海道大学および各生検組織採取施設の倫理委員会の承認を受けて実施された。

胃生検組織は採取後速やかに輸送培地（ヘリコポーター、日研生物）に入れて菌株分離施設へ輸送された。輸送された組織は到着後すぐに、*H. pylori* 選択培地（日水製薬）に接種され、37℃、5-7日間、微好気環境下で培養した。発育したコロニーを2個別々に増菌培養した。継代培養した菌の一部はDNAの抽出に用いて、残りは-80℃で保存した。

【糞便総DNAの抽出】

採取された糞便は速やかに-30℃以下で凍結保存された。糞便200mgを秤量し、QIAamp DNA Stool Mini Kit (Quiagen)を用いて総DNAを抽出した。

【分離菌株の薬剤感受性試験】

保存した分離菌株は7%馬血清添加Brucella培地（BHS）中で培養後、寒天平板希釈法による薬剤感受性試験を実施した。

【PCR反応】

糞便から抽出したDNAによるCAM耐性関連遺伝子の保有状況の検査は、Rimbaraらによって報告された方法に変更を加えて行った。分離菌は培養後、MagExtractor（Toyobo）を使ってDNAを抽出した。*H. pylori* 23SrRNA 特異的プライマーを用いて nested-PCR 増幅産物を得て、その産物をシーケンスし感受性株の配列と比較した。菌株から分離したDNAは *H. pylori* 23SrRNA 遺伝子特異的プライマー（H1 および H3）を用いて PCR 増幅しシーケンス解析した。

【除菌治療】

患者は無作為に抽出された方法で *H. pylori* の除菌治療を受けた。CAM、アモキシシリン（AMPC）、プロトンポンインヒビター（PPI）による治療群を A 群、メトロニダゾール（MNZ）、AMPC、PPI による治療群を B 群とした。

B. 研究結果

糞便検体採取用の登録患者 100 名中、糞便の提出のみられなかった症例、*H. pylori* が陰性と判定された症例を除き、*H. pylori* の分離菌株を得た 48 例を本研究の対象とした。検体の採取輸送条件の問題から *H. pylori* の培養ができずに、対象者の年齢は 18 歳から 39 歳であった。

分離菌株 48 株について培養法による薬剤感受性試験から CAM 耐性と判定された菌株は 15 例（31.3%）であった。同じ菌株から分離した DNA について 23S rRNA の遺伝子配列の変異を認めたものは 12 例（25%）となった。糞便 48 例から 23S rRNA の遺伝子変異が検出されたのは 17 例で 35.7% と最も高い検出感度となった。

次に、培養による薬剤感受性試験法を Gold standard として、各遺伝子検査法の一致率を検討した。菌株 DNA の遺伝子変異検出は陽性一致率 100%、陰性一致率 91.7% で、感度は 80%、特異度 100% であった（表 1）。このとき菌株 DNA の遺伝子変異検出が陰性と判定され、同じ菌株から培養法で行った薬剤感受性試験で CAM 耐性菌と判定された 3 例は、いずれも CAM 1 μg/ml を含んだ培地に保存菌株を再接種すると *H. pylori* が発育した。さらに再分離した菌株から回収された DNA を使った PCR 増幅産物から、CAM 耐性関連遺伝子変異が検出された。この結果は、野生型 23SrRNA 遺伝子を保有する菌と変異型遺伝子保有菌が混在した例であると考えられた。

培養による薬剤感受性試験法を Gold standard として糞便 DNA の遺伝子変異検出と比較したところ、陽性一致率 70.6%、陰性一致率 90.3% で、感度は 80%、特異度 84.8% であった（表 2）。前述の、野生型変異型 23SrRNA 遺伝子の混在した菌株 3 例の患者由来の糞便は、糞便 DNA から CAM 耐性関連遺伝子変異が検出された 2 例と、検出されなかった 1 例に分かれていた。

除菌治療の各群の結果判定と CAM 耐性菌の出現数を比較した（表 3）。CAM、AMPC および PPI にて治療された A 群は

除菌成功 15 例、失敗 6 例、投薬中止者 2 例が含まれた。除菌失敗例 7 例のうち 3 例は菌株、糞便ともに CAM 耐性関連遺伝子変異が検出され、2 例は分離菌株のみに遺伝子変異が、さらに 1 例は糞便のみに耐性遺伝子変異が検出された。従って、ほとんどの症例が CAM 耐性菌株を保有していたことが示された。

CAM を含まない、MNZ を使用した除菌治療群からも、CAM 耐性菌が検出された 9 例が含まれていた。さらに、MNZ 耐性菌が 3 例の患者から検出されたが、投薬中止 1 例を除く全例において除菌成功と判定された。

D. 考察

糞便から抽出した DNA による薬剤耐性関連遺伝子の保有状況の検査は、内視鏡検査施行の難しい若年者の場合に非侵襲的に行う検査として特に重要である。しかし、この方法について同一対象者から分離菌株を得て実施される薬剤感受性試験の結果と比較した報告はないことから、感度、特異度などが検討されてこなかった。本研究では 18 歳から 39 歳の対象者から分離菌株を得て薬剤感受性試験を実施した。さらに、同一患者の糞便を用いた CAM 耐性菌関連遺伝子変異の有無と、分離菌株から直接 CAM 耐性関連遺伝子変異の検出を実施した。その結果、糞便 DNA を用いた検出方法は、菌株 DNA を用いた CAM 耐性菌関連遺伝子変異の検出方法と比べて、同等の感度を示すものの、特異度の点で劣ること、さらに陰性一致率は同等であるが、陽性一致率が劣る結果となった。

また、除菌治療結果と CAM 耐性菌の保有状況の結果を比較した際に、除菌不成功例の中から、糞便 DNA を使って検出された CAM 耐性の結果が菌株 DNA を使った判定ならびに薬剤感受性試験の結果と不一致で、糞便の DNA からのみ耐性と判定された 1 例が見られた。この例は、感受性菌と耐性菌が混在していて、分離培養時に感受性コロニーを選択したことに起因する可能性が示唆された。また、

胃から CAM 耐性菌が検出されて糞便から耐性関連遺伝子が検出されない結果は、検体採取部位による耐性菌と感受性菌の混在比率の差に起因する可能性が示された。

E. 結論

CAM 耐性に関わる 23SrRNA 遺伝子の変異を検出する方法として糞便 DNA を用いた方法と、菌株 DNA を用いた方法を、分離菌株の薬剤感受性試験と比較した。これらの方法の感度および陰性一致率は同等であったが、糞便 DNA では菌株 DNA と比べて、特異度が低く、陽性一致率が低かった。患者の CAM を含む 3 剤併用除菌治療の結果において、除菌不成功の症例では、両方の検査で CAM 耐性が検出された例、菌株 DNA のみ陽性の例、糞便 DNA のみ陽性例が認められ、これらの検査結果を知ることは除菌治療法を選択する際の有用な情報となることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 . 分離菌株の薬剤感受性試験結果からみた菌株 DNA 中のクラリスロマイシン耐性遺伝子変異の検出感度

菌株 DNA 中の 23SrRNA 遺伝子変異の検出 (A2142C および A2143C)	薬剤感受性試験		合計	一致率(%)
	CAM 耐性菌 ^a	CAM 感受性菌		
陽性	12	0	12	100
陰性	3 ^b	33	36	91.7
合計	15	33		
感度および特異度	80.0	100		

^a: MIC < 0.5µg/ml

^b: 3 菌株に感受性菌と耐性菌の混在が認められた。

表 2 . 分離菌株の薬剤感受性試験結果からみた糞便 DNA 中のクラリスロマイシン耐性遺伝子変異の検出感度

糞便 DNA 中の 23SrRNA 遺伝子変異の検出 (A2142C および A2143C)	薬剤感受性試験		合計	一致率(%)
	CAM 耐性菌 ^a	CAM 感受性菌		
陽性	12	5	17	70.6
陰性	3	28	31	90.3
合計	15	33		
感度および特異度	80.0	84.8		

^a: MIC < 0.5µg/ml

表 3 . 除菌治療の結果別にみた薬剤耐性関連遺伝子変異の検出状況

除菌治療群 ^a	除菌判定	症例数	23SrRNA 遺伝子変異の検出 (A2142C および A2143C)			
			菌株 DNA		糞便 DNA	
			陰性	陽性	陰性	陽性
A	成功	15	14	1	12	3
	不成功	7	2 ^b	5	3	4
B	成功	24 ^c	17	7	14	10
	不成功	0	0	0	0	0

^a : A 群の患者は CAM、AMPC、PPI の 3 薬剤で除菌治療された。B 群の患者は MNZ、AMPC、PPI の 3 薬剤で除菌治療された。

^b : 1 例の患者は糞便 DNA から A2143C 変異が検出された。

^c : 3 例の患者は MNZ 耐性菌を保有していた。