

ヘリコバクター属菌の薬剤耐性の対策に資する研究

研究代表者 柴山 恵吾 （名古屋大学大学院・医学研究科・教授）

ヘリコバクター・ピロリの薬剤耐性について、継続的に状況を把握するための手法として厚生労働省院内感染対策サーベイランス(JANIS)に着目し、JANIS データベースから 2012 年から 2021 年までのヘリコバクター・ピロリの細菌検査データを抽出して、薬剤耐性率を集計した。JANIS に参加している 3,207 病院(2024 年 1 月)の中でヘリコバクター・ピロリの細菌検査データを登録しているのは、最も多い年で 142 病院、少ない年で 73 病院とごく一部だったが、菌株数としては年間数千株のデータが得られることがわかった。薬剤耐性率の結果を日本ヘリコバクター学会が実施したサーベイランスの結果と比較したところ、クラリスロマイシンの耐性率はほぼ同等であり、アモキシシリンとメトロニダゾールの耐性率は年により乖離があった。乖離の原因としては試験法の違いや精度管理などが考えられた。特にメトロニダゾールについては微量液体希釈法と Etest で結果が大きく乖離していた。ヘリコバクター・ピロリの培養と薬剤感受性試験は一般的に 1 次除菌の際には実施することは少なく、1 次除菌に失敗した際に実施されることが多いと考えられる。そのため、JANIS に登録されているデータは 1 次除菌失敗例が多い可能性がある。そのため、結果の解釈にはそれらのバイアスも考慮する必要がある。なお、JANIS には除菌治療歴のデータが含まれておらず、また制度上の制約で JANIS の参加病院に個別に追加情報を求めることができない。この課題の解決のため病院にアンケートを実施し、まず除菌治療と薬剤感受性試験の実態を把握することとした。282 名の回答が得られ、薬剤感受性試験の実施率が低いこと、感受性試験の実施法は寒天平板希釈法と微量液体希釈法に分かれることなどの問題点が示された。今後も薬剤感受性試験の普及とともに、耐性菌パネル菌株の利用を含めた標準化を推進させる必要性が示唆された。いずれにしても、薬剤感受性試験には標準株を用いた精度管理が重要であり、また試験法も統一することが望ましいと考えられる。精度管理のためにこれまでに作成した基準パネル菌株の MIC を測定したところ、作成当初と変化がなく、安定して保存されていることを確認した。一方、日本ヘリコバクター学会が実施した 2018 年-2020 年のサーベイランスの結果については標本とした患者や試験法などデータの特性を整理し課題をまとめて論文に発表した。そしてこれらの結果を踏まえ厚生労働省にピロリ菌感染を感染症法の 5 類に指定する要望を提出した。その他同一患者から胃内液および糞便検体を用いたヘリコバクター・ピロリの遺伝子およびクラリスロマイシン耐性遺伝子変異を自動 PCR 判定器(スマートジーン)で測定して両者を比較した。一致率は 97.3%で、両検査ともに、ヘリコバクター・ピロリ感染診断と適正な治療薬の選択に有用であることを示した。ヘリコバクター・ピロリ以外のヘリコバクター属菌については、分担者が代表を務める研究班(AMED 林原班)で実施されている多施設疫学調査で 2023 年 7 月までに 30 株を分離した。そのうち、28 株は豚や猿を自然宿主とするヘリコバクター・スuis、2 株はスuis以外のヘリコバクター属菌(NHPH)だった。ヒト由来 NHPH 30 株について、薬剤感受性試験を行った結果、MIC₉₀はアモキシシリンが 2 μg/ml、クラリスロマイシンが 0.5 μg/ml、メトロニダゾールが 32 μg/ml、ミノサイクリンが 4 μg/ml、レボフロキサシンが 16 μg/ml であった。耐性株については、変異を同定した。薬剤感受性試験法については、原法を簡便化して汎用の培地、試薬を用いた微量液体希釈法の試験プロトコルを考案し、臨床分離株で評価を行った。臨床分離株の中には簡便法で培養できないものがあることがわかった。病原性に関する研究では、この菌は胃上皮細胞の TLR4 を介してタイプ 1-IFN を産生、B リンパ球を活性化し、さらに IFN-γ 産生を誘導し、著明な胃粘膜リンパ濾胞を形成させる機序を明らかにした。また同時に多施設感染実態調査でヘリコバクター・スuis感染の症例データを集積し、臨床像をとりまとめた。

研究分担者

大崎敬子・杏林大学医学部・教授
加藤元嗣・国立病院機構函館病院名誉院長
杉山敏郎・北海道医療大学先端研究センター・客員教授
村上和成・大分大学医学部・教授
林原絵美子・国立感染症研究所細菌第二部・
主任研究官
徳永健吾・杏林大学医学部・准教授

A 研究目的

この研究班は、ヘリコバクター・ピロリについては薬剤耐性の継続的なモニタリングの方法を提言することを目的とした。また、ヘリコバクター・ピロリ以外のヘリコバクター属菌については薬剤耐性の実態は不明であるため、まず実態を調査することを目的とした。昨年度までに日本ヘリコバクター学会が実施してきたサーベイランスを検証し課題を整理するとともに、厚生労働省院内感染対策サーベイランス(JANIS)のデータベースからヘリコバクター・ピロリの薬剤感受性試験の結果データを抽出し、集計した。ヘリコバクター・ピロリの培養と薬剤感受性試験の実施状況についても JANIS データで調べた。今年度は薬剤集計されたデータを検証し課題を整理するとともに、その課題を解決するため医療機関にアンケートをとることとした。薬剤感受性試験の精度管理については、これまでに作成した精度管理標準株の安定性の評価を引き続き行うとともに利用の促進を図ることとした。また、ヘリコバクター・ピロリ感染ならびにクラリスロマイシン耐性を簡便に検出する技術開発を行った。ヘリコバクター・ピロリ以外のヘリコバクター属菌については、AMED 林原班で実施されているヘリコバクター・スイスの多施設疫学調査の収集菌株で薬剤感受性試験を行うとともに簡便化した試験法を考案した。

B. 研究方法

JANIS データの利用に当たっては、厚生労働省に統計法の利用申請を行い、2012 年から 2021 年までのデータベースからヘリコバクター・ピロリの細菌検査のデータを集計した。ヘリコバクター・ピロリのデータを抽出して、医療機関数、培養菌株数、薬剤感受性試験実施数、薬剤感受性試験方法内訳、薬剤耐性率を集計した。精度管理標準株については、凍結保存株について薬剤感受性試験を実施した。ヘリコバクター・スイスについては、菌株収集を進めるとともに薬剤感受性試験を簡便化し汎用性が高い手法を開発した。収集菌株の薬剤感受性試験を実施し、最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。また、ドラフトゲノムを得て菌種の同定や薬剤耐性メカニズムの解析等を行った。

倫理面への配慮

ヘリコバクター・ピロリの除菌治療に関するアンケート調査については日本ヘリコバクター学会倫理委員会に対して研究計画申請をした。審査委員会より、本研究は人を対象とする生命科学・医学系研究ではない研究に分類されるとの評価をうけ、研究計画の承認をうけた (承認番号 23002)。胃液と糞便からのヘリコバクター・ピロリの検出については、国立病院機構函館病院、聖マリアンナ医科大学の倫理委員会による承認を受け、すべての患者

からインフォームドコンセントを得て実施した。ヘリコバクター・スイス菌株の収集にあたっては人を対象とする生命科学・医学系研究として、杏林大学医学部、日本ヘリコバクター学会、各参加施設の倫理委員会に申請し承認を受けた。内視鏡下生検法を行うため、被験者には十分な説明を行い、研究への参加について書面による同意を得た。

C. 研究結果

JANIS に参加している 3,207 病院 (2024 年 1 月) の中でヘリコバクター・ピロリの細菌検査データを登録しているのは、最も多い年で 142 病院、少ない年で 73 病院とごく一部だったが、菌株数としては年間 4 千件以上のデータが得られることがわかった。アンチバイオグラムを日本ヘリコバクター学会が実施したサーベイランスと比較したところ、クラリスロマイシンの耐性率はほぼ同等であり、アモキシシリンは JANIS の方が耐性率が高い傾向にあり、メトロニダゾールの耐性率は年により大きく変動していて乖離もあった。なお、メトロニダゾールについては JANIS の集計結果で微量液体希釈法と Etest で結果が大きく乖離していることがわかった。実際、メトロニダゾールについては我々が作成した標準株でも試験法によるブレが見られ、寒天平板希釈法で MIC が $4 \mu\text{g/ml}$ の株が E-test では $0.023 \mu\text{g/ml}$ だった。このように集計の際には試験法による違いを考慮する必要があることがわかった。また、ヘリコバクター・ピロリの培養と薬剤感受性試験は一般的に一次除菌の際には実施することは少なく、一次除菌に失敗した際に実施されることが多い。そのため、JANIS に登録されているデータは一次除菌失敗例が多い可能性がある。ヘリコバクター・ピロリの薬剤耐性の集計を JANIS で行う場合、このバイアスが最も大きな課題と考えられる。ヘリコバクター・ピロリの薬剤耐性の集計には除菌治療歴の有無によるデータの層別化が必須であるが、JANIS データベースにはもともと除菌治療歴のデータは含まれていない。JANIS は統計法に基づく調査であるため、参加病院は匿名化されている。そのため JANIS の参加病院に個別に追加情報を求めることができない。この問題の解決のため、病院にアンケートをとって JANIS によるサーベイランスに協力を求めることとした。282 名の回答が得られ、薬剤感受性試験の実施率が低いこと、感受性試験の実施法は寒天平板希釈法と微量液体希釈法に分かれることなどの問題点が示された。薬剤感受性試験は全体の 19% が実施しており、試験対象抗菌薬は CAM96%、AMPC 86%、MNZ 78%、STFX 45% だった。

JANIS 検査部門に参加しているとの回答は 18%、参加していない、60%、不明、22%であった。精度管理用の基準パネル菌株の MIC は、今年度も作成当初と変化がなく、安定して保存されていることを確認した。

日本ヘリコバクター学会が実施した2018年-2020年のサーベイランスの結果については標本とした患者や試験法などデータの特性を整理し課題をまとめて論文に発表した。そしてこれらの結果を踏まえ厚生労働省にピロリ菌感染を感染症法の5類に指定する要望を提出した。

その他、胃内液および糞便検体を用いた *H. pylori* 遺伝子およびクラリスロマイシン耐性遺伝子変異を自動PCR判定器(スマートジーン)で測定して両者を比較した。一致率は97.3%で、両検査ともに、*H. pylori* 感染診断と適正な治療薬の選択に有用であることを明らかにした。

ヘリコバクター・ピロリ以外のヘリコバクター属菌については、分担者林原が代表を務めるAMED研究班で2023年7月までに30株を分離した。そのうち、28株は豚や猿を自然宿主とする *Helicobacter suis*、2株は *H. suis* 以外のNHPH株だった。ヒト由来NHPH 30株について、薬剤感受性試験を行った結果、MIC₉₀ はアモキシシリンが2 µg/ml、クラリスロマイシンが0.5 µg/ml、メトロニダゾールが32 µg/ml、ミノサイクリンが4 µg/ml、レボフロキサシンが16 µg/mlであった。耐性株については、変異を同定した。薬剤感受性試験法については、原法を簡便化して汎用の培地、試薬を用いた微量液体希釈法の試験プロトコルを考案し、臨床分離株で評価を行った。臨床分離株の中には簡便法で培養できないものがあることがわかった。病原性に関する研究では、この菌はTLR4を介して胃上皮細胞からタイプ1-IFNを産生、Bリンパ球を活性化、さらにIFN-γ産生を誘導し、著明な胃粘膜リンパ濾胞を形成させる機序を明らかにした。除菌治療法については、ヘリコバクター・ピロリと同じレジメンのボノプラザン40mg+アモキシシリン1500mg+クラリスロマイシン400mg、7日間で多くの症例において除菌が成功している。

D. 考察

JANISを利用してヘリコバクター・ピロリの薬剤耐性の集計が可能であることがわかった。しかし、試験法により薬剤感受性試験結果が乖離すること、またJANISに提出されているデータは一次除菌失敗例が多いというバイアスがあること、JANISデータには除菌治療歴の情報がなく、データを提出した病院に個別に問い合わせることも統計法の制約から出来ないという課題が明らかになった。これらを克服するため、病院にアンケートをとり今後JANISによる集計の際に除菌歴の情報の提供の協力を求める予定である。ヘリコバクター・スイスについては薬剤耐性株がある程度存在することが明らかになった。なお、ヘリコバクター・スイスは人工培養は可能であるものの、同一の条件でも菌株により発育しにくい場合がある。薬剤感受性試験に用いる培地についても、簡便な組成のものだと発育が得られない株があった。このような株については分担者林原らが報

告したMTT試薬を用いる原法を用いる必要がある。除菌治療法については、ヘリコバクター・ピロリのレジメンで成功しているが、耐性菌の判定のためのブレイクポイントを今後検討していく必要がある。

E. 結論

JANISデータベースからヘリコバクター・ピロリの薬剤感受性データが集計できることがわかったが、除菌治療歴の有無や試験法などバイアスがあることがわかった。これらの課題を解決できれば、JANISは少なくともヘリコバクター・ピロリの薬剤耐性サーベイランスのsurrogateとして利用できる可能性が高いと考えられる。同時に、ヘリコバクター・ピロリ感染症を感染症法の第5類の対象疾患に含めることも引き続き検討していく必要がある。いずれにしても胃がんの予防について国民への啓発がより深くなされるためにも、感染の状況や感染予防の方策が国によって把握、実施されることが大切である。ピロリ菌以外のヘリコバクター属菌については、最適な除菌治療法を提言するために今後も薬剤感受性情報および薬剤耐性に関する遺伝子変異の有無に関する情報を蓄積していく必要がある。

F. 健康危険情報

ヘリコバクター・ピロリの除菌治療については、近年ボノプラザンの導入によりクラリスロマイシン耐性株であっても除菌に成功する例が多いことがわかって来た。この状況を踏まえ、今後除菌治療に用いる抗菌薬を再考するとともに、薬剤耐性サーベイランスで監視対象とする抗菌薬も検討していく必要があると考えられる。

G. 研究発表

- 論文発表
 - Okimoto T, Osaki T, Sugiyama T, et al. Antimicrobial-resistant *Helicobacter pylori* in Japan: Report of nationwide surveillance for 2018–2020, *Helicobacter* 2023, DOI: 10.1111/hel.13028
 - Sugiyama T, Nanjyo S, et al. *Helicobacter pylori* re-infection diagnosed by endoscopic and histologic recurrence in a patient with gastric MALT lymphoma, *Case Rep Gastroenterol.* 17:47–54, 2023
 - Matsui H, Suzuki M, Aoki S, Shibayama K, Tokunaga K, Suzuki H, Mabe K, Kenri T, Rimbara E. Protocol for detecting *Helicobacter suis* infection in gastric biopsies and serum by PCR and ELISA. *STAR Protoc.* 2023 Dec 15;4(4):102556.
 - Yamaguchi H, Okubo T, Nozaki E, Osaki T. Differential impact of environmental factors on airborne live bacteria and inorganic particles in an underground walkway. *PLoS One.* 2024;19(3):e0300920. Published 2024 Mar 21. doi:10.1371/journal.pone.0300920

- 5) Matsui H, Rimbara E, Suzuki M, Tokunaga K, Suzuki H, Sano M, Ueda T, Tsugawa H, Nanjo S, Takeda A, Sasaki M, Terao S, Suda T, Aoki S, Shibayama K, Ota H, Mabe K. Development of serological assays to identify *Helicobacter suis* and *H. pylori* infections. *iScience*. 2023 Mar 29;26(4):106522.
 - 6) Tsuda M, Watanabe Y, Oikawa R, Watanabe R, Higashino M, Kubo K, Yamamoto H, Itoh F, Kato M. Tsuda M, Watanabe Y, Oikawa R, Watanabe R, Higashino M, Kubo K, Yamamoto H, Itoh F, Kato M. Impact of mixed-infection rate of clarithromycin-susceptible and clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains on the success rate of clarithromycin-based eradication treatment. *Helicobacter*. 2024 Mar-Apr;29(2):e13062.
 - 7) Kobayashi M, Fujisaki J, Namikawa K, Hoteya S, Sasaki A, Shibagaki K, Yao K, Abe S, Oda I, Ueyama H, Isomoto H, Ito M, Sugimoto M, Kawai T, Kodama M, Murakami K, Adachi K, Matsuhashi N, Ohata K, Ushijima T, Kato M, Miyamoto S, Yoshimura D, Yao T, Yagi K, Iwaizumi M, Uemura N. Multicenter study of invasive gastric cancer detected after 10 years of *Helicobacter pylori* eradication in Japan: Clinical, endoscopic, and histopathologic characteristics. *DEN Open*. 2024 Mar 2;4(1):e345.
 - 8) Kubo M, Ono S, Dohi O, Fukui H, Hikichi T, Kato T, Tsuda M, Matsumoto M, Kato S, Mukai R, Yagi N, Takagi R, Sakamoto N, Kato M; LAN Trial Group. Surveillance esophagogastroduodenoscopy using linked color imaging and narrow-band imaging: A multicenter randomized controlled trial. *J Gastroenterol Hepatol*. 2024 Feb 25.
 - 9) Kubo K, Mabe K, Kikuchi S, Kato M. Diagnostic Accuracy of a Novel Stool Antigen Test for *Helicobacter pylori* Infection in a Medical Checkup Setting: A Prospective Cohort Study. *Intern Med*. 2023 Nov 6.
 - 10) Kodama M, Mizukami K, Hirashita Y, Okimoto T, Wada Y, Fukuda M, Ozaka S, Kudo Y, Ito K, Ogawa R, Okamoto K, Fukuda K, Murakami K. Differences in clinical features and morphology between differentiated and undifferentiated gastric cancer after *Helicobacter pylori* eradication. *PLoS One*. 2023 Mar 31;18(3)
 - 11) Mizukami K, Kodama M, Fukuda M, Hirashita Y, Tsutsumi K, Fukuda K, Ogawa R, Okamoto K, Okimoto T, Murakami K. Comparison of the improvement in gastric mucosal tissue after *Helicobacter pylori* eradication between young and elderly people. *Arab J Gastroenterol*. 2023 May;24(2):98-103.
 - 12) 柴山 恵吾. JANIS データからみた *Helicobacter pylori* 薬剤耐性. *Helicobacter Research*, 2024 in press.
2. 学会発表
- 1) The 19th Korea-Japan Joint Symposium 1. Medical Concerns and Strategies in the Era of Active Eradication for *H. pylori* Infection, The 31st Annual Meeting of the Korean College of *Helicobacter* and Upper Gastrointestinal Research & International Symposium on *Helicobacter* and Upper Gastrointestinal Diseases & The 19th Korea-Japan Joint Symposium
 - 2) A Novel Diagnostic Method for *Helicobacter pylori*: Clinical evaluation of a novel molecular diagnosis kit for detecting *H. pylori* using intragastric fluid or stool. The 32th Annual Meeting of the Korean College of *Helicobacter* and Upper Gastrointestinal Research Mar 14, 2024. Seoul, Korea
 - 3) The impact of co-infectious rate of clarithromycin-susceptible and resistant *H. pylori* strains for the efficacy eradication treatment including clarithromycin. XXXVIth Workshop of the European *Helicobacter* and Microbiota Study G
 - 4) Rimbara E, Matsui H, Suzuki M, Tokunaga K, Suzuki H, Sano M, Ueda T, Tsugawa H, Nanjo S, Takeda A, Sasaki M, Terao S, Suda T, Aoki S, Shibayama K, Ota H, Mabe K. Development of serological assays to identify *Helicobacter suis* infections and whole genome-based phylogeny of *H. suis* isolates. *ASM Microbe*, 2023 年 6 月, Houston, TX.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定も含む。)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし