

学 位 論 文 題 名

The Relationship Between Consumption of
Antimicrobial Agents and the Prevalence of
Primary *Helicobacter Pylori* Resistance.

(ヘリコバクター・ピロリの薬剤一次耐性と抗菌薬使用量との関係)

学位論文内容の要旨

緒 言

ヘリコバクター・ピロリは 1983 年に発見されたグラム陰性桿菌で、ヒトの胃粘膜に持続感染して胃炎を引き起こす。ヘリコバクター・ピロリ感染に伴う胃炎は様々な上部消化管疾患と関連することが明らかとなった。ヘリコバクター・ピロリの除菌により、組織学的胃炎の改善、消化性潰瘍の再発予防および治癒促進、胃 MALT リンパ腫や過形成ポリープの消失などがもたらされる。ヘリコバクター・ピロリ陽性の消化性潰瘍と低悪性度胃 MALT リンパ腫に対する第一選択の治療法はヘリコバクター・ピロリ除菌であることが、わが国のガイドラインにも明記されている。現在、世界的にプロトンポンプ阻害剤と 2 種類の抗菌薬を用いた 3 剤併用療法が標準的な除菌治療法となっている。除菌治療に用いられる主な抗菌薬はアモキシシリン、クラリスロマイシン、メトロニダゾールであり、わが国でもプロトンポンプ阻害剤、アモキシシリン、クラリスロマイシンの 3 剤併用療法が消化性潰瘍の治療として保険適用になっている。わが国における無作為二重盲検比較試験の多施設検討の成績から除菌率は約 85-90%であった。初回除菌に失敗した場合には、日本ヘリコバクター学会のガイドラインでは再除菌法としてプロトンポンプ阻害剤、アモキシシリン、メトロニダゾールの 3 剤併用療法が推奨されている。ヘリコバクター・ピロリの耐性菌、患者のコンプライアンス、酸分泌抑制の不足が除菌療法失敗の主な原因として考えられている。中でもヘリコバクター・ピロリの除菌療法失敗の最大の理由は抗菌薬の一次耐性の存在とされる。最近、わが国ではクラリスロマイシンの一次耐性率が徐々に増加傾向にあると報告されているが、その耐性菌の増加の原因については明らかではない。また、除菌が失敗すると高頻度に二次耐性が出現することも知られている。そこで今回、わが国における耐性菌の実態とその原因について明らかにするために、保険認可前のわが国における 3 種類の抗菌薬に対する一次耐性率とそれらの年間抗菌薬使用量との関係を検討した。

材料と方法

1995 年から 2000 年において北海道大学病院で内視鏡検査を受けて、ヘリコバクター・ピロリの培養を施行した 593 例の日本人を対象とした。男性 380 例、

女性 213 例で年齢は 16 才から 86 才までで平均年齢 51 才であった。以前に除菌治療を既往がある者、上部消化管の手術を受けた者は除外した。インフォームドコンセントは全例から取得した。内視鏡施行に胃幽門部大弯と胃体部大弯の 2 箇所から生検を行った。その生検組織をヘリコバクター・ピロリ用培地（栄研、東京）で微好気条件の下で 35℃ 7 日間培養した。菌の同定はグラム染色、オキシダーゼ活性、カタラーゼ活性、ウレアーゼ活性を調べた。培養された菌は 20% グリセオールを添加した BHI 培地に入れて -80℃ で保存した。

薬剤感受性試験については、これらの保存菌を用いて寒天希釈法でメトロニダゾール、クラリスロマイシン、アモキシシリンに対する最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。メトロニダゾールは 1mg/l から 256mg/l、クラリスロマイシンとアモキシシリンは 0.5mg/l から 16mg/l の濃度に希釈したものを自家製スキロー培地に添加した。国際的な標準に従って、メトロニダゾールは 8 mg/l、クラリスロマイシンは 1 mg/l、アモキシシリンは 0.5 mg/l 以上の最小発育阻止濃度値の場合に薬剤耐性と判断した。

クラリスロマイシンとメトロニダゾールの年間使用量はこれらの抗菌薬すべての年間売上高からその時点での薬価を基準に算出した。

統計処理は χ^2 検定で行い、危険率 5% 以下を有意差ありとした。

結果および考察

ヘリコバクター・ピロリ菌のクラリスロマイシン、メトロニダゾール、アモキシシリンに対する一次耐性は、それぞれ 11%、9%、0.3 % であった。クラリスロマイシンの耐性率は、1997-98 年時では 7% だったが、1999-2000 年時では 15.2% へ有意に上昇していた ($p=0.003$)。同観察期間中、メトロニダゾールは 6.6% から 12% へ有意に上昇した ($p=0.02$)。この間のクラリスロマイシンの年間使用量は飛躍的に上昇しており、メトロニダゾールの年間使用量も増加していた。クラリスロマイシンとメトロニダゾールの耐性率の上昇は、これらの抗菌薬の年間使用量と関連していた。

結 語

クラリスロマイシンとメトロニダゾールの耐性率の上昇は、これらの抗菌薬の年間使用量の増加を反映していると考えられた。現在の日本におけるクラリスロマイシンの耐性率の増加は、将来的にはクラリスロマイシンを含む除菌療法の有効性が危惧される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 今 村 雅 寛

学 位 論 文 題 名

The Relationship Between Consumption of Antimicrobial Agents and the Prevalence of Primary *Helicobacter Pylori* Resistance.

(ヘリコバクター・ピロリの薬剤一次耐性と抗菌薬使用量との関係)

ヘリコバクター・ピロリ (*H. pylori*) はグラム陰性桿菌で、ヒトの胃粘膜に持続感染して胃炎を引き起こす。*H. pylori* 陽性の消化性潰瘍と低悪性度胃 MALT リンパ腫に対する第一選択の治療法は *H. pylori* 除菌である。除菌治療に用いられる主な抗菌薬はアモキシシリン (AMPC)、クラリスロマイシン (CAM)、メトロニダゾール (MNZ) である。中でも *H. pylori* の除菌療法失敗の最大の理由は抗菌薬の一次耐性の存在とされる。そこで今回我々はわが国における耐性菌の実態とその原因について明らかにするために、3種類の抗菌薬に対する一次耐性率とそれらの年間抗菌薬使用量との関係を検討した。1995年から2000年に *H. pylori* の培養を施行した593例の日本人を対象とした。これらの保存菌を用いて寒天希釈法で MNZ、CAM、AMPC に対する最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。CAM と MNZ の年間使用量はこれらの抗菌薬すべての年間売上高からその時点での薬価を基準に算出した。*H. pylori* 菌の CAM、MNZ、AMPC に対する一次耐性は、それぞれ11%、9%、0.3%であった。CAM と MNZ の耐性率の上昇は、これらの抗菌薬の年間使用量と関連していた。CAM と MNZ の耐性率の上昇は、これらの抗菌薬の年間使用量の増加を反映していると考えられた。次に、MNZ の耐性化機序についての基礎実験の成績を報告した。MNZ の耐性化には *frxA*、*rdxA* などの還元酵素の遺伝子変異が関連すると報告されているが、まだ十分に解明されていない。そこで、MNZ 感受性の臨床株5株を用いて、低濃度の MNZ 下に培養を繰り返して耐性化誘導を行った。各臨床株それぞれに濃度を変えて合計15回の耐性化誘導を行ったところ、6株に低レベルから高レベルの耐性化が認められた。*frxA*、*rdxA* の遺伝子に焦点を絞り、この遺伝子の変異の有無をダイレクト PCR 法にて検討した。耐性化しなかった9株については両遺伝子の変異を認めなかった。耐性化した6株のうち4株に両遺伝子の単独または並存の変異 (missense mutation) を認めた。これらの結果から *frxA*、*rdxA* は MNZ の耐性化に関与していることが明らかになった。ただし、両遺伝子異常を認めない耐性株の存在からその他の耐性化機序の存在が示唆された。

口頭発表に際し、副査である今村教授より、耐性誘導株に *frxA*、*rdxA* の遺伝子変異が認められているが、その変異と耐性レベルが必ずしも相関しないのはなぜかとの質問があった。申請者はこれらの遺伝子をノックアウトした場合には耐性化レベルが一定となるが、今回の変異はいずれも missense mutation であり、酵素蛋白合成の機能は保たれている。そのため耐性化レベルは合成された酵素の活動性に依存するため、ノックアウトした場合の結果と同じにはならなかった答えた。続いて臨床の耐性株の遺伝子変異についての質問がなされ、申請者は臨床の耐性株においても同様な遺伝子変異が報告されていると述べた。さらに、CAM の耐性機序についての質問があり、申請者は CAM では 23SrRNA の点変異が耐性機序であると答えた。副査の浅香教授からは CAM と MNZ の世界での耐性率について質問があった。申請者は CAM は 5-10% 位であるが、MNZ は 10-90% と幅広く、特に発展途上国では高い傾向にあると答えた。次に、申請者の母国であるメキシコでの MNZ 耐性率について問われ、申請者は 30-40% と答えた。また、MNZ の消費量の変化はあまり顕著でないが、耐性率が上昇している理由についての質問には、CAM と比較すると顕著ではないが、確実に消費量は増えていると答えた。最後の質問はメキシコに帰国してからの研究目標で、胃癌と *H. pylori* の関連についての研究を希望していると答えた。最後に主査小池教授より、*H. pylori* の培養時に迅速に遺伝子変異を調べる方法が問われた。申請者は CAM にはあるが、MNZ についてはシークエンスをしなければないと答えた。次に、AMPC の耐性化機序についての質問で、申請者はペニシリン結合蛋白の異常との報告を紹介した。次に、AMPC の消費量と耐性との関連性について質問があったが、申請者は今回データは持っていないが、AMPC の耐性化は非常にまれであるのであまり問題にならないと回答した。

本研究はわが国における *H. pylori* の一次耐性の割合の増加が抗菌薬の使用と関連があり、さらに MNZ の耐性機序に *frxA*、*rdxA* の遺伝子変異が関与していることを明らかにしたことで高く評価され、今後の *H. pylori* 治療や耐性化予防に結びつくことが期待された。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。