

# 胃潰瘍患者胃粘膜より分離した *Helicobacter pylori* の各種抗菌薬感受性

小林 寅詰<sup>1)</sup>・戸田 陽代<sup>1)</sup>・長谷川美幸<sup>1)</sup>・西田 実<sup>1)</sup>・藤岡 利生<sup>2)</sup>・那須 勝<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 三菱化学ビーシーエル化学療法研究室\*

<sup>2)</sup> 大分医科大学第2内科

(平成8年3月21日受付・平成8年6月19日受理)

1995年6月以後に胃潰瘍患者胃粘膜より分離した *Helicobacter pylori* 56株のペニシリン系、ペネム系、マクロライド系およびニューキノロン系抗菌薬の9薬剤に対する薬剤感受性を測定した。その結果、amoxicillin および clavulanic acid/amoxicillin は試験菌株のすべてに対し MIC は 0.20  $\mu\text{g/ml}$  以下で耐性菌株はまったく認められなかった。Frophenem の抗菌力は試験薬剤中でもっとも強く 56株中 55株は MIC  $\leq 0.025 \mu\text{g/ml}$  残り 1株は 0.05  $\mu\text{g/ml}$  であった。マクロライド系 5薬剤の MIC<sub>50</sub> 値は 0.05~0.39  $\mu\text{g/ml}$  であった。しかし clarithromycin 以外の 4薬剤の MIC<sub>90</sub> 値は 50  $\mu\text{g/ml}$  以上で、耐性菌株が存在することを認めた。Levofloxacin の MIC は 25  $\mu\text{g/ml}$  を示した 1株を除き 0.10~6.25  $\mu\text{g/ml}$  に分布した。また抗菌薬による除菌治療前に分離された 27株と、治療中または治療後に分離された 29株に分類して両群の MIC を比較すると、明らかに後者にマクロライド薬に対する耐性株が多く存在した。胃潰瘍患者の *H. pylori* に対する抗菌薬による除菌療法には耐性株の出現を十分考慮して、慎重に行われることが必要である。

**Key words:** *Helicobacter pylori*, drug-susceptibility, drug-resistance

1983年 Warren と Marshall らの報告以来、胃潰瘍やその他の消化器疾患の発症と *Helicobacter pylori* との関連性について多くの検討がなされている。また *H. pylori* の除菌が潰瘍の再発防止に有用であることが報じられ、1994年には NIH が *H. pylori* 感染潰瘍患者に対し抗菌薬治療による除菌の必要性を示した。わが国においても消化器病学会を中心とし抗菌薬化学療法による *H. pylori* の除菌治療に関する検討が進行中である。除菌に用いられる抗菌薬は主にペニシリン系の amoxicillin (AMPC) やマクロライド系の clarithromycin (CAM) である。近年、他の細菌類と同様、これらの薬剤に対する *H. pylori* の耐性化が報告され、治療方針に大きな影響を与え、耐性化の抑制と効果的な治療方式の確立が検討されている。今回、我々はまず新鮮分離 *H. pylori* の多数株について、各種の抗菌薬感受性を測定し、常用薬に対する耐性の現状を調査した。

## I. 材料および方法

### 1. 試験菌株

1995年6月以後に全国の医療施設において主に胃潰瘍患者より採取した胃粘膜が HP 培地<sup>1)</sup> (栄研) を用いて当研究室に搬入され、これを試料として分離した *H. pylori* 56株を試験菌株とした。*H. pylori* の同定は、グラム染色性が湾曲した螺旋状グラム陰性桿菌で、オキシダーゼ試験陽性、カタラーゼ産生およびウレアーゼ強産生を確認し、Manual of Clinical Microbiology 6th ed<sup>2)</sup> に従って行った。

### 2. 抗菌薬

Amoxicillin (AMPC, スミスクラインビーチャム), clavulanic acid/amoxicillin (CVA/AMPC, ビーチャム薬品), frophenem (FRPM, サントリー), erythromycin (EM, シオノギ製薬), clarithromycin (CAM, 大正製薬), azithromycin (AZM, ファイザー製薬), roxithromycin (RXM, エーザイ), rokitamycin (RKM, 旭化成), levofloxacin (LVFX, 第一製薬)。

以上力価の明らかな 9薬剤を用いた。

### 3. MIC 測定法

MIC 測定は日本化学療法学会標準法<sup>3)</sup> に準じ、寒天平板希釈法で行った。すなわちコロンビア 5% 羊血液寒天培地 (BBL) で CO<sub>2</sub> 10%, 35℃, 72時間前培養し、発育した試験菌を平板よりかきとり、Brucella broth (Difco) で約 10<sup>6</sup> CFU/ml となるように調製したものを被検菌液とした。各抗菌薬の 2倍希釈系列 (100~0.025  $\mu\text{g/ml}$ ) を含む 5% ウマ脱繊維血液加 Brucella agar (Difco) に各被検菌液を 5  $\mu\text{l}$  ずつ接種し、CO<sub>2</sub> 10%, 35℃, 72時間培養し発育の認められない最小濃度を MIC とした。

## II. 結果

*H. pylori* 56株に対する各種抗菌薬の MIC を Table 1 に示した。AMPC, CVA/AMPC の MIC<sub>50</sub> 値は  $\leq 0.025 \mu\text{g/ml}$ , MIC<sub>90</sub> 値は、前者が  $\leq 0.025 \mu\text{g/ml}$ , 後者

Table 1. Drug susceptibilities of 56 clinical isolates of *Helicobacter pylori* to various types of antimicrobial agents

Drug	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup>		
	50%	90%	range
Amoxicillin	$\leq 0.025$	$\leq 0.025$	$\leq 0.025 - 0.20$
Amoxicillin/clavulanic acid	$\leq 0.025$	0.05	$\leq 0.025 - 0.20$
Froprinem	$\leq 0.025$	$\leq 0.025$	$\leq 0.025 - 0.05$
Levofloxacin	0.39	3.13	0.10 - 25
Erythromycin	0.10	100	$\leq 0.025 - >100$
Clarithromycin	0.05	6.25	$\leq 0.025 - 25$
Roxithromycin	0.10	100	$\leq 0.025 - >100$
Azithromycin	0.20	>100	$\leq 0.025 - >100$
Rokitamycin	0.39	50	$\leq 0.025 - >100$

<sup>a</sup> 50% and 90%, MICs for 50 and 90% of isolates tested, respectively

は 0.05  $\mu\text{g/ml}$  と低い値であった。MIC range から明らかな通り、試験菌すべて 0.20  $\mu\text{g/ml}$  以下で耐性株は認められなかった。FRPM は MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub> ともに  $\leq 0.025 \mu\text{g/ml}$  で、試験に用いた 9 種の抗菌薬のなかでもっとも強い活性を示した。また MIC range も  $\leq 0.025 \sim 0.05 \mu\text{g/ml}$  と、FRPM の MIC が 0.10  $\mu\text{g/ml}$  以上の株はまったく存在しなかった。マクロライド系 5 薬剤において、MIC<sub>50</sub> 値は CAM の 0.05  $\mu\text{g/ml}$  がもっとも低く、次いで EM, RXM の 0.10  $\mu\text{g/ml}$ , AZM の 0.20  $\mu\text{g/ml}$ , RKM は 0.39  $\mu\text{g/ml}$  でいずれも感受性域であった。しかし MIC<sub>90</sub> 値は CAM の 6.25  $\mu\text{g/ml}$  を除き他 4 薬剤はすべて 50  $\mu\text{g/ml}$  以上と耐性域であった。MIC range は CAM が  $\leq 0.025 \sim 25 \mu\text{g/ml}$  で他は  $\leq 0.025 \sim >100 \mu\text{g/ml}$  と感受性から高度耐性株まで広く分布した。ニューキノロン薬の LVFX は MIC<sub>50</sub> で 0.39  $\mu\text{g/ml}$ , MIC<sub>90</sub> は 3.13  $\mu\text{g/ml}$  であった。MIC range は 0.10  $\sim 25 \mu\text{g/ml}$  と本薬剤に対し比較的中程度感受性を示す菌株の存在が見られた。

除菌治療前に分離された 27 株と、除菌治療中または治療後に分離した 29 株に分類し、各試験薬の MIC を Table 2 に示した。AMPC, CVA/AMPC は治療前株と中、後株に大差はなく、両薬剤の MIC<sub>50</sub> 値はすべて  $\leq 0.025 \mu\text{g/ml}$  とまったく同じであった。MIC<sub>90</sub> 値は治療中、後の株は両薬剤ともに  $\leq 0.025 \mu\text{g/ml}$  であったのに対し、治療前株は AMPC 0.05  $\mu\text{g/ml}$ , CVA/AMPC 0.10  $\mu\text{g/ml}$  と 2~4 倍高い値であった。FRPM は、治療前および治療中、後の各菌株は MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub> 値ともに  $\leq 0.025 \mu\text{g/ml}$  であった。マクロライド系抗菌薬では、治療中および治療後に分離された菌株に耐性株が多く存在した。治療前株の MIC<sub>50</sub> 値は CAM の  $\leq 0.025 \mu\text{g/ml}$  から、EM, RXM の 0.10  $\mu\text{g/ml}$ , AZM, RKM ともに 0.20  $\mu\text{g/ml}$  で治療中、後の株も CAM 0.05  $\mu\text{g/ml}$ , EM, RXM 0.10  $\mu\text{g/ml}$ , AZM 0.20  $\mu\text{g/ml}$ , RKM 0.39  $\mu\text{g/ml}$  と差は 1~2 倍内であった。しかし投与前株に対する MIC<sub>90</sub> 値は CAM の 0.10  $\mu\text{g/ml}$  から EM, RKM の 0.78  $\mu\text{g/ml}$  に対し、投与前、後に分離された株には CAM が 12.5  $\mu\text{g/ml}$ , 他の 4 薬剤はすべて 100  $\mu\text{g/ml}$  以上と明らかな相違を認めた。LVFX は投与前と、投与前後に分離された株間で MIC<sub>50</sub> および MIC<sub>90</sub> 値にほとんど差はなく 1~2 倍程度であった。

### III. 考 察

1983 年 Warren と Marshall らが胃粘膜から *H. pylori* を報告して以来、慢性胃炎、十二指腸潰瘍さらには胃癌患者の病巣形成に本菌の関与を示唆する多くの研究が報告されている<sup>4-8)</sup>。

また *H. pylori* を摂取したボランティアが胃炎を発症したことから、本菌が Koch の原則を満たす感染症の起炎菌としてみなされている<sup>9,10)</sup>。

一方、欧米では *H. pylori* の除菌が潰瘍再発防止に有用であるとされ、1994 年には NIH が *H. pylori* 感

Table 2. Drug susceptibilities of *Helicobacter pylori* isolates from patients before, during and after drug treatments

Drug	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup>					
	50%		90%		range	
	before <sup>b</sup>	during or after <sup>c</sup>	before	during or after	before	during or after
Amoxicillin	$\leq 0.025$	$\leq 0.025$	0.05	$\leq 0.025$	$\leq 0.025 - 0.20$	$\leq 0.025$
Amoxicillin/clavulanic acid	$\leq 0.025$	$\leq 0.025$	0.10	$\leq 0.025$	$\leq 0.025 - 0.20$	$\leq 0.025 - 0.05$
Froprinem	$\leq 0.025$	$\leq 0.025$	$\leq 0.025$	$\leq 0.025$	$\leq 0.025$	$\leq 0.025 - 0.05$
Levofloxacin	0.39	0.20	6.25	3.13	0.20 - 25	0.10 - 6.25
Erythromycin	0.10	0.10	0.78	>100	0.05 - 100	$\leq 0.025 - >100$
Clarithromycin	$\leq 0.025$	0.05	0.10	12.5	$\leq 0.025 - 6.25$	$\leq 0.025 - 25$
Roxithromycin	0.10	0.10	0.20	>100	$\leq 0.025 - 50$	$\leq 0.025 - >100$
Azithromycin	0.20	0.20	0.39	>100	$\leq 0.025 - >100$	0.05 - >100
Rokitamycin	0.20	0.39	0.78	100	$\leq 0.025 - 50$	0.10 - >100

<sup>a</sup> 50% and 90%, MICs for 50 and 90% of isolates tested, respectively

<sup>b</sup> before (27 strains)

<sup>c</sup> during or after (29 strains)

染潰瘍患者に対し、抗菌薬治療による除菌の必要性に関する統一見解を示した。わが国においても消化器病学会を中心として1995年の“*Helicobacter pylori* 治療ガイドライン”にもとづき、除菌治療が行われている。除菌に用いられている抗菌薬はペニシリン系のAMPCやマクロライド系のCAMで、抗潰瘍薬のプロトンポンプインヒビターやH<sub>2</sub>ブロッカー等と併用で使用されている。しかし近年H. pyloriの抗菌薬に対する耐性化が報告され<sup>2)</sup>、抗菌薬による治療方針に影響を与えている。

今回の我々の検討結果では1995年6月以後に分離された新しい菌株は、AMPC、β-lactamase inhibitorとの配合薬およびFRPMのMICが0.20 μg/ml以下で耐性株はまったく存在しなかった。これは1992年のLoo<sup>3)</sup>らの報告と一致し、現在に至ってもH. pyloriではAMPCに対する耐性化は認められていない。特にカルバペネム系のFRPMは1株を除きすべて≤0.025 μg/mlともっとも強い抗菌活性を有していた。反面、マクロライド系抗菌薬に対しては耐性化が認められ、それらのMIC<sub>50</sub>は0.39 μg/ml以下でありながらMIC<sub>90</sub>はCAMを除き50 μg/ml以上と試験菌株のうち10%以上が耐性株であった。またこれらの耐性株は、ほとんど治療中または治療後に分離された株で、投与前に分離された株のMIC<sub>90</sub>はすべてのマクロライド系薬剤で0.78 μg/ml以下と感受性を示した。治療中または治療後に分離された耐性株はいずれもマクロライド薬による除菌治療を受けた患者から分離された株で、Haas<sup>14)</sup>らが指摘しているマクロライド薬との連続した接触によって生じた耐性化と推定できる。また彼らは同じ実験でAMPCには耐性化が生じにくいことも報告している。結果には示さなかったが我々はAMPCによる治療が行われた後の患者から本菌を分離したが、いずれの株もAMPCに耐性化は見られなかった。

一方、ニューキノロン薬は今回の試験においてLVFXのMIC 12.5 μg/ml以上の耐性株は1株と少なかったがほとんどがMIC 0.20~0.39 μg/mlと消化器疾患におけるH. pylori感染菌の治療のうえではAMPC、FRPMおよびCAMほど高い感受性を示さなかった。特にニューキノロン薬は耐性化しやすいとの報告もある<sup>15)</sup>。本菌においてもHirschlらはニューキノロン薬による治療中に出現したH. pyloriの耐性菌問題を指摘している<sup>16)</sup>。今回の検討からも明らかな通り、H. pyloriも例外なく他の細菌同様抗菌薬治療への抵抗および耐性化が問題となる。したがって胃潰瘍患者への本菌の除菌治療には原因菌の薬剤感受性の継続的なチェックと慎重な対応が必要である。

#### 文 献

- 1) 小林寅詰, 長谷川美幸, 藤岡利生, 那須 勝: 新しく考案した*Helicobacter pylori*輸送用培地 (HP培地)

の有用性。感染症誌 69: 123~124, 1995

- 2) Jerris R C: *Helicobacter*. Manual of Clinical Microbiology 6th ed. p. 492~498, American Society for Microbiology, Washington D. C., 1995
- 3) 日本化学療法学会 MIC測定法改訂委員会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 4) Blaser M J: *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. J. Infect. Dis. 161: 626~633, 1990
- 5) Marshall B J, McGeachie D B, Rogers P A, Glancy R J: Pyloric *Campylobacter* infection and gastroduodenal disease. Med. J. Aust. 142: 439~444, 1985
- 6) Nomura A, Stemmermann G N, Chyou P H, Kato I, Perez-Perez G I, Blaser M J: *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. N. Engl. J. Med. 325: 1132~1136, 1991
- 7) Parsonnet J, Friedman G D, Vandersteen D P, Chang Y, Vogelmann J H, Orentreich N, Sibley R K: *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. N. Engl. J. Med. 325: 1127~1131, 1991
- 8) Rauws E A J, Langenberg W, Houthoff H J, Zanen H C, Tytgat G N J: *Campylobacter pyloridis*-associated chronic antral gastritis. Gastroenterology 94: 33~40, 1988
- 9) Marshall B J, Armstrong J A, McGeachie D B, Glancy R J: Attempt to fulfill Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. Med. J. Aust. 142: 436~439, 1985
- 10) Morris A, Nicholson G: Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting pH. Am. J. Gastroenterol. 87: 192~198, 1987
- 11) *Helicobacter pylori* 治験検討委員会: *Helicobacter pylori* 治験ガイドライン資料。日本消化器病学会誌: 1~35, 1995
- 12) 藤井友紀子, 山田美和子, 松本有右, 内田 寛, 河合隆, 西里吉則, 濱島 肇, 笹津備規, 新井武利: *Helicobacter pylori* より分離された薬剤耐性プラスミドについて。第42回日本化学療法学会東日本支部総会: 051, 長野, 1995
- 13) Loo V G, Sherman P, Matlow A G: *Helicobacter pylori* infection in a pediatric population: *In vitro* susceptibilities to omeprazole and eight antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemother. 36: 1133~1135, 1992
- 14) Haas C E, Nix D E, Schentag J J: *In vitro* selection of resistant *Helicobacter pylori*. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 1637~1641, 1990
- 15) 伊豫部志津子: キノロン系薬剤の耐性機構。臨床と微生物 22: 563~568, 1995
- 16) Hirschl A M, Hentschel E, Schutze K, Nemecek H, Potzi R, Gangl A, Weiss W, Pletschette M, Stanek G, Rotter M L: The efficacy of antimicrobial treatment in *Campylobacter pylori*-associated gastritis and duodenal ulcer. Scand. J. Gastroenterol. 23 (Suppl. 142): 76~81, 1988

## Drug susceptibility of *Helicobacter pylori* freshly isolated from gastrointestinal mucosa of patients with peptic ulcer

Intetsu Kobayashi<sup>1)</sup>, Haruyo Toda<sup>1)</sup>, Miyuki Hasegawa<sup>1)</sup>, Minoru Nishida<sup>1)</sup>,  
Toshio Fujioka<sup>2)</sup> and Masaru Nasu<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Chemotherapy Division, Mitsubishi Kagaku Bio Clinical Laboratories, Inc.,  
3-30-1 Shimura, Itabashi-ku, Tokyo, Japan

<sup>2)</sup> Second Department of Internal Medicine, Oita Medical University

We determined the susceptibility of 56 strains of *Helicobacter pylori*, freshly isolated from the gastrointestinal mucosa of patients with peptic ulcer, to different types of antibacterial drugs. All the strains tested were susceptible to amoxicillin and clavulanic acid/amoxicillin with MIC values of 0.20  $\mu\text{g/ml}$  or less, indicating no resistance to these drugs. The antibacterial activity of fropenem was significantly more potent than that of the 8 other drugs tested. The MICs of fropenem were  $\leq 0.025 \mu\text{g/ml}$  for 55 of the 56 strains and 0.05  $\mu\text{g/ml}$  for the remaining strain. The MICs of the 5 macrolide derivatives were 0.05~0.39  $\mu\text{g/ml}$ . However, the MIC<sub>90</sub> values of four drugs (erythromycin, azithromycin, roxithromycin and rokitamycin) except clarithromycin were 50  $\mu\text{g/ml}$  or more, which indicates that some strains were resistant to these four drugs. The MICs of levofloxacin for all of the test strains except for one were distributed between 0.10 and 6.25  $\mu\text{g/ml}$ . The 56 strains of *H. pylori* were allocated to 2 groups; Group 1 consisted of 27 strains isolated before antibiotic treatment for the eradication of the bacteria and Group 2 consisting of the remaining 29 strains isolated during or after the treatment. When both groups were compared for drug susceptibility, the number of strains resistant to these antibacterial drugs was significantly larger in Group 2 than in Group 1. These results suggest that eradication therapy with antibacterial drugs in peptic ulcer patients infected with *H. pylori* may induce resistance to the antibacterial drugs used. Therefore, special attention should be paid to the prevention of the emergence of this type of resistance.