

## 【原著・基礎】

*Helicobacter pylori* に対する clarithromycin の breakpoint と 23S rRNA 遺伝子の point mutation の相関について小林 寅詰<sup>1)</sup>・雑賀 威<sup>1,2)</sup>・村岡 宏江<sup>1)</sup>・井上 松久<sup>2)</sup>・那須 勝<sup>3)</sup><sup>1)</sup>三菱化学ビーシーエル化学療法研究室\*<sup>2)</sup>北里大学医学部微生物学教室<sup>3)</sup>大分医科大学第二内科

(平成12年12月26日受付・平成13年2月20日受理)

臨床分離 *Helicobacter pylori* 302 株を用いて National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) のガイドライン M 100-S 10 にしたがって clarithromycin (CAM) の MIC 測定を行い、同ガイドラインに掲載された CAM の breakpoint と 23S rRNA 遺伝子の point mutation との関連性について検討を行った。除菌成功例分離株 262 株中 258 株 (98.5%) の CAM MIC は  $\leq 0.015 \sim 0.5 \mu\text{g/mL}$  であり、 $8 \mu\text{g/mL}$  以上の株が 4 株 (1.5%) 認められた。一方、除菌不成功例分離株 40 株のうち 23 株 (57.5%) は  $0.25 \mu\text{g/mL}$  以下で、 $4 \mu\text{g/mL}$  以上の株は 17 株 (42.5%) 存在した。除菌成功例分離株で  $8 \mu\text{g/mL}$  以上を示す 4 株すべてにおいて 23S rRNA 遺伝子の 2,143 番目のアデニン (A) のグアニン (G) への変異が認められ、除菌不成功例のうち CAM の MIC が  $4 \mu\text{g/mL}$  以上を示す 17 株は A 2143 G あるいは A 2142 G 変異を有していた。CAM の MIC が 32 および  $64 \mu\text{g/mL}$  の株には A 2142 G 変異を有する株が 1 株ずつ認められた。NCCLS の基準で S および I となる  $0.5 \mu\text{g/mL}$  以下の株では 23S rRNA 遺伝子の point mutation は見られなかったが、R となる  $1 \mu\text{g/mL}$  以上の株すべてに mutation が認められた。NCCLS による CAM の breakpoint は、23S rRNA 遺伝子の point mutation の有無と一致した。

**Key words:** *Helicobacter pylori*, clarithromycin, breakpoint, 23S rRNA, point mutation

1983 年に Warren と Marshall<sup>1)</sup>により胃炎患者の胃粘膜から *Helicobacter pylori* が分離されて以来、多くの臨床研究が行われ本菌が胃炎や消化性潰瘍の原因となることが明らかとなった<sup>2-5)</sup>。また、1994 年に米国 NIH が *H. pylori* 陽性の消化性潰瘍患者に対し除菌治療を行う必要性を示し<sup>6)</sup>、わが国においても *H. pylori* 感染消化性潰瘍に対する抗菌薬を用いた除菌治療が普及し、2000 年 11 月からは胃潰瘍患者と十二指腸潰瘍患者を対象に抗菌薬による *H. pylori* 除菌治療の保険適用が認可された。

現在の *H. pylori* 除菌治療の主流は酸分泌抑制剤と抗菌薬 2 剤を用いる new triple therapy であり、抗菌薬としては amoxicillin (AMPC), clarithromycin (CAM), metronidazole (MNZ) などが用いられているが、わが国においては発癌性などの問題から MNZ は積極的に使用されていない。したがって、AMPC と CAM が主に用いられ、保険適用となったのも同 2 剤である。しかし、CAM に対しては一次耐性菌の増加や除菌不成功例からの二次耐性獲得菌の増加が報告され問題となっている<sup>7,8)</sup>。

*H. pylori* の主な CAM 耐性機構は 23S rRNA 遺伝子の 2,142 あるいは 2,143 番目のアデニン (A) のグアニン (G) あるいはシトシン (C) への point mutation であり<sup>9-11)</sup>、これまでに行ったわれわれの検討結果からわが国において分離

される *H. pylori* においても例外ではないことが明らかとなった<sup>12)</sup>。

そこで今回われわれは、臨床分離 *H. pylori* 多数株を用いて 23S rRNA 遺伝子の point mutation の有無およびそのタイプと NCCLS 法による CAM の MIC 値、さらには NCCLS が定める breakpoint との関連性について検討を行った。

## I. 材料と方法

## 1. 使用菌株

試験菌株として 1991~1999 年にかけて Table 1 に示す医療施設において主に胃潰瘍患者および十二指腸潰瘍患者検体から分離された *H. pylori* のうち、3 剤併用療法による除菌成功例と除菌不成功例の薬剤投与前分離株それぞれ 262 株と 40 株、計 302 株を用いた。

## 2. 使用薬剤

CAM (大正製薬) を用いた。

## 3. 薬剤感受性測定法

NCCLS M 100-S 10<sup>13)</sup>に従い寒天平板希釈法により測定を行った。すなわち、CAM の 2 倍希釈系列を含む 5% ヒツジ血液 (採血後 2 週間以上経過したもの) 加 Mueller Hinton agar (Difco) に、滅菌生理食塩水に McFarland 2.0 となるように懸濁した *H. pylori* 接種菌液を  $1 \sim 3 \mu\text{L}$  接種し、 $35^\circ\text{C}$ 、72 時間微好気培養した後、

\* 東京都板橋区志村 3-30-1

菌の発育の認められない最小濃度を MIC とした。

#### 4. 23S rRNA point mutation の検出法

23S rRNA の point mutation の検出は既報<sup>10)</sup>にしたがって Versalovic らの方法<sup>9)</sup>に準じて行った。すなわち、常法に従い抽出した DNA をフェノール/クロロホルム処理した後、エタノールにより沈殿させた。PCR には 23S rRNA の V 領域を増幅できるように設定した 5'-AGTCGGGACCTAAGGCGAG-3' および 5'-TTCCCGCTTAGATGCTTTCAG-3' を用いた。PCR 反応は、pre-denaturation; 94°C, 3 分, denaturation; 94°C, 1 分, annealing; 50°C, 2 分, extension; 72°C, 2 分で 40 cycle, postextension; 72°C, 7 分の設定で行った。得られた PCR 産物は、制限酵素 *Bsa*I (New England Biolabs), 5 U, 50°C で 14 時間または *Mbo*II (Takara), 7.5 U, 37°C で 14 時間処理した後、1% アガロースゲルを用いて電気泳動しエチジウムブロマイドで染色した。

Table 1. Origins of 302 *Helicobacter pylori* isolates

Institution	Isolates
Second Department of Internal Medicine, Oita Medical University	42
Second Department of Internal Medicine, Fukui Medical University	7
Department of Medical Technology, School of Allied Medical Sciences, Shinshu University	55
Third Department of Internal Medicine, Kyorin University, School of Medicine	49
Fourth Department of Internal Medicine, Hyogo College of Medicine	92
Fourth Department of Internal Medicine, University of Tokyo School of Medicine	57

## II. 結 果

### 1. H. pylori に対する CAM の MIC 分布

Fig. 1 に除菌成功例および不成功例から薬剤投与前に分離した *H. pylori* 304 株に対する CAM の MIC 分布を各総菌株数に占める割合で示した。除菌成功例分離株は 0.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を中心に多くの株が分布し、0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の株は 262 株中 6 株 (2.3%) 認められた。一方、除菌不成功例分離株は 2 峰性の分布を示し、4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の株が 40 株中 17 株 (42.5%) と高率に存在した。

### 2. 23S rRNA の point mutation と CAM の MIC

23S rRNA の point mutation と CAM の MIC との関係についてみると、除菌成功例分離株 262 株のうち 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下の 258 株 (98.5%) には point mutation は認められなかった。しかし、8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の 4 株 (1.5%) はすべて A 2143 G 変異を有していた (Table 2)。一方、除菌不成功例分離株 40 株のうち 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下の 23 株 (57.5%) には point mutation は認められなかったが、4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の 17 株 (42.5%) はすべて point mutation を有し、そのうち 15 株 (88.2%) は A 2143 G 変異で、32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  および 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の 1 株ずつは A 2142 G 変異であった (Table 3)。

### 3. NCCLS の breakpoint と point mutation

今回用いた *H. pylori* 302 株に対する NCCLS による CAM の breakpoint と point mutation のタイプについて Table 4 に示した。NCCLS の基準で S となる CAM MIC 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下の 279 株において point mutation はまったく認められなかった。また I となる 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の株は 2 株しか認められず、これらの株も point mutation は有していなかった。一方、R となる 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上を示す 21 株はすべて point mutation を有し、2 株が A 2142 G 変異を、19 株が A 2143 G 変異を有していた。

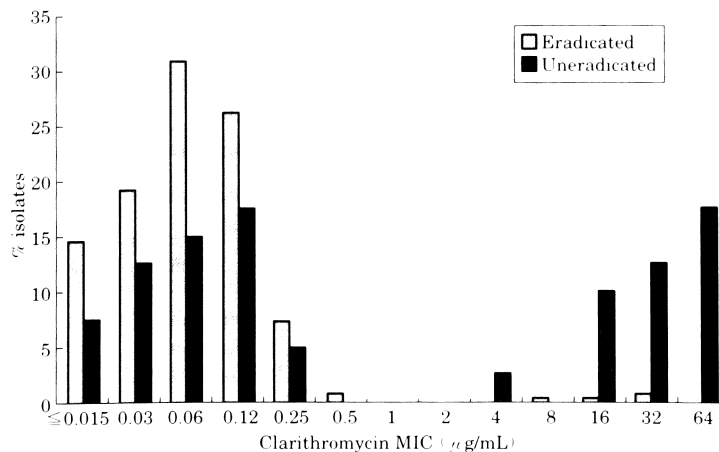


Fig. 1. Distribution of clarithromycin MICs for 302 *Helicobacter pylori* isolates from patients in whom isolates were or were not eradicated.

## III. 考 察

1999年1月, NCCLSのガイドラインM 100-S 9<sup>14</sup>に*H. pylori*のMIC測定法が掲載され, 次いで同年9月には, *H. pylori*に対するCAMのbreakpointが制定され, 2000年1月にNCCLSガイドラインM 100-S 10<sup>13</sup>に掲載された。わが国においても本学会抗菌薬感受性測定委員会: ヘリコバクター・ピロリ委員会を中心として, 2000年6月の本学会総会において国内分離株に対するCAMとAMPCのbreakpointの断案が制定された<sup>15</sup>。

これらの条件をもとに*H. pylori*国内分離株302株を用いてCAMのMIC測定を行った結果, 0.06 µg/mLにピークをもつ群と4 µg/mL以上の群とに二分された。0.5~8 µg/mLを示す株は少なく, 1および2 µg/mLを示す株は1株も認められなかった。この分布は, *H. pylori*の主なCAM耐性機構である23S rRNA遺伝子のpoint mutationと関連があると考えられる。すなわち, 過去にわれわれが行った臨床分離*H. pylori*を順次高濃度のCAMと接触させ各接触段階株のMIC測定とpoint mutationの有無を調べた検討においても, point mutationが生じた時点でMIC値が128倍以上高くなる現象が認められている。

23S rRNA遺伝子のpoint mutationは, いままでにA 2142 G, A 2142 CおよびA 2143 G変異が報告されている<sup>10</sup>。またCAMに対する耐性はA 2143変異よりもA 2142変異の方が高い傾向にあることも明らかとなっている<sup>9</sup>。今回用いた*H. pylori*のうち除菌成功例分離株262株中258株(98.5%)は $\leq 0.015 \sim 0.5$  µg/mLを示し, point mutationを有する株は認められなかったのに対して, 8 µg/mL以上の4株(1.5%)はすべてA 2143 G変異を有していた。一方, 除菌不成功例40

株中point mutationが認められたのは4 µg/mLの1株および16~64 µg/mLの16株計17株(42.5%)であり, 除菌成功例分離株と比較して40%程度高い割合でpoint mutation保有株が認められた。この結果は, われわれが行った前述と同様なCAM耐性誘導実験において, 除菌不成功例の投与前分離株は除菌成功例投与前分離株よりもpoint mutationが生じるまでのCAMとの接触継代回数が少ないことから耐性化しやすい(point mutationが生じやすい)株であることが反映されていると考えられた。また17株中16~64 µg/mLの15株はA 2143 G変異, 32および64 µg/mLの2株はA 2142 G変異であり, A 2142 G変異の方が耐性度が高いことが確認された。以上の結果はVersalovicら<sup>9</sup>やTaylorら<sup>10</sup>およびStoneら<sup>16</sup>の報告と一致し, CAM耐性に関してわが国は米国と同じ傾向にあることが示唆された。しかし, これまでのわれわれの検討においてA 2142 C変異はまだ認められていない。

NCCLSガイドラインM 100-S 10<sup>13</sup>に掲載されたCAMのbreakpointはS:  $\leq 0.025$  µg/mL, I: 0.5 µg/mL, R:  $\geq 1$  µg/mLであり, 今回われわれが用いた*H.*

Table 2. Relationship between clarithromycin MICs and 23S rRNA point mutation of *Helicobacter pylori* isolated from patients in whom isolates were eradicated

Clarithromycin MIC (µg/mL)	Isolates	Point mutation		
		A 2142 G	A 2143 G	non*
$\leq 0.015$	38	0	0	38
0.03	50	0	0	50
0.06	81	0	0	81
0.12	68	0	0	68
0.25	19	0	0	19
0.5	2	0	0	2
1	0	-	-	-
2	0	-	-	-
4	0	-	-	-
8	1	0	1	0
16	1	0	1	0
32	2	0	2	0
Total	262	0	4	258

\*Point mutation not detected

Table 3. Relationship between clarithromycin MICs and 23S rRNA point mutation of *Helicobacter pylori* isolated from patients in whom isolates were not eradicated

Clarithromycin MIC (µg/mL)	Isolates	Point mutation		
		A 2142 G	A 2143 G	non*
$\leq 0.015$	3	0	0	3
0.03	5	0	0	5
0.06	6	0	0	6
0.12	7	0	0	7
0.25	2	0	0	2
0.5	0	-	-	-
1	0	-	-	-
2	0	-	-	-
4	1	0	1	0
8	0	-	-	-
16	4	0	4	0
32	5	1	4	0
64	7	1	6	0
Total	40	2	15	23

\*Point mutation not detected

Table 4. Relationship between clarithromycin breakpoint and 23S rRNA point mutation of *Helicobacter pylori* isolates

Clarithromycin breakpoint* (µg/mL)	Isolates	Total	Point mutation		
			A 2142 G	A 2143 G	non <sup>b</sup>
$\leq 0.25$	S	279	0	0	279
0.5	I	2	0	0	2
$\geq 1$	R	21	2	19	0

\*NCCLS M 100-S 10<sup>13</sup>

<sup>b</sup>Point mutation not detected

*pylori* 302 株をこの基準にあてはめると S: 279 株 (92.4%), I: 2 株 (0.7%), R: 21 株 (7.0%) となった (Table 4)。S および I に分類された 281 株において point mutation は認められず, R に分類された 21 株はすべて point mutation を有していた。これらの結果は NCCLS の制定した CAM の breakpoint は国内分離株の 23 S rRNA 遺伝子 point mutation の有無とよく一致しており, ひいては本学会制定の CAM breakpoint の断案<sup>15)</sup>を支持するものであった。ただし, breakpoint R 株であっても測定方法により MIC 値が 1/4 低く判定された場合 S 株と判断されるため, 厳密な条件下での MIC 測定が必要であると考ええる。

前述の通り 2000 年 11 月から抗菌薬による *H. pylori* の除菌治療が保険適用となったことは, 国内で約 120 万人ともいわれている胃・十二指腸潰瘍患者にとっては朗報である。しかし, 抗菌薬除菌治療不成功例からは CAM 耐性株が高率に分離されること<sup>8, 16)</sup>や, われわれの行った耐性誘導実験において容易に CAM 耐性株が得られることから, 外来診療による患者個人の不十分な抗菌薬投与などにより CAM 耐性菌の増加を助長する可能性も否定できない。したがって今後, 除菌不成功時の second therapy に有効であると考えられる抗菌薬の選定あるいは開発が急務であると考えられた。

#### 謝 辞

本研究の要旨は第 48 回日本化学療法学会総会 (岡山) において発表し, 座長推薦を受けたものであることをここに記すとともに, 執筆の機会をお与え下さいました本学会関係諸先生に謝意を表します。また, 本研究を行うにあたり終始ご協力ならびにご指導いただいた京都薬科大学微生物学 西野武志先生, 福井医科大学第二内科 東 健先生, 信州大学医療技術短期大学部 川上由行先生, 琉球大学医学部第一内科 斉藤 厚先生, 東京薬科大学薬学部病原微生物学 笹津備規先生, 杏林大学医学部第三内科 高橋信一先生, 兵庫医科大学第四内科 福田能啓先生, 東京大学医学部附属病院分院内科 峯徹哉先生, 大分医科大学第二内科 藤岡利生先生の各委員に深謝いたします。

#### 文 献

- Warren J R, Marshall B J: Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* i: 1273~1275, 1983
- Levi S, Beardshall K, Haddad G, et al.: *Campylobacter pylori* and duodenal ulcers: the gastrin link. *Lancet* i: 1167~1168, 1989
- Parsonnet J, Friedman G D, Vandersteen D P, et al.: *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 325: 1127~1131, 1991
- Peura D A, Graham D Y: *Helicobacter pylori*: consensus reached: peptic ulcer is on the way to becoming an historic disease. *Am J Gastroenterol* 89: 1137~1139, 1994
- Honda S, Fujioka T, Tokieda T, et al.: Gastric ulcer, atrophic gastritis, and intestinal metaplasia caused by *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *Scand J Gastroenterol* 33: 454~460, 1998
- NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in Peptic Ulcer Disease: *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *JAMA* 272: 65~69, 1994
- Xia H X, Buckley M, Hyde D, et al.: Effect of antibiotic-resistance on clarithromycin-combined triple therapy for *Helicobacter pylori*. *Gut* 37 (Suppl 1): A 55 (abstr), 1995
- 佐藤竜吾, 村上和成, 久保田利博, 他: *Helicobacter pylori* 除菌不成功例に対する再除菌法. *Helicobacter Research* 4: 221~225, 2000
- Versalovic J, Osato M S, Spakovsky K, et al.: Point mutations in the 23 S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. *J Antimicrob Chemother* 40: 283~286, 1997
- Taylor D E, Ge Z, Purych D, et al.: Cloning and sequence analysis of two copies of a 23 S rRNA gene from *Helicobacter pylori* and association of clarithromycin resistance with 23 S rRNA mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 2621~2628, 1997
- Garcia-Arata M I, Baquero F, Rafael L, et al.: Mutations in 23S rRNA in *Helicobacter pylori* conferring resistance to erythromycin do not always confer resistance to clarithromycin. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 374~376, 1999
- 雑賀 威, 小林寅詔, 藤岡利生, 他: *Helicobacter pylori* における clarithromycin 耐性機構の解析—in vitro 継代培養菌と臨床分離株の比較—。 *感染症学雑誌* 72: 918~923, 1998
- National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Tenth informational supplement (aerobic dilution) M 100-S 10. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000
- National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Ninth informational supplement M 100-S 9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999
- 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定委員会: ヘリコバクター・ピロリ委員会: *Helicobacter pylori* 除菌療法における clarithromycin および amoxicillin のブレイクポイント制定に関する報告書. *日化療会誌* 48: 561~568, 2000
- Stone G G, Shortridge D, Versalovic J, et al.: A PCR-oligonucleotide ligation assay to determine the prevalence of 23 S rRNA gene mutations in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 712~714, 1997

## Relationship between clarithromycin breakpoint for *Helicobacter pylori* and point mutation in 23S rRNA gene

Intetsu Kobayashi<sup>1)</sup>, Takeshi Saika<sup>1,2)</sup>, Hiroe Muraoka<sup>1)</sup>,  
Matsuhisa Inoue<sup>2)</sup> and Masaru Nasu<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Chemotherapy Division, Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratories, Inc., 3-30-1 Shimura, Itabashi-ku, Tokyo 174-8555, Japan

<sup>2)</sup>Department of Microbiology, Kitasato University School of Medicine

<sup>3)</sup>Second Department of Internal Medicine, Oita Medical University

The resistance of *Helicobacter pylori* to clarithromycin (CAM) is mainly due to adenine (A)-to-guanine (G) point mutations at the A 2142 or A 2143 of the 23S rRNA gene. In this study, CAM MICs for 302 clinical isolates of *H. pylori* were determined by agar dilution based on the guideline (M 100-S 10) established by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). The relationship between the CAM breakpoint for *H. pylori* and the point mutation in the 23S rRNA gene was studied. When *H. pylori* strains isolated in advance from patients in whom strains were eradicated with CAM therapy were tested, CAM MICs for 258 (98.5%) of the 262 isolates ranged from  $\leq 0.015$  to  $0.5 \mu\text{g/mL}$ . CAM MICs for 23 (57.5%) and 17 (42.5%) of 40 strains isolated from patients in whom strains were not eradicated with CAM therapy were  $\leq 0.25 \mu\text{g/mL}$  and  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ . The 4 *H. pylori* strains (MIC;  $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ ) isolated from patients in whom strains were eradicated had A 2143 G mutation, and 17 strains ( $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ ) from patients in whom strains were not eradicated had A 2143 G and A 2142 G mutations. *H. pylori* isolates belonging to the S (MIC;  $\leq 0.25 \mu\text{g/mL}$ ) or I ( $0.5 \mu\text{g/mL}$ ) category in the NCCLS guideline did not possess any type of mutation in the 23S rRNA gene, but all isolates belonging to the R category ( $\geq 1 \mu\text{g/mL}$ ) had point mutations. It is thus noteworthy that CAM breakpoint MICs for *H. pylori* based on the NCCLS guideline agreed with point mutations in the 23S rRNA gene of test isolates.