

50組の親子のピロリ菌株の抗菌薬感受性の比較検討 －菌株遺伝子型との関連も含めて－

札幌厚生病院小児科 今野武津子、藤原 伸一、戸板 成昭、高橋美智子
札幌医科大学医学部微生物学講座 横田 伸一

【はじめに】

日本では2013年に*Helicobacter pylori*（以下ピロリ菌）感染胃炎に対する除菌療法が保険認可され、胃がん撲滅のための除菌療法が始まった。しかしながら、一次除菌療法で用いられるクラリスロマイシン（CAM）耐性株の増加により除菌率の低下が問題となっている^{1, 2)}。当科では以前よりピロリ菌感染患児において薬剤感受性試験に基づいた除菌療法を行ってきた³⁾。

これまで我々はピロリ菌感染が乳幼児期に、主として親子感染によって起こることを明らかにしてきた^{4, 5, 6)}。今回は50家族において、患児とその親のピロリ菌株の薬剤感受性を比較検討した。さらに、親子の菌株遺伝子型と薬剤感受性との関連を検討した。

【対象と方法】

対象は1998年から2017年の20年間に腹痛あるいは鉄欠乏性貧血にて当院小児科を受診し、内視鏡検査でピロリ菌感染胃炎と診断されて除菌治療を行った患児50例と、その家族検索においてピロリ菌感染が確認され菌株が得られた50例の親である。薬剤感受性試験は今回クラリスロマイシン（CAM）について検討した。CAMのブレイクポイントはCLSIおよび日本化学療法学会が推奨する基準を用いた（表1）⁷⁾。

また、Multi-locus sequence typing（MLST）法を用いて家族の菌株の遺伝子型を決定し、CAM感受性との関連を検討した。MLST法はピロリ菌の7種のハウスキーピング遺伝子（*atpA*, *efp*, *mutY*, *trpC*, *ureI*, *ppa*, *yphC*）と*vac*遺伝子の部分配列をPCRで増幅し、ダイレクトシーケンス法にて塩基配列を解析する方法である。解析した塩基配列は蓄積されたMLST data base（<http://pubmlst.org/helicobacter/>）で照合し、Sequence type（Allele ID）を決定し、その比較により菌株の異同を判定した。

（表1）CAMのブレイクポイント

ブレイクポイント（ $\mu\text{g/mL}$ ）			
CAM	S	I	R
	≤ 0.25		≥ 1

【結果】

1. 患児と親の菌株のCAM感受性の比較

50家族中17家族は親子ともにCAMに対して感受性であり、17家族では親が感受性・児が耐性、7家族では親が耐性・児が感受性、9家族で親子ともに耐性との結果であった（表2）。したがって、親子の菌株の薬剤感受性が一致したのは52%のみであった。親子感染の親子の菌株では薬剤感受性結果が一致する可能性も予測されたが、結果として48%は不一致であった。また、CAM耐性率の検討では患児が52%、親が32%であり、患児の方が耐性率は高かった（表3）。以上より、親子間で菌株の薬剤感受性は必ずしも一致しないこと判明した。

（表2）患児と親の菌株のCAM感受性の比較

A	親子ともに感受性あり	17/50家族	34%	親子一致：52%
B	親子ともに耐性	9/50家族	18%	
C	親感受性、児耐性	17/50家族	34%	親子不一致：48%
D	親耐性、児感受性	7/50家族	14%	

（表3）患児と親の菌株CAM耐性率

患児	26/50	52%
親	16/50	32%

2. MLSTによる家族の菌株遺伝子型とCAMに対する感受性との関連

Family 1 では、両親の菌株と3人の児の菌株の遺伝子型は不一致であったが、薬剤感受性試験では家族全員がCAM感受性で一致した(表4)。

表4 Family 1の家族の遺伝子型とCAMに対する感受性

Family 1	H. pylori 感染	RAPD pattern の異同	allele sequence type(MLST)								MLST No.	CAM
			atpA	efp	mutY	ppa	trpC	urel	ypb	vac		
父	+	●	2366	2220	2469	1125	2523	2525	2495	562	2824	S≤0.03
母	+	▲	2315	2184	2351	445	2426	1968	2394	563	2761	S≤0.03
第1子	+	○	951	909	950	2230	2427	2392	2400	564	2762	S≤0.03
第2子	+	○	951	909	950	2230	2427	2392	2400	564	2762	S≤0.03
第3子	+	○	951	909	950	2230	2427	2392	2400	564	2762	S≤0.03

Family 2, 3, 4は両親と児(患児と兄弟)の菌株は遺伝子型がほぼ一致したが、薬剤感受性試験ではそれぞれ異なる結果を示した(表5)。

表5 Family 2, 3, 4の家族の菌株の遺伝子型とCAMに対する感受性

Family 2	H. pylori 感染	RAPD pattern の異同	allele sequence type(MLST)								MLST No.	CAM
			atpA	efp	mutY	ppa	trpC	urel	ypb	vac		
父	+	○	2322	2203	2362	56	2434	2409	2408	521	2766	S≤0.05
母	+	○	2322	2204 ¹	2362	56	2434	2409	2408	521	2783	S≤0.05
第1子	+	○	2322	2203	2362	56	2434	2409	2408	521	2766	S≤0.05
第2子	+	○	2322	2203	2362	56	2434	2409	2408	521	2766	R 16

Family 3	H. pylori 感染	RAPD pattern の異同	allele sequence type(MLST)								MLST No.	CAM
			atpA	efp	mutY	ppa	trpC	urel	ypb	vac		
父	-											
母	+	○	1760	455	2463	2295	2516	2506	2484	556	2817	S≤0.03
第1子	-											
第2子	+	○	1760	455	2463	2295	2516	2506	2484	556	2817	R 8
第3子	-											

Family 4	H. pylori 感染	RAPD pattern の異同	allele sequence type(MLST)								MLST No.	CAM
			atpA	efp	mutY	ppa	trpC	urel	ypb	vac		
父	+	○	2328	2219	2370	2248	2441	2425	2419	526	2787	R 2
母	+	○	2328	2219	2376 ¹	2248	2441	2425	2419	526	2788	S≤0.03
第1子	+	○	2328	2219	2370	2248	2441	2425	2419	526	2787	R 64
第2子	+	○	2328	2219	2370	2248	2441	2425	2419	526	2787	S≤0.03

【考察】

我々はピロリ菌陽性の母親から出生した乳幼児への感染を母子間の菌株遺伝子型が一致したことより証明した⁴⁾。また、42家族の菌株の遺伝子DNAをrandom amplified polymorphic DNA fingerprinting (RAPD)法による検討で、42家族中29家族(69%)で母子間の菌株の遺伝子型が一致したことを報告し、⁵⁾日本ではピロリ菌の感染経路は母子感染が優位であることが明らかにされた。さらに、36家族の菌株DNAをより精度の高いMLST法で検討した結果、20家族の母子の菌株で遺伝子型が一致したことを報告した⁶⁾。

菌株の遺伝子型が一致した親子の菌株では薬剤感受性も親子間で一致する可能性が当初予測されたが、結果として親子の菌株の薬剤感受性の一致率は52%にとどまった。さらに、MLST法により家族間の遺伝子型が一致した菌株について薬剤感受性検査を施行したところ、CAMに対する感受性は必ずしも家族間で一致しなかった。MLST法による遺伝子型の解析で親子が同じallele sequence typeとの結果が得られれば、同一起源由

来、つまり親子感染であると考えられる。しかし、MLSTは6遺伝子のみ解析であり、それぞれの菌株が個体に感染した後起きたと考えられる遺伝子の変異は全ゲノム解読による変異比較解析によらねばならないとされる。

CAMはピロリ菌の50S subunit内リボザイムの23S ribosomal RNA(23SrRNA)に結合することによって菌の増殖を阻害することが知られている。耐性獲得の機序としては、この23SrRNA遺伝子の2143番または2144番の塩基の点突然変異によって薬剤が23SrRNAに結合できなくなるために菌が耐性化してしまうと考えられている。MLSTによる遺伝子型が一致した親子の菌株間でCAMに対する感受性が必ずしも一致しなかった理由としては、同一菌株由来であっても、胃内のピロリ菌が抗菌薬に暴露され、23SrRNA遺伝子の点突然変異が起こったもののMLSTによる遺伝子型(Allele型)には反映されなかった可能性がある。

今回の検討で、親子の菌株間でMLSTでの遺伝子型が一致していても薬剤感受性は必ずしも一致せず、ピロリ菌の薬剤耐性化は個々における抗菌薬への曝露によって獲得されることが明らかになった。

【結語】

一度の除菌治療で除菌を成功させるために、ピロリ菌感染症においては、親子の菌株遺伝子型がMLSTで同じであっても、それぞれの菌株の薬剤感受性試験を行うことが必要であり、その感受性に基づいた除菌療法を行うことが望ましいと考える。

【文献】

- 1) 小林寅詰, 東健, 池田文昭, 他. わが国における薬剤耐性*Helicobacter pylori*の現状 2010～2011年度耐性菌サーベイランスの集計報告. 日本ヘリコバクター学会誌 2013; 14 (2) : 102-106.
- 2) 橋永正彦, 沖本忠義, 兒玉雅明, 他. わが国における薬剤耐性*Helicobacter pylori*の現状 -2013～2014年度耐性菌サーベイランスの集計報告-日本ヘリコバクター学会誌 2016; 17 (2) : 45-49.
- 3) 今野武津子. 小児のH. pylori除菌治療成績-クラリスロマイシン耐性をいかに克服するか-. 日本ヘリコバクター学会誌. 2011; 12 : 30-32.
- 4) Mutsuko Konno, Nobuhiro Fujii, Shinichi Yokota, et al. Five-year follow-up study of mother-to-child transmission of *Helicobacter pylori* infection detected by a random amplified polymorphic DNA fingerprinting method. J Clin Microbiol 2005; 43: 2246-2250.
- 5) Konno M, Yokota S, Suga T, et al. Predominance of mother-to-child transmission of *Helicobacter pylori* infection detected by random amplified polymorphic DNA fingerprinting analysis in Japanese families. Pediatr Infection Dis J 2008 Nov;27(11):999-1003.
- 6) Yokota S, Konno M, Fujiwara S, et al. Intrafamilial, preferentially mother-to-mother and intraspousal, *Helicobacter pylori* infection in Japan determined by multilocus sequence typing and random amplified polymorphic DNA fingerprinting. Helicobacter. 2015 Oct;20(5):334-42.
- 7) 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(CAM)およびamoxicillin(AMPC)のブレイクポイント制定に関する報告書. 日本化学療法学会雑誌2000; 48 : 561-567.