Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Primary levofloxacin-resistance and gyrA/B mutations amongHelicobacter pylori in Japan

宮地，英行

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2008-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲4314
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004314

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

氏　　名	宮地　英行
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学　位　記　番　号	博い第 1914 号
学位授与の　要　件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の　日　付	平成 20 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Primary levofloxacin-resistance and gyrA/B mutations among Helicobacter pylori in Japan(Helicobacter pylori に対する levofloxacin の 1 次耐性と gyrA/B mutations)

審　査　委　員

主　査　　教　授　横野　浩一
　　教　授　具　英　成
　　教　授　堀田　　博

背景と目的

胃潰瘍や十二指腸潰瘍の予防と治療において *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) の除菌は非常に重要な役割を担っている。これまで多くの研究者によって *H. pylori* 除菌療法は開発されてきたが、現在は amoxicillin(AMX)と clarithromycin (CLR)、metronidazole(MNZ)の3剤の内の2剤とプロトンポンプ阻害剤(PPI)を組み合わせた3剤療法が広く使用されている。日本では PPI と AMX、CLR の3剤療法が1次除菌療法として2000年から保険診療で認められている。しかし、この3剤の除菌療法では 20%以上の失敗例があり、充分な成績とは言えない。除菌失敗の原因は *H. pylori* の CLR 耐性に因る所が大きく、CLR 耐性 *H. pylori* の出現頻度は年々増加しているため、除菌成功率は次第に低下する傾向にある。さらに CLR 耐性を示す *H. pylori* を同じ3剤で再除菌した場合の成功率は 20%以下と低く、新たな抗生剤を使用した除菌療法の開発が望まれている。

我々はニューキノロン系抗生剤の levofloxacin(LVX)を用いた除菌療法は安全で有効である事を報告しており、今後 LVX は MNZ とともに除菌を行う上で重要な薬剤と考えられ、また近年世界的にも LVX を用いた除菌治療に注目が集まっている。

LVX を始めとしたキノロン耐性については、標的酵素である DNA gyrase の A/B サブユニット遺伝子(*gyrA/B*)の QRDR(quinolone resistance-determining region)に変異がある場合、キノロンが DNA gyrase に結合して DNA 合成を阻害するという過程が阻害されて、耐性が出現すると言われている。しかし、AMX や CLR、MNZ に関する耐性率や耐性遺伝子についての報告は多数あるが、LVX に関する報告は殆んどない。したがって、多数の *H. pylori* 臨床菌株を用いて LVX 耐性率や耐性遺伝子の検討する事は非常に重要な事を考えられる。

対象と方法

2001年1月から2004年12月までの間に神戸大学病院において上部消化管内視鏡検査にて採取され、培養・薬剤感受性試験が行われた *H. pylori* 507株を対象とした。以前に除菌療法を受けた事のある菌株は対象外とした。

薬剤感受性試験は E test を使用して、LVX 耐性を 1ug/ml 以上と定義して、その感受性分布を検討した。

DNA が保存されていなかった8株を除く全ての耐性菌 68 株と、ランダムに選んだ感受性菌 50 株の DNA について、*gyrA* と *gyrB* の QRDR(quinolone resistance-determining region)を direct sequencing して、*gyrA* については GenBank accession number: L29481 と *gyrB* については GenBank accession number: AB084028 と比較して point mutation の評価を行った。評価の際には Genetyx-Mac version 10.1.6.を使用した。

耐性菌と感受性菌における mutaion の出現頻度の違いについては Fisher's exact probability test を用いて評価した。

結果

1. levofloxacin の耐性率について

MIC_{50} は 0.064 μg/ml で、MIC_{90} は 2.0 μg/ml であった。1 μg/ml 以上を耐性とした場合の耐性率は 15.0%(76/507)であった。男女間や年齢、採取された年次による耐性率の偏りは認めなかった。

2. levofloxacin 耐性と *gyrA* および *gyrB* mutation の関係について

耐性菌 68 株中 57 株(83.8%)に、また感受性菌 50 株中 7 株(14.0%)に Asn-87 もしくは Asp-91 の *gyrA* mutation を認めた(Table 1, Table 2)。即ち耐性菌と感受性菌では *gyrA* mutation の出現頻度に統計学的有意差を認めた(Table 3)。耐性菌の中では、どの MIC においても *gyrA* mutation は高率に認められ、MIC 値による差異は認めなかった(Table 1)。

一方、*gyrB* mutation は耐性菌 68 株中 3 株(4.4%)に認めたが、感受性菌には認められなかった(Table 1, Table 2)。

Table 1 Association between MIC levels and *gyrA/B* mutation patterns in levofloxacin-resistant strains

MIC (μg/ml)	*gyrA* mutation			*gyrB* mutation	Number of strains	Frequency (%) of *gyrA* mutation
	87Asn	91Asp	Others			
32	N87H	D91G	-	E463G	1	10/13 (76.9%)
	N87K	-	-	-	7	
	N87I	-	-	-	1	
	-	D91Y	-	-	1	
	-	-	-	D435N	1	
	-	-	-	-	2	

16	N87K	-	-	-	1	2/2 (100%)
	N87Y	-	-	-	1	
12	N87K	-	-	-	1	3/3 (100%)
	N87I	-	-	-	1	
	-	D91Y	-	-	1	
8	N87I	-	-	-	1	1/1 (100%)
4	N87K	-	-	-	2	4/4 (100%)
	-	D91G	-	-	2	
3	N87K	-	-	-	2	3/4 (75.0%)
	-	D91G	-	-	1	
	-	-	-	-	1	
2	N87K	-	-	-	8	13/16 (81.3%)
	N87I	-	-	-	2	
	-	D91G	-	-	3	
	-	-	-	-	3	
1.5	N87K	-	-	-	2	5/7 (71.4%)
	N87K	-	-	I482M	1	
	N87I	-	-	-	1	
	-	D91Y	-	-	1	
	-	-	-	-	2	
1	N87K	-	-	-	5	16/18 (88.9%)
	N87I	-	-	-	1	
	N87Y	-	-	-	1	
	N87Y	-	V65I	-	1	
	-	D91G	V65I	-	1	
	-	D91G	-	-	1	
	-	D91G	T62I	-	1	
	-	D91N	-	-	1	
	-	D91N	A97V	-	1	
	-	D91Y	-	-	2	
	-	D91Y	G85C	-	1	
	-	-	-	-	2	
Total					68	57/68 (83.8%)

Table 2 Association between MIC levels and *gyrA/B* mutation patterns in levofloxacin-susceptible strains

MIC (μg/ml)	*gyrA* mutation			*gyrB* mutation	Number of strains	Frequency (%) of *gyrA* mutation
	87Asn	91Asp	Others			
0.5	N87K	-	-	-	1	1/4 (25.0%)
	-	-	-	-	3	
0.25	-	D91G	-	-	1	1/4 (25.0%)
	-	-	-	-	3	
0.125	-	-	-	-	3	0/3 (0.0%)
0 094	-	D91G	-	-	1	1/4 (25.0%)
	-	-	-	-	3	
0.064	-	-	-	-	3	0/3 (0.0%)
0.032	-	-	-	-	2	0/2 (0 0%)
0 016	-	D91N	-	-	1	2/7 (28.6%)
	-	D91Y	-	-	1	
	-	-	-	-	5	
0 008	-	-	-	-	6	0/6 (0.0%)
0.006	N87I	-	-	-	1	1/3 (33.3%)
	-	-	-	-	2	
0.004	-	-	-	-	2	0/2 (0.0%)
0.002	N87I	-	-	-	1	1/12 (8.3%)
	-	-	-	-	11	
Total					50	7/50 (14.0%)

Table 3 Occurrence of *gyrA* mutations in levofloxacin-resistant and -susceptible strains

gyrA mutation	MIC (μg/ml)		Total
	≥1	<1	
Positive	57	7	64
Negative	11	43	54
Total	68	50	118

Fisher's exact probability <0.001

考察

報告されている国々でのキノロン耐性率は 5%前後が多いが、本研究でのlevofloxacin 耐性率は 15%であり、日本では *H. pylori* のキノロン耐性率が高いと考えられた。この理由として各報告の調査年次や調査時に設定した break point の差異なども考えられるが、日本ではキノロン系抗生剤が多量に消費されている事も大きく影響していると考えられる。

細菌のキノロン耐性は DNA gyrase もしくは topoisomerase IV の遺伝子変異が原因とされているが、細菌により耐性出現の責任遺伝子は少しずつ異なっている。*H. pylori* は topoisomerase IV をコードする *parC* や *parE* を持っていないため、DNA gyrase をコードする *gyrA* もしくは *gyrB* の変異を検討する必要があった。本研究では耐性菌の 83.8%に *gyrA* mutation が認められた。さらに Asn-87 もしくは Asp-91 の *gyrA* mutation がその殆どを占め、他の場所の *gyrA* mutation や *gyrB* mutation は常に Asn-87 か Asp-91 の *gyrA* mutation と同時に存在していた。従って *H. pylori* における levofloxacin 耐性の hot spot は *gyrA* の Asn-87 と Asp-91 であると考えられた。(これらの mutation は levofloxacin 感受性菌の 14%にも認められ、耐性菌の 14.7%には認められなかった。この原因については、mutation を持つ菌と持たない菌が胃内に mixed infection していた可能性が最も考えられる。)さらに耐性菌において Asn-87 の mutation はどの MIC 値でも広く認められたのに対し、Asp-91 は比較的低い MIC 値と関係している傾向があったが、更なる検討が必要と考えられた。

今後、臨床で LVX を用いた除菌療法を行い、Asn-87 か Asp-91 の *gyrA* mutation を持つ *H. pylori* は実際に除菌されないのかどうか確認して行く必要がある。また、これら hot spot に注目して、direct sequencing ではない簡便な mutation のスクリーニング方法も検討するべきであると考えられる。

結語

神戸における臨床分離 *H. pylori* 507 株の levofloxacin 耐性率は 15%であった。levofloxacin 耐性菌と感受性菌では *gyrA* mutation の出現頻度に有意差を認め、その hot spot は Asn-87 及び Asp-91 と考えられた。

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 1915 号	氏 名	宮地 英行
論文題目 Title of Dissertation	Primary levofloxacin-resistance and *gyrA/B* mutations among *Helicobacter pylori* in Japan *Helicobacter pylori* に対する levofloxacin の 1 次耐性と *gyrA/B* mutations		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 横野 浩一 副 査 Vice-examiner 具 英成 副 査 Vice-examiner 塚田 博		
審査修了日	平成 20 年 2 月 19 日		

（要旨は 1,000 字～2,000 字程度）

胃潰瘍や十二指腸潰瘍の予防と治療において *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)の除菌は非常に重要な役割を担っている。これまで多くの研究者によって *H. pylori* 除菌療法は開発されてきたが、現在は amoxicillin(AMX)と clarithromycin (CLR)、metronidazole(MNZ)の 3 剤の内の 2 剤とプロトンポンプ阻害剤(PPI)を組み合わせた 3 剤療法が広く使用されている。日本では PPI と AMX、CLR の 3 剤療法が 1 次除菌療法として 2000 年から保険診療で認められている。しかし、この 3 剤の除菌療法では 20%以上の失敗例があり、充分な成績とは言えない。除菌失敗の原因は *H. pylori* の CLR 耐性に因る所が大きく、CLR 耐性 *H. pylori* の出現頻度は年々増加しているため、除菌成功率は次第に低下する傾向にある。さらに CLR 耐性を示す *H. pylori* を同じ 3 剤で再除菌した場合の成功率は 20%以下と低く、新たな抗生剤を使用した除菌療法の開発が望まれている。研究者らは既にニューキノロン系抗生剤の levofloxacin(LVX)を用いた除菌療法は安全で有効である事を報告しており、今後 LVX は MNZ とともに除菌を行う上で重要な薬剤と考えられ、また近年世界的にも LVX を用いた除菌治療に注目が集まっている。LVX を始めとしたキノロン耐性については、標的酵素である DNA gyrase の A/B サブユニット遺伝子(*gyrA/B*)の QRDR(quinolone resistance-determining region)に変異がある場合、キノロンが DNA gyrase に結合して DNA 合成を阻害するという過程が阻害されて、耐性が出現すると言われている。しかし、AMX や CLR、MNZ に関する耐性率や耐性遺伝子についての報告は多数あるが、LVX に関する報告は殆んどない。そこで今回、研究者は多数の *H. pylori* 臨床菌株を用いて LVX 耐性率や耐性遺伝子の検討を行った。

2001 年 1 月から 2004 年 12 月までの間に神戸大学病院において上部消化管内視鏡検査にて採取され、培養・薬剤感受性試験が行われた *H. pylori* 507 株を対象とした。以前に除菌療法を受けた事のある菌株は対象外とした。薬剤感受性試験は E test を使用して、LVX 耐性を 1ug/ml 以上と定義して、その感受性分布を検討した。DNA が保存されていなかった 8 株を除く全ての耐性菌 68 株と、ランダムに選んだ感受性菌 50 株の DNA について、*gyrA* と *gyrB* の QRDR(quinolone resistance-determining region)を direct sequencing して、*gyrA* については GenBank accession number: L29481 と *gyrB* については GenBank accession number: AB084028 と比較して point mutation の評価を行った。評価の際には Genetyx-Mac version 10.1.6.を使用した。耐性菌と感受性菌における mutaion の出現頻度の違いについては Fisher's exact probability test を用いて評価した。

その結果、耐性菌 68 株中 57 株(83.8%)に、また感受性菌 50 株中 7 株(14.0%)に Asn-87 もしくは Asp-91 の *gyrA* mutation を認めた。即ち耐性菌と感受性菌では *gyrA* mutation の出現頻度に統計学的有意差を認めた。耐性菌の中では、どの MIC においても *gyrA* mutation は高率に認められ、MIC 値による差異は認めなかった。一方、*gyrB* mutation は耐性菌 68 株中 3 株(4.4%)に認めたが、感受性菌には認められなかった。

今回の研究に関して、報告されている国々でのキノロン耐性率は 5%前後が多いが、本研究での levofloxacin 耐性率は 15%であり、日本では *H. pylori* のキノロン耐性率が高いと考えられた。この理由として各報告の調査年次や調査時に設定した break point の差異なども考えられるが、日本ではキノロン系抗生剤が多量に消費されている事も大きく影響していると考えられる。細菌のキノロン耐性は DNA gyrase もしくは topoisomerase IV の遺伝子変異が原因とされているが、細菌により耐性出現の責任遺伝子は少しずつ異なっている。*H. pylori* は topoisomerase IV をコードする *parC* や *parE* を持っていないため、DNA gyrase をコードする *gyrA* もしくは *gyrB* の変異を検討する必要があった。本研究では耐性菌の 83.8%に *gyrA* mutation が認められた。さらに Asn-87 もしくは Asp-91 の *gyrA* mutation がその殆どを占め、他の場

所の *gyrA* mutation や *gyrB* mutation は常に Asn-87 か Asp-91 の *gyrA* mutation と同時に存在していた。従って *H. pylori* における levofloxacin 耐性の hot spot は *gyrA* の Asn-87 と Asp-91 であると考えられた。これらの mutation は levofloxacin 感受性菌の 14%にも認められ、耐性菌の 14.7%には認められなかった。この原因については、mutation を持つ菌と持たない菌が胃内に mixed infection していた可能性が最も考えられるとしている。さらに耐性菌において Asn-87 の mutation はどの MIC 値でも広く認められたのに対し、Asp-91 は比較的低い MIC 値と関係している傾向があった。今後、臨床で LVX を用いた除菌療法を行い、Asn-87 か Asp-91 の *gyrA* mutation を持つ *H. pylori* は実際に除菌されないのかどうか確認して行く必要がある。また、これら hot spot に注目して、direct sequencing ではない簡便な mutation のスクリーニング方法も検討するべきであると研究者は考察している。

本研究は、胃潰瘍や十二指腸潰瘍の予防と治療において *H. pylori* の除菌における levofloxacin の有用性を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった本薬剤の耐性頻度や耐性遺伝子の解析を行い重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。