

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790327  
 研究課題名(和文) ヘリコバクター・ピロリのキノロン耐性遺伝子変異における糞便迅速診断法の開発  
 研究課題名(英文) Rapid Detection of Point Mutations Conferring Resistance to Fluoroquinolone in the *gyrA* of *Helicobacter pylori*  
 研究代表者  
 西澤 俊宏(Nishizawa Toshihiro)  
 慶應義塾大学・医学部・助教  
 研究者番号：80348648

## 研究成果の概要：

内視鏡後の *H. pylori* 培養検体においてアレル特異的 PCR 法によりキノロン耐性にかかわる *gyrA* 遺伝子変異株と野生株を 2 本の PCR チューブで 3～4 時間で簡便に識別可能であった。糞便検体については他の腸内細菌の *gyrA* 遺伝子も増幅されてしまい判定不能であった。従来 *H. pylori* 薬剤感受性試験は費用がかかり、10～14 日間の日数を要するが、*H. pylori* のキノロン耐性に関わる *gyrA* 遺伝子変異においてアレル特異的 PCR 法による迅速検出法は簡便で有用と考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	330,000	3,030,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ、フルオロキノロン、*gyrA* 遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) は、慢性胃炎・胃十二指腸潰瘍・胃癌の原因であることが明らかとなっている。最近我々は、*H. pylori* 感染スナネズミモデルにおいて、除菌療法による胃粘膜再生効果を検討し、感染期間が短いほどその効果が高いことを示し(Nishizawa T et al. *Digestion*, in press) 若年期における除菌療法が胃癌予防として有用である可能性を示唆した。除菌治療は胃

十二指腸潰瘍に対してすでに健康保険適用されているが、最近慢性胃炎のみならず胃癌の予防効果としても検討されており、今後は胃癌の予防として慢性胃炎や除菌治療が広く実施される可能性がある。

フルオロキノロン系は *H. pylori* の三次除菌としての薬剤として期待できると考えられているが、フルオロキノロン系抗菌薬の作用機序として、DNA 複製の際に DNA のコイルをほどく機転に不可欠な DNA gyrase の A サ

プユニットを阻害することが知られている。そしてフルオロキノロン耐性化の機序としてはその *gyrA* 遺伝子の変異が指摘されており、研究代表者らは、ガチフロキサシン (GFLX) の MIC と *gyrA* 遺伝子の点突然変異の関連を検討し、その薬剤耐性機構の検討し、GFLX 耐性判定における *gyrA* 遺伝子変異による検出は、特異度 95.7%・感度 95.7%と非常に良好であることを報告した (Nishizawa T, et al. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(4).1538-1540.2006)。研究代表者らは、除菌不成功例においてはキノロン耐性率が本邦では 47.9%と非常に高いことを報告しており、フルオロキノロンによる除菌療法の際には、薬剤感受性試験の必要性が高いことを示唆した。

## 2. 研究の目的

*H.pylori* の薬剤感受性試験は手技が比較的煩雑で培養自体も容易ではなく、判定にも約 1 ヶ月を要する。本試験は現在も保険適用になっておらず、研究機関においてのみ施行されているのが現状である。生検検体あるいは糞便から *H.pylori* の DNA を抽出し、アレル特異的 PCR を用いて点突然変異部位の迅速診断法の開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

### *H.pylori* 分離・培養薬剤感受性試験

クラリスロマイシン (CAM) あるいは、メトロニダゾール (MNZ) での除菌不成功例において十分なインフォームド・コンセントを得た上で、上部消化管内視鏡を施行し、胃体部粘膜より生検を施行する。また、その際に糞便を持参して頂き回収する。Mueller Hinton agar および aged sheep blood の培地で 35 にて微好気培養を行う。

### *H.pylori* 薬剤感受性試験

GFLX / AMPC / CAM および MNZ の薬剤感受性測定を寒天平板希釈法で施行する。希釈系列範囲は 128 ~ 0.0015  $\mu$ g/ml の 14 段階とし菌の発育を認めない最小の薬剤濃度を MIC とする (NCCLS, 2004. M100-S14. Villanova, PA.)。また、すでに慶應義塾大学医学部倫理委員会にて承認されているが (16-52-2) CAM・MNZ 耐性の症例に対し GFLX / AMOX およびラベプラゾールでの除菌治療を文書にてインフォームド・コンセントを得た上で施行する。除菌判定は、除菌療法 1 2 週間後に尿素呼吸試験にて行う。

### *H.pylori* の DNA 抽出・*gyrA* シークエンス

*H.pylori* 培養株より DNA を抽出する。*gyrA* および *gyrB* のキノロン耐性決定領域の遺伝子を PCR で増幅する。使用するプライマーは *gyrA* の forward が 5'-TTTRGCTTATTCMATGAGCGT、reverse が 5'-GCAGACGCTTGGTARAATA を、*gyrB* の forward は

5'-YGC AAAAGCCAGAGAAGCCA、reverse は 5'-ACATGCCCTTGTTCAATCAGC を用いる。この場合 *gyrA* および *gyrB* の増幅フラグメントはそれぞれ 428bp、444bp である。それぞれの遺伝子配列をシークエンスし、遺伝子変異を検討する。

### 遺伝子変異迅速診断法の確立

*gyrA* 遺伝子配列のシークエンスが完了した野生株・変異株において、アレル特異的 PCR による遺伝子変異迅速診断法を確立する。既報や当院での分離株での *gyrA* 遺伝子変異としては C261A, C261G, G271A, G271T, A272G であり、それぞれの変異に特異的なプライマーを作成する。プライマーの 3 末端より 2 個目の塩基は PCR 増幅率に決定的な影響を与えることがわかっており、この部位に点突然変異部位にあわせ、変異株において一致させる。更に変異株での PCR 増幅を特異的にするために 3 末端から 3 番目~5 番目の塩基に 1 箇所 mismatch を作成する。即ち、野生株においてはプライマーの 3 末端から 2 番目と 3 番目~5 番目の塩基に 2 箇所 mismatch があり PCR 増幅が生じないのに対し、変異株では 3 末端から 3 番目~5 番目の塩基に 1 箇所のみ mismatch であり PCR 増幅を生じる。C261A に対するプライマー配列は CCCCC ATGGCGAGAAaG, C261G に対するプライマー配列は CCCCCATGGCGAGA AgG, G271A に対するプライマー配列は GC GATAACGCGGTTTAGaA, G271T に対するプライマー配列は GGCGATAATGCGGTTA ATtA, A272G に対するプライマー配列は GCGATAACGCGGTTTAGgGt とする。配列中の小文字が 3 末端より 2 番目の塩基が変異株のそれと一致させた部位で、下線は 3 末端から 3 番目~5 番目の塩基の mismatch 部位を示す。C261A, C261G に対するプライマーによる増幅フラグメントは 262bp で、G271A, G271T, A272G に対するプライマーによるものは 254bp である。の PCR 溶液組成は、精製水 7.9  $\mu$ l, PCR バッファー 2.5  $\mu$ l, dNTPs 2.5  $\mu$ l, KOD plus DNA ポリメラーゼ (東洋紡) 0.5  $\mu$ l, MgSO<sub>4</sub> 1  $\mu$ l, プライマー混合液 9.6  $\mu$ l, DNA 抽出液 1  $\mu$ l とする。また、PCR 温度設定は、95 5分、ついで 95 for 30秒, 62.5 30秒, 72 30秒を 35 サイクルおよび 72 2分とする。増幅後は 2% アガロースゲルで電気泳動後に、エチレンブロマイド染色の上、紫外線下に増幅を確認する。

### 糞便中 *H.pylori* DNA 抽出・*gyrA* シークエンス

また、糞便試料より DNA を抽出する。*gyrA* のキノロン耐性決定領域の遺伝子を PCR で増幅する。*gyrA* の増幅フラグメント 428bp を 2% アガロースゲルで電気泳動の上、確認

する。それぞれの遺伝子配列をシーケンスし、遺伝子変異を検討する。*gyrA* 遺伝子配列のシーケンスが完了した野生株・変異株において、アレル特異的 PCR による遺伝子変異迅速診断法を試みる。

#### 4. 研究成果

CAM あるいは MNZ での除菌不成功例において十分なインフォームド・コンセントを得た上で、上部消化管内視鏡を施行し、胃体部粘膜より生検を施行した。Mueller Hinton agar および aged sheep blood の培地で 35 にて微好気培養を行った。*H. pylori* 培養 51 株より DNA を抽出し *gyrA* のキノロン耐性決定領域の遺伝子を PCR で増幅し遺伝子配列をシーケンスした。GFLX 耐性 25 株中 24 株に *gyrA* 遺伝子変異を認め、GFLX 感受性 26 株では 1 株のみに *gyrA* 遺伝子変異を認めた。全 51 株中 26 株で *gyrA* 遺伝子変異を認めず、C261A 変異は 8 株、C261G 変異 3 株、G271A 変異 9 株、G271T 変異 2 株、A272G 変異 3 株であった。*gyrA* 遺伝子配列のシーケンスが完了した野生株・変異株において、アレル特異的 PCR による遺伝子変異迅速診断法を確立した。アレル特異的 PCR 法により野生株と変異株を 2 本の PCR チューブで 3 ~ 4 時間で識別可能であった。従来の *H. pylori* 薬剤感受性試験は費用がかかり、10 ~ 14 日間の日数を要するが、本法は数時間で簡便に判定可能であった。*H. pylori* のキノロン耐性に関わる *gyrA* 遺伝子変異においてアレル特異的 PCR 法による迅速検出法は簡便で有用と考えられた (Nishizawa et al. **J. Clin. Microbiol.** 45(2):303-5.2007)。糞便からの *gyrA* 遺伝子増幅を各種のプライマーで試みたが、他の腸内細菌の *gyrA* 遺伝子も増幅されてしまい糞便検体からの迅速検出法開発は断念した。

また、15 例の CAM・MNZ 両耐性あるいは一次除菌不成功で MNZ 耐性の症例に対し GFLX / AMPC / RPZ での除菌治療を施行し、する。GFLX の MIC < 1 µg/ml の GFLX 感受性あるいは *gyrA* 遺伝子変異のない症例では 100% の成功率だったのに対し、GFLX の MIC < 1 µg/ml の GFLX 感受性あるいは *gyrA* 遺伝子変異のない症例では 100% の成功率であったが、GFLX の MIC 1 µg/ml の GFLX 耐性あるいは *gyrA* 遺伝子変異のある症例では 28.6% の成功率と有意差を認めた。GFLX による三次除菌に際しては、薬剤感受性試験あるいは *gyrA* 遺伝子変異の検討が有用と考えられた (Nishizawa T, Nishizawa et al. **J Gastroenterol Hepatol**, 23:s2,167-170,2008.)

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 22 件)

1. Nishizawa T, Suzuki H, Nakagawa I, Minegishi Y, Masaoka T, Iwasaki E, Hibi T, Early *Helicobacter pylori* eradication restores sonic hedgehog expression in the gastric mucosa of Mongolian gerbils. **Digestion**, 79(2):99-108. 2009. (査読あり)
2. Nishizawa T, Suzuki H, Hibi T, Fluoroquinolone based third-line therapy for *Helicobacter pylori* eradication. **J Clin. Biochem. Nutr.** 44(2):119-124. 2009. (査読あり)
3. 西澤俊宏、鈴木秀和、ワーファリン内服中のメトロニダゾールによる除菌治療の注意点、**Helicobacter Research**. 2009;13(1):63-65. (査読なし)
4. Suzuki S, Suzuki H, Nishizawa T, Kaneko F, Ootani S, Muraoka H, Saito Y, Kobayashi I, Hibi T, Past Rifampicin Dosing Determines Rifabutin Resistance of *Helicobacter pylori*. **Digestion**. 14.79(1),1-4.2009. (査読あり)
5. Suzuki H, Nishizawa T, Muraoka H, Hibi T. Sitafloxacin and garenoxacin may overcome the antibiotic resistance of *H. pylori* with *gyrA* mutation. **Antimicrob Agents Chemother**. 53(4):1720-1721.2009. (査読あり)
6. Nishizawa T, Suzuki H, Nakagawa I, Minegishi Y, Masaoka T, Iwasaki E, Hibi T, Rebamipide promoted restoration of sonic hedgehog expression in the gastric mucosa after early eradication of *Helicobacter pylori* infection. **Digestion**, inpress. (査読あり)
7. Tsugawa H, Suzuki H, Nakagawa I, Nishizawa T, Saito Y, Suematsu M, Hibi T. Alpha ketoglutarate oxidoreductase, an essential salvage enzyme of energy metabolism, in coccoid form of *Helicobacter pylori*. **Biochem Biophys Res Commun**. 376(1):46-51. 2008. (査読あり)
8. Nishizawa T, Suzuki H, Nakagawa I, Iwasaki E, Masaoka T, Hibi T, Gatifloxacin based triple therapy as third-line regimen for *Helicobacter*

*pylori* eradication. **J Gastroenterol Hepatol**, 23:s2,167-170,2008. (査読あり)

9. Saeki K, Hozawa S, Miyata N, Nishizawa T, Soma H, Iwao Y, Kameyama K, Hibi T, IgG4-negative autoimmune pancreatitis with sclerosing cholangitis and colitis: possible association with primary sclerosing cholangitis? **Intern. Med.** 47(10):943-948. 2008. (査読あり)

10. 西澤俊宏、鈴木秀和:FDの病態とグレリン。 **消化器の臨床** Vol.No.4 :11.385-388, 2008. (査読なし)

11. 西澤俊宏、鈴木秀和:ガチフロキサシンはどのような薬剤ですか? *H. pylori* 除菌に有効ですか? **Helicobacter Research**. Vol.12.no 2:59-61,2008. (査読なし)

12. 鈴木秀和、西澤俊宏:*Helicobacter pylori* 研究の年間レビュー、非悪性胃十二指腸疾患とのかかわり **Helicobacter Research**. Vol. 12.no 2:26-28,2008. (査読なし)

13. Nishizawa T, Suzuki H, Masaoka T, Iwasaki E, Hibi T, A new eradication resistance index as a predictor of metronidazole-containing second-line treatment of *Helicobacter pylori*. **Digestion**, 76(3-4):215-220, 2007. (査読あり)

14. Nishizawa T, Suzuki H, Ayako U, Muraoka M, Iwasaki E, Masaoka M, Kobayashi I, Hibi T. Rapid detection of point mutations conferring resistance to fluoroquinolone in the *gyrA* of *Helicobacter pylori* by allele-specific polymerase Chain Reaction. **J. Clin. Microbiol.** 45(2),303-305.2007. (査読あり)

15. Nishizawa T, Suzuki H, Masaoka T, Iwasaki E, Hibi T, Reduced conscious blood flow in the stomach during non-steroidal anti-inflammatory drugs administration assessed by flash echo imaging. **Scand. J. Gastroenterol.** 42(9):1040-1044, 2007. (査読あり)

16. Nishizawa T, Suzuki H, Masaoka T, Hibi T. Enhanced gastric transmural blood flow in aspirin intoxication. **J Gastroenterol Hepatol**, 22(11):2037, 2007. (査読あり)

17. Nishizawa T, Suzuki H, Masaoka T, Miegishi Y, Eisuke I, Hibi T. *Helicobacter*

*pylori* eradication restored Sonic hedgehog expression in the stomach. **Hepatogastroenterology**,54(75):697-700.2007. (査読あり)

18. 西澤俊宏、朴沢重成、鈴木秀和、今枝博之、樋口肇、久松理一、永田博司、島津元秀、向井万起男、日比紀文、膵癌との鑑別に苦慮した膵仮性嚢胞を伴うアルコール性膵炎の1例、**膵臓**, 22:503-508,2007. (査読あり)

19. 西澤俊宏、鈴木秀和: *Helicobacter pylori* の二次・三次除菌療法『**消化管Network**』Vol.8,No4,2007. (査読なし)

20. 鈴木秀和、西澤俊宏: 肥満遺伝子産物、レプチン。その病態生理学的意義。 **医学のあゆみ** Vol.223,No7:521-524,2007. (査読あり)

21. 鈴木秀和、正岡建洋、西澤俊宏、岩崎栄典、日比紀文、臨床医学の展望、消化器病学、上部消化管疾患。 **日本医事新報** 4322:64-65, 2007. (査読なし)

22. 鈴木秀和、西澤俊宏、日比紀文。抗ヘリコバクター食品。 **G.I. Research** 15(1):55-59, 2007. (査読なし)

[学会発表](計8件)

Nishizawa T, Hidekazu Suzuki, Yuriko Minegishi, Tatsuhiro Masaoka, Eisuke Iwasaki, Toshifumi Hibi. Earlier *H. pylori* eradication restores sonic hedgehog expression in the gastric mucosa. **Digestive Disease Week 2008**, May 18th 2008, Sandiego.

Nishizawa T, Suzuki H., Nakagawa I., Iwasaki E., Masaoka T., Hibi T. Prediction of the results of metronidazole-based second-line and gatifloxacin-based third-line therapies after the failure of *H. pylori* eradication. **The 1st Japan and US Collaboration Conference in Gastroenterology**. Tokyo. 2007年11月16日。

西澤俊宏、鈴木秀和、日比紀文、感染スナネズミ胃炎での sonic hedgehog 及び RUNX3 発現と除菌後の胃粘膜再生-胃がん予防の除菌時期の考察 **49回日本消化器病学会大会**, シンポジウム, 2007年10月20日, 神戸。

Nishizawa T, Hidekazu Suzuki, Yuriko Minegishi, Tatsuhiro Masaoka, Eisuke

Iwasaki, Toshifumi Hibi. Sonic hedgehog expression in the gastric mucosa with or without Heterotopic proliferative glands after the *Helicobacter pylori* eradication. **Gastrointestinal response to injury**. October 3, 2007, Quebec Canada. Travel award 受賞。

西澤俊宏, 鈴木秀和, 峯岸ゆり子, 正岡建洋, 岩崎栄典, 齋藤義正, 日比紀文, 除菌療法による sonic hedgehog 発現変化と胃粘膜再生, **日本消化器免疫学会総会**, 2007 年 7 月 9 日, 品川

西澤俊宏, 鈴木秀和, 正岡建洋, 村岡宏江, 岩崎栄典, 鈴木雅之, 小林真哲, 日比紀文, ガチフロキサシンによる三次除菌療法, **第 13 回ヘリコバクター学会**, 2007 年 6 月 22 日, 大津

Nishizawa, T., Hidekazu Suzuki, Tatsuhiko Masaoka, Eisuke Iwasaki, Toshifumi Hibi, Eradication resistance index as a predictor of response to metronidazole-containing second-line treatment for *Helicobacter pylori* infection, **Digestive Disease Week 2007**, May 23th 2007, Washington, D.C.

Nishizawa, T., Suzuki, H., Umezawa, A., Iwasaki, E., Muraoka, H., Masaoka, T., Kobayashi, I., Hibi, T. Third line H. pylori eradication therapy after the failure of metronidazole-containing second line therapy. **The 12<sup>th</sup> Taishotoyama International Symposium**. Shimoda. 2007 年 4 月 27 日。

〔図書〕(計 1 件)

鈴木秀和、西澤俊宏、日比紀文: *Helicobacter pylori* 感染症 『**Annual review 2007 消化器**』林紀夫、日比紀文編集。中外医学社。東京。Pp 38-43, 2007.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西澤 俊宏 (Nishizawa Toshihiro)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号 80348648

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし