

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09478

研究課題名(和文) 薬剤耐性ピロリ菌の新規治療法 - LED光線を用いた新規除菌治療装置の開発 -

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic regimens for Helicobacter pylori infection by Light Emission Diode light irradiation

研究代表者

平塚 孝宏 (Hiratsuka, Takahiro)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：20600886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：青色LEDの照射はAmoxicillin, Clarithromycin, Levofloxacin, Metronidazoleに対する抗生物質耐性ピロリ菌株および1種の感受性Helicobacter pylori (H. pylori) 株に対する死滅効果を有した。死滅の過程においてH. pyloriは形態変化を伴い機序としてLEDがH. pylori 内でのROS産生を増加させることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1. 複数のピロリ菌株への青色LED光線照射により死滅効果が確認でき、薬物療法を代替する治療あるいはその補助療法として臨床応用が期待できる。
2. 薬剤耐性株に対しても死滅効果が確認できたため、薬剤耐性ピロリ菌感染者に対する新規治療法の足掛かりとなりうる。

研究成果の概要(英文)：Irradiation of blue LEDs had a killing effect on antibiotic-resistant H. pylori strains against Amoxicillin, Clarithromycin, Levofloxacin, and Metronidazole, and one susceptible Helicobacter pylori (H. pylori) strain. It was found that H. pylori increased ROS production in H. pylori as a mechanism by which H. pylori was accompanied by morphological changes during the death process.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ピロリ菌治療 光線照射 内視鏡外科学

## 1. 研究開始当初の背景

日本消化器病学会によるとピロリ菌の感染率は世界人口の約 50%、本邦でも約 50%と極めて高率である。また 2014 年には全世界の胃癌の約 8 割がヘリコバクター・ピロリの感染が原因であることが世界保健機関 (WHO) の国際がん研究機関によって報告された。現在抗菌薬によるピロリ菌の除菌治療は 90%以上の成功率といわれているが、一次除菌治療、二次除菌治療においても効果が認められない例も 5%程度存在する (Sasaki M et al. J Clin Biochem Nutr 47:53-58, 2010)。薬剤耐性菌増加による治療抵抗性感染症のパンデミックが世界中で危惧される中、驚異的な量の抗菌薬がピロリ菌感染者によって使用されており、抗菌薬の不適切な使用によるあらたな耐性菌出現への対策は極めて重要な課題である。

現在、当講座では炎症性疾患に対する光線を用いた新規治療法開発の研究を行っている。これまで我々は、光線照射が炎症性腸疾患や気管支喘息の病態モデル動物において、その局所および全身の抗炎症効果を示し、さらに病態を改善することを発見した (Hiratsuka T et al. JGH. 2014, Inomata M, Hiratsuka T et al. Adv Tech Biol Med 2014)。そして近年では特定の波長、強さの Light Emitting Diode (以下 LED) 光線が炎症性腸疾患モデル動物の病勢を改善する結果を得ている。ピロリ菌に対する光線照射による増殖抑制効果の報告は、in vitro, ヒトにおいて散見されるものの、さまざまな菌種が存在するピロリ菌について網羅的に光線照射を行った報告はほとんどない。今回我々は、薬剤耐性ピロリ菌を含めた様々なピロリ菌に対し preliminary な実験において、光線照射は照射早期からピロリ菌のコロニー数を減少させ、増殖を抑制し、電子顕微鏡にて形態変化を認めた。有効な光源特定と、その増殖抑制効果の機序について検討したい。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、LED 光線の胃内照射によるピロリ菌感染症に対する新規治療法を開発することを最終的な目標とし、抗菌薬への耐性菌を含む種々のピロリ菌に対して、(1) 光線照射が in vivo, in vitro において除菌効果を発揮するか否か (2) 除菌効果に至適な光線波長および光量はどのようなものか、(3) 光線照射による除菌効果の機序は何か、を解明することである。

## 3. 研究の方法

(1) in vitro, in vivo にて光線照射が複数のピロリ菌株に対して除菌効果を発揮するか否かの検討。液体培地内で培養した一定量の抗菌薬耐性があるピロリ菌株 (表 1) を LED 光源を内蔵した温度管理センサ付き CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養したのち、経時的に寒天培地で培養しコロニー数を測定することによりその増殖抑制効果の有無を判定する。

(2) in vitro, in vivo における光線照射後のピロリ菌の増殖へ及ぼす影響調査による、除菌効果に至適な光線波長および光量の決定。LED 光源の交換と、照射距離、電圧を増減することにより波長、光量の違いがピロリ菌の増殖抑制効果に及ぼす影響を調べる。波長は可視光線 (青色、緑色、オレンジ色、赤色) の単波長を用いる。

(3) 光線照射による除菌効果の機序について、in vitro ではコロニー、in vivo では摘出した胃の組織におけるピロリ菌を用い、光線照射前後の、電子顕微鏡による形態変化を明らかにする。さらに当院に設置された次世代シーケンサーを用いて、光線照射により増殖抑制効果あるいは殺菌効果を示すピロリ菌株に対する光線照射群と非照射群での網羅的 DNA 解析を行うことにより、光線照射がおよぼす遺伝子への影響を明らかにし、その現象の機序を検討する。また光線照射に光線照射にて良好な増殖抑制効果を示す株とそうでない株との遺伝子学的差異をあきらかにし、光線照射に対するピロリ菌の増殖への反応性の違いの機序、さらに抗菌薬耐性との関連について検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 結果

Amoxicillin, Clarithromycin, Levofloxacin, Metronidazole に対する耐性特性の調査がなされた 10 種の抗菌薬耐性株および 1 種の抗菌薬感受性 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 株 (表 1) を使用した。これらに 300, 500, 600  $\mu$ W の青色 LED 照射後、経時的なコロニー形成単位数のカウントにて *H. pylori* の生存率を評価したところ青色 LED による照射後、全菌株の *H. pylori* コロニーは対照群と比較して時間依存性に有意に減少した ( $p < 0.05$ )。その他の LED においても増殖抑制効果を検討したが青色 LED と比較してその増殖抑制効果は低かった。Levofloxacin 耐性株にて照度依存性の *H. pylori* 死滅効果を認めた。光線照射による除菌効果の機序解明のため、青色 LED のピロリ菌の殺菌効果と活性酸素種 (ROS) との関連を調べたところ、ピロリ菌に対する 405nm の光線照射後、非照射群では ROS の発生は認められなかったのに対し、光線照射群では経時的に ROS 発生量が増加し、非照射群と比較し ROS は有意に増加した ( $P < 0.05$ )。また

Clarithromycin, Levofloxacin, Metronidazole に対する抗菌薬耐性株および抗菌薬感受性 *H. pylori* 株を使用し、500  $\mu$ W の青色 LED 照射・固定後、電子顕微鏡にてその形態変化について評価したところ青色 LED を照射後の *H. pylori* は、3-5 時間後に電子顕微鏡にて観察すると表面不整な短い棒状の形態を呈し、非照射群よりも有意に長さが短かった。また光線照射後に再培養された 1 種のピロリ菌の長さは、非照射群と有意な違いを認めず、その後の光線照射にて死滅した。一方で *In vivo* での動物実験は感染率の問題から困難でありヒトでの研究が望ましいことが判明した。

H. pylori name in this study	Original strain No.	Antibiotics (resistant MIC [ $\mu$ g/mL])			
		AMX (R $\geq$ 0.25)	CLR (R $\geq$ 1)	LVX (R $\geq$ 1)	MNZ (R $\geq$ 8)
Type A	BGD133	S	S	R (4)	S
Type B	BGD94	S	S	S	R (128)
Type C	BGD69	S	R (32)	R (8)	R (128)
Type D	26695	S	S	S	S
Type E	BGD3	S	R (64)	R (4)	R (64)
Type F	BGD10	S	R (128)	R (4)	R (16)
Type G	BGD14	S	S	S	R (64)
Type H	BGD63	R (0.25)	S	R (64)	R (64)
Type I	BGD68	S	R (16)	S	R (128)
Type J	BGD80	S	S	S	R (128)
Type K	BGD120	R (0.25)	S	R (8)	R (128)

図 1. 本研究に用いたピロリ菌とその抗菌剤感受性 (J Ma et al. JGH 2018)

AMX, amoxicillin; CLR, clarithromycin; LVX, levofloxacin; MIC, minimal inhibitory concentration; MNZ, metronidazole; R, resistant (minimal inhibitory concentration of resistant strain); S, susceptible.

## (2) 考察

既存の報告において抗菌薬耐性株を含む *H. pylori* が青色 LED により増殖抑制効果を示す報告は存在するが、Amoxicillin, Clarithromycin, Levofloxacin, Metronidazole に対する耐性の組み合わせが異なる 10 種の *H. pylori* に対する青色 LED に対する増殖抑制および機序を検討した報告はなかった。今回の研究では、青色 LED という可視光線が、複数の種類の抗菌薬耐性 *H. pylori* に対して *in vitro* で増殖抑制効果、死滅効果を示すことが明らかになった。青色 LED は可視光線であり、直接的な有害作用はほとんどないと推定されていることから、安全性に関する実験は必要であるものの速やかな臨床応用が可能と考えられた。

## (3) 今後の展望

ヒトから採取した複数の種類の抗菌薬耐性 *H. pylori* に対する増殖抑制もしくは死滅効果が確認できたことから、抗菌薬しかない現在の除菌治療に加えて、抗菌薬耐性菌を含めた新しい *H. pylori* 除菌法として臨床応用が期待できる。特に一旦形態変化を示すまで光線照射を行ったのちに再度培養、増殖させ、2 度目の光線照射を行った際、その菌死滅効果の減弱を認めなかったことから、光線治療に対して耐性化は起こさない、あるいは少ない可能性がある。また現在内視鏡へ青色 LED を搭載し内視鏡観察と同時にピロリ菌除去が可能となるようなデバイス開発に取り組んでいる。

抗菌薬に対する *H. pylori* の耐性化は年々増加傾向にある (Thung I, et al *Aliment Pharmacol Ther* 2016) ことより、特に先進国における 2 次除菌や 3 次除菌といった抗菌薬耐性株に対する治療法として応用可能であることはもちろん、医療発展途上国における検診目的の上部消化管内視鏡検査と同時に内視鏡の光源として青色 LED を使用することで除菌ができれば治療効率が劇的に向上するものと考えられる。現在大分大学では、環境予防医学講座を中心としてアジア、アフリカを中心とした *H. pylori* の感染状況、その特性に関する研究が進められており、光線を用いた新しい *H. pylori* 除菌方法はこれらの地域での除菌率を上げる可能性があるとして、共同で新しい光線除菌デバイス開発に取り組んでいる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ma Jianwei, Hiratsuka Takahiro, Etoh Tsuyoshi, Akada Junko, Fujishima Hajime, Shiraishi Norio, Yamaoka Yoshio, Inomata Masafumi	4. 巻 なし
2. 論文標題 Anti-proliferation effect of blue light-emitting diodes against antibiotic-resistant Helicobacter pylori	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1492-1499
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jgh.14066	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ma Jianwei, Takahiro Hiratsuka, Tsuyoshi Etoh, Junko Akada, Hajime Fujishima, Norio Shiraishi, Yoshio Yamaoka, Masafumi Inomata
2. 発表標題 The killing effect of blue light-emitting diodes(LEDs)for Helicobacter Pylori with antibiotic-resistant strains
3. 学会等名 Asian Pacific Digestive Diseases Week - APDW 2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	猪股 雅史  (Inomata Masafumi)  (60315330)	大分大学・医学部・教授    (17501)	
研究分担者	衛藤 剛  (Etoh Tsuyoshi)  (00404369)	大分大学・医学部・准教授    (17501)	
研究分担者	井上 高教  (Inoue Takanori)  (40243969)	大分大学・理工学部・准教授    (17501)	

