

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

(2000年6月)

委員：那須 勝¹⁾：大分医科大学第二内科
西野 武志²⁾：京都薬科大学微生物学
東 健：福井医科大学第二内科
川上 由行：信州大学医療技術短期大学部
小林 寅詰：三菱化学ピーシーエル(株)化学療法研究室
斉藤 厚：琉球大学医学部第一内科
笹津 備規：東京薬科大学薬学部病原微生物学
高橋 信一：杏林大学医学部第三内科
福田 能啓：兵庫医科大学第四内科
峯 徹哉：東京大学医学部附属病院分院内科
藤岡 利生：大分医科大学第二内科
(順不同)

1)：委員長，2)：前委員長

はじめに

1994年に、米国NIHが*H. pylori*感染潰瘍患者に対する抗菌薬治療による除菌の必要性を示した。それ以来、世界において各種抗菌薬を用いた*H. pylori*除菌治療が行われ成果を上げている。その反面、除菌に用いられる抗菌薬に対する耐性株も報告され問題となっている。

現在わが国では、*H. pylori*の抗菌薬感受性に関する成績は多くの研究者によって報告されているが、それらの耐性および感性の判定は正式なものがなく、任意に決められているのが現状である。他方、1999年9月にNCCLSは「Candidate Standard for Approval」において*H. pylori*に対するCAMのブレイクポイントを定め、2000年1月のNCCLSガイドラインM100-S10に記載している¹⁾。

今回我々は、わが国における*H. pylori*除菌治療のためのCAMおよびAMPCの臨床的ブレイクポイントMICを定めることを目的として、施設を限定し、厳密に管理された*H. pylori*感染患者にCAM、AMPCおよびプロトンポンプインヒビター(PPI)による除菌治療を行った症例を対象として、その臨床背景を詳細に調査するとともに、分離菌に対する両薬の最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。ここでは、その結果に基づいて、ブレイクポイント制定について報告する。

1. 対象患者および施設

日本消化器病学会治験ガイドライン²⁾に基づいて、CAM、AMPCおよびPPIの3剤併用療法を行い、治療後6ヶ月間経過観察が可能であった*H. pylori*感染が明らかな胃潰瘍患者136例、十二指腸潰瘍患者112例、慢性胃炎28例、胃・十二指腸潰瘍患者14例、MALT(mucosa associated lymphoid tissue)リンパ腫9例、胃癌2例、RLH(reactive lymphoreticular hyperplasia)1例の計302例を対象とした。

参加施設は次の如くである。

福井医科大学医学部附属病院第二内科、信州大学医学部附属病院中央検査部、琉球大学医学部附属病院第一内科、杏林大学医学部附属病院第三内科、兵庫医科大学附属病院第四内科、東京大学医学部附属病院分院内科、大分医科大学医学部附属病院第二内科（順不同）

2. 除菌療法および除菌の判定

除菌療法は、CAMは400mg、600mgまたは800mg/日、AMPCは1000mgまたは1500mg/日、PPIはlan-soprazole30mgまたは60mg/日、omeprazole20mgまたは40mg/日、rabeprazole20mgまたは40mg/日のCAM+AMPC+PPIの3剤の組合せで7日間ないし14日間投与した。

除菌の判定は、投薬前および投薬後4週目以降に胃生検組織の*H. pylori*の培養検査を行い、投薬終了6ヶ月後の胃生検組織の培養検査等において*H. pylori*を認めない症例を除菌成功例とした。

3. *Helicobacter pylori* の同定

各施設において胃生検組織より分離された*H. pylori* は深冷凍庫にて -80°C にて保存後、集中測定施設（三菱化学ピーシーエル研究室：小林寅詰委員）に送付され、菌種の同定の再確認が行われた。 -80°C にて保存された各菌液は、溶解後ただちに羊血液寒天培地M58（栄研化学）に接種し、 35°C 、微好気条件下(CO_2 10%, O_2 5%, N_2 85%)で72時間培養を行った。培養後発育したコロニーは、Manual of Clinical Microbiology 7th ed. に準じた各種性状試験³⁾により*H. pylori* の確認を行った。

4. 最小発育阻止濃度(MIC)の測定

H. pylori に対するCAMおよびAMPCのMIC測定は、Table 1に示したNCCLSガイドラインM100-S9

Table 1 Testing condition of MIC for *Helicobacter pylori*

Organism	<i>Helicobacter pylori</i>
Medium	Agar Dilution : Mueller Hinton agar and aged (≥ 2 week old) sheep blood (5% v/v)
Inoculum	A saline suspension equivalent to a 2.0 McFarland standard (containing 1×10^7 to 1×10^8 CFU/ml), to be prepared from a 72-hour old subculture from a blood agar plate. The inoculum (1 to $3 \mu\text{l}$ per spot) is replicated directly on the antimicrobial agent-containing agar dilution plates.
Incubation characteristics	35°C ; 3 days; microaerobic atmosphere produced by gas generating system suitable for Campylobacters.

(NCCLS guideline M100-S9⁴⁾)

に準じて行った⁴⁾。すなわち、羊血液寒天培地M58にて前培養した各試験菌を掻き取り、McFarland No.2に調整し接種菌液とした。段階希釈した抗菌薬を含む寒天平板培地に接種し微好気培養装置を用いて 35°C 、72時間培養後、寒天平板培地上に発育したコロニーの有無を観察しMICを判定した。なお、予備実験として、臨床分離菌7株およびATCC43504, 43629, 43579の3株を用い、McFarland No.2に懸濁した菌液の*H. pylori* 生菌数を測定し、 $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$ CFU/mlであることを確認した。またQuality Control株として*H. pylori* ATCC 43504を用い、同様にMICを測定し、NCCLSガイドラインの定める精度管理基準を満たしていることを確認した。

5. 成績

Table 2に、今回用いた*H. pylori* 302株に対するCAMおよびAMPCのMIC分布と、除菌治療後の除菌株数および残存株数を示した。

Table 2 *H. pylori* に対する clarithromycin および amoxicillin の MIC 分析

MIC ($\mu\text{g/ml}$)	株 数			
	clarithromycin	(除菌, 残存)	amoxicillin	(除菌, 残存)
≤ 0.015	41	(38,3)	214	(190,24)
0.03	55	(50,5)	51	(47,4)
0.06	87	(81,6)	21	(15,6)
0.12	75	(68,7)	12	(8,4)
0.25	21	(19,2)	4	(2,2)
0.5	2	(2,0)	0	
1	0		0	
2	0		0	
4	1	(0,1)	0	
8	1	(1,0)	0	
16	5	(1,4)	0	
32	7	(2,5)	0	
64	7	(0,7)	0	
128	0		0	
計	302	(262,40)	302	(262,40)

CAMのMIC値の分布は明らかな2峰性を示し、 $\text{MIC} \leq 0.5 \mu\text{g/ml}$ および $\text{MIC} \geq 4 \mu\text{g/ml}$ の2群に分かれた。 $\text{MIC} \leq 0.5 \mu\text{g/ml}$ の株は281株と全体の93%を占めた。そのうち残存例は23株(8.1%)であった。一方、 $\text{MIC} \geq 4 \mu\text{g/ml}$ の株は21株で、そのうち残存例は17株(81%)と高い割合であった。

AMPCでは全株が $\text{MIC} \leq 0.25 \mu\text{g/ml}$ に分布し、 $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$ の株は存在しなかった。また、 $\text{MIC} \leq 0.015 \mu\text{g/ml}$ の株は214株と全体の71%を占め、MICが高くなるにつれ菌株数は少なくなった。

このMIC分布から、感性株が多く分布するCAMの $\text{MIC} \leq 0.25 \mu\text{g/ml}$ 、AMPC $\leq 0.12 \mu\text{g/ml}$ のそれぞれのMIC値を示した症例について、抗菌薬の投与条件と除菌率について検討し、Table 3およびTable 4に示した。Table右側には各条件毎の残存株数とその株に対する併用薬のAMPCまたはCAMのMICを付記した。

Table 3に示したCAMのMIC別でみた場合、除菌率は90.5~93.1%とMIC値による差はみられなかった。投与量別でも $\text{MIC} 0.12 \mu\text{g/ml}$ 、800mg投与群の少数例を除き、除菌率は85~100%を示し、投与量による差はみられなかった。さらに、これらを投与期間別に分類した例においても、一部の少数例を除き高い除菌率が得られ、7日と14日間の投与期間の間に差はみられなかった。すなわち、CAMの $\text{MIC} \leq 0.25 \mu\text{g/ml}$ の株は90%以上の除菌率が得られ、投与量、投与期間による差はないものと考えられた。

同様に、Table 4に示したAMPCのMIC値と除菌率については、 $\text{MIC} \leq 0.015 \mu\text{g/ml}$ では88.8%、

Table 3 *H. pylori* に対する clarithromycin の MIC および投与条件と除菌率

MIC ($\mu\text{g/ml}$)	例数 (除菌率%)	投与量別除菌率			投与期間別除菌率			残存例	
		投与量 (mg/日)	除菌例/対象例 (除菌率%)	(除菌率%)	投与期間 (日)	除菌例/対象例 (除菌率%)	(除菌率%)	株数	AMPC MIC ($\mu\text{g/ml}$)
≤ 0.015	41 (92.7)	400	18/18	(100)	7	2/2	(100)		
					14	16/16	(100)		
		600	17/20	(85.0)	7	4/6	(66.7)	2	$\leq 0.015, \leq 0.015$
				14	13/14	(92.9)	1	0.03	
		800	3/3	(100)	7	3/3	(100)		
0.03	55 (90.9)	400	22/24	(91.7)	7	2/2	(100)	2	$\leq 0.015, \leq 0.015$
					14	20/22	(90.9)		
		600	19/22	(86.4)	7	12/15	(80.0)	3	$0.03, \leq 0.015, \leq 0.015$
				14	7/7	(100)			
		800	9/9	(100)	7	9/9	(100)		
0.06	87 (93.1)	400	54/58	(93.1)	7	6/7	(85.7)	1	≤ 0.015
					14	48/51	(94.1)	3	$0.12, \leq 0.015, \leq 0.015$
		600	18/19	(94.7)	7	12/13	(92.3)	1	≤ 0.015
				14	6/6	(100)			
		800	9/10	(90.0)	7	9/10	(90.0)	1	≤ 0.015
0.12	75 (90.7)	400	43/49	(87.8)	7	3/5	(60.0)	2	$0.06, \leq 0.015$
					14	40/44	(90.9)	4	$\leq 0.015, \leq 0.015, 0.06, 0.06$
		600	21/21	(100)	7	12/12	(100)		
				14	9/9	(100)			
		800	4/5	(80.0)	7	4/5	(80.0)	1	≤ 0.015
0.25	21 (90.5)	400	11/13	(84.6)	7	2/2	(100)	2	$\leq 0.015, 0.03$
					14	9/11	(81.8)		
		600	5/5	(100)	7	3/3	(100)		
				14	2/2	(100)			
		800	3/3	(100)	7	3/3	(100)		

Table 4 *H. pylori* に対する amoxicillin の MIC および投与条件と除菌率

MIC ($\mu\text{g/ml}$)	例数 (除菌率%)	投与量別除菌率			投与期間別除菌率			残存例	
		投与量 (mg/日)	除菌例/対象例 (除菌率%)	(除菌率%)	投与期間 (日)	除菌例/対象例 (除菌率%)	(除菌率%)	株数	CAM MIC ($\mu\text{g/ml}$)
≤ 0.015	214 (88.8)	1000	13/21	(61.9)	7	12/14	(85.7)	2	0.06, 0.12
					14	1/7	(14.3)	6	64, 64, 64, 0.06, 16, 16
		1500	177/193	(91.7)	7	50/59	(84.7)	9	$0.03, 16, \leq 0.015, 0.06, 64,$ $0.03, \leq 0.015, 0.12, 0.06$
				14	127/134	(94.8)	7	$64, 0.12, 0.06, 0.12, 0.25,$ $0.03, 0.03,$	
0.03	51 (92.2)	1000	2/2	(100)	7	2/2	(100)		
		1500	45/49	(91.8)	7	18/19	(94.7)	1	0.03
				14	27/30	(90.0)	3	$\leq 0.015, 0.25, 4$	
0.06	21 (71.4)	1000	0/1	(0)	7	0/1	(0)	1	0.12
		1500	15/20	(75.0)	7	4/5	(80.0)	1	32
				14	11/15	(73.3)	4	64, 16, 0.12, 0.12	
0.12	12 (66.7)	1500	8/12	(66.7)	7	2/5	(40.0)	3	32, 32, 32
					14	6/7	(85.7)	1	0.06

0.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ は最も高く92.2%, 0.06 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では71.4%, 0.12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では66.7%であり、 $\text{MIC} \leq 0.03$ $\mu\text{g}/\text{ml}$ の株に対しほぼ90%以上の除菌率を示し、 ≥ 0.06 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の株は除菌率は低くなる傾向が認められた。しかし、AMPCの $\text{MIC} \geq 0.06$ $\mu\text{g}/\text{ml}$ の株のうち、残存した10株にはCAMの $\text{MIC} \geq 16$ $\mu\text{g}/\text{ml}$ の6株(60%)が存在しており、これにより除菌率が低くなったものと思われた。また、投与量、投与期間別では症例数にばらつきがあるが、除菌率に大きな差は認められないと考えられた。

6. 考察

以上の結果から、CAMの $\text{MIC} \leq 0.25$ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ではいずれも90%以上の除菌率が得られることから、このMIC値はブレイクポイントとしては感性(S)と考えられる。また、残存株に対するAMPCのMIC値と除菌率については特別な関連性が見いだせず、AMPCのMIC値からみた除菌率においては、CAMの抗菌活性が大きく影響しているものと思われた。一方、Table 2に示すとおり、CAMのMIC値が ≥ 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の株の多くが残存例、除菌率19%であることから、このMIC値はブレイクポイントとしては耐性(R)と考えられる。

今回の検討では、CAMのMIC値が1~2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を示す株が全く存在せず、これらの成績からはブレイクポイントの中間値(I)およびRを定めることは困難と考えられる。しかし、CAMの主な耐性機構である23SrRNAのpoint mutationは、CAMのMIC 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 付近で生じることが報告され^{5) 6)}、我々も同様な成績を確認している⁷⁾。従って、遺伝子変異との関連から考えると、CAMのブレイクポイントIは0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、Rは ≥ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と定めても問題はないと考えられる。

AMPCについては、併用薬であるCAMの抗菌作用が大きく影響するので、 $\text{MIC} \leq 0.03$ $\mu\text{g}/\text{ml}$ の株に対してはほぼ90%の除菌率が得られていることから、ブレイクポイントSを ≤ 0.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と定めるのが妥当であろうと考えられる。

なお、PPIの種類ならびに投与量による除菌率には有意差は認められなかった。

さらに、Table 5に、これらのブレイクポイントSをもとに、CAMとAMPCの併用による除菌率を

Table 5 clarithromycinおよびamoxicillinのブレイクポイントと併用による除菌率

ブレイクポイント (MIC: $\mu\text{g}/\text{ml}$)		除菌例数/対象例数	除菌率(%)
clarithromycin	amoxicillin		
S(≤ 0.25)	S(≤ 0.03)	232/251	92.4
S(≤ 0.25)	S以外	24/28	85.7
S以外	S(≤ 0.03)	5/14	35.7
S以外	S以外	1/9	11.1
計		262/302	

示した。CAM, AMPCともにブレイクポイントSの除菌率は92.4%、CAMのみSは85.7%、AMPCのみSは35.7%、両薬ともにSでないものは11.1%と十分に参考となる成績であった。しかし、両薬のS以外の例数が少ないため、今後さらに例数を増やし、再度集計し検討する必要があると思われる。

最後に、NCCLSは2000年1月に初めて*H. pylori* に対するCAMのブレイクポイントを定めガイドラインM100-S10に掲載した¹⁾。それによると、CAMのブレイクポイントはS; $\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$, I; $0.5 \mu\text{g/ml}$, R; $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ としており、今回我々がブレイクポイントとして提唱する値と一致する結果であった。

7. 断案

H. pylori 感染症の除菌治療において、*H. pylori* に対するclarithromycin (CAM) およびamoxicillin (AMPC)のブレイクポイントを以下のように提唱する。

CAM：ブレイクポイント	感性(S)	： $\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$
	中間(I)	： $0.5 \mu\text{g/ml}$
	耐性(R)	： $\geq 1 \mu\text{g/ml}$
AMPC：ブレイクポイント	感性(S)	： $\leq 0.03 \mu\text{g/ml}$

ただし、測定法によってMIC値が変動するので、厳密な条件下で測定したMIC値をブレイクポイントとする。

この条件でブレイクポイントを運用し、さらに見直しを行っていく。

文 献

- 1) National Committee for Clinical Laboratory Standards : Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically ; Approved standard, fifth edition. M7-A5, 2000.
- 2) 日本消化器病学会 *Helicobacter pylori* 治験検討委員会 : *Helicobacter pylori* 治験ガイドライン. 日本消化器病学会雑誌 96(2):199-207, 1999.
- 3) Versalovic J, Fox JG : *Helicobacter*. In Murray PR (ed.) : Manual of Clinical Microbiology, 7th ed. p.727-738, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1999.
- 4) National Committee for Clinical Laboratory Standards : Performance standards for antimicrobial susceptibility testing ; ninth informational supplement. M100-S9, 1999.
- 5) Versalovic J. et al. : Mutations in 23SrRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. Antimicrob. Agents Chemother. 40 : 477-480, 1996.
- 6) Stone, G.G. et al. : A PCR-oligonucleotide ligation assay to determine the prevalence of 23SrRNA gene mutations in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori*. Antimicrob. Agents Chemother. 41 : 712-714, 1997.
- 7) 小林寅詰、他 : *Helicobacter pylori* に対する clarithromycin の breakpoint と 23SrRNA の point mutation について. 第48回日本化学療法学会総会 講演. 岡山、2000.