

ヘリコバクター・ピロリのバイオフィルム機能に関する基礎的研究

米澤 英雄

杏林大学医学部感染症学

【背景と目的】

Helicobacter pylori は急性および慢性胃炎を惹起するとともに、胃十二指腸潰瘍の再発因子および胃癌のリスクファクターとなる病原性細菌である。近年 *H. pylori* はヒト胃粘膜表層にバイオフィルムを形成して存在していることが報告されている。バイオフィルムとは個体表面に形成する微生物のフィルム状構造体であり、バイオフィルム形成菌体とこれら細菌が産生する多糖体や、放出された菌体表層タンパク、菌体外DNAなどからなる菌体外マトリックスで構成される。バイオフィルムを形成した細菌は、宿主防御機構からの回避や抗菌物質に対する抵抗性の上昇、またクオラムセンシングや環境応答メカニズムを利用した遺伝子発現の調整による形質の変換などの特徴を持つことが明らかとなっている。その一方で、*H. pylori* のバイオフィルム形成に関する研究においては、バイオフィルム細菌の持つ特徴である遺伝子発現や抗菌物質への抵抗性に関する研究はまだ何も報告されていない。そこで、本邦保険適応除菌療法で使用される抗菌薬であるクラリスロマイシン (CAM)、アモキシシリン (AMPC) およびメトロニダゾール (MNZ) の *H. pylori* に対する抗菌効果に、本菌バイオフィルム形成がどのような影響を与えるかについて検討を行った。

【方 法】

使用菌株

われわれは日本人胃・十二指腸潰瘍患者由来の TK1402 株は *in vitro* 実験系において非常に強いバイオフィルム形成能を所有することを明らかとしてきている。そこで本株のバイオフィルムを使用し、抗菌薬抵抗性への影響について検討を行った。

バイオフィルム形成が及ぼす抗菌薬抵抗性への影響

H. pylori TK1402 株のバイオフィルムは、12穴プレート中にカバーガラスを立て掛け、そこに7% Fetal Calf

Serum (FCS) 含有 Brucella 培地にて *H. pylori* を微好気、振盪下、37°C にて72時間培養することで、カバーガラス表層に形成させた。形成したバイオフィルムを抗菌薬含有の培地に移し、さらに24時間追加培養した後、バイオフィルムをクリスタルバイオレットにて染色、エタノールにて抽出した色素を A₅₉₅ にて測定し、これをバイオフィルム値とした。また追加培養したバイオフィルム細菌を PBS 中に機械的に剥がし、その生菌数を測定した。バイオフィルム細菌における Efflux pump 遺伝子発現の解析

H. pylori TK1402 株のバイオフィルムをと、同様の条件で培養した浮遊状細菌より Total RNA を抽出し、*H. pylori* Efflux pump 遺伝子である HP605, HP971, HP1327, HP1489 遺伝子特異的プライマーを用いて Real-time PCR にて特異的 mRNA の定量した。

バイオフィルム形成が及ぼす CAM 耐性化への影響

バイオフィルムの CAM 処理後、バイオフィルムを PBS 中に機械的に剥がし、抗生剤無添加培地にて回復させた。その後 CAM 添加培地に接種することで、CAM 耐性化の有無についての検討を行った。CAM 耐性化していないものに関しては、5回まで CAM による追加処理を行い、その都度耐性化の有無を確認した。

【結 果】

TK1402 株は CAM, AMPC および MNZ に対して感性であり、それぞれの最小発育阻止濃度 (MIC) は CAM 0.02µg/ml, AMPC 0.008µg/ml, MNZ 2µg/ml であった。TK1402 株のバイオフィルムを種々の濃度の CAM で処理した後のバイオフィルムの状態は、0.25µg/ml (12xMIC 濃度) までの CAM 濃度含有培地でバイオフィルムの増加が認められた (図1)。その一方で AMPC, MNZ 含有培地での処理は MIC 濃度処理においてバイオフィルムは減少した。これら抗菌薬で処理した後のバイオフィル

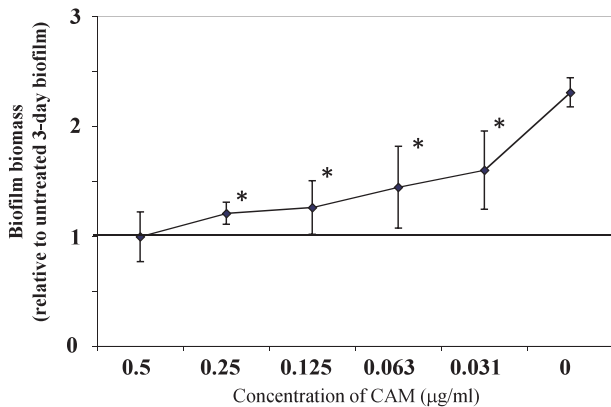


図1 CAM処理後のTK1402株バイオフィルムの状態をバイオフィルム試験にて測定。縦軸は元のバイオフィルムであるスタート時の値を1としたときの相対値で表している。横軸はCAMの濃度である。

ムの生菌数を検討すると、バイオフィルム中には、浮遊状よりも多くの生菌が残存していた。最少殺菌濃度(MBC)の比較は、CAMではバイオフィルム細菌1.0µg/mlに対して浮遊状細菌0.25µg/ml、AMPCでは64µg/mlに対して8µg/ml、MNZでは256µg/mlに対して128µg/mlと、全ての抗菌薬に対してバイオフィルムが高くなった。これら抵抗性上昇には、バイオフィルム細菌において本菌が持つ抗菌薬排出に関与するRND-family Efflux pumpsの発現が上昇していることが関与していた。最後にバイオフィルム形成が、CAM耐性菌出現にどのような影響を与えるかについて検討を行ったところ、バイオフィルム状細菌を1/4 MBC濃度(0.25µg/ml)のCAMで5回まで処理すると、約80%のバイオフィルムにおいてCAM耐性菌が出現した(図2)。バイオフィルムを1/2 MBC(0.5µg/ml)や1/8 MBC(0.125µg/ml)濃度のCAMで処理した際には、耐性菌出現度は減少し、浮遊上細菌を1/2 MBC(0.125µg/ml)や1/8 MBC(0.063µg/ml)濃度のCAMで処理した際の耐性菌出現率とほぼ同等かやや高いという結果であった。

【考察】

今回得られた結果から、*H. pylori*が形成するバイオフィルムの役割として、抗菌薬抵抗性への関与、遺伝子発現の変化によるバイオフィルム細菌特有の形質表現系を示すことを明らかにすることができた。さらに本菌のCAM耐性菌出現にも、バイオフィルム形成が関与していることを明らかとした。近年本菌除菌治療の成功率が低下し、その除菌不成功の原因はCAM耐性*H. pylori*が存在するためであると報告されている。これまで*H. pylori*のCAM耐性獲得機序は、23S rRNA遺伝子の点変異であることが明らかとされている一方で、耐性を獲得する際の菌体側の因子の検討はこれまで報告されていない。本菌のバイオフィルム形成は、菌体側の抗菌薬耐性獲得機序の因子の一つとなることが明らかとなった。

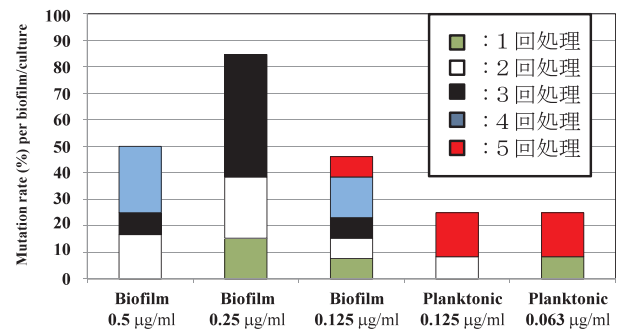


図2 CAMで処理したTK1402株バイオフィルム(Biofilm)または浮遊菌(Planktonic)のCAM耐性菌出現頻度の累積割合。バイオフィルムでの1/2から1/8 MBC濃度であるCAM 0.25mg/ml, 0.125mg/ml, 0.063mg/ml, Planktonicでの1/2および1/4 MBCであるCAM 0.125 mg/ml, 0.063mg/mlの濃度で処理後、耐性菌の出現を調べた。耐性菌出現が認められない際には、再度同条件にて処理し、耐性菌出現を確認した。最終的に5回まで処理を行い、その耐性菌出現の累積割合を縦軸に表している。

現在*H. pylori*に対する抗菌薬の効果については、浮遊状細菌に対する効果のみで判定されているが、その判定にバイオフィルム形成状態での効果を加える必要があることが今回の結果から示唆された。さらに感染している*H. pylori*のバイオフィルム形成能を検討することは、本菌抗菌薬耐性菌の出現を防ぐためにも重要なことであることが示唆された。

List of publications

1. Yonezawa H, Osaki T, Hanawa T, Kurata S, Ochiai K, Kamiya S. Impact of *Helicobacter pylori* Biofilm Formation on Clarithromycin Susceptibility and Generation of Resistance Mutations. PLoS One. 6; 8(9): e73301. 2013.
2. Osaki T, Okuda M, Ueda J, Konno M, Yonezawa H, Hojo F, Yagyu K, Lin Y, Fukuda Y, Kikuchi S, Kamiya S. Multi locus sequence typing for the analysis of intra-familial transmission of *Helicobacter pylori* by using faecal specimens. J Med Microbiol. 62 (Pt 5): 761-5. 2013.
3. Flahou B, Haesebrouck F, Smet A, Yonezawa H, Osaki T, Kamiya S. Gastric and Enterohepatic Non-*Helicobacter pylori* Helicobacters. Helicobacter. 18 Suppl 1: 66-72. 2013.
4. Zaman C, Osaki T, Hanawa T, Yonezawa H, Kurata S, Kamiya S. Analysis for microbial ecology between *Helicobacter pylori* and gastric microbiota of Mongolian gerbil. J Med Microbiol. 63 (Pt 1): 129-37. 2014.

講演記録

1. Yonezawa H, Osaki T, Hanawa T, Kurata S, Kamiya S: Effects of biofilm formation by *Helicobacter pylori* on antibiotics susceptibility. American Society for Microbiology 113th General Meeting. 2013年5月18日-21日. Colorado, USA.
2. 米澤英雄, Zaman Cynthia, 大崎敬子, 神谷茂: *Helicobacter pylori*持続感染を調節する胃内細菌叢の解析。第19回日本ヘリコバクター学会学術集会。2013年6月28-29日。長崎
3. 米澤英雄, 神谷茂: *Helicobacter pylori*のバイオフィルム。

- 日本細菌学会第7回若手研究者のためのワークショップ「若手研究者によるバイオフィーム研究」。2013年6月2日。東京
4. Yonezawa H, Osaki T, Kamiya S: Impact of biofilm formation by *Helicobacter pylori* on antibiotics susceptibility. Campylobacter, Helicobacter, and Related Organisms CHRO conference. 2013年9月15日-19日. Aberdeen, Scotland.
 5. 米澤英雄, 神谷茂:ヘリコバクター・ピロリのバイオフィーム形成が及ぼす抗菌薬抵抗性への影響。第42回杏林医学学会総会。2013年11月16日。東京
 6. 米澤英雄, 神谷茂: *Helicobacter pylori*のバイオフィーム形成。第47回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会。2014年1月31日-2月1日。東京
 7. 米澤英雄, 大崎敬子, 花輪智子, 蔵田訓, 神谷茂: CsrA could play a central role for the regulation of gene expression in *Helicobacter pylori* biofilm. 第87回日本細菌学会総会。2014年3月26日-28日。東京