

## Impact of *Helicobacter pylori* biofilm formation on clarithromycin susceptibility and generation of resistance mutations

米澤 英雄

杏林大学医学部感染症学教室

*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MALTリンパ腫や胃癌、特発性血小板減少性紫斑病などの疾患への関与が指摘されている。本菌は胃粘膜にバイオフィルムを形成し存在している。近年クラリスロマイシン（CAM）耐性*H. pylori*の増加による*H. pylori*除菌率の低下が危惧されている。バイオフィルムはその構造的背景より抗菌薬からの逃避という役割を担っていることから、今回われわれは*H. pylori*のバイオフィルム形成が及ぼすCAM抵抗性や、耐性菌出現への影響について検討を行った。

われわれはこれまで日本人胃・十二指腸潰瘍患者から分離したTK1402株が、*in vitro*実験系において高いバイオフィルム形成能を有していることを明らかとしている。そこで、本株を使用して本菌の*in vitro*におけるバイオフィルム形成が及ぼす抗菌薬抵抗性への影響について検討を行った。3日培養にて成熟したバイオフィルムをカバーガラス上に作成し、種々の濃度のクラリスロマイシンを含む培地へと移し、24時間抗菌薬処理を行った。処理後、カバーガラス上のバイオフィルムを物理的に剥がし、生存細菌数を培養にて確認した。対照として浮遊状細菌にて同様の処理を行った。全ての抗菌薬濃度処理において、浮遊状細菌よりもバイオフィルム状細菌で生存菌の数が増える結果となった。また最小殺菌濃度（MBC）の比較でもCAMでは浮遊状細菌0.25 $\mu$ g/mlに対してバイオフィルム状細菌では1.0 $\mu$ g/mlとバイオフィルム状細菌で高くなる結果となった。以上より*H. pylori*のバイオフィルム形成は、抗菌薬への抵抗性を亢進させることが明らかとなった。次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。バイオフィルム状細菌を1/4 MBC濃度（0.25 $\mu$ g/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。バイオフィルムを1/2 MBC（0.5 $\mu$ g/ml）や1/8 MBC（0.125 $\mu$ g/ml）濃度のCAMで処理した際には、耐性菌出現度は減少し、浮遊状細菌を1/2 MBC（0.125 $\mu$ g/ml）や1/8 MBC（0.063 $\mu$ g/ml）濃度のCAMで処理した際の耐性菌出現率よりやや高いという結果であった。CAM耐性化はこれまでの報告と同様に23S rRNAの点変異であった。そこでバイオフィルム状細菌におけるクラリスロマイシン抵抗性亢進のメカニズムを明らかとするために、*H. pylori*の抗菌薬耐性に関わるefflux pump遺伝子であるHP0605, HP0971, HP1327, HP1489のバイオフィルム状細菌の遺伝子発現について、浮遊状細菌との比較検討を行った。すべてのefflux pumps遺伝子において、バイオフィルム状細菌は浮遊状細菌と比較して約2~5倍発現量が上昇していることが明らかとなった。

以上の結果より、本菌のバイオフィルム形成は、CAMに対する抵抗性を亢進させ、耐性菌出現頻度も上昇することが明らかとなった。これまで*H. pylori*の薬剤耐性機序は明らかとなってきたものの、抗菌薬耐性を獲得する際の、環境因子や菌体側の因子の検討はされていない。今回、*in vitro*において本菌はバイオフィルムを形成することで、抗菌薬への抵抗性を亢進し、耐性菌出現頻度も上昇することが明らかとなった。これらの結果から本菌の抗菌薬耐性化への新たなメカニズムが解明され、新規阻害剤および治療薬が開発されることが期待される。