

論文要約

題名 *Helicobacter pylori* 感染症に対するボノプラザンを用いた 2 剤療法と 3 剤療法の腸内細菌叢への影響

内科系消化器内科学専攻
堀井 敏喜

1. 研究の目的

Helicobacter pylori に対する様々な除菌治療による腸内細菌叢への影響が報告されているが、ボノプラザンとアモキシシリンを用いた 2 剤治療による腸内細菌叢への影響に関する報告はない。2 剤治療の腸内細菌叢への影響を第一選択であるアモキシシリン、クラリスロマイシン、ボノプラザンを用いた 3 剤治療の腸内細菌叢への影響と比較することを本研究の目的とした。

2. 研究方法

2.1. 研究デザインと対象者

本研究は、*Helicobacter pylori* 一次除菌におけるボノプラザンとアモキシシリンの 2 剤治療の有効性と安全性を検証する多施設共同無作為化比較試験(UMIN00003414)の副次解析であった。本研究は JA 秋田厚生連由利組合総合病院の倫理委員会で承認され(承認番号 2018-14)、2018 年 3 月から同年 5 月に行われた。被検者は上部消化管症状または健診目的で上部消化管内視鏡検査を受け、培養法で *Helicobacter pylori* が検出された 20 歳から 79 歳の者とした。除外基準は試験薬へのアレルギーがある者、胃に対する手術歴のある者、制酸剤、抗菌薬、ステロイドを常用しており休薬できない者、妊娠中及び授乳中の者であった。

3 剤治療はボノプラザン 20mg、アモキシシリン 750mg、クラリスロマイシン 200mg を 1 日 2 回、7 日間の投与とした。2 剤治療はボノプラザン 20mg、アモキシシリン 750mg を 1 日 2 回、7 日間の投与とした。主試験の参加に同意した者がそれぞれの治療法群に無作為割付され除菌治療を受けた。

2.2. 便検体の採取方法

便検体は、被検者が自宅で専用ブラシを用いて、除菌治療前、除菌終了から 1 週後、除菌終了から 8 週後の 3 点で採取した。検体保存液は 100mM Tris-HCL(pH 9.0)、40nM エチレンジンアミン 4 酢酸、4M グアニジンチオシアン酸塩、0.001%プロモチモールで構成されていた。採取された便検体はテクノスルガ・ラボへ郵送され、次世代シーケンサーによる腸内細菌分析が行われた。

2.3. DNA 抽出と菌種同定

各サンプル 100mg を 100mM Tris-HCL(pH 9.0)、40nM エチレンジンアミン 4 酢酸に懸濁し FastPrep FP100A instrument でジルコニアビーズを用いて均一化し、PI-480 と NR-201 で DNA の抽出を行った。その後、ND8000 を用いて DNA 濃度を測定した。DNA 抽出後に、16SrRNA 遺伝子の V3-V4 領域をターゲットとして 341f-R806 をプライマーに用いて PCR 増幅をした。PCR 条件は 98°C で 2 分間初期変性を行い、98°C で 10 秒の変性、60°C で 15 秒のアニーリング、68°C で 30 秒の伸長を 1 サイクルとして 30 サイクル行った。高橋らの方法を用いて、ライブラリーを調整した。MiSeq と MiSeq reagent kit v.3.0 を用いてシーケンシングした。ペアエンドシーケンス後にペアエンドマージを行い、低クオリティリードとキメラ配列の除去は Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2 ver 2017.6.0 を用いた。データベースには Greengenes database ver13.8 を用いて 99%以上の相同性を示す配列に対して細菌属を分類した。

2.4. データ解析と統計解析

腸内細菌叢分析は微生物群集解析用プログラムである QIIME2 を使用した。腸内細菌叢の多様性の評価として α 多様性は Chao 1 index と Shannon index を用いて、Kruskal-Wallis 検定を行った。 β 多様性の評価は weighed UniFrac distance と unweighted UniFrac distance に基づき ANOSIM 解析を行い、主座標分析を用いて表現した。また、菌種の占有率、カテゴリー変数は EZR を用いて解析を行った。本研究では p-value < 0.05 を有意差と定義した。

3. 結果

3.1. 患者背景

研究期間に 59 名が主試験に登録され、そのうち本研究へは 43 名(3 剤治療 24 名、2 剤治療 19 名)が参加した。両群の患者背景、除菌成功率、合併症発生率に有意差は認めなかった。

3.2. 多様性指数の評価

両群の治療前の α 多様性指数に有意差は認めなかった。3 剤治療では、治療 1 週間において治療前値と比較して有意に α 多様性指数の低下が認められ(Chao1 index, $p < 0.01$; mean \pm SD, 116.4 ± 31.6 vs 92.8 ± 32.2 ; Shannon index, $p = 0.01$; mean \pm SD, 5.5 ± 0.5 vs 5.1 ± 0.6)、治療 8 週間においても治療前値と比較して Shannon index は有意に低下したままであった (Chao1 index, $p = 0.06$; mean \pm SD, 116.4 ± 31.6 vs 103.3 ± 31.7 ; Shannon index, $p = 0.02$; mean \pm SD, 5.5 ± 0.5 vs 5.2 ± 0.5)。一方で、2 剤治療では、 α 多様性指数は治療前値と比較して治療 1 週間後に有意な変化はなく(Chao1 index, $p = 0.92$; mean \pm SD, 111.4 ± 34.7 vs 108.9 ± 108.9 ; Shannon index, $p = 0.27$; mean \pm SD, 5.5 ± 0.6 vs 5.2 ± 0.7)、同様に治療 8 週間にも有意な変化はなかった(Chao1 index, $p = 0.97$; mean \pm SD, 111.4 ± 34.7 vs 116.4 ± 45.3 ; Shannon index, $p = 0.29$; mean \pm

SD, 5.5 ± 0.6 vs 5.3 ± 0.6).

両群の治療前での UniFrac distance 解析に有意差は認めなかった。3 剤治療では、UniFrac distance は治療 1 週後に治療前と比較して有意に変化し(weighted: $p = 0.01$, unweighted: $p < 0.01$)、weighted UniFrac distance 解析では治療 8 週後まで変化したままであった($p = 0.03$)。一方で、2 剤治療では、UniFrac distance は治療 1 週間後ならび 8 週間後にも有意に変化しなかった (weighted :治療前 vs 1 週間後, $p = 0.18$; 治療前 vs 8 週間後, $p = 0.90$ unweighted: 治療前 vs 1 週間後, $p = 0.80$; 治療前 vs 8 週間後, $p = 0.89$)。

3.3. 菌種の同定と占有率の変化

3 剤治療では治療 1 週後に Actinobacteria 門が有意に減少した(7.3% vs 3.0% ; $p < 0.01$)。また、治療 8 週間後においても Actinobacteria 門は減少したままであった (7.3% vs 4.3% ; $p = 0.04$)。一方で、2 剤治療では、治療 1 週間後において Firmicutes 門と Bacteroidetes 門が有意に減少したが(Firmicutes; 60% vs 51% ; $p = 0.02$, Bacteroidetes; 28% vs 37% ; $p = 0.04$)、治療 8 週間後にはどちらも治療前値レベルに回復した(Firmicutes; 60% vs 54% ; $p = 0.18$, Bacteroidetes; 28% vs 31% ; $p = 0.44$)。

3 剤治療では *Collinsella* 属、*Streptococcus* 属、*Blautia* 属が治療前後で有意に変化した。*Collinsella* 属は治療 1 週後に有意に減少し(1.7% vs 0.4% ; $p < 0.01$)、治療 8 週間後にも治療前値レベルに回復しなかった(1.7% vs 1.0% ; $p = 0.03$)。*Streptococcus* 属は治療 8 週間後に治療前値と比較して有意に減少した(8.1% vs 2.9% ; $p < 0.01$)。*Blautia* 属は治療 1 週後に有意に増加し(5.7% vs 9.8% ; $p < 0.01$)、治療 8 週間後にも増加したままであった (5.7% vs 9.5% ; $p < 0.01$)。一方で、2 剤治療では *Lachnospira* 属だけが治療 8 週間後に有意に減少した(1.5% vs 0.6% ; $p = 0.04$)。

4. 考察

本研究はポノプラザンとアモキシシリンによる 2 剤治療とさらにクラリスロマイシンを加えた 3 剤治療の腸内細菌叢への影響を比較検討したものである。本研究では 3 剤治療では治療前と比較して 1 週間後、8 週間後の腸内細菌叢の α 多様性指数が有意に低下した。一方で 2 剤治療では α 多様性指数は治療後にも低下しなかった。同様に 3 剤治療では β 多様性と菌種の占有率も治療 1 週間後に有意に変化し、その変化は治療 8 週間後まで続いた。

ポノプラザンを用いた 3 剤治療は、従来の PPI を用いたレジメンよりも除菌成功率が高いために本邦では一次治療の第一選択になっている。PPI を用いた 3 剤治療は一時的な腸内細菌叢の α 多様性指数の低下を起すすが、治療 8 週間後では α 多様性指数は治療前値レベルに回復することが知られている。ポノプラザンは PPI に比して制酸作用が強いためポノプラザンを用いた 3 剤治療はより腸内細菌叢への影響が大きいと考えられる。ポノプラザンを用いた 3 剤治療を受けた中学生の腸内細菌叢を調査した報告では、 α 多様性指数は治療 1 週間後に有意に低下したものの治療 8 週間後で治療前値レベルに回復した。しかしながら、一

部の症例では治療 8 週間後の腸内細菌叢の占有率が治療前の状態と比較して大きく変化したままであったことも報告されている。今回の我々の研究では、ボノプラザンを用いた 3 剤治療から 8 週間後も α 多様性と β 多様性ともに治療前から有意に変化していることから、3 剤治療の腸内細菌叢への影響は少なくとも 8 週間は遷延することが示唆された。

抗菌薬ごとに腸内細菌叢へ及ぼす影響は異なる。アモキシシリンは、Firmicutes 門を減少させるものの、 α 多様性指数への影響は軽微であるとも報告されている。本研究では 2 剤治療後の α 多様性の変化は少なく、Firmicutes 門の減少は一時的であった。一方で、クラリスロマイシンは Actinobacteria 門を減少させ、その腸内細菌叢への影響はペニシリン系抗菌薬に比して長期にわたると報告されている。これらの知見は、本研究において 3 剤治療後の多様性指数の変化が遷延した要因がクラリスロマイシンであることを支持するものである。

Helicobacter pylori の除菌治療を行った後に代謝パラメータが変化する報告がある。Liou らは除菌治療レジメンの違いによって除菌 1 年後の BMI、中性脂肪値、HDL コレステロール値の変化が異なることを報告し、除菌の成否にそれらの数値の変化が依存しなかったことから腸内細菌叢の変化が代謝パラメータの変化の原因であると考察している。本研究でも 2 つの除菌治療後には異なる腸内細菌叢の変化を示した。本研究において 3 剤治療後に有意な増加を認めた *Blautia* 属は、内臓脂肪面積と関連していると報告されている。3 剤治療後に有意に減少した *Streptococcus* 属は総コレステロール値と、2 剤治療後に有意に減少した *Lachospira* 属は中性脂肪値と関連が報告されている。本研究は治療 8 週間までの腸内細菌叢の変化のみを検討しており、体重や代謝パラメータは検討できていない。今後は長期的な腸内細菌叢の変化と代謝パラメータの変化との関連について検討する必要がある。

本研究にはいくつかの limitation がある。まず、主試験の副次解析であるため、2 つの治療法間で被検者数が異なったこと。また、単施設で行われた小数例の研究であること。本研究結果を確かなものにするためには多施設共同の大規模試験を行う必要がある。そして各治療法の腸内細菌叢への長期的な影響も調査する必要がある。

ボノプラザンとアモキシシリンによる 2 剤治療は、クラリスロマイシンを加えた 3 剤治療と比較して腸内細菌叢への影響が少ない治療であった。