

## 人獣由来 *Helicobacter cinaedi* の分子疫学解析と臨床への応用

Molecular epidemiology and clinical application of *Helicobacter cinaedi* strains isolated from humans and animals.

宮崎大学農学部獣医学科 三澤 尚明

Naoaki Misawa, Department of Veterinary medicine, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki

キーワード: *Helicobacter cinaedi*, 同定, MALDI-MS, 病原因子, 感染モデル

keywords: *Helicobacter cinaedi*, identification, MALDI-MS, Pathogenic factors, infection model

### 1. 人獣由来 *H. cinaedi* の同定と新しい疫学ツールの開発

#### 1-1. 背景

*Helicobacter cinaedi* は、腸肝 *Helicobacter* に属するグラム陰性らせん菌で、2003年に国内初の菌血症患者が報告されてから<sup>1)</sup>、以後同様の症例報告数が増加している新興感染症菌である。本菌はハムスターなどのげっ歯類、イヌ、ネコなどの肝臓や腸管内からも分離されており、人獣共通感染症の原因菌と考えられるが、本菌の分離には煩雑な作業を要すること、有用な疫学ツールが存在しないこと等の理由から、その病原性、感染経路等についてはほとんど明らかになっていないのが現状である。当研究室では、2002年に国内で初めて血便を呈するイヌからシネジ菌を分離しており<sup>2)</sup>、その後も健康なイヌ、ネコ、ハムスターから十数株のシネジ菌の分離培養に成功している。シネジ菌は、発育速度が遅いことに加え、鑑別に用いる生化学的性状が乏しく、さらに16S rRNA遺伝子の塩基配列の比較解析において、“*Helicobacter rappini*”、*Helicobacter bilis* と98%以上の相同性を持つため、菌種の鑑別が非常に難しく、全菌体蛋白のプロファイリングシステムを用いた鑑別を行わなければならなかった。

最近、菌体の主要な構成タンパク質であるリボソームタンパク質群を、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法(matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry: MALDI-MS)により測定し、得られたマススペ

クトルのパターンを比較することによって微生物を同定する手法が提案されている<sup>3)</sup>。この手法は、分離菌の生化学的性状検査や16S rRNA遺伝子塩基配列を用いた従来法に比べ、迅速簡便かつ低コストで行うことが可能である。菌が分離されていればスペクトルに基づく同定までに数分しか要さず、さらに、平板培地に形成された単一コロニー程度の菌体量があれば解析可能で、微生物の生育条件(培地、時間等)によって判定結果が影響されにくいという利点もある。現在細菌、真菌、酵母など3000種以上のライブラリがあるが、独自に菌株のライブラリを作成して、同定・系統解析を行うこともできる。

#### 1-2. 目的

MALDI-MSを用いて、マススペクトルパターン解析の結果に基づいた*H. cinaedi*の同定、新たな分子疫学ツールを開発することを目的とした。

Source	Number
Human blood	21
Human feces	4
Dog feces	30
Cat feces	1
Hamster feces	12

表1. *Helicobacter cinaedi* の由来

#### 1-3. 材料と方法

寒天培地で培養した *Helicobacter* 属菌の *H.*

*cinaedi*, *H. bilis*, '*H. rappini*', *H. canis*, *H. mustelae*, *H. fennelliaes*, *H. pylori* について、70%ギ酸とアセトニトリルで抽出した蛋白質のマススペクトルを MALDI-MS (Bruker Daltonics) にて測定した。得られたマススペクトルは、MALDI Biotyper 2.0 software を用いて解析し、種によるパターンの違いを比較した。さらにヒトの血液、糞便およびイヌ、ネコ、ハムスターの糞便から分離した 68 株の *H. cinaedi* について (表 1)、マススペクトルパターンに基づいた系統解析を行った。さらに同じサンプルについて Heat shock protein 60 (*hsp60*) 約 450bp の塩基配列を決定し、配列に基づく系統解析を行った。

#### 1.4. 結果および考察

*H. cinaedi*, *H. bilis*, '*H. rappini*' は、16S rRNA 遺伝子塩基配列において、98%以上の相同性を示し、さらに生化学的性状が乏しいため、これらを識別するのが困難であった。しかしながら、*H. cinaedi* のマススペクトルパターンは他 2 菌種と明らかに異なっており、これにより *H. cinaedi* を迅速かつ簡便に同定することが可能になった (図 1)。またその他の *Helicobacter* 属菌ともパターンが異なることが確認できた。ヒト、イヌ、ネコ、ハムスターから分離した由来の異なる *H. cinaedi* 68 株のマススペクトルパターンに基づく系統解析では、イヌ 2 株を除いてヒト由来株と動物由来株で異なるクラスターを形成した (図 2)。さらに *hsp60* 塩基配列に基づく系統解析でも同様の結果を示した。このことから愛玩動物由来株はヒト由来株とは異なるポピュレーションであること、さらにこの MALDI-MS を用いた手法は有用な疫学ツールとなりうることが示唆された。

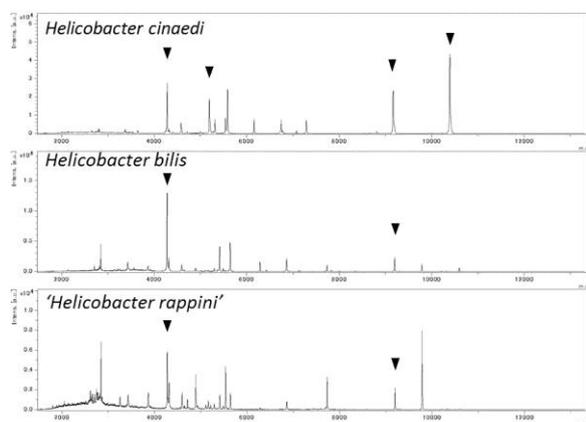


図 1. *H. cinaedi*, *H. bilis*, '*H. rappini*' のマススペクトルパターンの比較

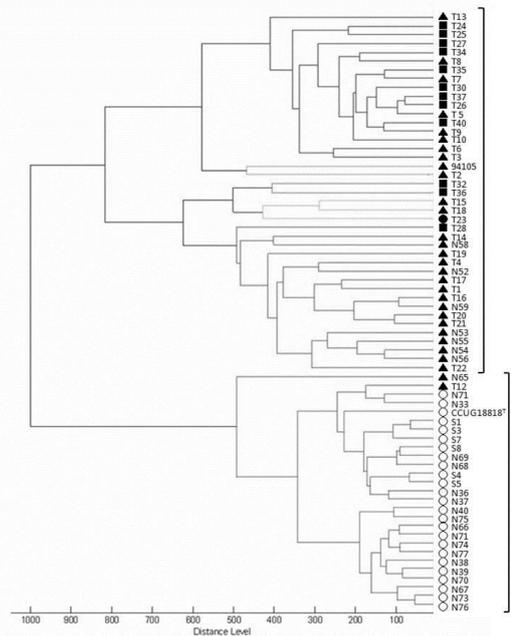


図 2. マススペクトルパターンに基づくクラスター解析

○:ヒト由来株, ▲:イヌ由来株, ●:ネコ由来株, ■:ハムスター由来株

## 2. 人獣由来 *H. cinaedi* のヒト株化上皮細胞に対する付着および侵入・貫通能の解析

### 2-1. 背景

*Helicobacter cinaedi* は、1984 年米国でヒトへの感染が初めて確認され<sup>4)</sup>、日本国内では 2003 年に最初の菌血症患者が報告されている<sup>1)</sup>。以後同様の症例報告が増加しており、菌血症のほか、蜂巣織炎、関節炎、髄膜炎などを併発することもある<sup>1)</sup>。宮崎大学医学部附属病院の入院患者の血液培養からも、本菌が相次いで分離されており、院内感染も疑われているが、本菌の分離には煩雑な作業を要すること、本菌に関する情報が少ないこと、有用な疫学ツールが存在しないこと、などの理由から、院内感染か否かの確定や具体的な対策の立案も困難な状況にある。当初は、HIV 感染患者や基礎疾患を有する免疫不全患者に感染すると考えられていたが、明らかな免疫異常を示さない患者、さらには上述のように院内感染が疑われるケースも報告されている<sup>5)</sup>。さらに、発症した場合、抗生物質

投与による治療が効果的であるが、治療後に再発するケースも多く、有効な治療法が確立していないのが現状である。

## 2-2. 目的

*H. cinaedi* による菌血症発症機序としては、*H. cinaedi* が腸管上皮細胞に付着した後、細胞内または細胞間を貫通して血中に侵入するルートを取ることが予想される。そこで本研究では、ヒト及び動物由来 *H. cinaedi* のヒト株化腸管上皮細胞に対する付着および侵入・貫通能を調べた。

## 2-3. 材料および方法

ヒトの血液、イヌ、ネコ、ハムスターの糞便から分離した *H. cinaedi* をヒト腸上皮株化細胞 (INT407) およびヒト結腸癌由来上皮細胞 (CaCo-2) に接種し、付着・侵入した菌数を計測した。さらに菌の貫通経路を調べるため、菌接種後の培養細胞の経上皮抵抗 (TEER) 値を Millicell Electrical Resistance System (Millipore) により測定した。また細胞内における菌の分布を観察するため、培養細胞に菌を接種した共焦点レーザー顕微鏡およびリアルタイム 3D 解析ソフトを用いた三次元画像により解析した。*H. cinaedi* は抗シネジ菌ポリクローナル抗体で処理後、FITC 標識抗ウザキヤギ IgG 抗体で菌体抗原を検出した。培養細胞は細胞骨格を Rhodamine phalloidine で染色した。

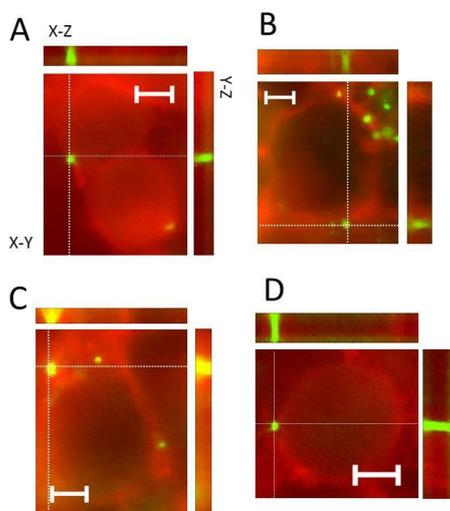


図 3. *H. cinaedi* を接種した INT407 細胞の共焦点画像

A:ヒト由来株, B:イヌ由来株, C:ネコ由来株, D:ハムスター由来株, スケール=5  $\mu$  m

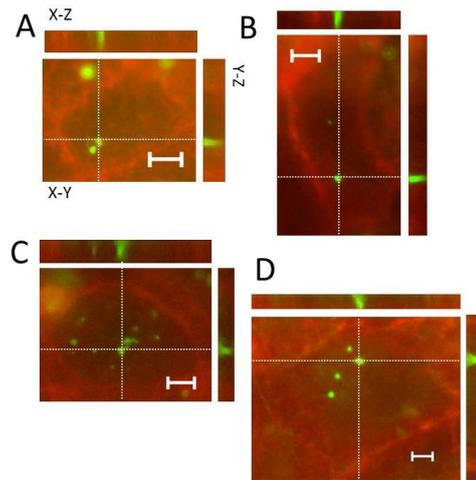


図 4. *H. cinaedi* を接種した CaCo-2 細胞の共焦点画像

A:ヒト由来株, B:イヌ由来株, C:ネコ由来株, D:ハムスター由来株, スケール=5  $\mu$  m

## 2-4. 結果および考察

*H. cinaedi* は由来に関わらず INT407 および CaCo-2 細胞に対して付着・侵入能を有していた。TEER 値は、INT407 細胞に菌を接種した場合に低下し、CaCo-2 細胞では変化がみられなかった。TEER は、細胞層のバリア機能と強い相関関係を示し、細胞間の接着が強い細胞層では高い値を示し、逆に細胞層が破壊されると値は低下する。即ち、INT407 細胞では、*H. cinaedi* の侵入によって細胞層が破壊されたことが予想された。さらに、菌を接種した際の画像解析の結果より、INT407 細胞では *H. cinaedi* が細胞間に付着・侵入していることから、タイトジャンクションの破壊を伴って貫通することが示唆された (図 3)。また CaCo-2 細胞では、細胞への *H. cinaedi* の付着・侵入が観察されたが、INT407 とは異なり細胞質内を移動する経路で貫通することが示唆された (図 4)。

## 3. マウスを用いた *Helicobacter cinaedi* 感染モデルの作出

### 3-1. 背景

*H. cinaedi* による菌血症あるいは蜂巣炎が発症した場合、有効な抗生物質が特定されていないため、多種類の抗生物質を長期間に渡って服用する傾向がみられる<sup>6)</sup>。また治療後に再発するケースも多く、有効な治療法が確立していないのが現状である。

### 3-2. 目的

シネジ菌を実験動物に接種して感染モデルの作出を試み、シネジ菌による感染・発症機序の解明や有効な治療法を確立させることを目的とした。

### 3-3. 材料および方法

6週齢のBALB/cマウスに、ヒト由来の*H. cinaedi*を経口接種した。経口接種は、エーテル麻酔下で、マウス用ゾンデを胃まで挿入し、約200u lのシネジ菌懸濁液を投与した。接種5日前から接種後60日まで約1～2週間おきにマウスの糞便を回収し、糞便中の*H. cinaedi*の菌数を寒天平板希釈法およびリアルタイムPCR法により計測した。接種6週間後にペントバルビタールナトリウムの過剰接種により安楽殺を行い、血液および組織（胃、腸、盲腸、肝臓等）を採取し、細菌学的、病理組織学および分子生物学的検査を実施した。

### 3-4. 結果および考察

*H. cinaedi*接種後6週間の間、継続して糞便中から*H. cinaedi*が検出されたため、*H. cinaedi*は腸管に定着したことが予想された。また剖検後の心臓、肺、腎臓、筋肉、大腸、盲腸から抽出したDNAにおいて、シネジ菌を特異的に検出するPCR法で陽性を示したことから、シネジ菌はマウス体内の広い範囲に分布していることが確認された。よって今回作出したマウス感染モデルを用いることにより、発症機序の解明や有効な治療法確立のための抗生物質投与試験等に応用可能であることが示唆された。

desorption ionization-time of flight mass spectrometer to BD Phoenix automated microbiology system for identification of gram-negative bacilli. J Clin Microbiol. 49:887-92.

- 4) Quinn TC, Goodell SE, Fennell C, Wang SP, Schuffler MD, Holmes KK, Stamm WE. 1984. Infections with *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter*-like organisms in homosexual men. Ann Intern Med. 101:187-92.
- 5) Matsumoto T, Goto M, Murakami H, Tanaka T, Nishiyama H, Ono E, Okada C, Sawabe E, Yagoshi M, Yoneyama A, Okuzumi K, Tateda K, Misawa N, Yamaguchi K. 2007. Multicenter study to evaluate bloodstream infection by *Helicobacter cinaedi* in Japan. J. Clin. Microbiol. 45:2853-2857.
- 6) Kikuchi H, Asako K, Tansho S, Ueda T, Koshio O, Ubagai T, Asahara M, Kawakami S, Ono Y. 2012. Recurrent *Helicobacter cinaedi* cellulitis and bacteremia in a patient with systemic lupus erythematosus. Intern Med. 51:3185-8.

### 引用及び参考文献

- 1) Murakami H, Goto M, Ono E, Sawabe E, Iwata M, Okuzumi K, Yamaguchi K, Takahashi T. 2003. Isolation of *Helicobacter cinaedi* from blood of an immunocompromised patient in Japan. J Infect Chemother. 9:344-7.
- 2) Misawa N, Kawashima K, Kondo F, Kushima E, Kushima K, Vandamme P. 2002. Isolation and characterization of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Anaerobiospirillum* strains from a puppy with bloody diarrhea. Vet. Microbiol. 87:353-364.
- 3) Saffert RT, Cunningham SA, Ihde SM, Jobe KE, Mandrekar J, Patel R. 2011. Comparison of Bruker Biotyper matrix-assisted laser