

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08081

研究課題名(和文) 人獣由来Helicobacter cinaedi感染・発症におけるT6SSの役割

研究課題名(英文) The role of T6SS in infection and pathogenesis of Helicobacter cinaedi isolated from human and animals.

研究代表者

谷口 喬子(岩田喬子)(Taniguchi, Takako)

宮崎大学・産業動物防疫リサーチセンター・助教

研究者番号：50500097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：Helicobacter cinaediの型分泌装置(T6SS)の役割を明らかにするため、T6SS関連遺伝子であるTssGの欠損株を作製し、野生株との病原性を比較した。さらに、H. cinaedi感染マウスへの薬剤経口投与試験により、ABPCとMINOの併用投与およびIPM/CS単独投与はH. cinaediの排除に効果があることが示唆されたが、その投与方法については今後さらに検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

H. cinaediによるヒト菌血症や軟部組織の炎症などは、抗菌薬の投与により寛解するが、30～60%の患者で再燃するという報告もあり、有効な治療法は確立していない。病原因子の分泌装置としての機構である型分泌装置(T6SS)の関連遺伝子(TssG)は、病原性への関与が低いことが示唆されたが、H. cinaedi感染マウスを用いた抗生物質投与試験において、今後の有効な治療法に繋がる新たな知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter cinaedi causes bacteremia and inflammation of subcutaneous tissue in humans. To clarify the role of the type VI secretion system (T6SS) in H. cinaedi, the pathogenicity of a mutant strain harboring a deletion in a T6SS-related gene, TssG, was compared for pathogenicity with that of a wild-type strain. In addition, mice infected with H. cinaedi were administered some antimicrobials orally to establish a useful treatment method. Although the suggested that suggested that combined administration of ABPC and MINO or administration of IPM/CS alone would be effective for eliminating H. cinaedi, further studies to establish an ideal administration method will be required.

研究分野：細菌学

キーワード：Helicobacter cinaedi 型分泌装置 TssG遺伝子 動物感染実験

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腸・肝ヘリコバクターに属する *Helicobacter cinaedi* は、ヒト・イヌ・ネコ・ハムスターなど多くの動物の肝臓や腸管内から分離されている。1984年米国でヒトへの感染が初めて確認され、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。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。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、さらには院内感染が疑われるケースも報告されている。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30~60%の割合で再燃するとの報告もあり、明確な治療法が確立していないのが現状である。2016年には宮崎大学附属病院において、子宮内感染によって *H. cinaedi* に感染した22週の男児の死亡という、*H. cinaedi* 感染による初めての死亡報告があり、その治療法の確立は喫緊の課題である。

### 2. 研究の目的

我々は、*H. cinaedi* のヒト由来株と動物由来株計47株について、次世代シーケンシング(MiSeq)解析を行い、高精度ドラフト配列を取得し、全ゲノムについて比較した。その結果、興味深いことに、ヒト由来株全てがⅠ型分泌装置(T6SS)の関連遺伝子を保有していることが明らかになった。グラム陰性菌にはⅠ型からⅣ型までの分泌機構が存在しており、菌種によって分布が異なる。病原因子を標的宿主細胞へ直接注入するためのタンパク質分泌装置としての機構であり、病原細菌が宿主において病原性を発揮する上で非常に重要である。*H. cinaedi* のこのT6SSの役割を明らかにすることは、*H. cinaedi* の病原性や発症機序を解明する上で非常に重要である。本研究では、*H. cinaedi* のT6SSをターゲットとしてヒト由来株の病原性や発症機序の解析を行う。さらに動物感染モデルを用いて、発症機序の解明や有用な診断・治療法を確立させることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) T6SS欠損株の作製

*H. cinaedi* の全ゲノムシーケンシングからT6SSに関連していると考えられるCDSは13個存在し、そのCDSは3つに分かれて位置している。これらのCDSの中から、TssG(baseplate)遺伝子を選択し、この欠損株を作製した。

#### (2) T6SS欠損株の病原性解析

ヒト結腸癌由来上皮細胞(CaCo-2)に対する付着・侵入能を調べ、野生株と比較した。付着試験は、CaCo-2細胞に接種後、付着した *H. cinaedi* を希釈培養法により計測することによって行う。侵入試験は、付着した *H. cinaedi* をゲンタマイシン処理し、細胞侵入した菌のみを計測する。さらに *H. cinaedi* 培養溶液の溶血性試験を行い、溶血性の有無を比較した。

#### (3) T6SS欠損株のマウス感染試験

T6SS欠損株をマウスに投与し、その腸管定着性について観察した。*H. cinaedi* の経口投与後は、経時的に糞便中の *H. cinaedi* を培養法により計測した。*H. cinaedi* 投与後8週間でマウスを安楽殺後、マウスの組織(脾臓、肝臓、肺、心臓、腎臓、小腸、大腸、盲腸、膀胱、筋肉)を採取し、細菌学的、病理組織学的および分子生物学的検査を行い、菌の分布や病理像を観察した。

#### (4) *H. cinaedi* ヒト由来株の薬剤感受性試験

供試株として、ヒト菌血症由来株29株を用い、基準株として *H. cinaedi* CCUG18818株を使用した。供試薬剤は、ペニシリン系、セファロsporin系、カルベニシリン系、アミノグリコシド系、テトラサイクリン系、マクロライド系、ニューキノロン系、メトロニダゾールの計8種で、最小発育阻止濃度(MIC)を寒天平板希釈法により測定した。

#### (5) *H. cinaedi* 感染マウスを用いた抗生物質投与試験

有効な治療法確立のため、すでに作出済みの感染モデルを用いて、抗生物質投与試験を行った。供試薬剤は、アンピリシン(ABPC)、イミペネム・シラスタチン合剤(IPM/CS)、ミノサイクリン(MINO)の3剤で、マウスを各薬剤の単剤投与群とABPCとMINOの併用投与群の4群に分けた。糞便中の菌数を測定し、腸管定着確認後、ABPCとMINOを各100mg/kg、IPM/CSは60mg/kgの用量で、1日1回ゾンデによる経口投与を5日間行い、糞便中の菌数を測定した。糞便から菌が検出されなくなった群は抗菌薬投与20日後に安楽殺し、盲腸内容物、血液、筋肉および主要臓器の菌数を培養法により測定した。

### 4. 研究成果

CaCo-2細胞の付着・侵入試験及び溶血試験において、TssG欠損株と野生株の差は検出されず、TssGの細胞付着・侵入や溶血性へ与える影響は低いことが示唆された。さらにTssG欠損株と野生株をマウスに経口投与し、糞便中の菌数を計測することにより、その腸管内定着性を比較した。投与後4週で野生株は糞便中から約 $10^6$ cfu/g、TssG欠損株約 $10^3$ cfu/g程度検出され、この菌数は投与後10週まで継続した。共に菌血症等の発症はなかった。

ヒト菌血症由来株29株のMICを測定した結果、IPM/CSおよびMINOに対するMICが最も低かった。一方、マクロライド系およびニューキノロン系のMIC90はブレイクポイントより

高く、他の報告同様に耐性菌の出現が認められ第一選択薬として使用する際には注意が必要であると思われた。*H. cinaedi*のマウス腸管定着後に、各抗菌薬を投与した結果、ABPCとMINOの併用投与群およびIPM/CS単独投与群では薬剤投与後いずれの検体からも接種菌は検出されなかった。一方、ABPCやMINOの単剤投与群では投与前と同等の菌数が回収された。今回、ABPCとMINO併用投与や経口薬ではないIPM/CSの単剤経口投与およびMINOの単剤投与で*H. cinaedi*の排除効果が認められた。ヒトの臨床では消化管内の病原細菌の増殖を抑える目的で、非吸収性の抗菌薬が経口投与されており、今回の結果は治療指針を立てる上で興味深い所見である。今後は菌の再燃の機序を解明し、治療法の確立につなげることが課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Gotoh Yasuhiro, Taniguchi Takako, Yoshimura Dai, Katsura Keisuke, Saeki Yuji, Hirabara Yasutoshi, Fukuda Mayumi, Takajo Ichiro, Tomida Junko, Kawamura Yoshiaki, Ogura Yoshitoshi, Itoh Takehiko, Misawa Naoaki, Okayama Akihiko, Hayashi Tetsuya	4. 巻 5
2. 論文標題 Multi-step genomic dissection of a suspected intra-hospital Helicobacter cinaedi outbreak	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbial Genomics	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/mgen.0.000236	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Osamu Sawada, Yasuhiro Gotoh, Takako Taniguchi, Shota Furukawa, Dai Yoshimura, Satomi Sasaki, Haruki Shida, Yoshihiro Kusunoki, Tsuyoshi Yamamura, Ken Furuya, Takehiko Itoh, Tetsuya Horita, Tetsuya Hayashi, Naoaki Misawa	4. 巻 6
2. 論文標題 Genome Sequencing Verifies Relapsed Infection of Helicobacter cinaedi	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Open Forum Infect Dis .	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ofid/ofz200.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takako Taniguchi, Yuji Saeki, Akihiko Okayama, Tetsuya Hayashi, Naoaki Misawa	4. 巻 61
2. 論文標題 Extraintestinal Infection of Helicobacter Cinaedi Induced by Oral Administration to Balb/c Mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Microbiol Immunol .	6. 最初と最後の頁 57-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12472.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永井 康紀、谷口 喬子、岡山 昭彦、三澤 尚明
2. 発表標題 Helicobacter cinaediのマウス腸管定着モデルを用いた抗菌薬の効果的経口投与法の検討
3. 学会等名 第70回日本細菌学会九州支部総会、第54回日本ウイルス学会九州支部総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	三澤 尚明  (Misawa Naoaki)  (20229678)	宮崎大学・産業動物防疫リサーチセンター・教授   (17601)	