

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K15152

研究課題名（和文）ヘリコバクター・シネディの治療方針の策定および病原性解明に関する研究

研究課題名（英文）Development of therapeutic strategies and pathogenesis analysis of *Helicobacter cinaedi*

研究代表者

中島 純子（富田純子）（Nakashima, Junko）

愛知学院大学・薬学部・講師

研究者番号：10454323

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ヘリコバクター・シネディ臨床分離株のMICを微量液体希釈法にて測定した。耐性を示した株については、耐性関連遺伝子について解析し、変異を確認した。また、薬剤排出システムの保有性およびアミノ酸配列を決定したところ、アミノ酸配列のある点変異が薬剤の高度耐性化に関与していることを見出した。

また、ヘリコバクター・シネディの病原性について6型分泌装置（T6SS）遺伝子群に注目し、T6SSの機能の探索を行った。T6SSは宿主細胞への感染に関与していることが示唆された。さらにT6SSエフェクター候補タンパク質を検出し、その機能を解析した結果、細菌増殖を抑制する性質が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヘリコバクター・シネディ感染症の感受性試験データは、治療方針策定と薬剤耐性化の現状を把握するための重要なデータである。今後、医療施設と協力して本菌種のブレイクポイントMICを策定し、適正な抗菌薬治療の方針が定められることにより本菌種感染症の早期治療に繋がると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The MICs of the *Helicobacter cinaedi* isolates were determined by the broth microdilution method. For resistant strains, mutations were detected by analyzing resistance-related genes. By comparing the amino acid sequences of the drug efflux system, we found that a certain point mutation is involved in the development of high drug resistance.

We focused on the type IV secretion system (T6SS) gene cluster for the pathogenicity of *H. cinaedi*. T6SS was involved in infecting host cells. Furthermore, a T6SS effector candidate protein was detected. The proteins inhibited bacterial growth.

研究分野：細菌学

キーワード：薬剤感受性 MIC 薬剤耐性 分泌装置

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ヘリコバクター・シネディ (*Helicobacter cinaedi*) は、腸肝在位菌に含まれる菌種であり、感染症状として発熱や下痢、蜂窩織炎、敗血症などが挙げられる。本菌種は複数の医療施設で院内感染を引き起こし、それらの施設では断続的に本菌の分離が続いている。過去 10 年以上にわたり本菌種が患者から分離されている医療施設もある。しかし、本菌種の治療方針は未だ策定されておらず、抗菌薬治療におけるブレイクポイントが設定されていないため、治療に難渋している。

(2) ヘリコバクター・シネディ感染症の特筆すべきところは、およそ 35% の患者で再発が見られる点である。抗菌薬投与後、症状が寛解しても、しばらくすると再発する症例が数多く報告されている。従って、生体内防御機構および抗菌薬作用から回避した菌体が生体内に留まり続け、何らかの作用により再度増殖し再発を引き起こしていることが予想される。このような病態を引き起こす病原性の解析は全く行われておらず、本菌種については不明な点が多い現状であった。

### 2. 研究の目的

(1) ヘリコバクター・シネディ感染症の適切な抗菌薬使用と耐性菌出現防止のために、臨床分離株の薬剤感受性試験データを収集してブレイクポイントを設定する。また、薬剤耐性化の機序を明らかにし、治療方針の基盤を築くことを目的とした。

(2) ヘリコバクター・シネディの染色体上には他のヘリコバクター属菌種とは異なる 130 kbp 程度の特異的な領域を持ち、VI 型分泌装置 (T6SS) の遺伝子クラスターが含まれていることが判明している。分泌装置から分泌されるエフェクターは、多くの病原細菌において主要な病原因子として機能しており、宿主の生理機能を攪乱し、細菌の感染戦略を理解する上で重要である。ヘリコバクター・シネディにおける T6SS の役割は全く解明されていないため、この分泌装置の機能とエフェクターの存在を明らかにすることを旨とした。

### 3. 研究の方法

(1) 臨床分離株 199 株を使用して、薬剤感受性試験を行った。改良レビンタール培地を用いて微量液体希釈法にて実施し、微妙好気環境で 3 日間培養後に MIC を判定した。薬剤はペニシリン系 (アンピシリン、アンピシリン/スルバクタム、アモキシシリン、カルベニシリン、ピペラシリン、ピペラシリン/タゾバクタム)、セフェム系 (セフェピム、セフトリアキソン)、カルバペネム系 (イミペネム、メロペネム)、アミノグリコシド系 (ゲンタマイシン、カナマイシン)、テトラサイクリン系 (テトラサイクリン)、マクロライド系 (エリスロマイシン)、キノロン系 (シプロフロキサシン、レボフロキサシン、モキシフロキサシン)、クロラムフェニコール系 (クロラムフェニコール)、メトロニダゾールの 19 薬剤を使用した。

(2) いくつかの症例において、一定の期間において再発が確認され、初回感染時と再発時にそれぞれヘリコバクター・シネディ菌株が分離された。再発症例では、初回感染時の菌体が生体内防御機構および抗菌薬作用から回避して生体内に留まり続け、何らかの作用により再度増殖し再発を引き起こしている場合と、別の菌株の再感染の 2 通りが考えられた。これらの菌株について、初回感染株と再発株が同一であるか、また MIC 値に変化が見られるか検証を行った。

(3) キノロン系薬剤に耐性を示した菌株について、DNA ジャイレースのサブユニット A (GyrA) のアミノ酸配列を決定した。また、ヘリコバクター・シネディのゲノム解析の結果、3 つの薬剤排出システムを保有することが推定された。そのうち 2 つは MATE 型であり、1 つは RND 型トランスポーターである。そこで、臨床分離株の薬剤排出システムの保有性およびアミノ酸配列の変異について解析した。

(4) T6SS の機能を明らかにするために、構成遺伝子である *icmF* を欠損した株を作成し、培養細胞への感染性を比較した。また、他菌種で報告されているエフェクター候補因子について BLAST-P からアミノ酸配列を比較し、ヘリコバクター・シネディにて保有している相同配列を検出した。

### 4. 研究成果

(1) 薬剤感受性試験の結果、アンピシリンとカルベニシリンで MIC が 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上を示す株が複数存在し、ペニシリン系の中でも特に強い耐性傾向を示した。アンピシリンとアンピシリン/

スルバクタム、ピペラシリンとピペラシリン/タゾバクタムのMICを比較すると同等のMIC値が得られたため、ヘリコバクター・シネディはラクタマーゼを産生していないことが判明した。カナマイシン、ゲンタマイシン、テトラサイクリンは低いMIC値を示した。エリスロマイシンおよびシプロフロキサシンのMIC値は高く、強い耐性傾向を示した(表1)。

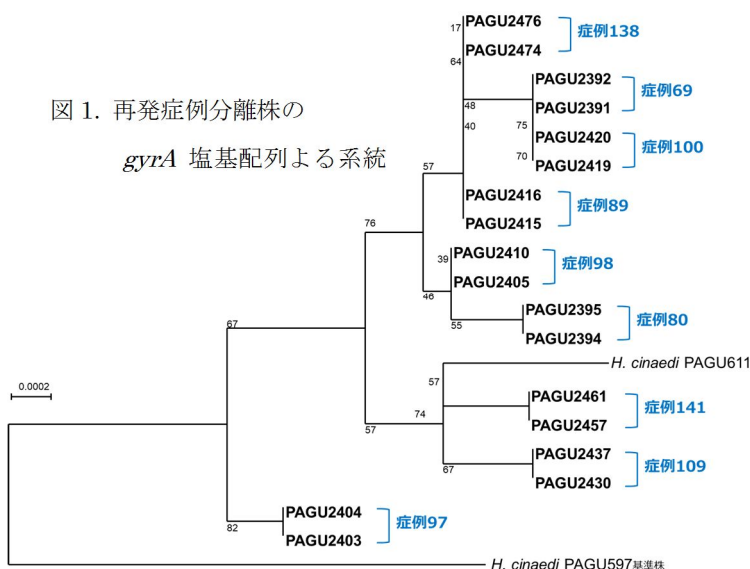
表1. 臨床分離株のMIC値

Antibiotics	MIC values (µg/mL)											
	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	>64
Ampicillin					1	4	12	34	69	52	26	1
Ampicillin/Sulbactam*					2	2	10	35	58	45	13	
Amoxicillin				5	20	22	99	49	3		1	
Carbenicillin				1	1	4	17	42	65	48	19	1
Piperacillin				1	7	12	33	47	86	11	1	1
Piperacillin/Tazobactam				1	8	17	31	76	56	7	2	1
Cefepime					5	13	41	81	44	6	9	
Ceftriaxone	1		4	7	20	33	75	47	10	1	1	
Imipenem	178	14	5	1	1							
Meropenem	129	50	15	2	2	1						
Gentamicin	46	17	80	41	9	4			1			1
Kanamycin	25	19	23	68	48	11	3					2
Tetracycline	104	34	30	19	6	3	2	1				
Erythromycin								10	25	61	20	83
Ciprofloxacin							1	4	21	55	87	31
Levofloxacin				1	5	15	27	55	7	7	52	30
Moxifloxacin	20	10	9	29	39	7	9	31	32	12	1	
Metronidazole	44	7	4	24	20	6	2	1	8	11	46	26
Chloramphenicol	49	33	60	46	8	1	2					

(2) 再発株について、初回感染株と再発株が同一クローンであるかを調べるためにヘリコバクター属の系統分類で使用されている gyrA 塩基配列について比較を行った。gyrA 遺伝子の全長約 2500 bp を決定し、2 株の配列を比較した結果、全ての再発株が初回感染株と同一配列であり、別の菌株の再感染ではなく、体内に留まっていた菌株の再燃であることが確認された(図1)。

図1. 再発症例分離株の

gyrA 塩基配列による系統



(3) ヘリコバクター・シネディでは、GyrAのThr84 Ile変異、Asp88 AsnまたはAsp88 Glyへの単独または二重の変異がある場合、キノロン系抗菌薬への耐性を獲得することが知られているため、キノロン耐性株のアミノ酸配列を比較した。その結果、臨床分離株全株においてThr84 Ile変異が確認された。また、Thr84 IleおよびAsp88 Asnの二重変異株において高度耐性傾向であった。シプロフロキサシンのMIC範囲は4->64 µg/mLであり、全ての株において耐性化していたが、レボフロキサシンおよびモキシフロキサシンはそれぞれMIC範囲が0.5->64 µg/mLと0.06-64 µg/mLであり、MIC値が低い株も見られた。3つの薬剤排出ポンプについて変異を解析すると、レボフロキサシンおよびモキシフロキサシンの高MIC値株はRND型トランスポーターにアミノ酸変異が存在しており、このアミノ酸点変異が高度耐性化に寄与していると考えられた。

(4) ヘリコバクター・シネディ PAGU611株およびVI型分泌装置の構成遺伝子 i cmF を欠損した株 ( l cmF ) を作製して、比較解析を行った。T6SS が細胞への感染に関与しているか調べるために、Caco-2細胞およびRAW264細胞へ野生株と l cmF を感染させて比較した結果、吸着量・侵入量ともに野生株で高値を示した。また、NO産生量を測定したところ、T6SSを持つ野生株の方が l cmF よりも産生量が多いことが確認された。さらにエフェクター候補タンパク質について、大腸菌高発現用プラスミドに遺伝子を導入し、エフェクター候補タンパク質発現大腸菌株を作製した。IPTG誘導によってエフェクター候補タンパク質を発現する株を構築できたため、培養試験を行ったところ、細菌増殖を抑制する性質が観察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 富田純子、大塚佑奈、久綱僚、河村好章
2. 発表標題 Helicobacter cinaediにおけるVI型分泌装置の機能解析
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上條萌子、富田純子、久綱僚、遠藤勇祐、馬場勝、荒岡秀樹、河村好章
2. 発表標題 Helicobacter cinaediのブレイクポイントMIC策定のための薬剤感受性データ収集とキノロン耐性機構について
3. 学会等名 第33回微生物シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富田純子、久綱僚、秋山徹、河村好章
2. 発表標題 比較ゲノム解析から見たHelicobacter cinaediの特徴
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 芳賀美友、富田純子、久綱僚、遠藤勇祐、馬場勝、荒岡秀樹、河村好章
2. 発表標題 Helicobacter cinaediの薬剤感受性の現状と再発株の遺伝学的解析について
3. 学会等名 第68回日本薬学会東海支部総会・大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富田 純子, 久網 僚, 河村 好章
2. 発表標題 Helicobacter cinaedi のVI型分泌装置を介した細胞付着及び炎症誘発について
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------