

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19700374  
 研究課題名（和文）実験動物由来ヘリコバクター属菌の病原遺伝子検索と簡易診断への応用

研究課題名（英文） Determination of pathogenic genes of *Helicobacter* species in Laboratory animals and its application for molecular identification.

研究代表者 篠原 晴香 (SHINOHARA HARUKA)  
 財団法人実験動物中央研究所 実験動物研究部 研究員

研究者番号：60414067

#### 研究成果の概要：

病原遺伝子の検索のため、まずは *Helicobacter hepaticus*(Hh)の菌株収集を行った。444 件の培養を行い、*Helicobacter* spp.(Hsp.) の 16SrRNA 遺伝子の PCR で陽性となったのは 58 件、更に Hh 16SrRNA 遺伝子の PCR で陽性となったのは 21 件、そしてウレアーゼ試験で陽性となり Hh として分離できたのは 4 件であった。

平行して蛍光ビーズアレイ Luminex の系の確立を目指し、まずは 16SrRNA 領域をターゲットとした実験を試みたが遺伝子配列の類似性が高く成功しなかった。そこで特異性が高いターゲット遺伝子として *gyrB* に着目し、この遺伝子の解析を行った。実験動物由来ヘリコバクター 7 種類 [Hh, *H. bilis*(Hb), *H. typhlonius*(Ht), *H. rodentium*(Hr), *H. muridarum*(Hm), *H. cinaedi*(Hc), *H. cholecystus*(Hcho)] の DNA を用いて Sequence Working 解析を行い、配列を決定した。同様の実験を 16SrRNA 遺伝子においても行い、その 2 つの結果を比較すると *gyrB* 遺伝子の特異性が非常に高いことがわかった。

今回解析した Hh の配列から *gyrB* 遺伝子検出用 Primer を設計し、Hh 16SrRNA 遺伝子検出 PCR 陽性となった 100 検体(盲腸サンプル)について PCR を実施した結果、*gyrB* 遺伝子 PCR 陽性となったものは認められなかった。菌体から抽出した DNA では PCR 陽性となることから、盲腸サンプル中の菌数が少ないことと、*gyrB* 遺伝子のコピー数が少ないことが示唆された。

また、Hh 病原遺伝子群とされている HHG11 の中でヘリコバクター属以外の菌(*V. cholerae*, *Yersinia pestis*)で病原遺伝子とされている遺伝子と類似している ORF13 個を選出し、Hh 以外のヘリコバクター、特に病原性があるとされている Hb, Ht にもそれらの遺伝子が存在しているかどうかを PCR により調べたが遺伝子は検出されなかった。

#### 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	0	1,500,000
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	540,000	3,840,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・感染症

キーワード：感染症 微生物 マイクロアレイ 動物

## 科学研究費補助金研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

実験動物由来 *Helicobacter* 属菌のうち Hh, Hb, Ht などマウスに対する病原性を有する菌種として知られている。とくに近年 scid マウスなどの免疫系不全動物が作出され、通常の免疫機能をもつマウスでは発病しないような病原体でも、これらのマウスでは重篤な症状を引き起こすことがわかっている。

現在 Hh の診断は、盲腸からのスキロー寒天培地を用いた菌分離や PCR 法による核酸検出が行われている。菌分離には微好気培養 ( $N_2:CO_2:O_2 = 85:10:5$ ) 装置が必要で、培養に5日程度かかる。このように培養が比較的困難で時間がかかることから、菌の 16SrRNA の塩基配列を使った遺伝子増幅法 PCR による検査法が一般的である。しかし、*Helicobacter* 属菌には多くの種が存在し、それらは 16SrRNA の配列が酷似しているため、PCR 法による擬陽性結果をしばしば引き起こす。また、16SrRNA の配列だけでは病原性の有無がわからないなどの欠点がある。

従来、実験動物由来 *Helicobacter* 属菌はヒトには感染しないとされてきた。しかし近年、ヒトへの感染の可能性が示唆され、特に実験動物を扱う施設においては重大な問題となってきた。実際胆のうや肝臓などに病変が見られる患者から Hh や Hb が検出されたという報告もある (Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Nov. 2002, vol.9, no.6 1160-1164)。Hh や Hb のヒトへの感染が確認された今、その病因のメカニズムを明らかにすることが急務である。ヒトの胃に定着する *H. pylori* (Hp) は既に病原遺伝子の多くが同定されているが他の *Helicobacter* 属菌についてはその Hp 病原遺伝子との比較によって一部の病原遺伝子が解明されるにとどまる。また実験動物由来 *Helicobacter* 属菌についてはその比較によって病原遺伝子を突き止めることはできていない。

そこで今回我々は *Helicobacter* 属菌のうち実験動物に感染する菌として最初に分離された菌で、マウスに肝炎や大腸炎症を起こす菌種として報告されている Hh について病原遺伝子の検索を行うことにした。この菌は2003年に complete genome sequence が発表されており (PNAS June 24, 2003 vol.100 no.13 7901-7906)、更には病原性にかかわる遺伝子群の存在も明らかになっている。よってこの病原遺伝子群の検索を行うことにより、Hh の病原遺伝子を同定できると考えた。

## 2. 研究の目的

2003年のHhのcomplete sequenceの発表以後、Hhの分子学的な研究が加速している。Hhには多くの株があり (Infection and immunity, 2005, vol.73, no.12, p8449-8452)、この研究を進めるためにもできるだけ多くのHh菌株が必要である。わが研究所では、げっ歯類実験動物のモニタリング業務を行っていることから、日本におけるHh野外株を収集することが可能である。この野外株を用いて、Hhの疫学調査を実施し、その遺伝子情報を比較することによってHh病原遺伝子の検索を行う。

本研究ではHh病原遺伝子の検索のため、まず蛍光ビーズアレイシステムLuminexを用いた検査システムの確立を目指した。これは一度に100種類もの遺伝子の解析が可能であるため、遺伝子のスクリーニングに最適である。

## 3. 研究の方法

1) *Helicobacter hepaticus* の菌株収集

2007年の1月から12月までの間にICLASモニタリングセンターに検査できた動物盲腸のHsp. 16SrRNA 遺伝子のPCRを行い、陽性となったものは更にHh 16SrRNA 遺伝子のPCRとdirect Sequenceを行った。並行して分離選択培地HP分離培地(栄研化学株式会社E-MR82)を用いて培養を行い、PCRやSequenceとデータを照らし合わせHsp.及びHh分離株を得た。その後ウレアーゼ試験、菌からのPCR, direct Sequenceを行いHh分離株を決定した。

## 2) 蛍光ビーズアレイシステム Luminex (HitachiSoft)の系の立ち上げ

通常の平板タイプのアレイでは、スポットが固定されている何行何列目という位置情報で各プローブが何であるかを特定しているが、Luminexシステムでは、識別コードを付与した担体表面にプローブを固定し、この担体の識別コードを読み取ることで表面に固定されているプローブを特定する。担体としては直径5.6 $\mu$ mのポリスチレン製 $\mu$ ビーズを用い、様々な比率の蛍光色素で染色しその蛍光色素含有量を識別コードとして用いる。ビーズは100種類あり、理論上100種類の遺伝子検出が可能である。

まず最初にバクテリアの遺伝子解析でよく用いられる、16SrRNA領域をターゲット遺伝子としてDirect Hybridization法を用いて

行った。これはLuminexのカルボキシルコートビーズにアミノ化したオリゴヌクレオチドをカップリングさせたものにサンプルDNAをHybridizationさせStreptavidin-PEにより検出するというものである。サンプルDNAはあらかじめ16SrRNA PCRにより増幅したものを使用した。

### 3)スクリーニングターゲット DNA の選出

16SrRNA 遺伝子は特異性が低いため、昨今バクテリアの系統分析で注目されている *gyrB* 遺伝子を調べた。サンプルは実験動物由来ヘリコバクターのうち Hh/ Hb / Ht / Hr / Hm / Hc / Hcho の菌体から抽出した DNA を解析に用いた。 *gyrB* Universal Primer (APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Mar.1995, p.1140-1109 )を用いて Sequence Working 解析を行った。同様の実験を 16SrRNA Universal Primer ( Curr Microbiol. 2000 Sep ; 41 (3) : 161-6 )を用いて行った。そのデータを解析ソフト GENETIX を用いて系統樹の作製及びホモロジーサーチを行った。

### 4) 実験動物由来ヘリコバクター属における Hh 病原遺伝子群 HHG11 の解析

Hh 病原遺伝子群とされている HHG11 の中でヘリコバクター属以外の菌 (*V. cholerae*, *Yersinia pestis*) で病原遺伝子とされているものと類似している ORF13 個 (H0243 ~ H0252, H0260, H0268, H0275) を選出し、それぞれの Primer を設計した。そして Hh 以外のヘリコバクター、特に病原性があると言われている Hb, Ht やその他の実験動物由来ヘリコバクター (Hr, Hm, Hc, Hcho) にもそれらの遺伝子が存在しているかどうかを PCR により調べた。

## 4 . 研究成果

### 1)-1 施設別 Hh 陽性数

2007 年の 1 月から 12 月までの間に ICLAS モニタリングセンターにおいて Hh の検査を実施した動物及びサンプルの 16SrRNA PCR、その後の direct Sequence によって Hh 陽性となった検体数を施設ごとに示した。2007 年度は *Helicobacter* 検査数 5,469 検体のうち陽性は 145 検体で陽性率は 2.6% であった。

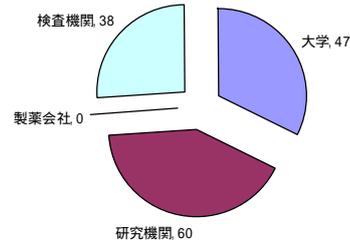


Fig 1.施設別 Hh 陽性数

### 1)-2 Hh 菌株収集の結果

分離を試みた 444 検体のうち Hh PCR 陽性となった検体数が 21 検体あったうち分離できたのは 4 検体であった。これは盲腸内容物からの培養のため、分離選択培地を用いても *Helicobacter* 属以外の菌や複数の *Helicobacter* の感染などにより純培養できなかったことが原因として考えられる。

Table1. *Helicobacter* 属菌の分離

分離を試みた検体数	444
Hspp. PCR 陽性数	58
Hh PCR 陽性数	21
分離できた Hh 検体数	4
分離できた Hspp(未同定)検体数	47

### 2) Luminex の結果

1tube に 3 つのプロープを混合し、それに対して sample DNA1 種類を反応させた。各プロープのカウントがどれか 100 個になるまでカウントした結果である。

本来 Sample DNA Hh はプロープ Hh のみに反応するようにプロープを設計したが、実際は他のプロープにも反応した。他のサンプルも同様に特異的なプロープ以外のプロープとも反応した。

Table 2.16SrRNA 遺伝子を用いた Luminex の反応

Sample DNA	プロープの種類		
	Hh	Hb	Hspp
Hh	100	113	179
Hb	100	114	134
Hm	110	100	176
Hp	100	121	178

3)-1 スクリーニングターゲット遺伝子の系統解析の結果

Fig2, Fig3 から 16SrRNA よりも *gyrB* の方がクラスターが分かれやすいことがわかった。(Fig2 と Fig3 では out strain の genetic distance が約 10 倍異なる)

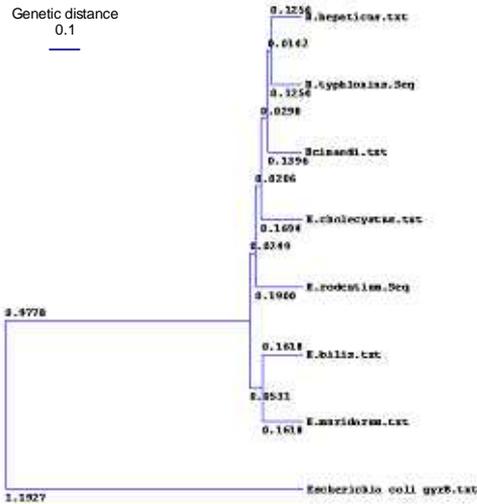


Fig2. *gyrB*による系統解析

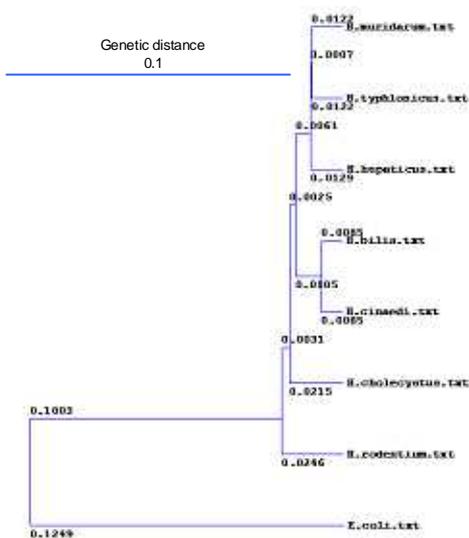


Fig3. 16SrRNAによる系統解析

3)-2 スクリーニングターゲット遺伝子の HomologySearch

3)-1 で解析した Sequence データの HomologySearch の結果の類似性を%で示した。16SrRNA 遺伝子は実験動物由来ヘリコバクター属間で類似性が高いが、*gyrB* 遺伝子は低いことがわかった。

Table 2. *gyrB* による実験動物由来 Helicobacter 属の類似性

<i>gyrB</i>	Hh	Hb	Ht	Hr	Hm	Hcina	Hcho
Hh							
Hb	71.3%						
Ht	81.5%	70.7%					
Hr	72.1%	67.9%	73.8%				
Hm	68.4%	75.0%	69.3%	67.2%			
Hcina	78.5%	72.9%	79.2%	73.1%	69.5%		
Hcho	77.4%	71.6%	76.3%	73.4%	72.2%	76.1%	

Table 3. *gyrB* による実験動物由来 Helicobacter 属の類似性

16S rRNA	Hh	Hb	Ht	Hr	Hm	Hcina	Hcho
Hh							
Hb	97.3%						
Ht	97.1%	97.3%					
Hr	95.7%	97.0%	95.2%				
Hm	96.8%	96.4%	98.2%	95.1%			
Hcina	96.8%	98.0%	97.0%	96.0%	95.6%		
Hcho	95.7%	96.4%	95.7%	96.1%	95.8%	95.8%	

4) 実験動物由来ヘリコバクターにおける *Hh* 病原遺伝子群 HHG11 の解析

実験動物由来ヘリコバクター7種類に、設計した ORF13 種類の Primer を用いた PCR を行ったが、増幅が確認されたのは *Hh* のみであった。

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠原 晴香 (SHINOHARA HARUKA)

財団法人実験動物中央研究所 研究員

研究者番号：19700374

(2) 研究分担者

( 0 )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( 0 )

研究者番号：