

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860105

研究課題名(和文) 腸肝ヘリコバクターの病原性と薬剤耐性に関する研究

研究課題名(英文) Pathogenicity and antimicrobial resistance in Enterohepatic Helicobacters

研究代表者

林原 絵美子 (Rimbara, Emiko)

国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官

研究者番号：20349822

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)：近年ヘリコバクター・シネディ(*Helicobacter cinaedi*)の人からの分離報告が急増している。本研究では*H. cinaedi*の薬剤耐性機構について解析を行い、シプロフロキサシン、クラリスロマイシン、およびb-lactam薬の薬剤耐性に寄与する変異部位を同定した。さらに、薬物排出ポンプが*H. cinaedi*の薬剤耐性に寄与していることを明らかにした。またこれまで解読されていなかった*H. fennelliae*のドラフトゲノムおよび、院内感染由来の*H. cinaedi*株の完全ゲノムを解析した。これらのゲノム情報を元に、病原性に関連する候補因子について解析を継続中である。

研究成果の概要(英文)：Recently *H. cinaedi* infection has been increasingly reported. We analyzed the mechanism of antimicrobial resistance in *H. cinaedi*, and identified the mutations conferring resistance to ciprofloxacin, clarithromycin, and b-lactams. Moreover the role of efflux pumps to the antimicrobial resistance in *H. cinaedi* was demonstrated. To elucidate the pathogenetic factors in enterohepatic Helicobacters, the genomes of *H. fennelliae* MRY12-0050, which is the first report for *H. fennelliae*, and *H. cinaedi* strain MRY08-1234 caused nosocomial infection, were analyzed. The suspected pathogenetic factors in *H. cinaedi* have been investigated to understand *H. cinaedi* pathogenicity.

研究分野：細菌学

キーワード：ヘリコバクター ヘリコバクター・シネディ 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

① 研究の学術的背景

Helicobacter 属菌は主に胃から分離される Gastric *Helicobacter* と腸管などから分離される Enterohepatic *Helicobacter* に分類される。代表的な Gastric *Helicobacter* である *H. pylori* は全世界人口の約半分が感染しており、消化性潰瘍や胃癌などの原因となることが一般によく知られている。Enterohepatic *Helicobacter* は主に動物の腸管から分離されるが、*H. cinaedi*, *H. fennelliae*, *H. canis*, *H. canadensis*, *H. bilis*, *H. pullorum*, *H. winghamensis* などの Enterohepatic *Helicobacter* は人からの分離も報告されている。中でも *H. cinaedi* は近年、人からの分離報告が増えている。

H. cinaedi は主に菌血症患者の糞便や血液からの分離が散発的に報告されてきた。*H. cinaedi* は *H. pylori* と同様、増殖速度が遅く、培養には特殊な培養条件が必要である。さらに *H. cinaedi* はコロニーを形成せずフィルム状に増殖するため、寒天培地上での判別には熟練を要する。近年 *H. cinaedi* 感染の報告が増えているのは、臨床検査技術の発達により、今まで見逃されていた *H. cinaedi* が分離培養されるようになってきたためと考えられている。

H. cinaedi 感染症は化学療法を行っている患者などの免疫力が低下している患者の血液や便からの分離報告が多い。しかし一方、免疫が健全な患者においても分離が報告されており、蜂窩織炎や心筋心膜炎の原因菌としても分離される。さらに近年では、アテローム性動脈硬化症との関連も指摘されている。しかし、*H. cinaedi* がどのようなメカニズムでこのようにさまざまな病態を引き起こすのかについては明らかになっていない。

Enterohepatic *Helicobacter* の薬剤感受性パターンは治療を行う上で必須の情報である。これまでに日本の臨床分離株の多くはシプロフロキサシンおよびクラリスロマイシンに耐性であることが明らかになっているが、薬剤耐性メカニズムは明らかになっていない。また、 β -latam 薬は *H. cinaedi* 感染症治療にもっともよく用いられる抗菌薬の一つであるが、薬剤耐性メカニズムは明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では *H. cinaedi* と *H. cinaedi* に類似し

た *H. fennelliae* に着目し、これらの細菌により引き起こされる病態を解明することを目的とし病原因子の同定を行う。また、薬剤感受性についても調査し、治療に用いることのできる抗菌薬の同定、および薬剤耐性機構の解明を行う。

3. 研究の方法

① *H. cinaedi* の病原性に関する研究

H. cinaedi の既知の病原因子である Cytolethal distending toxin (CDT) のノックアウト株を作製し、ノックアウトにより病原性がどのように変化するかについて、*in vitro* 感染実験系で評価する。また、*H. cinaedi* や *H. fennelliae* などの菌血症を起こす *Helicobacter* 属菌と菌血症を起こさない *Helicobacter* 属菌について、ゲノム解析を行い、pangenome 解析により菌血症を起こす *Helicobacter* 属菌に特異的な病原因子を探索する。病原因子の候補遺伝子を選定したのち、ノックアウト株を作製し、病原性の変化を評価する。

② *H. cinaedi* の薬剤耐性に関する研究

H. cinaedi のシプロフロキサシン耐性株に認められた GyrA, および GyrB 変異を感受性株に導入し、耐性への寄与を検討する。また、*H. cinaedi* のマクロライド耐性株に共通に認められた 23S rRNA 変異についても感受性株に導入し、耐性への寄与を確認する。 β -lactam 耐性については、高度耐性株と低度耐性株のゲノムを比較することにより耐性に寄与する可能性のある変異部位を選択したのち、変異の導入実験により耐性への寄与を確認する。また、薬剤排出ポンプのノックアウト株を作製し、各抗菌薬の耐性への寄与を検討する。また薬剤排出ポンプおよびポーリンの遺伝子発現量を RT-qPCR により測定し、耐性株と感受性株で比較する。

4. 研究成果

① *H. cinaedi* の病原性に関する研究

H. cinaedi の type strain である CCUG18818 株を用いて、CDT ノックアウト株を作製し、*in vitro* の感染実験により細胞障害性を比較した結果、U937 細胞に対する細胞障害性は CDT のノックアウトにより変化しなかった。一方、Caco-2 細胞に対する細胞障害性は CDT ノックアウトにより減弱した。実験を行っていく過程で、院内感染由来の MRY08-1234 株

の細胞障害性が CCUG18818 株より高い傾向が認められたことから、病原因子探索には MRY08-1234 株を宿主としてノックアウト株を作製することとし、MRY08-1234 株の完全ゲノム解析を行った (Accession No. AP017374)。また、*H. fennelliae* のゲノムはこれまでに解読されていなかったことからドラフトゲノムを解析・報告した。pangenome 解析により病原性に関連すると考えられる因子について、MRY08-1234 株を用いたノックアウト株を作製を試みたが、MRY08-1234 株を用いたノックアウト株の作製はできなかった。MRY08-1234 株は Clonal complex (CC)9 に属するが、CC9 に属する他の菌株もノックアウト株の作製ができなかったことから、CC9 にはノックアウト株の作製を妨げる共通の要因があると考えられた。そこで、現在、別の菌血症由来株である MRY12-0027 株を用い、ノックアウト株の作製し、感染実験により病原因子の同定解析を進めている。

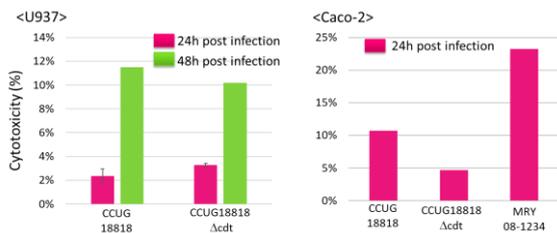


Figure 1 *H. cinaedi* 感染による細胞障害性

CDT ノックアウト株を用いた U937 と Caco-2 の感染実験により細胞障害性を LDH 測定により検討。

② *H. cinaedi* の薬剤耐性機構の解明

H. cinaedi のシプロフロキサシン耐性株に認められた GyrA および GyrB 変異を感受性株に導入することにより、各変異の寄与を検討した。その結果、*H. cinaedi* は GyrA の 84 位の変異によりシプロフロキサシン耐性化し、GyrA の 88 位や GyrB の 423 位の変異が加わることで高度耐性化した。薬剤排出ポンプの発現量を調べたところ、高度シプロフロキサシン耐性株において RND 型薬剤排出ポンプ CmeDEF を構成する CmeF の遺伝子発現量が優位に増加していることが分かった。さらに CmeD および CmeF のノックアウトによりシプロフロキサシンの MIC が 8-16 倍、2-4 倍低下した (Table 1) ことから、シプロフロキサシン耐性には Gyrase 変異だけでなく、RND 型薬剤排出ポンプ CmeDEF の高発現が寄与していることが明らかとなった。

また、クラリスロマイシン耐性に関しては変異導入実験により 23S rRNA の A2018G 変異の寄与を明らかにした。クラリスロマイシ

ン感受性は薬剤排出ポンプのノックアウトにより変化しなかったことから、薬剤排出ポンプのクラリスロマイシン耐性への寄与は低いと考えられた (Table 1)。

Table 1 RND 型薬剤排出ポンプのノックアウト株におけるシプロフロキサシンおよびクラリスロマイシン感受性

Strain	Mutations in:			MIC (mg/mL) of:	
	23S rRNA	GyrA	GyrB	ciprofloxacin	clarithromycin
MRY08-1240	A2018G	T84I	D423N	128	128
MRY08-1240 MacAAcat	A2018G	T84I	D423N	128	128
MRY08-1240 CmeCAcat	A2018G	T84I	D423N	64	128
MRY08-1240 CmeBAcat	A2018G	T84I	D423N	64	128
MRY08-1240 CmeDAcat	A2018G	T84I	D423N	16-32	128
MRY08-1240 CmeFAcat	A2018G	T84I	D423N		n.o.
MRY08-1240 CmeGAcat	A2018G	T84I	D423N		n.o.
MRY12-0056	A2018G	T84I	-	32	128
MRY12-0056 MacAAcat	A2018G	T84I	-	32	128
MRY12-0056 CmeCAcat	A2018G	T84I	-	32	128
MRY12-0056 CmeBAcat	A2018G	T84I	-	32	128
MRY12-0056 CmeDAcat	A2018G	T84I	-	4	128
MRY12-0056 CmeFAcat	A2018G	T84I	-		n.o.
MRY12-0056 CmeGAcat	A2018G	T84I	-	32	128
12-0027	A2018G	T84I	-	32-64	2-4
MRY12-0027 MacAAcat	A2018G	T84I	-	64	4
MRY12-0027 CmeCAcat	A2018G	T84I	-	64	2
MRY12-0027 CmeBAcat	A2018G	T84I	-	32	4
MRY12-0027 CmeDAcat	A2018G	T84I	-	4	2
MRY12-0027 CmeFAcat	A2018G	T84I	-	16	2
MRY12-0027 CmeGAcat	A2018G	T84I	-	32	2

β -latam 薬剤耐性機構についてはセフトリアキソンの MIC が 128 μ g/ml である MRY12-0051 株を用いた解析を行った。MRY12-0051 株のゲノムを MRY12-0051 と同一のシーケンスタイプ (ST10) でありセフトリアキソンの MIC が 4 μ g/ml の MRY08-1234 株と比較した結果、70 個のアミノ酸変異を伴う SNPs が 60 個の遺伝子上に認められ、それらの中に Penicillin-binding proteins (PBPs) をコードする遺伝子が含まれていた。PBPs に認められた変異を感受性株に導入した結果、PBPA 変異が β -lactam 耐性に大きく寄与していることが明らかとなった。また、PBPA 変異に FtsI 変異が加わることで高度耐性化することが分かった。PBPA および FtsI に認められた変異部位はいずれも Penicillin binding motifs の近傍であった (Figure 2)。

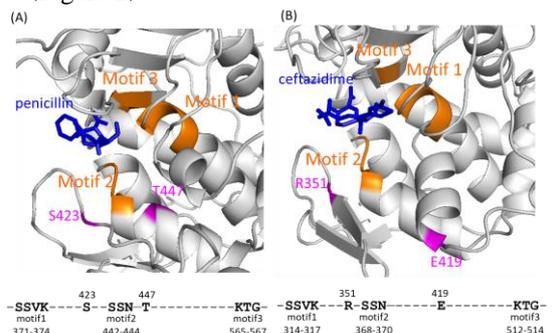


Figure 2 *H. cinaedi* の β -lactam 耐性に関与する PBPA (A) と FtsI (B) の変異部位

β -lactam 耐性関連変異は penicillin-binding motif の近傍に認められた。

PBPA の 447 位の変異はセフトリアキソンの MIC が 64 µg/ml である MR Y12-0033 株にも認められたことより、耐性への寄与が高いと考えられた。

一方 RND 型薬剤排出ポンプを構成する CmeB および CmeD のノックアウト株ではセフトリアキソンの MIC がそれぞれ 8 倍、64 倍低下した (Table 2)。H. cinaedi のβ-lactam 薬感受性は同属である H. pylori に比べて低い (H. pylori のアモキシシリンの MIC₉₀ は 0.125 µg/ml 以下なのに対し、H. cinaedi の MIC₉₀ は 8 µg/ml) が、CmeD ノックアウト株の MIC は H. pylori と同レベルまで低くなっていたことから、H. cinaedi のβ-lactam 薬への感受性の低さは RND 型排出ポンプによるものであることが分かった。また薬剤排出ポンプ遺伝子の発現量は MR Y12-0051 株において高かったが、その傾向は MR Y12-0051 株と同一の ST である感受性株の MR Y08-1234 株においても認められた。従って薬剤排出ポンプは高度耐性への寄与は低い、薬剤排出ポンプの発現量が高いバックグラウンドをもつ菌株群はβ-lactam 薬耐性になりやすい可能性が考えられた。

Table 2 RND 型薬剤排出ポンプのノックアウト株におけるβ-lactam 薬感受性

	MIC (µg/ml) ^a	
	AMX	CRO
CCUG18818	4-8	8
CCUG18818_pbpICΔcat	8	8
CCUG18818_cmeCΔcat	4-8	8
CCUG18818_macAΔcat	4-8	8-16
CCUG18818_cmeBΔcat	0.5-1	0.5-1
CCUG18818_cmeDΔcat	0.063-0.125	0.063
CCUG18818_cmeFΔcat	4-8	8
CCUG18818_cmeGΔcat	4-8	8
MR Y08-1240	8	8-16
MR Y08-1240_pbpICΔcat	8	16
MR Y08-1240_cmeCΔcat	4-8	8
MR Y08-1240_macAΔcat	4-8	8-16
MR Y08-1240_cmeBΔcat	0.5	0.5-1
MR Y08-1240_cmeDΔcat	0.063	0.5-1
MR Y08-1240_cmeFΔcat	n. o.	n. o.
MR Y08-1240_cmeGΔcat	n. o.	n. o.
MR Y12-0027	2-4	2
MR Y12-0027_pbpICΔcat	n. t.	n. t.
MR Y12-0027_cmeCΔcat	4	2
MR Y12-0027_macAΔcat	4	2
MR Y12-0027_cmeBΔcat	0.25	0.125
MR Y12-0027_cmeDΔcat	0.031	0.016
MR Y12-0027_cmeFΔcat	2-4	2
MR Y12-0027_cmeGΔcat	2-4	2

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Trespalcios-Rangél AA, Otero W, Arévalo-Galvis A, Poutou-Piñales RA, Rimbara E, Graham DY. Surveillance of Levofloxacin Resistance in *Helicobacter pylori* Isolates in Bogotá-Colombia (2009-2014). PLoS One. 2016 Jul 25;11(7):e0160007.

- ② Murata S, Suzuki H, Sakamoto S, Miki T, Rimbara E, Shibayama K, Koyama S, Tamai K, Yaguchi Y, Tada M. *Helicobacter cinaedi*-associated Vertebral Osteomyelitis in an Immunocompetent Patient. Intern Med. 2015;54(24):3221-4.
- ③ Flahou B, Rimbara E, Mori S, Haesebrouck F, Shibayama K. The Other *Helicobacters*. Helicobacter. 2015 Sep;20 Suppl 1:62-7.
- ④ Trespalcios AA, Rimbara E, Otero W, Reddy R, Graham DY. Improved allele-specific PCR assays for detection of clarithromycin and fluoroquinolone resistant of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies: identification of N87I mutation in GyrA. Diagn Microbiol Infect Dis. 2015 Apr;81(4):251-5.
- ⑤ Akashi Y, Igarashi J, Suzuki H, Rimbara E, Shibayama K, Nin S, Tamai K, Yaguchi Y, Shiigai M, Oikawa T, Suzuki M. Pararenal Lymphatic Cyst Infection Caused by *Helicobacter cinaedi*. Intern Med. 2015;54(11):1437-40.
- ⑥ Rimbara E, Matsui M, Mori S, Suzuki S, Suzuki M, Kim H, Sekizuka T, Kuroda M, Shibayama K. Draft Genome Sequence of *Helicobacter fennelliae* Strain MR Y12-0050, Isolated from a Bacteremia Patient. Genome Announc. 2013 Aug 8;1(4). pii:e00512-13. Erratum in: Genome Announc. 2016;4(4). pii: e00634-16.
- ⑦ Rimbara E, Mori S, Kim H, Matsui M, Suzuki S, Takahashi S, Yamamoto S, Mukai M, Shibayama K. *Helicobacter cinaedi* and *Helicobacter fennelliae* transmission in a hospital from 2008 to 2012. J Clin Microbiol. 2013 Jul;51(7):2439-42.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 林原 絵美子, 森 茂太郎, 金 玄, 松井 真理, 鈴木 里和, 高橋 俊司, 山本 聡, 向井 正也, 柴山 恵吾. 同一の病院で分離された *H. cinaedi* と *H. fennelliae* の分子疫学的解析と薬剤感受性. 第 19 回ヘリコバクター学会学術集会, 2013 年 6 月 28 日~29 日, 長崎.
- ② 林原 絵美子, 森 茂太郎, 金 玄, 柴

山 恵吾. セフトリアキソン耐性 *Helicobacter cinaedi* におけるペニシリン結合タンパク質変異. 第 88 回日本細菌学会総会, 2015 年 3 月 26 日~8 日, 岐阜.

- ③ 林原 絵美子, 柴山 恵吾. *Helicobacter cinaedi* の分子疫学と薬剤耐性. 第 21 回日本ヘリコバクター学会学術集会 (招待講演), 2015 年 6 月 26 日~27 日, 神戸.
- ④ 林原 絵美子. ピロリ菌 -胃がんとの関連性と薬剤耐性について-. 第 6 回北里感染症教育フォーラム (招待講演), 2015 年 5 月 16 日, 東京.
- ⑤ 采原 隆志, 鈴木 道雄, 今岡 浩一, 林原 絵美子, 柴山 恵吾. 動物濃厚接触患者の血液培養より分離された *Helicobacter trogontum* の 1 症例, 第 28 回日本臨床微生物学会, 2017 年 1 月 20 日~22 日, 長崎.
- ⑥ 林原 絵美子, 柴山 恵吾. *Helicobacter cinaedi* における薬剤排出ポンプと薬剤耐性との関連. 第 23 回日本ヘリコバクター学会学術集会, 2017 年 6 月 30 日~7 月 2 日, 函館.
- ⑦ Emiko Rimbara, Shigetarou Mori, Masato Suzuki, Kim Hyun, Keigo Shibayama. Mechanism of resistance to ceftriaxone in *Helicobacter cinaedi*. 19th International Workshop on *Campylobacter, Helicobacter* and Related Organisms. Sep. 10-14, 2017, Nantes, France.

[図書] (計 4 件)

- ① Rimbara E, Sasatsu M, Graham DY. PCR detection of *Helicobacter pylori* in clinical samples. *Methods Mol Biol.* 2013;943:279-87.
- ② 高橋 俊司, 林原 絵美子. ヘリコバクター・シネディ. *臨床検査* 2014;56 (11):1357-1361
- ③ 林原 絵美子, 森 茂太郎, 金 玄, 高橋 俊司, 柴山 恵. *Helicobacter cinaedi* の分子疫学と薬剤耐性. *日本ヘリコバクター学会誌* 2015;17(2): 25-30
- ④ 林原 絵美子. ゲノムからみた non-pylori Helicobacters . *Helicobacter Research* 2017;20(5);497-505

6. 研究組織

研究代表者

林原 絵美子 (Rimbara, Emiko)

国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官

研究者番号: 20349822