

平成 21年 4月 10日現在

研究種目： 基盤研究（C）
 研究期間： 2006～2008
 課題番号： 18590416
 研究課題名（和文） ヘリコバクター・ハイルマニー感染症解明の分離培養法確立と臨床細菌学的研究
 研究課題名（英文） Clinical Bacteriology for the Clarification of Infectious Diseases due to ‘*Candidatus Helicobacter heilmannii*’
 研究代表者 川上 由行（KAWAKAMI YOSHIYUKI）
 信州大学・医学部・教授
 研究者番号： 90283275

研究成果の概要：

‘*Candidatus Helicobacter heilmannii*’ 株のマウス継代法を確立し、その 16S rRNA と Urease 遺伝子を解析した。ヒト胃内視鏡材料由来の継代 HHL0 株の解析から、殆どの株が ‘*Candidatus H. heilmannii*’ type 1 に一致することを明らかにした。type 1 は *H. suis* との同一性が明らかにされ、培養法も既に確立した。我々は ‘*Candidatus H. heilmannii*’ type 1（即ち *H. suis*）でも type 2 でもない、新規の ‘*Candidatus H. heilmannii*’ SH6 株を報告（J. Microbiol. 47（4）： 201-207, 2009）した。また、近縁の *H. felis* を供試菌株とし、至適ガス濃度と培養の温度および時間等の培養環境を、集落発生時期と集落サイズおよび spiral-form と coccoid-form の比率等を検討し、研究目的に応じた最適な培養条件について提案（Microbiol. Immunol. 47（5）： 251-258, 2009）した。なお、新菌種と考えられる SH6 株の 16S rRNA および Urease 遺伝子は、NCBI および DDBJ の DNA DataBank に登録した。

◎ 16S rRNA gene sequence : Accession number AB462257

◎ Urease gene sequence : Accession number AB462258

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,000,000	0	1,000,000
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	510,000	3,210,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：

Candidatus、*Helicobacter heilmannii*、*Helicobacter suis*、*Helicobacter felis*、
 urease 遺伝子、16S-rRNA、type 1、type 2

1. 研究開始当初の背景

ヒトの胃・十二指腸に感染し炎症および潰瘍病変の惹起に関与する細菌には、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) と、

ヘリコバクター・ハイルマニー（‘*Candidatus H. heilmannii*’）とがあることが知られていたが、国際的にも ‘*Candidatus H. heilmannii*’ の感染症については未解明であった。これまで “*Helicobacter heilmannii*” はヒト胃粘

膜に感染する人工培養不能のグラム陰性のらせん菌として知られて来ており、形態学的には、*Helicobacter pylori* と比較すると大型で非常にねじれが強い *Helicobacter* 属菌である。人工培養不能菌であることから生化学的性状をはじめ菌が有する細胞毒性など多くが未だ解明されていない。また、今日でも '*Candidatus H. heilmannii*' の分離培養法の確立は示されておらず、米国 ATCC (American Type Culture Collection) の *H. heilmannii* の Reference strain も、*in vitro* 培養法は示されておらず、マウス胃内に感染させて生菌の Transplantation を図るよう記されている。分離培養法を確立して、性状分析し、分類学および臨床細菌学的に、'*Candidatus H. heilmannii*' に起因する感染症を明らかにする。

2. 研究の目的

我々は、一連の研究過程に於いて、慢性胃炎患者の胃粘膜にこれまでに知られていない HHL0 ("*Helicobacter heilmannii*" -like organism (SH6 株を含む) を観察した。本研究では、我々が観察した SH6 株を含む HHL0 株について、透過型電子顕微鏡による形態学的解析に加えて、16S rRNA 遺伝子と urease 遺伝子の配列に基づいた系統解析を行い、どのような菌種に近縁であるかを明らかにすることを最初の目的とした。さらには、16S rRNA および Urease 遺伝子の解析を行ない、'*Candidatus H. heilmannii*' を遺伝学的に分類し、病態と '*Candidatus H. heilmannii*' の type 別との関連性を明らかにすると同時に、最終的にはこれまで全く誰も成し得ていない '*Candidatus H. heilmannii*' の培養法を確立するための段階として、遺伝学的には '*Candidatus H. heilmannii*' に近縁と考えられている *Helicobacter felis* を用いて最適培養条件に就いて提案することを最終的な目的とした。

3. 研究の方法

我々は、マウスへ接種する方法による菌株の継代培養方法を模索し、安定した菌株供給の手法を確立した。そして、安定供給が可能になった供試 '*Candidatus H. heilmannii*' 株について、各種の培養環境条件を模索しながらの培養法の検討を実施すると同時に、遺伝学的に 16S rRNA 遺伝子と Urease 遺伝子を解析して供試 '*Candidatus H. heilmannii*' 株の系統樹を作成した。

まず、SH6 株を保有する患者の胃生検材料をホモジナイズし、specific-pathogen-free マウスに経口接種する方法を採用して、電子顕微鏡を用いてマウス胃粘膜への感染の有無を確認することにより '*Candidatus*

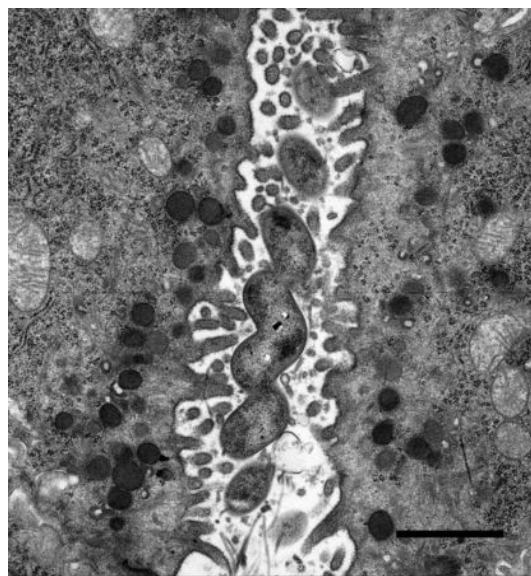
H. heilmannii' の安定継代方法を確立させ、研究菌株の安定供給を可能にした。

供試 '*Candidatus H. heilmannii*' 株を感染させたマウスの胃粘膜サンプルを培養試料として、培養法の確立を目指して、種々の growth factor を組み合わせながら、人工培地 (5%ヒツジ血液寒天培地、チョコレート寒天培地、ヘリコバクター寒天培地など) を用いて各種の培養環境条件を模索しながらの培養法の検討を試みた。なお、'*Candidatus H. heilmannii*' の培養法の最終的な確立のために、種々の growth factor や、ガス環境、培養温度、培養期間等々を、幾つか組み合わせながら検討を重ねた。培養可能な条件についての試行錯誤に際しては、'*Candidatus H. heilmannii*' と近縁菌種と考えられている *H. felis* を供試菌株として用いて検討した。

培養法の検討を実施すると同時に、遺伝学的に 16S rRNA 遺伝子と Urease 遺伝子を解析して供試 '*Candidatus H. heilmannii*' 株の系統樹を作成するした。まず、感染マウスの胃粘膜から DNA を抽出し、16S ribosomal RNA 遺伝子と urease (*ureA* と *ureB*) 遺伝子の PCR 増幅・シーケンス解析を行った。ほぼ全長の 16S ribosomal RNA 遺伝子配列 1,445 bp、部分的な urease 遺伝子配列 1,483 bp を用いて、BLAST 検索による相同性解析、CLUSTAL W を用いた系統樹の作成を実施した。また SH6 株と既知のヒト由来 HHL0 との *UreA* と *UreB* のアミノ酸配列を比較評価して、相同性解析を実施した。

4. 研究成果

供試 '*Candidatus H. heilmannii*' 感染マウスの胃粘膜サンプルを供試しての透過型電子顕微鏡による検索で、以下の写真に示す



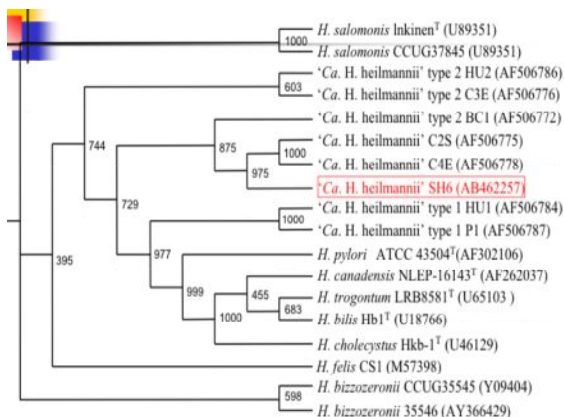
ように、大型でねじれが強い大型の菌体細胞の感染像が観察され、SH6株を含む‘*Candidatus H. heilmannii*’のマウス胃粘膜への感染を確認した。

人工培地による培養を試みたが、SH6株を含む全ての供試‘*Candidatus H. heilmannii*’の培養は成功しなかった。

16S rRNA 遺伝子配列を用いた相同性解析を行った結果、SH6株はチーター由来 HHL0 C4E に対して 99.4% (1,437/1,445 bp) と最も高い相同性を示し、urease 遺伝子配列においては、HHL0 C4E に 81.7% (1,223/1,496 bp) と最も高い相同性を示した。また ureA と ureB 間に存在する intergenic spacer region には GAA の 3bp が介在することが判明した。

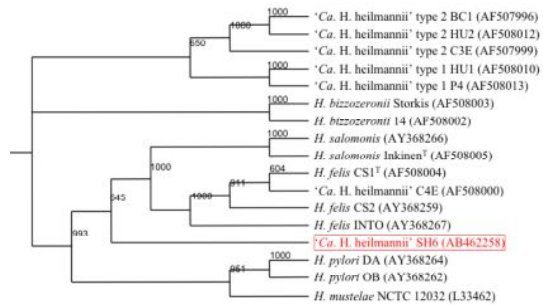
特に、注目されたことは、SH6株と既知のヒト由来‘*Candidatus H. heilmannii*’である“*H. heilmannii*” type1, および “*H. heilmannii*” type2, *H. felis* との Urease アミノ酸配列に対する相同性解析では、UreA に対し、夫々 81.8%, 86.3%, 88.5% の一致率を示し、UreB では夫々 92%, 91.3%, 95% の一致率を示したことであった。

慢性胃炎患者から検出された HHL0 である SH6 株は、16S rRNA 遺伝子配列の相同性解析



にてチーター由来 HHL0 C4E と C2S に対し 99.4% (1,437/1,445 bp) と最も高い相同性を示したが、“*H. heilmannii*” type2 (98.1%), *H. felis* (98.2%), に対しても高い相同性が示され、16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統解析では SH6 株の分類学的位置の特定は不能であった。urease 遺伝子配列の相同性解析で、最も相同性の高いものでも ‘*Candidatus H. heilmannii*’ HHL0 C4E 81.7% (1,223/1,496 bp) であるなど、相同率が低いことから、既知のいずれのカテゴリーにも属しないことを明らかになった。

そこで、ほとんどこれまでに実施されて来っていない Urease 遺伝子配列に基づく系統解析を実施した。Urease 遺伝子の解析成績から、‘*Candidatus H. heilmannii*’ SH6 株が新しい HHL0 ‘*Candidatus H. heilmannii*’ の菌種



に分類されることが示された。intergenic spacer region は *H. pylori* の 3 bp と同じ塩基数であったが、*H. pylori* の構成する塩基は TGC 析では SH6 株が新しい HHL0 ‘*Candidatus H. heilmannii*’ の菌種に分類されることが示された。intergenic spacer region は *H. pylori* の 3 bp と同じ塩基数であったが、*H. pylori* の構成する塩基は TGC であるのに対し、SH6 株は GAA と異なっており、SH6 株と一致する菌種はなかった。SH6 株の UreB のアミノ酸配列には、ニッケルの結合と酵素活性に重要な役割を担うヒスチジン残基とシステイン残基の保存された部位が存在することが分かり、SH6 株の UreB の酵素活性が保たれていることが推測された。本研究により得られた解析結果は、SH6 株がヒト胃粘膜に感染する “*Helicobacter heilmannii*” の中でもこれまでに報告のない新しい分類群に属することを示唆するものであった。

urease gene



Intergenic spacer region

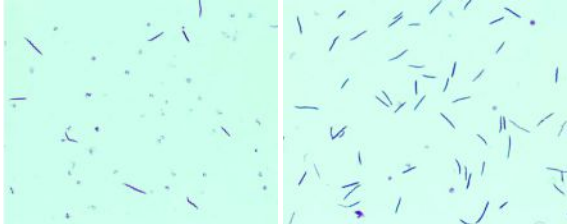
SH6 strain	: 3 bp (GAA)
<i>H. pylori</i>	: 3 bp (TGC)
<i>H. felis</i>	: 9 bp
<i>H. bizzozeronii</i>	: 15 bp
<i>H. salomonis</i>	: 10 bp
“ <i>H. heilmannii</i> ”	: 14 bp

以上の成績から導きだすことが出来た知見を整理すると、以下のようになった。

我々がこれ迄に保有している ‘*Candidatus H. heilmannii*’ 6 株について遺伝学的に解析し、その殆どが ‘*Candidatus H. heilmannii*’ type1 に属することを明らかにした。さらに、‘*Candidatus H. heilmannii*’ SH6 株については、16S rRNA および Urease 遺伝子の解析から、これまでに全く知られていなかった ‘*Candidatus H. heilmannii*’ に分類されることを明らかにする (J.

Microbiol. 47(4): 201-207, 2009) と同時に、16S rRNA 遺伝子と Urease 遺伝子の塩基配列について、DDBJ/NCBI の GeneBank Nucleotide Sequence DataBase から、SH6 株の遺伝子配列 (Accession number AB462257 ~ AB462257) を公開した。

また、*H. felis* を用いた CO₂ および O₂ ガス濃度等の種々の培養環境条件下での検討成績から、培養速度重視の場合、coccoid-form の細胞数をより少なくして spiral-form の細胞を得ることを重視する等の研究目的の応じた「至適培養環境」(Microbiol. Immunol. 53(5): 251-258, 2009) について提案した。



【coccoid-form 主体】

【spiral-form 主体】

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件) 主な発表論文等

(1) 太田 浩良、羽山 正義、金子 靖典、松本 竹久、川上 由行、熊谷 俊子、久保田 聖子、勝山 努. *Helicobacter pylori* 感染 -基礎と臨床-. 臨床科学. 35: 37-47, 2006. (査読: 無し)

(2) 太田 浩良、松澤 賢司、沖山 陽子、細田 和貴、川久保 雅友、日高 恵以子、川上 由行. *Helicobacter heilmannii* 感染と胃粘膜病変. *Helicobacter Research*. 10: 57-62, 2007. (査読: 無し)

(3) Kawakami, Y., Oana, K., Hayama, M., Ota, H., Takeuchi, M., Miyashita, K., Matsuzawa, T. In vitro bactericidal activities of Japanese rice-fluid against *Helicobacter pylori* strains. *Int. J. Med. Sci.* 3: 112-116, 2006. (査読: 有り)

(4) 松本 竹久、川上由行、太田 浩良. HHL0 '*Helicobacter heilmannii*' -like organisms. *G. I. Research*. 15: 162-164, 2007. (査読: 有り)

(5) Ishizone, S., Maruta, F., Suzuki, K., Miyagawa, S., Takeuchi, M., Kanaya, K., Oana, K., Hayama, M., Kawakami, Y., and Ota, H. In vivo bactericidal activities of Japanese rice-fluid against *H. pylori* in a *Mongolian gerbil* model. *Int. J. Med.*

Sci. 4:203-208, 2007. (査読: 有り)

(6) Matsumoto, T., Kawakubo, M., Shiohara, M., Kumagai, T., Hidaka, E., Yamauchi, K., Oana, K., Matsuzawa, K., Ota, H., and Kawakami, Y. Phylogeny of a novel '*Helicobacter heilmannii*' organism from a Japanese patient with chronic gastritis based on DNA sequence analysis of 16S rRNA and urease genes. *J. Microbiol.* 47 (4): 201-207, 2009. (査読: 有り)

(7) Shiohara, M., Kawakubo, M., Matsumoto, T., Kumagai, T., Yamauchi, K., Oana, K., Ota, H., and Kawakami, Y. Laboratory appraisal of optimal gaseous conditions for growth of zoonotic *Helicobacter felis*. *Microbiol. Immunol.* 53 (5): 251-258, 2009. (査読: 有り)

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 塩原真弓、松本竹久、春日恵理子、小穴こず枝、川上由行. *Helicobacter felis* の培養における至適ガス環境に関する検討. 第 20 回日本臨床微生物学会総会. 2009 年 1 月 31 日・2 月 1 日 仙台.

(2) 松本 竹久、川久保 雅友、熊谷 俊子、松田 和之、山内 一由、太田 浩良、川上 由行. 16S rRNA 遺伝子と urease 遺伝子の塩基配列に基づく '*Candidatus Helicobacter heilmannii*' の系統解析. 第 57 回日本医学検査学会総会. 2008 年 5 月 29-31 日 札幌

(3) Matsumoto, T., Kawakubo, M., Ota, H., Katsuyama, T., Kawakami, Y. "Phylogenetic analysis of '*Helicobacter heilmannii*'-like organisms from different Japanese patients based on DNA sequences of 16S rRNA and Urease genes". International Symposium on *Helicobacter heilmannii*. April 25, 2007. Tokyo.

〔その他〕

DDBJ/NCBI の GeneBank Nucleotide Sequence DataBase から、'*Candidatus Helicobacter heilmannii*' SH6 株の 16S rRNA 遺伝子と urease 遺伝子の塩基配列を公開している。

- 16S rRNA gene sequence :
Accession number AB462257
- urease gene sequence :

Accession number AB462258

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 由行 (KAWAKAMI YOSHIYUKI)

信州大学・医学部・教授

研究者番号： 90283275

(2) 研究分担者

小穴 こず枝 (OANA KOZUE)

信州大学・医学部・助教

研究者番号： 60115334

太田 浩良 (OTA HIROYOSHI)

信州大学・医学部・教授

研究者番号： 50273107

羽山 正義 (HAYAMA MASAYOSHI)

信州大学・医学部・准教授

研究者番号： 40377619

(3) 連携研究者

なし