

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461635

研究課題名(和文)胆道閉鎖症術後と乳幼児の肝機能障害におけるヘリコバクター・ヘパティカスの役割解明

研究課題名(英文)Evaluation of Helicobacter hepaticus infection in children with liver disorders and postoperative biliary atresia

研究代表者

奥田 真珠美 (Okuda, Masumi)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：40531091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヘリコバクター属はピロリ菌に代表されるが、ヘパティカス、ピリスなど様々な菌種が報告されている。ヒトにおける病原性は十分には明らかでない。小児の肝障害や胆道閉鎖症術後の肝障害とヘパティカス菌の関連を検討するため、抗体測定を行った。さらに、精度の高い血清診断法の開発を目的として、ヘパティカス菌(標準菌株)の全蛋白質を二次元電気泳動を行い、前記の研究で用いた血清を反応し、最も強く反応する蛋白質を同定した。ヘパティカス菌抗体保有率は肝障害なし0-15歳の小児33名で30.3%、肝障害あり9名では44.4%であった。イムノプロットでは小児血清が最も強く反応した蛋白はフラジェリンAであった。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter hepaticus (H. hepaticus) is a gram-negative, spiral shaped microaerophilic bacterium. Several studies have suggested the possibility that infection of this bacterium plays a role in the pathogenesis of liver diseases in humans. We evaluated the association between H. hepaticus and children with liver disorders. Furthermore, we detect the antigenic H. hepaticus protein recognized by child sera using 2-DE immunoblot analysis. Positive rate of H. hepaticus in children without and with liver disorders was 30.3% (10/33) and 44.4% (4/9), respectively. Total 25 proteins were identified as candidate antigens by LS-MS/MS after the 2-DE immunoblot analysis. Among the proteins, flagelin A was the most reactive protein, particularly against highly reactive sera, although low reactive sera also detected the spot slightly.

研究分野：感染症学 小児科学

キーワード：ヘリコバクター・ヘパティカス 小児 肝障害 イムノプロット 抗体測定

1. 研究開始当初の背景

*Helicobacter hepaticus* (*H. hepaticus* ヘパティカス菌)は *Helicobacter pylori* (*H. pylori* ピロリ菌)と同じヘリコバクター属の1菌種で、マウスにおいて活動性慢性肝炎や肝腫瘍、大腸炎の原因となる(Fox JG., 2011)。しかし、ヒトの疾患と *H. hepaticus* との関連はまだ充分解明されていない。この理由はヒトからの分離培養法が確立されていないこと、*H. hepaticus* 菌株の培養が困難なこと、血清抗 *H. hepaticus* 抗体測定など、その他の診断法が確立されていないことによるものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は(1)研究分担者らが開発した抗 *H. hepaticus* 抗体測定法である HR11-51 antigen capture ELISA (Fukuda Y et al. *Helicobacter* 14: 66-71, 2009)を用いて小児の抗体を測定する事、肝障害ありとなしで比較をすることである。

しかし、(1)に用いられたモノクロナール抗体は供給に限度があること、さらに精度の高い *H. hepaticus* の抗体測定系を確立するため、(2)小児血清が反応する *H. hepaticus* 抗原蛋白の解析を行い、抗体測定経路の作成を試みることを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

(1)小児における *H. hepaticus* 抗体測定と保有状況の検討

対象と方法：対象は小児科外来で採取され、保存されていた血清である。0~15歳の小児42名から得た血清(肝障害あり9名、なし33名)である。肝障害ありの一部の小児では追跡した。コントロールとして、肝障害のない生後6カ月児3名の血清を用いた。血清は連結不可能匿名化し、血清の使用に関して、兵庫医科大学倫理審査委員会の承認を得た。抗体測定はHR11-51 antigen capture ELISAを用いて行なった。96穴ELISAプレートにモノクロナール抗体であるHR11-51を固着し、破碎 *H. hepaticus* を反応させた。洗浄後、血清検体を反応(1次反応)し、洗浄後に抗ヒトIgG抗体を反応(2次反応)させた。非反応抗体を洗浄除去後に基質で発色させ、吸光度(OD値)を測定した。

(2)小児血清が反応する *H. hepaticus* 蛋白の解析

プロテオミクスによる *H. hepaticus* 菌抗原同定：*H. hepaticus* 菌から蛋白抽出を行い、2次元電気泳動を行った。CBBゲル染色を行った。染色部位のゲルの切り出しを行い、同部位の蛋白質を質量分析で蛋白解析(LC-MS/MS analysis)を行った。

小児血清が反応する *H. hepaticus* 蛋白の解析~イムノプロットを用いて：

対象は3~10歳の小児から得た血清8検体である。研究に先立って(1)と同様に兵庫医

科大学倫理審査委員会の承認を得た。8検体の内訳はHR11-51 antigen capture ELISAで高反応3検体、低反応1検体(このうち、1検体は胆道閉鎖症の患児から得たものでHR11-51 antigen capture ELISAに対して最も強く反応したものである)、既製の *H. hepaticus* lysate 抗原を用いて、ELISA法を実施し、高反応の血清2検体、低反応の血清2検体である。(表1)

表1：イムノプロット対象

番号	年齢	HR11-51	抽出抗原	<i>H. pylori</i> 抗体
A2	3		0.319	陽性
A78	10		0.354	陰性
A14	7		0.169	陽性
A66	7		0.161	陰性
7-H	5	0.265		実施せず
8-H	5	0.274		実施せず
30-H	5	0.249		実施せず
50-H	5	0.144		実施せず

*H. hepaticus* 標準株(ATCC51449)を入手し培養を行った。*H. hepaticus* 菌から蛋白抽出を行い、2次元電気泳動を行った。イムノプロットを実施するため、PVDF膜に転写した。1000倍希釈した小児血清を16時間反応させた。その後、非反応血清を洗浄除去した。抗ヒトIgG抗体を2時間反応させ、基質で発色させ、反応部位を同定した。

4. 研究成果

(1)小児における *H. hepaticus* (ヘパティカス菌)抗体保有率

コントロール3検体の平均±2SDをカットオフ値とした(カットオフ値0.18)。抗体保有率は肝障害ありでは9名中4名、肝障害なしでは33名中10名であった。(表2)

表2 肝障害の有無と *H. hepaticus* 抗体陽性率

肝障害	平均年齢	対象数	陽性	(%)
あり	3.3±3.4	9	4	44.4
なし	5.9±4.8	33	10	30.3
合計	5.4±4.7	42	14	33.3

肝障害あり抗体陽性4名の疾患名は乳児肝炎2名(乳児期発症 採血時1歳と2歳)、胆道閉鎖症術後1名(5歳)、原因不明の肝機能障害(11歳)1名であった。乳児肝炎の2名は約1年後の血清で抗体測定を実施した。2名ともに肝障害の改善とともに抗体も陰性となった。

肝障害なしの小児33名について、年齢層別抗体保有率を検討した。(表3)抗体保有率

は年齢とともに上昇した。

表 3 年齢層別 *H. hepaticus* 抗体陽性率

年齢	対象数	陽性	(%)
0~5	19	3	15.8
6~10	7	2	28.6
11~15	7	5	71.4
合計	33	10	30.3

*H. hepaticus* による抗体測定系はスタンダードとなる感染診断法が確立されていない、すなわち、ヒトから培養や抗原検出などによって直接感染を証明することは困難であることから、精度の検証が困難である。HRII-51 antigen capture ELISA に用いたモノクローナル抗体で抗体測定できる検体数が限られていたこと、さらに精度の良い抗体測定方法を模索するために、(2)の実験を行った。

(2) 小児血清が反応する *H. hepaticus* 蛋白の解析

プロテオミクスによる *H. hepaticus* 菌抗原同定：

LC-MS/MS analysis にて 25 の抗原蛋白を同定した。同定された蛋白は flagelinA、elongation factor Ts、DNA polymerase III subunit beta、flagelinB、elongation factor G、urease subunit beta、superoxide dismutase などである。

小児血清が反応する *H. hepaticus* 蛋白の解析～イムノプロットを用いて： で同定された蛋白解析結果を用いて、イムノプロットにおけるそれぞれの血清の各蛋白への反応性を定性で示した。一部を表に示した。今回対象とした小児血清が最も強く反応したのは flagelin A であった。(表 4, 5)

表 4：小児血清の各蛋白への反応性

血清	抗体 OD	flagerin A	flagerin B	FlgE
A2	0.319	□		
A78	0.354	□ □ □		□
A14	0.169	□		
A66	0.161	□		
7-H	0.265	□ □ □	□	□
8-H	0.274	□	□	
30-H	0.249	□		
50-H	0.144	□		

□：反応あり □ □ □: 強い反応あり

表 5：小児血清の各蛋白への反応性

血清	CdtB	elongation factor Ts	50S ribosomal P
A2		□	□
A78	□	□	
A14		□	
A66		□	
7-H	□	□	□
8-H	□		
30-H	□	□	
50-H			

□：反応あり □ □ □: 強い反応あり

flagelin A は HRII-51 antigen capture ELISA や既製の *H. hepaticus* lysate を抗原とし、ELISA 法陽性と判定された血清で特に強く反応したが、陰性と反応されたものでも弱い反応を認めた。flagelin は細菌の鞭毛を構成する蛋白であり、様々な細菌の構成蛋白のひとつである。最も強く反応する蛋白であることから、*H. hepaticus* 抗体測定に使うことができると考えたが、非特異的の反応が生じる可能性がある。今後、さらに特異的な flagelin 抗原蛋白を模索必要がある。

## 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 1 件)

Akada J., Okuda M., Hiramoto N., Kitagawa T., Zhang X., Kamei S., Ito A., Nakamura M., Uchida T., Hiwatani T., Fukuda Y., Nakazawa T., Kuramitsu Y., Nakamura K. Proteomic characterization of *Helicobacter pylori* CagA antigen recognized by child serum antibodies and its epitope mapping by peptide array. PLoS One. 2014 Aug 20;9(8):e104611. doi: 10.1371 査読有

[学会発表](計 1 件)

Okuda M., Akada J., Osaki T., Kitagawa T., Kuramitsu Y., Kamiya S., Fukuda Y. Detection of antigenic *Helicobacter hepaticus* protein recognized by child serum antibodies. CHRO conference, New Zealand Rotorua, November 4, 2015

[図書](計 0 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

奥田 真珠美 (OKUDA, Masumi)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：40531091

### (2) 研究分担者

神谷 茂 (KAMIYA, Shigeru)  
杏林大学・医学部・教授  
研究者番号：10177587

菊地 正悟 (KIKUCHI, Shogo)  
愛知医科大学・医学部・教授  
研究者番号：40224901

福田 能啓 (FUKUDA, Yoshihiro)  
兵庫医科大学・医学部・名誉教授  
研究者番号：60148640

大崎 敬子 (OSAKI, Takako)  
杏林大学・医学部・准教授  
研究者番号：90255406

近藤 宏樹 (KONDOU, Hiroki)  
大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・  
研究員  
研究者番号：10373515

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：