

熊本大学学術リポジトリ

Kumamoto University Repository System

Title	新興感染症菌ヘリコバクター・シネディの主要抗原とその感染疫学に関する研究
Author(s)	岩下, 博文
Citation	
Issue date	2008-03-25
Type	Thesis or Dissertation
URL	http://hdl.handle.net/2298/11104
Right	

学位論文
Doctor's Thesis

新興感染症菌ヘリコバクター・シネディの主要抗原とその感染疫学に関する研究
(Study on the major antigen of an emerging pathogen *Helicobacter cinaedi* and
its epidemiology)

岩下 博文
Hirofumi Iwashita

熊本大学大学院医学教育部博士課程
臨床医科学専攻消化器内科学

指導教員

赤池 孝章 教授
熊本大学大学院医学教育部博士課程病態制御学専攻微生物学

佐々木 裕 教授
熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻消化器内科学

2008年3月

学 位 論 文

Doctor's Thesis

論文題名 : 新興感染症菌ヘリコバクター・シネディの主要抗原とその
感染疫学に関する研究
(Study on the major antigen of an emerging pathogen *Helicobacter
cinaedi* and its epidemiology)

著者名 : 岩下博文
Hirofumi Iwashita

指導教員名 : 微生物学分野 赤池 孝章 教授
消化器内科学分野 佐々木 裕 教授

審査委員名 : 免疫識別学分野 西村 泰治 教授
病態情報解析学分野 安東 由喜雄 教授
細胞病理学分野 竹屋 元裕 教授
消化器外科学分野 馬場 秀夫 教授

2008年3月

要旨

【 目的 】 *Helicobacter cinaedi* はヒトやその他の動物の腸管や肝臓から検出される腸肝ヘリコバクター (enterohepatic *Helicobacter* species) に属し、1984年にヒトへの感染が初めて確認された新興感染症菌である。*H. cinaedi* 感染の報告例はほとんどが日和見感染症であった。最近我々は、整形外科術後発症した *H. cinaedi* 菌血症・蜂窩織炎 11 症例を経験した。これらの患者には明らかな免疫異常はなく、これまで報告されている *H. cinaedi* 感染症例とは明らかに異なっていた。*H. cinaedi* は通常の微好気培養での増殖効率が悪いいため培養による検出が難しく、さらに血清診断法も確立されていないため、感染経路などの疫学や感染病態については不明な点が多い。そこで本研究では、*H. cinaedi* の病原性および疫学的特性を明らかにするために、今回我々が経験した *H. cinaedi* 菌血症・蜂窩織炎の症例の分析、分離菌の分子疫学的解析を行うと共に、ヒト感染における *H. cinaedi* 主要抗原蛋白質遺伝子の同定を行った。さらに大腸菌を用いた発現系により得られた同主要抗原組換え蛋白質を用いて、ウエスタンブロットおよび ELISA による *H. cinaedi* の血清診断法を確立し、*H. cinaedi* の感染疫学に関する解析を行った。

【 方法 】 整形外科術後に菌血症・蜂窩織炎を発症した 11 例の患者の血液培養・便培養から得られた臨床分離菌について、16S rRNA および *hsp60* 遺伝子の塩基配列を決定し、*Helicobacter* 属菌株内における系統分類学的解析を行った。また、パルスフィールドゲル電気泳動によるゲノム DNA の制限酵素断片パターンの解析および random amplified polymorphism DNA 解析により標準株および分離株のゲノムの類似性を調べた。*H. cinaedi* 主要抗原の同定では、まず、*H. cinaedi* のゲノム DNA 断片をプラスミドに組み込んだライブラリーを作製し、これを大腸菌に導入した。形質転換した大腸菌コロニーを *H. cinaedi* 菌体ライセートで免疫したウサギ血清を使ってイムノスクリーニングすることにより、主要抗原蛋白質を発現しているクローンを単離した。同蛋白質遺伝子の塩基配列を決定し、大腸菌にて His-tag 組換え蛋白質を発現させた。さらにニッケルアフィニティーカラムで精製した組換え蛋白質を用いて *H. cinaedi* 感染患者や対照群の血清抗体の検出を行った。

【 結果と考察 】 菌血症・蜂窩織炎患者から分離された細菌は、16S rRNA 塩基配列の解析から *H. cinaedi* と同定された。分離された 13 株は 16S rRNA、*hsp60* の遺伝子解析、および、パルスフィールドゲル電気泳動により、近縁の 2 グループに分類された。また、*H. cinaedi* 臨床分離株から作製した遺伝子ライブラリーのイムノスクリーニングにより、感染者の血清が強く反応する 30 kDa の主要抗原蛋白質をコードす

る遺伝子を同定した。これをもとに作製した組換え蛋白質は、ウエスタンブロットにおいて、*H. cinaedi* 感染患者血清と強力な免疫反応性を示した。また、この組換え蛋白質を用いた ELISA では、*H. cinaedi* 感染患者の血清は、他のグループ (健常人、*H. pylori* 感染者、および新生児) と比較して、有意に高い抗体価を有していた。しかし、健常人や *H. pylori* 感染者の中にも、少数の割合 (35 人中 3 人) で本抗原に対する中等度以上の抗体価を有するものが見られ、*H. cinaedi* の既往感染やキャリアーである宿主が存在する可能性が示唆された。

[結論] *H. cinaedi* 感染症はこれまで考えられていたような稀な日和見感染症ではないと考えられる。今回私が同定した *H. cinaedi* 主要抗原を血清診断に応用することにより、*H. cinaedi* 感染症の疫学・病態解明が期待される。

発表論文リスト

[1]. Iwashita, H., Fujii, S., Kawamura, Y., Okamoto, T., Sawa, T., Masaki, T., Nishizono, A., Higashi, S., Kitamura, T., Tamura, F., Sasaki, Y., and Akaike, T. Identification of the Major Antigenic Protein of *Helicobacter cinaedi* and Its Immunogenicity in Humans with *H. cinaedi* Infections. *Clin Vaccine Immunol*, 15: 513-521, 2008.

[2] Kitamura, T., Kawamura, Y., Ohkusu, K., Masaki, T., Iwashita, H., Sawa, T., Fujii, S., Okamoto, T., and Akaike, T. *Helicobacter cinaedi* cellulitis and bacteremia in immunocompetent hosts after orthopedic surgery. *J Clin Microbiol*, 45: 31-38, 2007.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました熊本大学大学院医学薬学研究部微生物学分野 赤池孝章教授ならびに消化器内科学分野 佐々木裕教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究において、ご協力とご理解をいただきました熊本整形外科病院 北村歳男医師、東修一医師、中村正医師および病院関係者の方々に深く感謝の意を表します。

本研究における、主に細菌の遺伝学的解析に関してご協力とご助言を賜りました、愛知学院大学薬学部微生物学講座 河村好章教授に深く感謝の意を表します。細菌の培養、菌株の維持などにご協力いただいた(財)化学及血清療法研究所 正木孝幸博士に心より感謝いたします。また、貴重な血清を分与していただいた大分大学医学部感染分子病態制御講座 西園晃教授にお礼を申し上げます。

本研究においてご指導いただきました熊本大学大学院医学薬学研究部微生物学分野 澤智裕准教授、岡本竜哉助教、藤井重元助教、同消化器内科学分野 田村文雄助教ならびに株式会社エフェクター細胞研究所 芥照夫博士に深い感謝の意を表します。

本研究にご協力いただきました熊本大学医学部微生物学分野ならびに消化器内科学分野の諸氏に心より感謝の意を表します。

目次

要旨	1
発表論文リスト	3
謝辞	4
目次	5
略語一覧	8
第1章 研究の背景と目的	9
1.1 新興感染症菌 <i>Helicobacter cinaedi</i> の特徴	
(a) <i>Helicobacter cinaedi</i> とは	
(b) <i>H. cinaedi</i> の宿主と病原性	
(c) <i>H. cinaedi</i> の検出・培養同定について	
(d) これまで報告された <i>H. cinaedi</i> の血清免疫学的研究について	
(e) <i>H. cinaedi</i> の遺伝子情報	
1.2 本研究の目的	
第2章 材料および方法	16
2.1 試薬	
2.2 血液または糞便からの細菌の培養と同定	
2.3 臨床分離株の菌種の同定	
2.4 16S rRNA と <i>hsp60</i> の遺伝子配列を使用した系統分類学的解析	
2.5 パルスフィールドゲル電気泳動を使ったゲノムタイピング	
2.6 Random amplified polymorphism DNA による解析	
2.7 免疫学的解析に用いた細菌株	
2.8 <i>H. cinaedi</i> の保存と液体培養	
2.9 抗 <i>H. cinaedi</i> 菌体および抗 <i>H. cinaedi</i> 主要抗原蛋白質抗血清の作製	
2.10 ヒト <i>H. cinaedi</i> 感染患者、疑感染者および対照群血清	
2.11 <i>H. cinaedi</i> 全菌体抗原を用いたウエスタンブロットティング	
2.12 <i>H. cinaedi</i> 全菌体抗原を用いた ELISA 解析	
2.13 <i>H. cinaedi</i> 遺伝子ライブラリーの作製	

- 2.14 *H. cinaedi* 主要抗原蛋白質のイムノスクリーニング
- 2.15 *H. cinaedi* 抗原遺伝子の塩基配列の決定
- 2.16 *H. cinaedi* 抗原蛋白質発現ベクターの作製
- 2.17 *H. cinaedi* 抗原組換え蛋白質の発現と精製
- 2.18 *H. cinaedi* 抗原組換え蛋白質を用いたウエスタンブロットティング
- 2.19 *H. cinaedi* 抗原の免疫沈降
- 2.20 *H. cinaedi* 抗原組換え蛋白質を用いた ELISA

第 3 章 結果 26

- 3.1 症例解析
- 3.2 細菌の培養と分離
- 3.3 細菌の同定と系統分類学的解析
- 3.4 小括 1
- 3.5 ウエスタンブロットティングによる血清抗 *H. cinaedi* 抗体の解析
- 3.6 ウエスタンブロットティングによる *H. cinaedi* 主要抗原蛋白質の特定
- 3.7 *H. cinaedi* 全菌体抗原によるヒト血清の ELISA 解析
- 3.8 *H. cinaedi* 遺伝子ライブラリーの作製
- 3.9 *H. cinaedi* 主要抗原蛋白質のイムノスクリーニング
- 3.10 *H. cinaedi* 抗原蛋白質 (HcMAP30) の塩基配列およびアミノ酸配列決定
- 3.11 HcMAP30 の発現ベクターの作製
- 3.12 HcMAP30 と菌体内主要抗原との同一性の確認
- 3.13 His-HcMAP30 ウエスタンブロットティングによるヒト血清 *H. cinaedi* 抗体の解析
- 3.14 HcMAP30 ELISA によるヒト血清 *H. cinaedi* 抗体の定量的解析
- 3.15 小括 2

第 4 章 考察 59

- 4.1 *H. cinaedi* 感染発症の背景
- 4.2 *H. cinaedi* 分離株の分子疫学と感染経路
- 4.3 ヒト以外の *H. cinaedi* の自然宿主
- 4.4 *H. cinaedi* 感染の発症病理
- 4.5 *H. cinaedi* 感染の治療と予後
- 4.6 ヒト感染における *H. cinaedi* 主要抗原蛋白質の同定
- 4.7 患者血清抗体価の変動と時間的推移

4.8	主要抗原蛋白質の遺伝子配列から推定される性質	
4.9	<i>H. cinaedi</i> 主要抗原蛋白質の免疫交差性	
4.10	組換え蛋白質を抗原とした ELISA の有用性	
第 5 章	結語	67
第 6 章	参考文献	68

略語一覧

AIDS: acquired immunodeficiency syndrome
BCA: bicinchoninic acid protein assay
BSA: bovine serum albumin
CBB: Coomassie brilliant blue
CLOs: *Campylobacter*-like organisms
CDT: cytolethal distending toxin
ECL: enhanced chemiluminescence
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
HcMAP30: 30 kDa *Helicobacter cinaedi* major antigenic protein
His-HcMAP 30: His-tagged HcMAP30
HIV: human immunodeficiency virus
IPTG: isopropyl 1-thio- β -D-galactoside
LB: Luria-Bertani
MRI: magnetic resonance imaging
NCBI: National Center for Biotechnology Information
OPD: *o*-phenylenediamine dihydrochloride
ORF: open reading frame
PBS: phosphate-buffered saline
PCR: polymerase chain reaction
PFGE: pulsed-field gel electrophoresis
PVDF: polyvinylidene fluoride
RAPD: random amplified polymorphism DNA
rbs: ribosome binding site
SDS: sodium dodecylsulfate
SDS-PAGE: sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TBS: Tris-buffered saline
T-TBS: 0.1% Tween 20-Tris-buffered saline
T-PBS: 0.05% Tween 20-phosphate-buffered saline
Tris: tris (hydroxymethyl) aminomethane
Tween 20: polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate

第1章 研究の背景と目的

1.1 新興感染症菌*Helicobacter cinaedi*の特徴

(a) *Helicobacter cinaedi*とは

1983~1984年に、シアトルの性感染症クリニックで同性愛者(ホモセクシュアル)男性の直腸からの病原体検出を大規模に行った際に、従来知られている多数の病原体のほか、既知の*Campylobacter*とは分類上異なるが性状の似ているらせん状細菌が高頻度に検出された(Quinn et al. 1984)。これらのらせん菌は、消化管症状のあるホモセクシュアルの男性らから高頻度(26/158, 16%)に分離同定され、一方、無症状のホモセクシュアル男性のグループからはそれより低頻度(6/75, 8%)に分離され、無症状の異性愛者男女からは分離されなかった(0/150)。Fennellらはこれら細菌を*Campylobacter-like organisms (CLOs)*と呼称し、CLO-1、CLO-2、CLO-3に分類した(Fennell et al. 1984)。その後、CLO-1は*C. cinaedi*、CLO-2は*C. fennelliae*と名づけられ、*Campylobacter*属に編入された(Totten et al. 1985)。“*cinaedi*”とはラテン語で「ホモセクシュアルの」を意味する形容詞句である。その後、1989年にGoodwinらによって初めて*Helicobacter*属が提唱され(Goodwin et al. 1989)、1991年のVandammeらによる*Campylobacter*属菌を中心とした大幅な改編が行われた際にこの*C. cinaedi*は*C. fennelliae*とともに*Campylobacter*属から*Helicobacter*属に移行され、現在に至っている(Vandamme et al. 1991)。

なお、現在、*Helicobacter*属の所属菌種は23種類以上あるとみられ、コンセンサスが得られている菌種をまとめたものを、次頁の表1に示した。*Helicobacter cinaedi*は腸管に棲息する*Helicobacter*属菌の1種である。これら腸管棲息型の*Helicobacter*は数が多いが、中には胆汁耐性で、胆管・肝臓に侵入し炎症を起こし得ると推定されている菌種もあり(*H. bilis*, *H. canis*, *H. hepaticus*, *H. pullorum*)、これらをまとめて腸肝*Helicobacter (enterohepatic Helicobacter species)*と呼称することが多い。これに対して、胃に棲息すると考えられる*Helicobacter*属菌を胃*Helicobacter (gastric Helicobacter species)*と呼び、この代表的な菌種が、*H. pylori*である。

表1 *Helicobacter* 属細菌の分類

	Species	Natural host
Gastric	<i>H. acinonychis</i>	cheetah
	<i>H. aurati</i>	hamster
	<i>H. bizzozeroni</i>	dog
	<i>H. felis</i>	cat, dog
	<i>H. mustelae</i>	ferret
	<i>H. pylori</i>	human , rhesus macaque
	<i>H. salomonis</i>	dog
Enterohepatic	<i>H. bilis</i>	mouse, dog, human
	<i>H. canadensis</i>	human
	<i>H. canis</i>	dog, human
	<i>H. cinaedi</i>	human , hamster
	<i>H. cholecystus</i>	hamster
	<i>H. fennelliae</i>	human
	<i>H. ganmani</i>	mouse
	<i>H. hepaticus</i>	mouse
	<i>H. mesocricetorum</i>	hamster
	<i>H. muridarum</i>	mouse, rat
	<i>H. pamntenis</i>	bird, swine
	<i>H. pullorum</i>	chicken, human
	<i>H. rodentium</i>	mouse
	<i>H. trogontum</i>	rat
	<i>H. typhlonicus</i>	mouse
<i>H. winghamensis</i>	human	

Solnick and Schauer. *Clin Microbiol Rev* 14: 59-97, 2001.をもとに改変.

(b) *H. cinaedi*の宿主と病原性

H. cinaedi は主に腸管に棲息すると考えられている。ヒトへの感染に関しては、腸炎や直腸炎を呈しているホモセクシュアル男性らの直腸から最初に分離されて以来、腸炎患者の糞便からの分離報告が多い (Grayson et al. 1989; Tee et al. 1987)。本菌による菌血症については、1984年に、結核に罹患した2人のホモセクシュアル男性のケースレポートが最初の報告である (Pasternak et al. 1984)。当時はまだ、菌種名が確定しておらず CLO-1 と記載されていた。この例では発熱を主症状とし、消化管症状はないものの便培養がなされていないため、消化管感染の有無は不明である。発熱の原因は結核菌よりむしろ本菌であると著者らは考察している。また、1987年には、acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) に罹患した29才のホモセクシュアル男性における *H. cinaedi* の菌血症の症例が報告された (Cimolai et al. 1987)。この患者は発熱に加え血便を呈し本菌との関連も推定されたが、便培養からは本菌は検出されなかった (ただし、培養法に問題があったと著者らは考察している)。さらに1987年には *H. cinaedi* と *H. fennelliae* の2つの菌種による菌血症を続けて起こした HIV (human immunodeficiency virus) 陽性 (AIDS は発症していない) 両性愛者 (バイセクシャル) 男性の症例が報告された (Ng et al. 1987)。以後、腸炎患者の腸管 (糞便)、あるいは発熱患者の血液からの *H. cinaedi* の検出が散発的に報告されている (Grayson et al. 1989; Vandamme et al. 1990; Decker et al. 1992; Mammen et al. 1995)。これらの報告から、*H. cinaedi* は腸管から血管に侵入し、菌血症を起こすものと推察される。この特徴は他の enterohepatic species (*H. canis*, *H. fennelliae*) においても報告されているが (Leemann et al. 2006; Hsueh et al. 1999) 報告症例数は圧倒的に *H. cinaedi* に多い。さらに、この血管侵襲性は、*Campylobacter* 属細菌でもしばしば認められる特徴である。

菌血症例では発熱 (38~39℃台) が主症状であるが、腸管感染以外にも様々な部位での蜂窩織炎や関節炎を伴っていることが多く、また、本菌による髄膜炎を発症した新生児の髄液からの分離例 (Orlicek et al. 1993) や関節炎を呈した男性の膝関節液からの分離例もあり (Lasry et al. 2000)、菌血症の原発感染巣あるいは菌血症を介した二次感染巣としてこれらの諸病態は重要である。

菌血症の症例集積報告としては、1982年から1990年まで米国のCenters for Disease Control (CDC) で確認された23例をまとめたKiehlbauchらの報告 (22例: 血液から分離, 1例: 糞便から分離) がある (Kiehlbauch et al. 1994)。この報告は特に蜂窩織炎との関連性に注目しており、24才から82才の感染患者 (平均44才, 83%が男性) のうち、43%の症例で蜂窩織炎が確認されており、しかも再発率が56% (5/9 例) と高かった。67% が明らかなimmunocompromised host (HIV感染陽性、肺癌、結腸癌、肝硬変、糖尿病など) であり、その他ではアルコール依存症の症例もあった。HIV陽性は45%の症例でみられた。消化管症状 (腹痛, 下痢など) は43%の症例に認められている。

また、1984年から1994年までの症例報告と自験例7例を加えたBurmanらの報告 (全18例) によると (Burman et al. 1995)、自験7例中、6例はHIV感染のあるホモセクシュアル男性で1例がアルコール依存症の女性であり、うち、4例に蜂窩織炎が、2例に関節炎が認められている。その他の集積症例検討から、本菌による菌血症は、何らかの基礎疾患 (AIDS、癌) による免疫能力の低下した症例に多いことがわかる。ただし、基礎疾患を伴わないimmunocompetent hostに発症した菌血症の報告もあり (Lasry et al. 2000; Vandamme et al. 1990)、特に最近、48歳の明らかな免疫異常のない男性に発症した*H. cinaedi*による心室細動を伴った心筋心膜炎が報告され、注目されている (Lewis et al. 2007)。

一方、*H. cinaedi*は、ヒト以外でも様々動物 (サル、ハムスター、イヌ、ネコ、キツネ、ラット、パンダ) の腸管 (糞便) からの分離が報告されており (Fernandez et al. 2002; Flores et al. 1990; Fox et al. 2001; Gebhart et al. 1989; Kiehlbauch et al. 1995; Solnick and Schauer 2001)、自然界での保有宿主域は*Helicobacter*属の中では比較的広い。一般にこれらの動物では、腸炎を呈することが多いが、ハムスターにおいては症状を有することなく腸管に存在し、主要な自然宿主 (あるいはキャリアー) の一つと認識されている (Gebhart et al. 1989)。

この様に、本菌感染症は新興感染症であると同時に、かつ人畜共通感染症として位置づけられている。

(c) *H. cinaedi* の検出・培養同定について

上述したように、*H. cinaedi*や*H. fennelliae*は旧来は、同じように腸管に棲息すると考えられている*Campylobacter*属に分類されていた。微好気培養が必要な点など、培養法でも*Campylobacter*と共通する部分も多く、分離培養に*Campylobacter*用の血液寒天培地が用いられている。例えば実際の糞便培養にあっては、これら腸管棲息型の*Helicobacter*は*Campylobacter*と混在して培養されることになるが、一般的に*Campylobacter*が2~3日でコロニーを形成するのに対し、*Helicobacter*はそれより発育が遅く、5~6日を必要とする場合が多い。このことは培養検査でこれらenterohepatic *Helicobacter*が見落とされる要因の一つとなっている。また、分離された菌種の同定も難しい場合が多く、生化学的な検査だけでは確定に至らないことが多い。*H. cinaedi*を含めたenterohepatic *Helicobacter* speciesは16S rRNA遺伝子配列やDNA-DNAハイブリダイゼーションなどのゲノム解析により最終的に同定されている報告が多い。この様に本菌は臨床検体に存在していても見過ごされる場合があることに加え、同定に特殊なゲノム検査技術を必要とするため、通常の臨床検査では分離同定が難しい細菌である。また、病原菌としての認識度が低いこともあり、これまで注目されてこなかった。

一方、培養法による検出が難しいことと関連して、それ以外の方法として polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて enterohepatic *Helicobacter* species の DNA を検出した報告が散見される。例えば、胃生検組織から属特異的プライマーを用いて 16S rRNA 遺伝子配列部分を増幅し、*H. cinaedi* のそれとほぼ一致したサンプルがあったとする報告 (Pena et al. 2002) がある。この報告は胃粘膜組織に本菌が存在する可能性を示唆している。*H. pylori* はウレアーゼを有し、胃酸を中和することにより胃内での生息が可能であるが、ウレアーゼ陰性である *H. cinaedi* が胃に生息するとすればそのメカニズムは興味深い。ただし分離培養による検出と違い、PCR 法での検出は生きた菌の存在を必ずしも示しておらず今後さらなる検討を必要とする。

(d) これまで報告された *H. cinaedi* の血清免疫学的研究について

Flores らは、本菌の全菌体ライセートを抗原として、本菌感染症患者 13 例 (直腸感染患者: 11 例, 菌血症患者: 2 例) の血清および本菌免疫ウサギの血清との反応をウエスタンブロットを行って解析し、本菌蛋白質中におけるいくつかの抗原の存在を確認した (Flores et al. 1989)。その結果、13 例全員の血清において 96、64、59、47、41 kDa の抗原が、10 例の血清においてはさらに 29 kDa の抗原、7 例の血清においてはさらに 12.4 kDa の抗原がそれぞれ程度の差はありながらも検出された。また、対照者 (健康人) 血清 においては、10 例全てにおいて 59 kDa と 64 kDa の抗原が弱いながら検出された。うち 3 人の対照者血清においてはさらに 96 kDa または 47 kDa の抗原が、1 例の対照者血清ではさらに 96 kDa と 29 kDa の 2 つの抗原が弱く検出された。これらの結果をまとめたものを表 2 に示した。免疫ウサギ血清における反応ではこれらを含む約 10 個の抗原が確認された。これら結果から、Flores らは、少なくとも 6 つ (29~96 kDa) の抗原が本菌ヒト感染患者で抗原となり得るがそれぞれの抗原に対する抗体価は患者間で大きなバラツキがあること、さらに対照者の中に同属菌への感染既往があるか他菌種との交差反応を示している可能性がある」と結論づけている。しかしながら、ヒト感染における *H. cinaedi* の特異的な主要抗原は未だに同定されていない。

(e) *H. cinaedi* の遺伝子情報

本菌は、現在、全体のゲノム情報がなく、16S rRNA と数種類の遺伝子のみが公開されている。例えば *Campylobacter* や enterohepatic *Helicobacter* の多く (*H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. pullorum*, *H. canis*) が産生する毒素である cytolethal distending toxin (CDT) の遺伝子を *H. cinaedi* も有していることが報告されている (Taylor et al. 2003)。ちなみに、*Helicobacter* 属細菌の中で全ゲノム情報が公開されている菌種は、今のところ、*H. acinonychis* (GenBank accession no. AM260522, Eppinger et al. 2006), *H. pylori* (GenBank accession no. AE000511; CP000241; AE001439), *H. hepaticus* (GenBank accession no.

AE017125, Suerbaum et al. 2003) の 3 菌種のみである。

表2 ウエスタンブロットによる *H. cinaedi* 抗原蛋白質の解析 (Flores らによる)

抗原蛋白質 (kDa)	<i>H. cinaedi</i> -infected patients (13 例)			Controls (10 例)		
	7/13	3/13	3/13	1/10	3/10	6/10
96	○	○	○	○	*	
64	○	○	○	○	○	○
59	○	○	○	○	○	○
47	○	○	○		*	
41	○	○	○			
29	○	○		○		
12.4	○					

Flores et al. *J Infect Dis* 159: 635-640, 1989. をもとに作成. ○のサイズの蛋白質のバンドが認められた. *はこれらいずれか (96 または 47 kDa) の蛋白質 1 つと反応したことを示す.

1.2 研究の目的

2004年から2005年にかけて、熊本市の熊本整形外科病院において、整形外科手術後の患者に菌血症を伴う蜂窩織炎が連続して発症するという小規模のアウトブレイクがあり、我々はその疫学的調査および病原性解析を行った。血液培養にて11例にグラム陰性らせん状桿菌が検出され、16S rRNA 遺伝子配列や標準株とのDNA-DNAハイブリダイゼーションの結果によって*H. cinaedi*と同定した (Kitamura et al, 2007)。

我々が経験した事例は、①整形外科手術後平均1ヶ月後に、菌血症(敗血症)と、手術を受けた側の四肢(術創とは離れた部位)に蜂窩織炎を発症する、②明らかな免疫異常がない(immunocompetent)宿主において発症している、③同一医療機関で短期間に集中して発生しているアウトブレイクである、という点が世界的に見てもユニークであった。しかし、*H. cinaedi*感染症は、感染経路などの感染疫学や病原性、そして感染に伴う宿主の免疫反応など不明な点が多いのが現状である。さらに前述のごとく、*H. cinaedi*感染症が人畜共通感染症であることや、院内感染・日和見感染の多様化に伴って、今後感染の拡大が危惧されている。

*H. cinaedi*は、上述したように培養検出の難しい菌の一つであり、適切な培養・同定技術の開発が望まれている。臨床検査室における市販のガスパックを用いた通常の微好気培養法では、これまでその多くが見過ごされてきた可能性が高い。実際、我々は、上記11症例と同様の症状・臨床経過を示し*H. cinaedi*感染が疑われたにもかかわらず培養検査で本菌が検出されなかったいくつかの症例を経験した。さらに、これらの症例の血清には、本菌の菌体ライセートを抗原とするELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) において抗体価の上昇していたケースがみられた (Kitamura et al. 2007)。

この様な知見を踏まえ、本研究では、未だ不明な点が多い*H. cinaedi*の病原性発現のメカニズムおよび感染疫学的特性を解明することを目指し、以下の解析を行った。

- (1) *H. cinaedi* 菌血症・蜂窩織炎の症例の分析、分離菌の分子疫学
- (2) ヒト感染における*H. cinaedi* 主要抗原蛋白質の同定
 - (a) *H. cinaedi* 遺伝子ライブラリー作製と主要抗原遺伝子の同定
 - (b) 主要抗原組換え蛋白質の作製とそれを応用した血清学的検査の確立
 - (c) *H. cinaedi* の感染疫学

第2章 材料および方法

2.1 試薬

試薬は全て特級以上のグレードのものを使用した。

2.2 血液または糞便からの細菌の培養と同定

発熱と蜂窩織炎を呈した患者から、10 ml の血液 (動脈または静脈) を無菌操作にて血液培養ボトルに採血し、自動分析装置 BD BACTEC Plus Aerobic/F system (Becton Dickinson 社) を使用して培養した。同システムにより陽性と判定された試料は、培養液の一部を、*Campylobacter* 羊血液寒天培地 (Becton Dickinson 社) に植菌し、高湿度、水素含有微好気環境 (キャンピパウチシステム, Becton Dickinson 社)、37°C、で3~5日間培養した。コロニーを形成した菌はグラム染色性と形態を観察した。糞便からの細菌の培養も、血液からの試料と同様の方法で、*Campylobacter* 羊血液寒天培地により培養を行った。らせん状のグラム陰性菌と確認された細菌は、遺伝子解析 (以下2.3~2.6参照) により菌種を同定した。

2.3 臨床分離株の菌種の同定

H. cinaedi 標準株 (CCUG 18818^T)、*H. canis* (NCTC 12379^T) および今回得られた臨床分離株から、DNA を抽出し (Marmur 1961)、photobiotin によりラベルした後、定量的マイクロプレート DNA-DNA ハイブリダイゼーション法 (Ezaki et al. 1989) により、菌種を同定した。

2.4 16S rRNA と *hsp60* の遺伝子配列を使用した系統分類学的解析

患者血液または糞便から得られた *H. cinaedi* 臨床分離株の 16S rRNA と *hsp60* の遺伝子配列を特異的プライマーを使った PCR によって増幅し (Ezaki et al. 1994; Kawamura et al. 1995; Mikkonen et al. 2004)、塩基配列を Dye Terminator Reaction Kit (Applied biosystems 社) および自動 DNA シーケンサー (モデル 3100, Applied Biosystems 社) を使って決定した。それぞれの分離株について、16S rRNA 遺伝子では約 1,430 bp、*hsp60* 遺伝子では約 530 bp の塩基配列を決定した。これらの塩基配列をもとにした近縁の菌種の検索では、FASTA Search System (DNA DataBank of Japan (DDBJ), <http://www.ddbj.nig.ac.jp>, Pearson and Lipman 1988) を使用した。DDBJ、

GenBank および European Molecular Biology Laboratory (EMBL) のデータベースから得た *Helicobacter* 属の近縁の菌種の 16S rRNA 遺伝子および *hsp60* 遺伝子の配列をもとに、CLUSTAL-X ソフトウェア (Thompson et al. 1994) を使って各株間の系統分類学的関係を解析した。系統樹は TreeView ソフトウェア (Page 1996; Pearson and Lipman 1988) を使って作成した。

2.5 パルスフィールドゲル電気泳動を使ったゲノムタイピング

パルスフィールドゲル電気泳動 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) による *H. cinaedi* 標準株および臨床分離株のゲノム DNA の制限酵素断片パターンを解析した (Ohkusu et al. 2004)。まず菌体をリゾチーム、sodium dodecylsulfate (SDS)、およびプロテアーゼ K によって溶解し、ゲノム DNA を制限酵素 *Spe I* により切断した。CHEE-DR III システム (Bio-Rad 社) を使って、パルス時間 5.3~34.9 秒の直線的増加で 6V/cm の電場で 20 時間、14°C において 1%アガロースゲル電気泳動を行い、DNA を分離した。 λ DNA ラダー (New England Biolabs 社) を DNA サイズマーカーとして用いた。ゲルはエチジウムブロマイドによる染色後、紫外線による蛍光により DNA を可視化し写真撮影した。各菌株のゲノム DNA のバンドパターンについては、撮影した写真を元にして、視覚的に類似性を解析した。

2.6 Random amplified polymorphism DNA による解析

Random amplified polymorphism DNA (RAPD) による解析を既報 (Akopyanz et al. 1992; Burucoa et al. 1999) に準じて行った。*Helicobacter* 属菌の RAPD タイピングのために 2つのプライマー (プライマー1281 [5'-AAC GCG CAA-3'], プライマー1283 [5'-GCG ATC CCC A-3']) を使い、PCR は以下の反応液組成で行った。

テンプレート DNA (~20 ng/ μ l)	1 μ l
10 \times PCR buffer (20 mM MgCl)	5 μ l
2.5 mM dNTPs	2.5 μ l
4 μ M プライマー	5 μ l
Ex-Taq DNA ポリメラーゼ (5 U/ μ l) (Takara 社)	0.5 μ l
水	36 μ l
計	50 μ l

PCR 反応条件は以下のように行った

94°C	2分	}	1 cycle
37°C	1分		
72°C	4分		
94°C	2分	}	29 cycles
37°C	3分		
72°C	7分		

PCR 反応後、1.0%アガロースゲル電気泳動と、エチジウムブロマイドによる染色を行い、フィンガープリント解析を行った。

2.7 免疫学的解析に用いた細菌株

H. cinaedi 菌体ライセートを抗原として用いる ELISA、ウエスタンブロッティングでは、臨床分離株として得られた *H. cinaedi* を使用した。予備実験において、遺伝子的に異なる2つのクローン、すなわち前期のアウトブレイクの株 (株番号 923, 表 3)、後期のアウトブレイクの株 (株番号 1035, 表 3) を比較したところ、同様の反応性を認めたため、その後の実験 (遺伝子ライブラリーの作製, ウサギの感作など) には、株番号 1035 の菌株を使用した。

また、その他の菌株として、*H. pylori* ATCC 43504、*H. hepaticus* PAGU 604 (LMG 16316) (河村好章教授から分与)、*Campylobacter jejuni* (臨床分離株, 正木孝之博士から分与) を主にウエスタンブロッティングに用いた。

2.8 *H. cinaedi* の保存と液体培養

2.2~2.6 により一度分離培養・同定した *H. cinaedi* 菌株の保存は、プレメディア HK 半流動培地 (極東製薬) を用いて行った。平板培地から保存を行う場合は、コロニーを白金耳から直接または綿棒を使って (滅菌生理食塩水で懸濁) 集菌したものをスポイドで取り、半流動培地の表面から 5~7 mm の深さに接種した。半流動培地から継代する場合は、直接スポイドで取り同様に接種した。継代頻度は 1 ヶ月に 1~2 度とし、保存温度は 37°C、5% CO₂ で行った。保存状態からの平板培地による増菌は、上述 (2.2 参照) のように *Campylobacter* 羊血液寒天培地 (Becton Dickinson 社) へ植菌し、37°C、高湿度で水素を含む微好気環境 (キャンピパウチシステム, Becton Dickinson 社) で 3~5 日間培養し行った。また、凍結保存する場合は、液体培養により得られた菌

を遠心 (2,000 × g) により集菌し、さらに生理食塩水で2回洗浄した後、滅菌 10% スキムミルクで懸濁し、迅速に-80°Cにて保存した。

また、液体培養は、*Campylobacter* ヒツジ血液寒天培地 (Becton Dickinson 社) で微好気状態 (キャンピパウチシステム, Becton Dickinson 社) で培養した菌体を生理食塩水に懸濁し、ブレインハートインヒュージョン液体培地に植菌した。これをデシケーター内に収めた後、適度な微好気環境が得られるよう、真空ポンプで大気を1回吸引し、混合ガス (H₂: 10%, CO₂: 10%, N₂: 80%) に置換し、37°C で3~6日培養した。

2.9 抗 *H. cinaedi* 菌体および抗 *H. cinaedi* 主要抗原蛋白質抗血清の作製

H. cinaedi に対する抗血清作製には、ウサギ (日本白色種, オス) を使用した。*Campylobacter* 羊血液寒天培地 (Becton Dickinson 社) にて培養し遠心 (6,000 × g) により回収した *H. cinaedi* 菌体を phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) に懸濁 (2.0 × 10⁹ CFU/ml) し、超音波破碎 (Insonicator 201M Kubota, 200 ワット・20 分) することにより *H. cinaedi* 全菌体ライセートを調製した (Goto et al. 1999)。得られた菌体ライセート (500 μg 蛋白質) を Freund's complete adjuvant と混合してウサギに皮下注射し、その後2週間おきに同抗原 (50 μg 蛋白質) を Freund's incomplete adjuvant とともに2回追加接種した。最初の接種の6週間後に全採血を施行した。

H. cinaedi 主要抗原の組換え蛋白質 (以下 2.17 参照) に対するウサギ抗血清もこれとほぼ同様の方法で作製した。初めに、抗原蛋白質 (480 μg, PBS に溶解) を Freund's complete adjuvant と混合してウサギに皮下注射した後、Freund's incomplete adjuvant とともに3回の追加接種を2週間おきに行い、最初の接種から7週間後に全採血を施行した。

2.10 ヒト *H. cinaedi* 感染患者、疑感染者および対照群血清

H. cinaedi に感染した患者 (感染確認後約1年経過した患者を含む) および感染が疑われた患者の血清は、熊本整形外科病院において採取された。対照群 (コントロール) として、年齢・性別をマッチングさせた熊本整形外科病院入院患者 (それぞれ入院時に採取) の血清を使用した。また、*H. pylori* 感染者血清および1歳未満の新生児の血清 (西園晃教授より分与)、さらに健康ボランティア血清 (熊本大学微生物学分野関係者) をコントロールとして使用した。これら血清は実験に供するまで-80°Cにて凍結保存した。

ヒト血清の採取と分析については、熊本大学大学院医学薬学研究部等倫理委員会

での承認を得て、その倫理規定とガイドラインに従って、患者や対照群の人々の同意を文書で得た上で実施した。

2.11 *H. cinaedi* 全菌体抗原を用いたウエスタンブロッティング

2.9 に述べた方法で調製した *H. cinaedi* 菌体ライセート (6.5 μg 蛋白質/レーン) を 15% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) に供した。蛋白質の分子量マーカーとして Prestained Protein Ladder (Invitrogen 社) を使用した。サンプルは 0.1 M dithiothreitol (DTT) 含有 SDS サンプルバッファー (0.04% ブロモフェノールブルー, 20% glycerol, 10% SDS 含 0.25 M Tris-HCl pH 6.8) に懸濁し、20 mA 定電流で電気泳動を行った。

泳動終了後、セミドライブロッティング法 (BE-330, バイオクラフト社) にてエレクトロトランスファーを行った。転写膜は polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜 (Immobilon P, Millipore 社) を使用した。転写は 100 mA で 1 時間行った。転写した PVDF 膜を 5% スキムミルク含有 0.1% Tween 20-Tris-buffered saline (0.15 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.6) (T-TBS) に浸して室温、1 時間もしくは 4°C、一晩のブロッキングを行った。1 次抗体としてウサギ血清 (抗 *H. cinaedi* ライセートまたは抗組換え蛋白質血清; 非感作血清, 各 1,000~625,000 倍希釈) あるいは、ヒト血清 (*H. cinaedi* 感染患者および各種コントロール血清, 1,500 倍希釈) と室温で 1 時間反応させた。その後 T-TBS で 3 回洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗ウサギ IgG 抗体 (Santa Cruz 社) またはペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗ヒト IgG 抗体 (シグマ社) と反応させた。さらに T-TBS で 3 回洗浄し、ECL Plus system (GE Healthcare 社) を使用して、化学発光のシグナルを LAS1000UV mini (フジフィルム社) を用いて検出した。さらに、バンドの濃さを、Multi Gauge V3.0 画像解析ソフトウェア (フジフィルム社) を使って数値化した。

2.12 *H. cinaedi* 全菌体抗原を用いた ELISA 解析

2.9 に述べた方法で調製した *H. cinaedi* 菌体ライセートから 15,000 \times g、4°C で 10 分遠心した上清 (ライセートの可溶性画分) を調製し、その後、リボポリサッカライドを除くために Triton-X114 によって処理し (Liu et al. 1997)、さらに限外濾過膜 (Millipore 社, 100 kDa cut) を使って低分子蛋白質を除いた画分を最終的に ELISA の固相化抗原として使用した。96 ウェルのマイクロプレート (Nunc 社) に、0.1 M 炭酸バッファー (pH 9.6) で希釈した 50 μl (0.0625 μg 蛋白質量/ウェル) の *H. cinaedi* 抗原を 4°C で一晩、固相化し、0.05% Tween 20-PBS (T-PBS) で 3 回洗浄し、0.5%ゼラチ

ン T-PBS により室温で 1.5 時間のブロッキングを行った。T-PBS で 3 回洗浄した後、400 倍希釈ヒト血清 (*H. cinaedi* 感染患者, *H. pylori* 感染者, 年齢・性別をマッチングさせた対照群, および新生児の血清) 50 μ l と室温で 1 時間反応させた。T-PBS で洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗ヒト IgG 抗体 (シグマ社) と室温で 1 時間反応させた後、T-PBS で洗浄した。 α -phenylenediamine dihydrochloride (OPD, Wako 社) -H₂O₂ 発色液を 100 μ l を加えて発色反応を行い、2.0 M 硫酸 50 μ l を加えて反応を停止し、その後マイクロプレートリーダー (Bio-Rad 社, Model 680) で 490 nm の吸光度値を測定した。

2.13 *H. cinaedi* 遺伝子ライブラリーの作製

ブレインハートインヒュージョン液体培地で培養した (2.8 参照) *H. cinaedi* 菌体から DNeasy Tissue Kit (Qiagen 社) を用いて DNA を抽出した。このゲノム DNA を制限酵素 *Hind* III (Takara 社) によって処理後、0.7%アガロースゲル電気泳動にて分離した 4~12 kbp の領域の断片を、QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen 社) によって精製した。この DNA 断片を予め *Hind* III で切断したプラスミド pBluescript SK+ (Invitrogen 社) にライゲーション (Ligation-Convenience Kit, ニッポンジーン社) した。ライゲーション反応物を、大腸菌 ElectroMax DH10B T1 フェージレジスタントコンピテントセル (Invitrogen 社) にエレクトロポレーション法 (ジーンパルサー, Bio-Rad 社) により導入、形質転換した。大腸菌は 100 μ g/ml アンピシリンおよび 50 μ g/ml 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-D-galactopyranoside (X-Gal) を含有した Luria-Bertani (LB) 平板培地上で 37°C、14~16 時間培養した。ゲノム DNA を含むプラスミドを有するコロニーは X-gal の発色 (青色) がないことにより選別した。

なお、遺伝子組換え実験に関しては、熊本大学での機関承認を得た上で、熊本大学および国の定める遺伝子組み換え生物等安全管理規則に基づき行った。

2.14 *H. cinaedi* 主要抗原蛋白質のイムノスクリーニング

H. cinaedi の主要抗原蛋白質遺伝子を同定するために、抗 *H. cinaedi* ウサギ血清を使って *H. cinaedi* 遺伝子ライブラリーのイムノスクリーニングを行った。

すなわち前述 (2.13) の方法で培養した大腸菌のコロニーをニトロセルロース膜 (Hybond-C Extra, GE Healthcare 社) に写し取り、ライセートバッファー (150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1.5% bovine serum albumin (BSA), 1 μ g/ml pancreatic DNase I, 40 μ g/ml lysozyme 含 100 mM Tris-HCl pH 7.8) に 14~20 時間、室温で浸して溶菌を行った (Sambrook and Russell 2001)。その膜を T-TBS で数回洗浄した後 5%スキムミルク含有

T-TBS で室温、1 時間もしくは 4°C、一晩のブロッキングを行った。その後、抗 *H. cinaedi* ウサギ血清 (10,000 倍希釈) と室温で 1 時間反応させた。その後 T-TBS で 3 回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗ウサギ IgG 抗体 (Santa Cruz 社) と室温で 1 時間反応させた。さらに T-TBS で 3 回洗浄した後、ECL Plus System (GE Healthcare 社) を用いて Hyperfilm TMECL (GE Healthcare 社) 上で抗原蛋白質を発現しているクローンのシグナルを検出した。これにより得られたシグナル陽性コロニーを選択し、2 次スクリーニングを行った。すなわち、形質転換体の大腸菌クローンをそれぞれ 3 ml の 100 µg/ml アンピシリン含有 LB 液体培地にて 37°C、12~16 時間培養し、菌体を集菌し、PBS 中で超音波破碎したライセートをウエスタンブロッティングにて解析した。この際、1 次抗体は抗 *H. cinaedi* ウサギ抗血清および *H. cinaedi* 感染患者血清 (それぞれ、10,000 倍、1,500 倍希釈) を使用し、2 次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗ウサギ IgG 抗体またはペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗ヒト IgG 抗体を使用した。ECL Plus System により免疫反応後の蛋白質を検出することにより *H. cinaedi* の主要抗原をコードする遺伝子を含む 4 つのプラスミドクローン (クローン 3-1, 8-2, 9-5, 10-2) を同定し回収した。

2.15 *H. cinaedi* 抗原遺伝子の塩基配列の決定

クローニングした *H. cinaedi* 抗原発現大腸菌クローンからプラスミドを抽出し (QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN 社)、制限酵素 (*Sac* I (Takara 社) /*Kpn* II (Takara 社)) 反応物のアガロース電気泳動を行うことにより、プラスミドのインサート (*H. cinaedi* ゲノム DNA) の大きさを調べた。インサートが確認でき、さらに最もヒト *H. cinaedi* 感染者との免疫反応性が高い 30 kDa の抗原蛋白質遺伝子を含むと考えられたクローン 9-5 を選択し、完全長の塩基配列解析へ進めた。配列の決定は、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems 社) を用いた dideoxy 法により、自動 DNA シーケンサー (ABI PRISM310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems 社) を用いて行った。4,000 bp 以上の長い塩基配列となるため、いくつかの *Hind* III 切断断片にわけて配列解析をする方法と、判読できた配列を元に新たなプライマーを設定し、未判読部分を解析する方法を使い、最終的にプラスミドに含まれるゲノム断片の完全長の配列決定を行った。判読した DNA 配列については National Center for Biotechnology Information (NCBI) の BLAST プログラムによる相同性検索およびドメイン検索 (Conserved Domain Search) を行うと共に open reading frame (ORF) 推定プログラム (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) を用いて ORF を推定した。

また、推定されたアミノ酸配列について、グラム陰性菌のリポ蛋白質のシグナルペプチドを推定するプログラム 'LipoP' (<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>)

(Juncker et al. 2003) を用いた解析を行った。

2.16 *H. cinaedi* 抗原蛋白質発現ベクターの作製

クローン 9-5 の ORFs の一つが、30 kDa の主要抗原蛋白質をコードしている領域と推定されたため、本実験においてはこの蛋白質を HcMAP (*Helicobacter cinaedi* major antigenic protein) 30 と呼ぶことにした。この ORF をクローン 9-5 プラスミドから PCR により増幅した。N 末端側に His を 10 個付加した組換え蛋白質 (His-MAP30) を作製するため、下記配列のプライマーを使用した。

5'-gggcatgggcatcatcatcatcatcatcatcatcatcATGAAAAGTTACTTGCTTTA-3' (forward)

5'-ccgatccTTAAAATGCAGGAACTATTTTC-3' (reverse)

上の配列において、アルファベットの大文字は、判読したクローン 9-5 由来の配列 (forward, N 末端側; reverse, C 末端側) である。小文字は制限酵素 *Nco* I (forward 側, 下線部) および *Bam*H I (reverse 側, 下線部) サイトを含めた配列であり、また、forward 側プライマーは 10 個の His が付加されるようにデザインした (二重下線)。

また、PCR は以下に示す反応系で行った。

テンプレート DNA (クローン 9-5) (200 ng/μl)	1 μl
10 × PCR buffer for KOD (+) (Toyobo 社)	5 μl
2 mM dNTPs	5 μl
25 mM MgSO ₄	2 μl
10 μM sense プライマー (forward, 上記)	0.75 μl
10 μM antisense プライマー (reverse, 上記)	0.75 μl
KOD plus DNA ポリメラーゼ (Toyobo 社)	1 μl
水	34.5 μl
計	50 μl

PCR 反応サイクルは以下のように行った。

94°C	2 分	} 40 cycles
94°C	15 秒	
55°C	30 秒	
68°C	1 分	
68°C	5 分	

増幅した PCR 産物は *Nco* I (Takara 社) と *Bam*HI (Takara 社) で処理 (37°C, 2 時間) し、発現ベクター pET3d (Novagen 社) に組み込み、2.15 と同様の方法で塩基配列を確認し、抗原蛋白質発現プラスミド pET3d-10×His-HcMAP30 を得た。

2.17 *H. cinaedi* 抗原組換え蛋白質の発現と精製

大腸菌 BL21 Star (DE3) pLysS (Invitrogen 社) に、pET3d-10×His-HcMAP30 をヒートショック法で導入・形質転換した。この大腸菌を 37°C、3 時間培養し、Lac プロモーターにより制御されている HcMAP30 遺伝子の発現を誘導するため、isopropyl 1-thio- β -D-galactoside (IPTG, 1 mM) を添加し、さらに 3 時間培養して組換え蛋白質を発現させた。1 L 培養 (LB 培地) 後の菌体 (湿重量 5 g) はライセートバッファー 25 ml (8 M urea 加 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl pH 8.0) に懸濁した後、室温で 1.5 時間混和、溶解し、全菌体ライセートとした。これを 15,000 × g、20 分遠心し、上清を 0.45 μ m のフィルター (Millipore 社) に通したサンプルを、Ni-NTA Agarose (Qiagen 社) 4 ml と混ぜて、室温で 2 時間混和し結合させた。この混合液を、ポリエチレン製カラム (フナコシ社) 4 本につめてニッケルアフィニティカラムを 4 本作製した。4 ml の洗浄バッファー (8 M urea 加 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl pH 6.3) でそれぞれ 2 回洗浄し、バッファー 1 (8 M urea 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl pH 5.9; 1 ml × 2)、バッファー 2 (8 M urea 加 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl pH 4.5; 1 ml × 4) の 2 段階で溶出した。非吸着画分、溶出画分 1 (バッファー 1)、2 (バッファー 2) を SDS-PAGE により分析した。SDS-PAGE で純度を確認した後、溶出分画をまとめて PBS (pH 7.4) で透析し凍結保存した。

2.18 *H. cinaedi* 抗原組換え蛋白質を用いたウエスタンブロットティング

精製した組換え蛋白質 His-HcMAP30 について、ウエスタンブロットティングを行った。SDS-PAGE にて泳動した蛋白質量は、0.6 μ g/レーンとし、2.11 と同様、1 次抗体に様々なヒト血清またはウサギ血清、2 次抗体にペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗ウサギ IgG 抗体 (Santa Cruz 社) またはペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗ヒト IgG 抗体 (シグマ社) を用いた。また、*H. cinaedi* および他の類縁の細菌 (*H. pylori*, *H. hepaticus*, *C. jejuni*) の菌体ライセート (6.5 μ g/レーン) を同時に泳動してウエスタンブロットティングを行った。なお、菌体ライセートは 2.9、2.11 と同様に、それぞれ固形培地で培養した菌体を回収し、PBS で懸濁したものを、超音波破碎し調製した。

ウエスタンブロットティング後の PVDF 膜からの抗体のストリップは、WB stripping solution (ナカライテスク社) によって、室温で 15 分間浸して行った。

2.19 *H. cinaedi* 抗原の免疫沈降

抗 HcMAP30 ウサギ抗血清 (2.9 参照) から、Sepharose CL-4B (GE Healthcare 社) および His-HcMAP30 固相化アフィニティカラム (HiTrap NHS-activated HP column, GE Healthcare 社) を用いて、特異的抗 His-HcMAP30 抗体を精製した。この抗体を用いた免疫沈降により *H. cinaedi* 菌体ライセートから主要抗原の単離を以下の方法で行った。

菌体をプロテアーゼインヒビターカクテル (Roche 社) および 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride を含んだライセートバッファー (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton-X100 含 50 mM Tris-HCl pH 7.4) に懸濁、超音波破碎し、15,000 × g、20 分間遠心し上清を回収した。この菌体ライセート (65 µg) に、50 µl の Protein A/G Plus Agarose (Santa Cruz 社) を加え 4°C で 30 分間の混和を行い、2,000 × g、1 分遠心し、抗体非依存性の吸着蛋白質をを除去した。この上清に 5 µg の抗 His-HcMAP30 抗体またはコントロールとして 5 µg のウサギ非感作 IgG (Santa Cruz 社) を加え、4°C で 4 時間、混和を行った。この後、1,000 × g、30 秒で遠心し、上清を注意深く除き、沈殿をライセートバッファーで 4 回洗浄し、非特異的吸着を除いた。この抗原抗体複合物を吸着した沈殿アガロースに SDS サンプルバッファー (2.11 参照) を加え、99°C で 3 分煮沸を行った後、2,000 × g、1 分間遠心し上清を SDS-PAGE およびヒト *H. cinaedi* 感染患者血清を用いたウエスタンブロッティング解析へ供し、バンドを検出した。

2.20 *H. cinaedi* 抗原組換え蛋白質を用いた ELISA 解析

H. cinaedi 菌体抗原を用いた場合と同様に (2.12 参照)、0.1 M 炭酸バッファー (pH 9.6) に希釈した組換え蛋白質 His-HcMAP30 (2 µg/ml) を 96 穴マイクロプレート (Nunc 社) 1 ウェルあたり 100 µl (0.2 µg/ウェル) 入れ、4°C で一晩の固相化を行った。その後、洗浄バッファー T-PBS で 3 回洗浄し、1% BSA 添加 T-PBS により室温で 1.5 時間のブロッキングを行った。さらに T-PBS で 3 回洗浄した後、200 倍希釈ヒト血清 100 µl と 37°C で 1 時間反応させた。T-PBS で洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗ヒト IgG 抗体 (シグマ社) と 37 °C で 1 時間反応させた。OPD (Wako 社) -H₂O₂ 発色液を 100 µl を加えて発色反応を行い、2.0 M 硫酸 50 µl を加えて反応を停止し、その後マイクロプレートリーダーで 490 nm おける吸光度値を測定した。

第3章 結果

3.1 症例解析

熊本整形外科病院 (204床) において、2004年6月から2005年3月の10ヶ月間に11例の *H. cinaedi* 菌血症・蜂窩織炎患者が発生した。その臨床的特徴を表3にまとめた。男性2例、女性9例で、年齢は22才から79才 (平均65.5才) であった。患者はそれぞれ様々な整形外科手術から8日~113日経過後に、突然の発熱 (最高体温の平均値: 38.9°C) と蜂窩織炎を発症した。発熱時の血液培養 (7例が動脈、4例が静脈) から、グラム陰性らせん状桿菌が検出され (図1)、最終的に、16S rRNA の遺伝子配列などによって *H. cinaedi* と同定した (後述)。また、11例のうち2例 (症例9と11) は便培養からも同菌が検出され、遺伝子学的に血液から検出された菌のものと一致したが、この2例には下痢などの消化管症状はみられなかった。

蜂窩織炎を発症した全例において、手術創には感染の徴候はなく、手術した部位から離れた部位に蜂窩織炎による炎症所見を認めた。蜂窩織炎の特徴として、非特異的で境界不明瞭なサーモンピンク色の比較的平坦な発赤・腫脹であり、局所の熱感・自発痛・圧痛を認めた。多発性に蜂窩織炎を起こした患者もみられた。図2に示した症例は、65才女性で、左上腕骨近位端骨折および左橈骨骨折に対する手術を施行し、術後18日目に突然の発熱 (39°C) とともに、同時に前胸部・左上腕・肘部にうすいサーモンピンク色の蜂窩織炎を認めた (表3, 症例1)。興味深いことに、蜂窩織炎を発症した部位は、冷庵 (アイスパックによる冷却) を行った部位と一致することが多かった。図3に magnetic resonance imaging (MRI) による蜂窩織炎の診断例を示す。この症例は58才男性で、左の下腿と上腕に同日に蜂窩織炎を発症したが、左踵骨および左上腕骨の手術を別々の日に施行されていた (それぞれ蜂窩織炎発症の42日前と28日前)。図3Aは下腿の蜂窩織炎の写真を示しており (手術部位である踵骨とは離れている)、図3Bには同部位のMRIを、健側と並列して示しているが、健側と比較すると、患側である左側下腿の皮下に広がる明瞭な炎症所見 (T2強調画像にて high intensity area) が確認できる (表3, 症例6)。

これらの症例の背景については、明らかな免疫不全を認めず、免疫抑制剤の投与を受けた患者もいなかった。3例が高血圧を基礎疾患に持つが、手術当時の血圧のコントロールは良好であり、その他入院時の身体所見、血液検査等で、手術に関連した所見 (骨折など) 以外で明らかな異常所見を認めなかった。また、本菌感染がしばしば報告されているホモセクシュアル男性はいなかった。感染源となり得るペットの飼育歴は全ての患者で認められなかった。手術の対象になった整形外科的疾患は、骨折6例 (1例は22才男性で開放骨折)、変形性膝関節症4例、腰椎ヘルニア1例だ

表3 *H. cinaedi* 菌血症・蜂窩織炎患者の臨床的特徴のまとめ^a

症例番号	年齢(才)	性別	分離株番号	病棟	診断	蜂窩織炎発症日	手術後発症から症の経過日数(日)	蜂窩織炎の部位	白血球(mm^3)	CRP(mg/dl)	再発	便培養	下痢	治療に使った抗菌剤	血清採取日
1	65	F	923	7th	L-HF & RF	Jun-19-04	18	L-Forearm & chest	13,160	12.3	+	-	+	SBTPC	Feb-23-05
2	71	F	377	7th	LH	Jul-01-04	8	Back	12,600	13.5	-	ND	-	IPM/CS	ND
3	68	F	944	7th	L-HF	Jul-21-04	21	L-Upper arm	18,420	12.3	+	-	-	CTM	Mar-04-05
4	22	M	409	5th	R-FeF, TF & FiF	Aug-09-04	18	R-Leg	18,880	13.7	-	ND	-	SBTPC	ND
5	76	F	<i>b</i>	7th	R-OA	Jul-01-04	12	R-Lateral thigh	14,830	19.3	-	ND	-	IPM/CS	Jul-01-05
			717	6th	L-OA	Sep-15-04	10	L-Medial thigh	15,120	22.0	-	ND	-	CTM	ND
6	58	M	<i>b</i>	6th	L-HF	Oct-28-04	28	L-Upper arm	10,470	14.9	+	-	-	CTM	Feb-25-05
			<i>b</i>	6th	L-CF	Oct-28-04	42	L-Leg						CTM	ND
7	79	F	1035, 14	6th	R-HF	Dec-24-04	113	R-Upper arm	13,300	5.6	+	-	-	SBTPC	Feb-09-05
			896	6th	R-CF	Jan-20-05	42	R-Leg	5,540	0.6	-	ND	-	SBTPC	ND
8	70	F	643	6th	L-TF & FiF	Jan-17-05	56	L-Leg	7,250	6.0	-	ND	-	CTM	ND
9	72	F	56, 361	6th	R-TF & FiF	Feb-01-05	8	R-Leg	10,230	10.2	-	+	-	CTM	Feb-21-05
10	62	F	1007	6th	R-OA	Feb-18-05	11	R-Thigh	6,140	18.7	-	-	-	SBTPC	Mar-08-05
11	77	F	545, 892	6th	R-OA	Mar-10-05	31	R-Thigh	15,790	19.2	-	+	-	CTM	Mar-17-05

^a略語: M, 男性; F, 女性; CF, 踵骨; FeF, 大腿骨骨折; FiF, 腓骨骨折; HF, 上腕骨骨折; RF, 橈骨骨折; TF, 脛骨骨折; LH, 腰椎椎間板ヘルニア; OA, 変形性膝関節症, R, 右; L, 左; CRP, C-反応性蛋白質; ND, 未施行; SBTPC, sulfamonomethoxylate; CTM, cefotiam hydrochloride, IPM/CS, imipenem/cilastatin sodium. ^b細菌の分離同定に成功したが途中で発育不良となり絶えた株.

った。

患者のうち2例(症例5と7)は時期をずらして2回、別部位の手術を施行されており、その都度に術肢の近い部位に蜂窩織炎を発症している。

血液学的および生化学的検査所見として、発熱時の白血球数、CRP値、赤沈値の上昇を認めた。ほとんどの症例において、手術日から1週間以上経過して術創は完全に治癒した時点で発熱しており、このような発熱や炎症所見は手術と直接の関連はないものと考えられた。

治療経過としては、全例、抗生剤の経静脈投与が有効であり、投与後数日で、発熱・蜂窩織炎等の症状および炎症反応に関連した検査所見の改善を認めた。しかし、11例中4例で蜂窩織炎の再発を認めた。ただし、再発の際は、臨床所見、検査所見いずれにおいても最初の蜂窩織炎よりも病勢は軽度であった。例えば症例6は外来経過観察中の半年の間に5回もの蜂窩織炎の再発を認めたが、再発を繰り返すうちに、無治療で自然治癒する傾向がみられた。

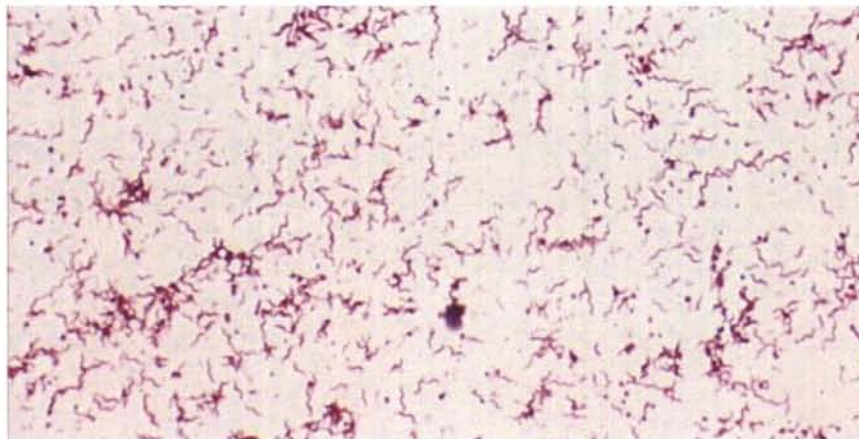


図1 患者の血液から分離・培養された細菌のグラム染色写真
グラム陰性らせん状桿菌が確認される。ゲノム解析の結果、*H. cinaedi* と同定された。

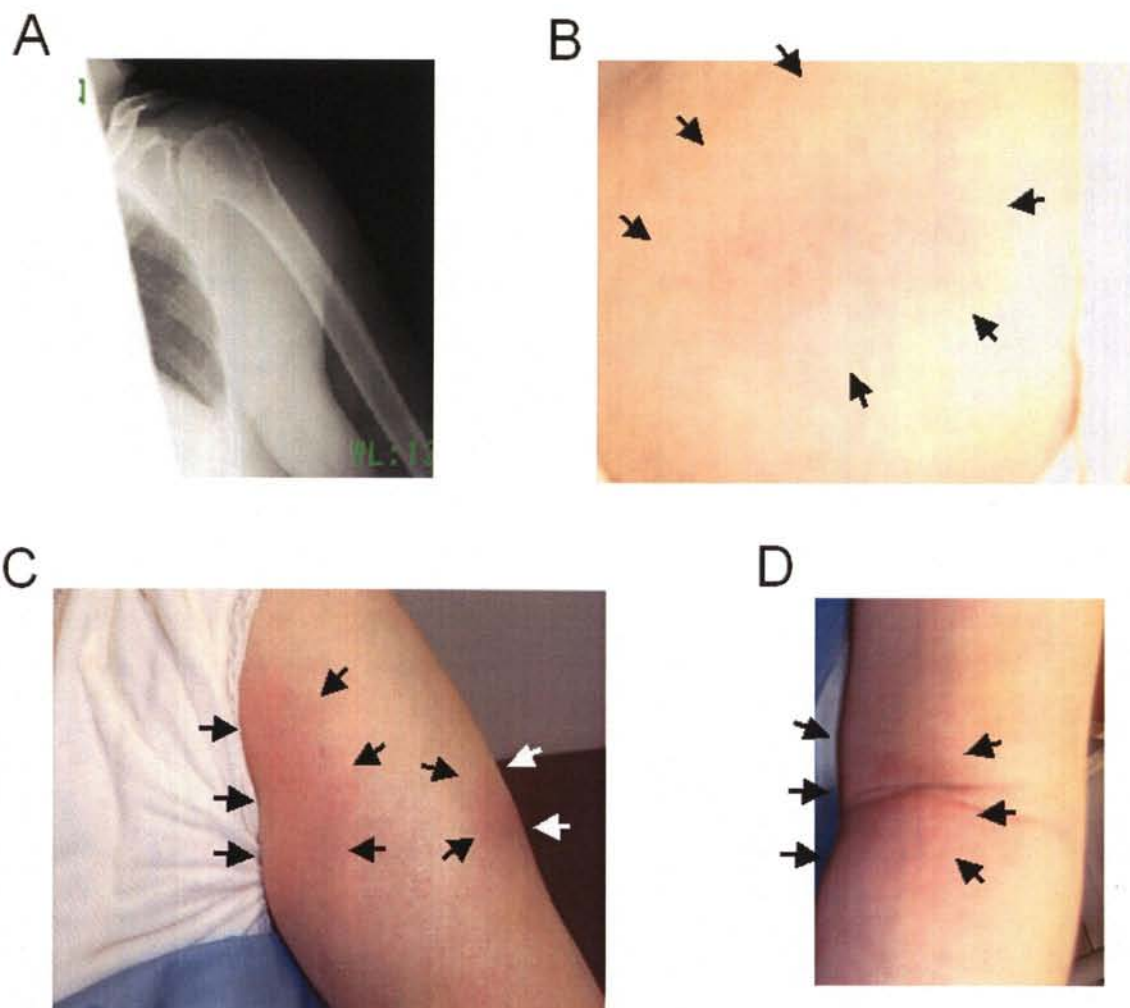


図 2 症例 1 の多発性蜂窩織炎の肉眼所見

左上腕骨近位端骨折 (A, レントゲン写真) および左橈骨骨折に対し手術を施行後 18 日目に発熱 (39°C)、同時に前胸部 (B)、左上腕 (C)、肘部 (D) に、多発性に蜂窩織炎を発症した。蜂窩織炎はうすいサーモンピンク色で平坦であり熱感、自発痛、圧痛を認めた。

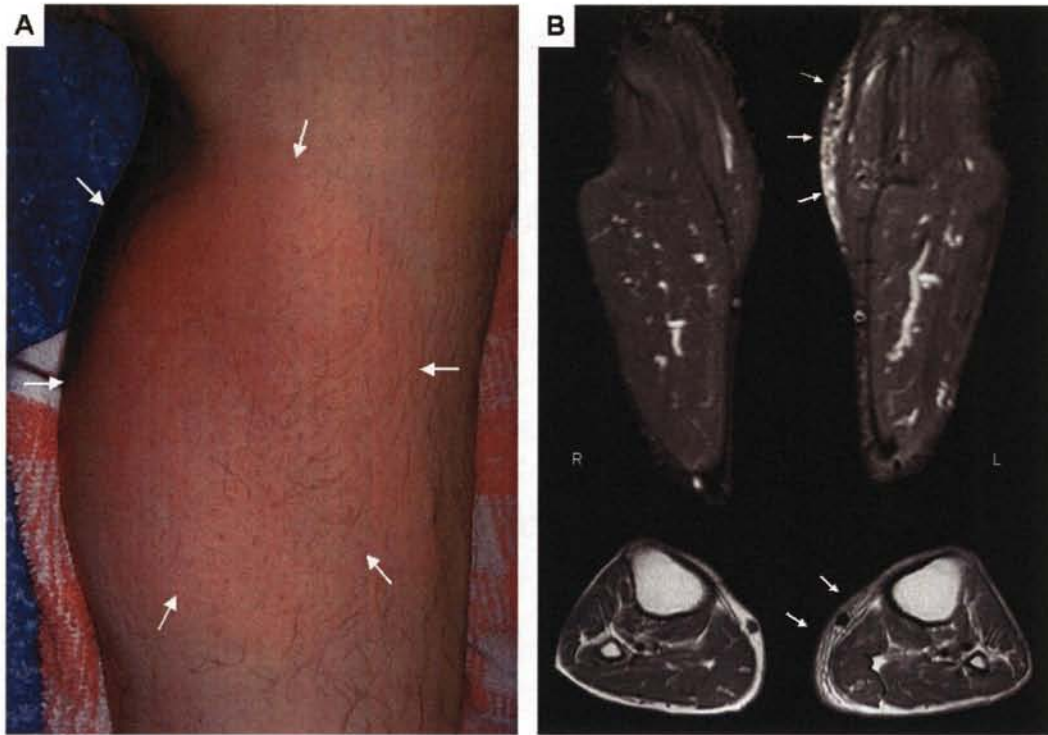


図 3 症例 6 の蜂窩織炎

- (A) 蜂窩織炎の肉眼所見: 交通事故による左踵骨骨折にて手術施行後 6 週間後に、同側の、手術部位より離れた左ふくらはぎに蜂窩織炎を発症した。
- (B) 同症例の下肢 MRI 所見: T2 強調画像にて、蜂窩織炎の部位に一致して、びまん性に high intensity area を認め、皮下組織の炎症を示唆する所見を呈した。

3.2 細菌の培養と分離

11 症例の血液培養は全て BD BACTEC Plus Aerobic/F system (Becton Dickinson 社) で培養後 4~7 日後に陽性と判定され、顕微鏡的検査によってグラム陰性のらせん状桿菌が観察された (図 1)。培養ボトルから平板培地 (*Campylobacter* 羊血液寒天培地, Becton Dickinson 社) を用い、サブカルチャー (微好気培養) を行った。本菌のコロニーの性状は、平板一面にフィルム状に発育する傾向がみられた (図 4)。

また、2 例の患者では、便培養からも、同様のらせん菌が検出されたが (表 3, 症例 9 と 11)、これらの患者には下痢などの腸炎症状は認めなかった。



図 4 *H. cinaedi* のコロニー

H. cinaedi のコロニー (微好気培養 4 日目)。一面に菌体を塗布したが、薄く膜を張ったようなフィルム状のコロニー (thin spread colony) が形成されている。

3.3 細菌の同定と系統分類学的解析

11例全ての分離菌は、16S rRNA 塩基配列から *H. cinaedi* と非常に高い (99.3%以上) 相同性を示した。他の菌種では 98.5%以下であった (図 5)。DNA-DNA ハイブリダイゼーション法では、代表的な2つの臨床分離株が (症例 2, 5)、*H. cinaedi* 標準株 (CCUG 18818^T) と 82%以上の高い相同性を示し、*H. cinaedi* と同定された (表 4)。

16S rRNA および *hsp60* 遺伝子の塩基配列をもとに、臨床分離株の系統分類学的解析を行った。16S rRNA の系統樹上では、*H. cinaedi* 標準株と全ての臨床分離株は1つのクラスターに分類され、さらに臨床分離株は2つのサブクラスターに分類できた (図 5A)。第1のクラスターには、4つの株が分類され (症例 1~4)、これらは、最初の時期のアウトブレイクで分離された株であった。第2のクラスターにはその他の6つの株が分類され (症例 5, 7~11)、こちらは後期のアウトブレイクで分離された株であった。*H. cinaedi* の標準株は、系統樹上でこれらの間に位置していた。

hsp60 遺伝子系統樹解析でも同様に、標準株と臨床分離株は1つのクラスターに分類され、さらに2つのサブクラスターに分類されたが、これらに分類される株の関係は16S rRNA による解析結果と同じであった (図 5B)。

PFGE の結果を図 6 に示す。臨床分離株と *H. cinaedi* 標準株 (S1) を比較すると、重複したパターンもあるが、臨床分離株ではいくつかの高分子バンド (112.0 kb 以上) が認められ、また、逆にいくつかの中分子バンド (48.5~112.0 kb) が標準株においてのみ認められた。最初のアウトブレイク株 (症例 1~4) と後期のアウトブレイク株 (症例 5, 7~11) の間にもパターンの違いが認められた。

また、RAPD の結果においても、それぞれの菌株間のグループのパターン分類について PFGE と同様の結果となった (図 7)。

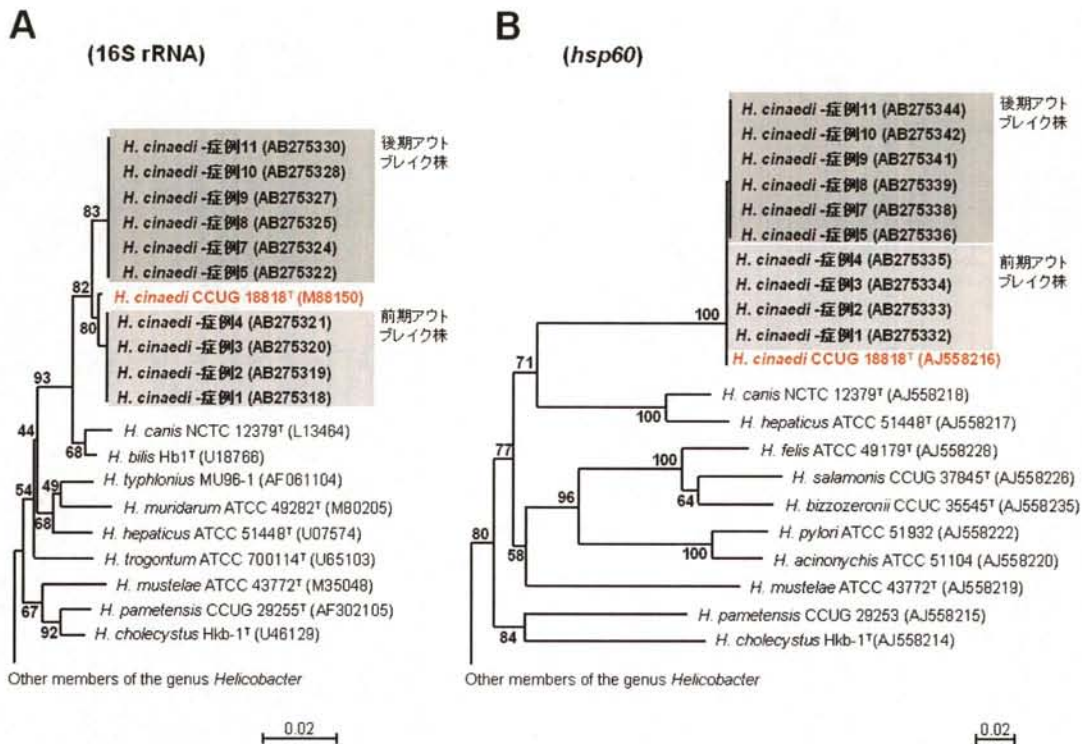


図 5 *H. cinaedi* 臨床分離株とその標準株および類縁菌株ゲノムの系統分類学的解析

H. cinaedi 臨床分離株の 16S rRNA (A) と *hsp60* (B) の遺伝子配列を FASTA 探索システムによって解析した。これら *H. cinaedi* 臨床分離株と *Helicobacter* 属菌株の系統学的解析を、16S rRNA 遺伝子配列 (1,430 bp 領域) と *hsp60* 遺伝子配列 (530 bp 領域) をもとに、DDJB、GeneBank、EMBL のデータベースを用いて行った。臨床分離株の 16S rRNA および *hsp60* の遺伝子配列の GenBank accession number は括弧内に表示した。

表 4 標準株と代表的な 2 つの *H. cinaedi* 臨床分離菌株を用いた DNA-DNA ハイブリダイゼーション

	% homology for <i>H. cinaedi</i> ^T		% homology for <i>H. cinaedi</i> (症例 2) ^a		% homology for <i>H. cinaedi</i> (症例 5) ^a		% homology for <i>H. canis</i> ^T	
	Optimal conditions	Stringent conditions	Optimal conditions	Stringent conditions	Optimal conditions	Stringent conditions	Optimal conditions	Stringent conditions
	<i>H. cinaedi</i> CCUG 18818 ^T	100.0	100.0	108.0	106.1	94.0	89.9	7.4
<i>H. cinaedi</i> (症例 2) ^a	82.9	81.8	100.0	100.0	82.3	76.4	5.7	2.7
<i>H. cinaedi</i> (症例 5) ^a	101.6	99.9	103.4	100.6	100.0	100.0	7.6	3.8
<i>H. canis</i> NCTC 12379 ^T	9.5	4.4	10.7	5.4	9.1	4.3	100.0	100.0
Salmon DNA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

^a 症例番号は表 3 のそれと対応している

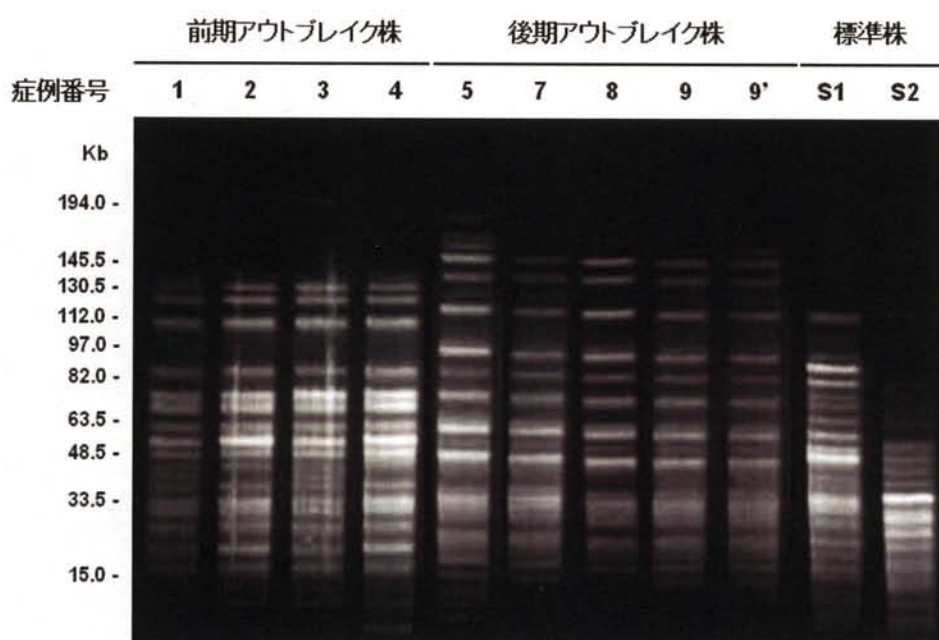


図6 *Spe I*によって消化した *H. cinaedi* DNA 断片の PFGE フィンガープリント
臨床分離株と *H. cinaedi* 標準株 (CCUG 18818^T) (S1) の PFGE パターンを比較すると、
類似しているが、臨床分離株ではいくつかの高分子バンド (112.0 kb 以上) が認めら
れ、また、逆にいくつかの中分子バンド (48.5~112.0 kb) が標準株においてのみ認め
られた。さらに、臨床分離株の PFGE パターンは *H. canis* 標準株 (NCTC 12379^T) (S2)
とも異なっている。加えて、前期のアウトブレイク株 (症例 1~4) と後期のアウトブ
レイク株 (症例 5, 7~9, 9') の間にもパターンの違いが認められた。臨床分離株は 9'
以外は全て血液培養から得られた分離株で、9'は便培養から得られたものである。症
例番号は表 3 の番号と対応している。

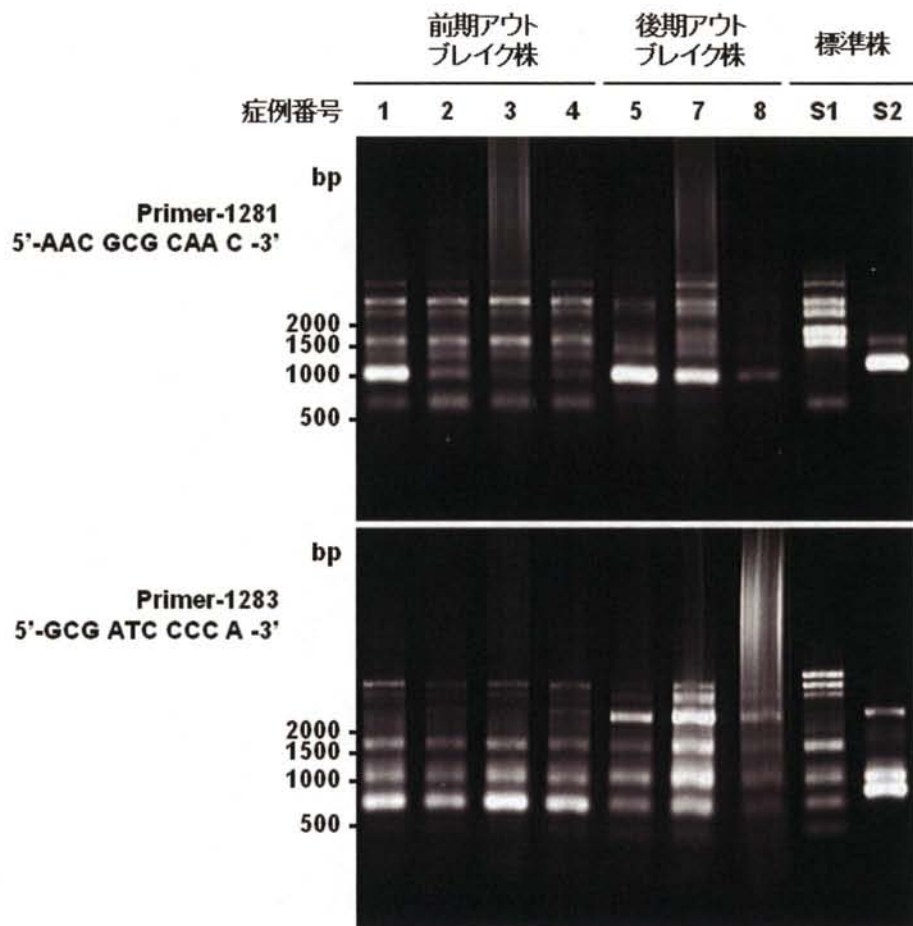


図 7 *H. cinaedi* 臨床分離株の RAPD 解析

実験に使ったプライマーは図左に表示した。S1: *H. cinaedi* 標準株 (CCUG 18818^T); S2: *H. canis* 標準株 (NCTC 12379^T)。PFGE (図 6) と類似した各細菌株間のパターンの違いが示された。すなわち *H. cinaedi* 臨床分離株は標準株 (S1) と類似しているが多少異なっており、また、*H. canis* 標準株とは明らかに異なっている。加えて、前期のアウトブレイク株 (症例 1~4) と後期のアウトブレイク株 (症例 5, 7, 8) の間にもパターンの違いが認められる。全て血液培養から得られた分離株で、症例番号は表 3 の番号と対応している。

3.4 小括 1

以上の結果から、以下のことが示された。

- 1) 2004年から2005年にかけて、整形外科手術後に発症した菌血症・蜂窩織炎11例の院内感染(アウトブレイク)を経験し、その臨床疫学的解析を行った。
- 2) 患者は全て明らかな免疫異常がなく、また、本菌感染の危険因子とされるホモセクシュアル男性もいなかった。全例において予後は良好で、抗生剤の経静脈投与による治療が有効であったが、再発・反復例も36%にみられた。
- 3) 菌血症・蜂窩織炎患者の血液および便培養から分離された細菌は、16S rRNA解析やDNA-DNAハイブリダイゼーションの結果より *Helicobacter cinaedi* と同定した。分離された13株は16S rRNA、*hsp60* の遺伝子解析、および、PFGEやRAPD解析により近縁の2つのグループに分類された。
- 4) 2つの異なった遺伝型のグループは、それぞれ異なった時期に異なった病棟フロアより分離され、今回のアウトブレイクは単一のクローンに由来するものではなく、アウトブレイク期間に第1(前期)のグループが第2(後期)のグループに置き換わったものと考えられた。

3.5 ウエスタンブロッティングによる血清抗 *H. cinaedi* 抗体の解析

H. cinaedi に対する宿主の免疫応答を解析するために、*H. cinaedi* 臨床分離株由来抗原と患者あるいは対照群の血清との反応をウエスタンブロッティングにより解析した。本項以下の実験において使用した血清サンプルの種類について表 5 にまとめた。

まず、表 3 の *H. cinaedi* 感染者 (11 例) のうち血清が得られたもの (8 例分、症例番号 1, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11) について、*H. cinaedi* ライセートを抗原とし、ウエスタンブロッティングを行った (図 8A)。各レーンの番号は症例番号 (表 3) と対応している。*H. cinaedi* ライセートで免疫したウサギ血清との反応も同時に解析した。*H. cinaedi* 感染患者血清との反応において、30 kDa の強い陽性バンドが認められた (症例 1, 3, 6, 7, 9)。特に症例 7 はこの抗原に対し顕著な反応を示した。また、患者血清サンプル全てにおいて 50-100 kDa に比較的強い複数のバンドが検出された。これらの反応性 (出現するバンドの位置、強さ) は免疫したウサギ血清を使った結果と類似していた。

一方、対照群 (*H. pylori* 感染者、年齢・性別マッチング対照群、健康ボランティア対照群) の血清を用いて同様の解析を行った場合の反応を図 8B~D に示した。*H. cinaedi* 感染者と異なり、対照群においては 30 kDa 蛋白質に対する反応性は 33 例中 30 例において陰性であった。弱~中等度の反応を示した 3 例は、*H. pylori* 感染者のグループのサンプル 1、年齢・性別マッチング対照群のサンプル 8、健康ボランティア群のサンプル 5 であった。50~100 kDa の複数のバンドに関しては対照群全体を通して比較的高頻度に認められた。

3.6 ウエスタンブロッティングによる *H. cinaedi* 主要抗原蛋白質の特定

以上の結果を踏まえ、さらに *H. cinaedi* 主要抗原を特定するために、次の実験を行った。*H. cinaedi* ライセートと免疫ウサギ血清とのウエスタンブロッティングを、

(1) 抗原 (*H. cinaedi* ライセート) を段階希釈した場合 (図 9A)

(2) 抗体 (免疫ウサギ血清) を段階希釈した場合 (図 9C)

とで行い、より少ない抗原または抗体の量で反応する抗原蛋白質のバンドの検出を試みた。ウエスタンブロッティングのバンドは画像解析ソフトにより数値化した (図 9B, D)。その結果、30 kDa 蛋白質が最も高い反応性を示し、本菌の主要抗原であると考えられた。

表 5 実験で使用したヒト血清

患者の種類	人数 (人)	年齢 (平均) (才)	性別		関連する表または図
			男 (人)	女 (人)	
<i>H. cinaedi</i> 感染患者 ^a	11	58~79 (69.6)	1	7	表 3, 図 8, 10, 18, 19
<i>H. cinaedi</i> 感染患者 ^b	1	82	-	1	図 21 (患者 5)
<i>H. cinaedi</i> 疑感染者	4	71~77 (75.0)	-	4	図 21 (患者 1~4)
<i>H. pylori</i> 感染者	10	37~69 (48.2)	8	2	図 8, 10, 18, 19
年齢・性別マッチング対照群	9	57~81 (70.6)	1	8	図 8, 10, 18, 19
健康ボランティア対象群	16	21~40 (27.4)	13	3	図 8, 18 (14 人分を使用), 19
新生児	6	0 (0)	2	3	図 10, 19 (5 人分を使用)

^a 今回のアウトブレイクで得られたサンプル ^b 散発的症例

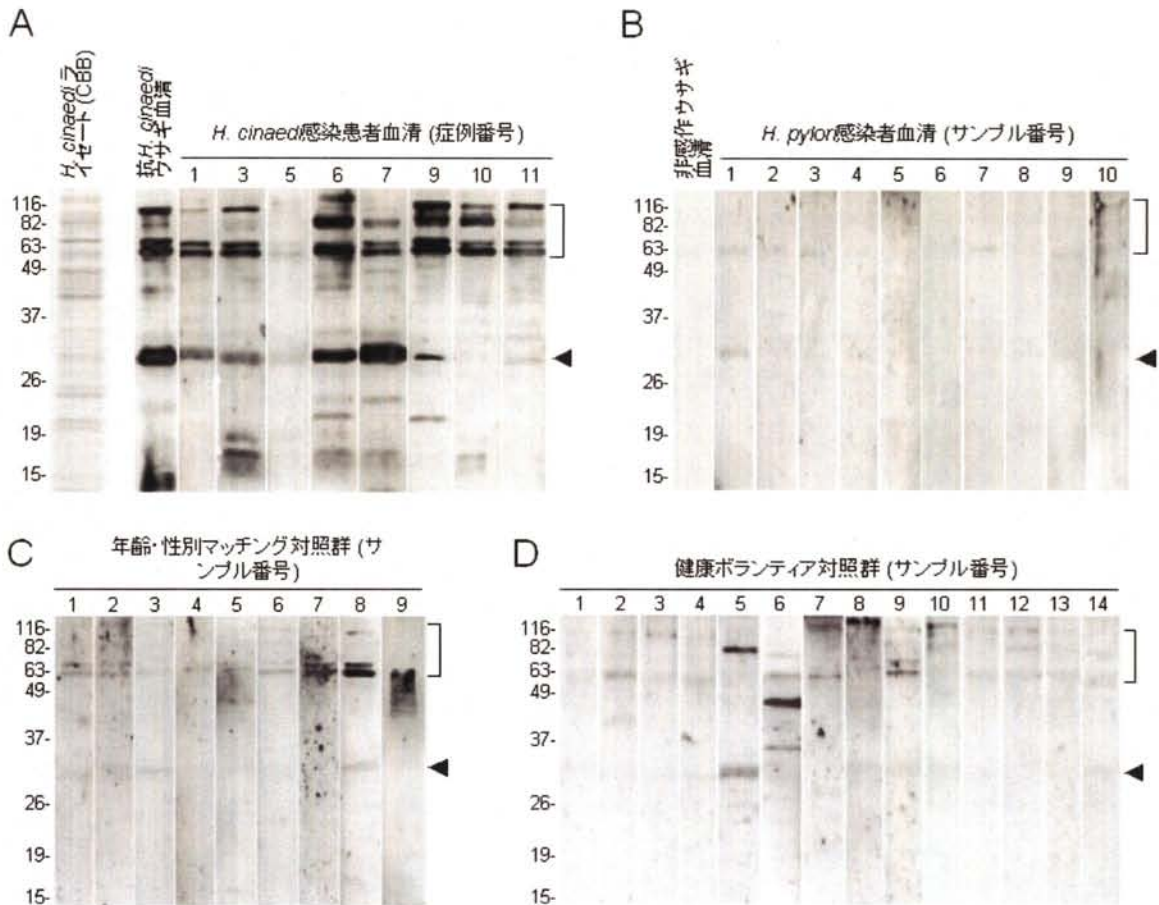


図 8 *H. cinaedi* 感染者血清、対照群血清および抗 *H. cinaedi* ウサギ血清を用いた *H. cinaedi* ライセートのウエスタンブロッティング

H. cinaedi ライセート (6.5 μg 蛋白質/レーン) を泳動し、転写したメンブレンと各種血清と反応させた。ウサギ血清は 10,000 倍希釈、ヒト血清は 1,500 倍希釈で使用した。A の *H. cinaedi* ライセート免疫ウサギ血清と、感染者ヒト血清は *H. cinaedi* の蛋白質に対して類似した反応を示し、特に症例 7 では顕著な反応が認められた。特異的な 30 kDa のバンドを矢印で、高分子 (50~100 kDa) の複数のバンドを角括弧で示した。一方、対照群 (B~D) に関しては、全体的に反応性が低い。30 kDa 蛋白質に対して弱~中等度の反応を示す例もあった (33 例中 3 例)。A の左端に蛋白質の CBB 染色を示した。蛋白質の分子量サイズ (kDa) は各パネルの左端に表示した。A のレーン番号は表 3 の症例番号に対応している。

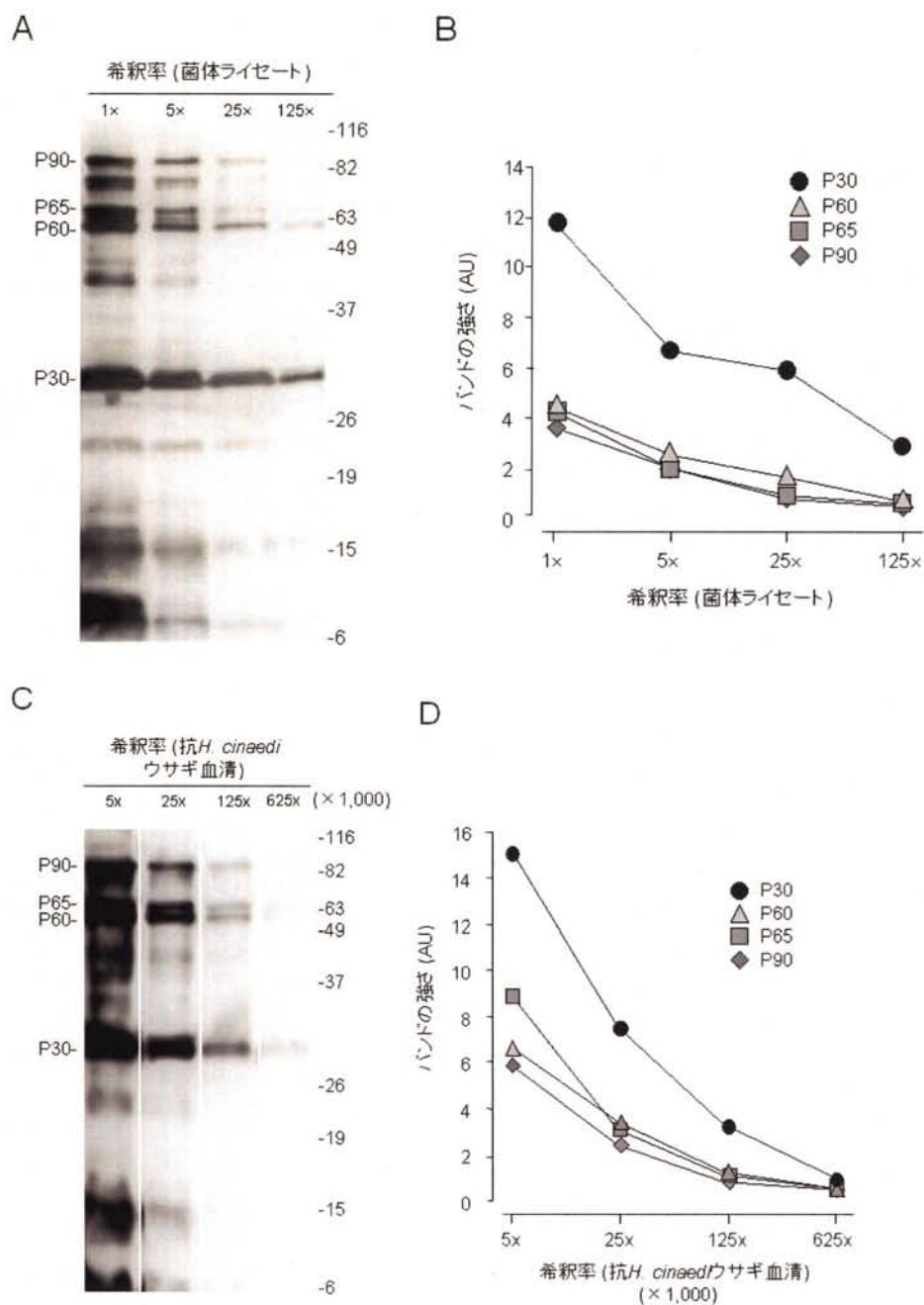


図9 ウェスタンブロッティングによる *H. cinaedi* 主要抗原蛋白質の特定

- (A) *H. cinaedi* ライゼートを5倍段階希釈し (最も左のレーン: 1.3 μg 蛋白質量)、*H. cinaedi* ライゼート免疫ウサギ血清 (1,000倍希釈) と反応させた。
- (B) Aの4つの抗原 (P30、P60、P65、P90) について、画像をもとにデンストメトリーによってバンドの濃さを数値化した。Pの後の数字は分子量サイズを示す (kDa)。
- (C) 免疫ウサギ血清を5倍段階希釈 (5,000~625,000倍) し、それぞれ *H. cinaedi* ライゼート (6.5 μg 蛋白質量) と反応させた。
- (D) Bと同様にCのバンドの濃さを数値化した。分子量サイズ (kDa) を右端に表示した (A, C)。

3.7 *H. cinaedi* 全菌体抗原によるヒト血清の ELISA 解析

各種ヒト血清中の *H. cinaedi* 抗体価を、*H. cinaedi* ライセートを固層化したマイクロプレートを使用した ELISA により解析した (図 10)。*H. cinaedi* 感染患者の血清は、他の対照群と比較して有意に高い *H. cinaedi* 抗体価を示した。*H. cinaedi* 感染患者の中で特に強い抗体価を示す 3 例 (症例 6, 9, 7) は、同じく *H. cinaedi* ライセートを抗原としたウエスタンブロッティング (図 8A) において 30 kDa の蛋白質のバンドを強く示す 3 例と一致していた。また、年齢・性別マッチング対照群の中で比較的高い抗体価を示すもの (サンプル番号 7, 8, 9) は図 8C においては、高分子の蛋白質のバンドが他よりやや強く検出されており、またサンプル 8 は 30 kDa のバンドが認められていた。番号は表 3 の症例番号および図 8 の番号 (症例番号, サンプル番号) と対応させている。

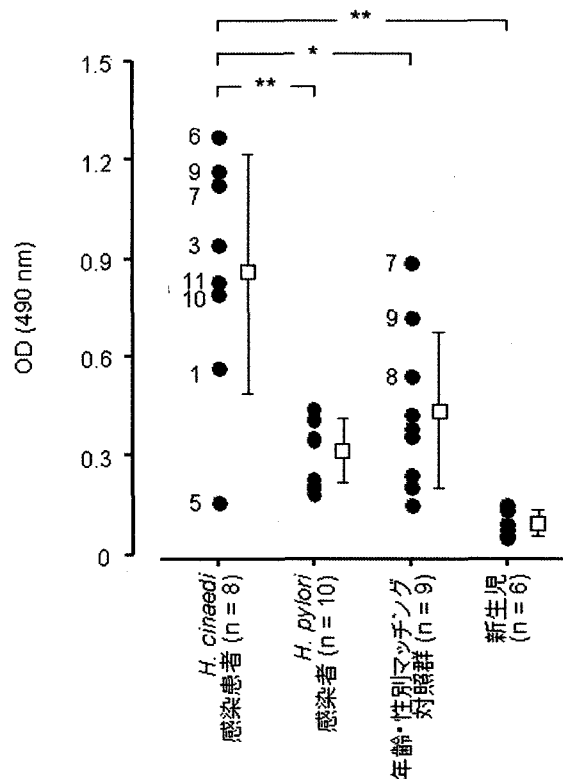


図 10 ELISA による *H. cinaedi* ライセートに対する血清中抗体価の測定
H. cinaedi 感染患者は対照群 (*H. pylori* 感染者、年齢・性別マッチング対照群、新生児) と比較して有意に高い値を示した。図中の番号は、表 3 の症例番号、図 8 のレーン番号 (症例番号、サンプル番号) と対応させている。対照群では本 ELISA で高値を示したサンプル番号のみ表示した。 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

3.8 *H. cinaedi* 遺伝子ライブラリーの作製

H. cinaedi の主要抗原蛋白質遺伝子をクローニングするために、*H. cinaedi* 遺伝子ライブラリーを構築した。

まず、*H. cinaedi* 菌体から DNA を抽出し、制限酵素 *Hind* III で部分切断した (図 11)。4~12 kbp の DNA 断片が得られる最適な酵素量 (比) を決め、大量スケールで実際に、DNA の任意の大きさへの切断・分離・回収を行った。その後、この *H. cinaedi* の DNA 断片 (4~12 kbp) とプラスミドベクター (pBluescript SK+) をライゲーションし、これを大腸菌に導入し、*H. cinaedi* 遺伝子ライブラリーを作製した。

3.9 *H. cinaedi* 主要抗原蛋白質のイムノスクリーニング

ここで構築した *H. cinaedi* 遺伝子ライブラリーから、抗 *H. cinaedi* ウサギ血清を使ってイムノスクリーニングを行った。その結果の一部を図 12 に示した。強いシグナルを示した大腸菌コロニーのうち、図に示したクローン 3-1、8-2、9-5、10-2 はウエスタンブロットによる 2 次スクリーニングにおいてもウサギおよびヒト抗 *H. cinaedi* 血清と反応性を示した (図 13)。

図 13 に示すように、それぞれのクローンはおのおの、29 kDa、30 kDa、45 kDa、50 kDa、80 kDa (矢印) の抗原性のある蛋白質を発現していた (10-2 は 50 kDa と 80 kDa の 2 つ)。この中でクローン 9-5 が発現する蛋白質 (30kDa) はウサギ抗血清、感染患者血清の両方とも強い反応を示し、さらに *H. cinaedi* の菌体ライセート中の 30 kDa の抗原蛋白質と同じ電気泳動度を示した (図 13)。よってこのクローン 9-5 に目的の主要抗原の遺伝子が含まれていると考えられた。そこでさらにクローン 9-5 について DNA 配列解析を行った。

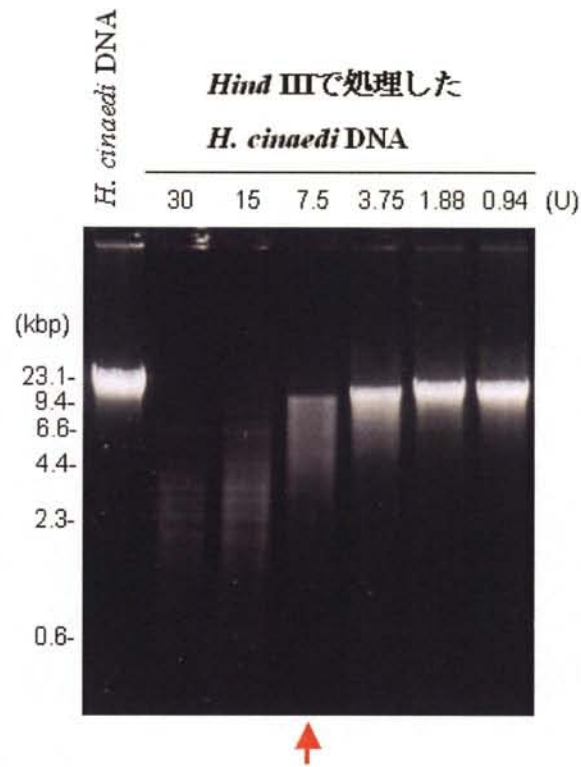


図 11 *H. cinaedi* ゲノム DNA の部分切断

液体培養した *H. cinaedi* から抽出したゲノム DNA を制限酵素 *Hind* III と 37°C、2 時間反応させたものを 0.7%アガロース電気泳動にて確認した。各レーンには 0.4 μ g の DNA が含まれており、それぞれ図に示した量 (U: unit) の *Hind* III と反応させている。赤矢印のレーンが、最適な部分切断 (partial digestion) が得られる *H. cinaedi* DNA と *Hind* III の比を示している。左は DNA サイズマーカー (kbp)。

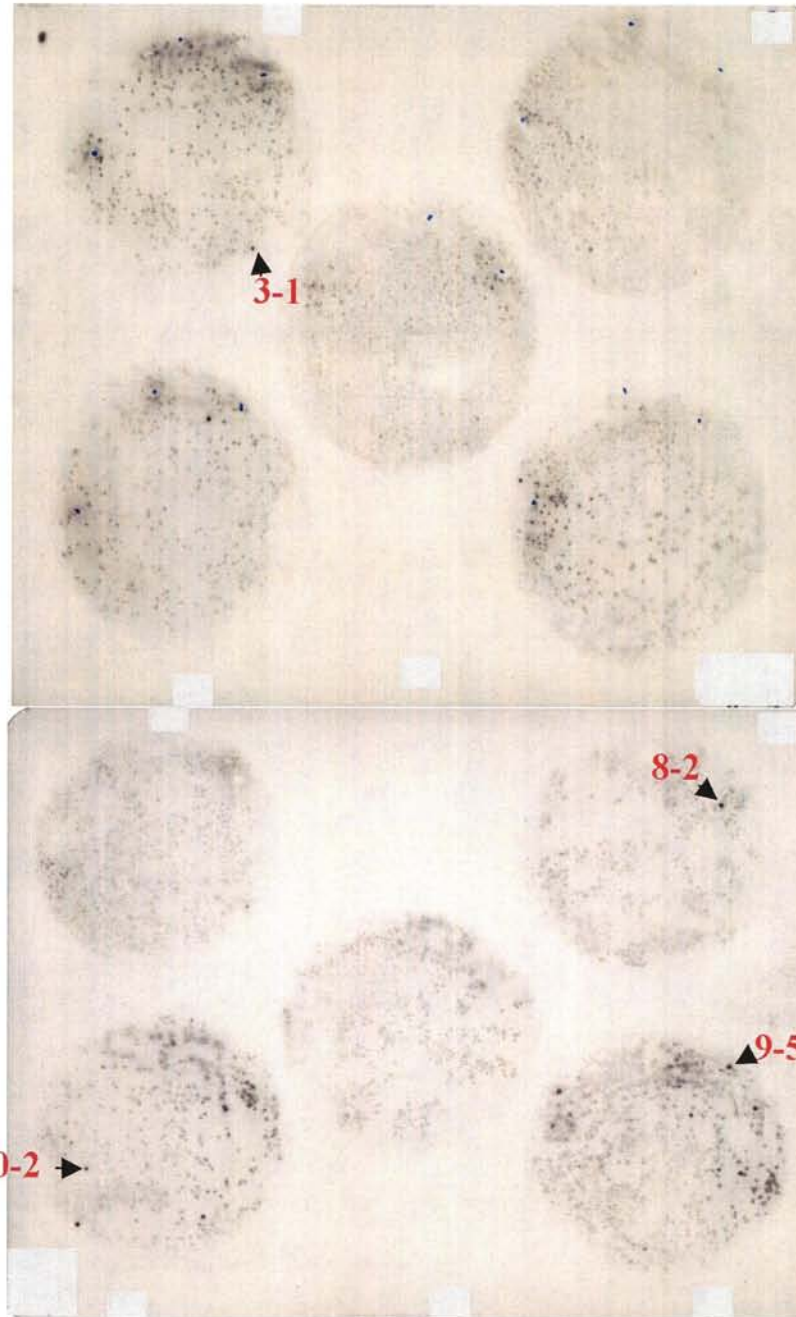


図 12 イムノスクリーニング (1次スクリーニング)

抗 *H. cinaedi* ウサギ血清を用いて *H. cinaedi* 発現ライブラリーからの主要抗原蛋白質のイムノスクリーニングを行った。任意のゲノム DNA 断片 (4~12 kbp) をライゲーションしたプラスミドを導入した大腸菌のコロニーをニトロセルロース膜に写し取り、ライセートバッファーに室温で 14~20 時間、浸して溶菌を行い、その後、*H. cinaedi* 免疫ウサギ血清 (10,000 倍希釈) と反応させた。ペルオキシダーゼ標識 2 次抗体と反応後 ECL Plus system を用いてフィルムに感光させシグナルを検出した。上図はその例を示す。バックグラウンドと比較して強いシグナルを示したクローンを抗原蛋白質を含む候補として選択した。このスクリーニングで得られたこれらクローンは、引き続きウエスタンブロットによる 2 次スクリーニングで解析した。図の 4 つのクローン (3-1, 8-2, 9-5, 10-2) は 2 次スクリーニングによって *H. cinaedi* 免疫ウサギおよび *H. cinaedi* 感染患者血清と強い反応性を示すことが確認された (図 13)。

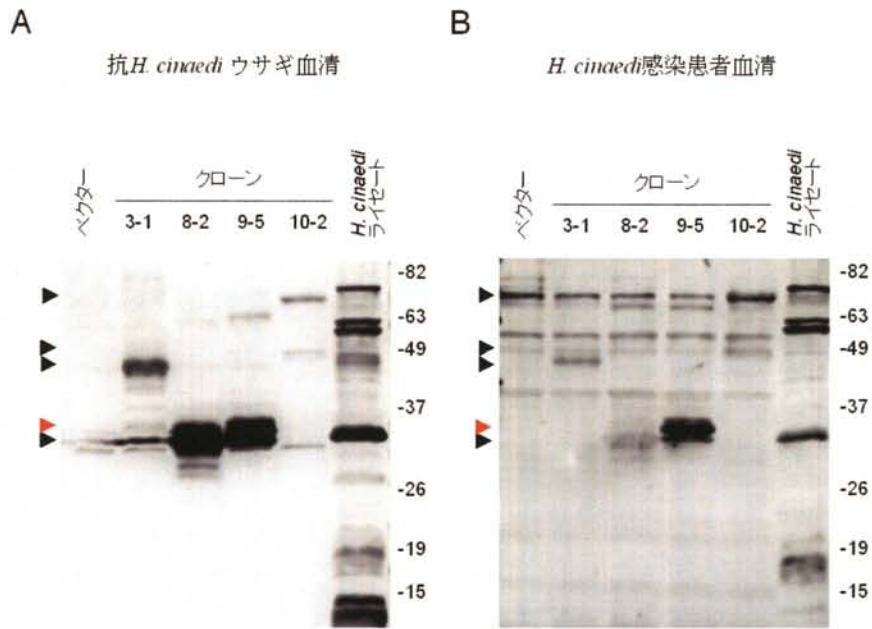


図 13 2 次スクリーニング (ウエスタンブロッティング)

図 12 で得られた抗 *H. cinaedi* ウサギ血清と反応性の高い大腸菌 4 クローンのウエスタンブロットのデータ。各大腸菌クローンのライセート (6.5 μg 蛋白質/レーン) と免疫ウサギ (10,000 倍希釈, A) 及びヒト *H. cinaedi* 感染患者血清 (1,500 倍希釈, B) とを反応させた。positive control として *H. cinaedi* ライセート (6.5 μg 蛋白質/レーン) も同時に泳動した。複数の免疫反応性のある蛋白質バンドが認められたが (矢印)、クローン 9-5 で抗 *H. cinaedi* ウサギ血清・*H. cinaedi* 感染患者血清両方において強い反応性のあるバンド (赤矢印) が認められ、*H. cinaedi* のライセート中の 30 kDa 蛋白質と同じサイズであった。

3.10 *H. cinaedi* 抗原蛋白質 (HcMAP30) の塩基配列およびアミノ酸配列決定

図 14 にクローン 9-5 中の、30 kDa の *H. cinaedi* 主要抗原蛋白質 (HcMAP30) をコードしていると推定される配列を示した。この遺伝子は塩基配列として開始コドン (ATG) から停止コドン (TAA) までの計 822 bp の ORF であり、この遺伝子によって翻訳される推定アミノ酸配列も同時に示した (273 アミノ酸)。また、N 末端の数個上流にあるリボソーム結合部位 (ribosome binding site, rbs) (Shine and Dalgarno 1974) と推定される配列も図中に表示した。この 273 個のアミノ酸配列に関し、グラム陰性菌のリポ蛋白質のシグナルペプチドを推定するプログラム 'LipoP' (<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>) を用いた解析を行ったところ、¹⁷Gly と ¹⁸Cys の間でシグナルペプチターゼ II によって切断されるリポ蛋白質であることが推定された。この DNA 配列については GenBank に登録した (GenBank accession No. AB365645)。

また、BLAST を用いたアミノ酸配列の相同性検索にて判明した最も相同性の高い蛋白質は、*H. hepaticus* の 29 kDa の蛋白質 (HH 0713, GenBank accession No. AAP77310) であった (一致率: 77.3%)。その他、50%程度の相同性を有する蛋白質がいくつか判明したが、そのうち臨床的にも重要性の高いものとして、*H. pylori* の 29 kDa の蛋白質 (HP 1564, GenBank accession No. AAD08604) とも相同性が比較的高いことがわかった (一致率: 56.3%)。図 15 にこれら 3 つの配列の比較を示した。さらに、NCBI の Conserved Domain Search によるとこの HcMAP30 のアミノ酸配列は ABC-type metal ion transport system に関連した蛋白質と近い配列であることがわかった。HH 0713 は “conserved hypothetical protein, similar to *H. pylori* putative outer membrane protein (HP 1564)” と記載されているが、機能の詳細は不明であり、HP 1564 は outer membrane protein と推定されている。

上述した LipoP を用いた解析や Conserved Domain Search の結果より、HcMAP30 は ABC-type metal ion transport system に関連した膜蛋白質 (リポ蛋白質) であると推定された。

rbs

AAGGAGAAAAAATGAAAAAGTTACTTGCCTTAGTCTTTGCGCAGGTTTAGCCTTTGTTGGCTGTGGTATGATAGGGATAAGGAAACA 90
 M K K L L A L V F A A G L A F V G C G D D R D K E T

TATCCTAAAAAGACACAAGAGCAAGAAAAAGTCGTGCTAAAAAGTCGGTGTACGCCTGTGCCACACGCAGAGATTTGGAGTTTGAAAAG 180
 Y P K K T Q E Q E K V V L K V G A T P V P H A E I L E F V K

CCTGATTTGGCAGAGCAGGGTATTGATTGCAAATTGTCTTTACAGATTATGTTTTGCCTAATATTAGCCTTAATGATGGCTCACTT 270
 P D L A E Q G I D L Q I V S F T D Y V L P N I S L N D G S L

GATGCCAATTTTCAACATAAGCCATTTTATGATTCTCTTAAAGCGGATAAGGGCTTAAAGTTAGAATCTATTGCAACAATCCACATT 360
 D A N F H Q H K P F L D S L K A D K G L K L E S I A T I H I

GAGCCAATTTGGGCTGATTCTCGCAAACCTAAGAGTATTGATGAATTGCCACAGGGGCTAGTATAGCTATCCCAAATGATCCAAGCAAT 450
 E P I G L Y S R K L K S I D E L P Q G A S I A I P N D P S N

GGTGGTAGAGCATTATTGTTGCTTGAGGCAAAGGTTTGATTAAGCTTAAAGATTCTAGCAATCTCACCTCAACAGAGCTTGATATTGTA 540
 G G R A L L L L E A K G L I K L K D S S N L T S T E L D I V

GAAAAATGCTAAAGACATTAATAAGCCCGTTGAAGCCGCACCTTTGCCTCGCACACTTGATGATGTTGATGCAGCTGTAATCAATGGC 630
 E N A K D I K I K P V E A A L L P R T L D D V D A A V I N G

AACTACGCGTTGCAAGCTGGGCTTAAAAAGCGGTGATGCGTTGGTGTAGAGGGTAAAGAATCTCCTTATGCCAATATCCTTGTCGTGCAG 720
 N Y A L Q A G L K S G D A L V L E G K E S P Y A N I L V V Q

GAATCTAGGGTGAATGATGAGACCTTGCAAAGCTTAAAAATGCACTGCAAAGCGCAAAGGTTAAAGATTTTATCCAAACACAATACAAA 810
 E S R V N D E T L Q K L K N A L Q S Q K V K D F I Q T Q Y K

GGGAAATAGTTCTCGCATTTAA 834
 G E I V P A F *

図 14 HcMAP30 の遺伝子配列と推定アミノ酸配列
 二重線は推定されるリボゾーム結合部位 (rbs) を示す。* 停止コドン。

HcMAP30	MK--KLLALVFAAGLAFVGCDDDRDKETYPKKTQEKEKVVVKVGATPVPHAEILLEFVKPD	58
HH0713	MK--KLLTFIL-VGLVFFGCS-D-EKNT-SQDG-TAEKVVVKVGATPVPHAEILLEFIKPD	53
HP1564	MNAFKRIISVGVIALGLFNLLDAKHHKE-KKENHKITR-ELKVGANPVPHAQILQSVVDD	58
HcMAP30	LAEQGIDIQIVSFTDYVLPNISLNDGSLDANFHQKPFLLDSLKADKGLKLESIAATHIEP	118
HH0713	LEKEGIDLQIVQFTDYVTPNVSLNDGSLDANYHQKPFLLDALKKDKGLNLESIASIHIEP	113
HP1564	LKEKGIKLIVSFTDYVLPNLAALNDGSLDANYFQHRPYLDRFNLDKRMHLVGLANIHVLP	118
HcMAP30	IGLYSRRLKSIDELPQGASTAIPNDPSNGGRALLLLEAKGLTKLKDSSNLTSTELDIVEN	178
HH0713	LGFYSHKFKDIDSLPOGATTAIPNDPSNGGRALLLDSKGIITKLADTNNLNATELDIVEN	173
HP1564	LRFYSQIITDIKNLKKGSVIAMPNDPANQGRALLLHKQGLTALKDPSNLYATEFDIVKN	178
HcMAP30	AKDIKIKPVEAALLPRTLDDVDAAVINGNYALQAGLKSGDALVLEEGKESPYANILVVQES	238
HH0713	PKSIKIKPVEAALLPRTLDDVDGAVINGNYALQAGLKSSDALFLEGSQSPYANILVVQST	233
HP1564	PYNIKIKPLEAALLPKVLGDVDGAIITGNYALQAKL-T-GALFSEDKDSPYANLIAARED	236
HcMAP30	RVNDETLQKLNALQSQRVKDFIQQTQYKGEIVPAF	273
HH0713	RVNDENLQKLNALQSQRVKDFIQQHYQGEIVPMF	268
HP1564	NAQDEAIKTLIEALQSEKTRKFIILDITYKGAIIIPAF	271

図 15 3 種類の蛋白質の推定アミノ酸配列の比較
 四角で囲った領域は 3 つの配列の完全一致部位を示している。HH0713: *H. hepaticus* 蛋白質 GenBank accession number AAP77310; HP1564: *H. pylori* 蛋白質 GenBank accession number AAD08604.

3.11 HcMAP30 の発現ベクターの作製

目的の 30 kDa 蛋白質をコードしていると考えられる ORF を PCR で増幅し発現プラスミド pET3d に組み込み、大腸菌の pET システムにて組換え蛋白質 His-HcMAP30 を発現させた。目的の蛋白質は前述の 2.17 における溶出画分 2 に回収されていることを確認した。培養 1 L で蛋白質収量がおよそ 9.6 mg であった。図 16 にニッケルアフィニティカラムを用いた組換え蛋白質の発現 (A) およびその免疫反応性 (ウエスタンブロッティング, B) を示す。精製した蛋白質は、ウエスタンブロッティングにおいて *H. cinaedi* 菌体ライセートで免疫したウサギの血清と強く反応することを確認した。

3.12 HcMAP30 と菌体内主要抗原との同一性の確認

組換え蛋白質 HcMAP30 と菌体の内因性蛋白質抗原との同一性を調べるために、本蛋白質と同時に *H. cinaedi*、*H. pylori*、*H. hepaticus*、*C. jejuni* の菌体ライセートを SDS-PAGE 上で泳動し、各種抗血清と反応させたウエスタンブロッティングの結果を図 17A~C に示す。約 31 kDa の組換え蛋白質 (His-HcMAP30) は抗 *H. cinaedi* ウサギ血清だけでなくヒト *H. cinaedi* 感染患者血清によっても強く検出された (図 17A, B)。他の菌体ライセート (*H. pylori*, *H. hepaticus*, *C. jejuni*) との反応では、高分子の蛋白質のバンドのいくつかが比較的弱く検出されている (図 17A, B) が、HcMAP30 に近い分子サイズのバンドは、ウサギ血清による *H. hepaticus* の約 29 kDa のバンドを除いては検出されなかった。His-HcMAP30 のバンドは 30 kDa 主要抗原の位置よりやや高分子側の位置に検出されているが、これは His-Tag による分子量の増加分と推察される。この 2 つの蛋白質の同一性を確認するため、メンブレン A の抗体をストリップし、C で使用したところ、同じ位置にバンドが検出されたことから、間接的に同一性が確認された。さらに、免疫沈降およびウエスタンブロッティングを行ったところ (図 17D)、抗 HcMAP30 抗体により、*H. cinaedi* 菌体ライセートから 30 kDa の蛋白質が特異的に回収されることがわかった。以上の知見から、HcMAP30 と内因性 30 kDa 抗原蛋白質の同一性が証明された。

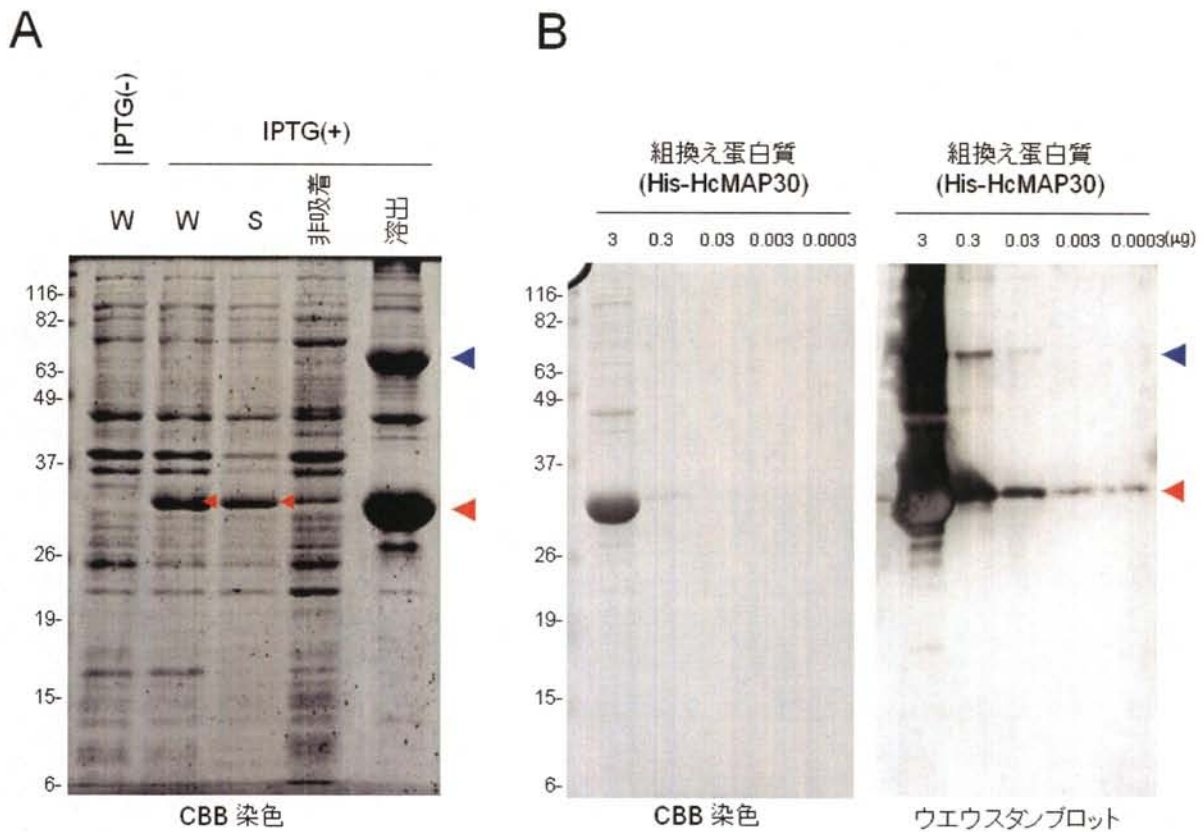


図 16 組換え蛋白質 His-HcMAP30 の発現・精製

- (A) ニッケルアフィニティカラムを用いた His-HcMAP30 の精製の過程のサンプルを SDS-PAGE で解析したものである。W: 全菌体ライセート、S: 可溶性画分、非吸着: ニッケルアフィニティカラム非吸着画分、溶出: ニッケルカラム吸着・溶出画分 2。赤矢印は約 31kDa の組換え蛋白質 (His-HcMAP30) を示す。青矢印は同蛋白質の 2 量体と考えられる。IPTG は、プラスミド中の His-HcMAP30 遺伝子の発現を促進する物質である。
- (B) 溶出した蛋白質を PBS で透析し、段階希釈した精製 His-HcMAP30 を SDS-PAGE で解析したものと、ウェスタンブロッティングによって抗 *H. cinaedi* ウサギ血清 (5,000 倍希釈) との反応性の確認を行ったものである。

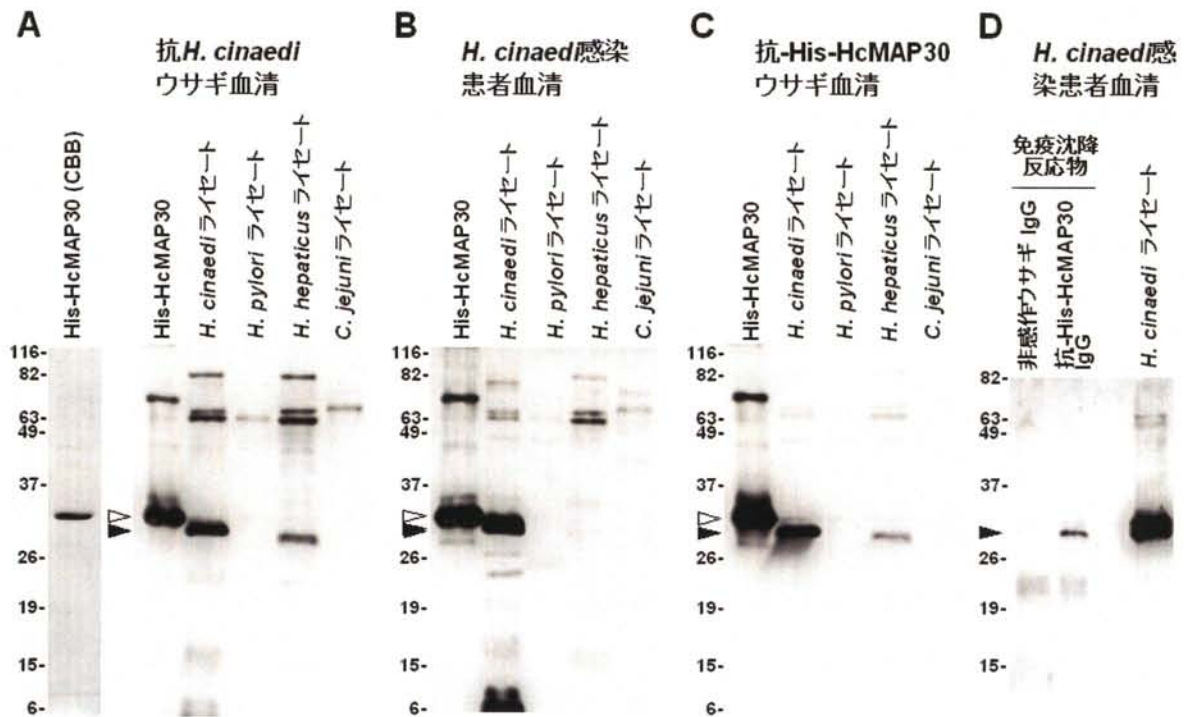


図 17 HcMAP30 および各種菌体ライセートのウエスタンブロッティング

- (A) 抗 *H. cinaedi* ウサギ血清 (*H. cinaedi* 菌体ライセート免疫ウサギ血清, 15,000 倍希釈) との反応
 (B) *H. cinaedi* 感染患者血清 (1,500 倍希釈) との反応
 (C) 抗 His-HcMAP30 ウサギ血清 (His-HcMAP30 免疫ウサギ血清, 15,000 倍希釈) との反応

His-HcMAP30, 0.6 μg /レーン; 各種菌体ライセート中蛋白質, 6.5 μg /レーン. A の左に SDS-PAGE の CBB 染色を示す. A で使用した PVDF 膜は抗体をストリップした後、C のリプローブに使用した。黒矢印: HcMAP30, 白矢印: His-HcMAP30 を示す。

- (D) 免疫沈降を使ったライセート中の主要抗原蛋白質の検出。 *H. cinaedi* の菌体ライセート (6.5 μg) を、抗 His-HcMAP30 抗体または非感作ウサギ IgG (0.5 μg) と 5 時間、4 $^{\circ}\text{C}$ で反応させ、抗体が結合した蛋白質を Protein A/G PLUS-アガロースにより回収した後、 *H. cinaedi* 感染患者血清を使ったウエスタンブロッティングに供した。抗 His-HcMAP30 抗体による免疫沈降反応物は、 *H. cinaedi* 感染患者の血清と反応し、そのバンドの分子サイズは *H. cinaedi* 菌体ライセート (6.5 μg /レーン) 中の主要抗原と同じであることが確認された。

3.13 His-HcMAP30 ウエスタンブロッティングによるヒト血清 *H. cinaedi* 抗体の解析

組換え蛋白質 (His-HcMAP30) を抗原とした、患者および対照群血清のウエスタンブロッティングの結果を図 18 に示す。*H. cinaedi* 感染患者の血清は、8 例中 3 例 (症例 6, 7, 9) が強い反応を示し、3 例 (症例 1, 3, 11) が中等度の反応、1 例が (症例 5) 弱く、残り 1 例 (症例 10) はほとんど反応がなかった (矢印)。一方、対照群においては、*H. pylori* 感染者のサンプル 1 と、年齢・性別マッチング対照群のサンプル 8 が弱~中等度の反応を示し、健康ボランティア群のサンプル 5 が比較的強い反応を示した (矢印) ことを除いて、それ以外の全ての対照群血清 (30/33 例、90.9%) はほとんど反応を認めなかった。

先に示した *H. cinaedi* の菌体ライセートを抗原としたウエスタンブロッティング (図 8) と、組換え蛋白質を抗原としたウエスタンブロッティング (図 18) とを比較すると、前者において認められていた高分子のバンドが後者においては認められず、*H. cinaedi* 感染の有無をより特異的に判定できる抗原であると評価できる。また、30 kDa の主要抗原蛋白質 (図 8, 矢印) に対する反応性を比較すると、非常に類似した相関が認められ、本組換え蛋白質が主要抗原蛋白質と同一のものであることがここでも確認できる。特に、*H. cinaedi* 感染患者の症例 7 は、菌体中の 30 kDa 蛋白質および本組換え蛋白質の両者に対して、非常に強い反応を示した (図 8, 18 矢印)。逆に、*H. cinaedi* 感染患者の症例 10 は、この両蛋白質に対しほとんど反応しなかった。対照群に関しては、His-HcMAP30 に反応を示す 3 例 (*H. pylori* 感染者のサンプル 1, 年齢・性別マッチング対照群のサンプル 8, 健康ボランティア群のサンプル 5) は、やはり菌体ライセート中の 30 kDa に対しても弱~中等度の反応を示していた (図 8)。

以上より、本組換え蛋白質は主要抗原蛋白質と同一のものであり、しかもこれを応用することで、より特異的な *H. cinaedi* 感染症の評価が可能になるものと考えられた。

3.14 HcMAP30 ELISA によるヒト血清 *H. cinaedi* 抗体の定量的解析

そこで、His-HcMAP30 を固相化したマイクロプレートによる ELISA を実施した。図 19 にその結果を示す。*H. cinaedi* 感染患者群は、対照群 (*H. pylori* 感染者, 年齢・性別マッチング対照群, 健康ボランティア対照群, 新生児) と比較して、有意に ($P < 0.05$) 高い抗体価を有した。本 ELISA で非常に高い抗体価を示した *H. cinaedi* 感染患者の症例 6, 7, 9 は、同じく His-HcMAP30 を抗原としたウエスタンブロッティングにおいても他より明らかに強い反応を示しており、また ELISA にて最も低い抗体価

を示した症例 10 はウエスタンブロッティングにおいても同様に反応性が患者中で最も弱かった (図 18A)。さらに、対照群に関しては、*H. pylori* 感染者グループのサンプル 1、年齢・性別マッチング対照群のサンプル 8、健康ボランティア群のサンプル 5 (35 人中 3 人) が本 ELISA で比較的高い抗体価を示したが (図 19)、いずれもウエスタンブロットにおいて他より強い反応性が確認されている (図 18B~D)。この様に、本 His-HcMAP30 固相化 ELISA における抗体価は、His-HcMAP30 や *H. cinaedi* ライセートを抗原としたウエスタンブロッティングの主要抗原蛋白質バンドの強さと相関することが確認された (図 8, 18, 19)。

一方、*H. cinaedi* ライセート抗原を固相化した ELISA (図 10) と、His-HcMAP30 を用いた本 ELISA (図 19) と比べると、後者の方が、対照群 (特に年齢・性別マッチング対照群) における抗体価が低く、特異度 (specificity, 真の陰性を陰性と評価できる率) において優れていると考えられた。これは、*H. cinaedi* ライセートを抗原とした ELISA の場合、ウエスタンブロットで認められた高分子蛋白質に対する反応性が ELISA の値に反映されるためと考えられる (図 10)。

His-HcMAP30-ELISA を用いて解析した *H. cinaedi* 感染患者の抗体価と、血清採取日における発症後の日数との関係を図 20 に示す。症例 1 と症例 6 は表 3 に示した血清採取日の後にも追加の血清が得られたのでそれを加えて推移を表示した。発症から血清採取までの日数は、7 日から 365 日とバラツキがある。抗体価は 1~3 ヶ月後にピークになり、その後低下する傾向が見られた。

また、今回のアウトブレイクの約 1 年後に散発的に発症した *H. cinaedi* 菌血症の症例があった。その症例は、明らかな免疫異常が認められない 82 才女性で、腰椎化膿性脊椎炎の手術を施行した 1 週間後に発熱し、血液培養から *H. cinaedi* が検出された (表 5) が、明らかな蜂窩織炎は認められなかった。なお、化膿性脊椎炎の原因菌は不明であった。この患者も他の患者同様、抗生剤治療で症状は改善した。発症時からの時間を経て数回採取された血液が得られたため、His-HcMAP30-ELISA により、抗体価の経時的変化を検討した (図 21、患者 5)。さらに、手術後に蜂窩織炎の所見を呈したが、血液培養にて菌を証明できなかった症例 (本菌感染の疑診例) が複数あり、そのうち 4 症例についても (表 5 参照) 抗体価推移を検討した (図 21、患者 1~4)。その結果、これら 5 症例はいずれも、血液培養で菌が証明された確診例を含め、それぞれ程度の差はあるものの、経時的に明確な抗体価の上昇が確認された。

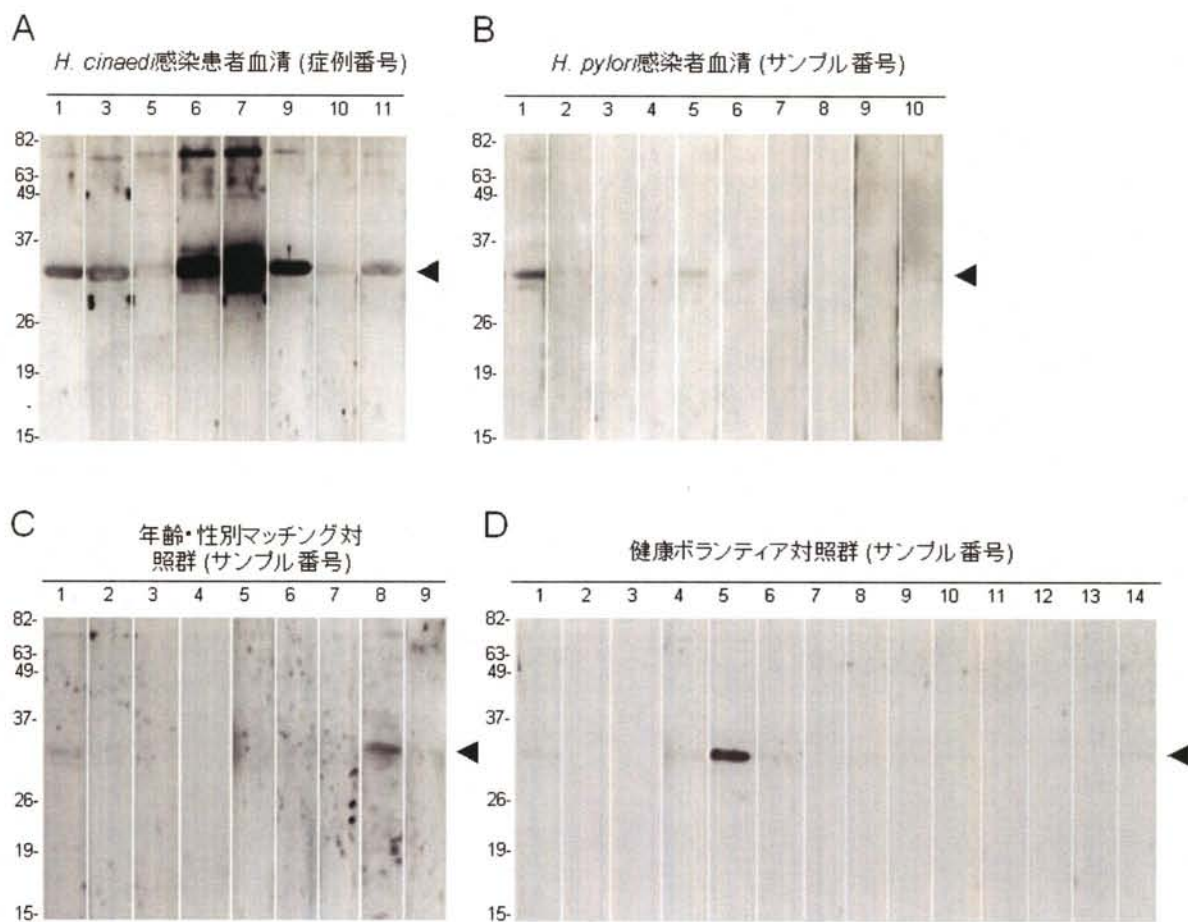


図 18 組換え His-HcMAP30 を抗原としたウエスタンブロッティング
H. cinaedi 感染患者血清 (A) または対照群血清 (B~D) と組換え蛋白質 His-HcMAP30 (0.6 μ g/レーン) との反応。レーン番号(症例番号, サンプル番号) は、表 3、図 8、10 の症例番号およびサンプル番号と対応している。また、全ての血清は 1,500 倍希釈で使用した。

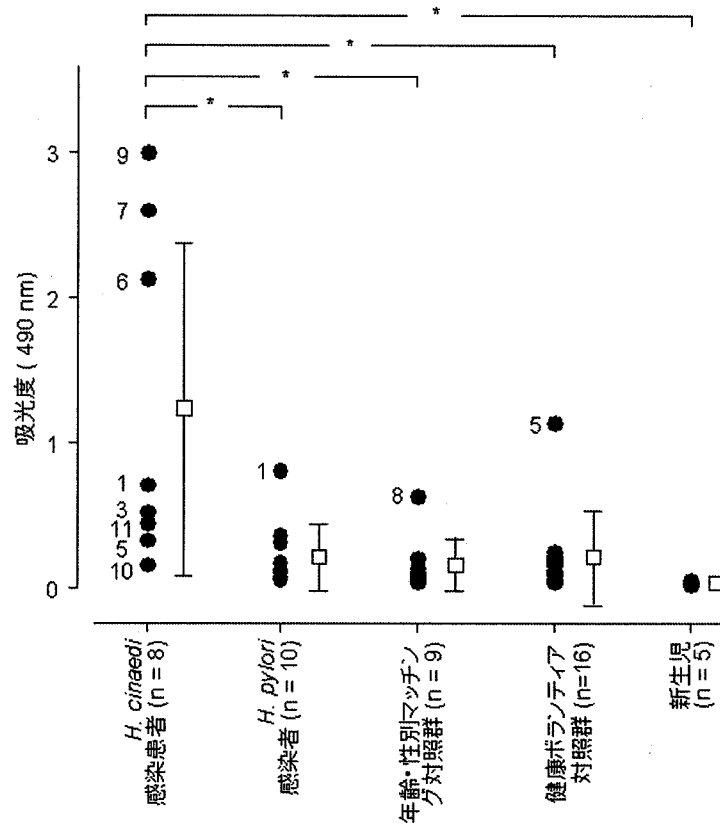


図 19 組換え His-HcMAP30 を抗原とした ELISA

H. cinaedi 感染患者血清 (n=8) の抗体価は他の対照群血清 [*H. pylori* 感染者 (n=10)、年齢・性別マッチング対照群 (n=9)、健康ボランティア対照群 (n=16) および新生児 (n=5)] と比較して有意に高い値を示した。図中の番号は、表 3、図 8、10、18 の症例番号およびサンプル番号と対応している。* $P < 0.05$ 。

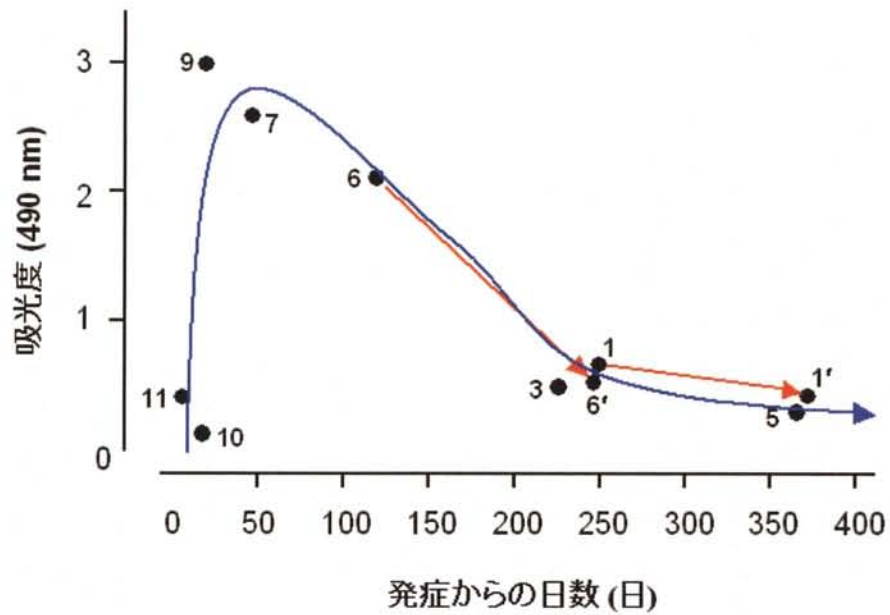


図 20 感染患者の抗体価と発症後日数

H. cinaedi 感染患者の His-HcMAP30-ELISA による血清抗体価と発症後日数との関係。図中の番号は、表 3、図 8、10、18、19 の症例番号と対応している。症例 1 と症例 6 に関しては血清採取時期の離れた血清のサンプルが得られた (1', 6': それぞれ赤矢印で推移を表示)。また、青矢印は全体的な抗体価の推移を表示した。

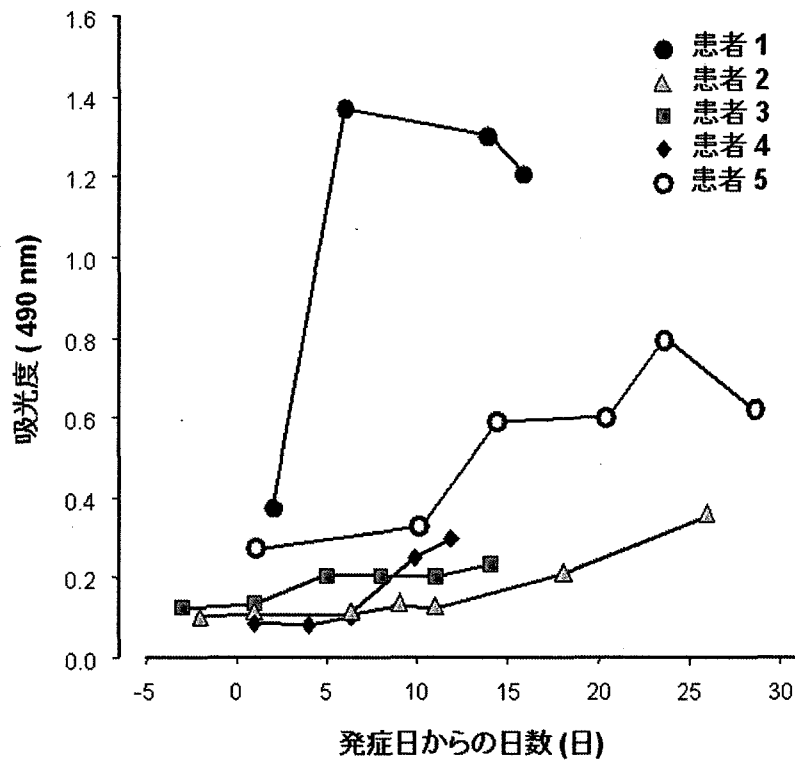


図 21 *H. cinaedi* 感染患者および疑感染患者における抗 McMAP30 抗体価の推移
H. cinaedi 感染患者および感染が疑われた患者の HcMAP30 に対する抗体価の時間推移。0 日ははじめて蜂窩織炎 (患者 1~4) または発熱 (患者 5) が確認された時点を示す。患者 1~4 は *H. cinaedi* の典型的な感染症状があったにもかかわらず、菌が検出されなかった疑診例である。一方、患者 5 は血液培養により *H. cinaedi* が同定された (散发例)。

3.15 小括 2

以上の結果から、以下のことが示された。

- 1) *Helicobacter cinaedi* 感染患者の血清と対照群の血清、さらに *H. cinaedi* 菌体ライセートで免疫したウサギの血清を用いたウエスタンブロット解析により、*H. cinaedi* の 30 kDa の蛋白質が、ヒト感染において最も免疫反応性の高い抗原であることを見出した。
- 2) 上記抗原を同定するために作製した *H. cinaedi* 遺伝子ライブラリーのイムノスクリーニングにより、感染者の血清が強く反応する 30 kDa の主要抗原蛋白質をコードする遺伝子を同定した。
- 3) 2) の遺伝子をもとに作製した組換え蛋白質 (HcMAP30) は、ウエスタンブロット解析において、*H. cinaedi* 感染患者血清と強力な免疫反応性を示した。また、免疫沈降法による解析から、クローニングした遺伝子がコードする蛋白質 (HcMAP30) は、1) の *H. cinaedi* ライセート中の 30 kDa 蛋白質と一致することが示された。
- 4) HcMAP30 を用いた ELISA では、*H. cinaedi* 感染者の血清は、他のコントロールグループ (健常人、*H. pylori* 感染者、および新生児) と比較して、有意に高い抗体価を有していた。しかし、新生児を除いたコントロールの中にも、一部に (35 人中 3 人) 抗体価上昇を示す例が存在することがわかった。
- 5) 今回確立した本主要抗原 (HcMAP30) を用いたウエスタンブロットおよび ELISA による血清診断法は、*H. cinaedi* 感染症の臨床診断法および疫学研究の手段として有用であると考えられた。

第4章 考察

4.1 *H. cinaedi* 感染発症の背景

H. cinaedi が発見された 1980 年始めから今日までになされた疫学的調査や症例報告によると、*H. cinaedi* 感染の発症には、免疫不全状態や HIV 感染またはホモセクシュアリティなどの危険因子の存在が指摘されている。(Burman et al. 1995, Cimolai et al. 1987; Fennell et al. 1984; Fox 2002; Ng et al. 1987; Sacks et al. 1991; Simons et al. 2004; Solnick and Schauer 2001; Sullivan et al. 1997; Tee et al. 1996; Weir et al. 1999)。

日本では、2003 年に初めて、腎移植後で免疫抑制剤使用中の 29 才の男性の *H. cinaedi* 菌血症が報告された (Murakami et al. 2003)。この患者は消化管症状や、蜂窩織炎・関節炎を伴わず、症状は発熱 (39°C) のみであった。また、縦隔リンパ節転移を伴う肺小細胞癌の化学療法中に、2 度にわたり *H. cinaedi* 菌血症を来たした 46 才男性の症例も報告されている (Nishine et al. 2007)。この患者においては消化管症状はないものの糞便から同菌が検出されている。その他、国内の学会における症例報告でも、血液からの分離例 (菌血症・敗血症) が散見される。例えば、悪性リンパ腫の化学療法中の症例や、腎不全のため維持透析中の症例などである。また、非常に興味深いことに、同じ病室で化学療法を施行中の男性肺癌患者 2 例に続けて起こった *H. cinaedi* 菌血症の報告例では、2 例の患者から分離された *H. cinaedi* は PFGE の結果から単一クローンであることが判明し、院内感染が強く疑われたとされている (日本臨床微生物学会, 2005 年)。上述した報告例はいずれも、immunocompromised host あるいは何らかの重大な基礎疾患をもつ患者に発生している例がほとんどである。

2007 年には、日本における *H. cinaedi* の血液からの分離状況が報告された (Matsumoto et al. 2007)。その結果、16,743 検体中、*H. cinaedi* が分離された例は 6 検体であり、これは検体全体の 0.06%、血液培養陽性の検体 (2,718 検体) に対する割合では 0.22% であり、本菌が分離された検体は癌や腎不全、外科手術後などの基礎疾患を有する症例に由来するものと報告されている。Matsumoto らは、血液から *H. cinaedi* が分離される頻度は極めて少ないものの、特に immunocompromised host においては菌血症の重要な原因菌であると結論している。

今回の我々の事例は、全て整形外科手術後に菌血症と蜂窩織炎を発症していたこと、ホモセクシュアリティや免疫不全状態および基礎疾患といった危険因子のない、いわゆる immunocompetent host に発症していたこと、同一の医療機関内で連続的に 11 例もの症例 (疑診例を含めると 20 例程度) が発生しているアウトブレイクであること、が世界的に見ても極めてユニークであると考えられる。

4.2 *H. cinaedi* 分離株の分子疫学と感染経路

本事例は同一病院で、同一菌による感染症が短期間に数多く発生している点から、院内感染による小規模のアウトブレイクであったといえる。今回の一連の臨床分離株は、系統分類学的解析により大きく 2 つのグループに分類された。第 1 の分離株グループは 2004 年の 6 月から 9 月に主に 7 階病棟で得られ、第 2 の分離株グループは、2004 年 10 月から 2005 年 3 月に主に 6 階病棟で得られた (表 3)。従って今回のアウトブレイクは単一のクローンによるものではなく、アウトブレイク期間に第 1 (前期) の株が第 2 (後期) の株に置き換わったと考えられる。1 つの株が別の株に置き換わったメカニズムは不明だが、第一に遺伝子変異が起こった可能性、第二に 2 個のクローンが患者や病院職員に同時あるいは別々に存在していた可能性が上げられる。そして、それぞれのクローンが比較的限られた環境で数ヶ月の間に連続して広がったものと推定される。国内での院内感染例の個発例については既に述べたが、国内外でこれまでこの様なアウトブレイクの報告は知られていない。

この疫学的事実と、全例が整形外科手術後の発症であることを考えると、今回のアウトブレイクが、医原性のもの、あるいは、*H. cinaedi* に汚染された院内環境もしくはキャリアー (患者や医療従事者) に起因する可能性がある。そこで、熊本整形外科病院において *H. cinaedi* の疫学調査のため前向き調査 (プロスペクティブサーベイランススタディ)、および感染防止対策を実施した。*H. cinaedi* は経口感染すると推定されるため、貯水タンク等の培養検査を行った。また、外科器具や、病室内で看護に使う用具 (アイスパックやタオルなど) についてスワブカルチャーなどを実施した。さらに、院内に *H. cinaedi* のキャリアーがいないか調査する目的で、院内の入院患者の他、医師、看護師、理学療法士など患者と密接に関わりのあった医療従事者の便の培養を広範囲に行なった。しかし、これら全ての培養検査において、*H. cinaedi* は検出されなかった。従って、本アウトブレイクの感染源と感染経路は依然として明らかではない。しかし、感染患者 11 例中 2 例において、便培養から菌が検出されていることから、いずれかの患者がキャリアーとして保有していた菌が経口的に広がったことが推定された。

ところで、このアウトブレイクが終息した約 1 年後に、腰椎化膿性脊椎炎の手術後の 82 才女性の血液から *H. cinaedi* が分離された (表 5, 図 21)。この症例は抗生剤の変更後に発生している点や明らかな蜂窩織炎を認めない点など、これまで述べてきたアウトブレイク症例とは相違点のある散発例であるが、同一病院内での発生であり、我々は、引き続き、*H. cinaedi* の疫学的調査 (院内職員・対照群) を行っていくことにしている。

4.3 ヒト以外の *H. cinaedi* の自然宿主

本菌は、イヌ、ネコ、ハムスターなどのペットや家畜からも分離培養され、人畜共通感染菌としての側面を有している (Fernandez et al. 2002; Flores et al. 1990; Fox et al. 2001; Gebhart et al. 1989; Kiehlbauch et al. 1995; Solnick and Schauer 2001)。例えば、2つの市販元 (6つの離れた地域にまたがる) から得られた健康なハムスターの便を調査したところ、72匹中54匹 (75%) から本菌が分離同定され、ハムスターにおいては正常細菌叢を形成しており、ヒトに対する感染源となり得る可能性が指摘されている (Gebhart et al. 1989)。その後実際に、ペットのハムスターがヒトに対する感染源と考えられた事例も報告されている (Orlicek et al. 1993)。しかし、今回経験した事例では、ハムスターを含めたペットの飼育歴は11例の症例のいずれにおいても認められなかった。

4.4 *H. cinaedi* 感染の発症病理

今回の症例ではほとんど全て、手術部位と同側に蜂窩織炎を発症している (表3)。その要因としては、術後の術肢に部分的な血流障害があり、血管内皮への菌の吸着・侵入を起こしやすくした可能性がある。加えて、蜂窩織炎は全て術部位とは離れており、しかも手術部位の創傷が完全に治癒した後に発症していることから術創感染とは考えにくい。実際、蜂窩織炎は術肢のクーリングのためにアイスパックで冷やした部位に起こる傾向が認められた。冷罨法によって局所の血流障害が惹起されたことや、血液中あるいは組織中の酸素分圧が低下したことが本菌の定着と発育を促進したものと考えられる。興味深いことに、手術部位の冷罨法を止めた時期以降に蜂窩織炎の院内発症が終息に向かったという事実があり、このことも上記の考察を支持するものである。同一のクローンが同じ患者の血液と便から検出されている症例が2例みられたことから、手術によって外因的に感染がおこった可能性よりも、むしろ、経口感染した菌がまず腸管内に定着し、手術のストレスなどが要因となって、血管内に侵入し、菌血症を起こしたものと推察される。さらに蜂窩織炎は、菌血症を背景として、局所の冷却が危険因子となって発症したものであろう。

腸管以外の内臓感染として、慢性の腸炎・肝炎を呈したサル (rhesus monkey) の剖検組織 (結腸・肝臓・腸管膜リンパ節組織) から本菌が分離同定されたという例があり、腸炎以外に肝炎との関連が示唆されている (Fox et al. 2001)。ヒトの肝炎との関与を示唆する報告は現在までになされていないが、*H. cinaedi* の肝指向性は今後の重要な課題であると考えられる。

今回の自験例11例中で明らかな消化管症状を呈したのは1例 (下痢, 症例1) の

みで、しかもその症例の便培養から本菌は検出されなかった。逆に、便培養で *H. cinaedi* が検出された症例 (症例 9, 11) においては消化管症状は認めず、便からの本菌の分離と、消化管症状とは必ずしも相関していなかった。なお、今回の症例ではいずれも、蜂窩織炎以外に明らかな合併症は認められず、肝炎を併発した例などはなかった。

腸管感染と菌血症との因果関係については、生後 12~25 才のサル (pig-tailed macaque) を用いた経口感染実験の報告 (Flores et al. 1990) がある。この報告では経口感染をうけた 4 匹全例において、血液および糞便から本菌が分離され、うち 2 匹は、水様便と軟便といった消化管症状に加え、低血圧、努力様呼吸や傾眠傾向など敗血症を示唆する臨床症状を呈したことが記載されている。さらに便培養での菌の検出は少なくとも 3 週間以上続いたとされ、*H. cinaedi* が消化管に感染した後、菌血症さらには敗血症を起こす可能性が示唆されている。

4.5 *H. cinaedi* 感染の治療と予後

本事例の臨床経過に関しては、広域スペクトルのペニシリン系・セフェム系抗生剤が全ての症例で有効であり (表 3)、速やかに発熱・蜂窩織炎の自他覚所見は沈静化に向かった。諸家の症例報告においても、本菌は多くの抗菌剤に感受性を有し、様々なものが使用されている。本感染症は、菌血症・敗血症例であっても重篤な例は少なく、抗菌剤投与で治癒するものがほとんどで、死亡例は未だ報告されていない。治療効果は、ペニシリン系、テトラサイクリン系、アミノグルコシド系が、セフェム系やニューキノロン系に勝るとする報告もあるが (Kiehlbauch et al. 1994)、菌株や症例によっても違いがあり、未だ定説は得られていないのが現状である。一方、この様に抗菌剤の治療効果が高いにも関わらず、高頻度 (37%) に蜂窩織炎の再発が経験された (表 3)。本菌感染症の再発例は、これまでも特に免疫不全症例で多く報告されているが (Kiehlbauch et al. 1995)、今回の我々の症例には明らかな免疫不全はなかったため、再発は *H. cinaedi* の病原性に依存した特徴の一つであると考えられる。また、蜂窩織炎が同じ部位に再発する傾向が強く、このことは、抗生剤治療後も *H. cinaedi* が組織中に潜伏感染している可能性を示しているのかもしれない。なお、症例 7 において、再発の前後に得られた菌株の抗生剤感受性を比較するとどちらも幅広い感受性を示しており、再発は抗生剤の耐性化に起因するものではない。

4.6 ヒト感染における *H. cinaedi* 主要抗原蛋白質の同定

この細菌がこれまでヒト感染症の原因菌としての認知度が低かった理由の一つに、

その最適な培養方法が確立されていないことが挙げられる。実際、本研究中でも、サブカルチャーを行う際に、同じ条件でプレートに植菌しても、うまく生える場合と生えない場合があり、この細菌の培養の難しさを実感した。さらに、今回のアウトブレイク期間中にも、11 症例以外に、同様の蜂窩織炎・発熱を起こしたものの血液培養または便培養からは菌が検出されなかった症例がみられた (表 5, 図 21)。これらの症例中にも、*H. cinaedi* 菌体ライセートおよび組換え抗原を使用した ELISA の抗体価の高い症例が含まれており、これらは血清診断上は感染例であったと考えられる (図 21)。

従って今後、一般細菌検査におけるより確実な培養法の確立が望まれると同時に、血清学的診断法の確立が本感染症の診断において非常に重要であるといえる。

私は、ヒト *H. cinaedi* 感染患者および対照群の血清における反応性の結果 (図 8) および抗原・抗体の希釈実験 (図 9) の結果より、30 kDa 抗原が最も反応性の高い蛋白質であると結論した。実際に、イムノスクリーニングおよびクローニングによって得た *H. cinaedi* 遺伝子がコードする 30 kDa の蛋白質 (HcMAP30) は、*H. cinaedi* 感染患者血清および *H. cinaedi* 免疫ウサギ血清と、非常に強い免疫反応性を示した (図 13, 16, 17, 18)。

一方、Flores らは、*H. cinaedi* の感染患者と免疫ウサギの血清を使ってウエスタンブロットティングによる抗原の検出を行い、96、64、59、47、41、29、12.4 kDa の蛋白質を抗原として示した (Flores et al. 1989)。彼らの記載している 29 kDa の蛋白質は今回私が証明した 30 kDa 抗原 (HcMAP30) と同じものであると推測される。彼らは 59 kDa と 64 kDa の抗原がもっとも広範囲のサンプルで認められたと記載し、30 kDa (29kDa) 抗原には注目していない。しかし、60 kDa (59 kDa) と 65 kDa (64kDa) の抗原は、私の解析では、対照群にも多く検出されており、本菌感染症に特異的に関連する抗原ではないものと考えられる (図 8)。一方、サルを用いた経口の感染実験 (Flores et al. 1990) では、本菌を抗原としたウエスタンブロットで、90 日後の血清が 29 kDa の蛋白質と最も強い反応を示したことが確認されている。

4.7 患者血清抗体価の変動と時間的推移

血清が得られ、抗体価を測定できた 8 例の感染患者のうち、1 例の血清は *H. cinaedi* 菌体ライセート中の 30 kDa 蛋白質とほとんど反応せず (図 8, 症例 10)、別の 2 例は反応が弱かったが (図 8, 症例 5, 11)、この反応性の低さは組換え蛋白質 HcMAP30 を用いたウエスタンブロットティング (図 18) および ELISA (図 19) においても概ね一致していた。また、対照血清群を用いた実験でも、菌体ライセートを用いたウエスタンブロットティングにおける 30 kDa のバンドの強さと (図 8) HcMAP30 を用いたウエ

スタンブロットティング (図 18) および ELISA (図 19) の結果にも相関性が認められた。全ての *H. cinaedi* 感染者の血清がある 1 つの抗原蛋白質に対し一様な反応性を示さないことについては、①抗原に対する宿主の免疫応答の多様性、すなわち特定の抗原に対する反応性の個体間の違い、②血清採取の時期の違いによるもの、つまり感染症の経過における抗体上昇の程度・種類の差、の 2 点が関与していると考えられる。図 21 では、血液培養陽性者および感染が強く疑われる患者の発症時点からの抗体価の推移を示している。これによると、仮にこれら全員が感染していると仮定した場合、一定の上昇傾向は認められるとはいえ、明らかにこの蛋白質に対して反応性に違いが認められる。これは、一部にはこの菌の感染が初回感染か否かといったことも関与しているかもしれない。

HcMAP30 以外の抗原については、例えばクローン 9-5 以外に、別の抗原蛋白質をコードしているクローンを 3 個回収しており (図 13)、それらの遺伝子配列解析も現在行っている。それらの抗原蛋白質の DNA 配列を決定し、同様に組換え蛋白質として発現させ、免疫学的反応を検討することも今後の重要な課題の一つである。感染者血清との反応性が強いものでなくとも、特異性の改善という観点からは貴重な抗原となるかもしれない。

H. cinaedi 感染患者における HcMAP30 血清抗体価の長期間にわたる推移に関しては、各患者血清における発症からの血清採取までの時期と抗体価の関係を調べることで評価ができる (表 3, 図 20)。発症から 20 日~120 日の患者血清が最も抗体価が高く、120 日以降は減少する傾向がみられた (図 20, 症例 6, 7, 9)。従って感染後、1~3 カ月で抗体価はピークを迎えその後低下するものと考えられる。実際に症例 1 と症例 6 に関しては同一人における時間経過による抗体価の下降傾向 (数ヶ月以降) が認められていることからこの様な抗体価の推移が示唆される。

4.8 主要抗原蛋白質の遺伝子配列から推定される性質

私が主要抗原として同定したこの 30kDa の蛋白質 (HcMAP30) は、遺伝子の塩基配列および推定アミノ酸配列 (図 14) から、*H. hepaticus* の 29 kDa の蛋白質 (GenBank accession no.AAP77310: HH0713) と最も相同性が高いことがわかった。この 29 kDa の蛋白質の機能についてははっきりわかっていないが (conserved hypothetical protein)、データベース上の記載によれば、*H. pylori* の outer membrane protein と推定される蛋白質 (GenBank accession no.AAD08604: HP1564) と類似性があり、確かにこれら 3 種類のアミノ酸配列は互いに比較的高い相同性が認められた (図 15)。

また、HcMAP30 はグラム陰性菌のリポ蛋白質を推定するプログラム (LipoP, Juncker et al. 2003) による解析において、17 番目の Gly と 18 番目の Cys との間でシ

グナルペプチダーゼ II で切断されるリポ蛋白質であることが示唆された。グラム陰性菌のリポ蛋白質は、前駆体蛋白質として生成された後、N 末端の疎水性のシグナルペプチドがプロテアーゼにより切断され、アシル化された Cys 残基を介して細胞膜にアンカーすることが知られており (Hayashi and Wu 1990, Sankaran and Wu 1994)、HcMAP30 の膜局在が推定された。さらに、蛋白質のドメインの類似性の解析 (NCBI Conserved Domain search) により、HcMAP30 のアミノ酸配列は“ABC-type metal ion transport system, periplasmic component/surface antigen”のドメインと類似性がみられ、これらの結果から、HcMAP30 は細菌の ABC-type metal ion transport system に関連している膜蛋白質 (リポ蛋白質) と推定された。このような膜蛋白質が宿主により効率よく認識され主要な抗原となることは比較的理にかなったことかもしれない。

4.9 *H. cinaedi* 主要抗原蛋白質の免疫交差性

H. hepaticus の菌体ライセートと抗 *H. cinaedi* ウサギ血清とのウエスタンブロッティングでは、*H. hepaticus* の高分子蛋白質 (50~100 kDa) に強い反応、29 kDa 蛋白質に弱い反応が認められた (図 17A)。また、抗 His-HcMAP30 ウサギ血清を用いたウエスタンブロッティングでは、*H. hepaticus* 菌体ライセート中の 29 kDa 蛋白質に中程度の反応が認められた (図 17C)。このことは、HcMAP30 と *H. hepaticus* の 29 kDa の蛋白質との交差反応性を示しており、これは HcMAP30 遺伝子と相同性の高い *H. hepaticus* 遺伝子が存在することからも支持される (図 15)。高分子の蛋白質については、抗 *H. cinaedi* ウサギ血清では *H. pylori*、*H. hepaticus*、*C. jejuni* の蛋白質と交差反応性が認められている (図 17A, B) が、抗 His-HcMAP30 ウサギ血清では反応が顕著に少なかった。また、ヒト *H. cinaedi* 感染患者の血清は *H. hepaticus* の 29 kDa 蛋白質とは反応しなかった (図 17)。このことは HcMAP30 が特異的抗原として *H. cinaedi* 感染の血清学的検査に有用であることを示している。

H. hepaticus に関しては、複数の研究者がヒトの疾病との関連性について示唆しており、例えば、子供の炎症性腸疾患症例の大腸組織の DNA 抽出物から *H. hepaticus* の 16S rRNA 遺伝子配列を検出した報告 (Vorobjova et al. 2006) や *H. hepaticus* の菌体抽出物を抗原とした ELISA において慢性肝臓疾患の患者の群が対照群と比較して高値であったとする報告 (Zhang et al. 2006) などがある。しかし、一般的には *H. hepaticus* はマウスの肝炎の病原体として知られており (Fox et al. 1994)、ヒトの検体から培養によって分離された報告はない。むしろ、今回の知見は、これまでの *H. hepaticus* の菌体抽出物などを抗原とした ELISA が *H. cinaedi* 感染の影響を受けている可能性を示唆している。

最近、*C. jejuni* とギラン・バレー症候群との関連性 (Speed and Cavanagh 1984;

Nachamkin 1997) や *H. pylori* と特発性血小板減少性紫斑病 (Gasbarrini et al. 1998; Kohda et al. 2002)、さらに *H. pylori* と冠動脈 (動脈硬化) 疾患 (Osawa et al. 2001) との関連性が指摘されている。従って *H. cinaedi* とこれら同属・類縁属菌種との交差反応性に加え、*H. cinaedi* の強い血管侵襲性から、様々な自己免疫疾患や動脈硬化に本菌感染症が関与している可能性も示唆される。今後、本研究によって確立した ELISA などの血清学的アプローチを *H. cinaedi* と自己免疫疾患や動脈硬化との関連性を探る疫学研究として展開していきたい。

4.10 組換え蛋白質を抗原とした ELISA の有用性

本研究と同様、*Helicobacter* や *Campylobacter* 属菌の抗原を組換え蛋白として精製し ELISA に応用した報告もみられる (Burnens et al. 1995; Feng et al. 2002, 2004; Kendall et al. 2004; Livingston et al. 1999; Tummuru et al. 1993)。これら ELISA は菌体ライセートを用いた ELISA より特異度に勝っていることが示されている。実際今回の研究においても組換え蛋白質を抗原として用いた ELISA (図 19) では *H. cinaedi* の菌体ライセートを用いた ELISA (図 10) の場合より、対照群血清の値がより低く抑えられていることから、特異度が改善していると考えられる。

組換え HcMAP30 を抗原とした ELISA において (図 19)、感染患者 8 例の血清抗体価は、臨床症状出現 (発症日) から血清採取までの期間が 7 日から 1 年と幅があるものの、対照群と比較して有意に高い値が得られた ($P < 0.05$, 図 19)。この ELISA における抗体価 (図 19) とウエスタンブロッティング (図 8, 18, 19) の相関関係は *H. cinaedi* 感染患者と対照群両方において確認されることから、HcMAP30 を使用した ELISA は *H. cinaedi* 感染の血清診断法として有用であると考えられる。また、今回の研究により、疑感染者において、本組換え HcMAP30-ELISA によって有意な抗体価上昇を確認できた (図 21)。このことは、典型的な臨床所見を示す症例においては、培養で本菌が証明できない場合でも、本研究で開発した ELISA を用いることによって *H. cinaedi* 感染を診断することが可能であることを示している。

今回、本 ELISA により、本蛋白質抗原に対する中等度以上の抗体価を有する健常人が 8.6% (35 例中 3 例) 存在することがわかった (図 19)。比較的高い抗体価を有する例が対照群の中にも認められたことは、不顕性感染 (潜伏感染) やキャリアーの存在を示唆するものである。そして、*H. cinaedi* がこれまで考えられていたような稀な細菌ではなく、日常的にヒトに病原性を発揮し得る細菌として我々人間社会に予想以上に広がっていることを示している。今後、本 ELISA による大規模スクリーニングを展開することにより *H. cinaedi* 感染の実態がさらに明らかになるものと期待される。

第 5 章 結語

新興感染症菌の一つである *H. cinaedi* は、AIDS など免疫不全状態にある患者に菌血症をおこす日和見感染菌の一つとして知られていた比較的稀な細菌である。今回、明らかな免疫不全のない患者に連続して発症した本菌の菌血症・蜂窩織炎に関し、その症例解析および臨床分離菌の分子疫学的解析を行った。さらに、*H. cinaedi* の主要抗原として 30 kDa 蛋白質を同定し、その組換え蛋白質を用いたウエスタンブロットおよび ELISA による血清学的検査法を確立した。この方法は *H. cinaedi* 感染の臨床診断法としての応用のみならず、未だ不明な点の多い *H. cinaedi* 感染症の疫学・病態解明のための有用な手段となることが期待される。

第 6 章 参考文献

Akopyanz, N., Bukanov, N.O., Westblom, T.U., Kresovich, S., and Berg, D.E. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 20: 5137-5142, 1992.

Burman, W.J., Cohn, D.L., Reves, R.R., and Wilson, M.L. Multifocal cellulitis and monoarticular arthritis as manifestations of *Helicobacter cinaedi* bacteremia. *Clin Infect Dis* 20: 564-570, 1995.

Burnens, A., Stucki, U., Nicolet, J., and Frey, J. Identification and characterization of an immunogenic outer membrane protein of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 33: 2826-2832, 1995.

Burucoa, C., Lhomme, V., and Fauchere, J.L. Performance criteria of DNA fingerprinting methods for typing of *Helicobacter pylori* isolates: experimental results and meta-analysis. *J Clin Microbiol* 37: 4071-4080, 1999.

Cimolai, N., Gill, M.J., Jones, A., Flores, B., Stamm, W.E., Laurie, W., Madden, B., and Shahrabadi, M.S. "*Campylobacter cinaedi*" bacteremia: case report and laboratory findings. *J Clin Microbiol* 25: 942-943, 1987.

Decker, C.F., Martin, G.J., Barham, W.B., and Paparello, S.F. Bacteremia due to *Campylobacter cinaedi* in a patient infected with the human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*, 15, 178-9, 1992.

Eppinger, M., Baar, C., Linz, B., Raddatz, G., Lanz, C., Keller, H., Morelli, G., Gressmann, H., Achtman, M., and Schuster, S.C. Who ate whom? Adaptive *Helicobacter* genomic changes that accompanied a host jump from early humans to large felines. *PLoS Genet* 2: e120, 2006.

Ezaki, T., Hashimoto, Y., and Yabuuchi, E. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Bacteriol* 39: 224-229, 1989.

Ezaki, T., Li, N., Hashimoto, Y., Miura, H., and Yamamoto, H. 16S ribosomal DNA sequences of anaerobic cocci and proposal of *Ruminococcus hansenii* comb. nov. and *Ruminococcus productus* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 44: 130-136, 1994.

Feng, S., Hodzic, E., Kendall, L.V., Smith, A., Freet, K., and Barthold, S.W. Cloning and expression of a *Helicobacter bilis* immunoreactive protein. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 627-632, 2002.

Feng, S., Kendall, L.V., Hodzic, E., Wong, S., Lorenzana, E., Freet, K., Ku, K.S., Luciw, P.A., Barthold, S.W., and Khan, I.H. Recombinant *Helicobacter bilis* protein P167 for mouse serodiagnosis in a multiplex microbead assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 1094-1099, 2004.

Fennell, C.L., Totten, P.A., Quinn, T.C., Patton, D.L., Holmes, K.K., and Stamm, W.E. Characterization of *Campylobacter*-like organisms isolated from homosexual men. *J Infect Dis* 149: 58-66, 1984.

Fernandez, K.R., Hansen, L.M., Vandamme, P., Beaman, B.L., and Solnick, J.V. Captive rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) are commonly infected with *Helicobacter cinaedi*. *J Clin Microbiol* 40: 1908-1912, 2002.

Flores, B.M., Fennell, C.L., and Stamm, W.E. Characterization of *Campylobacter cinaedi* and *C. fennelliae* antigens and analysis of the human immune response. *J Infect Dis* 159: 635-640, 1989.

Flores, B.M., Fennell, C.L., Kuller, L., Bronsdon, M.A., Morton, W.R., and Stamm, W.E. Experimental infection of pig-tailed macaques (*Macaca nemestrina*) with *Campylobacter cinaedi* and *Campylobacter fennelliae*. *Infect Immun* 58: 3947-3953, 1990.

Fox, J.G. The non-*H pylori* helicobacters: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. *Gut* 50: 273-283, 2002.

Fox, J.G., Dewhirst, F.E., Tully, J.G., Paster, B.J., Yan, L., Taylor, N.S., Collins, M.J., Jr., Gorelick, P.L., and Ward, J.M. *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium

isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. *J Clin Microbiol* 32: 1238-1245, 1994.

Fox, J.G., Handt, L., Sheppard, B.J., Xu, S., Dewhirst, F.E., Motzel, S., and Klein, H. Isolation of *Helicobacter cinaedi* from the colon, liver, and mesenteric lymph node of a rhesus monkey with chronic colitis and hepatitis. *J Clin Microbiol* 39: 1580-1585, 2001.

Gasbarrini, A., Franceschi, F., Tartaglione, R., Landolfi, R., Pola, P., and Gasbarrini, G. Regression of autoimmune thrombocytopenia after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 352: 878, 1998.

Gebhart, C.J., Fennell, C.L., Murtaugh, M.P., and Stamm, W.E. *Campylobacter cinaedi* is normal intestinal flora in hamsters. *J Clin Microbiol* 27: 1692-1694, 1989.

Goodwin, C.S., J. A. Armstrong, T. Chilvers, M. Peters, M. D. Collins, L. Sly, W. McConnell, and W. E. S. Harper. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *In. J Syst Bacteriol* 39: 397-405, 1989.

Goto, T., Nishizono, A., Fujioka, T., Ikewaki, J., Mifune, K., and Nasu, M. Local secretory immunoglobulin A and postimmunization gastritis correlate with protection against *Helicobacter pylori* infection after oral vaccination of mice. *Infect Immun* 67: 2531-2539, 1999.

Grayson, M.L., Tee, W., and Dwyer, B. Gastroenteritis associated with *Campylobacter cinaedi*. *Med J Aust* 150: 214-215, 1989.

Hayashi, S., and Wu, H.C. Lipoproteins in bacteria. *J Bioenerg Biomembr* 22: 451-471, 1990.

Hsueh, P.R., Teng, L.J., Hung, C.C., Chen, Y.C., Yang, P.C., Ho, S.W., and Luh, K.T. Septic shock due to *Helicobacter fennelliae* in a non-human immunodeficiency virus-infected heterosexual patient. *J Clin Microbiol* 37: 2084-2086, 1999.

Juncker, A.S., Willenbrock, H., Von Heijne, G., Brunak, S., Nielsen, H., and Krogh, A.

Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci* 12: 1652-1662, 2003.

Kawamura, Y., Hou, X.G., Sultana, F., Miura, H., and Ezaki, T. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Bacteriol* 45: 406-408, 1995.

Kendall, L.V., Feng, S., Hodzic, E., Freet, K., and Barthold, S.W. Use of the P167 recombinant antigen for serodiagnosis of *Helicobacter bilis*. *Comp Med* 54: 44-48, 2004.

Kiehlbauch, J.A., Brenner, D.J., Cameron, D.N., Steigerwalt, A.G., Makowski, J.M., Baker, C.N., Patton, C.M., and Wachsmuth, I.K. Genotypic and phenotypic characterization of *Helicobacter cinaedi* and *Helicobacter fennelliae* strains isolated from humans and animals. *J Clin Microbiol* 33: 2940-2947, 1995.

Kielbauch, J.A., Tauxe, R.V., Baker, C.N., and Wachsmuth, I.K. *Helicobacter cinaedi*-associated bacteremia and cellulitis in immunocompromised patients. *Ann Intern Med* 121: 90-93, 1994.

Kohda, K., Kuga, T., Kogawa, K., Kanisawa, Y., Koike, K., Kuroiwa, G., Hirayama, Y., Sato, Y., and Niitsu, Y. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on platelet recovery in Japanese patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura and secondary autoimmune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 118: 584-588, 2002.

Lasry, S., Simon, J., Marais, A., Pouchot, J., Vinceneux, P., and Boussougant, Y. *Helicobacter cinaedi* septic arthritis and bacteremia in an immunocompetent patient. *Clin Infect Dis* 31: 201-202, 2000.

Leemann, C., Gambillara, E., Prod'hom, G., Jatton, K., Panizzon, R., Bille, J., Francioli, P., Greub, G., Laffitte, E., and Tarr, P.E. First case of bacteremia and multifocal cellulitis due to *Helicobacter canis* in an immunocompetent patient. *J Clin Microbiol* 44: 4598-4600, 2006.

Lewis, G.D., Holmes, C.B., Holmvang, G., and Butterton, J.R. Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 8-2007. A 48-year-old man with chest pain followed by cardiac arrest. *N Engl J Med* 356: 1153-1162, 2007.

Liu, S., Tobias, R., McClure, S., Styba, G., Shi, Q., and Jackowski, G. Removal of endotoxin from recombinant protein preparations. *Clin Biochem* 30: 455-463, 1997.

Livingston, R.S., Riley, L.K., Hook, R.R., Jr., Besch-Williford, C.L., and Franklin, C.L. Cloning and expression of an immunogenic membrane-associated protein of *Helicobacter hepaticus* for use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 6: 745-750, 1999.

Mammen, M.P., Jr., Aronson, N.E., Edenfield, W.J., and Endy, T.P. Recurrent *Helicobacter cinaedi* bacteremia in a patient infected with human immunodeficiency virus: case report. *Clin Infect Dis* 21: 1055, 1995.

Marmur, J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *Mol Biol* 3: 208-218, 1961.

Matsumoto, T., Goto, M., Murakami, H., Tanaka, T., Nishiyama, H., Ono, E., Okada, C., Sawabe, E., Yagoshi, M., Yoneyama, A., Okuzumi, K., Tateda, K., Misawa, N., and Yamaguchi, K. Multicenter study to evaluate bloodstream infection by *Helicobacter cinaedi* in Japan. *J Clin Microbiol* 45: 2853-2857, 2007.

Mikkonen, T.P., Karenlampi, R.I., and Hanninen, M.L. Phylogenetic analysis of gastric and enterohepatic *Helicobacter* species based on partial HSP60 gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 753-758, 2004.

Murakami, H., Goto, M., Ono, E., Sawabe, E., Iwata, M., Okuzumi, K., Yamaguchi, K., and Takahashi, T. Isolation of *Helicobacter cinaedi* from blood of an immunocompromised patient in Japan. *J Infect Chemother* 9: 344-347, 2003.

Nachamkin, I. Microbiologic approaches for studying *Campylobacter* species in patients with Guillain-Barre syndrome. *J Infect Dis* 176 Suppl 2: S106-114, 1997.

Ng, V.L., Hadley, W.K., Fennell, C.L., Flores, B.M., and Stamm, W.E. Successive bacteremias with "*Campylobacter cinaedi*" and "*Campylobacter fennelliae*" in a bisexual male. *J Clin Microbiol* 25: 2008-2009, 1987.

Ohkusu, K., Bermudez, L.E., Nash, K.A., MacGregor, R.R., and Inderlied, C.B. Differential virulence of *Mycobacterium avium* strains isolated from HIV-infected patients with disseminated *M. avium complex* disease. *J Infect Dis* 190: 1347-1354, 2004.

Orlicek, S.L., Welch, D.F., and Kuhls, T.L. Septicemia and meningitis caused by *Helicobacter cinaedi* in a neonate. *J Clin Microbiol* 31: 569-571, 1993.

Page, R.D. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12: 357-358, 1996.

Pasternak, J., Bolivar, R., Hopfer, R.L., Fainstein, V., Mills, K., Rios, A., Bodey, G.P., Fennell, C.L., Totten, P.A., and Stamm, W.E. Bacteremia caused by *Campylobacter*-like organisms in two male homosexuals. *Ann Intern Med* 101: 339-341, 1984.

Pearson, W.R., and Lipman, D.J. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 2444-2448, 1988.

Pena, J.A., McNeil, K., Fox, J.G., and Versalovic, J. Molecular evidence of *Helicobacter cinaedi* organisms in human gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol*, 40, 1511-3, 2002.

Quinn, T.C., Goodell, S.E., Fennell, C., Wang, S.P., Schuffler, M.D., Holmes, K.K., and Stamm, W.E. Infections with *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter*-like organisms in homosexual men. *Ann Intern Med* 101: 187-192, 1984.

Osawa, H., Kawakami, M., Fujii, M., Kubo, N., Iwanaka, H., Yamamoto, W., Saitoh, M., Yaginuma, T., and Sugano, K. *Helicobacter pylori* infection and coronary heart disease in Japanese patients. *Cardiology* 95: 14-19, 2001.

Sacks, L.V., Labriola, A.M., Gill, V.J., and Gordin, F.M. Use of ciprofloxacin for successful eradication of bacteremia due to *Campylobacter cinaedi* in a human immunodeficiency virus-infected person. *Rev Infect Dis* 13: 1066-1068, 1991.

Sambrook, J., and Russell, D.W., Molecular cloning : a laboratory manual. 3rd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N.Y., 2001.

Sankaran, K., and Wu, H.C. Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglyceryl moiety from phosphatidylglycerol. *J Biol Chem* 269: 19701-19706, 1994.

Shine, J., and Dalgarno, L. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71: 1342-1346, 1974.

Simons, E., Spacek, L.A., Lederman, H.M., and Winkelstein, J.A. *Helicobacter cinaedi* bacteremia presenting as macules in an afebrile patient with X-linked agammaglobulinemia. *Infection* 32: 367-368, 2004.

Solnick, J.V., and Schauer, D.B. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin Microbiol Rev* 14: 59-97, 2001.

Speed, B., Kaldor, J., and Cavanagh, P. Guillain-Barre syndrome associated with *Campylobacter jejuni* enteritis. *J Infect* 8: 85-86, 1984.

Suerbaum, S., Josenhans, C., Sterzenbach, T., Drescher, B., Brandt, P., Bell, M., Droge, M., Fartmann, B., Fischer, H.P., Ge, Z., Horster, A., Holland, R., Klein, K., Konig, J., Macko, L., Mendz, G.L., Nyakatura, G., Schauer, D.B., Shen, Z., Weber, J., Frosch, M., and Fox, J.G. The complete genome sequence of the carcinogenic bacterium *Helicobacter hepaticus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7901-7906, 2003.

Sullivan, A.K., Nelson, M.R., Walsh, J., and Gazzard, B.G. Recurrent *Helicobacter cinaedi* cellulitis and bacteraemia in a patient with HIV Infection. *Int J STD AIDS* 8: 59-60, 1997.

Taylor, N.S., Ge, Z., Shen, Z., Dewhirst, F.E., and Fox, J.G. Cytolethal distending toxin: a potential virulence factor for *Helicobacter cinaedi*. *J Infect Dis* 188: 1892-1897, 2003.

Tee, W., Anderson, B.N., Ross, B.C., and Dwyer, B. Atypical campylobacters associated with gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 25: 1248-1252, 1987.

Tee, W., Street, A.C., Spelman, D., Munckhof, W., and Mijch, A. *Helicobacter cinaedi* bacteraemia: varied clinical manifestations in three homosexual males. *Scand J Infect Dis*

28: 199-203, 1996.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680, 1994.

Totten, P.A., Fennell, C.L., Tenover, F.C., Wezenberg, J.M., Perine, P.L., Stamm, W.E., and Holmes, K.K. *Campylobacter cinaedi* (sp. nov.) and *Campylobacter fennelliae* (sp. nov.): two new *Campylobacter* species associated with enteric disease in homosexual men. *J Infect Dis* 151: 131-139, 1985.

Tummuru, M.K., Cover, T.L., and Blaser, M.J. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun* 61: 1799-1809, 1993.

Vandamme, P., Falsen, E., Pot, B., Kersters, K., and De Ley, J. Identification of *Campylobacter cinaedi* isolated from blood and feces of children and adult females. *J Clin Microbiol* 28: 1016-1020, 1990.

Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R., and De Ley, J. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* 41: 88-103, 1991.

Vorobjova, T., Nilsson, I., Terjajev, S., Granholm, M., Lyyra, M., Porkka, T., Prukk, T., Salupere, R., Maaros, H.I., Wadstrom, T., and Uibo, R. Serum antibodies to enterohepatic *Helicobacter* spp. in patients with chronic liver diseases and in a population with high prevalence of *H. pylori* infection. *Dig Liver Dis* 38: 171-176, 2006.

Weir, S.C., Gibert, C.L., Gordin, F.M., Fischer, S.H., and Gill, V.J. An uncommon *Helicobacter* isolate from blood: evidence of a group of *Helicobacter* spp. pathogenic in AIDS patients. *J Clin Microbiol* 37: 2729-2733, 1999.

Zhang, L., Day, A., McKenzie, G., and Mitchell, H. Nongastric *Helicobacter* species detected in the intestinal tract of children. *J Clin Microbiol* 44: 2276-2279, 2006.