

# 学位論文

## Doctoral Thesis

新興感染症菌ヘリコバクター・シネディの高感度検出法の開発と  
感染疫学研究への展開  
(Development and epidemiological application of  
a novel detection method for  
*Helicobacter cinaedi* infection)

小山 耕太

Kohta Oyama

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻微生物学

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医学専攻微生物学

2013年3月

# 学 位 論 文

## Doctoral Thesis

論文題名 : 新興感染症菌ヘリコバクター・シネディの高感度検出法の開発と  
感染疫学研究への展開

(Development and epidemiological application of a novel  
detection method for *Helicobacter cinaedi* infection)

著者名 : 小 山 耕 太  
Kohta Oyama

指導教員名 : 熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻微生物学  
赤池 孝章 教授

審査委員名 : エイズ学担当教授 岡田 誠治  
消化器外科学担当教授 馬場 秀夫  
公衆衛生・医療科学担当教授 加藤 貴彦  
感染免疫内科学担当准教授 川口 辰哉

2013 年 3 月

## 目次

要旨 .....	1
発表論文リスト .....	3
謝辞 .....	4
略語一覧 .....	5
第1章 研究の背景と目的 .....	6
1.1 新興感染症菌 <i>Helicobacter cinaedi</i> の特徴	
(a) <i>H. cinaedi</i> とは	
(b) <i>H. cinaedi</i> の宿主と病原性	
(c) Cytolethal distending toxin (Cdt) について	
(d) <i>H. cinaedi</i> の検出・培養同定について	
(e) <i>H. cinaedi</i> の遺伝子情報	
(f) <i>H. cinaedi</i> の薬剤感受性	
1.2 本研究の目的	
第2章 材料および方法 .....	18
2.1 試薬	
2.2 <i>H. cinaedi</i> の培養	
2.3 細胞の培養および培養細胞への <i>H. cinaedi</i> 感染実験	
2.4 <i>H. cinaedi</i> 感染動物モデルの作製および検体採取	
2.5 <i>H. cinaedi</i> 感染症の診断と臨床検体の採取	
2.6 健常者ボランティアの便検体の採取	
2.7 倫理の遵守	
2.8 <i>Helicobacter cinaedi</i> の DNA 抽出	
2.9 Nested PCR	
2.10 系統樹解析	

第3章	結果 .....	25
3.1	Nested PCR 法による <i>H. cinaedi</i> の検出感度および特異性の検討	
3.2	<i>H. cinaedi</i> 感染マウスの検体における Nested PCR	
3.3	<i>H. cinaedi</i> 感染患者 3 人の臨床経過およびそれらの nested PCR による診断	
3.4	抗菌薬治療経過における便中 <i>H. cinaedi</i> のクリアランス評価	
3.5	抗菌薬治療経過における血液中 <i>H. cinaedi</i> のクリアランス評価	
3.6	臨床分離株の系統樹解析	
3.7	Nested PCR による <i>H. cinaedi</i> 保菌者のスクリーニング応用	
第4章	考察 .....	44
4.1	Nested PCR 法の構築と臨床応用	
4.2	<i>H. cinaedi</i> 検出における nested PCR と培養技術の比較	
4.3	<i>H. cinaedi</i> 感染発症の背景	
4.4	<i>H. cinaedi</i> 分離株の分子疫学と感染経路	
4.5	ヒト以外の <i>H. cinaedi</i> の自然宿主	
4.6	<i>H. cinaedi</i> 感染の治療と予後	
4.7	<i>H. cinaedi</i> 感染と心房性不整脈およびアテローム性動脈硬化症との関連	
第5章	結語 .....	49
第6章	参考文献 .....	50

## 要旨

[ 目的 ] *Helicobacter cinaedi* (*H. cinaedi*) はヒトや動物の腸管・肝臓から検出される Enterohepatic *Helicobacter* species に属し、1984年に初めてヒトへの感染が確認された新興感染症菌である。2004年、市中病院にて、免疫異常のない術後患者に敗血症を伴う蜂窩織炎が多数発生し、我々は、当該患者の血液培養より分離されたグラム陰性らせん状桿菌に対して遺伝子学的解析を行い *H. cinaedi* と同定した。*H. cinaedi* は、通常の微好気培養での増殖効率が悪く、通常の細菌培養検査にて見落とされてきた可能性が高く、我々は、本菌感染症の血清診断法 (ELISA) を開発し、感染患者の診断、治療効果判定、あるいは病院職員のスクリーニングへの応用を試みた。しかし本法では、本菌感染の既往は診断可能であるが、今現在菌を保有しているか否かの判定が困難であり、*H. cinaedi* 感染の早期診断や治療効果判定のためには、菌体由来成分 (蛋白質あるいは DNA) を直接検出するシステムの確立が必要と考えられた。そこで今回我々は、PCR 法による菌体 DNA の検出系を開発し、臨床検体、および感染マウス検体を用いてその有用性について解析を行った。

[ 方法 ] *H. cinaedi* の PCR 法による検出では、本菌の病原因子の一つとして知られる cytolethal distending toxin subunit B (*cdtB*) 遺伝子 (GenBank: ABQT01000017.1, AF243080.1) にプライマーを設定し、2組のプライマーペアを用いる nested PCR 法を採用した。検出の特異性は、*Helicobacter* 属および *Campylobacter* 属の菌の DNA を用いた。検出感度は、各種菌量の本菌を感染させた培養マクロファージと、本菌を腹腔内投与した感染モデルマウス (血液、尿、便) を用いて評価した。また、本菌感染による蜂窩織炎を発症した患者から発症経過に沿って採取された各種検体試料 (血液、尿、便) について、本 PCR 法にて解析を行った。さらに、健常者 274 名の便を用いて、本法による保菌者のスクリーニングと便培養による本菌の検出を行った。

[ 結果と考察 ] RAW 264.7 細胞を用いた検出感度は、 $10^2$  cfu/ $10^5$  cells であった。次に、ddy マウス (6 週齢♂) に  $1 \times 10^8$  cfu の本菌を腹腔内投与し、経時的に血液および尿を採取し、抽出した DNA を用いて nested PCR を行ったところ、血

液では1時間後から6時間後まで、尿では24時間後まで、便では3サンプル中2サンプルにおいてPCR産物を検出し得た。また、informed consentの得られた*H. cinaedi*感染(血液培養陽性例)患者4名および疑い症例1名においても、それぞれ血液、尿、便からPCR産物を検出し得た。さらに2例においては便より、1例においては血液から抽出したDNAを用いたnested PCRにて陽性所見を認め、抗菌薬治療により陰性化するに至った。

また、健常者274名に対して、便より抽出したDNAを用いたnested PCRを行ったところ、9名においてPCR産物を検出し得た。これらの検出された*H. cinaedi*菌株のDNAの遺伝子配列を*cdtB*遺伝子において解析した結果、感染患者、健常者において遺伝子配列に統一性はなく、複数の遺伝子株が存在することが分かった。更に、9名の便培養を行ったところ、5名の検体から*H. cinaedi*の発育を認めた。この結果より、*H. cinaedi*健常者の腸管に定着している可能性が強く示唆され、発症要因は*H. cinaedi*既往感染者やキャリアー健常者が手術を契機に感染症を発症する自家感染である可能性が示唆された。

**【結論】**今回我々が開発した*H. cinaedi*の特異的で高感度な検出法を用いて、健常者の中にも本菌のキャリアーが存在することが示された。本法は、迅速かつ特異的な検出法として、本菌感染の早期診断や治療効果判定および疫学調査において有用なツールとなることが期待される。

## 発表論文リスト

[1]. Kohta Oyama, Shahzada Khan, Tatsuya Okamoto, Shigemoto Fujii, Katsuhiko Ono, Tetsuro Matsunaga, Jun Yoshitake, Tomohiro Sawa, Junko Tomita, Yoshiaki Kawamura, and Takaaki Akaike

Identification of and Screening for Human *Helicobacter cinaedi* Infections and Carriers via Nested PCR. *J Clin Microbiol* 50:3893-3900, 2012.

[2]. Shahzada Khan, Tatsuya Okamoto, Koji Enomoto, Naomi Sakashita, Kohta Oyama, Shigemoto Fujii, Tomohiro Sawa, Motohiro Takeya, Hisao Ogawa, Hiroshige Yamabe, and Takaaki Akaike. Potential association of *Helicobacter cinaedi* with atrial arrhythmia and atherosclerosis. *Microbiol Immunol* 56:145-154, 2012.

[3]. Tatsuya Okamoto, Shahzada Khan, Kohta Oyama, Shigemoto Fujii, Tomohiro Sawa, and Takaaki Akaike. A new paradigm for antimicrobial host defense mediated by a nitrated cyclic nucleotide. *J Clin Biochem Nutr*. 46: 14-19, 2010.

## 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生命科学研究部微生物学分野 赤池孝章教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究における、主に細菌の遺伝子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。

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 東修一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。

本研究においてご指導いただきました熊本大学大学院生命科学研究部微生物学分野 澤智裕准教授、岡本竜哉前助教、藤井重元助教、シャザダ・カーン博士研究員、松永哲郎博士研究員、小野勝彦博士研究員に深い感謝の意を表します。



## 略語一覽

AIDS:	acquired immunodeficiency syndrome
AhpC:	alkyl hydroperoxidase reductase
bp:	base pair(s)
CDC:	Center for Disease Control
Cdt:	cytolethal distending toxin
cfu:	colony forming unit
CLOs:	<i>Campylobacter</i> -like organisms
CRP:	C-reactive protein
DDBJ:	DNA data bank of Japan
DMEM:	Dulbecco's modified Eagle medium
dNTPs:	deoxyribonucleotide triphosphates
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay
HIV:	human immunodeficiency virus
h p.i.:	hour(s) post- infection
IgG:	Immunoglobulin G
MIC:	minimum inhibitory concentration
PBS:	phosphate-buffer saline
PCR:	polymerase chain reaction
PFGE:	pulsed-field gel electrophoresis
p. o.:	post-operation
QRDR:	quinolone resistance determining region
rRNA:	ribosomal RNA
VBNC:	Variable but non-culturable
WBC:	white blood cell

## 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) *H. cinaedi* とは

*H. cinaedi* 検出についての報告は 1980 年代に、同性愛者（ホモセクシャル）男性の直腸から検出され、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）事に始まる。“cinaedi”とはラテン語で「ホモセクシャルの」を意味する形容詞句である。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* と名付けられ、*Campylobacter* 属に編入された（Totten et al. 1984）。その後、1989 年に Goodwin らによる *Campylobacter* 属菌を中心とした大幅な改変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）。日本では、2003 年に初めて分離報告がされている（Murakami et al. 2003）。

なお、2012 年現在、*Helicobacter* 属の所属菌種は 33 種が知られているが、ヒトから分離報告のあるものは 8 菌種のみである。Gastric *Helicobacter* species（胃在位菌種）としては、*Helicobacter pylori* のみヒトからの分離が報告されている。残りの 7 菌種（*H. cinaedi*, *H. bilis*, *H. Canadensis*, *H. canis*, *H. fennelliae*, *H. pullorum*, *H. winghamensis*）は Enterohepatic *Helicobacter* species（腸肝在位菌種）である（表 1）。

何らかの基礎疾患により免疫機能が低下した患者の腸管や肝臓、血液から *H. cinaedi* の分離報告が散見される（Burman et al. 1995; Simons et al. 2004; Matsumoto et al. 2007; Minauchi et al. 2010）が、近年は、明らかな基礎疾患のない患者や、1 つの医療施設内で連続的に検出された事例も報告されている（Kitamura et al. 2007）。

表1 *Helicobacter*属細菌の分類と自然宿主

	菌種	自然宿主
胃在位	<i>H. acinonychis</i>	チーター
	<i>H. aurati</i>	ハムスター
	<i>H. bizzozeroni</i>	イヌ
	<i>H. felis</i>	ネコ, イヌ
	<i>H. mustelae</i>	フェレット
	<i>H. pylori</i>	ヒト, アカゲザル
	<i>H. salomonis</i>	イヌ
腸肝在位	<i>H. bilis</i>	マウス, イヌ, ヒト
	<i>H. canadensis</i>	ヒト
	<i>H. canis</i>	イヌ, ヒト
	<b><i>H. cinaedi</i></b>	ヒト, ハムスター
	<i>H. cholecystus</i>	ハムスター
	<i>H. fennelliae</i>	ヒト
	<i>H. ganmani</i>	マウス
	<i>H. hepaticus</i>	マウス
	<i>H. mesocricetorum</i>	ハムスター
	<i>H. muridarum</i>	マウス, ラット
	<i>H. pamntenis</i>	トリ, ブタ
	<i>H. pullorum</i>	ニワトリ, ヒト
	<i>H. rodentium</i>	マウス
	<i>H. trogontum</i>	ラット
	<i>H. typhlonicus</i>	マウス
<i>H. winghamensis</i>	ヒト	

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

上述のように、腸肝在位菌種の *H. cinaedi* は主にヒトやその他の動物の腸管に生息すると考えられており、1980年代に、消化器症状（腸炎や直腸炎）を呈しているホモセクシャル男性らの直腸から最初にヒトへの感染として報告されて以来、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）。ヒトの血液中からの *H. cinaedi* の分離（菌血症）については、1984年に結核に罹患したホモセクシャル男性のケースレポートが最初である（Pasternak et al. 1984）。しかし、当時は菌種名が確定していなかった為、CLO-1 と記載されていた。また、この例は発熱を主症状としており、消化器症状は認めていなかった為、発熱の原因は結核菌よりはむしろ本菌である可能性が高いと著者らは考察している。1987年には、acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) に罹患した 29 歳のホモセクシャル男性における *H. cinaedi* の菌血症の症例が報告され（Cimolai et al. 1987）、さらに同年に *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）。これ以後、腸炎患者の糞便、あるいは発熱患者の血液からの *H. cinaedi* の検出報告が散発的に行われている（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* の血管侵襲性が高いことが示され、生体内への侵入経路は腸管から血管内に侵入し、菌血症を起こすものと推察される。他の Enterohepatic species (*H. canis*, *H. fennelliae*) においても、このような特徴は報告されているが（Leemann et al. 2006; Hsueh et al. 1999）、*H. cinaedi* が報告数は最多である。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。

発熱や腸管感染以外の症状も菌血症例では認めることが多く、中で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い。重症例では、髄膜炎に罹患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（Lasry et al. 2000）の報告もあり、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

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、米国の Center for Disease Control (CDC) で 1982 年から 1990 年に確認された 23 例をまとめた Kiehlbauch らの報告 (22 例：血液からの分離、1 例：糞便からの分離) (Kiehlbauch et al. 1994) があり、特に蜂窩織炎との関連性に注目している。この報告によると、24 歳から 82 歳の感染患者 (平均 44 歳、83% が男性) のうち、蜂窩織炎は 43% の症例で確認されており、再発率が 56% (5/9 例) と高かった。明らかな immunocompromised host (HIV 陽性患者、糖尿病、悪性新生物、肝硬変、アルコール依存症など) は 67% に認められた。HIV 陽性は 45% の症例でみられ、消化器症状 (腹痛、下痢など) は 43% の症例に認められている。

また、Burman らの報告 (1984 年から 1994 年までの症例報告と自験例 7 例を加えた全 18 例) によると、自験 7 例中、6 例は HIV 感染のあるホモセクシャル男性で 1 例がアルコール依存症の女性であり、うち、蜂窩織炎が 4 例、関節炎が 2 例に認められている (Burman et al. 1995)。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、糖尿病、悪性新生物など) による免疫能力の低下した症例に多いことが分かる。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 (Vandamme et al. 1990; Lasry et al. 2000) もあり、2007 年には 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、それ以降、*H. cinaedi* と心血管疾患との関連が注目視されている (Lewis et al. 2007)。

2012 年、我々はこれらの知見に基づき、*H. cinaedi* 感染と心房性不整脈およびアテローム性動脈硬化症との関連について検討し報告した。心房性不整脈との関連については、心房性不整脈患者において *H. cinaedi* 抗体レベルの優位な上昇を認め、*H. cinaedi* と心房性不整脈の関連を示した。アテローム性動脈硬化症との関連については、動脈硬化症の凍結組織を抗 *H. cinaedi* 抗体で免疫組織染色し、5 例中 4 例に陽性染色像を認め、*H. cinaedi* とアテローム性動脈硬化症との関連を示した。さらに、ここで認められた陽性細胞は、CD68 陽性であることも分かり、マクロ

ファージであることを見出した (Khan et al. 2012)。

*H. cinaedi* のもう 1 つの特徴として、人畜共通感染症と考えられている点が挙げられる。これまでに、ヒト以外でも様々な動物 (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) の 1 つと認識されている (Gebhart et al. 1989)。またヒトの疾患の感染源としてペットを指摘する論文報告 (Orlicek et al. 1993) もあるが、患者とそのペットの両方から *H. cinaedi* が分離できたとする報告は一例もない。一方、ヒトと動物由来の *H. cinaedi* 菌株はやや形質が異なるのではないかとする報告もある (Kiehlbauch et al. 1995)。

本菌の病原因子については、Cdt (cytolethal distending toxin; 細胞致死性膨化毒素) が知られている (Taylor et al. 2003; Rasika et al. 2011)。この毒素は真核細胞において細胞周期の停止とアポトーシスを誘導し宿主細胞に致死的に働く毒素である。本菌の病原因子については長らく本毒素しか知られていなかったが、2012 年になり AhpC (alkyl hydroperoxidase reductase; アルキルヒドロペルオキシド還元酵素) という新たな因子が見出された (Charoenlap et al. 2012)。これは、各種アルキルヒドロペルオキシド類を対応するアルコール類に変える酵素で、 $H_2O_2$  を  $H_2O$  へと分解する作用を持つ。*H. cinaedi* はこの因子を使い、酸化ストレスから菌体を守り、宿主への定着に有利に働くと考えられている。

### (c) Cytolethal distending toxin (Cdt) について

Cdt は、上述のしたように *H. cinaedi* の病原因子として知られる毒素の 1 つで、24~48 時間で細胞を膨化させ、さらに 96~120 時間で細胞を致死させるというユニークな毒素として様々な臨床的に重要なグラム

陰性菌によって生成される毒性物質である。Cdt は CdtA、CdtB、CdtC の 3 つのサブユニットからなるホロ毒素で、それぞれ *cdtA*, *B*, *C* 遺伝子オペロンによりコードされている (図 1A)。毒性発揮の機序は、まず、CdtA と CdtC が標的細胞の受容体と結合し、毒素本体である CdtB を細胞内へ送り込む。細胞内へ送り込まれた CdtB は、最終的に核内に移行し、CdtB の持つ DNase 活性により DNA を傷害し、細胞周期を G2/M 期で停止させる。(図 1B)。

2012 年現在、Cdt を産生する菌としては *Helicobacter* 属、*Campylobacter* 属、*Salmonella* 属、*Sigella* 属、大腸菌等が知られており、興味深いことに、*Helicobacter* 属については、*H. cinaedi* をはじめとする腸管在位菌種の多くに Cdt 産生を認めているが、*H. pylori* をはじめとする胃在位菌種には認められない (表 2) (Rasika et al. 2011)。従い、同じ菌属に属する菌であっても、その毒性には大きな違いがあることが考えられる。

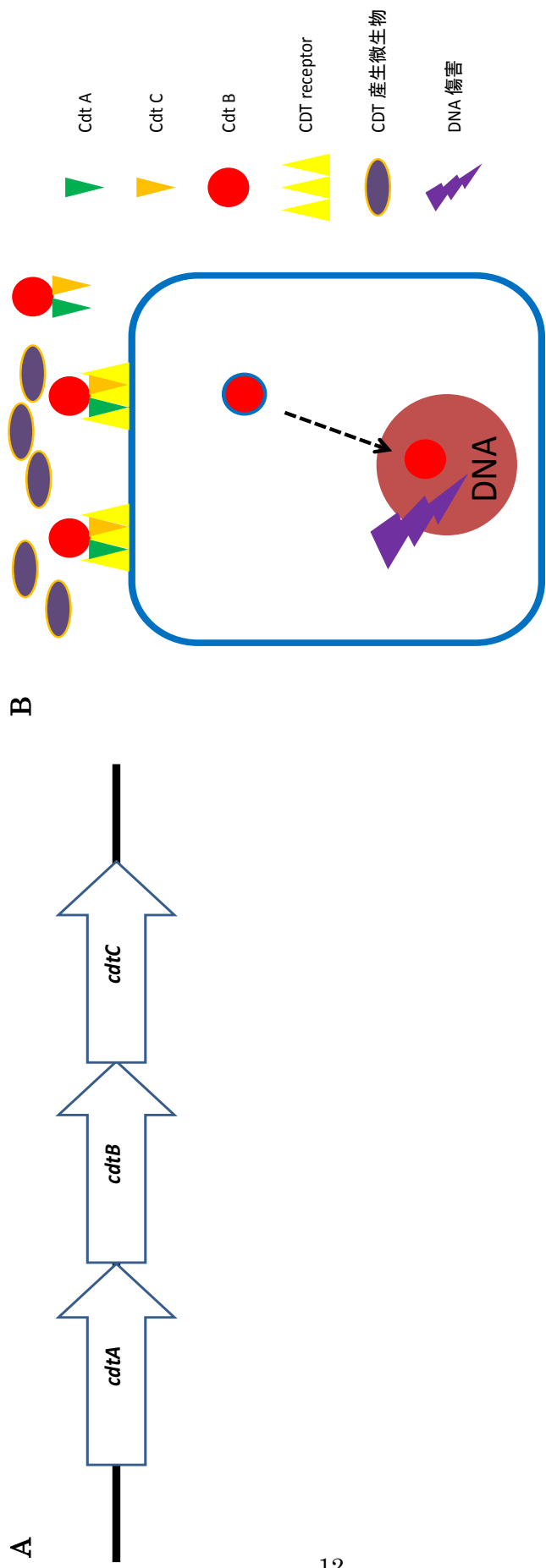


図 1 *cdt* 遺伝子座 (A) と Cdt の細胞毒性メカニズムのスキーム (B)



表 2 各菌種の *cdtB* 遺伝子

Class <i>Gammaproteobacteria</i>			
Family <i>Pasterrellaceae</i>			
<i>Hemophilus</i> species		HducCDT	
<i>Haem. ducreyi</i>		HparCDT	
<i>Haem. parasuis</i>		AactCDT	
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>			
Family <i>Enterobacteriaceae</i>			
<i>E. coli</i>		EcolCdtB-I	
EPEC/ExPEC		EcolCdtB-I	
APEC		EcolCdtB-II	
EPEC		EcolCdtB-III	
EPEC/ExPEC		EcolCdtB-III	
NTEC		EcolCdtB-IV	
EPEC/ExPEC		EcolCdtB-IV	
NTEC		EcolCdtB-IV	
ExPEC		EcolCdtB-IV	
EHEC/STEC		EcolCdtB-V	
<i>Sigella</i> species			
<i>Shig. boydii</i> serotype 13		SboyCDT	
<i>Shig. dysenteriae</i>		SdysCDT	
<i>Salmonella</i> species			
<i>S. enterica</i> serotype Typhi		StypCdtB	
Class <i>Epsilonproteobacteria</i>			
Family <i>Campylobacteriaceae</i>			
<i>Campylobacter</i> species			
<i>C. jejuni</i>			CjejCDT
<i>C. coli</i>			CcolCDT
<i>C. upsaliensis</i>			CupsCDT
<i>C. hyointestinalis</i>			ChyoCDT
<i>C. lari</i>			ClarCDT
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>			CfetCDT
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>			CvenCDT
Family <i>Helicobacteriaceae</i>			
<i>Enterohapatic Helicobacter</i> species			
<i>H. hepaticus</i>			HhepCDT
<i>H. bilis</i>			HbilCDT
<i>H. mastomyrinus</i>			HmasCDT
<i>H. cinaedi</i>			HcinCDT
<i>H. canis</i>			HcanCDT
<i>H. pullorum</i>			HpulCDT
<i>H. winghamensis</i>			HwinCDT

Rasika N. *Microbiology* 157:1851-75. をもとに改変。

#### (d) *H. cinaedi* の検出・培養同定について

*H. cinaedi* や *H. fennelliae* は旧来、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 1 つとなっている。また、分離された菌種の同定も表 3 (Nachamkin et al. 2011) に示すように難しい場合が多く、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。このよう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事に加え、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。

#### (e) *H. cinaedi* の遺伝子情報

本菌の遺伝子情報は、2012 年現在、我々の研究グループによって全染色体 DNA が明らかになっており、2,078,348-bp の染色体と 23,054-bp のプラスミドが報告されている (GenBank accession no. AP012344; AP012344, Goto et al. 2012)。その他、現時点で *Helicobacter* 属細菌の中で全遺伝子情報が公開されている菌種は、*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) の計 4 菌種である。

表3 *Campylobacter* spp.との鑑別性状

菌種	<i>H. cinaedi</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
発育 : 25°C	-	+	-	-	-	-
42°C	-(+)	-(+)	+	+	+	+
ナリジクス酸	R (S)	R	S (R)	S (R)	R	S
セフアロチン	R (I)	S (R)	R	R	R	S
馬尿酸加水分解	-	-	+	-	-	-
インドキシル酢酸加水分解	-	-	+	+	-	+
カタラーゼ	+	+	+	+	+	W
ウレアーゼ	-	-	-	-	V	-
オキシダーゼ	+	+	+	+	+	+
硝酸塩還元	+	+	+	+	+	+
好気培養	-	-	-	-	-	-

+: positive, -: negative, W: weakly positive, R: resistant, I: intermediate, S: susceptible, V: variable  
Nachamkin et al. 2011をもとに改変

#### (f) *H. cinaedi* の薬剤感受性

本菌は遊走性が強く、多くの場合平板培地全体に一面に発育する。そのため阻止円形成法 (Disk 法や E-test など) では、薬剤感受性を測定できない場合が多い。また Microtiter tray 中では液体培養できないと明言した論文などもあり、これまで本菌の薬剤感受性は寒天希釈法が常法として報告されてきた (Orlicek et al. 1993; Flores et al. 1989)。しかし寒天希釈法は、煩雑な培地調整に加え保存性に問題があり、臨床現場で日常的に使うのは現実的ではないため、微量液体希釈法が開発されている。カルバペネム、アミノグリコシド、テトラサイクリン系の薬剤は非常に低い MIC 値を示す一方、クラリスロマイシンでは高 MIC 値を示す。マクロライド系については古くから耐性が知られており、また、ニューキノロンについては日本で分離された菌株は例外なく *gryA* 遺伝子の QRDR (Quinolone Resistance Determining Region) に 1~2 個の point mutation が入っており、全株耐性傾向を示す (Rimbara et al. 2012)。これは、日本国内での抗菌薬治療におけるニューキノロン薬使用の多さを反映しているものと筆者は考える。また、海外の分離株は、これほど高頻度にキノロン耐性株は見つかっていないが、CDC の報告によると、キノロン薬使用により再発を招くので使用すべきではない、との指摘がすでに 1994 年になされている。また本菌感染症の治療期間としては、10 日以内の短期的治療よりも、2~6 週間の長期的治療が好ましいとの記述もある (Kiehlbauch et al. 1994)。

いずれにせよ、治療戦略、MIC 測定値と臨床での治療実績の相関などについては、まだ不明な点が多く、今後のデータの蓄積が待たれる。

## 1.2 本研究の目的

2004 年以降、我々は熊本市の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を多数経験した。これを契機に我々はその疫学的調査および病原性解析を開始した。血液培養にて 11 例にグラム陰性らせん状桿菌 (図 2) 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)。

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く、前述したように培養検出の難しい菌の 1 つであり、適切な培養・同定技術の開発が望まれている。臨床現場で汎用されている既存の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 (Kiehlbauch et al. 1994; Vandamme et al. 2000)。実際、我々は上記のような症例と同様の症状・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。そこで、過去に我々は、臨床分離株を用いて本菌のゲノムライブラリを作成し、患者血清が極めて強く反応する 30 kDa の菌体蛋白質を主要抗原と特定し、さらにその遺伝子のクローニングならびに組換え蛋白質 (HcMAP30) を作成し、これを抗原とした感度・特異性ともに優れた ELISA 測定系を構築することに成功した (Iwashita et al. 2008)。そして、感染患者の診断、治療効果判定、あるいは病院職員のスクリーニングへの応用を試みた。しかし本法では、本菌感染の既往は診断可能であるが、今現在菌を保有しているか否かの判定が困難であり、*H. cinaedi* 感染の早期診断や治療効果判定のためには、菌体由来成分 (蛋白質あるいは DNA) を直接検出するシステムの確立が必要と考えられた。

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 PCR 法による菌体 DNA の検出系を開発し、臨床検体、および感染マウス検体を用いてその有用性について解析を行った。

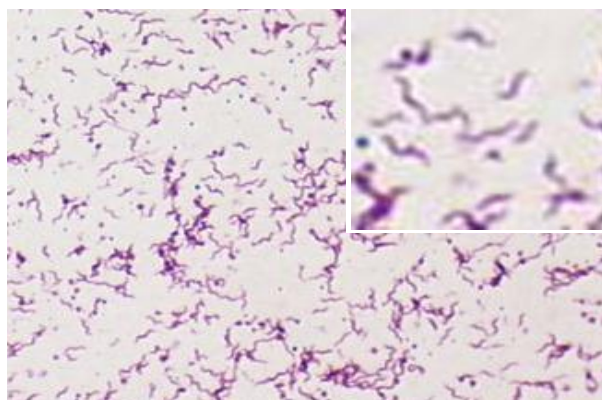


図 2 *H. cinaedi* のグラム染色所見

## 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 *H. cinaedi* の培養

マウスの *H. cinaedi* の感染実験では臨床分離株である *H. cinaedi* (strain PAGU 0616) (Goto et al. 2012; Iwashita et al. 2008; Khan et al. 2012; Kiehlbauch et al. 1994) を使用した。また、nested PCR 解析による *H. cinaedi* の検出においては、この菌株を positive control として使用した。また、各種臨床検体からの本菌検出法の開発および条件最適化においてもこの菌株を用いた。

*H. cinaedi* の培養は、37°C、微好気（10% 水素、10% 二酸化炭素、80% 窒素）環境下でヘリコバクター寒天培地（日水製薬）で 2~3 日間培養した。ヘリコバクター寒天培地はヘリコバクター選択分離培地であり、組成にはバンコマイシン（5.0 mg/l）、乳酸トリメトプリム（2.5 mg/l）、セフスロジン（2.5 mg/l）、アムホテリジン B（2.5 mg/l）を含む。培養した菌は 10 mM リン酸緩衝生理食塩水（PBS）に懸濁して回収した。実験に使用する場合の菌量は細菌懸濁液の 620nm の吸光度をもとに OD 1.0 のときを  $1.2 \times 10^9$  cfu と換算して調整を行った。

### 2.3 細胞の培養および培養細胞への *H. cinaedi* 感染実験

マウス由来のマクロファージ細胞（RAW 264.7）は 37°C、5% 二酸化炭素の環境下で 10% ウシ胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM、和光純薬) にて培養を行った。細胞は 12 ウェルプレートにそれぞれ  $2 \times 10^5$  cells/ウェルずつ播種し、12 時間後に様々な用量の菌を 1 時間感染させた。感染後は、細胞と培地を同時に懸濁液の状態に回収した。その後、懸濁液を  $5000 \times g$  で 5 分間遠心分離しペレットを下記 2.8 項の DNA 抽出用試料として使用した。

## 2.4 *H. cinaedi* 感染動物モデルの作製および検体採取

血液と尿の検体採取：6週齢雄の ddY マウスを使用し、 $10^8$  cfu/mouse の *H. cinaedi* を 200  $\mu$ l の PBS に懸濁し腹腔内に接種して感染させた。感染後 1、6、24 時間後に血液と尿を採取した。採取はマウスをジエチルエーテルで麻酔した後開腹し、混入菌のリスクを軽減するため、心臓（300～1000 $\mu$ l）と膀胱（30～80 $\mu$ l）からそれぞれ直接穿刺吸引にて回収した。

糞便の検体採取：*H. cinaedi* の自然感染モデルを作成するため、同種のマウスに  $10^9$  cfu /mouse の本菌を 200  $\mu$ l の PBS に懸濁し経口で接種して感染させ、感染前と感染 24 時間後にそれぞれ糞便を回収した。

全ての動物実験は、熊本大学動物実験委員会の定める指針に沿って行った。

## 2.5 *H. cinaedi* 感染症の診断と臨床検体の採取

熊本市内の整形外科病院で整形外科的手術を受けた 4 名の患者が術後に発熱や蜂窩織炎を発症し、*H. cinaedi* 感染症として診断を受けた。これらの患者から採取された血液に対し、前述の通常の血液培養を行った (Kitamura et al. 2007)。血液培養には、10 ml ずつ分注された血液を BD BACTEC Plus Aerobic/F system (Becton Dickinson and Company 社) を使用した。そして、培養で陽性であった血液は、さらに前述 (2.2 項) の条件下でヘリコバクター寒天培地にて培養した。細菌の増殖はコロニーの形態 (図 3)、ウレアーゼテスト、運動性およびグラム染色で評価した。菌種同定は後述 (2.10 項) の 16S rRNA 遺伝子配列を用いた PCR で行った (Kitamura et al. 2007)。感染患者から得られた便、尿、血液検体については後述の nested PCR を行った。検体はそれぞれ蜂窩織炎や発熱の発症日に採取し、血液は無菌的に採取した。

術後に発熱や蜂窩織炎を発症するといった *H. cinaedi* 感染が疑われる患者から採取した便については、PBS に懸濁した後、前述 (2.2 項) の条件下でヘリコバクター寒天培地に接種し培養した。発育した菌については、PBS で懸濁・鈎菌し、DNA 抽出および後述 (2.9 項) の nested PCR を行った。



図3 *H. cinaedi*のコロニー

*H. cinaedi*のコロニー（微好気培養4日目）。薄く幕を張ったようなフィルム状のコロニー（thin spread colony）を形成する。

## 2.6 健常者ボランティアの便検体の採取

2012年4月にランダムに選択した274名の熊本市内の整形外科病院に勤務する健常職員（男性79名、女性195名；年齢20~78歳、平均年齢37.4歳）から便検体を採取した。便は採取直後から熊本大学大学院微生物学研究室到着まで氷温保存し、DNA抽出までの間は-80℃で保存した。

## 2.7 倫理の遵守

全てのヒトからのサンプル採取には、当該病院内の倫理委員会の承認を得た上で、さらに書面での同意を得られた個人からのみ行った。



## 2.8 *Helicobacter cinaedi* の DNA 抽出

臨床検体、感染 RAW 264.7 細胞、感染マウスから採取された検体、尿、および菌体懸濁液からの DNA 抽出は、市販の DNA 抽出キットを使用した。DNA 抽出は DNeasy Blood and Tissue Mini Kit (Qiagen 社) は細胞、血液および細菌懸濁液の DNA 抽出に、QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen 社) は尿および便検体の DNA 抽出に使用し、製造元のプロトコールに沿って行った。細菌懸濁液から抽出された DNA は、後述(2.9 項)の nested PCR の positive control として使用した。

## 2.9 Nested PCR

PCR 反応では、サーマルサイクラーとして Astec Program Temp Control System (Astec 社) を使用した。PCR 用耐熱酵素は KOD plus (TOYOBO) を使用した。

Nested PCR とは、一組のプライマー対で増幅される標的配列の内側に第 2 のプライマーを設定し、最初の PCR で増幅した産物を希釈して新たな鋳型とした第 2 の PCR のことである。この手法の最大の利点は、2 回、PCR を行うことにより標的遺伝子の検出感度を高めることにある。

1 回目の PCR は、便もしくは尿の DNA は 5.0  $\mu$ l (25-100 ng)、血液の DNA は 2.0  $\mu$ l (200-300 ng)、*H. cinaedi* 菌体の DNA は 2.0  $\mu$ l (約 0.5 ng) をテンプレートとして使用し、以下に示す反応系で行った。

Template DNA	上記用量
10×Buffer for KOD Plus (Toyobo)	2.5µl
2mM dNTPs	2.5µl
25mM MgSO <sub>4</sub>	1.1µl
Primer F (16S F HC 20 µM)	0.31µl
Primer R (16S R HC 20 µM)	0.31µl
KOD plus (1U /µl)	0.5µl
Milli Q water	17.78 - Template DNA 量 µl
Total	25µl

プライマーは *H. cinaedi* 特異的な *cdtB* 遺伝子 (GenBank: ABQT01000017.1, AF243080.1) をもとに設計した。以下に 1<sup>st</sup> PCR プライマーの配列を示す。

5'-GGAGCTGTGAGTGTGCTG-3' (forward primer)

5'-AAATGACCGACACGAGCTG-3' (reverse primer)

PCR 反応サイクルは以下のように行った。

Pre-denature	95°C	3 min	
Denature	98°C	10 sec	} 35cycles
Annealing	58°C	30 sec	
Extension	68°C	35 sec	
	68°C	7 min	
	4°C	保存	

1 回目の PCR では 659 塩基の PCR 産物が増幅され、次の nested PCR のテンプレートとして使用した。

2 回目の PCR (nested PCR) では 1 回目の PCR の増幅産物の 1.0 µl をテンプレートとし、上記と同じ反応系で行った。その際のプライマー配列は、以下の配列のものを使用した。

5'- GGATTTAGGCTCTCGCTCTCGTCCGGATAT -3' (forward primer)

5'- ATCGCCGTCCTTACTCGCGTCTCCAAATTA -3' (reverse primer)

最終的に、359塩基のPCR産物が増幅された。最後に、nested PCRのPCR産物は1%アガロースゲル上で電気泳動し、臭化エチジウムで染色の後、紫外線照射下で観察した。より正確に評価するため、PCRには2種類のnegative controlsを使用した。1つはPCR反応に対して、サンプルを含まないPCR溶液のみを、もう1つはDNA抽出液に対して、Milli-Q waterをテンプレートにし、negative controlsとした。Positive controlには、*H. cinaedi*のDNA 2 µlを使用した。すべての作業過程において、クロスコンタミネーションのリスクを最小限にするため、フィルター付きのチップを使用した。

Nested PCRの感度の評価には10人の*H. cinaedi*感染患者から分離された臨床分離株、尿で様々な濃度に希釈された*H. cinaedi*のDNA、そして様々な量の*H. cinaedi*を感染させたRAW 264.7細胞を使用した。

Nested PCRで陽性となったヒトの検体は、偽陽性を除外するため、再度DNA抽出から解析をし直し、再現性を得た。

PCR産物のDNAシーケンシングについては、まずnested PCRのPCR産物をゲル用DNA抽出キット（Qiagen社）を使用し1%アガロースゲルから精製し、dye terminator reaction kit（Applied Biosystems社）を使用し、自動シーケンサー（ABI PRISM 310, Applied Biosystems社）で行った。予備実験では、*H. cinaedi*感染患者から採取した臨床検体（血液、便）からは、1回目のPCRで*cdtB*遺伝子を検出することはできなかったため、臨床検体からの*H. cinaedi* DNA検出にはnested PCRを行った。

## 2.10 系統樹解析

過去に報告された方法を用いて（Kitamura et al. 2007）、*H. cinaedi*臨床分離株に対して16S rRNA遺伝子配列を使用して系統樹解析を行った。具体的には、16S rRNA遺伝子を用いてPCRで得られた増幅産物を使用し（Kawamura et al. 1995; Mikkonen et al. 2004）、遺伝子配列はdye terminator reaction kitおよび自動シーケンサー（model 3100; Applied Biosystems社）を使用して解析した。各菌株において、約1430塩基の16S rRNA遺伝子を同定した。類似類縁菌種の検出には、日本のDNAデータベース（DDBJ）ウェブサイト

（<http://www.ddbj.nig.ac.jp>）にあるFASTA検索システムを使用して解析した。*Helicobacter*属に近い16S rRNA遺伝子の検索にはDDBJ、GenBank、

European Molecular Biology Laboratory databases を使用して解析した。系統学的解析には、CLUSTAL-X software (Thompson et al. 1994) を使用して解析し、Tree View software を使用して系統樹を作成した。(Page et al. 1996; Pearson et al. 1988)

また、感染患者および健常者の便から抽出された DNA における系統樹解析は、nested PCR 増幅産物を使用し、*cdtB* 遺伝子にて系統樹解析を行った。遺伝子配列は dye terminator reaction kit および自動シーケンサー (ABI PRISM 310; Applied Biosystems 社) を使用して解析し、系統学的解析には、CLUSTAL-W software を使用して解析した。

### 第3章 結果

#### 3.1 Nested PCR 法による *H. cinaedi* の検出感度および特異性の検討

*H. cinaedi* を特異的かつ高感度で検出する方法の開発を目指し、今回 nested PCR 法を用いた *H. cinaedi* 検出法を構築した。

この nested PCR では *H. cinaedi* の *cdt B* 遺伝子を標的として PCR プライマーを設計し、まず 1 回目の PCR で 659 塩基の *cdtB* 遺伝子配列を増幅し、ここで得られた PCR 産物を更に 2 回目の PCR のテンプレートとし、最終的に 359 塩基の PCR 産物として *H. cinaedi* を検出した。下にこれらのプライマーの *cdtB* 遺伝子内での具体的な配置を示す (図 4)。

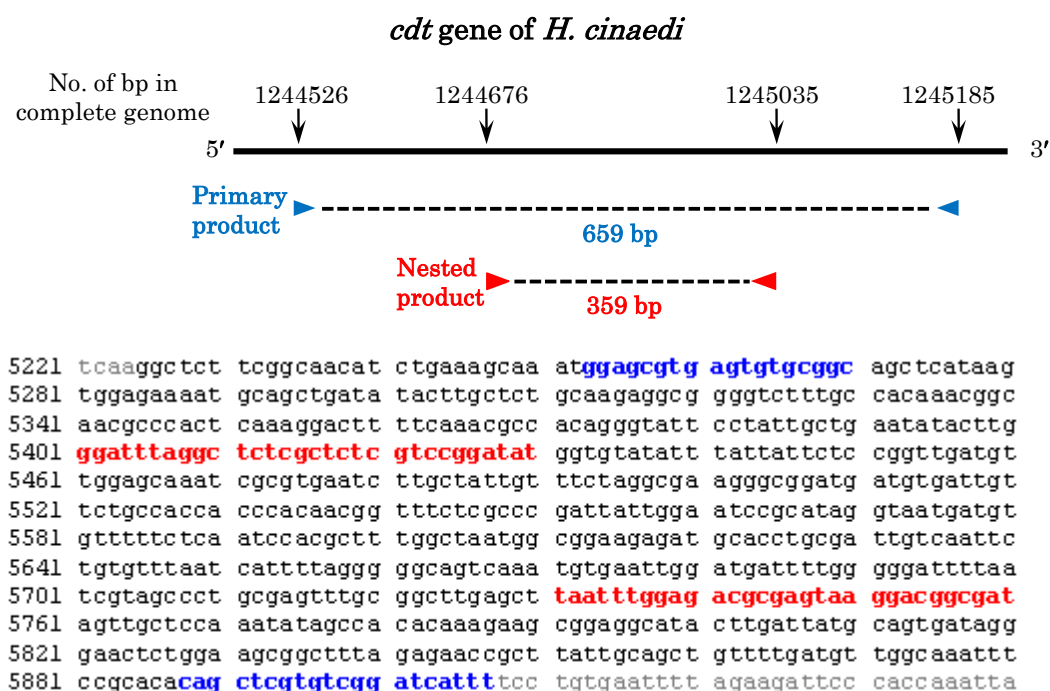


図 4 プライマー設定

*H. cinaedi* 標準株 (PAGU611) から精製した DNA を用いた実験により、これらのプライマーペアを用いた nested PCR により予想される 359 bp のバンドが得られた (図 5, Lane 2)。

また、この PCR 産物を電気泳動した後、ゲルから DNA を精製し塩基配列を解析したところ、*H. cinaedi cdt B* 遺伝子の配列と一致した。

これらのことから、本 nested PCR 法により、*H. cinaedi* を検出できることが示された。

Nested PCR により全ての当教室で保存していた *H. cinaedi* 臨床分離株 (10 株) から単一の 359 塩基の PCR 産物が得られた (図 5. Lane 5~14)。

*H. cinaedi* の近縁の菌として *Helicobacter pylori* (ATCC 43504)、*Helicobacter hepaticus* (PAGU604) から抽出した DNA を用いて本 nested PCR 法による解析を行ったところ、PCR 産物は検出されなかった (図 5. Lane 15, 16)。このことから本 PCR 法はこれらの菌と反応しないことが確認された。

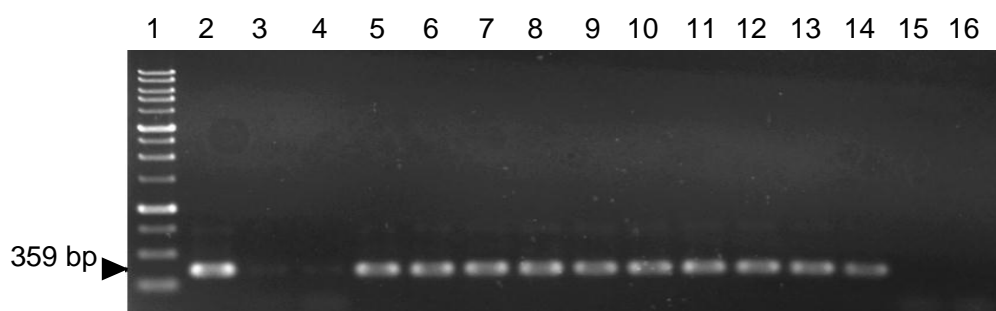


図 5 Nested PCR の特異性の評価 (1)

Lane 1 : マーカー、lane 2 : *H. cinaedi* 臨床分離標準株、lane 3 : PCR 溶液のみ (Template 無し)、lane 4 : Milli-Q water、lanes 5~14 : *H. cinaedi* 感染患者 10 名からの臨床分離株、lane 15 : *H. pylori* PAGU 151 (=ATCC 43504)、lane 16 : *H. hepaticus* PAGU 604 (=LMG 16316)

他のヘリコバクター属細菌 (*H. fennelliae*, *H. pamntenis*, *H. acinonychis*, *H. muridarum*, *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. pylori*, *H. canadensis*, *H. canis*) および *Campylobacter fetus* についても、さらに本 PCR 法の特異性を調べるために臨床分離株から抽出した DNA を用いて解析を行ったところ、1 回目の PCR で増幅産物は検出されず (図 6)、2 回目の PCR (nested PCR) を行った場合でも増幅産物は検出されなかった。



図 6 Nested PCR の特異性の評価 (2)

各種 *Helicobacter*、*Campylobacter* から抽出した DNA を鋳型として 1 回目の PCR をかけたものを泳動した。*H. cinaedi* では 659 bp の産物が検出されたが、その他の菌では PCR による増幅は認められなかった。

Lane 1 : 100-bp DNA マーカー、lane 2, *H. cinaedi* PAGU 597T (=CCUG18818T)、lane 3 : *H. fennelliae* PAGU 601T (=LMG 18294T)、lane 4 : *H. pamntenis* PAGU 607T (=LMG 12678T)、lane 5 : *H. acinonychis* PAGU 609T (=LMG 12684T)、lane 6 : *H. muridarum* PAGU 606T (=LMG 13646T)、lane 7 : *H. hepaticus* PAGU 604T (=LMG 16316T)、lane 8 : *H. bilis* PAGU 599T (=LMG 18386T)、lane 9 : *H. pylori* PAGU 151T (=ATCC 43504T)、lane 10 : *H. canadensis* PAGU 600T (=CCUG 47163T)、lane 11 : *H. canis* PAGU 598T (=NCTC 12379T)、lanes 12-14 : clinical isolates of *H. cinaedi*、lane 15 : *C. fetus* subsp. *fetus* PAGU 74T (=ATCC 27374T)。

Nested PCR の感度の評価には尿で様々な濃度に希釈された *H. cinaedi* の DNA、並びに様々な量の *H. cinaedi* を感染させた RAW 264.7 細胞を使用した。結果、検出限界はそれぞれ 10 cfu /10<sup>5</sup> RAW 264.7 cells、10 cfu /100 µl of urine であり (図 7)、本 PCR 法により高い感度で *H. cinaedi* の検出が可能であることが示された。

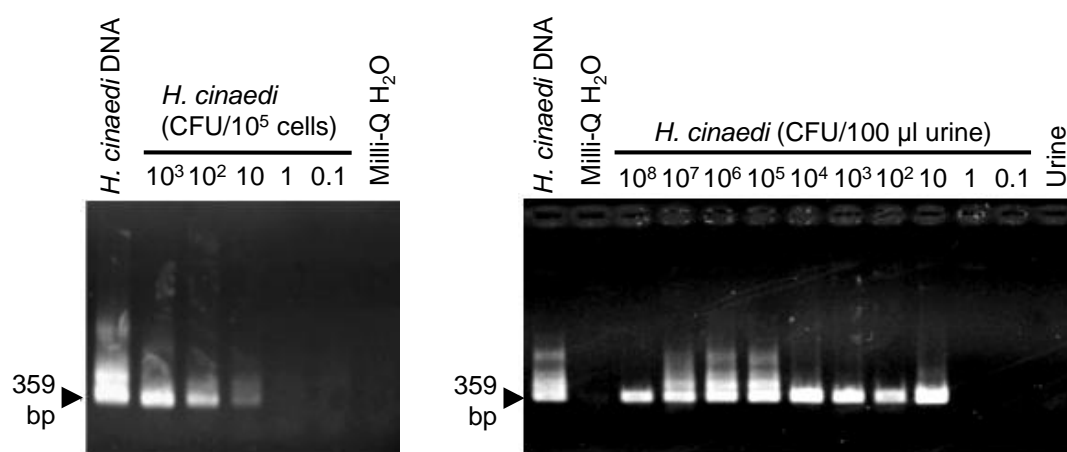


図 7 Nested PCR の感度の評価

様々な量の *H. cinaedi* を感染させた RAW 264.7 細胞の系 (左図) での検出限界は 10 cfu /10<sup>5</sup> RAW 264.7 cells、尿で様々な濃度に希釈された *H. cinaedi* の DNA の系 (右図) での検出限界は 10 cfu /100 µl of urine であった。

### 3.2 *H. cinaedi* 感染マウスの検体における Nested PCR

生体試料中の *H. cinaedi* が nested PCR により検出できるかを調べるために、まず、マウスの感染モデルを用いて検討した。

*H. cinaedi* を 10<sup>8</sup> cfu/mouse 腹腔内接種したマウスから血液および尿をそれぞれ接種後 1 時間、6 時間、24 時間の時点で採取した。これらの試料から全 DNA を抽出し、nested PCR を行った。血液においては、1 時間後、6 時間後にそれぞれ 3 匹中 1 匹に陽性反応を認め、24 時間後には検出されなかった (図 8A)。尿においては、比較的、すべての採取時間においても陽性反応 (7 匹中 6 匹) を認めた (図 8B)。

また、*H. cinaedi* を 10<sup>9</sup> cfu /mouse 経口投与したマウスからは、投与前と投



与7日後に便を採取し、nested PCRを行った。投与前には検出されなかったが、投与7日後には3匹中2匹に陽性反応を認めた（図8C）。

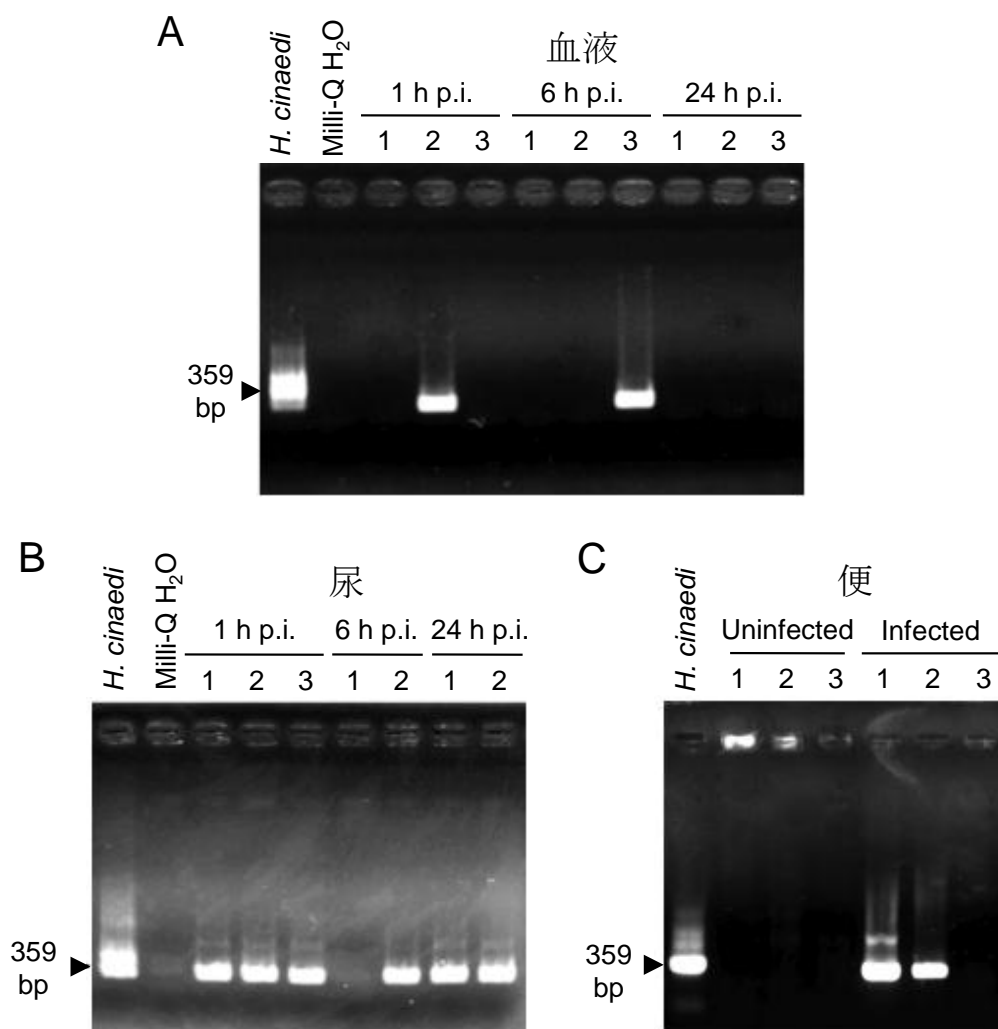


図8 マウスの検体における Nested PCR の感度の評価

### 3.3 *H. cinaedi* 感染患者 3 人の臨床経過およびそれらの nested PCR による診断

Nested PCR 法が診断に応用できるか、*H. cinaedi* 感染後の様々な時点で臨床検体を採取し、nested PCR を行った。表 4 にそれぞれの患者の臨床背景を示す。

Patient 1 は再発する菌血症を呈した。初感染（発熱、蜂窩織炎）時にピペラシリン（2 g/day）とミノサイクリン（200 mg/day）による点滴治療を 7 日間受け、その後 11 日間のミノサイクリン内服で治癒に至った。しかし、4 か月後に化膿性脊椎炎（L4/5）で再入院し、血液培養で *H. cinaedi* が陽性となった（図 9A・B）。また、この患者から化膿性脊椎炎入院中に採取した便より nested PCR にて陽性反応を認め、さらに、便培養の結果、*H. cinaedi* に特徴的なコロニー形成を認め（図 9C）、血液培養菌株も同様に nested PCR で陽性反応を示した（図 9B）。

Patient 2 は右変形性膝関節症に対して人工関節置換術を受け、手術 24 日後に発熱を伴う右下腿の蜂窩織炎を発症した。血液培養で菌の発育を認め、nested PCR を血液と尿に対して行い、血液は陰性であったが、尿については発症前は陰性であったが、発症当日およびその 3 日後に陽性反応を認めた（図 9D）。また、発症 5 日後の尿は陰転化した。

Patient 3 は腰部椎間板ヘルニアに対し手術を施行され、術後 10 日目に白血球増加を伴う発熱を認めた。その際に施行した血液培養は陰性であったが、発熱発症 4 日後の血液、2 日および 7 日後の尿では nested PCR 陽性を認めた（図 9E）。以上の結果より、培養法と比較して本 nested PCR 法の有用性が示された。

表 4 患者背景一覧

	Patient 1	Patient 1 (recurrent)	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 4 (recurrent)	Patient 5
年齢	73	-	80	66	81	-	92
性別	男性	-	女性	男性	女性	-	男性
整形外科疾患名	左肩腱板断裂	-	右変形性膝関節症	腰部椎間板ヘルニア	左橈骨尺骨骨折	-	左大腿骨転子部骨折
手術日	2010年11月2日	-	2010年11月30日	2010年11月26日	2011年8月16日	-	2012年5月3日
発熱/蜂窩織炎発症日	2010年11月24日	2011年4月19日	2010年12月24日	2010年12月6日	2011年8月22日	2011年10月20日	2012年9月16日
蜂窩織炎発症部位	左肩	腰部椎間板	右下腿	所見なし	所見なし	両側下腿	左大腿・踵部
白血球(ce/l/mm <sup>3</sup> )	12180	8400	8000	10970	12500	8080	7600
CRP(mg/dL)	10.4	0.3	2.8	9.8	5.1	3.1	6.4
便培養	+	+	未施行	未施行	未施行	未施行	未施行
血液培養	+	+	+	-	+	+	+
抗菌薬治療	ピペラシリン ミノマイシン	アンピシリン スルバクタム ミノマイシン レボフロキサシン	ドリペネム ミノマイシン	ドリペネム ミノマイシン	ドリペネム	ミノマイシン	ピペラシリン タゾバクタム

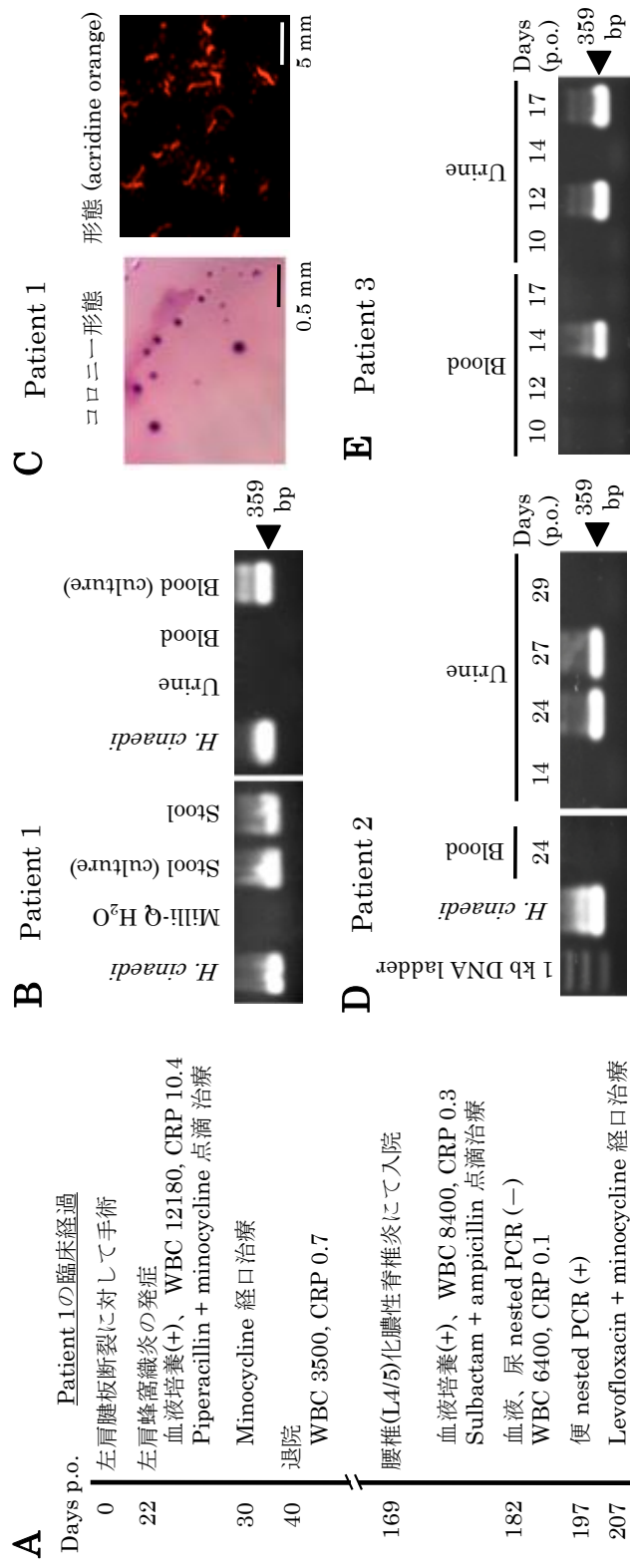


図 9

A: Patient 1 の臨床経過。

B: Patient 1 の便、尿、血液の PCR 所見。血液培養および便培養で陽性であった。

C: 便培養でのコロニー形態。

D: Patient 2 の血液、尿の PCR 所見。血液は陰性であったが、尿については発症前は陰性であったが、発症当日およびその 3 日後に陽性反応を認めた。

E: Patient 3 の血液、尿の PCR 所見。血液培養は陰性であったが、発症 4 日後の血液、2 日および 7 日後の尿では nested PCR 陽性を認めた。

### 3.4 抗菌薬治療経過における便中 *H. cinaedi* のクリアランス評価

次に nested PCR 法が *H. cinaedi* のクリアランス評価に応用できるか、我々は抗菌薬治療を受けた *H. cinaedi* 患者 (Patient 4) の便を採取し、nested PCR を行った。それに際し、便 DNA 抽出液中の PCR 阻害物質の混在の可能性を考慮し、2 回目の PCR のテンプレートとなる 1 回目の PCR 産物の量を 0.1 から 5.0  $\mu\text{l}$  まで濃度を変えて行った。結果、1.0  $\mu\text{l}$  のテンプレート量が最も検出効率が良いことが分かった (図 10A)。この患者は整形外科的手術の術後 6 日で発熱を呈していた。術後 7 日に *H. cinaedi* 感染が判明し、アンピシリン/スルバクタムの点滴を 3 日受けた後、ドリペネムの点滴を 15 日間受けて治癒退院した。さらに、術後 65 日目に下腿に蜂窩織炎を発症し、ミノサイクリンの内服治療を受けた。この患者の継時的にランダムに採取した便からは *H. cinaedi* が術後 72 日まで nested PCR で検出し得た (図 10A)。また、術後 85 日目には陰転化を確認した。

また、Patient 1 においては、抗菌薬治療後のフォローアップ目的で便の nested PCR を行った。上述したように、Patient 1 は再発時の *H. cinaedi* 感染症に対しアンピシリン/スルバクタムの点滴を 30 日、内服を 8 日間受け、その後ミノサイクリン並びにレボフロキサシンの内服を 30 日間受けた。便は抗菌薬治療開始後 28、38、72 日後に採取し、nested PCR を行った。また、ヘリコバクター寒天培地にて便培養も行った。治療開始 28 日、38 日後に採取した便では nested PCR で陽性反応を認めたが、72 日後の便からは検出されなかった (図 10B)。また、便培養でも菌の発育は認められなかった。

その後、これらの患者は少なくとも 1 か月の間、再発することなく経過している。

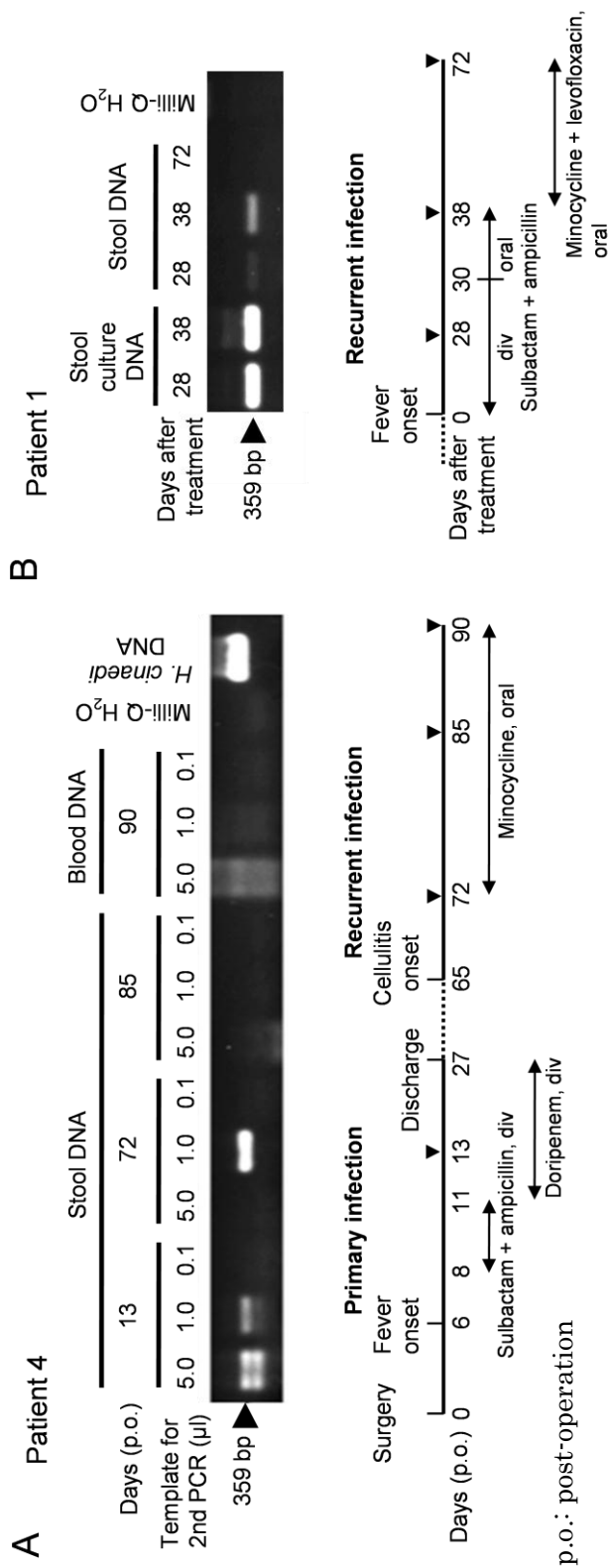


図 10 抗菌薬治療経過における便中 *H. cinaedi* のクリアランス評価

A: Patient 4 の便、血液の PCR 所見。便からは *H. cinaedi* が術後 72 日まで nested PCR で検出し、術後 85 日目には陰転化を確認した。また、術後 90 日目の血液では陰性であった。

B: Patient 1 の便の PCR 所見。治療開始 28 日、38 日後に採取した便では nested PCR で陽性反応を認めたが、72 日後の便からは検出されなかった。

### 3.5 抗菌薬治療経過における血液中 *H. cinaedi* のクリアランス評価

我々は、整形外科手術後に *H. cinaedi* 菌血症を伴う蜂窩織炎を発症した感染患者 (Patient 5) に抗菌薬治療を施行し、治療期間中の各タイムポイントで採血し、その検体の nested PCR を行った。臨床経過を表 5 に示す。

Patient 5 は、左大腿骨転子部骨折に対し手術を施行された約 3 ヶ月後に発熱を呈し、間もなくして患側の術創部から離れた部位に蜂窩織炎を発症した (図 11)。

発症後、抗菌薬 (ピペラシリン/タゾバクタム) の点滴治療を開始し、各タイムポイント (治療開始当日、3 日目、5 日目、7 日目) で採血し、nested PCR を施行した。結果、3 日目までの血液で PCR 産物を検出 (図 12) し、それ以降、陰性化するのを確認した。これにより、我々が今回構築した nested PCR の系が抗菌薬治療効果判定に有用であることが示唆された。

治療は計 14 日間の点滴治療で終了し、症状は消失している。治療終了後も再発することなく良好に経過し、退院した。

表 5 Patient 5 の臨床経過

Days p.o.	
0	左大腿骨転子部骨折に対して手術
108	左大腿・踵部蜂窩織炎の発症 血液培養(+), WBC 7600, CRP 6.4 Piperacillin + tazobactam 点滴 治療 採血 (PCR) : day 108, 110, 112, 114
140	退院

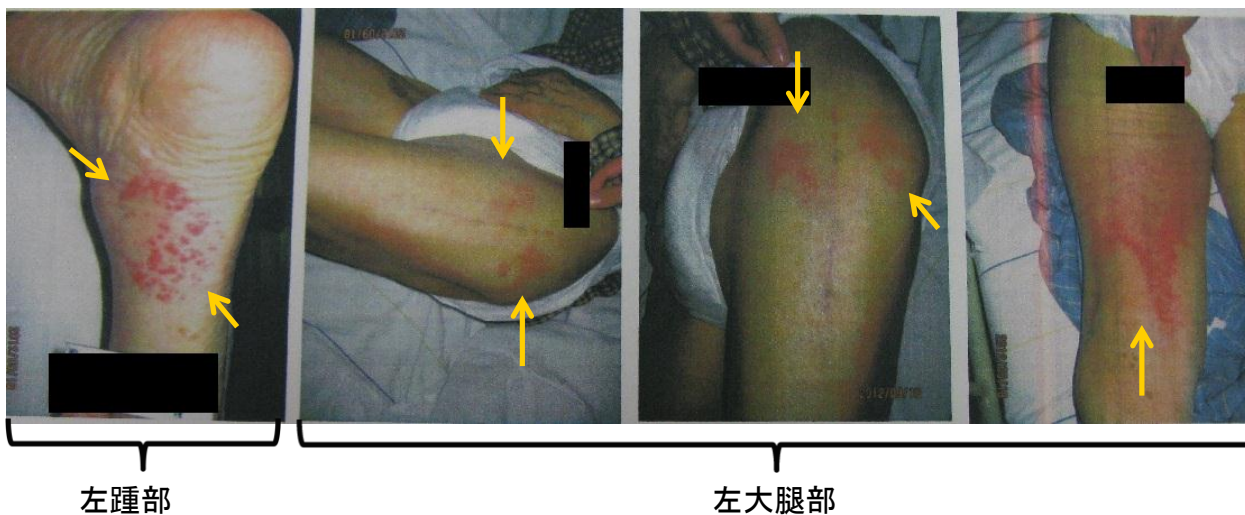


図 11 Patient 5 の蜂窩織炎身体所見  
術創部から比較的離れた部位に発赤・熱感・圧痛を伴う蜂窩織炎を認めた。

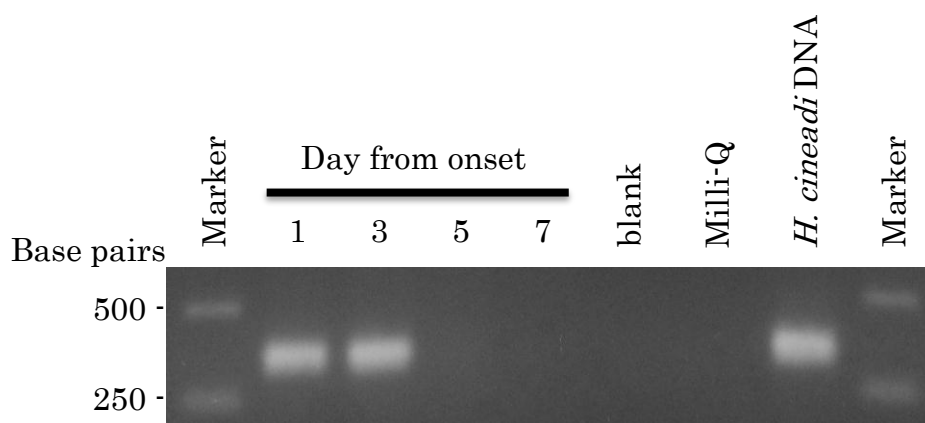


図 12 *H. cinaedi* 敗血症治療の効果判定  
治療開始 5 日後以降、*H. cinaedi* DNA は陰性化した。



### 3.6 臨床分離株の系統樹解析

我々は Patient 1 から採取した、初感染時、再発時の血液培養陽性の 2 つ菌株をそれぞれ使用し、他の臨床分離株、*H. bilis* との間で 16S rRNA において系統樹解析を行った。結果、Patient 1 から採取された 2 つの菌株は、どちらも同じクラスターに属していた。これらの株は 2004 年から 2008 年に検出された他の熊本分離株と 1430 塩基中、20~27 塩基異なっていた (図 13)。

この結果から、*H. cinaedi* 菌株の一部は初感染時の抗菌薬治療後も体内に残存し、ある程度の時間を経て再発時の感染源となっていることが示唆された。

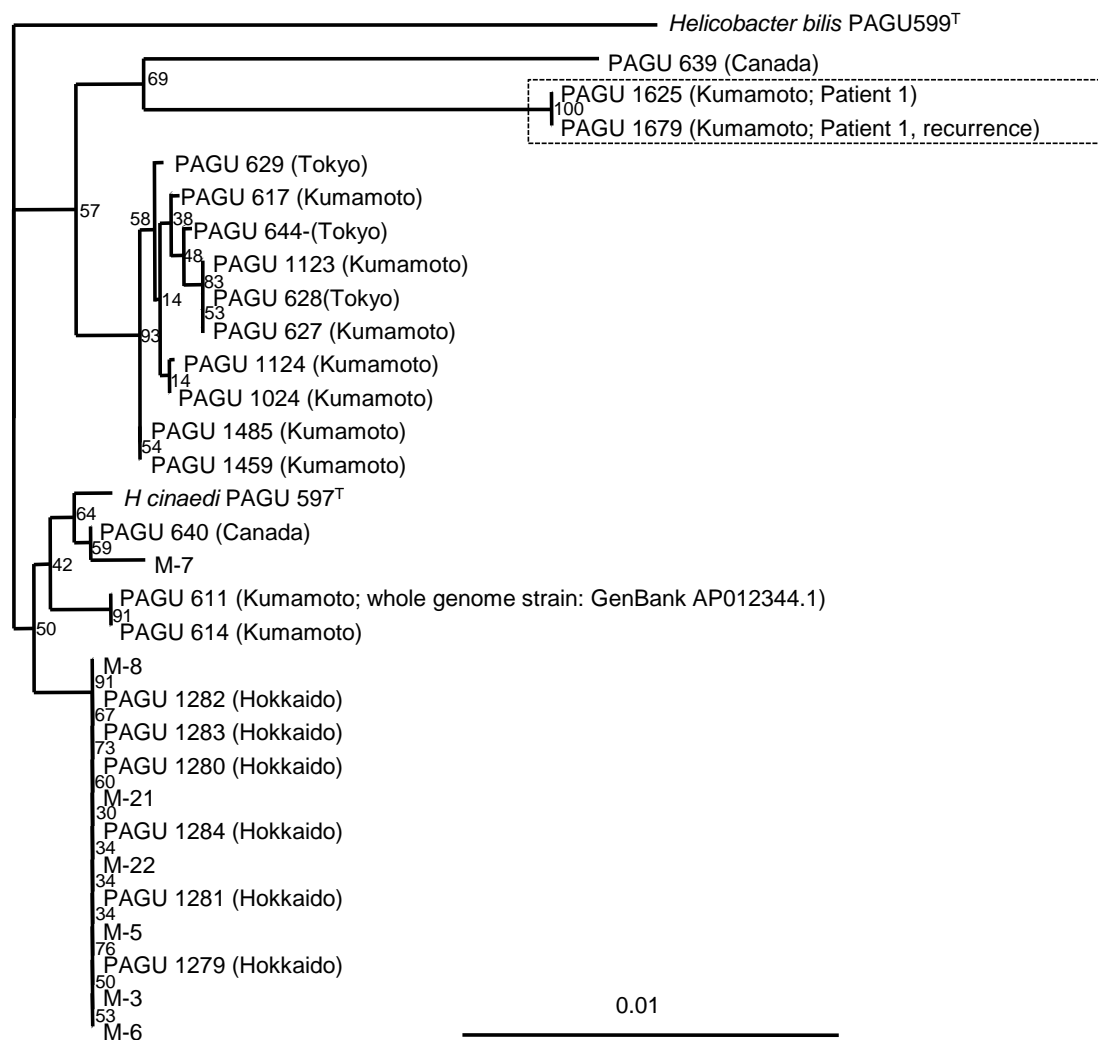


図 13 臨床分離株の系統樹解析

Patient 1 から採取された 2 つの菌株 (囲み線内) は、どちらも同じクラスターに属していた。図中の数値はブートストラップを指す。

### 3.7 Nested PCR による *H. cinaedi* 保菌者のスクリーニング応用

我々は、市中、院内環境における *H. cinaedi* キャリアーの存在を考え、これをスクリーニングすることを試みた。そこで、274名の健康な病院職員から便を提供してもらい、*H. cinaedi* 遺伝子の nested PCR を行った。結果判定基準は、各サンプルにおいて、nested PCR を 2 回施行し、2 回とも陽性であれば「陽性」、2 回とも陰性であれば「陰性」とした。また、どちらかが陽性であれば、再度 DNA 抽出からやり直し、nested PCR を 2 回施行した上で、1 回でも陽性であれば「疑い」と判定した。結果、274 名中 9 名 (3.28%) に陽性反応を認めた (図 14・表 6)。また、これら PCR 産物について遺伝子配列解析を行った結果、PCR 増幅産物は一貫して *H. cinaedi* 世界標準株 (CCUG18818) のそれと同じであったが、名古屋標準株 (PAGU611) のそれとは 8 塩基の相違が認められた (図 15)。しかし、これら 8 塩基の相違により生じたアミノ酸の相違は 4 ヶ所に認められ、これらは全て Cdt 活性に必須のアミノ酸ではなかった (Chien CC et al. 2000)。

さらに、これら陽性 9 名の便をヘリコバクター寒天培地で培養したところ、5 名にコロニー形成を認め (図 16)、これを *H. cinaedi* と同定した (図 17 A・B)。

この結果より、*H. cinaedi* の無症候性のキャリアーの存在が強く示唆された。しかし、*H. cinaedi* の感染拡大の原因を断定するためには、更に広範な疫学調査が必要である。

表 6 健常者便 PCR 結果一覧

No	年性	職種	勤務病棟	PCR 検査		PCR 検査		PCR 検査結果
				1回目 結果	2回目 結果	1回目 結果	2回目 結果	
8	25F	看護師	8病棟	(+)	(-)	(-)	(-)	PCR 陽性疑い
9	49F	看護師	外来	(+)	(-)	(-)	(-)	PCR 陽性疑い
10	26F	看護師	5病棟	(+)	(-)	(-)	(-)	PCR 陽性疑い
11	29F	医事課		(+)	(-)	(+)	(-)	PCR 陽性疑い
12	46F	看護師	7病棟	(+)	(-)	(-)	(-)	PCR 陽性疑い
20	21F	栄養士		(+++)	(-)	(-)	(-)	PCR 陽性疑い
29	55F	看護師	7病棟	(+++)	(-)	(-)	(-)	PCR 陽性疑い
55	36F	放射線科受付		(+++)	(-)	(-)	(-)	PCR 陽性疑い
75	50F	看護師	6病棟	(+)	(-)	(-)	(-)	PCR 陽性疑い
76	28F	看護師	7病棟	(+)	(-)	(-)	(-)	PCR 陽性疑い
77	31F	秘書		(+++)	(+++)			PCR 陽性
78	35F	管理栄養士		(+)	(-)	(-)	(-)	PCR 陽性疑い
81	20F	リハビリ助手		(+++)	(+++)			PCR 陽性
83	41M	事務		(+++)	(+++)			PCR 陽性
84	64F	調理師		(+++)	(+++)			PCR 陽性
85	32M	情報システム課	4F事務室	(+++)	(+++)			PCR 陽性
86	55F	看護助手	中材	(+++)	(+++)			PCR 陽性
89	23F	看護助手	5病棟	(+++)	(+++)			PCR 陽性
90	34F	看護師	5病棟	(+++)	(+++)			PCR 陽性
92	41M	看護師	op	(+)	(-)	(-)	(-)	PCR 陽性
144	62M	放射線技師		(+)	(-)	(-)	(-)	PCR 陽性疑い
152	32F	医局秘書課		(+)	(-)	(-)	(-)	PCR 陽性疑い
156	30F	理学療法士	2階	(+)	(+)	(-)	(-)	PCR 陽性

No.は図 14 におけるサンプル番号に該当する。

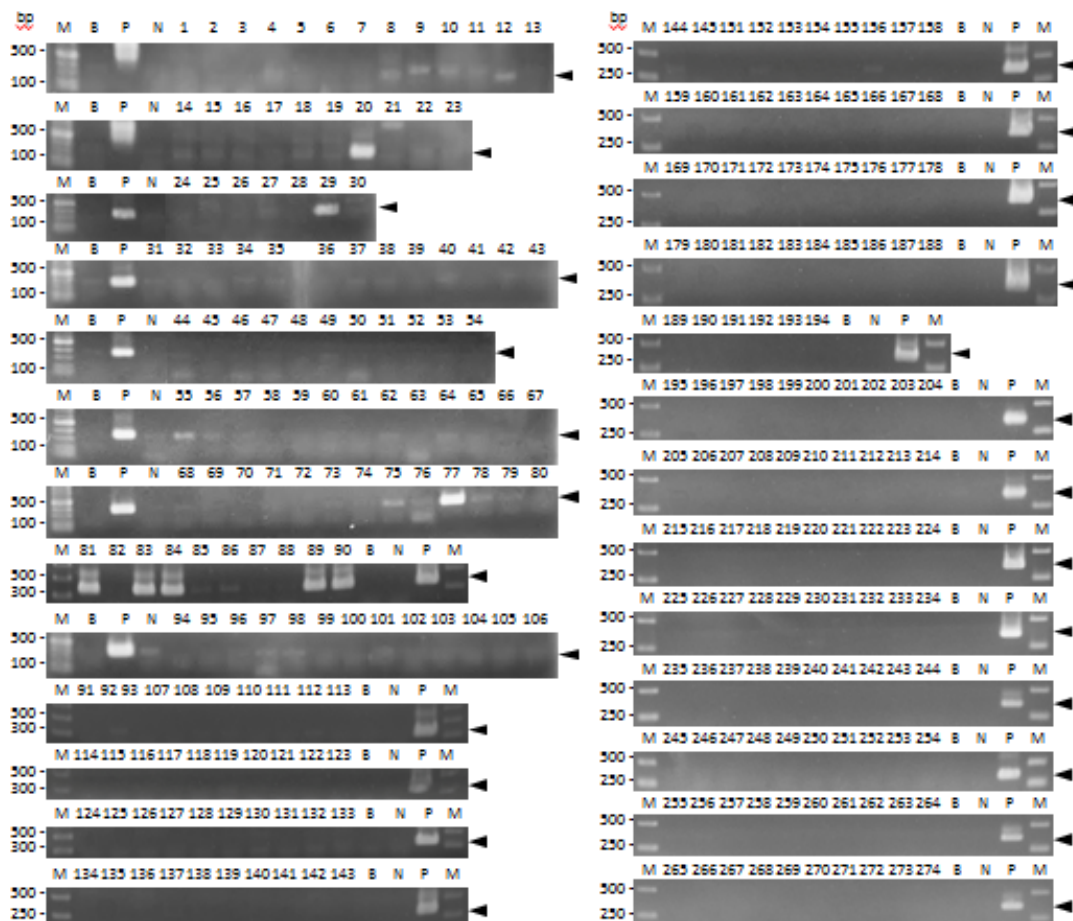


図 14 健常者からの便における nested PCR 結果

274 名中 9 名 (3.28%) に陽性反応を認めた。

結果判定基準は、各サンプルにおいて、nested PCR を 2 回施行し、2 回とも陽性であれば「陽性」、2 回とも陰性であれば「陰性」とした。また、どちらかが陽性であれば、再度 DNA 抽出から施行し、nested PCR を 2 回施行し、1 回でも陽性であれば「疑い」と判定した。ここには 1 回目の結果を示す。



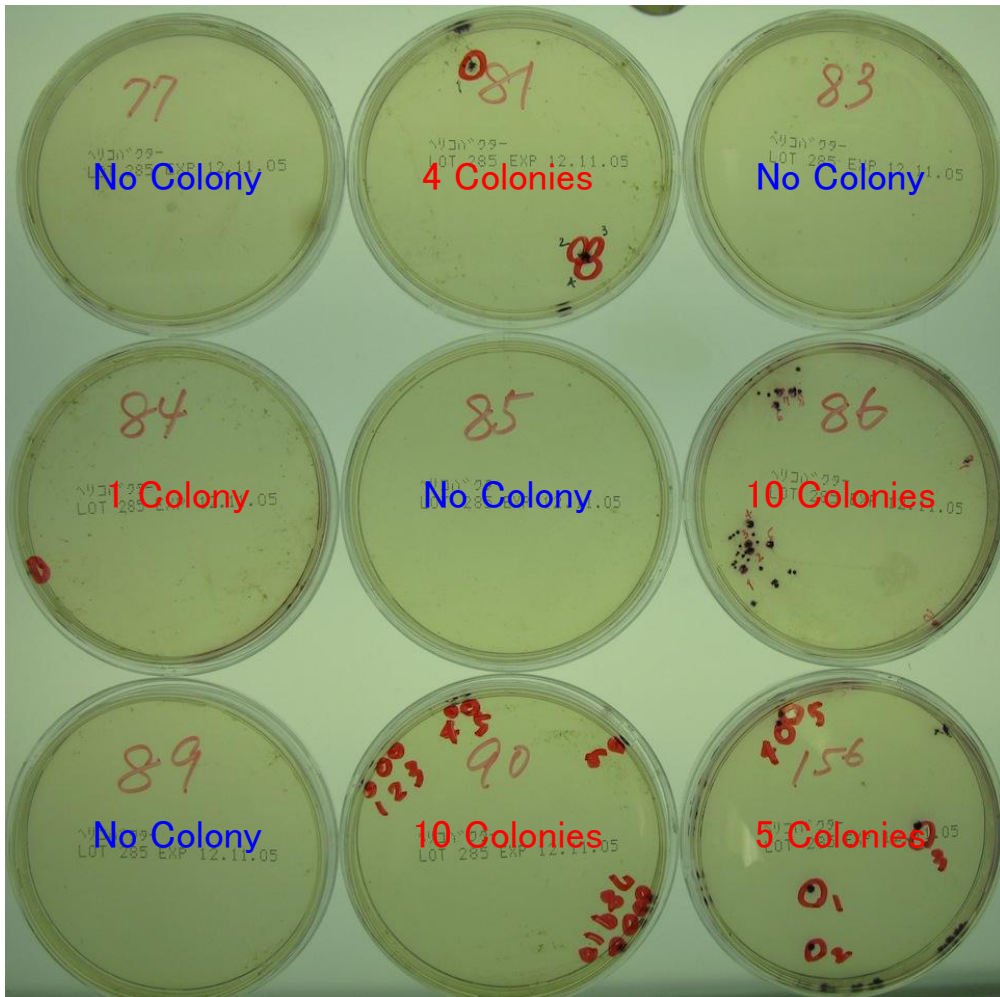


図 16 健常者の便から培養検出された *H. cinaedi* コロニー形成  
 培養条件：37°C、微好気（10% 水素、10% 二酸化炭素、80% 窒素）環境下  
 にヘリコバクター寒天培地で3日間培養。  
 数値は図 14 におけるサンプル番号に該当する。

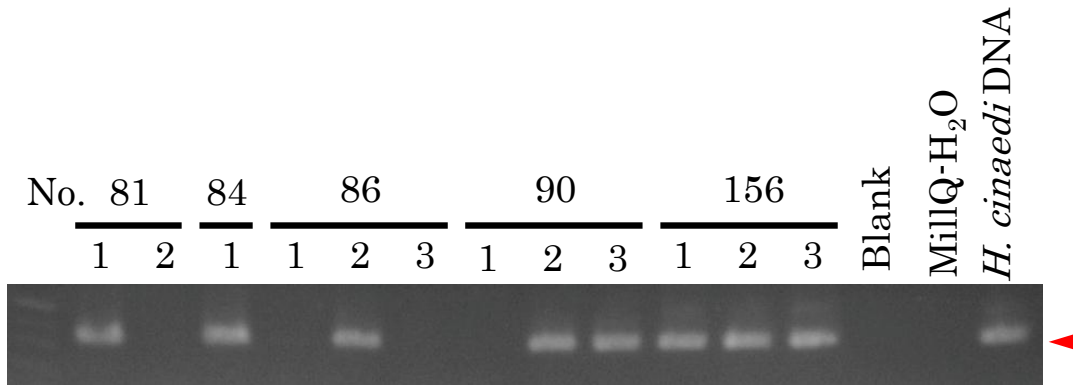


図 17A コロニーから釣菌された *H. cinaedi* の nested PCR  
No.値は図 16 におけるサンプル番号に該当する。

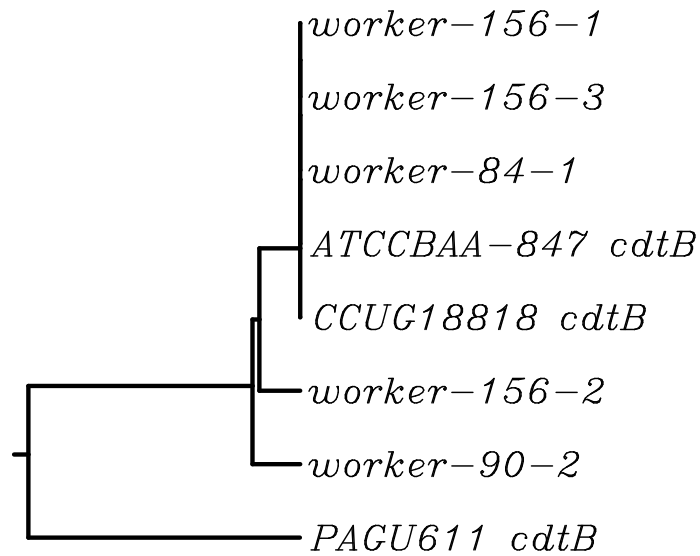


図 17 B コロニーから釣菌された *H. cinaedi* の *cdt B* 遺伝子系統樹解析  
CCUG18818：世界標準株  
ATCCBAA 847：東京標準株  
PAGU611：名古屋標準株  
Worker における数値は図 17A におけるサンプル番号に該当する。

## 第4章 考察

### 4.1 Nested PCR 法の構築と臨床応用

今回、*H. cinaedi* 感染の早期診断のために、菌体由来成分（蛋白質あるいは DNA）を直接検出するシステムの確立が必要と考え、我々は PCR 法による菌体 DNA の検出系を開発した。中でも、より高感度（ $10^2$  cfu/ml）で特異性の高い nested PCR 法の構築に成功した。臨床検体への応用についても、血液培養で陰性であっても、本 PCR 法で *H. cinaedi* の検出が可能であり、培養検査と比較しても、本 PCR 法がより迅速かつ高感度であることが示された。

しかし、図 9D に示されたように、血液培養で陽性であったにも関わらず、発症当日の血液からは本 PCR 法で検出されないこともあった。これに関しては、発症当日の血中に存在する *H. cinaedi* の菌量が、本 PCR 法の検出限界以下であったと推測され、図 8 の *H. cinaedi* 感染マウスの実験で示されたように、発症当日の本 PCR 法の検出感度は血液よりむしろ尿の方が高いことから、発症当日には、血液中に侵入した *H. cinaedi* は、早期に肝臓、脾臓、腎臓に集積していた可能性があるとして筆者は考察している。また、他の可能性として、血液中に何らかの PCR 阻害物質が存在していた可能性も否めない。

### 4.2 *H. cinaedi* 検出における nested PCR と培養技術の比較

過去に我々は、上述のようにホモセクシャ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 に術後 *H. cinaedi* 感染症を経験し、ELISA による血清学的診断法を確立した (Iwashita et al. 2008)。しかし、臨床的に典型的な *H. cinaedi* 感染症の症状を呈しているにも関わらず、血液培養での培養効率の低さから、*H. cinaedi* を検出できない症例も多数存在した。例えば、上述の Patient 3 については、臨床的に典型的な *H. cinaedi* 感染症の症状を呈していたが、血液培養は陰性であった。しかし、今回構築した nested PCR では、血液と尿から *H. cinaedi* 遺伝子を検出し得た (図 9E)。この知見から、本 nested PCR が血液培養よりも有用であることが示され、同時に *H. cinaedi* の増殖効率の低さが再確認された。また、*H. cinaedi*



の増殖効率の低さの理由として、生菌であるにも関わらず、培養条件等の環境要因によって、増殖能が抑制された状態、viable but non-culturable (VBNC) にある可能性が考えられる。このようなことから、菌体DNAを検出する本PCR法は、培養法による検出と比較してより有用であることが期待される。

#### 4.3 *H. cinaedi*感染発症の背景

*H. cinaedi*が最初に発見された1984年以降、*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ャ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男性患者の *H. cinaedi* 菌血症が報告された (Murakami et al. 2003)。また、肺癌の化学療法中に、2度にわたり *H. cinaedi* 菌血症を来した男性の症例も報告されている (Nishine et al. 2007)。いずれも、immunocompromised host あるいは何らかの重大な基礎疾患を持つ患者に発生している例がほとんどである。

我々は2004年以降、市中病院にて、immunocompetent host において術後に *H. cinaedi* 菌血症を伴う蜂窩織炎を度々経験しており、ELISAによる血清学的診断法を確立し (Iwashita et al. 2008)、今回、nested PCR法による診断法を構築した。これを応用し、健常人の生体試料(便)からの *H. cinaedi* 検出に世界で初めて成功した。

#### 4.4 *H. cinaedi*分離株の分子疫学と感染経路

我々は2004年当初、*H. cinaedi*感染症が同一病院で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ると考えた。しかし、系統分類学的解析により、クローンは単一ではないことが当初より指摘されており、アウトブレイクは複数のクローンによるものと考えた。その原因としては、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た。しかしながら、いずれの可能性も明確に示すデータは得られずにいた。

今回、我々は上述の Patient 1 ように、再発した *H. cinaedi* 感染症の原因菌は初感染のそれと系統解析の上で、同一であることを示した (図 13)。また、健常者 274 名の便から *H. cinaedi* の DNA 検出を新たに構築した nested PCR で試み、結果、9 名 (3.28%) の *H. cinaedi* DNA の検出に成功した。さらに、これら 9 名の便をヘリコバクター寒天培地で培養し、5 名から *H. cinaedi* の増殖を認めた。これにより、健常者にもある程度の確率で腸管や肝胆道系に *H. cinaedi* を保菌していることが示され、同時に *H. cinaedi* が糞口感染する可能性も示唆された。また、*H. cinaedi* 感染経路の可能性として、保菌している *H. cinaedi* による内因性の感染も上げられる。さらに、健常者 274 名の便から得た PCR 産物 (*cdtB* 遺伝子) の遺伝子配列検索により、感染患者から検出される菌株と、健常者から検出されるそれは必ずしも同一ではないことも新たに分かった。このことも、保菌している *H. cinaedi* による内因性感染の可能性を支持すると考えられる。従い、便から抽出された DNA の解析は、*H. cinaedi* 感染症、保菌者のスクリーニングに有用であると考えられる。いずれにせよ、*H. cinaedi* の感染源と感染経路は依然として不明であり、その解明には今後さらに大きな規模の疫学的調査が必要となるだろう。

#### 4.5 ヒト以外の *H. cinaedi* の自然宿主

*H. cinaedi* は、ペット (イヌ、ネコ、ハムスターなど) や家畜 (ブタ、ニワトリ) 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; Stanley et al. 1993)。これまでに、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)。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) が、2004 年以降に我々が経験した症例にそれを示唆する背景は認められなかった。

また、これまでの報告に *H. cinaedi* が環境中から見出されたことはない。自然界の感染源として環境汚染も考えられるので、我々が構築した nested PCR 法を用いて、環境中からの検出を試みることも有用なアプローチとなると考えられる。

#### 4.6 *H. cinaedi* 感染の治療と予後

これまでの諸家の症例報告において、*H. cinaedi* は多くの抗菌薬に感受性を有し、様々なものが使用されている。*H. cinaedi* 感染症は、菌血症・敗血症であっても重篤な例は少なく、抗菌薬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、アミノグリコシド系が、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。さらに、ニューキノロンについては日本で分離された菌株は例外なく全株耐性傾向を示す報告 (Rimbara et al. 2012) があり、これは、日本国内での抗菌薬治療におけるニューキノロン薬使用の多さを反映しているものと筆者は考察している。

一方、このように抗菌薬の治療効果が高いにも関わらず、しばしば蜂窩織炎の再発が認められる。また、再発前後に得られた菌株において抗菌薬感受性に変化は認めず、再発は抗菌薬耐性化に起因するものではない。このことは、抗菌薬治療後も *H. cinaedi* が潜伏感染していることを示唆している。

従って、2012 年現在、本邦での *H. cinaedi* 感染症の治療は、ニューキノロン薬は避けるべきであり、治療期間も Kiehlbauch らの報告 (Kiehlbauch et al. 1994) から、10 日以内の短期的治療よりも、2~6 週間の長期的治療が推奨される。

#### 4.7 *H. cinaedi* 感染と心房性不整脈およびアテローム性動脈硬化症との関連

この 20 年程で、*H. cinaedi* 感染症の報告数は増えており、当初思われていたよりも、普遍的な感染症となりつつある (Kitamura et al. 2007; Uckay et al. 2006)。これまで、培養効率の低さゆえの診断技術の困難さが、*H. cinaedi* の臨床症状や病因の理解を妨げていると考えられる。

2007年に心筋心膜炎の患者から *H. cinaedi* が検出されており (Lewis et al. 2007)、*H. cinaedi* 感染と心血管疾患との関連が注目視されている。最近、我々は抗 *H. cinaedi* IgG の上昇が心房性不整脈に寄与しており、さらに、アテローム性動脈硬化の血管組織に *H. cinaedi* 抗原を見出し報告した (Khan et al. 2012)。今回の研究によって健常保菌者の存在が明らかになった。このことは本菌が心血管・代謝性疾患の発症病態に関係している可能性を支持しているかもしれない。今後さらに本菌とその様な疾患との関連について病因論的な解析が必要になると考えられる。

## 第5章 結語

*H. cinaedi* はヒトや動物の腸管・肝臓から検出される Enterohepatic *Helicobacter* species に属し、1984年に初めてヒトへの感染が確認された新興感染症菌である。過去に我々は、本菌感染症の血清診断法（ELISA）を開発し、感染患者の診断、治療効果判定、あるいは病院職員のスクリーニングへの応用を試みた。しかし本法では、本菌感染の既往は診断可能であるが、今現在菌を保有しているか否かの判定が困難であるため、菌体由来成分（DNA）を直接検出する nested PCR 法を構築した。この方法は、感度・特異度共に高く、*H. cinaedi* 感染症の早期診断や治療効果判定、感染症疫学調査、病態解明、保菌者のスクリーニングにおいて極めて有用なツールとなるものと期待される。

## 第6章 参考文献

1. Burman WJ, Cohn DL, Reves RR, Wilson ML. 1995. Multifocal cellulitis and monoarticular arthritis as manifestations of *Helicobacter cinaedi* bacteremia. *Clin Infect Dis* 20: 564-570.
2. Charoenlap N, Shen Z, McBee ME, Muthupalani S, Wogan GN, Fox JG et al. 2012. Alkyl hydroperoxide reductase is required for *Helicobacter cinaedi* intestinal colonization and survival under oxidative stress in BALB/c and BALB/c interleukin-10 <sup>-/-</sup> mice. *Infect Immun* 80: 921-928
3. Chien CC, Taylor NS, Ge Z, Schauer DB, Young VB, Fox JG. 2000 Identification of cdtB homologues and cytolethal distending toxin activity in enterohepatic *Helicobacter* spp. *J Med Microbiol.* 49:525-534.
4. Cimolai N, Gill MJ, Jones A, Flores B, Stamm WE, Laurie W, Madden B, Shahrabadi MS. 1987. “*Campylobacter cinaedi*” bacteremia: case report and laboratory findings. *J Clin Microbiol* 25: 942-943.
5. Decker CF, Martin GJ, Barham WB, Paparello SF. 1992. Bacteremia due to *Campylobacter cinaedi* in a patient infected with the human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 15, 178-179.
6. Eppinger M, Baar C, Linz B, Raddatz G, Lanz C, Keller H, Morelli G, Gressmann H, Achtman M, Schuster SC. 2006. Who ate whom? Adaptive *Helicobacter* genomic changes that accompanied a host jump from early humans to large felines. *PLoS Genet* 2: e120.
7. Fennell CL, Totten PA, Quinn TC, Patton DL, Holmes KK, Stamm WE. 1984. Characterization of *Campylobacter*-like organisms isolated from homosexual men. *J. Infect. Dis.* 149:58-66.

8. Fernandez KR, Hansen LM, Vandamme P, Beaman BL, Solnick JV. 2002. Captive rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) are commonly infected with *Helicobacter cinaedi*. *J Clin Microbiol* 40: 1908-1912.
  
9. Flores BM, Fennell CL, Kuller L, Bronsdon MA, Morton WR, Stamm WE. 1990. Experimental infection of pig-tailed macaques (*Macaca nemestrina*) with *Campylobacter cinaedi* and *Campylobacter fennelliae*. *Infect Immun* 58: 3947-3953.
  
10. Flores BM, Fennell CL, Stamm WE. 1989. Characterization of *Campylobacter cinaedi* and *C. fennelliae* antigens and analysis of the human immune response. *J Infect Dis* 159: 635-640.
  
11. Fox JG, Handt L, Sheppard BJ, Xu S, Dewhirst FE, Motzel S, Klein H. 2001. 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.
  
12. Fox JG. 2002. The non-*H. pylori* *Helicobacters*: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. *Gut* 50:273-283.
  
13. Gebhart CJ, Fennell CL, Murtaugh MP, Stamm WE. 1989. *Campylobacter cinaedi* is normal intestinal flora in hamsters. *J Clin Microbiol* 27:1692-1694.
  
14. Goto T, Ogura Y, Hirakawa H, Tomida J, Morita Y, Akaike T, Hayashi T, and Kawamura Y. 2012. Complete Genome Sequence of *Helicobacter cinaedi* Strain PAGU611, Isolated in a Case of Human Bacteremia. *J Bacteriol* 194: 3744-3745.
  
15. Grayson ML, Tee W, Dwyer B. 1989. Gastroenteritis associated with *Campylobacter cinaedi*. *Med J Aust* 150: 214-215.

16. Hsueh PR, Teng LJ, Hung CC, Chen YC, Yang PC, Ho SW, Luh KT. 1999. Septic shock due to *Helicobacter fennelliae* in a non-human immunodeficiency virus-infected heterosexual patient. *J Clin Microbiol* 37: 2084-2086.
17. Iwashita H, Fujii S, Kawamura Y, Okamoto T, Sawa T, Masaki T, Nishizono A, Higashi S, Kitamura T, Tamura F, Sasaki Y, Akaike T. 2008. Identification of the major antigenic protein of *Helicobacter cinaedi* and its immunogenicity in humans with *H. cinaedi* infections. *Clin Vaccine Immunol* 15:513-521.
18. Kawamura Y, Hou XG, Sultana F, Miura H, Ezaki T. 1995. 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.
19. Khan S, Okamoto T, Enomoto K, Sakashita N, Oyama K, Fujii S, Sawa T, Takeya M, Ogawa H, Yamabe H, Akaike T. 2012. Potential association of *Helicobacter cinaedi* with atrial arrhythmias and atherosclerosis. *Microbiol. Immunol* 56:145-154.
20. Kiehlbauch JA, Brenner DJ, Cameron DN, Steigerwalt AG, Makowski JM, Baker CN, Patton CM, Wachsmuth IK. 1995. Genotypic and phenotypic characterization of *Helicobacter cinaedi* and *Helicobacter fennelliae* strains isolated from humans and animals. *J Clin Microbiol* 33:2940-2947.
21. Kiehlbauch JA, Tauxe RV, Baker CN, Wachsmuth IK. 1994. *Helicobacter cinaedi*-associated bacteremia and cellulitis in immunocompromised patients. *Ann Intern Med* 121:90-93.



22. Kitamura T, Kawamura Y, Ohkusu K Masaki T, Iwashita H, Sawa T, Fujii S, Okamoto T, Akaike T. 2007. *Helicobacter cinaedi* cellulitis and bacteremia in immunocompetent hosts after orthopedic surgery. *J Clin Microbiol* 45:31-38.
23. Lasry S, Simon J, Marais A, Pouchot J, Vinceneux P, Boussougant Y. 2000. *Helicobacter cinaedi* septic arthritis and bacteremia in an immunocompetent patient. *Clin Infect Dis* 31: 201-202.
24. Leemann C, Gambillara E, Prod'hom G, Jaton K, Panizzon R, Bille J, Francioli P, Greub G, Laffitte E, Tarr PE. 2006. First case of bacteremia and multifocal cellulitis due to *Helicobacter canis* in an immunocompetent patient. *J Clin Microbiol* 44, 4598-4600.
25. Lewis GD, Holmes CB, Holmvang G, Butterson JR. 2007. 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.
26. Mammen MP Jr., Aronson NE, Edenfield WJ, Endy TP. 1995. Recurrent *Helicobacter cinaedi* bacteremia in a patient infected with human immunodeficiency virus: case report. *Clin Infect Dis* 21: 1055.
27. 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, Yamaguchi K. 2007. Multicenter study to evaluate bloodstream infection by *Helicobacter cinaedi* in Japan. *J Clin Microbiol* 45: 2853-2857.
28. Mikkonen, TP, Kärenlampi RI, Hänninen ML. 2004. Phylogenetic analysis of gastric and Enterohepatic *Helicobacter* species based on partial HSP60 gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:753-758.

29. Minauchi K, Takahashi S, Sakai T, Kondo M, Shibayama K, Arakawa Y, Mukai M. 2010. The nosocomial transmission of *Helicobacter cinaedi* infections in immunocompromised patients. *Intern Med* 49:1733-9
30. Murakami H, Goto M, Ono E, Sawabe E, Iwata M, Okuzumi K, Yamaguchi K, Takahashi T. 2003. Isolation of *Helicobacter cinaedi* from blood of an immunocompromised patient in Japan. *J Infect Chemother* 9: 344-347.
31. Nachamkin I: Algorithms for identification of Curved and Spiral-Shaped Gram-Negative Rods in. Fitzgerald C, Nachamkin I. *Campylobacter* and *Arcobacter* in. Lawson AJ. *Helicobacter* in: Versalovic J, Carroll KC, Tenover FC, Tenover GC, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, ed. Manual of clinical microbiology. *American Society for Microbiology, Washington DC*, 2011: 881-915
32. Ng VL, Hadley WK, Fennell CL, Flores BM, Stamm WE. 1987. Successive bacteremias with "*Campylobacter cinaedi*" and "*Campylobacter fennelliae*" in a bisexual male. *J Clin Microbiol* 25: 2008-2009.
33. Nishine H, Kasai S, Yoshikawa M, Otsuka Y, Tokuda H. 2007. A case of recurrent *Helicobacter cinaedi*-associated bacteremia in a small cell lung cancer patient during chemotherapy. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 45: 26-30.
34. Orlicek SL, Welch DF, Kuhls TL. 1993. Septicemia and meningitis caused by *Helicobacter cinaedi* in a neonate. *J Clin Microbiol* 31: 569-571.
35. Page RD. 1996. Tree View: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12:357-358.

36. Pasternak J, Bolivar R, Hopfer RL, Fainstein V, Mills K, Rios A, Bodey GP, Fennell CL, Totten PA, Stamm WE. 1984. Bacteremia caused by *Campylobacter*-like organisms in two male homosexuals. *Ann Intern Med* 101: 339-341, 1984
37. Pearson WR, Lipman DJ. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:2444-2448.
38. Rasika N, Jinadasa, Stephen E. Bloom, Robert S. Weiss, Gerald E. Duhamel 2011. Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. *Microbiology* 157:1851-75.
39. Rimbara E, Mori S, Matsui M, Suzuki S, Wachino J, Kawamura Y, Shen Z, Fox JG, Shibayama K. 2012. Molecular epidemiologic analysis and antimicrobial resistance of *Helicobacter cinaedi* isolated from seven hospitals in Japan. *J Clin Microbiol* 50: 2553-2560.
40. Sacks LV, Labriola AM, Gill VJ, Gordin FM. 1991. 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.
41. Simons E, Spacek LA, Lederman HM, Winkelstein JA. 2004. *Helicobacter cinaedi* bacteremia presenting as macules in an afebrile patient with X-linked agammaglobulinemia. *Infection* 32: 367-368.
42. Solnick JV, and Schauer DB. 2001. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and Enterohepatic diseases. *Clin Microbiol Rev* 14: 59-97.

43. Stanley J, Linton D, Burnens AP, Dewhirst FE, Owen RJ, Porter A, On SL, Costas M. 1993. *Helicobacter canis* sp. nov., a new species from dogs: an integrated study of phenotype and genotype. *J Gen Microbiol* 139:2495-2504.
44. Suerbaum S, Josenhans C, Sterzenbach T, Drescher B, Brandt P, Bell M, Droge M, Fartmann B, Fischer HP, Ge Z, Horster A, Holland R, Klein K, Konig J, Macko L, Mendz GL, Nyakatura G, Schauer DB, Shen Z, Weber J, Frosch M, Fox JG. 2003. The complete genome sequence of the carcinogenic bacterium *Helicobacter hepaticus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 7901-7906.
45. Sullivan AK, Nelson MR, Walsh J, Gazzard BG. 1997. Recurrent *Helicobacter cinaedi* cellulitis and bacteremia in a patient with HIV infection. *Int J STD AIDS* 8: 59-60.
46. Taylor NS, Ge Z, Shen, Z, Dewhirst FE, Fox JG. 2003. Cytolethal distending toxin: a potential virulence factor for *Helicobacter cinaedi*. *J. Infect. Dis* 188:1892-1897.
47. Tee W, Anderson BN, Ross BC, Dwyer B. 1987. Atypical *Campylobacters* associated with gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 25:1248-1252.
48. Tee W, Street AC, Spelman D, Munckhof W, Mijch A. 1996. *Helicobacter cinaedi* bacteremia: varied clinical manifestations in three homosexual males. *Scand J Infect Dis* 28: 199-203
49. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. 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.

50. Uckay I, Garbino J, Dietrich PY, Ninet B, Rohner P, Jacomo V. 2006. Recurrent bacteremia with *Helicobacter cinaedi*: case report and review of the literature. *BMC Infect Dis* 6:86.
51. Vandamme P, Falsen E, Pot B, Kersters K, De Ley J. 1990. Identification of *Campylobacter cinaedi* isolated from blood and feces of children and adult females. *J. Clin. Microbiol.* 28:1016-1020.
52. Vandamme P, Falsen E, Rossau R, Hoste B, Segers P, Tytgat R, De Ley J. 1991. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* 41: 88-103
53. Vandamme P, Harrington CS, Jalava K, On SL. 2000. Misidentifying *Helicobacters*: the *Helicobacter cinaedi* example. *J Clin Microbiol* 38:2261-2266.
54. Weir SC, Gibert CL, Gordin FM, Fisher SH, Gill VJ. 1999. An uncommon *Helicobacter* isolate from blood: evidence of a group of *Helicobacter* spp. Pathogenic in AIDS patients. *J Clin Microbiol* 37: 2729-2733.