

厚生労働省研究費補助金(がん臨床研究事業)
分担研究報告書

家族由来 *Helicobacter pylori* 菌株の遺伝子型別とスナネズミ感染性の比較

研究分担者 神谷 茂 杏林大学医学部感染症学教室 教授

研究要旨

H. pylori の感染ルートの一つに家族の保有する菌株が感染源となる小児期の家族内感染がある。家族内の感染状況を明らかにするため、複数の家族員が *H. pylori* に感染している家族において菌株を分離し遺伝子型を比較した。母子感染を主とする親から子への感染が認められたが、両親の保有する 2 菌株と子供の保有する菌株の遺伝子タイプが異なり、同胞間感染が明らかな 1 例を検出した。同一家族から分離された遺伝子型の異なる 3 菌株を用いて、菌株ごとの感染性の差の有無について明らかにするため、動物実験を実施した。子供由来 *H. pylori* K25 株 (3 人の同胞が同一の遺伝子型) は父親由来 (K21 株)、母親由来 (K22 株) の *H. pylori* と比較して、スナネズミに高い感染性を示した。胃上皮細胞への付着性が高く、増殖能は中等度であった。子供由来株の動物への感染性が高いことが示唆され、親子感染と比べて同胞間感染が優位であった要因のひとつと考えられた。

神谷 茂
杏林大学医学部感染症学教室 教授
大崎敬子
杏林大学医学部感染症学教室 准教授
米澤英雄
杏林大学医学部感染症学教室 講師
今野武津子
札幌厚生病院 小児科

株と子供の保有する菌株の遺伝子タイプが異なり、同胞間感染が明らかな家族では、遺伝子型が異なる 3 菌株が分離された。本研究では、同一家族から分離された遺伝子の異なる 3 菌株を用いてスナネズミへの感染実験を実施し、各菌株の宿主感染性の差について明らかにし、感染に重要な菌側の要因を解析することとした。

B. 研究方法

【使用菌株】同一家族から分離された *H. pylori*、父親由来 (K21、シークエンス型 (ST):2760)、母親由来 (K22 株、ST:2761) の子供由来 (K25 株、ST:2762; 同胞 3 名において同一型であった) の 3 株を用いた。

【動物実験】*H. pylori* K21 株、K22 株をそれぞれスナネズミに投与し 10 日後に子供由来 K25 株を投与した。別の実験として、子供由来 *H. pylori* K25 株を先に投与して、K21 それぞれの菌株の順番を入れ替えてスナネズミに投与した。いずれの

A. 研究目的

H. pylori は主として 5 歳以下の小児期に感染が成立すると考えられており、家族の保有する菌株が感染源となる家族内感染が本邦における重要な感染ルートと考えられている。家族内の感染状況を明らかにするため、複数の家族員が *H. pylori* に感染している家族から菌株を分離し遺伝子型を比較した。その結果、家族内感染が多く見られるのは母子感染であることを示し報告した。両親の保有する 2 菌

実験も2回目の感染から2週間後に、スナネズミの胃から粘膜を採取して、培養し、*H. pylori* 選択培地(日水製薬)に接種した。発育した紫色のコロニーを釣菌し、7%馬血清添加 Brucella 寒天培地で3-4日培養し、集菌した。集菌後 DNA 抽出までの間は-80 で保存した。

【遺伝子型の確認】

保存した菌の DNA は MagExtractor (東洋紡) を使って抽出した。*H. pylori* 16S r RNA 遺伝子特異的プライマーを用いて増幅の認められない菌株 DNA は、サンプル数から除外した。

ランダムプライマーを用いた PCR 増幅後に、電気泳動パターンの違いを確認した。

trpC 遺伝子をターゲットとするプライマー (rpC-for8、5'-GGCAATTTGGATGAGCGAGCTC-3'、trpC-rev6、5'-AAGGCCCGCACACTTTATTTTC-3') を用いて PCR 増幅後に、産物のダイレクトシーケンスを実施した。

【菌株の性状比較】

菌株の性状解析として、液体培地中での増殖を比較した。7%馬血清添加 Brucella 培地中での増殖は、継時的に OD 値の測定と、平板希釈培養法による生菌数算定を実施した。

胃上皮細胞への付着性状の比較は、AGS 細胞を用いて評価した。上皮細胞との共培養3時間後に、PBSで3回洗浄し、洗浄後、サポニンを含むハンクス緩衝液で細胞を破壊して、生菌数を算定した。(倫理面への配慮)

本研究は既に報告した *H. pylori* 臨床分離菌株を用いて実施しているが、家族内の個人データと結びつくことの無いように管理された菌株を用いている。

動物実験は杏林大学動物実験委員会の承認を受けて実施した。

C. 研究結果

遺伝子型の異なる *H. pylori* の菌株を組み合わせ、K21 株または K22 株とあとから K25 株をスナネズミに感染させた。スナネズミから分離された *H. pylori* は1匹のスナネズミ(K22-3)を除いて、子供由来

K25 株が優勢であった(表1, 2)。前投与に使った K21 株または K22 株は検出されなかった。

さらにスナネズミへの投与の順番を入れ

表1. *H. pylori* K21 株投与後に K25 株を投与したスナネズミから分離されたコロニーの遺伝子型

動物番号	K25 株/コロニー数
K21-1	14/14
K21-2	2/2
K21-3	8/12

表2. *H. pylori* K22 株投与後に K25 株を投与したスナネズミから分離されたコロニーの遺伝子型

動物番号	K25 株の数/コロニー数
K22-1	14/14
K22-2	15/15
K22-3	0/2

替えて子供由来 *H. pylori* K25 株を先に投与し両親の菌株(K21 株または K22 株)を投与した際にも、子供由来 K25 株が優勢で検出された(表3, 4)。K21 株または K22 株は検出されなかった。

表3. *H. pylori* K25 株投与後に K21 株を投与したスナネズミから分離されたコロニーの遺伝子型

動物番号	K25 株の数/コロニー数
K25-1	8/11
K25-2	10/14
K25-3	8/14

表4. *H. pylori* K25 株投与後に K22 株を投与したスナネズミから分離されたコロニーの遺伝子型

動物番号	K25 株の数/コロニー数
K25-4	2/5
K25-5	1/3

これらの結果から、子供由来菌株は両親由来株と比べてスナネズミへの感染性が高いことが示唆された。

H. pylori 菌株の増殖性を比較した。子供由来 K25 株は K21 株、K22 株と比べて、増殖性においては中程度であった(図1)。

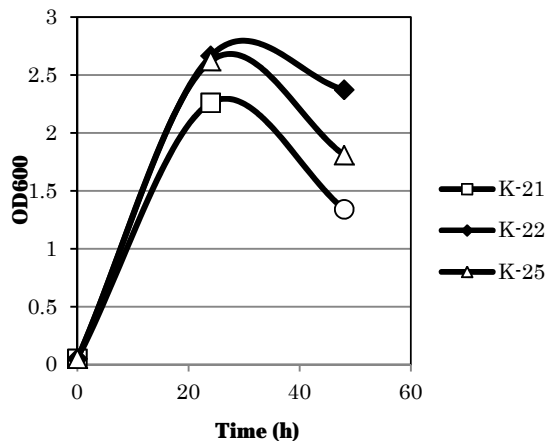


図1. *H. pylori* 各菌株の液体培養中での増殖の比較 (OD値).

さらに、*H. pylori* 菌株の AGS 細胞への付着性を比較した。用いた菌株のうち最も高い付着性を示したのは K25 株であった(図2)。

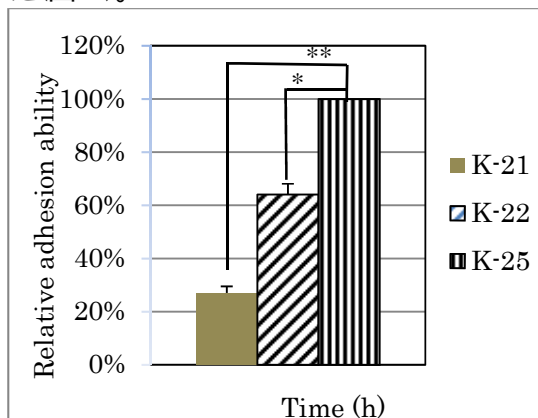


図2. 遺伝子タイプの異なる *H. pylori* 菌株の AGS 細胞への付着性 (K25 の付着数を 100% として相対値で示した。)

D. 考察

H. pylori の小児への感染源となる菌株は、多くの場合母親や父親由来と考えられているが、家族外の由来である場合、その原因として、家族内に存在していた菌株と比較して、感染性がより高くなっているのではないかという推察が成り立つ。

本研究に用いた菌株は両親がそれぞれ違う遺伝子タイプの菌株を持ち、子供3名が一つの遺伝子タイプの菌株を持った例で、外から持ち込まれた菌株が、同胞

への感染源となっていることも示されている²⁾。

子供由来菌株は両親由来株と比べてスナネズミへの感染性が高いことが示唆された。さらに、スナネズミ感染性の高い要因を明らかにするため、増殖性を比較したところ、子供由来の菌株は両親由来株と比べて増殖性においては中程度であったが、胃上皮細胞への付着を比較したところ、子供由来 K25 株が3株の中で最も高い菌数で付着していた。上皮細胞への付着力の高さが感染性の強さの一要因となっていたことが示された。

今後は、付着や定着に重要な働きをするとされるバイオフィルム産生能の比較や、外膜蛋白質の比較を実施して、感染性の強さを明らかにする必要性が示唆された。

E. 結論

家族から分離された遺伝子タイプの異なる *H. pylori* 3 株のうち、子供由来の菌株が、スナネズミへの感染性を有しており、上皮細胞への高い付着性を示した。これらの結果は、親子感染と比べて同胞間感染が優位であった要因のひとつと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Osaki T, Konno M, Yonezawa H, Hojo F, Takahashi M, Fujiwara S, Zaman C, Kamiya S. Analysis of intra-familial transmission of *Helicobacter pylori* in Japanese families. **J Med Microbiol.** 64:67-73, 2015
- Kurata S, Nakashima T, Osaki T, Uematsu N, Shibamori M, Sakurai K, Kamiya S. Rebamipide protects small intestinal mucosal injuries caused by indomethacin by modulating intestinal microbiota and the gene expression in intestinal mucosa in a rat model. **J Clin Biochem Nutr.** 56(1), 20-27, 2015
- Okuda M, Osaki T, Lin Y, Yonezawa H, Maekawa K, Kamiya S, Fukuda

- Y, Kikuchi S. Low prevalence and incidence of *Helicobacter pylori* infection in children: a population-based study in Japan. **Helicobacter**. doi: 10.1111/hel.12184, 2015
4. Okuda M, Osaki T, Kikuchi S, Ueda J, Lin Y, Yonezawa H, Maekawa K, Hojo F, Yagyu K, Kamiya S, Fukuda Y. Evaluation of a stool antigen test using a monoclonal antibody for native catalase for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children and adults. **J Med Microbiol**. 63: 1621-1625, 2014
 5. Usui M, Nanbu Y, Oka K, Takahashi M, Inamatsu T, Asai T, Kamiya S, Tamura Y. Genetic relatedness between Japanese and European isolates of *Clostridium difficile* originating from piglets and their risk associated with human health. **Front Microbiol**. Doi:10.3389/fmicb.2014.00513. eCollection PMID:25339943, 2014
 6. Inoue SI, Niikura M, Inoue M, Mineo S, Kawakami Y, Uchida A, Ohnishi H, Kamiya S, Watanabe T, Kobayashi F. The protective effect of CD40 ligand-CD40 signaling is limited during the early phase of *Plasmodium* infection. **FEBS Lett**, 588(13), 2147-2153, 2014
 7. Aiso T, Kamiya S, Yonezawa H, Gamou S. Overexpression of an antisense RNA, ArrS, increases the acid resistance of *Escherichia coli*. **Microbiology**, 160(5), 954-961, 2014
 8. Zaman C, Osaki T, Yonezawa H, Hanawa T, Kurata S, Kamiya S. Analysis for microbial ecology between *Helicobacter pylori* and gastric microbiota of Mongolian gerbil. **J Med Microbiol**. 63: 129-137, 2014
 9. Kurata S, Osaki T, Yonezawa H, Arae K, Taguchi H & Kamiya S. Role of IL-17A and IL-10 in the antigen induced inflammation model by *Mycoplasma pneumoniae*. **BMS Microbiol**. 14, 156, 2014
 10. Matsui H, Takahashi T, Murayama SY, Uchiyama I, Yamaguchi K, Shigenobu S, Matsumoto T, Kawakubo M, Horiuchi K, Ota H, Osaki T, Kamiya S, Smet A, Flahou B, Ducatelle R, Haesebrouck F, Takahashi S, Nakamura S, Nakamura M. Development of new PCR primers by comparative genomics for the detection of *Helicobacter suis* in gastric biopsy specimens. **Helicobacter**.;19(4):260-71, 2014
 11. 大崎敬子、神谷 茂 *H. pylori*感染症の疫学、感染経路、臨床と微生物、42(2), 17-22, 2015.
 12. 今野武津子、横田伸一、高橋美智子、藤原伸一、大崎敬子、神谷 茂.日本人小児の最近のピロリ菌感染率と感染経路について. *ヘリコバクター学会誌*、15(2)、68-74, 2014
 13. 岡 健太郎、神谷 茂、腸内フローラと健康・疾病とのかかわり、腸管感染症、臨床と微生物、41(2)、137-141、2014
 14. 神谷 茂、*Clostridium difficile*:病原性と疫学、感染症内科、2(4) 、410 - 417、2014
 15. 神谷 茂、腸内細菌叢（フローラ）研究の進歩と臨床への応用、診断と治療、102(7) 、1069-1074、2014
 16. 神谷 茂、蔵田 訓、田口晴彦、医学領域における肺炎マイコプラズマ感染症の基礎と臨床、家畜診療、61(6) 、331-338、2014
 17. 神谷 茂、大崎敬子、腸内細菌研究の基礎分野における近年の進歩 腸内細菌の解析方法、代謝 医学のあゆみ、251(1) 、5-11、2014
 18. 神谷 茂、嫌気性菌 破傷風菌、微生物検査イエローページ、臨床検査、58(11) 、1394-1396、2014
 19. 神谷 茂、嫌気性菌 バクテロイデス、微生物検査イエローページ、臨床検査、58(11) 、1397-1400、2014
- 学会発表**
1. Hideo Yonezawa, Takako Osaki,

- Shigeru Kamiya “Susceptibility of amoxicillin and metronidazole to *Helicobacter pylori* biofilm”, **European Helicobacter Study Group XXVIIth International Workshop**, Rome, Italy, Sept. 11~13, 2014.
2. Shigeru Kamiya, Cynthia Zaman, Hideo Yonezawa, Fuhito Hojo, Takako Osaki “Microbial-ecological study on colonization of human *H. pylori* isolates from father, mother and 3 children of a family in gastric mucosa of Mongolian gerbil”, **European Helicobacter Study Group XXVIIth International Workshop**, Rome, Italy, Sept. 11~13, 2014.
 3. Fuhito Hojo, Takako Osaki, Hideo Yonezawa, Satoshi Kurata, Tomoko Hanawa, Hiroyuki Yamaguchi, Shigeru Kamiya, “Survival strategy of *Helicobacter pylori* in environments by co-existence in *Acanthamoeba castellanii*”, **European Helicobacter Study Group XXVIIth International Workshop**, Rome, Italy, Sept. 11~13, 2014.
 4. Takako Osaki, Cynthia Zaman, Fuhito Hojo, Hideo Yonezawa, Satoshi Kurata, Tomoko Hanawa and Shigeru Kamiya . Comparative study on infectivity and adhesion among *Helicobacter pylori* strains isolated from family members, **The XVIII International Symposium on Gnotobiology**, St. Petersburg, Russia, Sept. 22-25, 2014
 5. 大崎敬子、蔵田 訓、神谷 茂. 家族由来 *Helicobacter pylori* 菌株の動物感染性の比較、**第 88 回日本感染症学会**、2014 年 6 月 18 日~20 日、福岡
 6. 米澤英雄、大崎敬子、花輪智子、蔵田訓、神谷 茂、*Helicobacter pylori* バイオフィーム形成が及ぼすアモキシシリン、メトロニダゾールへの抵抗性への影響、第 28 回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会 平成 26 年 7 月 9 日 東京
 7. シンシア ザマン、大崎敬子、今野武津子、米澤英雄、神谷 茂. The comparison of animal infectivity among strains isolated from family members、**第 20 回日本ヘリコバクター学会**、2014 年 6 月 28 - 29 日、東京
 8. 大崎敬子、シンシア ザマン、北条史、米澤英雄、神谷 茂. 鉄制限スナネズミにおける *Helicobacter pylori* 感染の宿主鉄保有状況に対する効果、**第 20 回日本ヘリコバクター学会**、2014 年 6 月 28 - 29 日、東京
 9. 米澤英雄、神谷 茂. *Helicobacter pylori* のバイオフィーム形成と抗菌薬抵抗性、**第 17 回臨床腸内微生物学会**、2014 年 10 月 4 日、東京、シンポジウム発表
 10. シンシア ザマン、大崎敬子、神谷 茂. 家族由来 *Helicobacter pylori* 菌株の遺伝子型別とスナネズミ感染性の比較、**第 17 回臨床腸内微生物学会**、2014 年 10 月 4 日、東京
 11. 大崎敬子、北条史、米澤英雄、蔵田訓、シンシア ザマン、花輪智子、神谷 茂、*Helicobacter pylori* infected Mongolian gerbils in iron-restricted female Mongolian gerbils. **87 回日本細菌学会総会**、東京、平成 26 年 3 月 26-28 日.
 12. Hojo F, Osaki T, Yonezawa H, Hanawa T, Kurata S, Yamaguchi H, Kamiya S: Transcriptome analysis of *Helicobacter pylori* in co culture with *Acanthamoeba castellanii*. 第 12 回韓日合同 *H. pylori* カンファレンス, 韓国, 平成 27 年 3 月 21 日
 13. 北条史、大崎敬子、米澤英雄、花輪智子、蔵田訓、山口博之、神谷 茂 . *Helicobacter pylori* の *Acanthamoeba castellanii* 共培養系における生存性の向上とトランスクリプトーム解析。第 88 回日本細菌学会総会、岐阜、平成 27 年 3 月 28-29 日
 14. 大崎敬子、ザマンシンシア、北条 史、米澤英雄、蔵田 訓、花輪智子、神谷 茂. Metagenomic study for gastric microbiota of chronic gastritis patients with or without *Helicobacter pylori* infection. 第 88

回日本細菌学会総会、岐阜、平成 27
年 3 月 28-29 日

15. 米澤英雄、大崎敬子、花輪智子、蔵田
訓、北条 史、Zaman Cynthia、神
谷 茂、*Helicobacter pylori* 外膜タ
ンパク AlpB のバイオフィルム形成へ
の関与、第 88 回日本細菌学会総会、
岐阜、平成 27 年 3 月 28-29 日

図書

1. 神谷 茂. 微鏡と染色、神谷 茂、
高橋秀実、林 英生、俣野哲朗監訳、
ブラック微生物学第 3 版(原書 8 版)、
50-73、丸善出版、東京、2014
2. 神谷 茂. はじめに、腸内フローラ
と加齢、神谷 茂編、腸内フローラシ
ンポジウム 22、1-4、医薬出版、東京、
2014

H . 知的財産権の出願・登録状況

なし

図書

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

取得状況(計 0 件)

名称:

〔その他〕

ホームページ等

該当なし.