The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Campylobacter hyointestinalisが産生する新規細胞膨化致死毒素（CDT）の性状解析とcdt遺伝子を標的としたCampylobacter属細菌の検出法の開発
Author(s)	亀井, 数正
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56174
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　亀　井　　数　正　　）	
論文題名	*Campylobacter hyointestinalis* が産生する新規細胞膨化致死毒素（CDT）の性状解析と *cdt* 遺伝子を標的とした *Campylobacter* 属細菌の検出法の開発

論文内容の要旨　2500 文字以内　9pt MS 明朝体

カンピロバクター属菌（*Campylobacter* spp.）は 25 菌種で構成され、ヒトに下痢、発熱、腹痛等を引き起こす細菌として認知されている。本邦におけるカンピロバクターによる食中毒は、細菌性食中毒の中で最も発生件数が多い。*Campylobacter jejuni* と *C. coli* の 2 菌種は食中毒細菌に指定されているが、少なくとも 17 菌種がヒトに病原性を示す可能性がある。それゆえ、カンピロバクター感染症の実態を正確に把握し、早期に適切な対策を講ずることが求められている。

カンピロバクターの検査は、培養法が基本である。他の細菌の増殖を抑えるため、培養には抗菌薬を含んだ選択培地が必要となるが、これらは主に *C. jejuni*、*C. coli* を対象に開発されてきた。しかし、カンピロバクターは菌種によって抗菌薬感受性、発育速度・条件が大きく異なるため、現行の方法では *C. jejuni*、*C. coli* 以外の菌種の存在を見逃している可能性がある。したがって、検体を培養することなくカンピロバクターを迅速、かつ簡便に検出できる検査法の開発が重要と考えられる。

カンピロバクターが産生する毒素として様々なものが報告されているが、現在までに精製され、その実態が明らかにされている毒素は細胞膨化毒素（Cytolethal distending toxin; CDT）のみである。CDT は 24～48 時間後に標的細胞を膨化させ、96～120 時間後に致死させるというユニークな作用機序をもつ。CDT は CdtA、CdtB、CdtC の 3 つのサブユニットから構成され、それぞれ *cdtA*、*cdtB*、*cdtC* 遺伝子にコードされている。我々は *cdt* 遺伝子が 3 菌種のカンピロバクター（*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus*）に菌種特異的かつ普遍的に存在することを見出し、*cdt* 遺伝子に基づく遺伝子検査法が 3 菌種の同定に有用であることを報告した。本研究では、これら 3 菌種以外のカンピロバクターも検出できるシステムを構築するため、*cdt* 遺伝子がカンピロバクター属全般に保存されている可能性を検証し、*cdt* 遺伝子を利用した遺伝子検査法の開発を目指した。

C. jejuni、*C. coli*、*C. fetus* の *cdtB* 遺伝子配列を比較したところ、3 菌種間で保存性の高い領域を数ヶ所同定し、これら *cdtB* 遺伝子を一度に増幅できるプライマー（コモンプライマー）を設計した。これらの領域は他菌種の *cdt* 遺伝子内にも保存されている可能性があると考え、コモンプライマーを用いて *cdt* 遺伝子の増幅を試み、*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus* 以外のカンピロバクターにも *cdt* 遺伝子が普遍的に存在する可能性を検証した。その結果、ヒトや動物の病気に関与するカンピロバクターである *C. hyointestinalis*、*C. lari*、*C. helveticus*、*C. upsaliensis* 内にも *cdt* 遺伝子が菌種特異的かつ普遍的に存在することを見出し、*cdt* 遺伝子はこれら 7 菌種（*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus*、*C. hyointestinalis*、*C. lari*、*C. helveticus*、*C. upsaliensis*）の標的遺伝子として有用であると考えられた。そこでこれら 7 菌種の *cdtB* 遺伝子を標的とした PCR-restriction fragment length polymorphisms（PCR-RFLP）法を構築し、分離菌株 277 株を用いて感度と特異性を評価した。*C. hyointestinalis* の感度（88%）は若干低かったものの、他菌種に対する感度、及び特異性は 100%であった。本 PCR-RFLP 法を下痢症患者便検体とウシ胆汁検体に適用したところ、検体から直接、カンピロバクターを検出でき、*C. jejuni*、*C. coli*、もしくは *C. fetus* と同定された。これらの結果は、培養法の結果とほぼ一致し、本 PCR-RFLP 法は迅速、簡便な検査法として有用であることが示された。

構築した PCR-RFLP 法において、PCR の段階で *cdt* 遺伝子を増幅できなかった 3 株の *C. hyointestinalis* が *cdt* 遺伝子を保有する可能性を検証した。我々は *C. hyointestinalis* Ch022 株の *cdt* 遺伝子の全塩基

配列を決定していたが、コロニーハイブリダイゼーション法の結果より、3 株の PCR 陰性株が Ch022 株型の *cdt* 遺伝子と相同性のある遺伝子を保有していないと考えられた。一方、これら 3 株の菌体破砕液を HeLa 細胞に添加したところ、細胞膨化や死細胞が観察され、CDT 活性のある物質を産生していると考えられた。これらの結果より、3 株の PCR 陰性株には Ch022 株型の *cdt* 遺伝子と配列が大きく異なる新規の *cdt* 遺伝子が存在する可能性がある。そこで PCR 陰性株の 1 つである *C. hyointestinalis* ATCC 32517 株から *cdt* 遺伝子のクローニングを試みた結果、ゲノム上にタンデムに並んだ 3 つの遺伝子を見出した。この 3 つの遺伝子は、それぞれ既知の *cdtA* 遺伝子、*cdtB* 遺伝子、*cdtC* 遺伝子と相同性が認められた。また、3 つの遺伝子を同時に発現ベクターに組み込み、大腸菌でリコンビナント蛋白として発現させ、その生物活性を評価したところ、HeLa 細胞を膨化させ、細胞死を誘導する等、CDT 活性が認められた。新たに見出した遺伝子クラスターは *cdt* 遺伝子ファミリーの一つと考えられる。また、これらの推定アミノ酸配列は、それぞれ Ch022 株型の CdtA サブユニットと 25.0%、CdtB サブユニットと 56.0%、CdtC サブユニットと 24.8%と同一菌種で見出されたにも関わらず非常に低い相同性を示した。それゆえ、Ch022 株に最初に見出された *cdt* 遺伝子を *chcdt-I* 遺伝子、今回新たに同定した ATCC 35217 株に見出した *cdt* 遺伝子を *chcdt-II* 遺伝子と名付け、新規 *cdt* 遺伝子を見出すことに成功した。

C. hyointestinalis における *cdt* 遺伝子の保有状況をコロニーハイブリダイゼーション法により評価したところ、*chcdt-I* 遺伝子は 88%（21 株/24 株）、*chcdt-II* 遺伝子は 100%（24 株/24 株）の保有率であった。*chcdt-II* 遺伝子は *C. hyointestinalis* 内で普遍的に存在する可能性があり、*C. hyointestinalis* に対する遺伝子検査法を開発する上で、*chcdt-I* 遺伝子よりも *chcdt-II* 遺伝子の方が良い標的になると考えられる。また、大部分の *C. hyointestinalis* が 2 種類の *cdt* 遺伝子を保有することも明らかとなり、*C. hyointestinalis* が病原性を発揮する上で複数の *cdt* 遺伝子を保有する意義について興味が持たれる。

C. hyointestinalis に関しては *chcdt-II* 遺伝子を標的とし、新たな遺伝子検査法の開発を試みた。下痢症患者から分離報告のある主要な 6 菌種のカンピロバクター（*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus*、*C. hyointestinalis*、*C. lari*、*C. upsaliensis*）に焦点を絞り、*cdtB* 遺伝子を標的とした Multiplex PCR 法を構築した。分離菌株 177 株を用いた検討の結果、本 Multiplex PCR 法の感度、特異性とも 100%であった。また、混合感染を想定した 6 菌種を同時に混合させた検体でも、本 Multiplex PCR 法は、それぞれの菌種特異的な *cdtB* 遺伝子を増幅した。今後、患者、動物検体から直接、カンピロバクターを検出できるかどうかを評価する必要があるが、本 Multiplex PCR 法が特異性、感度に非常に優れた方法論になりうることが示唆された。

以上、カンピロバクターの *cdt* 遺伝子に着目し、下痢症患者及び動物から分離報告のある主なカンピロバクターを検出・同定可能な方法論を確立した。構築した方法は、分離株の菌種同定に役立つだけでなく、食品サンプルや患者便検体のスクリーニングへの適用が期待される。従来の検査法とは異なり、*C. jejuni*、*C. coli* を対象とした選択性の高い培養を行う前に、カンピロバクターを検出、同定できれば、*C. jejuni*、*C. coli* に偏ることなく、カンピロバクター感染症の実態を把握することができ、人々の食の安全性確保に貢献できることを期待する。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　亀井　数正　）			
		（職）	氏　名
論文審査担当者	主 査	教授	中川　晋作
	副 査	教授	八木　清仁
	副 査	教授	土井　健史
	副 査	教授	平田　收正

論文審査の結果の要旨

カンピロバクター属菌（*Campylobacter* spp.）は現在25菌種存在するが、胃腸炎や敗血症等ヒトに病気を引き起こす可能性があるのは少なくとも17菌種ある。なかでも、*C. jejuni*と*C. coli*は食中毒細菌に指定され、本邦における細菌性食中毒の中で最も発生件数が多い病因物質である。細菌感染症の検査の基本は培養法であるが、カンピロバクターの場合*C. jejuni*と*C. coli*を標的とした選択培地が用いられるため、*C. jejuni* /*C. coli*以外の菌種が見逃されている可能性がある。すなわち、カンピロバクター属菌は菌種によって薬剤感受性や培養条件が大きく異なるため全てに適用できる培養法は存在しない。それゆえ、*C. jejuni*/*C. coli*以外を含めカンピロバクター感染症の実態を正確に把握する為には、培養に依存せずカンピロバクター属菌の菌種を特異的に検出できる方法の開発が必要である。カンピロバクターの病原因子として様々なものが報告されているが、その実態が明らかにされているものの1つとして細胞膨化致死毒素(Cytolethal distending toxin; CDT) がある。CDTはCdtA、CdtB、CdtCの3つのサブユニットから構成され、それぞれ*cdtA*、*cdtB*、*cdtC*遺伝子にコードされている。この*cdt*遺伝子が特定のカンピロバクター属菌に菌種特異的かつ普遍的に保存されている可能性があることから、*cdt*遺伝子を標的とした菌種特異的なカンピロバクターの検査法が開発できる可能性がある。本研究では、この*cdt*遺伝子に焦点を絞り、カンピロバクター感染症の実体を正確に把握する上で有益な検査ツールとしての遺伝子検査法を開発すると共に、新規*cdt*遺伝子の同定を試み、以下の結論を得た。

1. *cdtB*遺伝子を標的とすることで、ヒトや動物の病気に関するカンピロバクターのうち、7菌種を検出・同定できるPCR-RFLP法を構築した。*C. hyointestinalis*に対する感度は若干低かったものの(88%)、他の6菌種に対する感度、及び7菌種に対する特異性はともに100%であった。
2. *C. hyointestinalis*から新規*cdt*遺伝子バリアント（*chcdt-II*）を発見し、*C. hyointestinalis*には少なくとも2種類の*cdt*遺伝子が存在することを明らかとした。中でも*chcdt-II*遺伝子は*C. hyointestinalis*内に普遍的かつ特異的に存在する遺伝子である可能性を示した。
3. ChCDT-IIも他のCDTと同様に哺乳類の培養細胞に対して、細胞周期のG_2/M期での停止を引き起こし、細胞膨化と細胞死を誘導することを明らかとした。
4. ヒトの胃腸炎の起因菌として重要視されている主要な6菌種のカンピロバクターを検出・同定できるMultiplex PCRを構築した。*C. hyointestinalis*に関しては*chcdt-II*遺伝子を標的することで、特異性・感度共に100%の方法論を確立した。

以上、本研究ではカンピロバクターの*cdt*遺伝子に着目し、ヒトや動物に病気を引き起こす可能性のあるカンピロバクターの複数菌種を一度のPCRで検出・同定可能な遺伝子検査を確立した。構築した方法は分離株の菌種同定に役立つだけでなく、食品サンプルや患者便検体のスクリーニングへの適用が期待される。さらには、従来の検査法とは異なり*C. jejuni*/*C. coli*を対象とした選択性の高い培養を行う前に、カンピロバクター属菌を菌種レベルで検出することで、*C. jejuni*/*C. coli*に偏ることなくカンピロバクター感染症の実態を把握することができ、食の安全性確保のみならず適切な治療法の選択に役立つことが期待される。以上の理由から、本研究内容は博士(薬学)の学位を授与するにふさわしいものと考える。