



Title	Campylobacter hyoilealis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	<a href="https://doi.org/10.18910/56174">https://doi.org/10.18910/56174</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

*Campylobacter hyoilealis*が產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

2015 年 薬剤学分野

亀井 数正

## 目 次

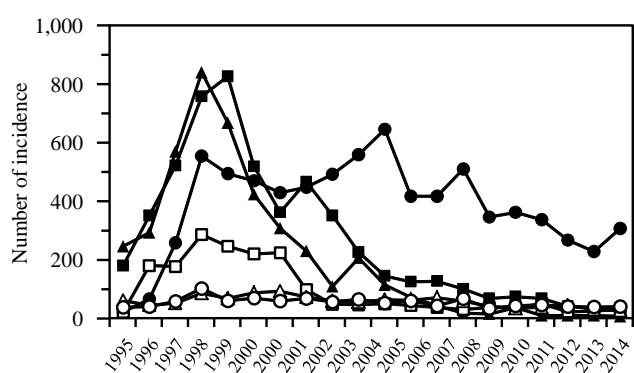
緒論	1
本論	7
第一章 カンピロバクターが保有する <i>cdt</i> 遺伝子の分布と <i>cdtB</i> 遺伝子を標的としたカンピロバクターの遺伝子検査法の開発	7
第一節 10 菌種のカンピロバクターに <i>cdt</i> 遺伝子が普遍的に保存されている可能性の評価	7
第二節 7 菌種のカンピロバクターを標的とした菌種同定法の開発	16
第三節 <i>cdtB</i> 遺伝子を標的とした PCR-RFLP 法の下痢症患者便検体、及びウシ胆汁検体への適用	22
第四節 小括	28
第二章 <i>C. hyointestinalis</i> が保有する新規 <i>cdt</i> 遺伝子 ( <i>chcdt-II</i> 遺伝子) の発見とその機能解析	30
第一節 <i>cdtB</i> 遺伝子が検出されなかった <i>C. hyointestinalis</i> が <i>cdt</i> 遺伝子を保有する可能性	30
第二節 <i>C. hyointestinalis</i> が有する新規 <i>cdt</i> 遺伝子 ( <i>chcdt-II</i> 遺伝子) の発見と塩基配列の決定	39
第三節 <i>C. hyointestinalis</i> が産生する ChCDT-II の活性評価	48
第四節 小括	56
第三章 カンピロバクター 6 菌種の高感度な菌種同定法の開発	58
総括	62
結論	66
謝辞	67
引用文献	68

## 緒 論

カンピロバクター属菌 (*Campylobacter* spp.) はらせん状のグラム陰性菌であり、ヒトに下痢を引き起こす食中毒細菌として認知されている (1)。カンピロバクターは鶏をはじめとする家禽や野生動物等の腸管内に生息しており (Table 1) (1)、本菌に汚染された食品、飲料水の摂取や動物との接触によってヒトに感染する恐れがある (2-5)。したがってカンピロバクター感染症は、人獣共通感染症 (Zoonosis) として公衆衛生上重要なテーマの 1 つになっている。平成 26 年度の厚生労働省の統計では、細菌性食中毒の発生件数は 440 件であり、そのうちカンピロバクター食中毒は 306 件 (70%) にも上った (Fig. 1) (6)。カンピロバクターは食中毒だけではなく、稀に敗血症、髄膜炎、ギランバレー症候群 (Guillain-Barré syndrome: GBS) 等を引き起こすことも報告されている (1, 7, 8)。それゆえ、カンピロバクター感染症と迅速に診断し、早期に適切な治療を開始することが求められている。

現在、カンピロバクター属菌は 25 菌種で構成されており、少なくとも Table 1 に示す 17 菌種はヒトに病原性を示す可能性がある (1, 9)。下痢症患者から分離される菌種の 90% 以上は *Campylobacter jejuni* と *C. coli* の 2 菌種であり (10, 11)、本邦ではこの 2 菌種が食中毒細菌に指定されている。横山らは 2000 年から 2004 年までの東京都立病院において、下痢症患者から分離されたカンピロバクターの 93.4% は *C. jejuni*、4.0% は *C. coli*、次いで 1.3% は *C. fetus* であったと報告している (11)。

*C. fetus* はウシやヒツジに流産を引き起こすことが知られていたが、ヒトには敗血症や髄膜炎等の重篤な合併症を引き起こす (1, 12)。これら 3 菌種は獣医学領域では家畜に流産を引き起こす細菌として古くから認知されてきた。



**Fig. 1. The number of incidence of food poisoning caused by bacteria between 1995 and 2014 in Japan.**  
■, *Salmonella* spp.; ▲, *Vibrio parahaemolyticus*; ●, *Campylobacter jejuni/coli*; □, *Escherichia coli*; △, *Staphylococcus* spp.; ○, Other bacteria.

**Table 1. The diverse niches colonized by and human diseases caused by *Campylobacter* spp. (Ref. 1).**

<i>Campylobacter</i> spp.	Source	Human disease
<i>C. coli</i>	Human, cattle, chicken, dog, duck, goat, monkey, pig, seagull, sheep, turkey	Gastroenteritis, acute cholecystitis, bacteremia, meningitis, spontaneous abortion
<i>C. concisus</i>	Human, cat, dog	Gastroenteritis, IBD, Barret esophagitis, brain abscess, reactive arthritis, rheumatoid arthritis, undifferentiated arthritis
<i>C. curvus</i>	Human, dog	Gastroenteritis, ulcerative colitis, liver abscess, Barrett esophagitis, bacteremia, bronchial abscess
<i>C. fetus</i>	Human, cattle, horse, kangaroo, turtle, sheep	Gastroenteritis, abscess, meningitis, bacteremia, cellulitis, endocarditis, septic abortion, vertebral osteomyelitis
<i>C. gracilis</i>	Human, dog	Crohn's disease, ulcerative colitis, periodontitis, head and neck infection, brain abscess
<i>C. hominis</i>	Human	Crohn's disease, ulcerative colitis, bacteremia
<i>C. helveticus</i>	Human, cat, dog	Diarrhea
<i>C. hyoilectinalis</i>	Human, cattle, dog, hamster, deer, pig, sheep	Diarrhea, fetal septicemia
<i>C. insulaenigrae</i>	Human, seal, porpoise, sea lion	Gastroenteritis, abdominal pain, diarrhea and vomiting, septicemia
<i>C. jejuni</i>	Human, cattle, chicken, dog, duck, goat, monkey, elephant seal, sheep	Gastroenteritis, IBD, acute cholecystitis, celiac disease, Guillain-Barre syndrome, reactive arthritis, Miller-Fisher syndrome, bacteremia, sepsis, meningitis, urinary tract infection, hemolytic uremic syndrome
<i>C. lari</i>	Human, cattle, chicken, dog, duck, foal, horse, owl, elephant seal, monkey, sheep, wild bird, seagull, cockle, gull, oyster, mussel, scallop, seawater	Gastroenteritis, recurrent pacemaker infection, bacteremia
<i>C. mucosalis</i>	Human, dog	Gastroenteritis
<i>C. rectus</i>	Human, dog	Gastroenteritis, Crohn's disease, ulcerative colitis, a periodontal pathogen, necrotizing soft issue infection, empyema thoracis
<i>C. showae</i>	Human, dog	Crohn's disease, ulcerative colitis, intraorbital abscess
<i>C. sputorum</i>	Human, cattle, dog, pig, sheep	Gastroenteritis, axillary abscess, bacteremia
<i>C. upsaliensis</i>	Human, cat, dog	Gastroenteritis, breast abscess, bacteremia, spontaneous abortion
<i>C. ureolyticus</i>	Human, horse	Gastroenteritis, Crohn's disease, ulcerative colitis, oral and perianal abscesses, soft tissue abscesses, ulcer or gangrenous lesions of the lower limb, reactive arthritis, rheumatoid arthritis, undifferentiated arthritis

本邦にはカンピロバクターに関する食品の規格基準がなく、公定法に相当する検査法はない。多くの場合、1) 検体を選択培地に塗布し、2) 酸素濃度が 3-15%程度の微好気条件下で 2-3 日分離培養した後、3) 得られたコロニーを純培養し、4) その生化学性状等を調べる方法に基づく (13)。菌数が少ないことが予測される検体の場合、分離培養の前に 1-2 日間の増菌培養を行う。このような培養に基づく検査法は操作が非常に煩雑である上、微好気条件を生みだせる特殊な培養装置が必要である。また、菌種間で生化学的性状が類似しているため、菌種の誤同定がしばしば問題となる。カンピロバクターは増殖が遅く、最終的にカンピロバクターを分離、同定するまでには 7-10 日という長い時間を要する。他の菌の増殖を抑えるため、抗菌薬を含んだ選択培地を使用することが多いが、これらは主に食中毒細菌に指定されている 2 菌種 (*C. jejuni*、*C. coli*) を対象に開発されてきた (13)。カンピロバクターは菌種によって薬剤感受性が異なるため (9)、これら 2 菌種 (*C. jejuni*、*C. coli*) 以外のカンピロバクターの増殖が抑えられてしまう可能性がある (1、14)。また、カンピロバクターの多くは微好気性菌であるが、水素ガスを要求する菌やより高い嫌気性条件下でしか増殖できない菌も存在し、至適発育温度域も菌種によって異なる (14)。それゆえ、1 種類の培養法で全てのカンピロバクターを分離培養することは困難であり、どうしてもいずれかの菌種に焦点を当てた培養方法を選ばざるを得ない。このような状況の下、一般に用いられる培養法は *C. jejuni* と *C. coli* を対象としており、これら 2 菌種以外のカンピロバクターの存在を見逃している可能性が指摘されている (14)。

カンピロバクターは両端もしくは一端に無鞘の鞭毛をもち、活発に旋回運動をする。Lastovica らはカンピロバクターの高い運動性に着目し、抗菌薬を用いないカンピロバクターの分離培養法 (ケープタウンプロトコール) を考案した。すなわち、メンブレンフィルターをのせた抗菌薬無添加の液体寒天培地に検体を添加し、メンブレンフィルターを通過できた菌のみを 37°C、水素濃度の高い微好気条件で培養する方法であり、下痢症患者から *C. jejuni*、*C. coli* 以外のカンピロバクターを高頻度で分離できることを報告した。1990 年から 2005 年までの Red Cross Children's Hospital (南ア

フリカ)においてケープタウンプロトコールを用いて下痢症患者から分離されたカンピロバクター様細菌うち、*C. jejuni*、*C. coli*以外の菌種の割合は57.2%であり、主に*C. concisus*、*C. upsaliensis*、*C. hyoilealis*、*C. fetus*、*C. lari*等が分離された (Table 2) (9)。カナダやアイルランド等でも同様の報告がある (15-18)。これらの菌種は、伴侶動物、家畜、野生動物等の腸管に分布しており (Table 1)、ヒトへ感染する機会は *C. jejuni* と *C. coli* と同様に高いと考えられる。しかし、これら菌種の分離報告例はあまり多くないため、病原性、及びヒトの疾患への関与については不明な点が多い。今後、*C. jejuni*、*C. coli*以外の菌種の存在も考慮に入れて、カンピロバクター感染症の実態を明らかにすることが求められる。

著者は、遺伝子検査法を用いて検体から直接、カンピロバクターを菌種特異的に検出できれば、*C. jejuni* と *C. coli* の 2 菌種に偏ることなくカンピロバクター感染症の実態をより正確に把握できるものと考えた。さらに、培養を行う前に検体に存在する菌種を同定することで適切な培養法を選択することができ、手間やコストが省けるだけではなく、カンピロバクターの分離率向上が期待できる。そのためには、迅速にカンピロバクターを検出、同定可能な遺伝子検査法の開発が必要不可欠である。

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なっている毒素は細胞膨化毒素 (CDT: Cytolethal distending toxin) のみである (19)。CDT は CdtA、CdtB 及び CdtC の 3 つのサブユニットからなるホロ毒素であり、それぞれ *cdtA*、*cdtB*、及び *cdtC* と呼ばれる 3 つの連続した遺伝子にコードされる (20)。CdtA と CdtC が標的細胞の受容体と結合し、毒素活性本態である CdtB を細胞内

へ送り込む。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 G<sub>2</sub>/M 期で停止させる。CDT を作用させた細胞は 24-48 時間後に膨化し、96-120 時間後に致死することが報告されている (20)。現在、*in vivo* における CDT の担う役割について研究が進められており、CDT はカンピロバクターの腸管定着性、細胞内侵入性、さらには宿主免疫システムからの回避に関与する可能性が示唆されている (5, 21, 22)。

CDT は大腸菌 (*Escherichia coli*)、赤痢菌 (*Shigella*)、ヘリコバクター属菌 (*Helicobacter* spp.) 等さまざまなグラム陰性菌が産生する (19, 23)。また、カンピロバクター属菌の中でも、食中毒細菌に指定されている *C. jejuni* と *C. coli*、まれに食中毒患者から分離され、敗血症の原因となる *C. fetus* が CDT を産生することが報告されていた (24, 25)。著者の研究グループは、これら 3 菌種内に *cdt* 遺伝子が普遍的に保有されていると共に、その配列に菌種特異性があることを見出し (25)、*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 (26-28)。上述したとおり、*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus* 以外のカンピロバクターもヒトに病原性を示す可能性があり (Table 1)、これら 3 菌種以外のカンピロバクターも特異的に検出できる遺伝子検査法の開発が求められている。そこで著者は、*cdt* 遺伝子が *C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus* の 3 菌種のみならず、*cdt* 遺伝子を保有するカンピロバクター属菌全般に菌種特異的かつ普遍的に保存されているのであれば、遺伝子検査法の標的遺伝子として非常に有用であると考えた。第一章では、ヒトや動物に対して疾病を引き起こす可能性のあるカンピロバクターのうち (Table 1)、10 菌種が *cdt* 遺伝子を普遍的に保有する可能性を検証し、*cdt* 遺伝子を保有するカンピロバクターを同定可能な PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphisms) 法を開発した。第二章では、カンピロバクター属に属する *C. hyoilealis* から既知の *cdt* 遺伝子と異なる *cdt* 遺伝子 (*chcdt-II* 遺伝子) を見出し、新規 *cdt* 遺伝子のクローニングと新規 CDT に関する性状解析を行った。第三章では、第二章で得られた情報を元に、ヒトの下痢症患者から分離報告例のある主要な 6 菌種のカンピロバクター (*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus*、*C. hyoilealis*、*C. lari*、*C. upsaliensis*) を菌種特異的に同定可能な Multiplex

PCR 法の開発を行った。

本研究成果は、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を提供すると共に、新規 *cdt* 遺伝子を同定することに成功し、カンピロバクターの病原機構を解明する上で有益な情報を提供し得るものと考え、ここに学位論文としてまとめた次第である。

## 本 論

### 第一章 カンピロバクターが保有する *cdt* 遺伝子の分布と *cdtB* 遺伝子を標的としたカンピロバクターの遺伝子検査法の開発

1987 年、Johnson と Lior は細胞膨化致死毒素 (CDT) という新規毒素を下痢症患者から分離された大腸菌で見出し (29)、さらに翌年カンピロバクター属に属する *Campylobacter jejuni* も CDT を産生することを報告した (24)。1994 年、米国の 2 つのグループによって異なる血清型の大腸菌から 2 つの異なる CDT をコードする遺伝子がクローニングされ (30, 31)、1997 年には *C. jejuni* の *cdt* 遺伝子の全塩基配列が決定された (32)。著者の研究グループはカンピロバクター属に属する *C. coli*、*C. fetus* の *cdt* 遺伝子配列を決定し、*C. jejuni* の *cdt* 遺伝子配列と比較解析した (25)。その結果、これら 3 菌種間で保存されている領域を *cdtB* 遺伝子内に見出し、*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus* の 3 菌種の *cdtB* 遺伝子を同時に增幅できるプライマー (コモンプライマー) を設計した (25)。著者は同定した領域が他菌種のカンピロバクターの *cdtB* 遺伝子内にも保存されている可能性があり、コモンプライマーを用いることで他菌種の *cdtB* 遺伝子も增幅できる可能性があると考えた。そこで本章では、コモンプライマーを用いて *cdtB* 遺伝子の増幅を試みることで、*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus* 以外のカンピロバクターが *cdt* 遺伝子を保有しているかどうかを調べた。また、*cdtB* 遺伝子を増幅可能であった菌種に対しては、その菌種内の *cdtB* 遺伝子の保有率を調べることで、*cdt* 遺伝子が遺伝子検査法の標的遺伝子として有用である可能性を評価した。さらに得られた知見に基づき、*cdt* 遺伝子を保有するカンピロバクターを簡便、かつ迅速に検出、同定できる遺伝子検査法 (PCR-RFLP 法) を開発し、その有用性を評価した。

#### 第一節 10 菌種のカンピロバクターに *cdt* 遺伝子が普遍的に保存されている可能性の評価

ヒトや動物の病気に関与するカンピロバクターのうち (Table 1)、*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus* 以外の代表的な 7 菌種 (*C. hyoilealis*、*C. lari*、*C. upsaliensis*、*C. helveticus*、*C. concisus*、

*C. hominis*、*C. curvus*) が *cdt* 遺伝子を普遍的に保有する可能性を検証するため、コモンプライマーを用いてこれら 7 菌種から *cdtB* 遺伝子の增幅を試みた。

## 実験材料と方法

### **【使用した菌株と培養条件】**

本節の実験に使用した菌株を Table 3 に示した。コモンプライマーを用いた PCR の予備検討では *C. jejuni* 81-176 株、*C. coli* Co1-243 株、*C. fetus* ATCC 27374 株、*C. hyoilealis* Ch022 株、*C. lari* 298 株、*C. upsaliensis* ATCC 43954 株、*C. helveticus* ATCC 51209 株、*C. concisus* ATCC 33237 株、*C. concisus* ATCC 51562 株、*C. curvus* ATCC 35224 株、*C. hominis* ATCC BAA-381 株、及び陰性コントロールとして *E. coli* C600 株を使用した。*C. concisus*、*C. curvus*、*C. hominis* を除くカンピロバクターは、5%の馬脱纖維血液 (Nippon Bio-Supp. Center) を含む血液寒天培地 (Oxoid) (以下、馬血液寒天培地) を用いて、37°C、水素添加微好気条件 (5% O<sub>2</sub>、7.5% CO<sub>2</sub>、7.5% H<sub>2</sub>、80% N<sub>2</sub>) 下で 2 日以上培養した。*C. concisus*、*C. curvus*、*C. hominis* を培養するため、200 μL の 6% ギ酸ナトリウム/フマル酸水溶液を馬血液寒天培地に添加し、コンラージ棒で広げながら乾燥させた。*C. concisus*、*C. curvus*、*C. hominis* を植菌したギ酸ナトリウム/フマル酸加馬血液寒天培地を 37°C、水素添加嫌気条件 (10% CO<sub>2</sub>、10% H<sub>2</sub>、80% N<sub>2</sub>) 下で 2 日以上培養した。*E. coli* は Luria-Bertani (LB: Becton, Dickinson and Company) 培地を用いて、37°Cで一晩、振とう培養した。

### **【鋳型 DNA の調製】**

寒天培地上に生じた上記菌株由来のコロニーを 200 μL の TE バッファー [10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)] に懸濁した。また、液体培地を用いて培養した菌株は、対数増殖期の菌液 20 μL と TE バッファー 180 μL を混合した。これら菌体懸濁液を 10 分間加熱処理し、遠心分離 (12,800 g、10 分) によって得られた上清を鋳型 DNA とし、PCR に用いた。

### **【コモンプライマーを用いた PCR】**

**Table 3. Bacterial strains used in this study (chapter I-III).**

Species	Strain	Chapter*	Species	Strain	Chapter
<i>Campylobacter jejuni</i>	81-176	I, II, III	<i>C. coli</i>	Co1-124	I, III
<i>C. jejuni</i>	ATCC 33560 <sup>T</sup>	I, III	<i>C. coli</i>	Co1-130	I, III
<i>C. jejuni</i>	43432	I, III	<i>C. coli</i>	Co1-194	I, III
<i>C. jejuni</i>	700819	I, III	<i>C. coli</i>	Co1-245	I, III
<i>C. jejuni</i>	Co2-037	I, III	<i>C. coli</i>	Co2-082	I, III
<i>C. jejuni</i>	Co2-130	I, III	<i>C. coli</i>	Co2-173	I, III
<i>C. jejuni</i>	Co2-146	I, III	<i>C. coli</i>	Co2-218	I, III
<i>C. jejuni</i>	Co2-150	I, III	<i>C. coli</i>	Co3-134	I, III
<i>C. jejuni</i>	Co2-217	I, III	<i>C. coli</i>	WLD4-1	III
<i>C. jejuni</i>	Co3-008	I, III	<i>C. coli</i>	WLD4-6	III
<i>C. jejuni</i>	B01	I	<i>C. coli</i>	WLD4-8	III
<i>C. jejuni</i>	Co1-008	I, III	<i>C. coli</i>	WLD4-4	III
<i>C. jejuni</i>	Co1-119	I, III	<i>C. coli</i>	WLD4-5	III
<i>C. jejuni</i>	Co1-126	I, III	<i>C. coli</i>	WLD4-9	III
<i>C. jejuni</i>	Co2-127	I, III	<i>C. coli</i>	WLD4-3	III
<i>C. jejuni</i>	Co2-128	I, III	<i>C. coli</i>	WLD4-7	III
<i>C. jejuni</i>	Co2-132	I, III	<i>C. coli</i>	WLD4-12	III
<i>C. jejuni</i>	Co2-193	I, III	<i>C. coli</i>	D3-2	III
<i>C. jejuni</i>	Co2-200	I, III	<i>C. coli</i>	D3-3	III
<i>C. jejuni</i>	Co2-214	I, III	<i>C. coli</i>	D3-4	III
<i>C. jejuni</i>	Co3-007	I, III	<i>C. coli</i>	D3-5	III
<i>C. jejuni</i>	Co3-011	I, III	<i>C. coli</i>	D3-6	III
<i>C. jejuni</i>	Co3-012	I, III	<i>C. coli</i>	LW9-9	III
<i>C. jejuni</i>	Co3-024	I, III	<i>C. coli</i>	LW9-3	III
<i>C. jejuni</i>	Co3-036	I, III	<i>C. coli</i>	LW9-7	III
<i>C. jejuni</i>	Co3-072	I, III	<i>C. coli</i>	LW9-1	III
<i>C. jejuni</i>	Co3-078	I, III	<i>C. coli</i>	LW9-2	III
<i>C. jejuni</i>	Co3-082	I, III	<i>C. coli</i>	LW9-4	III
<i>C. jejuni</i>	B86	I, III	<i>Campylobacter fetus</i>	ATCC 27374 <sup>T</sup>	I, II, III
<i>C. jejuni</i>	8214c	I, III	<i>C. fetus</i>	ATCC 19438 <sup>T</sup>	I, III
<i>C. jejuni</i>	8215a	I, III	<i>C. fetus</i>	Co1-099	I, III
<i>C. jejuni</i>	8414c	I, III	<i>C. fetus</i>	Co1-187	I
<i>C. jejuni</i>	9914b	I, III	<i>C. fetus</i>	3-1	I
<i>C. jejuni</i>	10114a	I, III	<i>C. fetus</i>	23-1	I
<i>C. jejuni</i>	10114c	I, III	<i>C. fetus</i>	7914c	I
<i>C. jejuni</i>	B38	III	<i>C. fetus</i>	7915a	I
<i>C. jejuni</i>	B82	III	<i>C. fetus</i>	8013b	I, III
<i>C. jejuni</i>	10014c	III	<i>C. fetus</i>	9813a	I
<i>C. jejuni</i>	8711c	III	<i>C. fetus</i>	2-1	I
<i>C. jejuni</i>	K328	II	<i>C. fetus</i>	7	I, III
<i>Campylobacter coli</i>	Co1-243	I, III	<i>C. fetus</i>	86c	I
<i>C. coli</i>	ATCC 33559 <sup>T</sup>	I, II, III	<i>C. fetus</i>	7915b	I, III
<i>C. coli</i>	ATCC 43478	I, III	<i>C. fetus</i>	8013a	I, III
<i>C. coli</i>	Co1-017	I, III	<i>C. fetus</i>	8013c	I, III
<i>C. coli</i>	Co1-106	I, III	<i>C. fetus</i>	8512a	I
<i>C. coli</i>	Co1-192	I, III	<i>C. fetus</i>	8614c	I, III
<i>C. coli</i>	Co1-247	I, III	<i>C. fetus</i>	8813a	I, III
<i>C. coli</i>	Co2-060	I, III	<i>C. fetus</i>	8813c	I, III
<i>C. coli</i>	Co2-147	I, III	<i>C. fetus</i>	COW055	III
<i>C. coli</i>	Co2-215	I, III	<i>Campylobacter hyoilealis</i>	Ch022	I, II, III
<i>C. coli</i>	Co1-071	I, III			

**Table 3. Continued.**

Species	Strain	Chapter	Species	Strain	Chapter
<i>C. hyointestinalis</i>	ATCC 35217 <sup>T</sup>	I, II, III	<i>C. upsaliensis</i>	99-1	I, III
<i>C. hyointestinalis</i>	SS	I, II, III	<i>C. upsaliensis</i>	101-1	I, III
<i>C. hyointestinalis</i>	1-1	I, II, III	<i>C. upsaliensis</i>	102-1	I, III
<i>C. hyointestinalis</i>	10-1	I, II, III	<i>C. upsaliensis</i>	104-1	I, III
<i>C. hyointestinalis</i>	87-4	I, II, III	<i>C. upsaliensis</i>	115-1	I, III
<i>C. hyointestinalis</i>	84-6	I, II, III	<i>C. upsaliensis</i>	G1104	I, III
<i>C. hyointestinalis</i>	2003	I, II, III	<i>C. upsaliensis</i>	Maririn	I, III
<i>C. hyointestinalis</i>	2030	I, II, III	<i>C. upsaliensis</i>	12-1	I, III
<i>C. hyointestinalis</i>	2032	I, II, III	<i>C. upsaliensis</i>	37-1	I, III
<i>C. hyointestinalis</i>	2033	I, II, III	<i>Campylobacter concisus</i>	ATCC 33237 <sup>T</sup>	I, II, III
<i>C. hyointestinalis</i>	2034	I, II, III	<i>C. concisus</i>	ATCC 51562	I, III
<i>C. hyointestinalis</i>	2035	I, II, III	<i>Campylobacter curvus</i>	ATCC 35224 <sup>T</sup>	I, II, III
<i>C. hyointestinalis</i>	2037	I, II, III	<i>Campylobacter hominis</i>	ATCC BAA-381 <sup>T</sup>	I, II, III
<i>C. hyointestinalis</i>	2038	I, II, III	<i>Campylobacter mucosalis</i>	ATCC 43952	II, III
<i>C. hyointestinalis</i>	2039	I, II, III	<i>Aggregatibacter</i>	S01	I
<i>C. hyointestinalis</i>	2073	I, II, III	<i>actinomycetemcomitans</i>		
<i>C. hyointestinalis</i>	3014	I, II, III	<i>Arcobacter butzleri</i>	49616 <sup>T</sup>	I, III
<i>C. hyointestinalis</i>	3158	I, II, III	<i>A. butzleri</i>	china 08	III
<i>C. hyointestinalis</i>	3197	I, II, III	<i>A. butzleri</i>	C38	III
<i>C. hyointestinalis</i>	3477	I, II, III	<i>A. butzleri</i>	Thai 41	III
<i>C. hyointestinalis</i>	3535	I, II, III	<i>A. butzleri</i>	Thai 43	III
<i>C. hyointestinalis</i>	3839	I, II, III	<i>A. butzleri</i>	Thai 48	III
<i>C. hyointestinalis</i>	3857	I, II, III	<i>Arcobacter skirrowii</i>	51132 <sup>T</sup>	I, III
<i>Campylobacter lari</i>	298	I, III	<i>Escherichia albertii</i>	17328 <sup>T</sup>	I, III
<i>C. lari</i>	ATCC 43675	I, II, III	<i>Escherichia coli</i>	VS-1	I
<i>C. lari</i>	JCM2530 <sup>T</sup>	I, III	<i>E. coli</i>	NT3363	I
<i>C. lari</i>	84c-1	I, III	<i>E. coli</i>	GB1371	I
<i>C. lari</i>	84c-2	I, III	<i>E. coli</i>	P3	I
<i>C. lari</i>	264	I, III	<i>E. coli</i>	b52	I
<i>C. lari</i>	448	I, III	<i>E. coli</i>	P101	I
<i>C. lari</i>	918	I	<i>E. coli</i>	S9	I
<i>C. lari</i>	1500	I	<i>E. coli</i>	S45	I
<i>C. lari</i>	1502	I	<i>E. coli</i>	P183	I, III
<i>C. lari</i>	1504	I	<i>E. coli</i>	P194	I
<i>C. lari</i>	1578	I	<i>E. coli</i>	B10	I
<i>C. lari</i>	1601	I	<i>E. coli</i>	b1	I
<i>Campylobacter helveticus</i>	ATCC 51209 <sup>T</sup>	I, II, III	<i>E. coli</i>	AQ25179	I
<i>C. helveticus</i>	CAT	I, III	<i>E. coli</i>	AQ13328	I
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	ATCC 43954 <sup>T</sup>	I, II, III	<i>E. coli</i>	P132	I
<i>C. upsaliensis</i>	13-1	I, III	<i>E. coli</i>	P140	I
<i>C. upsaliensis</i>	21-1	I, III	<i>E. coli</i>	b95	I
<i>C. upsaliensis</i>	26-4	I, III	<i>E. coli</i>	AQ11333	I
<i>C. upsaliensis</i>	40-1	I, III	<i>E. coli</i>	P150	I
<i>C. upsaliensis</i>	41-2	I, III	<i>E. coli</i>	P336	I, III
<i>C. upsaliensis</i>	42-3	I, III	<i>E. coli</i>	B102	I
<i>C. upsaliensis</i>	48-1	I, III	<i>E. coli</i>	P31	III
<i>C. upsaliensis</i>	49-1-1	I, III	<i>E. coli</i>	EaI	III
<i>C. upsaliensis</i>	60-1	I, III	<i>E. coli</i>	hachi	III
<i>C. upsaliensis</i>	66-1	I, III	<i>E. coli</i>	C600	II
<i>C. upsaliensis</i>	68-3	I, III	<i>E. coli</i>	JM109	II
<i>C. upsaliensis</i>	70-3	I, III	<i>E. coli</i>	BL21(DE3)	II

**Table 3. Continued.**

Species	Strain	Chapter	Species	Strain	Chapter
<i>Helicobacter cinaedi</i>	ATCC BAA-847	III	<i>S. dysenteriae</i>	153AQ	I
<i>Haemophilus ducreyi</i>	700724	I	<i>S. dysenteriae</i>	155AQ	I
<i>Helicobacter fennelliae</i>	35684 <sup>T</sup>	I, III	<i>S. dysenteriae</i>	H14-174	I
<i>Helicobacter hepaticus</i>	ATCC 51448 <sup>T</sup>	I	<i>S. dysenteriae</i>	HU29	I
<i>H. hepaticus</i>	ATCC 51449	III	<i>S. dysenteriae</i>	BCM519	I
<i>Helicobacter pylori</i>	43504 <sup>T</sup>	I, III	<i>Shigella flexneri</i>	SF3	I
<i>H. pylori</i>	43629	I, III	<i>S. flexneri</i>	SF4	I
<i>Providencia alcalifaciens</i>	Tm8	I, III	<i>S. flexneri</i>	SF5	I
<i>Salmonella</i> spp.	ST4,311	I	<i>S. flexneri</i>	SF6	I
<i>Salmonella</i> spp.	ST1,312	I	<i>S. flexneri</i>	SF7	I
<i>Salmonella</i> spp.	ST3,307	I	<i>Shigella sonnei</i>	7AQ	I
<i>Salmonella</i> spp.	TM101	I	<i>S. sonnei</i>	SS2	I
<i>Salmonella</i> spp.	TM103	I	<i>S. sonnei</i>	SS3	I
<i>Salmonella</i> spp.	TM104	I	<i>S. sonnei</i>	SS7	III
<i>Salmonella</i> spp.	TM105	I	<i>Vibrio cholera</i>	N16961	I
<i>Salmonella</i> spp.	TM106	I, III	<i>V. cholera</i>	569B	I
<i>Salmonella</i> spp.	TM107	I	<i>V. cholera</i>	VC406	I
<i>Salmonella</i> spp.	TM109	I	<i>V. cholera</i>	C-1	I
<i>Salmonella</i> spp.	TM110	I	<i>V. cholera</i>	C-2	I
<i>Salmonella</i> spp.	TM111	I	<i>V. cholera</i>	C-3	I
<i>Salmonella</i> spp.	TM112	I, III	<i>V. cholera</i>	C-4	I
<i>Salmonella</i> spp.	TM113	I, III	<i>V. cholera</i>	C-5	I
<i>Salmonella</i> spp.	TM114	I, III	<i>V. cholera</i>	C-6	I
<i>Salmonella</i> spp.	TM116	I, III	<i>V. cholera</i>	C-7	I
<i>Salmonella</i> spp.	TM117	I, III	<i>V. cholera</i>	C-8	I
<i>Salmonella</i> spp.	TM118	I	<i>V. cholera</i>	C-9	I
<i>Salmonella</i> spp.	TM119	I	<i>V. cholera</i>	C-10	I
<i>Salmonella</i> spp.	TM121	I	<i>V. cholera</i>	A5	I
<i>Salmonella</i> spp.	TM122	I	<i>V. cholera</i>	A10	I
<i>Salmonella</i> spp.	TM123	I	<i>V. cholera</i>	A15	I
<i>Salmonella</i> spp.	TM125	I	<i>V. cholera</i>	B5	I
<i>Salmonella</i> spp.	TM126	I	<i>V. cholera</i>	B10	I
<i>Salmonella</i> spp.	TM127	I	<i>V. cholera</i>	C5	I
<i>Salmonella</i> spp.	TM128	I	<i>V. cholera</i>	C9	I
<i>Salmonella</i> spp.	TM129	I	<i>V. cholera</i>	D5	I
<i>Salmonella</i> spp.	TM130	I	<i>V. cholera</i>	E5	I
<i>Salmonella</i> spp.	TM132	I	<i>V. cholera</i>	E10	I
<i>Salmonella</i> spp.	TM134	I	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	VP1	I
<i>Salmonella</i> spp.	TM135	I	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP2	I
<i>Salmonella</i> spp.	TM136	I	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP3	I
<i>Salmonella</i> spp.	TM137	I	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP4	I
<i>Shigella dysenteriae</i>	SD1	I	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP5	I
<i>S. dysenteriae</i>	SD2	I	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP6	I
<i>S. dysenteriae</i>	SD3	I	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP7	I
<i>S. dysenteriae</i>	SD5	I	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP8	I
<i>S. dysenteriae</i>	SD102	I, III	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP9	I
<i>S. dysenteriae</i>	SD104	I, III	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP10	I
<i>S. dysenteriae</i>	SD-107	I	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP11	I
<i>S. dysenteriae</i>	SD112	I, III	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP12	I
<i>S. dysenteriae</i>	SD153	III	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP13	I
<i>S. dysenteriae</i>	SD155	III	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP14	I

**Table 3. Continued.**

Species	Strain	Chapter	Species	Strain	Chapter
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP15	I	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP24	I
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP16	I	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP25	I
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP18	I	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP26	I
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP19	I	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP28	I
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP20	I	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP30	I
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP21	I	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP31	I
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP22	I	<i>Wolinella succinogenes</i>	ATCC 29543 <sup>T</sup>	III
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP23	I	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Ye09	I

\*Indicates the chapter where the bacterial strain was used.

コモンプライマーである C-CdtBcom1 (5'-ACTTGGAAATTGCAAGGC-3') と C-CdtBcom2 (5'-TCTAAAATTACHGGAAAATG-3') は GeneDesign 社で合成され本実験に供した (25)。鋳型 DNA 1-4 μL、C-CdtBcom1 (10 μM) 2 μL、C-CdtBcom2 (10 μM) 2 μL、dNTP mix (2.5 mM) 3.2 μL、10 × *Ex* Taq buffer 4 μL、Takara *Ex* Taq (Takara) 1 U を混合し、滅菌精製水を用いて最終液量を 40 μL に調整した。94°C 3 分間の初期変性後、94°C 30 秒の変性、50°C 30 秒のアニーリング、72°C 30 秒の伸長反応を 30 サイクル行い、72°C 3 分の最終伸張反応を行った。PCR は TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient (Takara)、もしくは Geneamp PCR System 9700 (Life Technologies) を用いて行った。PCR 産物は 2.0% アガロースゲル (Seakem LE agarose; Cambrex Bio Science Rockland) を用いて泳動後、アガロースゲルをエチジウムプロマイド水溶液で染色し、ゲルドキュメンテーション解析システム (Gel Doc 2000; Bio-Rad Laboratories) を用いて紫外線下 (260 nm) で撮影した。

### 【塩基配列の解析】

PCR 産物は QIA quick PCR Purification Kit (Qiagen)、もしくは Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて精製した。Cycle PCR は BigDye Terminators v1.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) を用いた。すなわち精製 DNA 2-5 ng、プライマー (2.5 μM) 1 μL、Big Dye terminator v1.1 1.75 μL、5 × Sequence buffer 2 μL を混合し、滅菌精製水を用いて最終液量を 10 μL に調整した後、96°C 5 分の初期変性後、96°C 10 秒の変性、50°C 5 秒のアニーリング、60°C 4 分の伸長反応を 25 サイクル行った。Cycle PCR 終了後、反応液を

CleanSEQ magnetic Particle Solution (Beckman Coulter) 10  $\mu$ L、85%エタノール 42  $\mu$ L と混合した。30 秒間静置した後、96 穴マグネットイックプレート (SPRI plate96R: Beckman Coulter) 上で 3 分間静置後、上清を除去した。85%エタノール 100  $\mu$ L を添加し 30 秒間静置後、上清を除去した。さらに室温で 10 分間、自然乾燥させた後、滅菌精製水 50  $\mu$ L を加え、5 分間静置した。上清 40  $\mu$ L を回収し、Applied Biosystems 3130 Genetic Analyser (Life Technologies) を用いて塩基配列を決定した。得られた塩基配列は DNA Lasergene software package (DNASTAR) を用いて解析し、相同性検索は、NCBI (National Center for Biotechnology Information) が提供する BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) を用いて行った。

### 【Accession Number】

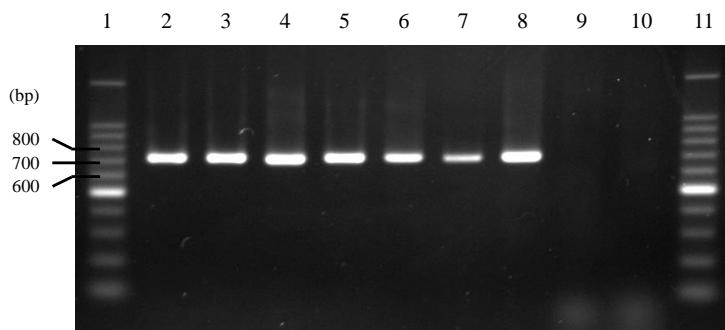
新たに決定した *cdtB* 遺伝子の塩基配列は、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録した (菌株/accession no.; *C. jejuni* Co1-008 株/AB872826、Co1-119 株/AB872827、Co1-126 株/AB872828、Co2-127 株/AB872829、Co2-128 株/AB872830、Co2-132 株/AB872831、Co2-193 株/AB872832、Co2-200 株/AB872833、Co2-214 株/AB872834、Co3-007 株/AB872835、Co3-011 株/AB872836、Co3-012 株/AB872837、Co3-024 株/AB872838、Co3-036 株/AB872839、Co3-072 株/AB872840、Co3-078 株/AB872841、Co3-082 株/AB872842、B86 株/AB872843、8214c 株/AB872844、8215a 株/AB872845、8414c 株/AB872846、9914b 株/AB872847、10114a 株/AB872848、10114c 株/AB872849、*C. coli* Co1-071 株/AB872850、Co1-124 株/AB872851、Co1-130 株/AB872852、Co1-194 株/AB872853、Co1-245 株/AB872854、Co2-082 株/AB872855、Co2-173 株/AB872856、Co2-218 株/AB872857、Co3-134 株/AB872858、*C. fetus* 2-1 株/AB872859、7 株/AB872860、86c 株/AB872861、7915b 株/AB872862、8013a 株/AB872863、8013c 株/AB872864、8512a 株/AB872865、8614c 株/AB872866、8813a 株/AB872867、8813c 株/AB872868、*C. hyoilealis* 1-1 株/AB872869、10-1 株/AB872870、87-4 株/AB872871、94-6 株/AB872872、2003 株/AB872873、2030 株/AB872874、2032 株/AB872875、2033 株/AB872876、2034 株/AB872877、2035 株/AB872878、2037 株/AB872879、2039 株/AB872880、2973 株/AB872881、

3014 株/AB872882、3158 株/AB872883、3197 株/AB872884、3477 株/AB872885、3535 株/AB872886、3839 株/AB872887、3857 株/AB872888、*C. upsaliensis* ATCC 43954 株/AB872889、12-1 株/AB872890、37-1 株/AB872891、13-1 株/AB872892、21-1 株/AB872893、26-4 株/AB872894、40-1 株/AB872895、41-2 株/AB872896、42-3 株/AB872897、48-1 株/AB872898、49-1-1 株/AB872899、60-1 株/AB872900、66-1 株/AB872901、68-3 株/AB872902、70-3 株/AB872903、99-1 株/AB872904、101-1 株/AB872905、102-1 株/AB872906、104-1 株/AB872907、115-1 株/AB872908、G1104 株/AB872909、Marin株/872910、*C. lari* ATCC 43675 株/AB872911、918 株/AB904782、1500 株/AB904783、1502 株/AB904784、1504 株/AB904785、1578 株/AB904786、1601 株/AB904787、*C. helveticus* ATCC51209 株/AB872912)。

### 実験結果と考察

7 菌種のカンピロバクター (*C. hyointestinalis*、*C. lari*、*C. upsaliensis*、*C. helveticus*、*C. concisus*、*C. hominis*、*C. curvus*) が *cdt* 遺伝子を保有する可能性あるいは既に保有が報告されている *cdt* 遺伝子がコモンプライマーで増幅されるかを予備的に検証するため、これら 7 菌種 8 株、及び陽性コントロールとして *C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus* の 3 菌種 3 株から、コモンプライマーを用いて *cdtB* 遺伝子の増幅を試みた。その結果、陽性コントロールとして用いた 3 菌種 (*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus*) のみならず、ヒトの胃腸炎の起因菌として認識されている 3 菌種 (*C. hyointestinalis*、*C. lari*、*C. upsaliensis*)、さらには愛玩動物に保有され、ヒトへの感染が危惧されている *C. helveticus* の合計 7 菌種から 720 bp 付近に単一な増幅断片を得た (Fig. 2)。得られた増幅断片の塩基配列を決定したところ、いずれも報告のある *cdtB* 遺伝子と相同性があり、*cdtB* 遺伝子が増幅されていることを確認できた (data not shown)。一方、その他 3 菌種 (*C. concisus*、*C. hominis*、*C. curvus*)、及び陰性コントロールとして使用した *E. coli* C600 株から増幅断片が得られなかった (得られた結果の一部を Fig. 2 に示す)。

著者の研究グループは既に *C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus* の 3 菌種内に *cdt* 遺伝子が普遍的に



**Fig. 2. Detection of the *cdtB* gene of 7 *Campylobacter* species.** Lanes: 1 and 11, 100-bp ladder; 2, *C. jejuni* (strain 81-176); 3, *C. coli* (Co1-243); 4, *C. fetus* (ATCC 27374<sup>T</sup>); 5, *C. hyoilealis* (Ch022); 6, *C. lari* (298); 7, *C. helveticus* (ATCC 51209<sup>T</sup>); 8, *C. upsaliensis* (ATCC 43954<sup>T</sup>); 9, *C. curvus* (ATCC 35224<sup>T</sup>); 10, *Escherichia coli* (C600).

**Table 4. Detection of the *cdtB* gene in *Campylobacter* spp.**

Bacterial strain (n <sup>a</sup> )	PCR with common primer	
	No. of positive	Positive rate (%)
<i>Campylobacter jejuni</i> (35)	35	100
<i>Campylobacter coli</i> (19)	19	100
<i>Campylobacter fetus</i> (20)	20	100
<i>Campylobacter hyoilealis</i> (24)	21	88
<i>Campylobacter lari</i> (13)	13	100
<i>Campylobacter helveticus</i> (2)	2	100
<i>Campylobacter upsaliensis</i> (22)	22	100
<i>Campylobacter concisus</i> (2)	0	0
<i>Campylobacter curvus</i> (1)	0	0
<i>Campylobacter hominis</i> (1)	0	0
<i>Escherichia coli</i> (1)	0	0

<sup>a</sup>Value in parentheses indicates number of strains analyzed.

存在することを報告している (25)。特異的な PCR 産物が得られた 4 菌種 (*C. hyoilealis*、*C. lari*、*C. helveticus*、*C. upsaliensis*) 内にも *cdt* 遺伝子が普遍的に存在する可能性を検証するため、これら 7 菌種 135 株から *cdtB* 遺伝子の増幅を試みた (Table 4)。その結果、*C. jejuni* は 35 株中 35 株、*C. coli* は 19 株中 19 株、*C. fetus* は 20 株中 20 株、*C. lari* は 13 株中 13 株、*C. helveticus* は 2 株中 2 株、*C. upsaliensis* は 22 株中 22 株から増幅断片が得られた。一方、*C. hyoilealis* については、調べた 24 株中 21 株 (88%) から増幅断片が得られ、3 株からは増幅断片が得られなかった。しかしながら、PCR で陰性となった 3 株の菌体破碎上清を HeLa 細胞に添加したところ、CDT 活性が認められる等、これら 3 株にも *cdt* 遺伝子が存在する可

能性を見出した(第二章第一節)。2013年現在、これら7菌種の $cdt$ 遺伝子配列は報告されており、今回のPCR陽性となった132株中39株も $cdt$ 遺伝子を保有していることが報告されている(25、32-35、Somroop *et al.*, unpublished data)。そこで、その他93株のPCR産物の塩基配列を決定したところ、いずれもそれぞれの菌種の $cdtB$ 遺伝子と最も相同意が高く、 $cdtB$ 遺伝子が増幅されていること、また菌種特異的な $cdt$ 遺伝子を保持している可能性が確認できた(data not shown)。

以上の結果より、少なくとも $C. jejuni$ 、 $C. coli$ 、 $C. fetus$ に加え、4菌種( $C. hyointestinalis$ 、 $C. lari$ 、 $C. upsaliensis$ 、 $C. helveticus$ )のカンピロバクターは $cdtB$ 遺伝子を保有しており、コモンプライマーはこれら7菌種の $cdtB$ 遺伝子を増幅することができた。また、これら7菌種内に $cdt$ 遺伝子が普遍的に存在する可能性が示され、これらの菌種を検出するための標的遺伝子として $cdt$ 遺伝子は有用であると考えられた。

## 第二節 7菌種のカンピロバクターを標的とした菌種同定法の開発

第一節での検討において、コモンプライマーを用いたPCRは7菌種のカンピロバクター( $C. jejuni$ 、 $C. coli$ 、 $C. fetus$ 、 $C. hyointestinalis$ 、 $C. lari$ 、 $C. upsaliensis$ 、 $C. helveticus$ )の $cdtB$ 遺伝子を感度よく増幅できた。コモンプライマーは、 $C. jejuni$ 、 $C. coli$ 、 $C. fetus$ の $cdtB$ 遺伝子を一度に増幅するために設計したプライマーであったが、コモンプライマーを用いたPCRは、 $cdt$ 遺伝子を保有するカンピロバクターを特異的に検出する遺伝子検査法としても使用可能である。そこで本節では、コモンプライマーを用いたPCRの特異性と検出下限値を評価することで遺伝子検査法としての基礎情報を収集した。また、 $cdt$ 遺伝子が菌種間で配列に特異性があることを利用し、PCR産物( $cdtB$ 遺伝子断片)を制限酵素で消化することで菌種特異的な切断断片が得られ、その切断多型(RFLP: restriction fragment length polymorphism)を電気泳動によって解析し、菌種を同定できる可能性を検証した(PCR-RFLP法)。

## 実験材料と方法

### **【使用した菌株と培養条件】**

本節の実験に使用した菌株を Table 3 に示した。カンピロバクター属菌、及び *E. coli* の培養法は第一節の実験材料と方法に従った。*Arcobacter* 属菌、*Helicobacter* 属菌は馬血液寒天培地を用いて、37°C、微好気条件 (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>) 下で 2 日以上培養した。*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* は 0.6% yeast extract (Becton Dickinson) を含む trypticase soy agar (TSA: Becton Dickinson) を用いて、37°C, 10% CO<sub>2</sub> 存在下 (10% CO<sub>2</sub> in 90% air) で 2 日間培養した。*Shigella* 属菌、*Vibrio cholerae*、*Providencia alcalifaciens* は LB 液体培地、*Vibrio parahaemolyticus* は 3% NaCl を含むアルカリペプトン水 (Nissui Pharmaceutical)、*E. albertii*、*Salmonella enterica* は trypticase soy broth (TSB: Becton Dickinson) を用いて、37°C で一晩、振とう培養した。*Yersinia enterocolitica* は TSB を用いて、30°C で 2 日間培養した。*Haemophilus ducreyi* は 10% の牛胎仔血清 (FBS: Life Technologies)、10 g/L のヘモグロビン (Becton Dickinson)、1% の IsoVitalex (Becton Dickinson) を含むブレインハートインフュージョン培地 (Becton Dickinson) を用いて、37°C、微好気条件 (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>) 下で 5 日間培養した。

### **【鋳型 DNA の調製】**

第一節の実験材料と方法に従った。

### **【コモンプライマーを用いた PCR】**

第一節の実験材料と方法に従った。

### **【塩基配列の解析】**

第一節の実験材料と方法に従った。*cdtB* 遺伝子のコモンプライマー結合領域の解析には、NCBI に登録されている配列情報 (菌株/accession no.: *C. jejuni* 81-176 株/NC\_008787、*C. coli* Co1-243 株/AB182109、*C. fetus* ATCC 27374 株/AB274802、*C. hyoilestinalis* Ch022 株/AB218983)、及び大阪府立大学獣医国際防疫学研究室で *cdtB* 遺伝子の全塩基配列を決定し、

その部分配列のみを NCBI に登録した *C. lari* 298 株/AB274802、*C. upsaliensis* ATCC 43954 株/AB872889、*C. helveticus* ATCC 51209/AB872912 株の配列情報を用いた。

### 【PCR の検出下限値の評価】

第一節の実験材料と方法に従って *C. jejuni* 81-176 株、*C. coli* Co1-243 株、*C. fetus* ATCC 27374 株、*C. hyoilectinalis* Ch022 株、*C. lari* 298 株、*C. upsaliensis* ATCC 43954 株、*C. helveticus* ATCC 51209 株を培養し、寒天培地上に生じたコロニーを PBS に懸濁した。遠心分離 (10,000 g、5 分) を行い、残渣を PBS で 2 回洗浄後、濁度 ( $OD_{600}$ ) を 1.0 に調整した。菌液 50  $\mu$ L と TE バッファー 450  $\mu$ L を混合し、上述の方法に従って鋳型 DNA を調製した。また、菌液に含まれる菌数を定量するため、菌体懸濁液を PBS で段階希釈し、それぞれ 100  $\mu$ L ずつ馬血液寒天培地に塗抹した。37°C、微好気条件下で 2 日間培養した後、生じたコロニー数から菌数 (colony forming unit: cfu) を算出した。この値を元に鋳型 DNA を TE バッファーで希釈し、1  $\mu$ L 中に  $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$  cfu に相当する菌数が含まれる鋳型 DNA を調製し、コモンプライマーを用いた PCR を行った。

### 【PCR-RFLP】

PCR 産物 1-5  $\mu$ L、10 × NEBuffer3 (New England Biolabs) 1  $\mu$ L、*Dde*I (New England Biolabs) 5 U、*Eco*RI (Takara) 7.5 U を混合し、滅菌精製水を用いて最終液量を 10  $\mu$ L に調整した。37°C で一晩、反応させた後、2.0%、もしくは 3.0% のアガロースゲルを用いて電気泳動を行った。

### 実験結果と考察

コモンプライマーを用いた PCR の特異性を評価するため、大腸菌等の *cdt* 遺伝子の存在が報告されているグラム陰性菌 (20、23)、ヘリコバクター等のカンピロバクターの類縁種、及びサルモネラ等の食中毒細菌 (6) を含むカンピロバクター以外の病原細菌 17 菌種 138 株から *cdtB* 遺伝子の增幅を試みた (Table 5)。その結果、*cdt* 遺伝子の保有の有無にかかわらず、いずれの菌株からも *cdtB* 遺伝子に特異的な增幅断片は得られなかった。以上の結果より本 PCR は

**Table 5. Bacterial strains used in this study and detection of the *cdtB* gene.**

Bacterial strain (n <sup>a</sup> )	Origin (n) /Strain ID	Pattern (n)	PCR-RFLP
			Identification rate (%)
<i>Campylobacter jejuni</i> (35)	Human (23) Animal (8) <u>81-176</u> ATCC33560 <sup>T</sup> ATCC43432 ATCC700819	Cj (23) Cj (8) Cj (1) Cj (1) Cj (1) Cj (1)	100
<i>Campylobacter coli</i> (19)	Human (16) <u>Co1-243</u> ATCC 33559 <sup>T</sup> ATCC 43478	Cc-I (14), Cc-II (1), Cc-III (1) Cc-I (1) Cc-I (1) Cc-I (1)	100
<i>Campylobacter fetus</i> (20)	Human (2) Animal (16) <u>ATCC 27374<sup>T</sup></u> ATCC 19438 <sup>T</sup>	Cf (2) Cf (16) Cf (1) Cf (1)	100
<i>Campylobacter hyoilealis</i> (24)	Animal (22) <u>Ch022</u> ATCC 35217 <sup>T</sup>	Chy (20) Chy (1) — <sup>h</sup>	88
<i>Campylobacter lari</i> (13)	Human (2) Mussel (2) Seawater (6) <u>298</u> ATCC 43675 JCM 2530 <sup>T</sup>	Cl (2) Cl (2) Cl (6) Cl (1) Cl (1) Cl (1)	100
<i>Campylobacter helveticus</i> (2)	Animal (1) <u>ATCC 51209<sup>T</sup></u>	Che (1) Che (1)	100
<i>Campylobacter upsaliensis</i> (22)	Animal (21) <u>ATCC 43954<sup>T</sup></u>	Cu-I (15), Cu-II (4), Cu-III (2) Cu-I (1)	100
<i>Campylobacter concisus</i> (2) <sup>b</sup>	ATCC 33237 <sup>T</sup> ATCC 51562	— —	0
<i>Campylobacter curvus</i> (1) <sup>b</sup>	ATCC 35224 <sup>T</sup>	—	0
<i>Campylobacter hominis</i> (1) <sup>b</sup>	ATCC BAA-381 <sup>T</sup>	—	0
<i>Helicobacter hepaticus</i> (1)	ATCC 51448 <sup>T</sup>	—	0
<i>Haemophilus ducreyi</i> (1)	ATCC 700724	—	0
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (1)	Human (1)	—	0
<i>Shigella dysenteriae</i> (13)	Human (13 <sup>c</sup> )	—	0
<i>Shigella sonnei</i> (3)	Human (3 <sup>d</sup> )	—	0
<i>Escherichia coli</i> (22)	Human (14 <sup>e</sup> ) Animal (8 <sup>f</sup> )	— —	0
<i>Escherichia albertii</i> (1)	JCM17328 <sup>T</sup>	—	0
<i>Providencia alcalifaciens</i> (1)	Human (1)	—	0
<i>Arcobacter butzleri</i> (1) <sup>b</sup>	ATCC 49616 <sup>T</sup>	—	0
<i>Arcobacter skirrowii</i> (1) <sup>b</sup>	ATCC 51132 <sup>T</sup>	—	0
<i>Helicobacter pylori</i> (2) <sup>b</sup>	ATCC 43504 <sup>T</sup> ATCC 43629	— —	0
<i>Helicobacter fennelliae</i> (1) <sup>b</sup>	ATCC 35684 <sup>T</sup>	—	0
<i>Shigella flexneri</i> (5) <sup>b</sup>	Human (5)	—	0
<i>Salmonella</i> spp. (33) <sup>b</sup>	Human (33)	—	0
<i>Yersinia enterocolitica</i> (1) <sup>b</sup>	Human (1)	—	0
<i>Vibrio cholerae</i> (23) <sup>b</sup>	Human (23 <sup>g</sup> )	—	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (28) <sup>b</sup>	Shrimp (28)	—	0

**Table 5. Continued.**

The reference strains are underlined.

<sup>a</sup>Number in parentheses indicates the number of strains analyzed.

<sup>b</sup>The presence of *cdt* genes was not reported.

<sup>c</sup>Seven strains are *cdt* gene-negative.

<sup>d</sup>Two strains are *cdt* gene-negative.

<sup>e</sup>Four strains are *cdtI* positive, 1 strain is *cdtII* positive, 2 strains are *cdtIII* positive, 4 strains are *cdtIV* positive and 3 strains are *Cdt-V* positive.

<sup>f</sup>One strain is *cdtI* positive, 1 strain is *cdtII* positive, 3 strains are *cdtIII* positive, 1 strain is *cdtIV* positive and 2 strains are *cdtV* positive.

<sup>g</sup>Thirteen strains are O1 serogroup and 10 strains are non-O1/non-O139 serogroup.

<sup>h</sup>The *cdtB* gene-specific PCR products were not obtained by the PCR assay with common primers.

T: Type strain, -: Not Done

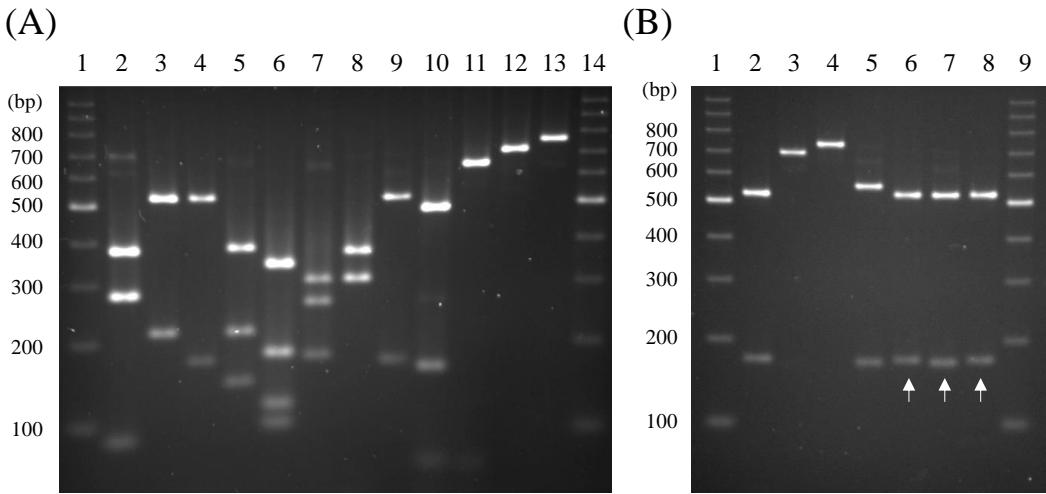
**Table 6. Computational restriction fragment length analysis of the partial *cdtB* gene-product obtained with *DdeI* and *EcoRI*.**

Bacterial species	Reference strain (Accession No.)	Product size (bp)	<i>DdeI</i> digest (bp)	<i>EcoRI</i> digest (bp)	<i>DdeI</i> and <i>EcoRI</i> digest (bp)	Pattern
<i>C. jejuni</i>	81-176 (NC_008787)	717	632, 85	369, 348	369, 263, 85	Cj
<i>C. coli</i>	Col-243 (AB182109)	723	511, 212	723	511, 212	Cc-I
	Co1-194 (AB872853)	723	511, 169, 43	723	511, 169, 43	Cc-II
	Co2-173 (AB872856)	723	368, 212, 143	723	368, 212, 143	Cc-III
<i>C. fetus</i>	ATCC 27374 <sup>T</sup> (AB274802)	711	321, 177, 115, 98	711	321, 177, 115, 98	Cf
<i>C. hyoilectinalis</i>	Ch022 (AB218983)	720	462, 258	549, 171	291, 258, 171	Chy
<i>C. lari</i>	298 (AB292355)	723	664, 43, 16	354, 297, 72	354, 300, 43, 16, 13	Cl
<i>C. helveticus</i>	ATCC 51209 <sup>T</sup> (AB872912)	717	685, 32	552, 165	520, 165, 32	Che
<i>C. upsaliensis</i>	ATCC 43954 <sup>T</sup> (AB872889)	717	456, 218, 43	610, 107	456, 154, 64, 43	Cu-I
	40-1 (AB872895)	717	674, 43	610, 107	610, 64, 43	Cu-II
	99-1 (AB872904)	717	674, 43	717	674, 43	Cu-III

非常に高い特異性を有することが明らかとなった。

コモンプライマーを用いた PCR の検出下限値を算出したところ、*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus*、*C. lari*、*C. upsaliensis*、*C. helveticus*においては、PCR 産物を得るのに PCR チューブあたり  $10^1$ - $10^2$  cfu の菌数が必要であったが、*C. hyointestinalis* は PCR チューブあたり  $10^3$ - $10^4$  の菌数が必要であった (data not shown)。*C. hyointestinalis* の検出下限値が高い理由を検証するため、それぞれの菌種の *cdtB* 遺伝子のプライマー結合領域の塩基配列を解析した。*C. hyointestinalis* 以外の 6 菌種の *cdtB* 遺伝子はプライマーとのミスマッチが 1 塩基以内であったのに対し、*C. hyointestinalis* の *cdtB* 遺伝子とプライマーとのミスマッチが 4 塩基あった (data not shown)。*C. hyointestinalis*において検出下限値が高い理由は、プライマー結合能の違いに起因すると考えられる。

7 菌種のカンピロバクター (*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus*、*C. hyointestinalis*、*C. lari*、*C. upsaliensis*、*C. helveticus*) の *cdtB* 遺伝子の塩基配列を比較解析したところ、*cdtB* 遺伝子を 2 種類の制限酵素 (*DdeI*、*EcoRI*) で同時に消化するだけで菌種特異的な遺伝子断片が得られることが示唆された (Pattern Cj、Cc-I、Cf、Chy、Cl、Che、Cu-I in Table 6)。そこで第一節での検討において、コモンプライマーを用いた PCR で陽性となった 7 菌種 132 株の PCR 産物を *DdeI* と *EcoRI* で同時に消化した結果、124 株は予測された菌種特異的な遺伝子断片が得られ、RFLP パターンに基づき菌種を同定できた (Table 5、Fig. 3A lanes 2、3、6-10)。しかし、*C. coli* 2 株、*C. upsaliensis* 6 株の RFLP パターンは、予測されたパターンと異なっていた (Fig. 3A lanes 4、5、11、12)。この理由を追求するため、これら 8 株の PCR 産物の塩基配列を解析したところ、いずれも既知の *cdtB* 遺伝子配列と 95%以上の相同性を示したが、*DdeI*、*EcoRI* 認識領域に欠損や挿入が起きる変異が認められた (data not shown)。そこで *C. coli*、*C. upsaliensis* で得られた 3 つの RFLP パターンをそれぞれ Cc-I、Cc-II、CcIII、及び Cu-I、Cu-II、Cu-III と定義し、*C. coli* 又は *C. upsaliensis* と同定できるようにした (Table 5、Fig. 3A lanes 3-5、10-12)。その結果、今回調べた PCR 陽性となった全ての株において PCR-RFLP により菌種



**Fig. 3. PCR-RFLP analysis using representative strains of 7 *Campylobacter* species with typical RFLP patterns.** (A) Double digest with *DdeI* and *EcoRI*. Lanes: 1 and 14, 100-bp ladder; 2, *C. jejuni* (strain 81-176); 3, *C. coli* (Co1-243); 4, *C. coli* (Co1-194); 5, *C. coli* (Co2-173); 6, *C. fetus* (ATCC 27374<sup>T</sup>); 7, *C. hyoilectinalis* (Ch022); 8, *C. lari* (298); 9, *C. helveticus* (ATCC 51209<sup>T</sup>); 10, *C. upsaliensis* (ATCC 43954<sup>T</sup>); 11, *C. upsaliensis* (40-1); 12, *C. upsaliensis* (99-1); 13, *C. upsaliensis* (99-1 undigested). (B) PCR products of *C. coli* (Co1-194, lanes 2, 4, 6, 8) or *C. helveticus* (ATCC 51209<sup>T</sup>, lanes 3, 5, 7) were digested with *DdeI* (lanes 2, 3) or *EcoRI* (lanes 4, 5), or both (lanes 6-8). Lanes 1 and 9, 100 bp DNA ladder was used as molecular weight size markers. White arrow indicates subtle difference of the digested fragment size, which could differentiate between *C. coli* and *C. helveticus*.

が同定可能であった (Table 5)。しかし、*C. coli* と *C. helveticus* の RFLP パターン (Cc-II と Che) は非常に類似していた (Fig. 3B lane 6-8)。誤同定を避けるため、このような場合は、PCR 産物を *DdeI*、もしくは *EcoRI* を単独で作用させることで容易に菌種を同定できることを確認した (Fig. 3B lanes 2-5)。

### 第三節 *cdtB* 遺伝子を標的とした PCR-RFLP 法の下痢症患者便検体、及びウシ胆汁検体への適用

本節では *cdtB* 遺伝子を標的とした PCR-RFLP 法の有用性を評価するため、下痢症患者便検体及びウシ胆汁検体からカンピロバクターの検出、同定を試みた。また、従来のカンピロバクターの検査法である培養法を用いて同一検体からカンピロバクターの分離を試み、両者の結果を比較した。

## 実験材料と方法

### **【PCR-RFLP 法の臨床検体への適用】**

臨床検体は 2012 年、水島中央病院 (岡山県) に消化器症状を訴えて来院した小児から採取した便検体 (24 検体) を用いた (Table 7)。患者便検体の一部を生理食塩水 500  $\mu$ L に懸濁し、便検体懸濁液 180  $\mu$ L と 10  $\times$  TE バッファー 20  $\mu$ L を混合した後、第一節の実験材料と方法に従って鑄型 DNA を調製した。鑄型 DNA は実験に供するまで-20°Cで保存し、1  $\mu$ L を PCR-RFLP 法に適用した。本節の臨床検体を用いた検討はレトロスペクティブな検討であり、以前、2 種類の分離方法 (mCCDA 法とフィルター法) でカンピロバクターの分離を試みた結果を陽性コントロールとし、PCR-RFLP 法の結果と比較解析した。尚、本実験は大阪府立大学研究倫理委員会の承認を得て行った。

### **【modified Charcoal Cefoperazone Desoxycholate Agar (mCCDA) プレートを用いた便検体からのカンピロバクターの分離 (mCCDA 法)】**

便検体懸濁液 50  $\mu$ L を mCCDA 培地 (Oxoid) にコンラージ棒で広げながら塗布した。プレートは 37°C、微好気条件下で 2-3 日間培養した。プレート上に得られたカンピロバクターと疑われるコロニーを馬血液寒天培地に植菌し、さらに 37°C、微好気条件下で 2-3 日純培養した。

### **【フィルター法を用いた便検体からのカンピロバクターの分離】**

セルロース混合エステルメンブレンフィルター (孔径 0.45  $\mu$ m: Advantec Toyo) を馬血液寒天培地に載せ、フィルターの上から検体懸濁液 100  $\mu$ L 滴下した。プレートは室温で 30 分間静置した後、液垂れしないようにフィルターを取り除き、プレートは 37°C、微好気条件下で 2-3 日間培養した。プレート上に得られたカンピロバクターと疑われるコロニーは、新しい馬血液寒天培地に植菌し、さらに 37°C、微好気条件下で 2-3 日、純培養した。

### **【分離したカンピロバクター様細菌の菌種同定】**

臨床検体から分離したカンピロバクターと疑われるコロニーはそのコロニーの形態、及び

顕微鏡を用いて菌体の運動性を評価した。また、フェイバーG「ニッスイ」(Nissui Pharmaceutical)を用いてグラム染色を行った。すなわち、プレートから回収したコロニーをスライドグラスに薄く広げた後、乾燥させ、火炎固定した。推奨プロトコールに従って染色、脱色、及び洗浄した後、顕微鏡にて鏡検した。グラム染色で陰性、かつ運動性があるらせん桿菌をカンピロバクター属菌と判定し、Asakuraらの方法に従い *C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus* の *cdt* 遺伝子を標的とした Multiplex PCR を行い、菌種を同定した(26)。

#### 【PCR-RFLP 法の動物検体への適用】

動物検体として、南港臓器株式会社から提供を受けたウシの胆汁(10検体)を用いた(Table 7)。胆汁中の不純物を極力除去するため、胆汁 1 mL を遠心分離(200 g、4°C、10 分)し、残渣を 1 mL の PBS で懸濁した。この操作を 2 回繰り返した後、胆汁検体 180 μL と 10 × TE バッファー 20 μL を混合し、第一節の実験材料と方法に従って鑄型 DNA を調製した。鑄型 DNA 1-5 μL を PCR-RFLP 法に適用した。また、胆汁内のカンピロバクターの増菌を目的に、胆汁 1 mL と 1.25 × Preston 培地 4 mL を混合し、37°C、微好気条件下で 24 時間培養した後、上述の方法に従って鑄型 DNA を調製した。なお、Preston 培地は、CM67 NUTRIENT BROTH No. 2 (Oxoid)、SR232E Campylobacter Growth Supplement (Oxoid)、SR117 Preston Campylobacter Selective Supplement (Oxoid)、及び馬脱纖維血液を用いて、Oxoid 社の推奨プロトコールに従って調製した。

#### 【動物検体からのカンピロバクターの分離】

上述の方法に従って、ウシの胆汁検体に mCCDA 法とフィルター法を適用することでカンピロバクターの分離を行った。また、胆汁中でのカンピロバクターの菌数が少ない可能性を考え、胆汁 1 mL と 1.25 × Preston 培地 4 mL を混合し、37°C、微好気条件下で 24 時間増菌培養した後、mCCDA 法を適用した。

#### 【使用した菌株と培養条件】

本節では、*C. jejuni* 81-176 株、*C. coli* Co1-243 株、*C. hyoilealis* Ch022 株を使用した。

第一節の実験材料と方法に従って菌株を培養した。

#### 【便検体中の PCR-RFLP 法の検出下限値の算出】

健常人ボランティアから糞便を採取し、糞便中にカンピロバクターが存在しないことを確認した。すなわち、糞便 2 g と滅菌済み PBS 8 mL を混合し、遠心分離 (200 g、4°C、10 分) によって得られた上清に対して mCCDA 法とフィルター法を適用するとともに、Preston 培地用いて増菌培養した後、mCCDA 法を適用することでカンピロバクターの分離を試みた。なお、全てのプレートは 37°C、微好気条件下で 5 日間培養した。第一節の実験材料と方法に従い、*C. jejuni* 81-176 株、*C. coli* Co1-243 株、及び *C. hyoilealis* Ch022 株の懸濁液を調製すると共に、菌体懸濁液に含まれる菌数を算出した。PBS を用いて菌体懸濁液を 10 倍段階希釈し、それぞれ 100 μL を健常人糞便 0.2 g と混合した。PBS 800 μL を添加後、遠心分離 (200 g、4°C、10 分) を行い、上清を回収した。再度、遠心分離 (12,800 g、10 分) を行い、上清を除去後、残渣を 1 mL の PBS で懸濁した。再度、同条件で遠心分離を行い、残渣を 500 μL の滅菌精製水で懸濁した後、10 分間加熱処理を行った。遠心分離 (12,800 g、10 分) を行い、得られた上清に対してフェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、DNA を素精製した。さらに DNA の精製度を上げるため、最終濃度が 50 μg/mL となるよう RNase A を加え、37°C で 30 分間インキュベーションした後、再度、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。最終的に TE バッファー 30 μL に溶解させた DNA 1 μL を鋳型 DNA とし、第二節の実験材料と方法に従って PCR-RFLP を行った。

#### 実験結果と考察

開発した PCR-RFLP 法を用いて、ヒトや動物由来の検体中に存在するカンピロバクターを検出、さらには同定できるかどうかを調べるため、下痢症患者の便検体から 2 種類の培養法 (mCCDA 法、フィルター法) を用いてカンピロバクターの分離を試みるとともに、PCR-RFLP 法を用いてカンピロバクターの検出を試みた。mCCDA 法は modified Charcoal

Cefoperazone Desoxycholate Agar (mCCDA) 培地を使用したカンピロバクターの分離培養法であり、選択培地にセフォペラゾンを添加することでカンピロバクター以外の夾雜菌の発育を抑制させる方法である。また、フィルター法は Lastovica らが開発したカンピロバクターの高い運動性を利用して、カンピロバクターを分離培養する方法であり、メンブレンフィルターをのせた抗菌薬無添加の血液寒天培地に検体を添加し、メンブレンフィルターを通過できた菌のみを培養する方法である (9)。便検体から 2 種類の培養法 (mCCDA 法、フィルター法) を用いてカンピロバクターの分離を試みた結果、24 検体中 7 検体からいずれかの方法でカンピロバクターが分離された (Table 7)。また、便検体から鑄型 DNA を調製し、PCR-RFLP 法を行った結果、24 検体中、7 検体から *cdtB* 遺伝子に特異的な遺伝子断片が得られた (data not shown)。RFLP パターンにより 5 検体で *C. jejuni*、1 検体で *C. coli*、1 検体で *C. fetus* と同定でき、培養法の結果と一致した (Table 7)。以上の結果より PCR-RFLP 法は、下痢症患者便検体から培養することなく直接カンピロバクターを検出、同定できることが示され、その特異度、及び感度ともに 100% であった。

次にウシの胆汁を用いて同様の検討を行った。フィルター法ではカンピロバクターを分離できなかつたが、mCCDA 法を用いることで 10 検体中 6 検体からカンピロバクターを分離することができた (Table 7)。一方、PCR-RFLP 法では、10 検体中 3 検体から *C. jejuni* を検出、同定できた (Table 7)。しかし、培養法で陽性となった 3 検体から PCR-RFLP 法でカンピロバクターを検出できなかつた (検体 No. 130911-1, 130911-4, 130918-2)。胆汁中でのカンピロバクターの菌数が少ない可能性が考えられたため、胆汁を 24 時間の増菌培養を行った後、PCR-RFLP を適用した。その結果、先ほどの 3 検体に加えて、新たに 2 検体から *C. jejuni* を検出、同定できた (Table 7)。これらの結果から、ある程度の菌数が存在すれば、PCR-RFLP 法を用いることでウシ胆汁からもカンピロバクターを検出できることが明らかとなつた。また、カンピロバクターが分離されなかつた検体では、PCR-RFLP 法でも陰性結果が得られたことから、本 PCR-RFLP 法の特異性は 100% であることが示された。ウシの胆汁は、カンピロバクターが高

**Table 7. Identification of *Campylobacter* spp. from human and animal samples.**

Sample	ID	Culture isolation		PCR-RFLP
		Filtration	mCCDA	
Human feces	P6496	—	—	—
	P6497	<i>C. jejuni</i>	—	<i>C. jejuni</i>
	P6498	—	—	—
	P6506	—	—	—
	P6507	<i>C. jejuni</i>	—	<i>C. jejuni</i>
	P6508	<i>C. fetus</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. fetus</i>
	P6509	—	—	—
	P6510	—	—	—
	P6511	—	—	—
	P6512	—	—	—
	P6513	—	—	—
	P6514	—	—	—
	P6515	—	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
	P6516	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>
	P6517	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
	P6518	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
	P6519	—	—	—
	P6520	—	—	—
	P6521	—	—	—
	P6538	—	—	—
	P6539	—	—	—
Bovine bile	130911-1	—	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> *
	130911-2	—	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
	130911-3	—	—	—
	130911-4	—	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> *
	130911-5	—	—	—
	130918-1	—	—	—
	130918-2	—	<i>C. jejuni</i>	—
	130918-3	—	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
	130918-4	—	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
	130918-5	—	—	—

—: *Campylobacter* was not isolated or detected.\**C. jejuni* was identified after enrichment cultures.

頻度で検出されることが報告されている (35)。また、無菌的に採取可能であり、液体であるため、ハンドリングの面で他の臓器、および臓器内容物よりも実験に適していると考え、実験に供した。今後、食品検体を用いた検査への応用を見据えて、本 PCR-RFLP 法を用いて食肉検体からカンピロバクターを検出できる可能性を評価することが望まれる。

最後に便検体中におけるカンピロバクターの検出下限値を算出した。3 種類の培養法 (mCCDA 法、フィルター法、Preston 培地で増菌後の mCCDA 法) でカンピロバクターが存在しないことが確認された健常人便検体に各種カンピロバクター属菌を添加し、精製した鑄型 DNA に対してコモンプライマーを用いた PCR を実施した。今回、食中毒細菌に指定

されている *C. jejuni*、*C. coli*、及び第一節で分離菌株に対する検出下限値が高かった *C. hyointestinalis* の 3 菌種を用いて検討を行ったところ、PCR 産物を得るのに *C. jejuni* では  $3 \times 10^6$  cfu/g、*C. coli* では  $2 \times 10^6$  cfu/g、*C. hyointestinalis* では  $2 \times 10^7$  cfu/g 以上の菌数が必要であった。

#### 第四節 小括

コモンプライマーは 3 菌種のカンピロバクター (*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus*) の *cdtB* 遺伝子を一度に増幅するために設計したプライマーである (25)。実際にこれら 3 菌種 74 株に対して PCR を行ったところ、全ての株から *cdtB* 遺伝子に特異的な増幅断片が得られた (Table 3)。第一節で示したとおり、他の 4 菌種のカンピロバクター (*C. hyointestinalis*、*C. lari*、*C. upsaliensis*、*C. helveticus*) の *cdtB* 遺伝子も増幅可能であり、これら 4 菌種 61 株を用いて PCR を行ったところ、3 株の *C. hyointestinalis* を除く 58 株から *cdtB* 遺伝子を増幅できた (Table 3)。第二章で PCR 隆性となった 3 株の *C. hyointestinalis* も *cdt* 遺伝子を保有することを見出しており、本研究成果によって少なくともこれら 7 菌種 (*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus*、*C. hyointestinalis*、*C. lari*、*C. upsaliensis*、*C. helveticus*) 内に *cdtB* 遺伝子が普遍的に存在する可能性が見出された。これら 7 菌種は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であることから (Table 1)、これら 7 菌種を標的とした遺伝子検査法を開発する意義は十分にあり、その標的遺伝子として *cdt* 遺伝子は非常に有用であると考えられる。今回、ヒトに病原性を示す可能性のある 17 菌種のカンピロバクターの内、10 菌種を評価の対象としたが (Table 1)、その他の 7 菌種のカンピロバクター (*C. gracilis*、*C. insulaenigrae*、*C. mucosalis*、*C. rectus*、*C. showae*、*C. sputorum*、*C. ureolyticus*)、及びコモンプライマーを用いて *cdtB* 遺伝子を増幅できなかつた *C. concisus*、*C. hominis*、*C. curvus* が *cdt* 遺伝子を保有する可能性については、更なる検討が必要である。

第二節では、コモンプライマーが 7 菌種のカンピロバクター (*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus*、

*C. hyointestinalis*、*C. lari*、*C. upsaliensis*、*C. helveticus*) の *cdtB* 遺伝子を感度良く、特異的に增幅できることに注目し、これら 7 菌種を特異的に検出、同定できる遺伝子検査法 (PCR-RFLP 法) を構築した。実際に本 PCR-RFLP 法を用いて下痢症患者便検体、及びウシの胆汁からカンピロバクターの検出を試みた結果、培養法と遜色のない感度と特異性でカンピロバクターを検出、同定することができた (Table 7)。今回、培養法で分離された菌種、及び PCR-RFLP 法で検出された菌種は *C. jejuni*、及び *C. coli* であり、本 PCR-RFLP 法を用いて検体から直接、他の菌種を検出できるかどうかについては検証できていない。今後、様々な検体を用いて本 PCR-RFLP 法の有用性を検証することで、従来の培養をベースとした検査法とは異なり、抗菌剤等の選択圧のかからない簡便、迅速なカンピロバクターの検査法として実用化されることが期待される。

コモンプライマーを用いた PCR 法は、菌種間で保存性の高い領域にプライマーが設計されているため、標的としている菌種以外のカンピロバクターの *cdtB* 遺伝子をも增幅できる可能性がある。緒論で論じた通り 17 菌種のカンピロバクターがヒトに病原性を示す可能性があることから (Table 1)、幅広くカンピロバクターを検出できる可能性があることは利点の一つである。しかも本研究で調べた限りでは、カンピロバクター以外の *cdt* 遺伝子を保有するグラム陰性菌や食中毒細菌等から増幅断片は得られなかった (Table 4)。また、使用するプライマーの種類が少ないと、プライマー同士の競合が生じるおそれが少なく、検体中の菌数が微量であってもカンピロバクターを検出できる可能性がある。実際に下痢症患者便検体、及びウシ胆汁検体から直接、カンピロバクターを検出できることも実験的に示された (Table 7)。菌種を同定するために、PCR 産物を制限酵素処理し、その泳動パターンを解析するという一手間がかかるものの、本 PCR-RFLP 法は有用性の高い方法であると考えられる。また、コモンプライマーと *C. hyointestinalis* の *cdtB* 遺伝子のミスマッチは合計 4 つ存在し、他菌種に比べて *C. hyointestinalis* に対する検出下限値が 10 倍以上高くなっていた。今後、*C. hyointestinalis* の *cdtB* 遺伝子も効率よく增幅できるプライマーに改良することで、*C. hyointestinalis* に対する検出感度が向上するものと考えられる。

## 第二章 *C. hyointestinalis* が保有する新規 *cdt* 遺伝子 (*chcdt-II* 遺伝子) の発見とその機能解析

*C. hyointestinalis* はブタ (36-39)、ウシ (36, 40)、イヌ (41)、ハムスター (36) 等の腸管に広く分布しており、胃腸炎を発症したブタ (38) や下痢症患者 (14, 15, 39, 42-46) からの検出、及び分離も多数報告されている。*C. hyointestinalis* のブタからヒトへの感染例も報告されており (39)、*C. hyointestinalis* は主要な人獣共通感染症の原因菌の一つと考えられている。しかし、*C. hyointestinalis* が病原性を示すメカニズムは殆ど明らかにされていない。1992 年に Ohya らは *C. hyointestinalis* が細胞毒素活性を有する物質を産生することを報告したが (47)、その実態は明らかにされていなかった。近年、著者の研究グループはタイの下痢症患者から分離した *C. hyointestinalis* Ch022 株も細胞毒素活性を有するとともに、細胞毒素活性のある CDT をコードする *cdt* 遺伝子の存在を報告し、その全塩基配列を決定した (48)。CDT は *C. hyointestinalis* の病原因子の候補である。第一章でコモンプライマーを用いた PCR 法で *C. hyointestinalis* から *cdtB* 遺伝子の増幅を試みた結果、24 株中 21 株 (88%) から *cdtB* 遺伝子を増幅でき、調べた範囲では *C. hyointestinalis* も *cdt* 遺伝子保有率が高いことを示すことができた (Table 4)。しかし、3 株 (12%) から *cdtB* 遺伝子を増幅できず、これら 3 株が *cdt* 遺伝子を保有しているかどうかについては更なる検討が必要となった。本章では、第一章で *cdtB* 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。その結果、Ch022 株で見つかった *cdt* 遺伝子と配列が大きく異なる *cdt* 遺伝子が存在することを見出した。また、新たに発見した *cdt* 遺伝子の全塩基配列を決定するとともに、その遺伝子産物の生物活性を評価した。

### 第一節 *cdtB* 遺伝子が検出されなかった *C. hyointestinalis* が *cdt* 遺伝子を保有する可能性

第一章での検討において、コモンプライマーを用いて *cdtB* 遺伝子を増幅できなかった 3 株の *C. hyointestinalis* が Ch022 株で見出された *cdt* 遺伝子クラスター (*cdtA* 遺伝子、*cdtB* 遺伝子、*cdtC* 遺伝子) を保有するかどうかについて、コロニーハイブリダイゼーション法により調べ

た。また、これら 3 株から滅菌菌体破碎液を調製し、細胞毒素活性を有するかどうかを調べることで、毒素遺伝子を保有する可能性を検証した。

## 実験材料と方法

### **【使用した菌株と培養条件】**

本節の実験に使用した菌株を Table 9 に示した。第一章第一節の実験材料と方法に従って菌株を培養した。

### **【滅菌菌体破碎液の調製】**

第一章第一節の実験材料と方法に従って培養した菌株を PBS に懸濁し、濁度 (OD<sub>600</sub>) を 10 に調整した。ハンディーソニケーター (Handy Sonic UR-20P: Tommy) を用いて 1 分間、氷上で超音波処理を行った後、1 分間、氷上で静置した。この処理を 3 回繰り返すことで菌体破碎液を調製した。菌体破碎液を遠心分離 (12,800 g、4°C、10 分) し、上清を 0.22 μm フィルター (Iwaki) に通過させたものを滅菌菌体破碎液として以下の実験に供した。

### **【細胞毒性試験】**

HeLa 細胞の培養には、5% FBS (Life Technologies) 含有 Minimum Essential Medium (MEM: Nissui Pharmaceutical) に antibiotic cocktail of streptomycin and penicillin (Life Technologies)、GlutaMax (Life Technologies) を添加したものを使用した。FBS は 56°C、30 分間の非効化処理したもの用いた。HeLa 細胞を 96 穴プレートに  $5.0 \times 10^3$  cells/100 μL で播種した後、滅菌菌体破碎液 10 μL を添加した。37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 48 時間培養した後、細胞をディフ・クイック (Sysmex) で染色し、顕微鏡下で細胞の形態を撮影した。HeLa 細胞に CDT 活性を示すことが報告されている *C. hyoilealis* Ch022 株 (48) を陽性コントロール、*cdt* 遺伝子の一部に欠損が認められ CDT 活性を示さない *C. jejuni* K328 株 (48, 49) を陰性コントロールとして用いた。

### **【細胞周期の解析】**

HeLa 細胞を  $25 \text{ cm}^2$  のフラスコに  $2.5 \times 10^5 \text{ cells}/4 \text{ mL}$  で播種し、滅菌菌体破碎液  $100 \mu\text{L}$  添加した後、24 時間培養した。細胞を 1% EDTA/PBS を用いて回収した後、遠心分離 ( $380 \text{ g}$ 、5 分) を行った。細胞を PBS  $10 \text{ mL}$  に懸濁し、再度同条件による遠心分離により細胞を洗浄した。その後、細胞を冷  $70\%$  エタノール  $10 \text{ mL}$  で懸濁し、 $4^\circ\text{C}$  で 2 時間、静置することで固定した。遠心分離 ( $380 \text{ g}$ 、5 分) を行い、上清を除去し、滅菌 PBS  $10 \text{ mL}$  で細胞を懸濁した。同様の処理を 2 回繰り返した後、細胞を RNase/PBS ( $0.25 \text{ mg/mL}$ )  $500 \mu\text{L}$  で懸濁し、氷上で 30 分間静置した。Propidium iodide (PI,  $0.5 \text{ mg/mL}$ )  $50 \mu\text{L}$  を添加し、氷上で 30 分間静置した後、BD FACSCalibur (Becton, Dickinson) を用いて Flow cytometry 解析を行った。

#### 【ヒストン H2AX のリン酸化の評価】

HeLa 細胞を 8 穴チャンバースライド (Nalge Nunc International) に  $1.0 \times 10^4 \text{ cells}/200 \mu\text{L}$  で播種し、24 時間培養した。細胞がスライドに接着したことを確認した後、滅菌菌体破碎液  $10 \mu\text{L}$  を添加し、さらに 16 時間培養した。細胞を  $3.7\%$  ホルムアルデヒドに 10 分間浸した後、 $0.5\%$  Triton X-100 に 20 分間、 $1.0\%$  BSA/PBS に 30 分間浸した。リン酸化されたヒストン H2AX を染色するため、 $0.3\%$  Triton X-100、 $1\%$  BSA を含む PBS で 1,000 倍希釈した anti-phospho-histone-H2AX (Ser139) polyclonal antibody (Enzo Life Sciences) を  $37^\circ\text{C}$  で 1 時間作用させた。PBS を用いた洗浄操作を 3 回繰り返した後、100 倍希釈した Alexa fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG (Life Technologies) を  $37^\circ\text{C}$  で 1 時間作用させた。同時にアクチンの重合を評価するため、F-actin を染色するため、100 倍希釈した Alexa Fluor 546-conjugated phalloidin (Life Technologies) を  $37^\circ\text{C}$  で 1 時間作用させ、LEICA DM2500 microscopy (Leica Microsystems) を用いて細胞を撮像した。

#### 【菌体からのゲノム DNA の精製】

第一章第一節の実験材料と方法に従って培養した菌株を PBS に懸濁し、遠心分離 ( $10,000 \text{ g}$ 、 $4^\circ\text{C}$ 、5 分) を行った。上清を除去した後、残渣から ISOPLANT Kit (Nippon Gene) を用いてゲノム DNA を精製した。

**Table 8. PCR primers and conditions used in chapter II.**

Name	Sequence (5'-3')	PCR condition			Amplicon (bp)	Target	Reference
		Denaturing	Annealing	Extention			
chcdtI-AF	GTTGCTCTAGCAAAGCC	94°C, 30 s	55°C, 30 s	72°C, 60 s	582	<i>chcdt-IA</i>	This study
chcdtI-AR	AACACTCTTGGAAAGCG						
C-CdtBcom1	ACTTGGAAATTGCAAGGC	94°C, 30 s	50°C, 30 s	72°C, 60 s	720	<i>chcdt-IB</i>	(25)
C-CdtBcom2	TCTAAAATTTACHGGAAAATG						
chcdtI-CF	GAAGATGACAATGTTATGCC	94°C, 30 s	55°C, 30 s	72°C, 60 s	417	<i>chcdt-IC</i>	This study
chcdtI-CR	GATGTTGACTTCTCGTCC						
GNW	GGNAAYTGGATHGGGGNTA	94°C, 30 s	50°C, 30 s	72°C, 60 s	960	<i>cdtA</i>	
WMI1	RTTRAARTCNCCYAADATCATCC					<i>cdtB</i>	(32, 53)
chcdtII-AF	ACTAGGGATAACCTAGGG	94°C, 30 s	55°C, 30 s	72°C, 60 s	418	<i>chcdt-IIA</i>	This study
chcdtII-AR	AATTGGCTCTAGCGTGC						
chcdtII-BF1	ACTTGGAAATATGCAAGGA	94°C, 30 s	55°C, 30 s	72°C, 60 s	737	<i>chcdt-IIB</i>	This study
chcdtII-BR1	CCAAATGTTAGGAAAGTG						
chcdtII-CF	ATGAGAGTTGGGATTG	94°C, 30 s	55°C, 30 s	72°C, 60 s	494	<i>chcdt-IIC</i>	This study
chcdtII-CR	TGTGCTTACATTGCC						
chcdtII-AF2 <sup>#</sup>	<u>GAATTCAATAACTATAAAGCTCCTAGGG</u>	94°C, 30 s	55°C, 30 s	72°C, 60 s	585	<i>chcdt-IIA</i>	This study
chcdtII-AR2 <sup>#</sup>	<u>AAGCTTCTATTATCTCCTAAAGCGG</u>						
chcdtII-BF2 <sup>#</sup>	<u>GCGGAATTCGCTATTGATGATTTAACAGC</u>	94°C, 30 s	55°C, 30 s	72°C, 60 s	789	<i>chcdt-IIB</i>	This study
chcdtII-BR2 <sup>#</sup>	<u>GCGGAGCTCTAAATCTCCAAATGTTATAGG</u>						
chcdtII-CF2 <sup>#</sup>	<u>GAATTCTCGTGGATAAAGAAAAAGTAG</u>	94°C, 30 s	55°C, 30 s	72°C, 60 s	705	<i>chcdt-IIC</i>	This study
chcdtII-CR2 <sup>#</sup>	<u>AAGCTTCACTCACAGACACCAGC</u>						
chcdtII-ABCF <sup>#</sup>	<u>GGTCTCCCATGACAAACTTGATTAAAT</u>	94°C, 30 s	55°C, 30 s	72°C, 120 s	2,263	<i>chdt-IIABC</i>	This study
chcdtII-ABCR <sup>#</sup>	<u>GGATCCCTTCACAGACACCAGCACCTT</u>						

GGATTC: *Eco*RI, GAGCTC: *Sac*I, GGTCTC: *Bsa*I, GGATCC: *Bam*HI

<sup>#</sup>Primers were used for preparation of recombinant protein.

## 【PCR】

Table 8 に示すプライマーと PCR 条件を用い、第一章の実験方法と材料に従って PCR を行った。

## 【遺伝子プローブの作製】

*C. hyointestinalis* Ch022 株から chcdtI-AF プライマーと chcdtI-AR プライマーを用いて *cdtA* 遺伝子、C-CdtBcom1 プライマーと C-CdtBcom2 プライマーを用いて *cdtB* 遺伝子、chcdtI-CF プライマーと chcdtI-CR プライマーを用いて *cdtC* 遺伝子を PCR で増幅した (Table 8)。PCR 産物は Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System で精製した後、Multiprime DNA labeling system (GE Healthcare) を用いて  $^{32}\text{P}$  で標識した。すなわち、各種 *cdt* 遺伝子の増幅断片を 3 分間の加熱処理後、氷上で冷却し、増幅断片 25 ng、Multiprime バッファー 10  $\mu\text{L}$ 、ランダムプライマー 5  $\mu\text{L}$ 、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dNTP (PerkinElmer) 1.85 MBq、Klenow enzyme 2 U を混合し、滅菌精製水を用いて最終液量を 50  $\mu\text{L}$  に調整した。37°Cで 30 分間、反応させた後、反応液 50  $\mu\text{L}$  をニックカラム (GE Healthcare) に添加し、さらに TE 400  $\mu\text{L}$  をカラムに添加した。このときの溶出液は回収せず、再び TE 400  $\mu\text{L}$  を加えて得られた溶出液を回収し、遺伝子プローブとした。

## 【コロニーハイブリダイゼーション】

第一章の実験材料と方法に従って菌株を培養し、滅菌爪楊枝を用いて各種寒天培地上のコロニーを採取した。各種寒天培地に置いたニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell BioScienc) 上にコロニーを植菌し、コロニーが適当な大きさ (3 mm × 3 mm 程度) になるまで培養した。回収したニトロセルロース膜は、3.5 mL の 0.5 N NaOH を添加した 90 mm の濾紙 (GE Healthcare) の上に置き、10 分間処理した。同様の操作を 3.5 mL の 1 M Tris-HCl (pH 7.0) を添加した濾紙上で 1 分間を 3 回、3.5 mL の 1.5 M NaCl を含む 1 M Tris-HCl (pH 7.0) を添加した濾紙上で 10 分間を 1 回、行った。ニトロセルロース膜を風乾させた後、UV クロスリンカー (CX-2000: UVP LLC) を用いて 2 分間 UV を照射させることで、DNA をニトロ

セルロース膜に固定した。 $^{32}\text{P}$  標識遺伝子プローブは、5 分間の加熱処理を行い、氷上で冷却したものをハイブリダイゼーションに用いた。ハイブリダイゼーションバッファー下で、 $^{32}\text{P}$  標識遺伝子プローブとニトロセルロース膜を  $42^\circ\text{C}$ 、一晩、インキュベーションした。ニトロセルロース膜は 0.1% SDS を含む  $2 \times \text{SSC}$  を用いて、室温で 10 分間、0.1% SDS を含む  $1 \times \text{SSC}$  を用いて  $65^\circ\text{C}$ 、30 分間を 2 回、インキュベーションした後、0.1% SDS を含む  $2 \times \text{SSC}$  に浸し、ペーパータオル上で半乾き状態まで乾燥させた。ニトロセルロース膜を BAS cassette 2430 (FUJIFILM) 内で BAS フィルムに一晩感光させ、BAS FLA-7000 (FUJIFILM) にて解析した。

### 実験結果と考察

タイの下痢症患者から分離した *C. hyointestinalis* Ch022 株の *cdt* 遺伝子の全塩基配列は既に報告されているが (48)、それ以外の *C. hyointestinalis* の分離株が保有する *cdt* 遺伝子の全塩基配列は報告されていない。そこで、第一章の検討において *cdtB* 遺伝子を增幅できなかった 3 株の *C. hyointestinalis* (ATCC 35217 株、2038 株、SS 株) が Ch022 株で見出された *cdt* 遺伝子と相同性の高い遺伝子を保有する可能性を検証した。コロニーハイブリダイゼーション法を用いて、3 株の *C. hyointestinalis* (ATCC 35217 株、2038 株、SS 株) と  $^{32}\text{P}$  で標識した Ch022 株由来の *cdtA* 遺伝子、*cdtB* 遺伝子、*cdtC* 遺伝子プローブをそれぞれ反応させたところ、い

**Table 9. Distribution of *chcdt* genes in *C. hyointestinalis*.**

Bacterium	Strain	Origin	Colony hybridization <sup>a</sup>		
			<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	<i>cdtC</i>
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	Ch022	Human <sup>b</sup>	+	+	+
	ATCC 35217 <sup>T</sup>	Pig <sup>b</sup>	—	—	—
	SS	Pork	—	—	—
	2038	Cow	—	—	—
<i>Escherichia coli</i>	C600	NA	—	—	—

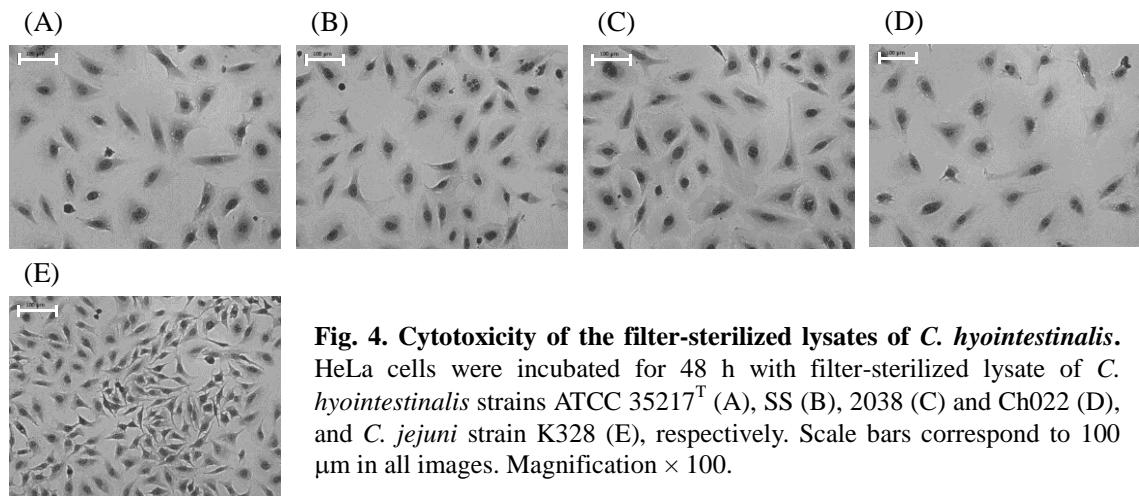
NA, not applicable; +, detected; -, not detected, T, Type strain

<sup>a</sup>Specific probe was prepared from *C. hyointestinalis* strain Ch022.

<sup>b</sup>The patient and animals had diarrhea and proliferative enteritis, respectively.

ずれの株もいずれの遺伝子プローブとも反応しなかった (Table 9)。一方、陽性コントロールとして用いた *C. hyointestinalis* Ch022 株は、全ての遺伝子プローブと反応した (Table 9)。以上の結果より、*C. hyointestinalis* ATCC 35217 株、2038 株、SS 株は、Ch022 株で見出された *cdt* 遺伝子と相同性の高い遺伝子を保有していない可能性があることがわかった。

*C. hyointestinalis* ATCC 35217 株、2038 株、SS 株が *cdt* 遺伝子を保有する可能性を検証するため、これら 3 株が細胞毒素活性を有するかどうかを調べた。これら 3 株から滅菌菌体破碎液を調製し、HeLa 細胞に添加したところ、培養 48 時間後には細胞が膨化し、通常の細胞に比べて 2 倍以上の大きさになる細胞も観察された (Fig. 4A-C)。また、培養 96-120 時間後には細胞数が減少し、多核化した細胞や脱核した細胞も観察され、細胞死が誘導されていた (data not shown)。これらの現象は、第一章の検討で *cdtB* を增幅できた 21 株の *C. hyointestinalis* でも同様に観察された (Fig. 4D, data not shown)。一方、陰性コントールとして用い、*cdt* 遺伝子の一部に欠損が認められる *C. jejuni* K328 株 (49) の菌体破碎液を添加した群では、PBS 添加群と同様に細胞の形態に変化が認められなかった (Fig. 4E)。これらの結果より、第一章でコモンプライマーを用いて *cdtB* 遺伝子を增幅できなかった 3 株の *C. hyointestinalis* (ATCC 35217 株、2038 株、SS 株) も細胞毒性活性を有する物質を産生していることが示された。

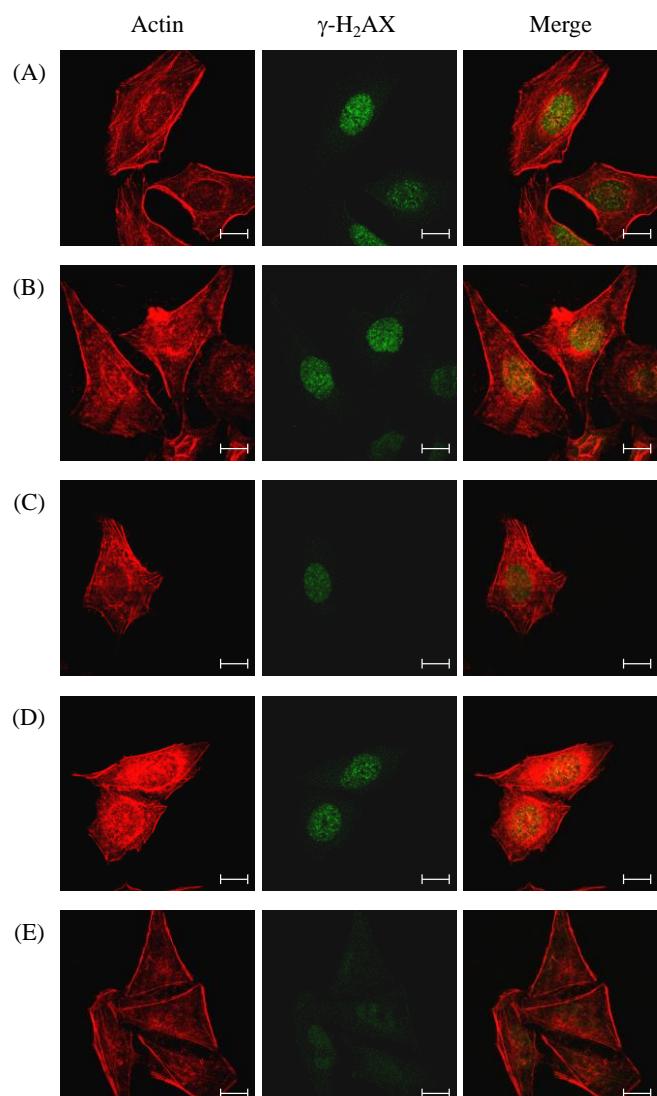


**Fig. 4. Cytotoxicity of the filter-sterilized lysates of *C. hyointestinalis*.** HeLa cells were incubated for 48 h with filter-sterilized lysate of *C. hyointestinalis* strains ATCC 35217<sup>T</sup> (A), SS (B), 2038 (C) and Ch022 (D), and *C. jejuni* strain K328 (E), respectively. Scale bars correspond to 100  $\mu$ m in all images. Magnification  $\times 100$ .

CDT は自身の持つ DNase 活性に基づき、標的細胞の染色体 DNA を傷害し、細胞周期を G<sub>2</sub>/M 期で停止させることで、細胞膨化や細胞死を誘導する (19)。ヒストン H2AX のリン酸化は切断された二本鎖 DNA の生成に伴って誘導される。CDT はヒストン H2AX のリン酸化を誘導すると共に (50, 51)、アクチ

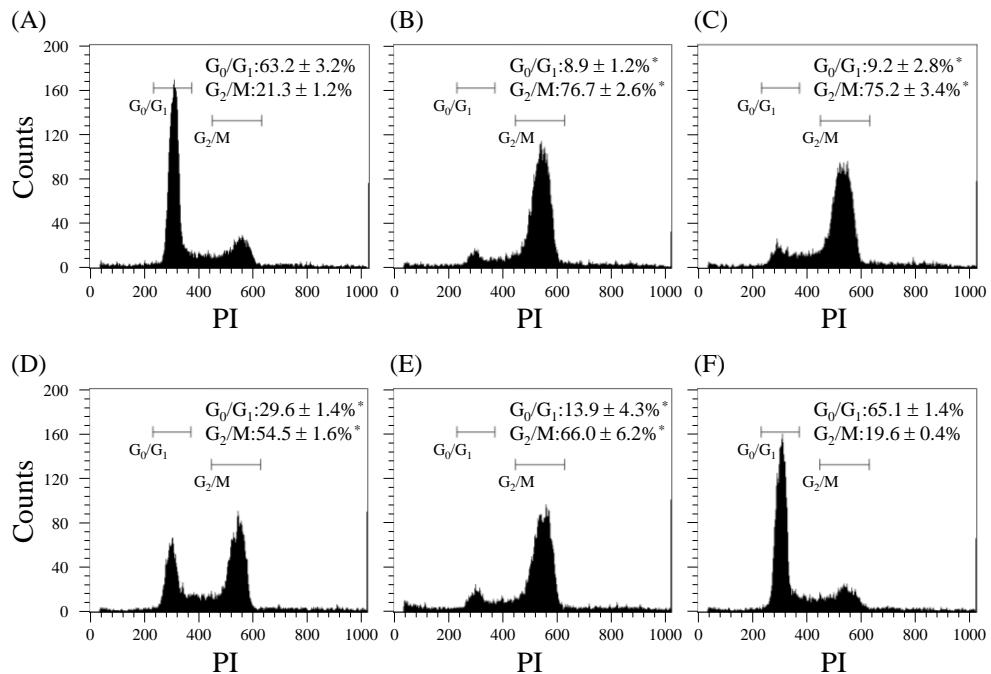
ンの重合を引き起こすことが報告され

ている (52, 53)。そこで *C. hyointestinalis* ATCC 35217 株、2038 株、SS 株が産生する細胞毒性活性を有する物質が CDT である可能性を評価するため、これら 3 株の滅菌菌体破碎液を HeLa 細胞に添加し、24 時間後に免疫蛍光染色を行った。その結果、*C. hyointestinalis* Ch022 株の滅菌菌体破碎液を添加した場合と同様にリン酸化ヒストン H2AX ( $\gamma$ -H2AX) の存在を示す緑色蛍光のシグナルが観察された (Fig. 5A-D)。一方、陰性コントールとして *C. jejuni* K328 株を使用した場合、殆ど緑色蛍光が検出されなかった (Fig. 5E)。また、F-actin を赤色蛍光で可視化したところ、*C. hyointestinalis* ATCC 35217 株、2038 株、SS 株、及び Ch022 株の滅菌菌体破碎液を作用させた細胞において



**Fig. 5. Genotoxic effect of the filter-sterilized lysates of *C. hyointestinalis*.** HeLa cells were incubated with filter-sterilized lysate of *C. hyointestinalis* strains ATCC 35217<sup>T</sup> (A), SS (B), 2038 (C) and Ch022 (D), and *C. jejuni* strain K328 (E). After 16 h of incubation,  $\gamma$ -H2AX was stained with anti-phospho-histone H2AX antibody and Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse-IgG antibody (left panels). Intracellular F-actin was stained with Alexa Fluor 546-conjugated phalloidin (middle panels). All fluorescent signals were digitally merged (right panels). Scale bars correspond to 100  $\mu$ m.

て F-actin の凝集が観察された。さらに、これら 4 株の *C. hyointestinalis* の滅菌菌体破碎液を作用させた細胞では、PBS 及び *C. jejuni* K328 株の菌体破碎液を作用させた細胞と比べて、細胞周期の G<sub>2</sub>/M 期で停止した細胞が有意に多かった (Fig. 6)。以上の結果より、第一章で *cdtB* 遺伝子を增幅できなかった 3 株の *C. hyointestinalis* (ATCC 35217 株、2038 株、SS 株) は、他の *C. hyointestinalis* と同様に CDT 活性を有しており、CDT 活性を有する物質を産生することが示された。また、これら 3 株は Ch022 株で見出された *cdt* 遺伝子と相同性の高い遺伝子は保有していないことが示唆された (Table 9)。これらの結果より、*C. hyointestinalis* ATCC 35217 株、2038 株、SS 株は既知の *cdt* 遺伝子とは異なる *cdt* 様遺伝子が存在する可能性が考えられた。以後の実験では、これら 3 株のうち、*C. hyointestinalis* ATCC 35217 株を用いて検討を進めたこととした。



**Fig. 6. Cell cycle analysis of HeLa cells.** HeLa cells were incubated with PBS (A), filter-sterilized lysate of *C. hyointestinalis* strains ATCC 35217<sup>T</sup> (B), SS (C) and 2038 (D), Ch022 (E), and *C. jejuni* strain K328 (F). After 24 h of incubation, cells were stained with propidium iodide and cell cycle distribution of about  $10^4$  cells was determined by flow cytometry. Average percentages and standard deviations of cells in each cell cycle phase calculated with three independent experiments are indicated. \*, P < 0.01 (Student's *t* test, n=3).

## 第二節 *C. hyointestinalis* が有する新規 *cdt* 遺伝子 (*chcdt-II* 遺伝子) の発見と塩基配列の決定

第二章第一節での検討の結果、コモンプライマーで *cdtB* 遺伝子を增幅できなかった *C. hyointestinalis* ATCC 35217 株、SS 株、2038 株が既知の *cdt* 遺伝子 (Ch022 型の *cdt* 遺伝子) とは異なる *cdt* 様遺伝子を保有する可能性が考えられた。本節では、これら 3 株のうち、*C. hyointestinalis* ATCC 35217 株から *cdt* 様遺伝子の検出を試みその塩基配列を解析した。さらに、新たに発見された *cdt* 遺伝子が *C. hyointestinalis* 内に普遍的に存在する可能性を検討した。

### 実験材料と方法

#### 【使用した菌株と培養条件】

本節の実験に使用した菌株を Table 13 に示した。クローニング用に *E. coli* JM109 株を使用した。第一章第一節の実験材料と方法に従って菌株を培養した。

#### 【縮合プライマー (degenerate primer) を用いた PCR】

Pickett らの報告に従って、縮合プライマーを合成し (32、54)、*C. hyointestinalis* ATCC35217 株から *cdt* 様遺伝子の増幅を試みた。鑄型 DNA 1 μL、各種プライマー (10 μM) 2 μL、dNTP mix (2.5 μM) 3.2 μL、10 × *Ex* Taq buffer 4 μL、Takara *Ex* Taq 1 U を混合し、滅菌精製水を用いて最終液量を 40 μL に調整した。94°C 3 分間の初期変性後、94°C 30 秒の変性、50°C 30 秒のアニーリング、72°C 30 秒の伸長反応を 30 サイクル行い、72°C 3 分の最終伸張反応を行った。

#### 【TA クローニング】

PCR 産物を QIA quick PCR Purification Kit で精製した後、pT7Blue-1 vector (Merck) とモル比が 4:1 となるように混合し、10 × T4 DNA Ligase buffer 1 μL、T4 DNA Ligase (New England Biolabs) 0.5 U を添加し、滅菌精製水を用いて最終液量を 10 μL に調整した。16°C で 16 時間反応させた後、エレクトロポレーション法により *E. coli* JM109 株に形質転換した。*E. coli*

JM109 株を 50 µg/mL ampicillin、0.023% X-gal、0.6 mM IPTG を含む LB 寒天培地上を用いて、37°Cで一晩培養した。得られた白いコロニーから QIAprep Miniprep (QIAGEN) を用いてプラスミドを回収した。

### 【塩基配列の解析】

第一章第一節の実験材料と方法に従った。

### 【遺伝子プローブの作製】

第二章第一節の実験材料と方法に従った。サザンハイブリダイゼーション用のプローブとして、GNW プライマーと WMI1 プライマーを用いて *C. hyointestinalis* ATCC 35217 株から PCR 増幅した遺伝子を <sup>32</sup>P で標識したものを用いた (Table 8)。また、C-CdtBcom1 プライマーと C-CdtBcom2 プライマーを用いて *C. hyointestinalis* Ch022 株から PCR 増幅した *cdtB* 遺伝子も同様に <sup>32</sup>P で標識し、陽性コントロールとして用いた。コロニーハイブリダイゼーション用のプローブとして、*C. hyointestinalis* Ch022 株から chcdtI-AF プライマーと chcdtI-AR プライマーを用いて *chcdt-IA* 遺伝子、C-CdtBcom1 プライマーと C-CdtBcom2 プライマーを用いて *chcdt-IB* 遺伝子、chcdtI-CF プライマーと chcdtI-CR プライマーを用いて *chcdt-IC* 遺伝子、及び *C. hyointestinalis* ATCC 35217 株から chcdtII-AF プライマーと chcdtII-AR プライマーを用いて *chcdt-IIA* 遺伝子、chcdtII-BF プライマーと chcdtII-BR プライマーを用いて *chcdt-IIB* 遺伝子、chcdtII-CF プライマーと chcdtII-CR プライマーを用いて *chcdt-IIC* 遺伝子を PCR 増幅し、<sup>32</sup>P で標識した (Table 8) (54)。

### 【サザンハイブリダイゼーション】

*C. hyointestinalis* Ch022 株、及び ATCC 35217 株のゲノム DNA 400 ng を *Dra*I で消化し、1.5% アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。第一章第一節の実験材料と方法に従って、泳動像を確認した後、ゲルを 0.25 N HCl で 15 分間、滅菌精製水で 10 分間 2 回、0.5 N NaOH で 30 分間処理した。ゲル内の DNA をナイロンメンブレン (PerkinElmer Life Sciences) に転写した。第二章第一節の実験材料と方法に従ってメンブレンと <sup>32</sup>P 標識遺伝子プローブを反

**Table 10. Primers used for genome walking and sequencing of the *chcdt-II* gene cluster and its flanking regions.**

Name	Sequence (5'-3')	Type	Target	Name	Sequence (5'-3')	Type	Target
cdt-II ramU1	CTCAGATCGTCATCTGCNNNNNNNN	Random	Upstream of <i>cdtA</i>	cdt-II seqR3	TAGTAGGAACAGTGAGCC	Sequence	Upstream of <i>cdtA</i>
cdt-II ramU2	GCTTAATGTCCTAACGGNNNNNNNN	Random	Upstream of <i>cdtA</i>	cdt-II seqR4	TTTAGCGTTGCGTCAC	Sequence	Upstream of <i>cdtA</i>
cdt-II ramU3	GTAGCACCAAAATGTCNNNNNNNN	Random	Upstream of <i>cdtA</i>	cdt-II seqR5	ATCCCCTAACACAGCTCC	Sequence	Upstream of <i>cdtA</i>
cdt-II ramU4	AGTAACTAGCTGCTGAGGNNNNNNNN	Random	Upstream of <i>cdtA</i>	cdt-II seqR6	TTTGCTAGTGGGCGTAAG	Sequence	Upstream of <i>cdtA</i>
cdt-II ramU5	ATTCGGCTAACGTGCTNNNNNNNN	Random	<i>cdtA</i>	cdt-II seqR7	AGCTAAAGTGGTTCCAGC	Sequence	Upstream of <i>cdtA</i>
cdt-II ramR1	CTGCTCGCACAAATAATGCGNNNNNNNN	Random	<i>cdtB</i>	cdt-II seqR8	GCCAAATTGTTGCTATCC	Sequence	Upstream of <i>cdtA</i>
cdt-II ramR2	TGCAAGCAGTTACCTGTGNNNNNNNN	Random	Downstream of <i>cdtC</i>	cdt-II seqR9	CTCGCCACATCCATACTC	Sequence	Upstream of <i>cdtA</i>
cdt-II ramR3	CTCACGAGTTTAAAGCCGNNNNNNNN	Random	Downstream of <i>cdtC</i>	cdt-II seqR10	TTTATTGCTGCTGCAC	Sequence	Upstream of <i>cdtA</i>
cdt-II ramR4	TAGCGTCTTCATTGGCGNNNNNNNN	Random	Downstream of <i>cdtC</i>	cdt-II seqR11	ACTATTGATCATCACGCC	Sequence	Upstream of <i>cdtA</i>
cdt-II ramR5	TAGCATACATGCTTGTGNNNNNNNN	Random	Downstream of <i>cdtC</i>	cdt-II seqF14	ACTAGGGATAACCTAGGG	Sequence	<i>cdtA</i>
cdt-II tartU1	CTCAGATCGTCATCTGC	Target	Upstream of <i>cdtA</i>	cdt-II seqR12	TTACCTGCCATAGCCTAG	Sequence	<i>cdtA</i>
cdt-II tartU2	GCTTAATGTCCTAACGG	Target	Upstream of <i>cdtA</i>	cdt-II seqF15	GTGGAATTGATGCATCGG	Sequence	<i>cdtB</i>
cdt-II tartU3	ATTTCGCTAACGTGCTCC	Target	Upstream of <i>cdtA</i>	cdt-II seqR13	CTGCTAGTATGCTAGACC	Sequence	<i>cdtB</i>
cdt-II tartU4	CTGCTCGCACAAATAATGCG	Target	Upstream of <i>cdtA</i>	cdt-II seqF16	CGGTTGCGTGGATAAAGA	Sequence	<i>cdtC</i>
cdt-II tartU5	TGCAAGCAGTTACCTGTG	Target	<i>cdtA</i>	cdt-II seqF17	CAAAGGTTCCATAGCATAG	Sequence	<i>cdtC</i>
cdt-II tarR1	TAGCATACATGCTTGTG	Target	<i>cdtB</i>	cdt-II seqF18	GAAGTGATGAAGATGAGC	Sequence	<i>cdtC</i>
cdt-II tarR2	GTAGCACCAAAATGTGTC	Target	Downstream of <i>cdtC</i>	cdt-II seqR14	TGTGCTTATACATTGCC	Sequence	<i>cdtC</i>
cdt-II tarR3	CTCACGAGTTTAAAGCCG	Target	Downstream of <i>cdtC</i>	cdt-II seqF19	GACTAAATTGCTACC	Sequence	Downstream of <i>cdtC</i>
cdt-II tarR4	TAGCGTCTTCATTGGCG	Target	Downstream of <i>cdtC</i>	cdt-II seqF20	CGCAATGACTAACGTGCG	Sequence	Downstream of <i>cdtC</i>
cdt-II tarR5	AGTAACTAGCTGCTGAGG	Target	Downstream of <i>cdtC</i>	cdt-II seqF21	GAGTATTTCGTCATCG	Sequence	Downstream of <i>cdtC</i>
cdt-II seqF1	AACTCTATACTGCTTCC	Sequence	Upstream of <i>cdtA</i>	cdt-II seqF22	TATCTCCGATCTCAGCTC	Sequence	Downstream of <i>cdtC</i>
cdt-II seqF2	TTCCAGGAACGAACTGC	Sequence	Upstream of <i>cdtA</i>	cdt-II seqF23	AGCGTCTGGATATTGGC	Sequence	Downstream of <i>cdtC</i>
cdt-II seqF3	ATCCTAGGAGGAACGTAC	Sequence	Upstream of <i>cdtA</i>	cdt-II seqF24	GGACTTATAGAATGCGCG	Sequence	Downstream of <i>cdtC</i>
cdt-II seqF4	CTCAAATACTGTAGCCG	Sequence	Upstream of <i>cdtA</i>	cdt-II seqF25	TAGTAGGAACAGTGAGCG	Sequence	Downstream of <i>cdtC</i>
cdt-II seqF5	TTTAGTGACGCAACGC	Sequence	Upstream of <i>cdtA</i>	cdt-II seqF26	TTGCCGATCTCGACATTGC	Sequence	Downstream of <i>cdtC</i>
cdt-II seqF6	GTACTAGAGGTAAGGCG	Sequence	Upstream of <i>cdtA</i>	cdt-II seqR15	GACACATTGGTGCCTAC	Sequence	Downstream of <i>cdtC</i>
cdt-II seqF7	ATAAGCCAGCAAGAGCTG	Sequence	Upstream of <i>cdtA</i>	cdt-II seqR16	GTAAAGCAGGAGTGAAGC	Sequence	Downstream of <i>cdtC</i>
cdt-II seqF8	GATATAGCAAGCAAGGC	Sequence	Upstream of <i>cdtA</i>	cdt-II seqR17	AGCTCCAAGTTACAGAG	Sequence	Downstream of <i>cdtC</i>
cdt-II seqF9	AAGTGGAGTTGCTCTACC	Sequence	Upstream of <i>cdtA</i>	cdt-II seqR18	GATCATAGCAGGAAGTGC	Sequence	Downstream of <i>cdtC</i>
cdt-II seqF10	CCCATATAAAACACCGCC	Sequence	Upstream of <i>cdtA</i>	cdt-II seqR19	TACCAAGAGCGACACTTG	Sequence	Downstream of <i>cdtC</i>
cdt-II seqF11	ATGAGTATGGATGTGGC	Sequence	Upstream of <i>cdtA</i>	cdt-II seqR20	TTAACGCACCAAGATACG	Sequence	Downstream of <i>cdtC</i>
cdt-II seqF12	TATCGGAGTCGGTCTTAG	Sequence	Upstream of <i>cdtA</i>	cdt-II seqR21	GGTTACTAACATCGGCTGG	Sequence	Downstream of <i>cdtC</i>
cdt-II seqF13	TGCAGGGATACTTAGAGG	Sequence	Upstream of <i>cdtA</i>	cdt-II seqR22	TTATCTGCACTATGGCG	Sequence	Downstream of <i>cdtC</i>
cdt-II seqR1	ATTCGGCTAACGTGCTGC	Sequence	Upstream of <i>cdtA</i>	cdt-II seqR23	CGTTTATCTGCTGC	Sequence	Downstream of <i>cdtC</i>
cdt-II seqR2	CTAGATTATCGGCTACAG	Sequence	Upstream of <i>cdtA</i>	cdt-II seqR24	GTAGATGATGGTAGCAC	Sequence	Downstream of <i>cdtC</i>

応させ、BAS FLA-7000 にて解析した。

### 【ゲノムウォーキング】

*cdtB* 遺伝子の既知塩基配列領域において、未知遺伝子領域が 3'末端側となるようにターゲットプライマー、ターゲットプライマーの 3'末端側に 9 個の N を付加したランダムプライマー、さらにターゲットプライマーより 3'末端側にシークエンスプライマーを設計した (Table 10)。ゲノム DNA 50 ng、ランダムプライマー (10  $\mu$ M) 1  $\mu$ L、2.5 mM dNTP 2  $\mu$ L、10  $\times$  *Ex* Taq buffer 2.5  $\mu$ L、Takara *Ex* Taq 2.5 U を混合し、滅菌精製水を用いて最終液量を 25  $\mu$ L に調整した。94°C 20 秒の変性、30°C 5 秒のアニーリング、74°C 30 秒の伸長反応を 1 サイクル行った。反応液を氷冷した後、反応液 12.5  $\mu$ L にターゲットプライマー (10  $\mu$ M) 2  $\mu$ L、2.5 mM dNTP 4  $\mu$ L、10  $\times$  *Ex* Taq buffer 5.0  $\mu$ L、Takara *Ex* Taq 3.8 U を混合し、滅菌精製水を用いて最終液量を 50  $\mu$ L に調整した。94°C 30 秒の変性、60°C 30 秒のアニーリング、74°C 1 分の伸長反応を 35 サイクル行った。反応液を QIAquick PCR Purification Kit で精製した後、シークエンスプライマーを用いて塩基配列の解析を行った。

### 【コロニーハイブリダイゼーション法】

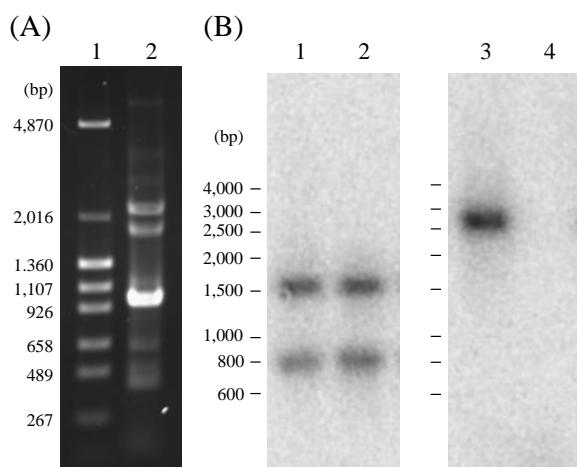
第二章第一節に記載した実験材料と方法に従った。

### 【Accession Number】

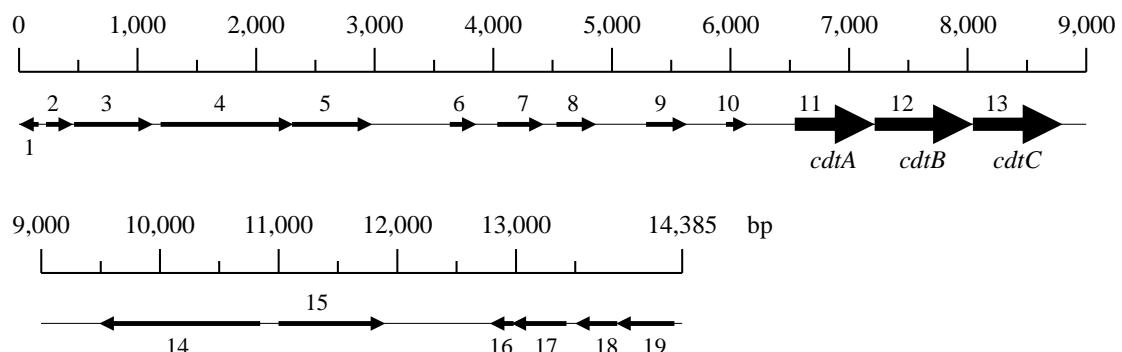
新たに決定した *chcdt-II* 遺伝子の塩基配列は、DDBJ に登録した (Accession Number; AB373951)。

## 実験結果と考察

*C. hyointestinalis* ATCC 35217 株から未知なる *cdt* 様遺伝子の遺伝子断片を得るため、カンピロバクターや大腸菌の CdtB のアミノ酸配列から、保存性の高い領域にデザインされた数種類の縮重プライマー (degenerate primer) を用いて PCR を行った。CdtA と CdtB にそれぞれデザインされた GNW プライマーと WMI1 プライマーを用いて PCR を行った結果、目的



**Fig. 7. Identification of *cdt* variant (*chcdt-II*) genes.** (A) Amplification of *cdt* gene-homologue by PCR using degenerative primers. Lanes: 1, pHY molecular weight marker; 2, *C. hyoilestinalis* strain ATCC 35217<sup>T</sup>. (B) Southern blot analysis. The genomic DNA of *C. hyoilestinalis* strains Ch022 (lanes 1 and 3) and ATCC 35217<sup>T</sup> (lanes 2 and 4) were digested with *Dra*I, electrophoresed, transferred to membranes and hybridized. Lanes 1 and 2 showed hybridization with the gene-probe prepared by a main PCR product in Fig. 3A (approx. 960 bp) and lanes 3 and 4 showed hybridization with the *chcdt-IB* gene of *C. hyoilestinalis* strain Ch022. Approximate molecular size of the marker is indicated on the left.



**Fig. 8. Schematic representation of the *chcdt-II* gene cluster and open reading frames present in its flanking region of *C. hyoilestinalis* strain ATCC 35217<sup>T</sup>.** Bold arrows indicate *chcdt-II* gene cluster and thick arrows indicate ORFs present in its flanking region.

とする約 960 bp の増幅産物を得ることができた (Fig. 7A)。増幅産物の塩基配列を解析したところ、既知の *cdt* 遺伝子と相同性があり、Ch022 株で見出された *cdt* 遺伝子とは 55.7% の相同性しか示さなかった。この新規 *cdt* 様遺伝子の PCR 増幅産物を <sup>32</sup>P で標識し、*Dra*I で処理した *C. hyoilestinalis* Ch022 株、及び ATCC 35217 株のゲノム DNA と反応させたところ、約 750 bp と約 1,500 bp の遺伝子断片と反応した (Fig. 7B lane 1, 2)。一方、Ch022 株で見出された *cdtB* 遺伝子を <sup>32</sup>P で標識し、同様の検討を行ったところ、*C. hyoilestinalis* Ch022 株ゲノム DNA 由来の約 2,500 bp の遺伝子断片とのみ反応し ATCC 35217 株のゲノム DNA とは反応しなかった (Fig. 7B lane 3, 4)。以上の結果より、新規の *cdt* 遺伝子が *C. hyoilestinalis* ATCC 35217 株のみならず Ch022 株にも存在していることが示された。

**Table 11. Characteristics of the ORFs of the *chcdt-II* gene cluster and its flanking regions.**

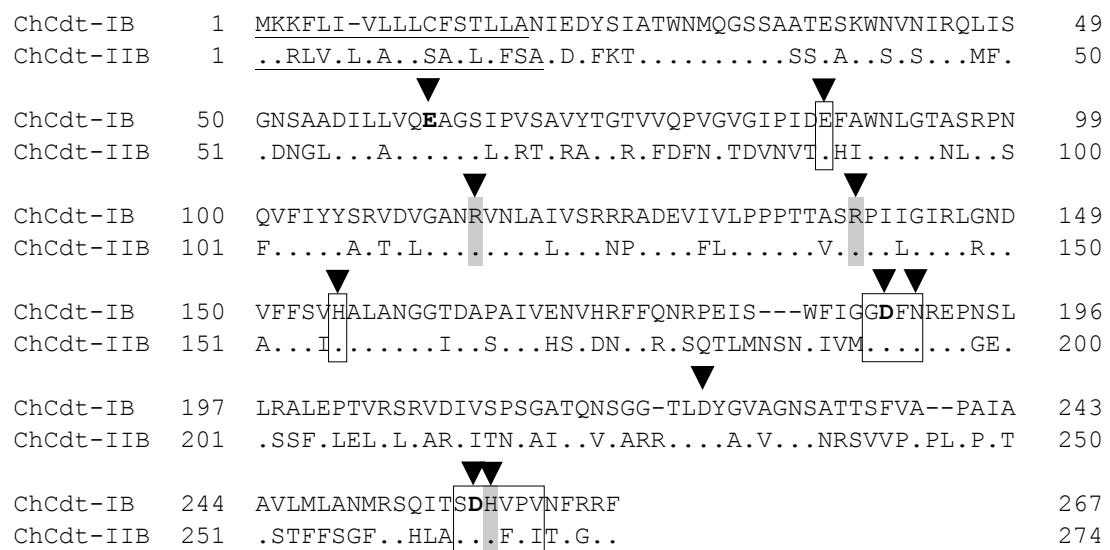
ORF	Gene coordinates and direction	Gene product size (aa)	GC%	Related bacterial proteins		Origin	GenBank accession no.	BLAST E-value (identities), %
				Products				
1	1←168	55	38.1	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	<i>Campylobacter fetus</i> 82-40	CP000487	2e-29 (54/55), 98%	
2	228→458	76	36.4	Phosphoribosylformylglycinamide synthase PurS protein	<i>Campylobacter fetus</i> 82-40	CP000487	2e-33 (62/77), 81%	
3	461→1126	221	34.8	Phosphoribosylformylglycinamide synthase I	<i>Campylobacter fetus</i> 82-40	CP000487	3e-118 (175/222), 79%	
4	1195→2313	372	29.1	Periplasmic protein (putative)	<i>Campylobacter fetus</i> 82-40	CP000487	2e-160 (242/352), 69%	
5	2297→2974	225	32.7	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	<i>Campylobacter fetus</i> 82-40	CP000487	7e-106 (163/226), 72%	
6	3628→3858	76	36.4	Prophage MuSo1 F protein (putative)	<i>Campylobacter hominis</i> ATCC BAA-381	CP000776	2e-11 (25/44), 57%	
7	4028→4417	129	26.2	Prophage MuSo1 F protein (putative)	<i>Campylobacter hominis</i> ATCC BAA-381	CP000776	6e-42 (74/129), 57%	
8	4529→4870	113	36.3	Phage virion morphogenesis protein (putative)	<i>Campylobacter hominis</i> ATCC BAA-381	CP000776	1e-19 (35/65), 54%	
9	5281→5631	116	33.9	Phage tail tape measure protein TP901 family (putative)	<i>Arcobacter butzleri</i> RM4018	CP000361	1e-06 (31/86), 36%	
10	5958→6140	60	31.2	Phage tail tape measure protein TP901 family (putative)	<i>Arcobacter butzleri</i> RM4018	CP000361	0.47 (12/35), 34%	
11	6542→7216	224	35.9	Cytotoxic distending toxin A	<i>Campylobacter lari</i> NCTC 12892	AB509349	4e-31 (53/120), 44%	
12	7217→8041	274	38.2	Cytotoxic distending toxin B (Partial start, Partial stop)	<i>Campylobacter hyoilealis</i> NE-P-CC6	DQ497436	1e-98 (165/169), 98%	
13	8041→8793	250	35.6	Cytotoxic distending toxin C	<i>Campylobacter lari</i> NCTC 12892	AB509349	3e-26 (52/104), 50%	
14	9488←10843	451	39.8	Unknown	<i>Campylobacter fetus</i> 82-40	CP000487	0.0 (378/446), 85%	
15	10994→11899	301	34.9	Integral membrane protein (putative)	<i>Campylobacter fetus</i> 82-40	CP000487	3e-136 (120/151), 79%	
16	12781←12978	65	31.3	Thioesterase superfamily	<i>Campylobacter curvus</i> 525.92	CP000767	2e-22 (38/58), 66%	
17	12962←13429	155	33.1	Glycosyl transferase group 2 family protein	<i>Campylobacter curvus</i> 525.92	CP000767	2e-32 (47/115), 41%	
18	13498←13854	118	27.7	Glycosyl transferase group 2 family protein	<i>Aggregatibacter aphrophilus</i> NJ8700	CP001607	3e-13 (21/61), 34%	
19	13844←14338	164	33.5	Glycosyl transferase group 2 family protein	<i>Campylobacter curvus</i> strain 525.92	CP000767	9e-40 (46/88), 52%	

新たに発見した *cdt* 様遺伝子の塩基配列を元に、ゲノムウォーキング法を用いて *cdt* 様遺伝子の上流領域、下流領域の塩基配列を解析した。14,385 bp の塩基配列を決定した。その結果、*C. hyointestinalis* ATCC 35217 株のゲノム DNA 上に 3 つ連続した遺伝子クラスターを見出した (ORFs11-13 in Fig. 8)。ORF11、12、13 はそれぞれ既知のカンピロバクターの *cdtA* 遺伝子 (22.8-33.6%)、*cdtB* 遺伝子 (52.6-56.6%)、*cdtC* 遺伝子 (24.8-39.5%) と相同性が認められた (Table 11, 12)。ORF12 には、CDT が DNase 活性を発揮する上で必須と考えられるアミノ酸残基、すなわち DNA との結合 (ChCdt-IB の R114, R139, H259 に相当)、金属イオンとの結合 (E61, D187, D258)、及び触媒作用の発現 (E87, G186-N190, H155, D225, S257-V262) に必須と考えられるアミノ酸残基が殆ど保存されていた (Fig. 9)。CDT の各サブユニットの分子量は菌種ごとに若干異なるものの、CdtA サブユニットは 23-30 kDa、CdtB サブユニットは 28-29 kDa、CdtC サブユニットは 19-21 kDa 程度であることが報告されている (23)。ORF11 は 675 bp、ORF12 は 825 bp、ORF13 は 753 bp の遺伝子からなり、推定アミノ酸の分子量はそれぞれ 24.9 kDa、30.2 kDa、28.2 kDa と既知の CDT サブユニットの分子量と似通っている。以上の結果より、ORFs11-13 は新規の *cdt* 遺伝子バリエントであり、ORF11 は *cdtA* 遺伝子、ORF12 は *cdtB* 遺伝子、ORF13 は *cdtC* 遺伝子と考えられる。ORFs11-13 と既知の *cdt* 遺伝子との相同性はあまり高くないよう見えるが、これまでに報告されている *cdt* 遺伝子の塩基配列は菌種間で相同性が低く、特に CdtA、CdtC サブユニットの相同性が低いことが特徴である (20)。また ORFs11-13 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 (Table 12)。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 (ORF11-13) を *chcdt-II* 遺伝子と名付けた。また、*chcdt-II* 遺伝子の上流域には、ファージの遺伝子と相同性を示す遺伝子も見つかり (ORF6-10)、進化の過程で水平伝播によって *C. hyointestinalis* は *chcdt-II* 遺伝子を獲得した可能性が考えられた。

**Table 12. Nucleotide and amino acid sequence homologies of *chcdt-II* genes and ChCDT-II proteins, respectively, with other similar genes and proteins of different bacteria.**

CDT <sup>*</sup> (Accession no.)	Nucleotide sequence homology(%)			Amino acid sequence homology(%)		
	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	<i>cdtC</i>	CdtA	CdtB	CdtC
ChCDT-I (AB218983)	34.0	61.7	40.8	25.0	56.0	24.8
CcCDT (AB182109)	37.1	60.1	45.7	27.0	56.6	33.5
CfCDT (AB274802)	33.7	52.6	45.4	22.8	53.6	34.9
CjCDT (U51121)	39.2	57.8	49.5	27.3	55.4	39.5
ClCDT (AB292351)	37.9	60.7	44.8	25.5	52.6	31.2
CuCDT (AAFJ01000003)	45.0	61.0	43.3	33.6	55.8	37.8

<sup>\*</sup>Ch; *C. hyointestinalis*、Cc; *C. coli*、Cf; *C. fetus*、Cj; *C. jejuni*、Cl; *C. lari*、Cu; *C. upsaliensis*



**Fig. 9. Alignment of CdtB sequence of ChCDT-II and ChCDT-I.** Amino acid sequences are aligned by using the ClustalW program. Dot indicates identical amino acid residue to that of ChCDT-I. Dash indicates deletion of corresponding amino acid residue to ChCDT-I. The signal peptides which were predicted by SignalIP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) are underlined. The bold, boxed and shaded sequences indicate the putative amino acid residues for metal-binding sites (corresponding to ChCdt-IB E61,D187 and D258), catalytic sites (E87, G186-N190, H155, D225 and S257-V262) and DNA binding sites (R114, R139 and H259), respectively (Ref. 23). The dropdown arrows indicate the predicted amino acid residues required for CdtB nuclease activity.

**Table 13. Distribution of *chcdt* genes in *C. hyointestinalis*.**

Bacterium	Strain	Origin	Colony hybridization (A/B/C)	
			<i>chcdt-I</i> <sup>a</sup>	<i>chcdt-II</i> <sup>b</sup>
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	Ch022	Human <sup>c</sup>	+/+/+	+/+/+
	ATCC 35217 <sup>T</sup>	Pig <sup>e</sup>	-/-/-	+/+/+
	SS	Pork	-/-/-	+/+/+
	2038	Cow	-/-/-	+/+/+
	1-1	Pig <sup>e</sup>	+/+/+	+/+/+
	10-1	Gorilla	+/+/+	+/+/+
	87-4	Monkey	+/+/+	+/+/+
	84-6	Elephant	+/+/+	+/+/+
	2003	Cow	+/+/+	+/+/+
	2030	Cow	+/+/+	+/+/+
	2032	Cow	+/+/+	+/+/+
	2033	Cow	+/+/+	+/+/+
	2034	Cow	+/+/+	+/+/+
	2035	Cow	+/+/+	+/+/+
	2037	Cow	+/+/+	+/+/+
	2039	Cow	+/+/+	+/+/+
	2073	Cow	+/+/+	+/+/+
	3014	Cow	+/+/+	+/+/+
	3158	Cow	+/+/+	+/+/+
	3197	Cow	+/+/+	+/+/+
	3477	Cow	+/+/+	+/+/+
	3535	Cow	+/+/+	+/+/+
	3839	Cow	+/+/+	+/+/+
	3857	Cow	+/+/+	+/+/+
<i>Escherichia coli</i>	C600	NA	-/-/-	-/-/-
<i>Campylobacter jejuni</i> <sup>c</sup>	81-176	Human	ND/-/ND	ND/-/ND
<i>Campylobacter coli</i> <sup>c</sup>	ATCC 33559 <sup>T</sup>	Pig	ND/-/ND	ND/-/ND
<i>Campylobacter fetus</i> <sup>c</sup>	ATCC 27374 <sup>T</sup>	Sheep	ND/-/ND	ND/-/ND
<i>Campylobacter lari</i> <sup>c</sup>	ATCC 43675	Human	ND/-/ND	ND/-/ND
<i>Campylobacter upsaliensis</i> <sup>c</sup>	ATCC 43954 <sup>T</sup>	Dog	ND/-/ND	ND/-/ND
<i>Campylobacter helveticus</i> <sup>c</sup>	ATCC 51209 <sup>T</sup>	Cat	ND/-/ND	ND/-/ND
<i>Campylobacter consisus</i> <sup>d</sup>	ATCC 33237 <sup>T</sup>	Human	ND/-/ND	ND/-/ND
<i>Campylobacter curvus</i> <sup>d</sup>	ATCC 35224 <sup>T</sup>	Human	ND/-/ND	ND/-/ND
<i>Campylobacter hominis</i> <sup>d</sup>	ATCC BAA-381 <sup>T</sup>	Human	ND/-/ND	ND/-/ND
<i>Campylobacter mucosalis</i> <sup>d</sup>	ATCC 49352	Pig	ND/-/ND	ND/-/ND

NA, not applicable; ND, not done; +, detected; -, not detected, T: Type strain

<sup>a</sup>Specific probe was prepared from *C. hyointestinalis* strain Ch022.

<sup>b</sup>Specific probe was prepared from *C. hyointestinalis* strain ATCC 35217<sup>T</sup>.

<sup>c</sup>Presence of the *cdt* genes was reported.

<sup>d</sup>Presence of the *cdt* genes was not reported.

<sup>e</sup>The patient and animals had diarrhea and proliferative enteritis, respectively.

*C. hyointestinalis* がどの程度の割合で *chcdt-I* 遺伝子と *chcdt-II* 遺伝子を保有しているかどうかを調べるため、それぞれの *cdtA* 遺伝子、*cdtB* 遺伝子、*cdtC* 遺伝子を <sup>32</sup>P で標識し、24 株の *C. hyointestinalis* を用いてコロニーハイブリダイゼーション法により調べた。その結果、*chcdt-IA*、-1B、-1C 遺伝子は 21 株 (88%)、*chcdt-IIA*、-IIB、IIC 遺伝子は全ての株と反応した

(Table 13)。一方、陰性コントロールとして *E. coli* C600 株を用いた場合、いずれの遺伝子プローブも反応しなかった。また、*chcdt-IB* 遺伝子プローブ、*chcdt-IIB* 遺伝子プローブは Table 13 に示す *C. hyointestinalis* 以外のカンピロバクターとは反応しなかった。以上の結果より、他のカンピロバクターが保有する *cdt* 遺伝子と同様に、*C. hyointestinalis* の *chcdt-II* 遺伝子は菌種特異的、かつ菌種内に普遍的に保存されている遺伝子である可能性が示された。遺伝子検査法を開発する上で、*chcdt-II* 遺伝子は標的遺伝子に適していると考えられる。また、2 種類の *cdt* 遺伝子を同時に保有する株が 88% も存在した (Table 13)。*C. hyointestinalis* が 2 種類の *cdt* 遺伝子を保有する意義、さらにはヒトに病気を引き起こす上で 2 種類の CDT が担う役割について興味が持たれる。

### 第三節 *C. hyointestinalis* が產生する ChCDT-II の活性評価

第二節で新たに *C. hyointestinalis* から *cdt* 遺伝子 (*chcdt-II*) を見出したことにより、*C. hyointestinalis* には少なくとも 2 種類の *cdt* 遺伝子が存在することが示された。2 種類の CDT (ChCDT-I と ChCDT-II) の推定アミノ酸配列は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。そこで本節では、各種 CdtB サブユニットのリコンビナント蛋白、及びそれらに対する抗血清を用いて、2 種類の ChCDT の抗原性の違いを評価した。また、ChCDT-II の生物活性を評価するため、ChCDT-II をリコンビナント蛋白として作製し、その生物活性を解析した。さらに、第二章第一節で見出された *C. hyointestinalis* のもつ細胞膨化活性等の細胞毒性が ChCDT-II に由来するかどうかを検討した。

#### 実験材料と方法

##### 【使用した菌株と培養条件】

*C. hyointestinalis* Ch022 株、ATCC 35217 株、*C. jejuni* 81-176 株、K328 株、*E. coli* BL21(DE3) 株を使用した。第一章第一節の実験材料と方法に従って菌株を培養した。

### 【リコンビナント蛋白発現ベクターの調製】

ChCdt-IIA、ChCdt-IIB、ChCdt-IIC サブユニットの発現ベクターを作製するため、*C. hyointestinalis* ATCC 35217 株から chcdtII-AF2 プライマーと chcdtII-AR2 プライマーを用いて chcdt-IIA 遺伝子、chcdtII-BF2 プライマーと chcdtII-BR2 プライマーを用いて chcdt-IIB 遺伝子、chcdtII-CF2 プライマーと chcdtII-CR2 プライマーを用いて chcdt-IIC 遺伝子を PCR で増幅した (Table 8)。PCR 産物は、*Eco*RI と *Hind*III、もしくは *Eco*RI と *Sac*I (いずれも NEW England Biolabs) で処理した後、改変型 pET28a+ベクター (Novagen) の *Eco*RI サイトの下流に組み込んだ。この改変型 pET28a+ベクターは HT-pET と名付けられ、*Eco*RI サイトの上流に His タグ (6 × His) と TEV プロテアーゼをコードする遺伝子が人為的に挿入されている (48, 55)。また、pET28a+ベクターのマルチクローニングサイトの *Xho*I の下流に元来コードされている終始コドンを利用した。ChCDT-II ホロ毒素の発現ベクターを作製するため、chcdtII-ABCF プライマーと chcdtII-ABCR プライマーを用いて *C. hyointestinalis* ATCC 35217 株から chcdt-IIABC 遺伝子を PCR で増幅した (Table 8)。PCR 産物は、*Bsa*I と *Bam*HI (NEW England Biolabs) で処理した後、改変型 pET28a+ベクター (Novagen) の *Bam*HI サイトの上流に組み込んだ。この改変型 pET28a+ベクターは TH-pET と名付けてられ、*Bam*HI サイトの下流に TEV プロテアーゼ、His タグ (6 × His) をコードする遺伝子と終止コドンが人為的に挿入されている (48, 55)。

### 【リコンビナント蛋白の調製】

各種リコンビナントプラスミドを *E. coli* BL21(DE3)株に形質転換し、30 μg/mL のカナマイシンを含む LB 培地で 37°C、数時間培養した。濁度 (OD<sub>600</sub>) が 0.3-0.6 に達した後、終濃度が 0.1-1.0 mM となるように IPTG を添加し、さらに 37°C で 3 時間、培養した。大腸菌を遠心分離 (6,000 g、15 分) によって回収し、PBS で 3 回洗浄した後、Astrason ultrasonic processor (Heat System-Ultronics) を用いて氷上で大腸菌を破碎した。再度遠心分離 (48,000 g、20 分) を行い、可溶性分画と不溶性分画を分離し、それぞれの分画を 15% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE を行い、目的の蛋白の発現を確認した。尚、染色はクマシ

一ブリリアントブルー (CBB) を用い、脱色は 5%の酢酸を含むメタノール溶液を用いて行った。rChCdt-IIIB を精製するため、0.22  $\mu\text{m}$  のフィルターで濾過した可溶性分画を Ni-Sepharose カラム (GE Healthcare) に通過させ、150 mM NaCl、を含む 50 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.0) で洗浄後、150 mM NaCl、200 mM イミダゾールを含む 50 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.0) で溶出した。一方、rChCdt-IIA と rChCdt-IIC は不溶性分画に見出されたことから、不溶性分画を PBS で懸濁し 15%ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で泳動後、目的の分子量の大きさ (約 25 kDa と 28 kDa) をゲルから切り出し、ウサギに免疫した。ChCDT-II ホロ毒素は、ChCDT-II の発現誘導を行った *E. coli* BL21(DE3)株の可溶性分画を 0.22  $\mu\text{m}$  フィルター (Iwaki) 濾過液を粗毒素液として、細胞毒性試験に供した。

### 【抗 ChCDT-II 抗体の調製】

ChCdt-IIA、ChCdt-IIIB、ChCdt-IIC に対する抗体をそれぞれ作製するため、8 週齢の雄ニュージーランドホワイトウサギ (Oriental Yeast) に精製 rChCdt-IIA、rChCdt-IIIB、rChCdt-IIC を免疫した。すなわち、約 200  $\mu\text{g}$  相当の rChCdt-IIA、もしくは ChCdt-IIC を含むアクリルアミドゲル、もしくは rChCdt-IIIB 370  $\mu\text{g}$  を 1 回分の免疫抗原とし、アジュバントとして初回免疫には Freund complete adjuvant (Becton, Dickinson and Company)、2 回目以降の免疫には Freund incomplete adjuvant (Becton, Dickinson and Company) を使用した。2 週間おきに 7 回、もしくは 8 回、肩への皮下投与、後脚ももへの筋肉内投与を行った。最終免疫後、rChCdt-IIA、もしくは ChCdt-IIC を含むアクリルアミドゲルを筋肉内投与、もしくは rChCdt-IIIB 100  $\mu\text{g}$  を静脈内投与し、3-5 日後、ケタミン/キシラジン麻酔下で採血を行った。遠心分離 (1,500 g、10 分) によって得られた血清は-20°C で保存した。ポリクローナル抗体を精製するため、血清を rProtein A Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) に通過させた。PBS でカラムを洗浄後、150 mM NaCl を含む 20 mM Glycine-HCl バッファー (pH 3.0) を用いてカラムから抗体を溶出させ、直ちに 1/10 量の 1 M Tris-HCl (pH 7.8) バッファーと混合することで pH を中和した。尚、ウサギへの免疫は、大阪府立大学動物実験委員会の承認を得て、大阪府立大学動物実

験委員会規定に則って実験を行った。

### 【オクタロニー2 重拡散法】

rChCdt-IB、抗 rChCdt-IB 血清は、Worada らの方法に従って調製した (48)。オクタロニー2 重拡散法は、Yutsudo らの方法 (56) に従った。すなわち、150 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.0) で溶解させた 1.2% Noble agar (Becton, Dickinson and Company) を加温し、スライドガラス上でゲルを固めた。直径 5 mm 程の円形状にゲルをくりぬき、15  $\mu$ L の抗血清、もしくは 500 ng の精製リコンビナント蛋白を滴下した。湿润箱内でサンプルを 24 時間インキュベーションし、0.5% CBB 液で染色後、脱色液 (50% メタノール/10% 氷酢酸) で十分に脱色した。

### 【ウエスタンブロッティング】

第一章第一節の実験材料と方法に従って調製した菌体破碎液と 2  $\times$  サンプルバッファー [10% 2-Mercaptoethanol、4% SDS、10% sucrose、0.004% Bromophenol blue を含む 0.125 M Tris-HCl (pH=6.8)] を等量で混合し、95°C で 10 分間の加熱処理を行い、10  $\mu$ L を 15% アクリルアミドゲルを含む SDS-PAGE で泳動した。泳動後トランスプロット SD セル (Bio-Rad) を用いてゲルを PVDF メンブレン (孔径 0.45  $\mu$ m、Merck) に転写した後、4°C でメンブレンを 3% スキムミルク (MEGMILK)/TBS でブロッキングした後、0.4% ECL Prime Blocking Reagent で 5,000 倍希釈した抗 rChCdt-IIA 血清、もしくは抗 ChCdt-IIB 血清を一次抗体、10,000-20,000 倍希釈した HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (GE Healthcare) を二次抗体として、それぞれ 2 時間、室温で反応させた。メンブレンを phosphate buffered saline with Tween 20 (PBS-T) で十分に洗浄した後、ECL Prime (GE Healthcare) を用いて発色させた。

### 【細胞毒性試験】

第二章第一節の実験材料と方法に従った。

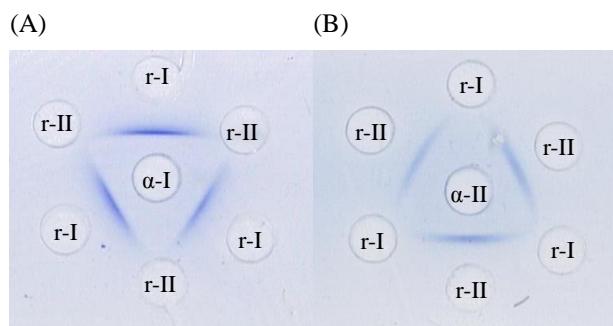
### 【細胞毒性の中和実験】

PBS を用いて *C. hyoilestinalis* ATCC 32517 株の菌体破碎液は 512-2,048 倍、*C. hyoilestinalis* Ch022 株の菌体破碎液は 16-64 倍、*C. jejuni* 81-176 株の菌体破碎液は 32-128

倍、ChCDT-II ホロ毒素発現ベクターを形質転換した *E. coli* BL21(DE3)株の菌体破碎液は 4-32 倍希釈した。各種菌体破碎液 5  $\mu$ L と抗 rChCdt-IIA 抗体 5  $\mu$ g、抗 rChCdt-IIB 抗体 4.5  $\mu$ g、もしくは抗 rChCdt-IIC 抗体 5.0  $\mu$ g を混合し、最終液量を 10  $\mu$ L として 37°C で 1 時間、プレインキュベーションした。HeLa 細胞を 96 穴プレートに  $5.0 \times 10^3$  cells/100  $\mu$ L で播種した後、サンプル 10  $\mu$ L を添加した。37°C、5% CO<sub>2</sub> を含む空気中で 72 時間培養した後、ディフ・クイック染色を行い、顕微鏡下で細胞の形態を撮影した。

### 実験結果と考察

2 種類の ChCDT (ChCDT-I、ChCDT-II) の抗原性の違いを評価するため、CDT のサブユニットのうち、2 種類の ChCDT 間で最も相同性の高いサブユニットである CdtB に対する抗血清を作製した。オクタロニ一二重拡散法により、各種リコンビナント蛋白と各種抗血清の反応性を調べた結果、抗 rChCdt-IB 血清は rChCdt-IB と反応し、rChCdt-IIB とは反応しなかった (Fig. 10A)。同様に抗 rChCdt-IIB 血清も rChCdt-IIB と反応し、rChCdt-IB とは反応しなかったことから (Fig. 10B)、rChCdt-IB と rChCdt-IIB はエピトープを殆ど共有していないと考えられた。ChCdt-IB と ChCdt-IIB の推定アミノ酸配列の相同性は 56.0% であり (Table 12)、2 種類の ChCDT の抗原性は大きく異なると考えられた。



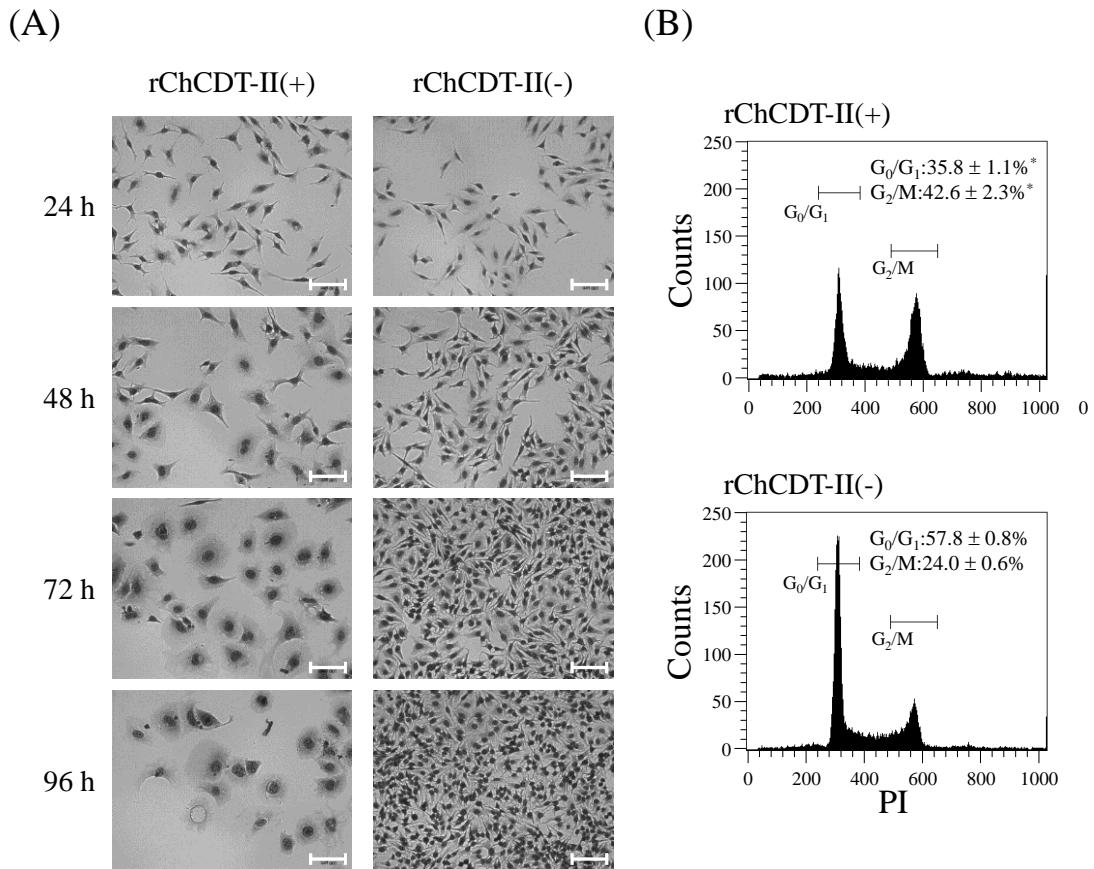
**Fig. 10. Immunological relation between rChCdt-IB and rChCdt-IIB.** Ouchterlony double gel diffusion tests were carried out with purified rChCdt-IB (r-I), purified rChCdt-IIB (r-II), anti-rChCdt-IB serum (α-I) and anti-rChCdt-IIB serum (α-II).

ChCDT-II の生物学的性状を調べるため、*chcdt-II* 遺伝子を発現ベクターに組み込み、*E. coli* BL21(DE3)株に形質転換した。リコンビナント蛋白の発現誘導後、*E. coli* BL21(DE3)株の滅

菌菌体破碎液（粗毒素液）を HeLa 細胞に添加したところ、培養 48 時間後には細胞膨化、96 時間後には死細胞も観察された (Fig. 11A)。一方、目的遺伝子を入れていないコントロールベクターを用いて同様の検討を行ったところ、細胞の形態に何ら変化は認められなかった (Fig. 11A)。また、培養 24 時間後の細胞周期の分布を調べたところ、rChCDT-II を含む粗毒素液では、陰性コントロールと比べて、G<sub>2</sub>/M 期で停止している細胞の割合が有意に多かつた (Fig. 11B)。以上の結果より、rChCDT-II は他の CDT と同様の生物活性を有していることが明らかとなった。

*C. hyointestinalis* が生物活性のある ChCDT-II を発現しているかどうかを評価するため、抗 ChCdt-IIA 血清、もしくは抗 ChCdt-IIB 血清を用いたウエスタンプロット法により、*C. hyointestinalis* の滅菌菌体破碎液から ChCdt-IIB の検出を試みた。2 種類の *cdt* 遺伝子を保有する *C. hyointestinalis* Ch022 株、*chcdt-II* 遺伝子のみを保有する *C. hyointestinalis* ATCC 35217 株 (Table 13) のどちらの滅菌菌体破碎液からも ChCdt-IIA の分子量に相当する 25 kDa 付近 (Fig. 12)、及び ChCdt-IIB の分子量に相当する 30 kDa 付近に反応が認められた (data not shown)。一方、陰性コントロールとして用いた *C. jejuni* 81-176 株、K328 株の滅菌体破碎液とは反応しなかった (Fig. 12、data not shown)。以上の結果より、得られた抗体はそれぞれ ChCdt-IIA と ChCdt-IIB に特異的に結合する抗体であり、また *C. hyointestinalis* Ch022 株、ATCC 35217 株とも ChCdt-IIA、ChCdt-IIB を産生していることが明らかとなった。

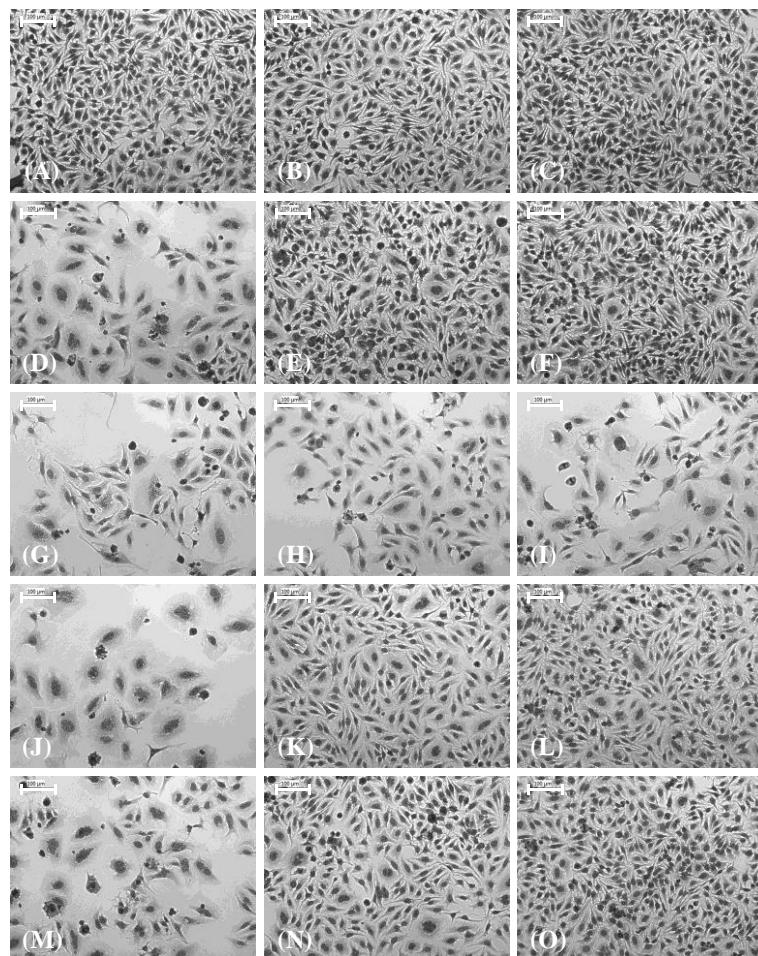
次に *C. hyointestinalis* の CDT 活性が抗 ChCDT-II 抗体で中和されるかどうかを調べるため、*C. hyointestinalis* の滅菌菌体破碎液を抗 rChCdt-IIA 抗体、抗 rChCdt-IIB 抗体もしくは抗 rChCdt-IIC 抗体と混合し、HeLa 細胞に添加した。*C. hyointestinalis* Ch022 株及び ATCC 35217 株は HeLa 細胞の膨化を引き起こしたが (Fig. 13J、M)、抗 ChCdt-IIA 抗体、もしくは抗 ChCdt-IIC 抗体と共に培養することでその細胞膨化活性は完全に失われた (Fig. 13K、L、N、O)。一方、これら 2 株の細胞膨化活性は、抗 ChCdt-IIB 抗体では中和されなかった (data not shown)。陽性コントロールとして rChCDT-II を含む粗毒素液を使用したところ、抗 rChCdt-IIA



**Fig. 11. Recombinant ChCDT-II activity on HeLa cells.** HeLa cells were incubated with the filter-sterilized lysates of recombinant *E. coli* strain BL21(DE3) with/without the *chcdt-IIABC* genes (ORF 11-13 in Fig. 8). (A) After 24-96 h cultivation, HeLa cells were observed by microscopy. Magnification  $\times 100$ . Scale bars correspond to 100  $\mu\text{m}$ . (B) After 24 h cultivation, cells were stained with propidium iodide and cell cycle distribution of about  $10^4$  cells was determined by flow cytometry. Average percentages and the standard deviations of cells in each cell cycle phase calculated with three independent experiments are indicated.



**Fig. 12. Detection of ChCdt-IIA of *C. hyointestinalis* wild type strain by western blotting.** Lanes: M, ECL DualVue Western Blotting Markers (GE Healthcare); 1, purified rChCdt-IA; 2, purified rChCdt-IB; 3, purified rChCdt-IC; 4, purified rChCdt-IIA; 5, purified rChCdt-IIB; 6, purified rChCdt-IIC; 7 and 8, sonic lysate of *C. hyointestinalis* (strain Ch022 and ATCC 35217<sup>T</sup>) 9 10, sonic lysate of *C. jejuni* (81-176 and K328). The experiment was carried out at least thrice.



**Fig. 13. Neutralization of CDT activity by anti-rChCdt-II subunit antibodies.** PBS (A-C) and sonic lysates of bacteria strains (D-F, recombinant *E. coli* carrying the TH-pET28(a) vector with *chcdt-IIABC* genes; G-I, *C. jejuni* 81-176; J-L, *C. hyoilestinalis* ATCC35217<sup>T</sup>; M-O, *C. hyoilestinalis* Ch022) were pre-incubated with PBS (A, D, G, J and M), anti-ChCdt-IIA antibody (B, E, H, K and N) or anti-ChCdt-IIC antibody (C, F, I, L and O), respectively, and co-cultured with HeLa cells for 72 h. Scale bars correspond to 100  $\mu$ m in all images. Magnification  $\times 100$ .

抗体、抗 rChCdt-IIC 抗体は rChCDT-II 粗毒素液の細胞膨化活性を完全に中和することができたが (Fig. 13D-F)、条件によっては抗 rChCdt-IIB 抗体で rChCDT-II の細胞膨化活性を中和することができなかつた (data not shown)。陰性コントロールとして *C. jejuni* 81-176 株の菌体破碎液を用いたところ、抗 rChCdt-IIA 抗体、抗 rChCdt-IIC 抗体ではこの株の細胞膨化活性は中和されなかつた (Fig. 13G-J)。以上の結果より、*C. hyoilestinalis* ATCC 35217 株で見られる HeLa 細胞に対する細胞膨化活性は ChCDT-II によるものであり、抗 rChCdt-IIA 抗体、抗 rChCdt-IIC 抗体は ChCDT-II の細胞膨化活性を特異的に中和することができる事が明らか

かとなった。一方、*C. hyointestinalis* Ch022 株の HeLa 細胞に対する細胞膨化活性の殆どが ChCDT-II によるものであると考えられた。なお、rChCDT-II 粗毒素液の細胞膨化活性を抗 rChCdt-IIIB 抗体で殆ど中和できなかった理由は少なくとも 3 つの可能性が考えられる。今回使用した抗 ChCdt-IIIB 抗体はポリクローナル抗体であり、ChCDT-II が毒素活性を発揮する上で重要な部位に対して結合する抗体が得られていない、もしくはその抗体の含量が低い可能性が考えられる。一般的に CDT は CdtA、B、C の 3 つのサブユニットが会合することで細胞膨化活性を発揮することができるとされている (20)。rChCdt-IIIB を免疫することで調製した抗 ChCdt-IIIB 抗体が結合するエピトープは、ChCDT-II のホロ毒素の状態では埋もれてしまった可能性がある。また、CDT が細胞表面の受容体に結合し、核内に移行する際、抗 ChCdt-IIIB 抗体が細胞内で乖離してしまった可能性が考えられる。

#### 第四節 小括

本章では人獣共通感染症の原因菌の一つとして考えられている *C. hyointestinalis* に注目して研究を進めた。臨床分離株である *C. hyointestinalis* Ch022 株の *cdt* 遺伝子の全塩基配列の情報は既に報告されていたが (48)、それ以外の *C. hyointestinalis* の分離株が *cdt* 遺伝子を保有する可能性、及びその塩基配列は殆ど報告されていなかった。第一章で *C. hyointestinalis* の *cdt* 遺伝子の保有率についてコモンプライマーを用いた PCR で評価したところ、21 株 (88%) が陽性であり、3 株 (12%) が陰性であった (Table 3)。本章第一節で、PCR 陰性であった 3 株の *C. hyointestinalis* も標的細胞を膨化させるといった CDT に特有の細胞毒素活性を有することを見出し、これら 3 株にも *cdt* 様遺伝子が存在する可能性が考えられた。さらに本章第二節では、これら 3 株には既知の *cdt* 遺伝子 (*chcdt-I* 遺伝子) と配列が大きく異なる新規の *cdt* 遺伝子 (*chcdt-II* 遺伝子) が存在することを見出すことができた。24 株の *C. hyointestinalis* を用いて *chcdt-II* 遺伝子の保有状況を調べたところ、全ての株で *chcdt-II* 遺伝子が検出されたことから (Table 13)、*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

方が標的遺伝子として適していると考えられる。*chcdt-I* 遺伝子、*chcdt-II* 遺伝子のコモンプライマーの結合領域を解析したところ、*chcdt-IB* 遺伝子とプライマーのミスマッチが 4 塩基であったのに対し、*chcdt-IIB* 遺伝子とプライマーのミスマッチは 7 塩基であった (data not shown)。コモンプライマーで *chcdt-IIB* 遺伝子を増幅することは難しく、今後、*chcdt-IIB* 遺伝子を標的とした特異プライマーを開発することにより、より精度の高いカンピロバクターの遺伝子検査法の開発が可能となる。

本章第三節の検討の結果、ChCDT-IIも他の CDT と同様に標的細胞の細胞周期を G<sub>2</sub>/M 期で停止させ、細胞膨化や細胞死を誘導することが示された。また、*chcdt-II* 遺伝子を保有する *C. hyointestinalis* Ch022 株と ATCC 35217 株は ChCDT-II を発現し、これら菌株が有する HeLa 細胞への毒素活性は主に ChCDT-II に起因することを明らかとした。これまでの検討では、*C. hyointestinalis* Ch022 株は *chcdt-I* 遺伝子を保有し、ウエスタンブロッティングにより ChCdt-IB の発現を確認できたが、この株が有する HeLa 細胞への毒素活性は抗 ChCdt-IB 抗体、及び抗 ChCdt-IC 抗体では中和できなかった (data not shown)。本章では、この株が ChCDT-I とはアミノ酸配列、抗原性が異なる新規の CDT (ChCDT-II) を產生していることを見出した。また、*C. hyointestinalis* Ch022 株の HeLa 細胞に対する毒素活性は抗 ChCdt-IIA 抗体と抗 ChCdt-IIC 抗体で中和された (Fig. 13)。本章で得られた結果より、*C. hyointestinalis* Ch022 株が細胞毒素活性を發揮する上で ChCDT-II は大きな役割を担っていると考えられる。ChCDT-I、ChCDT-II のアミノ酸配列が大きくことなることから、2 種類の CDT が認識する受容体、標的細胞が異なる可能性がある。今後、HeLa 細胞以外の細胞を用いて同様の検討を行うと共に、ChCDT-I、ChCDT-II の発現量を評価し、2 種類の CDT が担う役割を明らかとすることが望まれる。

### 第三章 カンピロバクター 6 菌種の高感度な菌種同定法の開発

第二章で *C. hyoilealis* には少なくとも 2 種類の *cdt* 遺伝子 (*chcdt-I*, *chcdt-II*) が存在し、*chcdt-II* 遺伝子は *C. hyoilealis* 内に普遍的に存在する可能性を示した。すなわち、*chcdt-II* 遺伝子を增幅できるようにプライマーを設計することで、検出感度の高い遺伝子検査法の開発に繋がることが期待できる。そこで本章では、*C. hyoilealis* に関しては *chcdt-II* 遺伝子を標的とし、ヒトの胃腸炎の起因菌として認識されているカンピロバクターのうち、主要な 6 菌種 (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. hyoilealis*, *C. lari*, *C. upsaliensis*) を高感度、かつ特異的に検出可能な Multiplex PCR 法の開発を行った。

#### 実験材料と方法

##### 【使用した菌株と培養条件】

本節の実験に使用した菌株を Table 3 に示した。カンピロバクターの類縁菌である *Wolinella succinogenes* は馬血液寒天培地を用いて、37°C、微好気条件 (5% O<sub>2</sub>, 7.5% CO<sub>2</sub>, 7.5% H<sub>2</sub>, 80% N<sub>2</sub>) 下で 2 日以上培養した。その他の菌株は、第一章の実験材料と方法に従って培養した。

##### 【鋳型 DNA の調製】

第一章第一節の実験方法に従った。

##### 【MultiplexPCR 法の開発】

*C. jejuni* ATCC 33560 株、*C. coli* ATCC 33569 株、*C. fetus* ATCC 27374 株、*C. hyoilealis* ATCC 35217 株、*C. lari* ATCC 43675 株、*C. upsaliensis* ATCC 43954 株を Multiplex PCR の標準菌株、*E. coli* C600 株を陰性コントロールとして本実験に供した。*E. coli* C600 株を各種標準菌株の *cdtB* 遺伝子配列を比較し、菌種間で特異性の高い領域に対してプライマーを設計し、また、增幅断片の大きさで菌種を鑑別できるようにした (Table 14)。反応液として、プライマー混合液 13.8 μL、鋳型 DNA 1-6 μL、Multiplex PCR Mix 1 (Takara) 0.2 μL、Multiplex PCR Mix 2 (Takara) 20 μL を混合し、滅菌精製水を用いて最終液量を 40 μL に調整した。各種プライ

マーの最終濃度、及び反応条件は Table 14 に示した。

#### 【PCR の検出下限値の評価】

第一章第一節の実験材料と方法に従って 1  $\mu$ L 中に  $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$  cfu に相当する菌数が含まれるカンピロバクターの鑄型 DNA を調製し、1  $\mu$ L を鑄型 DNA として MultiplexPCR を行った。

#### 【複数菌種の同時検出】

1  $\mu$ L 中に  $10^4$  cfu に相当する菌数が含まれるカンピロバクターの鑄型 DNA を調製し、6 菌種の鑄型 DNA をそれぞれ等量ずつ混合し、6  $\mu$ L を鑄型 DNA として MultiplexPCR を行った。

**Table 14. PCR primers used for the *cdtB* gene-based multiplex PCR.**

Name	Sequence (5'-3')	Target	Amplicon (bp)	Concentration ( $\mu$ M)
Cj-spBU5	ATCTTTAACCTTGCTTTGC	<i>C. jejuni</i>	714	0.38
Cj-spBR6	GCAAGCATTAAAATCGCAGC			
Cf-spBU6	GGCTTGCAAAACCAGAAG	<i>C. fetus</i>	553	0.19
Cf-spBR3	CAAGAGTTCCCTTAAACTC			
Cc-spBU10	CTGTATCAAGACCTAGCTC	<i>C. coli</i>	433	0.38
Cc-spBR9	TATAAAGCTGCAGTGTGG			
Cu-spBU5	GCCTTAGCTTCTTG	<i>C. upsaliensis</i>	342	0.094
Cu-spBR5	CATCGGCTTGGACGCGAC			
ChII-spBU8	CCTAGTAGCGCTACTTAG	<i>C. hyoilealis</i>	215	0.13
ChII-spBR8	CAAATACCCTACCTGTAGC			
Cl-spBU4	GTATCCATGCTTATCAAGA	<i>C. lari</i>	141	0.19
Cl-spBR4	GTAGGCCTATAAGAGAAC			

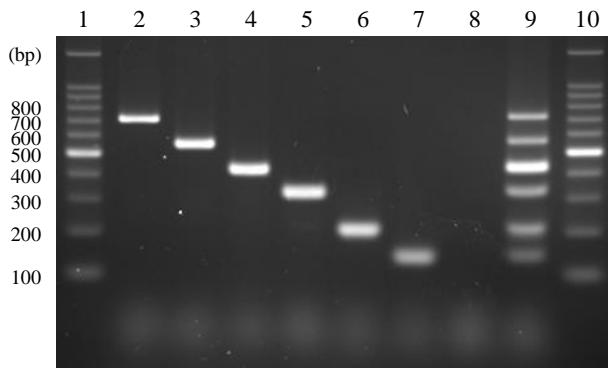
#### 実験結果と考察

6 菌種のカンピロバクター (*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus*、*C. hyoilealis*、*C. lari*、*C. upsaliensis*) の *cdtB* 遺伝子を比較解析し、それぞれの菌種に特異的なプライマーを設計した。これらプライマーを組み合わせ、6 菌種を同時に検出可能な Multiplex PCR 法の構築を試みた。各菌種の標準菌株の鑄型 DNA を用いてプライマーの種類と濃度、及び反応条件を検討

し、最終的に決定した条件を Table 14 に示した。開発した Multiplex PCR を用いて標的とする 6 菌種のカンピロバクターから *cdtB* 遺伝子の增幅を試みたところ、*C. jejuni* から 714 bp、*C. fetus* から 553 bp、*C. coli* から 433 bp、*C. upsaliensis* から 342 bp、*C. hyoilealis* から 215 bp、及び *C. lari* から 141 bp の菌種特異的な增幅断片が得られた (Fig. 14 lanes 2-7)。得られた增幅断片の塩基配列を決定したところ、いずれも報告のある *cdtB* 遺伝子と相同性があり、*cdtB* 遺伝子が特異的に增幅されていることを確認できた (data not shown)。また、陰性コントロールとして用いた *E. coli* C600 株からは PCR 産物が得られなかった (Fig. 14 lanes 8)。

Multiplex PCR 法の感度を評価するため、標的とするカンピロバクター 6 菌種 143 株から調製した鑄型 DNA に対して Multiplex PCR 法を適用した。その結果、全ての株から菌種特異的な增幅断片が得られた (Table 15)。また、特異度を評価するため、標的とする 6 菌種以外のカンピロバクター、及びその他の病原細菌 34 株の鑄型 DNA を用いて同様の検討を行ったところ、いずれの菌株からも PCR 産物は得られなかった (Table 15)。以上の結果より、開発した Multiplex PCR 法は、感度、特異性ともに 100% であり、菌種同定法として有用であると考えられた。

開発した Multiplex PCR 法には 12 種類のプライマーを使用しているため、プライマー同士の競合がおこる恐れがある。本 Multiplex PCR の検出下限値を実験的に算出したところ、各菌種から PCR 産物を得るのに PCR チューブあたり  $10^2$ - $10^3$  cfu の菌数が必要であった (data not shown)。検出下限値はあまり低くなかったが、検体から直接、カンピロバクターを検出できる可能性はある。また、カンピロバクターの混合感染を想定し、同時に複数菌種を検出できるかどうかを評価するため、標的とする 6 菌種のカンピロバクターの鑄型 DNA を混合し、Multiplex PCR を行った結果、それぞれの菌種に特異的な増幅産物が得られ、複数菌種を同時に検出できることを示すことができた (Fig. 14 lane 9)。複数菌種の同時検出は標的細菌の菌数、他菌種の存在の有無に影響されることが予測されるため、今後、本 Multiplex PCR 法を用いて患者便検体や食品検体から直接、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。



**Fig. 14. Detection of the *cdtB* gene of 6 *Campylobacter* spp. by the *cdtB* gene-based multiplex PCR.** Lanes: 1 and 10, 100-bp ladder; 2, *C. jejuni* (strain ATCC 33560<sup>T</sup>); 3, *C. fetus* (ATCC 27374<sup>T</sup>); 4, *C. coli* (ATCC 33559<sup>T</sup>); 5, *C. upsaliensis* (ATCC 43954<sup>T</sup>); 6, *C. hyoilealis* (ATCC 35217<sup>T</sup>); 7, *C. lari* (ATCC 43675); 8, *E. coli* (C600); 9, *C. jejuni*, *C. fetus*, *C. coli*, *C. upsaliensis*, *C. hyoilealis* and *C. lari*.

**Table 15. Detection of the *cdtB* gene by the *cdtB* gene-based multiplex PCR.**

Bacterial strain (n <sup>a</sup> )	Multiplex PCR pattern (n)
<i>Campylobacter jejuni</i> (38)	Cj (38)
<i>Campylobacter coli</i> (39)	Cc (39)
<i>Campylobacter fetus</i> (12)	Cf (12)
<i>Campylobacter upsaliensis</i> (22)	Cu (22)
<i>Campylobacter hyoilealis</i> (24)	Ch (24)
<i>Campylobacter lari</i> (7)	Cl (7)
<i>Campylobacter helveticus</i> (2)	—
<i>Campylobacter mucosalis</i> (1)	—
<i>Campylobacter hominis</i> (1)	—
<i>Campylobacter consisus</i> (2)	—
<i>Campylobacter curvus</i> (1)	—
<i>Arcobacter</i> spp. (7)	—
<i>Escherichia</i> spp. (7)	—
<i>Helicobacter</i> spp. (5)	—
<i>Salmonella</i> spp. (6)	—
<i>Shigella</i> app. (7)	—
<i>Providencia alcalifaciens</i> (1)	—
<i>Wolinella succinogenes</i> (1)	—

—, Specific PCR product was not obtained

<sup>a</sup>Number in parentheses indicates the number of strains analyzed.

## 総 括

カンピロバクター食中毒は国内外を問わず、発生件数、患者数ともに多い細菌性食中毒である (Fig. 1) (6)。現在の培養法をベースとした検査法では、下痢症患者から分離されるカンピロバクターのうち、大部分を *C. jejuni* と *C. coli* の 2 菌種が占める (10, 11)。しかし、カンピロバクターを分離培養する際、*C. jejuni* と *C. coli* が耐性を示すセフェム系抗菌薬を使用するケースが多く、*C. hyoilealis* や *C. lari* といったセフェム系抗菌薬に感受性を示すカンピロバクターは分離されにくい (9)。また菌種によって薬剤感受性や至適発育条件が異なることから、一般に用いられている培地と培養法では、*C. jejuni* と *C. coli* 以外のカンピロバクターの存在が見逃される可能性が高い (14)。

著者は検体から培養することなく、カンピロバクターを特異的に検出できれば、カンピロバクターの簡便、迅速な検査法として役立つだけでなく、*C. jejuni* と *C. coli* の 2 菌種に偏ることなく、カンピロバクター感染症の実態をより正確に把握できるものと考えた。標的遺伝子として *cdt* 遺伝子を選択し、第一章では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うち、*cdtB* 遺伝子を標的としたコモンプライマーを用いることで 7 菌種 (*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus*、*C. hyoilealis*、*C. lari*、*C. helveticus*、*C. upsaliensis*) の *cdtB* 遺伝子を全て増幅することができた (Table 3)。さらに制限酵素消化産物の多型を電気泳動で比較解析する、PCR-RFLP 法により 7 菌種全てを型別できることを示した (Table 4)。分離菌株を用いた検討の結果、本研究で開発した PCR-RFLP 法の感度は 88-100%、特異性は 100% であった (Table 5)。また、本法を用いることで下痢症患者、動物検体から直接、カンピロバクターを検出できることを明らかとした (Table 7)。

第 1 章で開発した PCR-RFLP 法は *C. hyoilealis* に関する感度が若干低かった (88%)。その理由を調べた結果、PCR-RFLP 法で *cdtB* 遺伝子を増幅できなかった 3 株の *C. hyoilealis* は既知の *cdt* 遺伝子 (*chcdt-I* 遺伝子) を保有しておらず、*chcdt-I* 遺伝子とは配列が大きく異なる新規の *cdt* 遺伝子 (*chcdt-II* 遺伝子) を保有することを見出した (Fig. 8)。

*C. hyointestinalis* における各種 *cdt* 遺伝子の保有状況を調べたところ、*chcdt-I* 遺伝子は 88% (21/24 株)、*chcdt-II* 遺伝子は 100% (24/24 株) の保有率であった (Table 13)。第一章で開発した PCR-RFLP 法は、プライマー結合領域のミスマッチにより、*chcdt-I* 遺伝子を增幅可能ではあるが、*chcdt-II* 遺伝子は增幅困難である。本研究で評価した全ての *C. hyointestinalis* が *chcdt-II* 遺伝子を保有していたことから、*chcdt-II* 遺伝子は標的遺伝子として適していると考えられる。*chcdt-II* 遺伝子の配列情報を踏まえてプライマー改良することで *C. hyointestinalis* に対する検出感度が向上するものと考えられる。

第三章では *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。標的としてヒトの胃腸炎に関与するカンピロバクターである主要な 6 菌種 (*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus*、*C. hyointestinalis*、*C. lari*、*C. upsaliensis*) を選択し、*cdtB* 遺伝子を標的とした Multiplex PCR 法を構築した。分離菌株を用いた検討の結果、Multiplex PCR 法の感度、特異性とも 100% であった。本 Multiplex PCR の検出下限値を実験的に算出したところ、各菌種から PCR 産物を得るのに PCR チューブあたり  $10^2$ - $10^3$  cfu の菌数が必要であった。一般的な Single PCR 法と比べると検出下限値は高いが、検体から直接、カンピロバクターを検出できる可能性はあると考えられた。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。第一章で開発した PCR-RFLP 法は、1) PCR でカンピロバクターを検出し、2) RFLP で菌種を同定するという、2 つステップが必要である。しかし、使用するプライマーの種類が少ないため、プライマーダイマーが生じにくく、検体中の菌数が少なくともカンピロバクターを検出できる可能性が高い。また、*cdtB* 遺伝子の配列のうち、菌種間で保存性の高い領域にプライマーが設計されているため、標的とする菌種以外のカンピロバクターの *cdtB* 遺伝子をも增幅できる可能性がある。緒論で論じた通り 17 菌種のカンピロバクターがヒトに病気を引き起こす可能性があることから (Table 1)、幅広くカンピロバクターを特異的に検出できる可能性は利点の一つである。一方、第三章で開発した Multiplex PCR 法は複数のプライマーを使用するため、プライマー同士の競合が生じるおそれがある。しかし、PCR-RFLP

法とは異なり一度の PCR で複数のカンピロバクターを同時に検出することができる。

PCR-RFLP 法と比べてコストはかかるものの、Multiplex PCR 法は簡便、かつ迅速に菌種を同定できることが大きな利点である。どちらの方法も一長一短があり、状況に応じて使い分けることが望まれる。今回開発した遺伝子検査法は、食品検体や患者便検体から直接、培養することなくカンピロバクターを検出する方法として活用されることが期待される。

本論文ではカンピロバクター属に属する *C. hyointestinalis* が産生する新規の CDT バリアント (ChCDT-II) の性状解析も行った。*C. hyointestinalis* は健康なブタやウシ等の腸管に広く分布しており、胃腸炎を発症したブタや下痢症患者からの分離も多数報告されている (14、15、39-46)。*C. hyointestinalis* は人獣共通感染症の原因菌として考えられているが、病原性を示すメカニズムは明らかにされていない。Ohya らは *C. hyointestinalis* が細胞毒素活性を有する物質を産生することを報告したが、その実態は明らかとされていなかった (47)。近年、著者の研究グループがタイの下痢症患者から分離された *C. hyointestinalis* Ch022 株が *cdt* 遺伝子を保有することを見出し、哺乳類の培養細胞に毒性を示す CDT を産生することを報告した (48、57)。本論文の第二章では、腸炎を発症したブタから分離された *C. hyointestinalis* ATCC 35217 株 (38) から新規 *cdt* 遺伝子 (*chcdt-II*) を同定し、生物活性のある ChCDT-II を発現していることを明らかとした (Fig. 11-13)。更なる検討が必要ではあるが、CDT は *C. hyointestinalis* が人や動物に病原性を発揮する上で何らかの役割を担っている可能性がある。ChCDT-II は他菌種の CDT と同様に、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ことを明らかとした (Fig. 11)。現在、CDT はカンピロバクターが宿主の腸管細胞に接着し、組織内に侵入する際に必要と考えられている主要な病原因子の候補である (5、21、58)。また、Okuda らは A 群赤痢菌 (*Shigella dysenteriae*) の CDT が乳のみマウスに下痢を引き起こすことを報告しており (59)、*C. hyointestinalis* においても CDT が果たす役割について興味が持たれる。

以上、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。

現行の培養法を用いた検査法は、*C. jejuni*、*C. coli* を対象とした抗菌剤を含む選択培地を使用するケースが多く、その他のカンピロバクターの存在を見逃している可能性がある。今後、開発した遺伝子検査法を用いて、下痢症患者の便検体等から直接、カンピロバクターを検出、同定できる簡便で迅速な検査に役立ち、さらには *C. jejuni*、*C. coli* の 2 菌種に偏ることなく、カンピロバクター感染症の実態がより明確になることを期待する。

## 結 論

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、及び特異度はともに 100% であった。
2. *C. hyointestinalis* から新規 *cdt* 遺伝子 (*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% の方法論を確立できた。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、自由な研究の場を与えてくださり、また終始激烈なご指導、御鞭撻を賜りました恩師、大阪大学大学院薬学研究科 薬剤学分野 教授 中川 晋作先生、大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 獣医学専攻 獣医国際防疫学教室 教授 山崎 伸二先生に深甚なる謝意を表します。

本研究に関して貴重な御助言、多大な御指導を頂きました扶桑薬品工業株式会社 研究開発センター 研究員 朝倉 昌博博士、大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 獣医学専攻 獣医国際防疫学教室 助教 日根野谷 淳先生に心より感謝致します。

本研究を進めるにあたり、多大なる御協力を賜りました大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 獣医学専攻 獣医国際防疫学教室 畠中 律敏学士に心より感謝いたします。

本稿をまとめるにあたり、貴重な御指導、御助言を賜りました大阪大学大学院 薬学研究科 教授 八木 清仁先生、土井 健史先生、平田 收正先生に心より御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、多大なる御協力を賜りました大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 獣医学専攻 獣医国際防疫学教室 Srinuan Somroop 修士、特認助教 Sharda Prasad Awasthi 博士、四良丸 幸博士、西川 明芳学士、川端 洋輝修士に深く感謝致します。また大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 獣医学専攻 獣医国際防疫学教室、大阪大学大学院 薬学研究科 薬剤学分野の皆様に謹んで感謝致します。

最後に、長かった学生生活を最後まで見守り、励ましてくれた最愛の家族に心から感謝致します。

## 引用文献

- 1 **Man SM.** 2011. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **8**, 669-685.
- 2 **Carbonero A, Torralbo A, Borge C, Garcia-Bocanegra I, Arenas A, Perea A** 2012. *Campylobacter* spp., *C. jejuni* and *C. upsaliensis* infection-associated factors in healthy and ill dogs from clinics in Cordoba, Spain. Screening tests for antimicrobial susceptibility. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **35**, 505-512.
- 3 **Hald B, Pedersen K, Waino M, Jorgensen JC, Madsen M.** 2004. Longitudinal study of the excretion patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. in young pet dogs in Denmark. *J Clin Microbiol* **42**, 2003-2012.
- 4 **Steinhauserova I, Fojtikova K, Klimes J.** 2000. The incidence and PCR detection of *Campylobacter upsaliensis* in dogs and cats. *Lett Appl Microbiol* **31**, 209-212.
- 5 **Young KT, Davis LM, Dirita VJ.** 2007. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* **5**, 665-679.
- 6 **Ministry of Health, Labour and Welfare.** Food Poisoning Statistics. URL; [http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryou/shokuhin/syokuchu/04.html](http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/syokuchu/04.html)
- 7 **Sivadon-Tardy V, Porcher R, Orlikowski D, Ronco E, Gault E, Roussi J, Durand MC, Sharshar T, Annane D, Raphael JC, Megraud F, Gaillard JL.** 2013. Increased incidence of *Campylobacter jejuni*-associated Guillain-Barré syndromes in the Greater Paris area. *Epidemiol Infect* **10**, 1-5.
- 8 **Yuki N, Hartung HP.** 2012. Guillain-Barre syndrome. *N Engl J Med* **366**, 2294-2304.
- 9 **Lastovica AJ, Allos BM.** 2008. Clinical significance of *Campylobacter* and related species other than *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. In *Campylobacter* third edition, pp. 123-149. Edited by Nachamkin I, Szymanski CM, Blaser MJ: ASM Press.
- 10 **Friedman CR, Hoekstra RM, Samuel M, Marcus R, Bender J, Shiferaw B, Reddy S, Ahuja SD, Helfrick DL, Hardnett F, Carter M, Anderson B, Tauxe RV; Emerging Infections Program FoodNet Working Group.** 2004. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in the United States: A case-control study in FoodNet sites. *Clin Infect Dis* **15**, S285-296.
- 11 **Yokoyama K.** 2006. Occurrence of *Campylobacter* food poisoning. *Jpn J Food Microbiol* **23**, 109-113 (in Japanese).
- 12 **Pacanowski J, Lalande V, Lacombe K, Boudraa C, Lesprit P, Legrand P, Trystram D, Kassis N, Arlet G, Mainardi JL, Doucet-Populaire F, Girard PM, Meynard JL; CAMPYLY Study Group.** 2008. *Campylobacter* bacteraemia: clinical features and factors associated with fatal outcome. *Clin Infect Dis* **15**, 790-796.
- 13 **Gharst G, Oyarzabal OA, Hussain SK.** 2013. Review of current methodologies to isolate and

- identify *Campylobacter* spp. from foods. *J Microbiol Methods* **95**, 84-92.
- 14 **Lastovica AJ.** 2006. Emerging *Campylobacter* spp.: The tip of the iceberg. *Clin Microbiol Newsletter* **28**, 49-56.
  - 15 **Inglis GD, Boras VF, Houde A.** 2011. Enteric campylobacteria and RNA viruses associated with healthy and diarrheic humans in the Chinook health region of southwestern Alberta, Canada. *J Clin Microbiol* **49**, 209-219.
  - 16 **Bullman S, Corcoran D, O'Leary J, O'Hare D, Lucey B, Sleator RD.** 2011. Emerging dynamics of human campylobacteriosis in Southern Ireland. *FEMS Immunol Med Microbiol* **63**, 248-253.
  - 17 **Prouzet-Mauleon V, Labadi L, Bouges N, Menard A, Megraud F.** 2006. *Arcobacter butzleri*: underestimated enteropathogen. *Emerg Infect Dis* **12**, 307-309.
  - 18 **Vandenberg O, Dediste A, Houf K, Ibekwem S, Souayah H, Cadranel S, Douat N, Zassis G, Butzler JP, Vandamme P.** 2004. *Arcobacter* species in humans. *Emerg Infect Dis* **10**, 1863-1867.
  - 19 **Dasti JI, Tareen AM, Lugert R, Zautner AE, Gross U.** 2010. *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *Int J Med Microbiol* **300**, 205-211.
  - 20 **Yamasaki S, Asakura M, Tsukamoto T, Faruque SM, Deb R, Ramamurthy T.** 2006. Cytolethal distending toxin (CDT): genetic diversity, structure and role in diarrheal disease. *Toxin Reviews* **25**, 61-88.
  - 21 **Ge Z, Schauer DB, Fox JG.** 2008. *In vivo* virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. *Cell Microbiol* **10**, 1599-1607.
  - 22 **Mortensen NP, Schiellerup P, Boisen N, Klein BM, Locht H, Abuounm M, Newell D, Krogfelt KA.** 2011. The role of *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin in gastroenteritis: toxin detection, antibody production, and clinical outcome. *APMIS* **119**, 626-634.
  - 23 **Jinadasa RN, Bloom SE, Weiss RS, Duhamel GE.** 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**, 1851-1875.
  - 24 **Johnson WM, Lior H.** 1988. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microb Pathog* **4**, 115-126.
  - 25 **Asakura M, Samosornsuk W, Taguchi M, Kobayashi K, Misawa N, Kusumoto M, Nishimura K, Matsuhisa A, Yamasaki S.** 2007. Comparative analysis of cytolethal distending toxin (*cdt*) genes among *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* strains. *Microb Pathog* **42**, 174-183.

- 26 **Asakura M, Samosornsuk W, Hinenoya A, Misawa N, Nishimura K, Matsuhisa A, Yamasaki S.** 2008. Development of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter fetus*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **52**, 260-266.
- 27 **Samosornsuk W, Asakura M, Yoshida E, Taguchi T, Nishimura K, Eampokalap B, Phongsisay V, Chaicumpa W, Yamasaki S.** 2007. Evaluation of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the identification of *Campylobacter* strains isolated from poultry in Thailand. *Microbiol Immunol* **51**, 909-917.
- 28 **Shiramaru S, Asakura M, Inoue H, Nagita A, Matsuhisa A, Yamasaki S.** 2012. A cytolethal distending toxin gene-based multiplex PCR assay for detection of *Campylobacter* spp. in stool specimens and comparison with culture method. *J Vet Med Sci* **74**, 857-862.
- 29 **Johnson WM, Lior H.** 1987. Response of Chinese hamster ovary cells to a cytolethal distending toxin (CDT) of *Escherichia coli* and possible misinterpretation as heat-labile (LT) enterotoxin. *FEMS Microbiol Lett* **43**, 19–23.
- 30 **Scott DA, Kaper JB.** 1994. Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin. *Infect Immun* **62**, 244-51.
- 31 **Pickett CL, Cottle DL, Pesci EC, Bikah G.** 1994. Cloning, sequencing, and expression of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin genes. *Infect. Immun* **62**, 1046 –1051.
- 32 **Pickett CL, Pesci EC, Cottle DL, Russell G, Erdem AN, Zeytin H.** 1996. Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. *cdtB* genes. *Infect Immun* **64**, 2070-2078.
- 33 **Matsuda M, Shigematsu M, Tazumi A, Sekizuka T, Takamiya S, Millar BC, Taneike I, Moore JE.** 2008. Cloning and structural analysis of the full-length cytolethal distending toxin (*cdt*) gene operon from *Campylobacter lari*. *Br J Biomed Sci* **65**, 195-199.
- 34 **Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, Chillingworth T, Davies RM, Feltwell T, Holroyd S, Jagels K, Karlyshev AV, Moule S, Pallen MJ, Penn CW, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, van Vliet AH, Whitehead S, Barrell BG.** 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* **403**, 665-668.
- 35 **Ministry of Health, Labour and Welfare.** 2010. カンピロバクター食中毒の現状と対策について. *IASR* **31** 特集記事 資料 1-3 (in Japanese).
- 36 **Gebhart CJ, Edmonds P, Ward GE, Kurtz HJ, Brenner DJ.** 1985. “*Campylobacter hyoilectinalis*” sp. nov.: a new species of *Campylobacter* found in the intestines of pigs and other animals. *J Clin Microbiol* **21**, 715-720.
- 37 **Gebhart CJ, Murtaugh MP, Lin GF, Ward GE.** 1990. Species-specific DNA probes for

- Campylobacter* species isolated from pigs with proliferative enteritis. *Vet Microbiol* **24**, 367-379.
- 38 **Gebhart CJ, Ward GE, Chang K, Kurtz, HJ.** 1983. *Campylobacter hyoilealis* (new species) isolated from swine with lesions of proliferative ileitis. *Am J Vet Res* **44**, 361-367.
- 39 **Gorkiewicz G, Feierl G, Zechner R, Zechner EL.** 2002. Transmission of *Campylobacter hyoilealis* from a pig to a human. *J Clin Microbiol* **40**, 2601-2605.
- 40 **Oporto B, Hurtado A.** 2011. Emerging thermotolerant *Campylobacter* species in healthy ruminants and swine. *Foodborne Pathog Dis* **8**, 807-813.
- 41 **Chaban B, Ngeleka M, Hill JE.** 2010. Detection and quantification of 14 *Campylobacter* species in pet dogs reveals an increase in species richness in feces of diarrheic animals. *BMC Microbiol* **10**, 73.
- 42 **Bullman S, O'Leary J, Corcoran D, Sleator RD, Lucey B.** 2012. Molecular-based detection of non-culturable and emerging campylobacteria in patients presenting with gastroenteritis. *Epidemiol Infect* **140**, 684-688.
- 43 **Edmonds P, Patton CM, Griffin PM, Barett TJ, Schmid GP, Baker CN, Lambett MA, Brenner DJ.** 1987. *Campylobacter hyoilealis* associated with human gastrointestinal disease in the United States. *J Clin Microbiol* **25**, 685-692.
- 44 **Fennell CL, Rompalo AM, Totten PA, Bruch KL, Flores BM, Stamm WE.** 1986. Isolation of “*Campylobacter hyoilealis*” from a human. *J Clin Microbiol* **24**, 146-148.
- 45 **Minet JB, Grosbois B, Megraud F.** 1988. *Campylobacter hyoilealis*: an opportunistic enteropathogen? *J Clin Microbiol* **26**, 2659-2660.
- 46 **Vandenberg O, Houf K, Douat N, Vlaes L, Retore P, Butzler JP, Dediste A.** 2006. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of non-*jejuni/coli* campylobacters and arcobacters from Belgium. *J Antimicrob Chemother* **57**, 908-913.
- 47 **Ohya T, Nakazawa M.** 1992. Production and some properties of cytotoxins produced by *Campylobacter* species isolated from proliferative enteropathy in swine. *J Vet Med Sci* **54**, 1031-1033.
- 48 **Samosornsuk W, Kamei K, Hatanaka N, Taguchi T, Asakura M, Somroop S, Sugimoto N, Chaicumpa W, Yamasaki S.** 2015. A new variant of cytolethal distending toxin in a clinical isolate of *Campylobacter hyoilealis*. *J Med Microbiol* in press.
- 49 **Kabir SM, Kikuchi K, Asakura M, Shiramaru S, Tsuruoka N, Goto A, Hinenoya A, Yamasaki S.** 2011. Evaluation of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the identification of *Campylobacter* strains isolated from diarrheal patients in Japan. *Jpn J Infect Dis* **64**, 19-27.
- 50 **Li L, Sharipo A, Chaves-Olarte E, Masucci MG, Levitsky V, Thelestam M, Frisan T.** 2002. The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin activates sensors of DNA damage and

- repair complexes in proliferating and non-proliferating cells. *Cell Microbiol* **4**, 87-99.
- 51 **Shima A, Hineno A, Asakura M, Sugimoto N, Tsukamoto T, Ito H, Nagita A, Faruque SM, Yamasaki S.** 2012. Molecular characterizations of cytolethal distending toxin produced by *Providencia alcalifaciens* strains isolated from patients with diarrhea. *Infect Immun* **80**, 1323-1332.
- 52 **Aragon V, Chao K, Dreyfus LA.** 1997. Effect of cytolethal distending toxin on F-actin assembly and cell division in Chinese hamster ovary cells. *Infect Immun* **65**: 3774-3780.
- 53 **Frison T, Cortes-Bratti X, Chaves-Olarte E, Stenerlöw B, Thelestam M.** 2003. The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin induces DNA double-strand breaks and promotes ATM-dependent activation of RhoA. *Cell Microbiol* **5**: 695-707.
- 54 **Eyigor A, Dawson KA, Langlois BE, Pickett CL.** 1999. Cytolethal distending toxin genes in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates: detection and analysis by PCR. *J Clin Microbiol* **37**, 1646-1650.
- 55 **Kamei K, Hatanaka N, Asakura M, Somroop S, Samosoronsuk W, Hineno A, Misawa N, Nakagawa S, Yamasaki S.** 2015. *Campylobacter hyoilealis* isolated from pigs produce multiple variants of biologically active cytolethal distending toxin. *Infect Immun* in press.
- 56 **Yutsudo T, Nakabayashi N, Hirayama T, Takeda Y.** 1987. Purification and some properties of a Vero toxin from *Escherichia coli* O157:H7 that is immunologically unrelated to Shiga toxin. *Microb Pathog* **3**, 21-30.
- 57 **Samosoronsuk W, Asakura M, Yoshida E, Taguchi T, Eampokalap B, Chaicumpa W, Yamasaki S.** 2015. Isolation and characterization of *Campylobacter* strains from diarrheal patients in Bangkok and its suburb in Thailand. *Jpn J Infect Dis* **68**, 209-15.
- 58 **Jain D, Prasad KN, Sinha S, Husain N.** 2008. Differences in virulence attributes between cytolethal distending toxin positive and negative *Campylobacter jejuni* strains. *J Med Microbiol* **57**, 267-272.
- 59 **Okuda J, Fukumoto M, Takeda Y, Nishibuchi M.** 1997. Examination of diarrheagenicity of cytolethal distending toxin: suckling mouse response to the products of the *cdtABC* genes of *Shigella dysenteriae*. *Infect Immun* **65**, 428-433.