

称号及び氏名	博士（獣医学）朝倉 昌博
学位授与の日付	平成19年3月31日
論文名	「Cytotolethal distending toxin (<i>cdt</i>) 遺伝子に基づく <i>Campylobacter jejuni</i> 、 <i>C. coli</i> 、および <i>C. fetus</i> の迅速な菌種 同定法の開発とその応用」
論文審査委員	主査 山崎 伸二 副査 馬場 栄一郎 副査 小崎 俊司

論文要旨

緒言

Campylobacter 属細菌は、獣医学領域では古くから *Vibrio fetus* として家畜の流産や腸炎の原因となることが知られていた。1957年、Kingらが *V. fetus*（現在の *Campylobacter fetus*）の中に発育温度の異なる2つのグループが存在することを指摘し、42℃で発育可能でヒトの下痢と関連があるグループを related vibrios（現在の *C. jejuni* と *C. coli*）と呼び、家畜の流産やヒトの全身感染を起こす従来の *V. fetus* と区別するようになった。その後、Butzler や Skirrow らの研究により *C. jejuni* と *C. coli* が感染性腸炎の原因となることが広く受け入れられるようになった。現在、*Campylobacter* 属細菌は17菌種が知られているが、中でも食中毒細菌に指定されている *C. jejuni* と *C. coli* および、易感染性宿主に腸炎のほかにも敗血症や髄膜炎の起原菌となる *C. fetus* の3菌種が最も重要な *Campylobacter* 属細菌である。また、*C. jejuni* は、胃腸炎のみならず、ギランバレー症候群等の神経障害を引き起こすことも知られている。*Campylobacter* 属細菌感染症は近年増加傾向にあり、我が国の食中毒の発生件数では *C. jejuni* および *C. coli* が第一位を占めている。*Campylobacter* 属細菌は 1) 微好気性細菌であり、培養には特殊な装置が必要、2) 増殖が遅い、3) 菌種によって温度感受性が異なるなどの理由から、本菌の分離・同定には時間を要し、また正確に行われているとは言い難い。特に *C. fetus* は *C. jejuni* および *C. coli* の検査でよく用いられる培養温度（42℃）では生育できないことから、一般の検査では見逃されている可能性もある。これらのことから、*Campylobacter* 属細菌感染症の診断、予防には簡易で迅速な検査法の開発が重要である。

Campylobacter 属細菌の病原因子として様々なものが報告されているが、その中で最もよく解析されているものの一つに、Cytotolethal distending toxin (Cdt) がある。Cdtは、24～48時間で細胞を

膨化させ、さらに 96~120 時間で細胞を致死させるというユニークな毒素として様々な病原性細菌で見つかっている。CdtはCdtA、CdtB、CdtCの3つのサブユニットからなるホロ毒素で、CdtAとCdtCが標的細胞の受容体と結合し、毒素本体であるCdtBを細胞内へ送り込む。細胞内へ送り込まれたCdtBは、最終的に核内に移行し、CdtB の持つDNase活性によりDNAを傷害し、細胞周期をG₂/M期で停止させる。*C. jejuni*の*cdt*遺伝子の全塩基配列は決定されているが、*C. coli*と*C. fetus*の*cdt*遺伝子は一部のアミノ酸配列が報告されているにすぎない。

本研究では、*C. coli* および *C. fetus* の *cdt* 遺伝子クラスターの全塩基配列を決定し、*C. jejuni*、*C. coli*、および *C. fetus* の3菌種の *cdt* 遺伝子の特異性と保存性について検討した。さらに、*cdt* 遺伝子を標的としたマルチプレックス PCR 法を構築し、患者および家畜由来の検体を用いて迅速検査法としての有用性を検討した。

第1章 *Campylobacter coli* および *C. fetus* の *cdt* 遺伝子のクローニングとその遺伝子解析

C. jejuni および *C. coli* の CdtB のアミノ酸配列からデザインした degenerated primer を用いて、*C. coli* と *C. fetus* の *cdtB* 遺伝子を PCR クローニングした。得られた塩基配列からそれぞれの菌種に特異プローブを作製し、それぞれの染色体 DNA を *Hind*III で消化した後、サザンハイブリダイゼーションを行い、それぞれの *cdtB* 遺伝子プローブと反応した約 3.0 kb (*C. coli*) と約 2.8 kb (*C. fetus*) の遺伝子を pUC18 にクローニングし、塩基配列を解析した。得られた *cdt* 遺伝子の塩基配列を基に、それぞれの下流域を genome walking によって塩基配列の解析し、*C. coli* および *C. fetus* の *cdt* 遺伝子クラスターを含むそれぞれ、約 3.7 Kb と 4.1 Kb の塩基配列を決定した。

C. coli の *cdtA*、*cdtB*、*cdtC* 遺伝子 (推定アミノ酸) はそれぞれ 774 bp (258 aa)、801 bp (267 aa)、570 bp (190 aa) からなり、*C. jejuni* の Cdt アミノ酸配列との相同性はそれぞれ 49%、67%、48%であった。一方、*C. fetus* の *cdtA*、*cdtB*、*cdtC* 遺伝子 (推定アミノ酸) は それぞれ 702 bp (234 aa)、798 bp (266 aa)、546 bp (182 aa) からなり、*C. jejuni* の Cdt アミノ酸配列との相同性はそれぞれ 32%、60%、35%であった。さらに CdtB の DNase 活性に必須と考えられているアミノ酸残基は、*C. coli* および *C. fetus* の CdtB の推定アミノ酸配列中にも保存されていた。*C. coli* および *C. fetus* の *cdt* 遺伝子のゲノム上での挿入部位は、*C. jejuni* のそれとも異なるそれぞれの菌種に特異的な領域であった。また、*cdt* 遺伝子の上流・下流域には水平伝播に関わる遺伝子は見いだせなかった。

第2章 *Campylobacter* 属細菌が保有する *cdt* 遺伝子クラスターの分布と Cdt 活性に関する解析

cdt 遺伝子の分布および特異性を調べるため、由来の異なる *C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus* をそれぞれ 27 株、19 株、20 株および 3 菌種以外の *Campylobacter* 属細菌を用いてコロニーハイブリダイゼーションを行った。*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus* の *cdtA*、*cdtB*、*cdtC* 遺伝子は、それら全てが菌種特異的に検出された。さらにそれらの遺伝子が機能的に保存しているかを調べるために、それぞれの *cdt* 遺伝子クラスターを PCR で増幅し、塩基配列を解析した。その結果、全ての菌株で約 3 kb

の増幅バンドが得られ、*cdtA*、*cdtB*、*cdtC* 遺伝子と相同性のある遺伝子が確認された。また、*cdt* 遺伝子の挿入箇所も菌種間で保存されていた。全ての株において *cdtB* 遺伝子の ORF 長は標準株と同じであったが、*cdtA* 及び *cdtC* 遺伝子の ORF 長に違いがある株が見られた。一方、各種菌株から粗 Cdt 液を作成し、HeLa 細胞に対する細胞毒性を調べたところ、*C. jejuni* では毒性を示さない株から 64 倍希釈まで毒性を示す株が見られた。*C. fetus* では 16 倍から 64 倍希釈まで毒性が見られたが、*C. coli* では全く毒性を示さなかった。

これらのことから、少なくとも *C. jejuni* と *C. fetus* の Cdt は病原因子として *Campylobacter* 感染症に関わっている可能性があること、*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus* の *cdt* 遺伝子は種特異的であり、かつ菌種に特異的なゲノム上に安定に保存されている遺伝子であることがわかった。

第3章 *cdt* 遺伝子に基づく *Campylobacter jejuni*、*C. coli*、および *C. fetus* の迅速な菌種同定法の開発とその応用

C. jejuni、*C. coli*、および *C. fetus* の菌種同定の標的として *cdt* 遺伝子に着目し、*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus* の *cdtA*、*cdtB*、*cdtC* 遺伝子を菌種特異的に増幅できるマルチプレックス PCR の系を構築し、様々な *Campylobacter* 属細菌や *Campylobacter* 属細菌以外の腸管感染症菌を用いて本マルチプレックス PCR の評価を行った。*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus* の *cdtA*、*cdtB*、*cdtC* 遺伝子に対するマルチプレックス PCR は、各菌種の *cdt* 遺伝子を特異的に増幅したが、他菌種の *Campylobacter* 属細菌、*cdt* 遺伝子陽性の *Campylobacter* 属以外の細菌や *cdt* 遺伝子を持たない腸管感染症菌では、増幅産物は全く得られなかった。また、混合感染を想定した *C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus* を2菌種あるいは3菌種混ぜた検体でも、本マルチプレックス PCR は、それぞれの菌種特異的な *cdt* 遺伝子を増幅した。

第4章 *cdt* 遺伝子に基づくマルチプレックス PCR を応用した小児下痢症患者および家畜の糞便中の *Campylobacter* 属細菌の検出、同定

Skirrow 培地およびフィルター法を用いて、ニワトリ、ブタ、ウシから計 74 株の *Campylobacter* 属細菌を分離し、本マルチプレックス PCR と従来法すなわち生化学的性状及び 16S rRNA 遺伝子解析にて菌種の同定を行った。その結果、35 株が *C. jejuni*、38 株が *C. coli*、1 株が *C. fetus* とそれぞれの方法で同定され、従来法とマルチプレックス PCR 法の結果は 100% 一致した。次に本マルチプレックス PCR 法を小児下痢症患者検体に適用し、*Campylobacter* 属細菌の検出、および菌種同定を試みた。合計 609 検体の小児下痢症患者由来のサブを Skirrow 選択培地に塗布し、微好気条件下で 37°C、2-3 日間培養を行った。その後、得られた菌集落を無作為に掻き取り、ボイル法にて PCR テンプレートを作製した。本マルチプレックス PCR 法で、各菌種の *cdtB* 遺伝子を検出したところ、*C. jejuni cdtB* 遺伝子陽性が 31 例（約 5%）、*C. coli cdtB* 遺伝子陽性が 3 例（約 0.5%）認められた。*C. jejuni* と *C. coli* の混合感染が疑われる患者も 1 例認められた。以上の結果から、本

マルチプレックス PCR 法は、分離培養を必要としない簡便・迅速な *C. jejuni*、*C. coli*、および *C. fetus* の菌種同定法として有用であると考えられた。

総括

1. *C. coli* および *C. fetus* の *cdt* 遺伝子クラスターの全塩基配列を決定した。
2. *C. jejuni*、*C. coli* および *C. fetus* の *cdt* 遺伝子クラスターの塩基配列は菌種間で特異的であり、また同菌種内でよく保存されていた。
3. *C. jejuni*、*C. coli* および *C. fetus* の *cdt* 遺伝子クラスターのゲノム上での挿入部位は菌種間で異なっていたが、同菌種内ではよく保存されていた。またそれぞれの *cdt* 遺伝子クラスターの上流・下流には、水平伝播に関わる遺伝子は見つからなかった。
4. *cdt* 遺伝子に基づくマルチプレックス PCR 法は、他の Cdt 産生菌や腸炎起因菌から非特異的な増幅断片が得られず、*C. jejuni*、*C. coli* および *C. fetus* でそれぞれに特異的な増幅断片が得られた。中でも *cdtB* 遺伝子を標的にしたものでは、100%特異的な増幅断片が得られた。
5. *cdt* 遺伝子に基づくマルチプレックス PCR 法による *C. jejuni*、*C. coli* および *C. fetus* の検出は患者検体のみならず、家畜の糞便中の菌の検出および同定に有用であった。また、得られた結果は生化学的性状と 16S rRNA 遺伝子の解析結果と 100%一致し、本マルチプレックス PCR は *C. jejuni*、*C. coli*、および *C. fetus* の簡便・迅速な菌種同定法として有用であると考えられた。

審査結果の要旨

現在、*Campylobacter*属細菌は 17 菌種が知られているが食中毒細菌に指定されている *C. jejuni* と *C. coli* および腸炎を初め敗血症や髄膜炎の原因となる *C. fetus* の 3 菌種が最も重要な *Campylobacter*属細菌である。*C. jejuni* は、胃腸炎のみならずギランバレー症候群等の神経障害を引き起こすことも知られている。*Campylobacter*属細菌感染症は近年増加傾向にあり、我が国の食中毒の発生件数では *C. jejuni* および *C. coli* が第一位を占めている。*Campylobacter*属細菌は 1) 微好気性細菌であり、培養には特殊な装置が必要、2) 増殖が遅い、3) 生化学的性状が菌種間で類似しており菌種同定が容易でない、4) 菌種によって温度感受性が異なるなどの理由から、本菌の分離・同定には時間を要し検査現場で問題となっている。特に *C. fetus* は *C. jejuni* および *C. coli* の検査でよく用いられる培養温度

(42°C) では生育できないことから、一般の検査では見逃されている可能性もある。これらのことから、*Campylobacter* 属細菌感染症の実態をより正確に把握し、検査を迅速に行い適切な対策を早期に講じるためには、菌種同定を含めた簡便で迅速な検査法の開発が重要である。

本研究では、*Campylobacter* 属細菌すなわち、*C. jejuni*、*C. coli*、および *C. fetus* の簡便で迅速な検査法の開発を目的として、*Campylobacter* 属細菌が保有する Cytolethal distending toxin (*cdt*) 遺伝子に着目し、*cdt* 遺伝子を標的とした *C. jejuni*、*C. coli*、および *C. fetus* の簡便で迅速な菌種同定法の開発を試みた。

第1章では、*C. coli* および *C. fetus* の *cdt* 遺伝子をクローニングし、クローニング断片とゲノムウォーキングにより、*C. coli* および *C. fetus* の *cdt* 遺伝子クラスターとそれぞれの上流・下流を含む約 3.7 kb と 4.1 kb の塩基配列を解析した。*C. coli* の *cdtA*、*cdtB*、*cdtC* 遺伝子 (推定アミノ酸) はそれぞれ 774 bp (258 aa)、801 bp (267 aa)、570 bp (190 aa) からなり、*C. jejuni* の Cdt アミノ酸配列との相同性はそれぞれ 49%、67%、48%、*C. fetus* の *cdtA*、*cdtB*、*cdtC* 遺伝子 (推定アミノ酸) はそれぞれ 702 bp (234 aa)、798 bp (266 aa)、546 bp (182 aa) からなり、*C. jejuni* の Cdt アミノ酸配列との相同性はそれぞれ 32%、60%、35%であることを明らかにした。

第2章では、*Campylobacter* 属細菌が保有する *cdt* 遺伝子クラスターの分布と Cdt 活性について解析した。その結果、*cdt* 遺伝子クラスターは菌種間で特異的にかつ菌種内では普遍的に保存されており、Cdt 活性を示さない菌株においても *cdt* 遺伝子と相同性のある遺伝子が保持されていることから、*cdt* 遺伝子が菌種同定の標的遺伝子となりうることを示した。

第3章では、*cdt* 遺伝子を標的としたマルチプレックス PCR 法を開発し、*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus* や他の *Campylobacter* 属細菌、*Campylobacter* 属細菌以外の *cdt* 遺伝子陽性菌および *cdt* 遺伝子を保持していない腸管感染症菌を用いて、それぞれの菌種に特異的であることを明らかにした。さらに、それぞれの菌種が複数存在しても検出可能であり、2 菌種又は 3 菌種の混合感染でも適応できることを示した。

第4章では、*cdtB* 遺伝子を標的としたマルチプレックス PCR を用いて、家畜の糞便および小児下痢症患者便から、簡便、迅速に *Campylobacter* 属細菌を検出し、菌種の同定が可能かどうかを調べた。その結果、マルチプレックス PCR の結果は、従来法の結果と一致し、従来法に比べて約 4 日間、菌種同定期間を短縮することが可能であった。

以上の結果は、*cdtB* 遺伝子を標的としたマルチプレックス PCR が、食中毒の原因菌のみならず家畜の流産菌や人の敗血症等の原因菌としても重要な *C. jejuni*、*C. coli* および *C. fetus* の迅速同定法として、従来法よりも迅速性、簡便性および信頼性の全てにおいて優れていることを示している。これらの成果は、本マルチプレックス PCR が、食肉および食品検査のみならず臨床検査の現場においても有益であることを示し、獣医学の分野のみならず医学領域においても多大な貢献をすると考えられる。従って、最終試験の結果と併せて、

博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。