

○朝倉昌博¹、Worada Samosornsuk¹、吉田恵実¹、西村和彦¹、田口真澄²、小林一寛²、山崎伸二¹
¹大阪府大・院・獣医国際防疫、²大阪府公衛研

<目的> *Campylobacter*腸炎は日本をはじめ欧米先進国で発生頻度の高い細菌性腸炎である。*Campylobacter*属細菌の病原因子の一つとしてCytotolethal Distending Toxin (CDT,細胞膨化性致死毒)が知られている。*Campylobacter*属細菌以外にも、*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus ducreyi*,や*E. coli*等様々な菌種がCDTを産生することが知られているが、その構造と機能については、一部の菌種を除き、あまり明らかにされていない。本研究では、*Campylobacter*属細菌の病原性におけるCDTの重要性とCDTの毒性発現機構を明らかにする目的で*C. coli*, *C. fetus*の*cdt*遺伝子をクローニング、シーケンスし、すでに明らかとなっている*C. jejuni*の*cdt*遺伝子とそれらの推定アミノ酸配列を比較し、特異プライマー及びコモンプライマーを作成して、PCRの系を確立した。さらに3菌種の組換えCdtB蛋白を大腸菌内で発現させ、精製し、毒素活性を比較した。

<方法> *C. jejuni*, 及び*C. coli* *cdtB* 遺伝子を増幅できる共通プライマーを設計した。供試菌株は*C. jejuni* 20株、*C. coli* 15株、*C. fetus* 2株を用いた。*C. coli* 及び*C. fetus*の菌体DNAを*Hind*IIIで消化し、それぞれの*cdtB*特異プローブと反応する断片をpUC18にクローニングした。Cdt遺伝子の塩基配列を解析し、それぞれ3菌種のCDTと比較した。得られた*cdt*遺伝子配列から各菌種*cdtB*遺伝子を特異的に増幅するmultiplex PCRを開発し、タイで分離された*Campylobacter*属細菌について分子疫学的解析を行った。さらに各菌種の*cdtB*遺伝子をpET-28(a)ベクターを用いて組換えCdtB蛋白を作製し、DNase様活性を測定した。

<結果・考察> コモンプライマーを用いたPCRにより、*C. jejuni* 16株、*C. coli* 12株、さらには*C. fetus* 2株に*cdtB*由来と思われる約700 bpのバンドが増幅された。そこで*C. fetus* *cdt*遺伝子のクローニングを試み、2.9 kbの*Hind*III断片に*cdtA*と*cdtB*遺伝子がコードされていることを確認した。塩基配列を解析した結果、*C. fetus* *cdtB*遺伝子は798 bp (266 aa) にコードされており、*C. coli* *cdtB*と*C. jejuni* *cdtB*遺伝子との相同性はそれぞれ約62%, 約64%であり、アミノ酸配列の相同性は約58%, 約59%であった。さらに、特異プライマーを用いて各菌種についてPCRを行ったところ、種と得られたPCRの結果に相関性が認められたことから、我々の開発したPCRは、*cdt*遺伝子を特異的に検出するのみならず、各菌種の同定にも有用であることが示唆された。組換え*C. jejuni* CdtBと組換え*C. fetus* CdtBにはDNase様活性が見られたが、組換え*C. coli* CdtBにはDNase様活性が認められなかった。現在、*Campylobacter*属細菌の産生するCDTと病原性との関係について動物を用いた系で検討中である。