

PCR 法による *Helicobacter cinaedi* 同定の検討について菅野奈美 渡邊奈々子 小黒祐子 須釜久美子 大竹俊秀  
微生物課

## 要 旨

*Helicobacter cinaedi* について、核酸増幅法の 1 つである Polymerase Chain Reaction 法を用いて菌種同定を検討した。23SrRNA 領域と *gyrB* 領域遺伝子を標的としたプライマーによって同定に必要な目的の遺伝子を増幅させることが可能であった。菌種同定が困難な *Helicobacter cinaedi* を、今後は PCR 法で確認できるものとする。

キーワード：*Helicobacter cinaedi*, PCR 法

## はじめに

*Helicobacter cinaedi* (以下“*H.cinaedi*”とする) については、2003 年に国内で初めて本菌による菌血症の例が報告された。その後、慢性腎不全、悪性腫瘍、血液疾患などの患者や抗癌剤、免疫抑制剤を投与されている患者などの免疫が低下した状態の患者血液から本菌が分離される症例が増加している。

本菌の検出は、市販の生化学的性状確認キットによって行うことができる。しかし、推定にとどまり、確定するためには遺伝子学的な解析等が必要となる<sup>1)</sup>。今回、核酸増幅法の 1 つである Polymerase Chain Reaction (以下“PCR”とする) 法を用いた菌種同定法について検討したので報告する。

## 材 料

2008 年 7 月と同年 12 月に感染症発生動向調査で当所に搬入された 2 検体を用いた。7 月搬入の検体は本菌を疑い分離された菌株であり、12 月搬入の検体は血液培養ボトルであった。以下“検体 1”及び“検体 2”と表記する。

## 方 法

## 1 培養

TSA II 5 % ヒツジ血液寒天培地 (日本 BD) に塗抹し、アネロパック 微好気 (三菱ガス化学株式会社) を用いて 25 °C, 37 °C,

42 °C で培養した。培養開始 2 日目から観察し、4 日間培養後、37 °C で培養した培地のように膜のように広がったシート状のコロニーの発育が見られた。発育したコロニーをグラム染色し、グラム陰性の螺旋状桿菌であることを確認した。オキシダーゼテスト、カタラーゼテスト共に陽性であった。生化学的性状では、市販の同定キットを使用したが発育不良により判定不能であった。

## 2 DNA抽出

TSA II 5 % ヒツジ血液寒天培地に発育した *H.cinaedi* 様コロニーを用いた。滅菌蒸留水で懸濁液を作成後、100 °C で 10 分間加熱処理をした。その後、12,000rpm で 5 分間 4 °C の条件で遠心し、上清をテンプレートとした。

## 3 PCRプライマー

*H.cinaedi* を検出するため 23SrRNA 遺伝子領域と *gyrB* 遺伝子領域を増幅するプライマーを用いた。23SrRNA 遺伝子領域を標的としたプライマーは Gehua Wang らの文献<sup>2)</sup> を基にした。*gyrB* 遺伝子領域を標的としたプライマーは岐阜大学の太田らが設計したプライマーを基にした<sup>3)</sup>。

## 4 PCR反応

反応液の総量は 25µL とし、テンプレートと PCR 試薬およびプライマーを混合した。

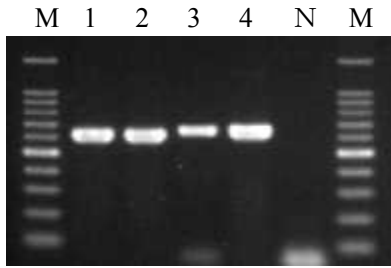


図1 23SrRNA遺伝子PCR産物電気泳動図

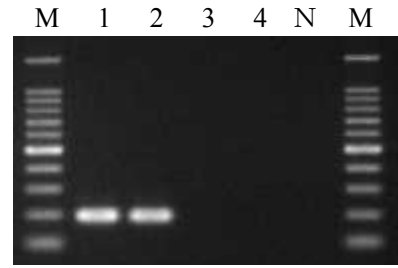


図2 gyrB遺伝子PCR産物電気泳動図

Lane1 : 検体 1 , Lane2 : 検体 2 , Lane3 : *C.jejuni* , Lane4 : *C.coli*  
Lane N : negative control, Lane M : 100bp DNA ラダー

EX Taq polymerase at 5U/mL (TaKaRa) を 0.2 $\mu$ L, 10  $\times$  Ex Taq Buffer を 2.5 $\mu$ L, dNTP Mixture at 2.5mM を 2.0 $\mu$ L, Primer (20pmol/ $\mu$ L) を 0.5 $\mu$ L ずつ, 滅菌蒸留水を 18.3 $\mu$ L, Template DNA を 1.0 $\mu$ L で調製した. PCR 増幅装置は iCycler (BIO RAD) を使用した. 反応条件は, 95  $^{\circ}$ C 6 分, 引き続き 95  $^{\circ}$ C 30 秒, 60  $^{\circ}$ C 30 秒, 72  $^{\circ}$ C 30 秒で 30 サイクル実施し, 最後に 72  $^{\circ}$ C 7 分 final extension step を設定した.

### 5 増幅産物の確認

PCR 産物を 2 %アガロースゲル (TaKaRa Nusieve3:1) で電気泳動後, エチジウムブロマイドにて後染色し, 目的とする塩基サイズのバンドを確認した. 増幅領域と PCR 産物のバンドサイズおよび標的菌種を表 1 に示す. 23SrRNA 遺伝子は *Campylobacter* 属, *Arcobacter* 属および *Helicobacter* 属が陽性になる. そのため *Campylobacter jejuni* (以下 “*C.jejuni*” とする) と *Campylobacter coli* (以

表 1 増幅領域とPCR産物のバンドサイズおよび標的菌種

増幅領域	サイズ	陽性となる菌種
23SrRNA	650bp	<i>Campylobacter</i> sp.
		<i>Arcobacter</i> sp.
		<i>Helicobacter</i> sp.
<i>gyrB</i>	195bp	<i>H.cinaedi</i>

下 “*C.coli*” とする) を陽性コントロールとして同時に PCR を実施した. DNA 断片の増幅は 650bp に確認される. *gyrB* 遺伝子の PCR では *H.cinaedi* のみが陽性になるように設計されており, *C.jejuni* および *C.coli* ではバンドが検出されない. DNA 断片の増幅は 195bp に確認される.

## 結果

### 1 23SrRNA遺伝子領域

結果を図 1 に示す. 検体 1 (レーン 1) および検体 2 (レーン 2) で目的とする塩基サイズのバンドが確認された. また陽性コントロールの *C.jejuni* (レーン 3) および *C.coli* (レーン 4) でもバンドが確認された.

### 2 gyrB遺伝子領域

結果を図 2 に示す. 検体 1 および検体 2 で目的とする塩基サイズのバンドが確認された. *C.jejuni* および *C.coli* ではバンドは検出されなかった.

## まとめ

23SrRNA で検体 1, 検体 2 および *C.jejuni*, *C.coli* にバンドが確認された. また, *gyrB* で検体 1 および検体 2 にバンドが確認され, *Campylobacter* と鑑別された.

菌種同定が困難な *H.cinaedi* を, 今後は PCR 法で確認できるものとする.

## 謝辞

*Helicobacter cinaedi* の PCR 法による菌種

同定について、ご指導いただきました岐阜大学大学院医学系研究科病原体制御学分野の大楠清文先生に深謝いたします。

#### 引用文献

- 1) アボット感染症アワー「*Helicobacter cinaedi* 感染症」  
<http://radio848.rslp.net/abbott/html/20080425.html>  
1 2008.12.22
- 2) Wang G, Clark CG, Taylor TM, et al.  
Colony Multiplex PCR Assay for Identification and Differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C.coli*, *C.lari*, *C.upsaliensis*, and *C.fetus* subsp.fetus, *Journal of Clinical Microbiology* 2002 ; 40 : 4744-4747
- 3) 大楠清文, 江崎孝行. *Helicobacter cinaedi* 感染症. *感染炎症免疫* 2007 ; 37 : 52-55