

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号  
特許第5465403号  
(P5465403)

(45) 発行日 平成26年4月9日(2014.4.9)

(24) 登録日 平成26年1月31日(2014.1.31)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 4 (全 40 頁)

(21) 出願番号	特願2008-215643 (P2008-215643)	(73) 特許権者	505127721
(22) 出願日	平成20年8月25日 (2008. 8. 25)		公立大学法人大阪府立大学
(65) 公開番号	特開2010-130901 (P2010-130901A)		大阪府堺市中区学園町1番1号
(43) 公開日	平成22年6月17日 (2010. 6. 17)	(73) 特許権者	000238201
審査請求日	平成23年8月19日 (2011. 8. 19)		扶桑薬品工業株式会社
(31) 優先権主張番号	特願2007-218962 (P2007-218962)		大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号
(32) 優先日	平成19年8月24日 (2007. 8. 24)	(74) 代理人	100102978
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	特願2009-530001 (P2009-530001)	(74) 代理人	100119507
(32) 優先日	平成20年2月26日 (2008. 2. 26)		弁理士 刑部 俊
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100128048
特許法第30条第1項適用 特許法第30条第1項適用 、平成19年2月27日、公立大学法人大阪府立大学主 催の「大阪府立大学 農学生命科学研究科 獣医学専攻 博士論文公聴会において文書をもって発表		(74) 代理人	弁理士 新見 浩一
		(74) 代理人	100129506
			弁理士 小林 智彦
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞膨張化致死毒を標的としたカンピロバクター属細菌の検出

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

カンピロバクター・ジェジュニ (Campylobacter jejuni)、C. コリ (C. coli)、およびC. フィータス (C. fetus) を同時に区別して検出可能な、被験試料中のカンピロバクター属細菌を検出する方法であって、カンピロバクター属細菌のcdtBゲノムDNAまたはmRNAに特異的に結合しうる2つのポリヌクレオチドからなる下記(a)～(c)記載のプライマー対を用いて被験試料に対し同一反応液中で核酸増幅反応を行う工程を含む方法。

(a) 配列番号：1および2記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtBゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対

(b) 配列番号：3および4記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtBゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対

(c) 配列番号：5および6記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtBゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対

【請求項2】

前記核酸増幅反応を行う工程の前または後に、カンピロバクター属細菌のcdtA～CのいずれかのゲノムDNAまたはmRNAに共通に結合しうる2つのポリヌクレオチドからなる共通プライマー対を用いて核酸増幅反応を行う工程を含む、請求項1記載の方法。

## 【請求項 3】

前記共通プライマー対が、配列番号：7および8に記載の配列からなるプライマー対、配列番号：9および10に記載の配列からなるプライマー対、配列番号：11、12、配列番号：13、および14に記載の4配列から2つの配列を組み合わせるプライマー対、配列番号：15および16に記載の配列からなるプライマー対、配列番号：17および18に記載の配列からなるプライマー対のいずれかである、請求項2記載の方法。

## 【請求項 4】

請求項1から3のいずれかに記載の方法に用いるための該方法用キットであって、使用説明書と、カンピロバクター属細菌のcdtBゲノムDNAまたはmRNAに特異的に結合する2つのポリヌクレオチドからなる下記(a)～(c)記載のプライマー対を含むキット。

(a) 配列番号：1および2記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtBゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅するプライマー対

(b) 配列番号：3および4記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtBゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅するプライマー対

(c) 配列番号：5および6記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtBゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅するプライマー対

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、カンピロバクター (Campylobacter) 属に属する細菌の細胞膨張化致死毒を標的とした、検体中のカンピロバクター属細菌の存在の有無を判定するための方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

カンピロバクター属細菌の菌種同定には、通常培養検査が用いられるが、本属菌が微好気性であること、菌種によっては異なる温度での培養が必要であることに加え、生化学的性状を調べるだけでは困難な菌株があり、煩雑かつ多大な労力を要する。通常、カンピロバクター属細菌の培養検査は、分離、同定まで含めると7から10日という長い時間を要する。

## 【0003】

現在、下痢症患者から分離されるカンピロバクター属細菌は約94%がカンピロバクター・ジェジュニ (Campylobacter jejuni、以下において「C. ジェジュニ」と称す)、4%がカンピロバクター・コリ (Campylobacter coli、以下において「C. コリ」と称す) と両菌種でそのほとんどを占めている。よって、通常、検査現場で行っているカンピロバクター属細菌の検査は、食中毒細菌に指定されているC. ジェジュニとC. コリのみを対象に行っていることがほとんどである。また、検査によく使用されている選択培地も、主としてC. ジェジュニおよびC. コリ用に開発された物であり、通常42℃で培養している。その為、温度感受性が異なるカンピロバクター・フィータス (Campylobacter fetus、以下において「C. フィータス」と称す) や他のカンピロバクター属細菌すべてを対象としているとは言い難い。一方、2005年に大阪においてC. フィータスによる集団食中毒も発生している。C. フィータスによる感染はヒトに対して下痢等の胃腸炎のみではなく敗血症や髄膜炎などの重篤な症状を引き起こし、また、動物の感染症においてもウシなどの不妊や流産などの原因となる。そのため、C. フィータスも含めたカンピロバクター属細菌の検査体制を整えることが重要である。

## 【0004】

生化学的性状に基づくカンピロバクター属細菌の菌種同定は、迅速性に欠けるだけでなく、カンピロバクター属細菌の生化学的性状は菌種間で酷似しているため、生化学的性状

10

20

30

40

50

での鑑別は困難なことが多い。特にC. ジェジュニとC. コリの鑑別は、馬尿酸水解酵素活性の有無で行っている為、酵素活性が弱い場合など、C. ジェジュニをC. コリと誤判定しやすいなどの問題がある。そのため検査現場では、PCR法で馬尿酸水解酵素遺伝子の有無を調べる方法が採り入れられている。遺伝子レベルで菌種同定を行う方法として、近年、16S rRNA遺伝子の解析がよく用いられている。しかしながら、16S rRNA遺伝子の解析においても、C. ジェジュニとC. コリでは、極めて相同性が高く、鑑別できない場合が多い。

【0005】

上記問題を解決すべく、本願発明者等は、カンピロバクター属細菌の細胞膨張化致死毒 (Cytolethal Distending Toxin: CDT) に着目してCDTの学術的研究を進めるとともに (非特許文献1、2)、細胞膨張化性致死毒遺伝子 (cdtA、cdtB、およびcdtC) を利用したカンピロバクター属細菌の検出方法を開発した (特許文献1)。しかし、カンピロバクター属細菌の発生件数、患者数がともに増加傾向にあることから (厚生労働省「病因物質別食中毒発生状況」)、カンピロバクター属細菌の簡便かつ迅速な同定法について、さらなる開発が期待される。

【特許文献1】W02005/054472

【非特許文献1】Asakura M. et al., Microbial Pathogenesis 42 (2007) 174-183

【非特許文献2】Yamasaki S. et al., Toxin Reviews, 25:61-88, 2006

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は上記状況を鑑みてなされたものであり、本発明が解決しようとする課題は、cdt遺伝子を利用したカンピロバクター属細菌の新規検出方法の提供である。

【課題を解決するための手段】

【0007】

上記課題を解決すべく、本発明者等は鋭意研究を行った。C. ジェジュニ、C. コリ、およびC. フィータスのcdt遺伝子を菌種特異的に増幅できるマルチプレックスPCR用プライマーを作製し、多くの臨床分離株を含むカンピロバクター属細菌および他のcdt遺伝子陽性細菌、また、代表的な腸管感染症起因菌を用いてマルチプレックスPCRの評価を行った。また本発明者等は、cdtB増幅用プライマーを用いたマルチプレックスPCRによって、複数のカンピロバクター属細菌を同時に検出することを試みた。その結果、本発明者等によるcdtB増幅用プライマーを用いたマルチプレックスPCRは、高い特異性をもって、複数のカンピロバクター属細菌を同時に検出可能なことが証明された。本発明の方法は、家畜やヒトが複数のカンピロバクター属細菌種に混合感染している場合に、一回の操作によって菌種レベルでカンピロバクター属細菌を同定できる。すなわち本発明は、カンピロバクター属細菌のcdt遺伝子増幅によるカンピロバクター属細菌の検出方法に関し、具体的には以下の発明を提供するものである。

(1) 被験試料中のカンピロバクター属細菌を検出する方法であって、カンピロバクター属細菌のcdtBゲノムDNAまたはmRNAに特異的に結合しうる2つのポリヌクレオチドからなる下記(a)および(b)記載のプライマー対のうちいずれか1以上のプライマー対を用いて被験試料に対し核酸増幅反応を行う工程を含む方法

(a) 配列番号: 1および2記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtBゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対

(b) 配列番号: 3および4記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtBゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対、

(2) 前記核酸増幅反応を前記(a)および(b)記載のプライマー対、および下記(c)記載のプライマー対を用いて行う、上記(1)記載の方法

(c) 配列番号: 5および6記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtBゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当

する mRNA の領域を増幅しうるプライマー対、

(3) 前記核酸増幅反応を行う工程の前または後に、カンピロバクター属細菌の cdtA ~ C のいずれかのゲノム DNA または mRNA に共通に結合しうる 2 つのポリヌクレオチドからなる共通プライマー対を用いて核酸増幅反応を行う工程を含む、上記 (1) または (2) 記載の方法、

(4) 前記共通プライマー対が、配列番号：7 および 8 に記載の配列からなるプライマー対、配列番号：9 および 10 に記載の配列からなるプライマー対、配列番号：11、12、配列番号：13、および 14 に記載の 4 配列から 2 つの配列を組み合わせるプライマー対、配列番号：15 および 16 に記載の配列からなるプライマー対、配列番号：17 および 18 に記載の配列からなるプライマー対のいずれかである、上記 (3) 記載の方法

10

(5) 上記 (1) 記載の方法に用いるためのキットであって、使用説明書と、カンピロバクター属細菌の cdtB ゲノム DNA または mRNA に特異的に結合しうる 2 つのポリヌクレオチドからなる下記 (a) および (b) 記載のプライマー対のうち少なくとも 1 のプライマー対を含むキット

(a) 配列番号：1 および 2 記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌の cdtB ゲノム DNA の領域、または増幅される前記ゲノム DNA の領域に相当する mRNA の領域を増幅しうるプライマー対

(b) 配列番号：3 および 4 記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌の cdtB ゲノム DNA の領域、または増幅される前記ゲノム DNA の領域に相当する mRNA の領域を増幅しうるプライマー対、

20

(6) さらに下記 (c) のプライマー対を含む、上記 (5) 記載のキット

(c) 配列番号：5 および 6 記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌の cdtB ゲノム DNA の領域、または増幅される前記ゲノム DNA の領域に相当する mRNA の領域を増幅しうるプライマー対、

(7) 被験試料中のカンピロバクター属細菌を検出する方法であって、カンピロバクター属細菌の cdtA ゲノム DNA または mRNA に特異的に結合しうる 2 つのポリヌクレオチドからなる下記プライマー対 (a) を用いて被験試料に対し核酸増幅反応を行う工程を含む方法

(a) 配列番号：19 および 20 記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌の cdtA ゲノム DNA の領域、または増幅される前記ゲノム DNA の領域に相当する mRNA の領域を増幅しうるプライマー対、

30

(8) 前記核酸増幅反応を、前記プライマー対 (a)、および下記プライマー対 (b) および (c) を用いて行う、上記 (7) 記載の方法

(b) 配列番号：21 および 22 記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌の cdtA ゲノム DNA の領域、または増幅される前記ゲノム DNA の領域に相当する mRNA の領域を増幅しうるプライマー対

(c) 配列番号：23 および 24 記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌の cdtA ゲノム DNA の領域、または増幅される前記ゲノム DNA の領域に相当する mRNA の領域を増幅しうるプライマー対、

(9) 上記 (7) 記載の方法に用いるためのキットであって、使用説明書と、カンピロバクター属細菌の cdtA ゲノム DNA または mRNA に特異的に結合しうる 2 つのポリヌクレオチドからなる下記 (a) のプライマー対を含むキット

40

(a) 配列番号：19 および 20 記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌の cdtA ゲノム DNA の領域、または増幅される前記ゲノム DNA の領域に相当する mRNA の領域を増幅しうるプライマー対、

(10) さらに下記 (b) および (c) のプライマー対を含む、上記 (9) 記載のキット

(b) 配列番号：21 および 22 記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌の cdtA ゲノム DNA の領域、または増幅される前記ゲノム DNA の領域に相当する mRNA の領域を増幅しうるプライマー対

(c) 配列番号：23 および 24 記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカ

50

ンピロバクター属細菌のcdtAゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対、

(11) 被験試料中のカンピロバクター属細菌を検出する方法であって、カンピロバクター属細菌のcdtCゲノムDNAまたはmRNAに特異的に結合しうる2つのポリヌクレオチドからなる下記プライマー対(a)を用いて被験試料に対し核酸増幅反応を行う工程を含む方法  
(a) 配列番号: 25および26記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtCゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対、

(12) 前記核酸増幅反応を、前記プライマー対(a)、および下記プライマー対(b)および(c)を用いて行う、上記(11)記載の方法

(b) 配列番号: 27および28記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtCゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対

(c) 配列番号: 29および30記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtCゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対、

(13) 上記11記載の方法に用いるためのキットであって、使用説明書と、カンピロバクター属細菌のcdtCゲノムDNAまたはmRNAに特異的に結合しうる2つのポリヌクレオチドからなる下記(a)のプライマー対を含むキット

(a) 配列番号: 25および26記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtCゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対、

(14) さらに下記(b)および(c)のプライマー対を含む、上記(13)記載のキット

(b) 配列番号: 27および28記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtCゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対

(c) 配列番号: 29および30記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtCゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対、

(15) 被験試料中のカンピロバクター属細菌を検出する方法であって、カンピロバクター属細菌のcdtゲノムDNAまたはmRNAに特異的に結合しうる2つのポリヌクレオチドからなる下記(a)から(c)に記載のプライマー対のうちいずれか1以上のプライマー対を用いて被験試料に対し核酸増幅反応を行う工程を含む方法

(a) 配列番号: 37および38記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtCゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対

(b) 配列番号: 40および41記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtCゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対

(c) 配列番号: 43および44記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtCゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対、

(16) 核酸増幅反応が定量的PCR法またはリアルタイム定量的PCR法を用いて行われる、上記(15)に記載の方法、

(17) 以下の(i)から(iii)に記載の工程をのうちいずれか1以上の工程をさらに含む、上記(15)または(16)に記載の方法

(i) 配列番号: 37および38記載の配列からなるプライマー対によって増幅される核酸断片を、配列番号: 39に記載のプロープを用いて検出する工程

(ii) 配列番号: 40および41記載の配列からなるプライマー対によって増幅される

10

20

30

40

50

核酸断片を、配列番号：42に記載のプロープを用いて検出する工程

(iii) 配列番号：43および44記載の配列からなるプライマー対によって増幅される核酸断片を、配列番号：45に記載のプロープを用いて検出する工程、

(18) 上記(15)記載の方法に用いるためのキットであって、使用説明書と、カンピロバクター属細菌のcdtゲノムDNAまたはmRNAに特異的に結合しうる2つのポリヌクレオチドからなる下記(a)および(b)記載のプライマー対のうち少なくとも1のプライマー対を含むキット

(a) 配列番号：37および38記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対

10

(b) 配列番号：40および41記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対

(c) 配列番号：43および44記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対、

(19) 配列番号39、42、および45のうち、少なくとも1の検出用プロープをさらに含む、上記(18)に記載のキット。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

20

本明細書において「細胞膨張化致死毒」とは、cytolethal distending toxin (CDTまたはCLDT)と呼ばれる、蛋白性のA-B型ホロトキシンのグループに属する毒素因子を指す。このものは、ほかに細胞膨化致死毒(素)、細胞膨潤化致死毒(素)などと称されることもある。細胞膨張化致死毒は、A,B,Cの3ユニットからなるサブユニット構造を有し、Bサブユニットが毒素活性中心ユニットであり、AおよびBサブユニットが細胞接着に関わっていると考えられている。細胞に作用すると細胞が大きく膨らむ等の変形が生じ、最終的に細胞死を引き起こす。毒素原性大腸菌が産生する易熱性エンテロトキシン(LT)などを実験的に細胞に作用させた場合にも細胞が大きく膨らむ等の変形が見られるが、毒素を取り除いた場合、細胞は回復し、致死することはない。しかしながら、CDTを除去しても細胞は回復せず、死に至る。

30

【0009】

本明細書において用いられる「ポリヌクレオチド」とは、複数の塩基または塩基対からなるリボヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチドの重合体を意味する。ポリヌクレオチドは、RNA、一本鎖型および二本鎖型のDNAを含む。ポリヌクレオチドは、天然に存在する状態から修飾されていないもの、および修飾されているものの双方を含む意である。修飾された塩基としては、例えば、トリチル化された塩基およびイノシンのような特殊な塩基がある。

【0010】

本明細書において用いられる「ポリペプチド」は、複数のアミノ酸からなる重合体を意味する。従って、オリゴペプチドおよびタンパク質もまた、ポリペプチドの概念に含まれる。ポリペプチドは、天然に存在する状態から修飾されていないもの、および修飾されているものの双方を含む意である。修飾としては、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、 $\gamma$ -カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解処理、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化のようなタンパク質へのアミノ酸の転移RNA媒介付加、ユビキチン化などが含まれる。

40

【0011】

50

本明細書において用いられる「変異」とは、アミノ酸配列におけるアミノ酸の変化または塩基配列における塩基の変化（すなわち単一または複数のアミノ酸またはヌクレオチド置換、欠失、付加または挿入）を指す。従って、本明細書において用いられる「変異体」は、一つ以上のアミノ酸が変化しているアミノ酸配列または一つ以上の塩基が変化している塩基配列を指す。この変異体の塩基配列の変化は、基準ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変更しても、しなくてもよい。変異体はアレリック変異体のように天然に存在するものでも、天然に存在することが知られていない変異体であってもよい。変異体は、置換されたアミノ酸が類似の構造的または化学的特性を有する保存的变化を有しうる。まれに、変異体は、非保存的置換を有しうる。生物学的または免疫学的活性を阻害することなく、いずれの、およびどれほど多くのアミノ酸残基を置換、挿入、または欠失するかを決定する手引きは、当技術分野において周知のコンピュータプログラム、例えばDNAスター・ソフトウェアを用いて発見することができる。

10

#### 【0012】

「欠失」はその中で1つ以上のアミノ酸またはヌクレオチド残基がそれぞれ、天然に存在する細胞膨張化致死毒ポリペプチドのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列と比較して存在しない、アミノ酸またはヌクレオチド配列のいずれかの変化である。

#### 【0013】

「挿入」または「付加」は、天然に存在する細胞膨張化致死毒ポリペプチドのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列と比較して、それぞれアミノ酸またはヌクレオチド残基1つ以上が付加されたアミノ酸またはヌクレオチド配列の変化である。

20

#### 【0014】

「置換」とは、天然に存在する細胞膨張化致死毒ポリペプチドのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列と比較して、アミノ酸またはヌクレオチド1つ以上がそれぞれ異なるアミノ酸またはヌクレオチドに入れ替えられたアミノ酸またはヌクレオチド配列の変化である。

#### 【0015】

本明細書において用いられる「ハイブリダイズ」とは、核酸鎖が塩基対形成を通じて相補鎖と結合するプロセスを意味する。

#### 【0016】

本明細書において「検出」とは、定性および定量の両方の意味を含む。また、「定量」には半定量も含まれる。

30

#### 【0017】

<被検試料中のカンピロバクター属細菌の存在の検出>

本発明は、被検試料中のカンピロバクター属細菌の存在の検出方法を提供する。被検試料中のカンピロバクター属細菌の存在の検出は、カンピロバクター感染症の診断、カンピロバクター属細菌に汚染された食品の迅速診断、食品加工工程のバリデーション、食中毒発生時における起因菌の同定など種々の目的において有用である。

#### 【0018】

本発明の検出方法の第一の態様は、被検試料中のカンピロバクター属細菌を検出する方法であって、カンピロバクター属細菌のcdtBゲノムDNAまたはmRNAに特異的に結合しうる2つのポリヌクレオチドからなる「(a) 配列番号：1および2記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtBゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対」および「(b) 配列番号：3および4記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtBゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対」のうちいずれか1以上のプライマー対を用いて被検試料に対し核酸増幅反応を行う工程を含む方法である。

40

#### 【0019】

上記方法は、C.ジェジュニおよびC.フィータスについて、それぞれのcdtBゲノムDNAまたはmRNAに特異的な領域を増幅することにより、細菌を検出する方法である。上記方法

50

において使用するプライマーとしては、C. ジェジュニについては、第一に「配列番号：1 および2記載の配列からなるプライマー対（実施例プライマー：Cj-CdtBU5およびCj-CdtBR6）」を挙げることができるが、上記配列そのものに限られず、C. ジェジュニのcdtBゲノムDNAまたはmRNAに特異的に結合しうる2つのポリヌクレオチドからなるプライマー対であって、C. ジェジュニのcdtBゲノムDNAを鋳型として「配列番号：1 および2記載の配列からなるプライマー対」によって増幅される領域または相当するmRNA領域を増幅可能なプライマー対であれば、他の配列であっても使用することができる。本明細書において「特異的に結合」とは、「結合」から、偶発的な結合（非特異的な結合）を排除する意図である。「配列番号：1 および2記載の配列からなるプライマー対」が結合するC. ジェジュニ 81-176株のcdtBゲノムDNA（配列番号：31）の位置を図5に示す。また配列番号：1 および2記載の配列からなるプライマー対によって、C. ジェジュニ ATCC33560株（DDBJ Accession No.：AB274783）またはC. ジェジュニ ATCC43432株（DDBJ Accession No.：AB274784）のゲノムDNAを増幅すると、714bpの増幅産物が得られる。

10

#### 【0020】

また、C. フィータスについては、第一に「配列番号：3 および4記載の配列からなるプライマー対（実施例プライマー：Cf-CdtBU6およびCf-CdtBR3）」を挙げることができるが、上記配列そのものに限られず、C. フィータスのcdtBゲノムDNAを鋳型として「配列番号：3 および4記載の配列からなるプライマー対」によって増幅される領域または相当するmRNA領域を増幅可能なプライマー対であれば、他の配列であっても使用することができる。「配列番号：3 および4記載の配列からなるプライマー対」が結合するC. フィータス Co1-187株のcdtBゲノムDNA（配列番号：32）の位置を図6に示す。また配列番号：3 および4記載の配列からなるプライマー対によって、C. フィータス ATCC27374株（DDBJ Accession No.：AB274802）、ATCC19438株（DDBJ Accession No.：AB274803）のゲノムDNAを増幅すると、553bpの増幅産物が得られる。

20

#### 【0021】

本発明の方法は、「（a）配列番号：1 および2記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtBゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対」と「（b）配列番号：3 および4記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtBゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対」とを別々に用いてもよいが、単一の核酸増幅反応において両方のプライマー対を同時に使用することもできる。実施例のように、複数のPCRプライマーを単一の反応系で使用するPCRは、マルチプレックスPCR法と呼ばれ、PCR産物を電気泳動し、バンドのサイズを見ることで複数の菌種を同時に鑑別することができる。本発明は、このマルチプレックスPCR法を代表とする、複数の核酸領域の増幅に好適に用いられるプライマーおよびその組み合わせを用いた核酸増幅法によるカンピロバクター属細菌の検出方法を提供する。本発明における核酸増幅の方法は、目的とする増幅物が得られる限り種類は問わない。PCR法は、本発明において好ましい核酸増幅法の具体例である。本発明の方法は、リアルタイムPCR法などによって、定量法として実施してもよい。

30

#### 【0022】

本発明の方法は、上記「（a）配列番号：1 および2記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtBゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対」および/または「（b）配列番号：3 および4記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtBゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対」とともにC. コリのcdtBゲノムDNAに特異的な領域を増幅するプライマー：「（c）配列番号：5 および6記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtBゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対」を単一の核酸増幅反応系において使用することができる。すなわち本発明は、被験試料中のC. ジェ

40

50



ジュニ、C.フィータス、およびC.コリの3種カンピロバクター属細菌を同時に検出可能な方法を提供する。本発明者等は、上記3種のプライマーを同時に用いて核酸増幅反応を行い、C.ジェジュニ、C.フィータス、およびC.コリの3種カンピロバクター属細菌を一度に検出可能であることを確認した。実施例に示すように、本発明の方法は、目的とするカンピロバクター属細菌を確実に検出する一方、他の種のカンピロバクター属細菌を誤検出することなく、極めて特異性が高い方法である。「配列番号：5および6記載の配列からなるプライマー対（実施例プライマー：Cc-CdtBU5およびCc-CdtBR5）」が結合するC.コリ C o1 - 243株のcdtBゲノムDNA（配列番号：33）の位置を図7に示す。

【0023】

本発明の方法は、上述した、C.ジェジュニ、C.フィータス、C.コリに対する特異的プライマーを用いて核酸増幅反応を行う工程の後に、「カンピロバクター属細菌のcdtBゲノムDNAまたはmRNAの増幅断片の有無または該増幅断片の分子量から、カンピロバクター属細菌の存在を判定する工程」または「カンピロバクター属細菌のcdtBゲノムDNAまたはmRNAの増幅断片量を定量する工程」を含む。

【0024】

また本発明の方法は、C.ジェジュニ、C.フィータス、C.コリに対する特異的プライマーを用いて核酸増幅反応を行う工程の前または後に、「カンピロバクター属細菌のcdtA～CのいずれかのゲノムDNAまたはmRNAに共通に結合しうる2つのポリヌクレオチドからなる共通プライマー対を用いて核酸増幅反応を行う工程」を行うことができる。上記「カンピロバクター属細菌のcdtA～CのいずれかのゲノムDNAまたはmRNAに共通に結合しうる2つのポリヌクレオチドからなる共通プライマー対」とは、C.ジェジュニ、C.フィータス、およびC.コリの全ての細菌について、cdtA、cdtB、およびcdtCのいずれかのcdtをコードするゲノムDNAを増幅しうるプライマー対、またはC.ジェジュニ、C.フィータス、およびC.コリの全ての細菌について、cdtA、cdtB、およびcdtCのいずれかのcdtをコードするmRNAを増幅しうるプライマー対を意味する。このようなプライマーの具体例としては、本願実施例で使用した配列番号：7および8に記載の配列からなるプライマー対（実施例cdtB共通プライマー：C-CdtBcom1および（C-CdtBcom2）を挙げることができる。上記プライマー対のほか、配列番号：9（WO2005/054472 配列番号：7）および10（WO2005/054472 配列番号：8）に記載の配列からなるプライマー対（cdtB共通プライマー対）、配列番号：11（WO2005/054472 配列番号：47）、12（WO2005/054472 配列番号：48）、配列番号：13（WO2005/054472 配列番号：49）、および14（WO2005/054472 配列番号：50）に記載の4配列から2つの配列を組み合わせるプライマー対（cdtB共通プライマー対）、配列番号：15（WO2005/054472 配列番号：64）および16（WO2005/054472 配列番号：65）に記載の配列からなるプライマー対（cdtA共通プライマー対）、配列番号：17（WO2005/054472 配列番号：66）および18（WO2005/054472 配列番号：67）に記載の配列からなるプライマー対（cdtC共通プライマー対）、も好適に使用できる共通プライマー対である。上記共通プライマー対がC.ジェジュニ、C.フィータス、およびC.コリの全ての細菌について、cdtA、cdtB、およびcdtCのいずれかのcdtをコードするゲノムDNAを増幅しうることについては、WO2005/054472において詳細に説明されている。上記「カンピロバクター属細菌のcdtA-CゲノムDNAまたはmRNAに共通に結合しうる2つのポリヌクレオチドからなる共通プライマー対」を用いた核酸増幅反応を、C.ジェジュニ、C.フィータス、C.コリに対する特異的プライマーを用いた核酸増幅反応と組み合わせて行うことにより、カンピロバクター属細菌検出における感度向上が期待できる。上述したとおり、上記プライマー対は少なくともC.コリ、C.ジェジュニ、およびC.フィータス3菌種の細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAまたはmRNAを共通して増幅する共通プライマー対である。上記共通プライマー対は、上記3菌種のみならず、その他のカンピロバクター属細菌の細胞膨張化致死毒をコードするゲノムDNAまたはmRNAを増幅すると期待できる。また同様に、該プライマー対と同一のゲノムDNA領域または相当するmRNA領域を増幅しうるプライマー対についても、上記3菌種を共通して該ゲノム領域または相当するmRNA領域を増幅することができ、その他のカンピロバクター属細菌の該ゲノム領域または相当するmRNA領域を増

10

20

30

40

50

幅することができると考えられる。

【 0 0 2 5 】

本発明の方法の第二の態様は、被験試料中のカンピロバクター属細菌を検出する方法であって、カンピロバクター属細菌のcdtAゲノムDNAまたはmRNAに特異的に結合しうる2つのポリヌクレオチドからなるプライマー対「(a)配列番号：19および20記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtAゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対」を用いて被験試料に対し核酸増幅反応を行う工程を含む方法、である。上記方法は、C.コリのcdtAゲノムDNAまたはmRNAに特異的に結合するプライマー対によってcdtAゲノムDNAまたはmRNAの一部を増幅し、増幅断片の有無または増幅断片の分子量から、C.コリの検出を可能とする。上記プライマーの具体例は、「配列番号：19および20に記載の配列からなるプライマー対（実施例プライマー：Cc-CdtAU1およびCc-CdtAR1）」である。上記第二の態様の方法は、上記プライマー対(a)に加え、カンピロバクター属細菌のcdtAゲノムDNAまたはmRNAに特異的に結合しうる2つのポリヌクレオチドからなるプライマー対「(b)配列番号：21および22記載の配列からなるプライマー対（実施例プライマー：Cj-CdtAU2およびCj-CdtAR2）」によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtAゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対、および/または「(c)配列番号：23および24記載の配列からなるプライマー対（実施例プライマー：Cf-CdtAU1およびCf-CdtAR1）」によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtAゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対」を同時に使用することにより、C.コリと同時に、C.ジェジュニおよびC.フィータスのいずれかまたは両方をも検出することが可能である。

【 0 0 2 6 】

本発明の方法は、上述した、C.ジェジュニ、C.フィータス、C.コリに対する特異的プライマーを用いて核酸増幅反応を行う工程の後に、「カンピロバクター属細菌のcdtAゲノムDNAまたはmRNAの増幅断片の有無または該増幅断片の分子量から、カンピロバクター属細菌の存在を判定する工程」または「カンピロバクター属細菌のcdtAゲノムDNAまたはmRNAの増幅断片量を定量する工程」を含む。本発明における増幅断片は、DNAでもRNAでもよい。

【 0 0 2 7 】

本発明の方法の第三の態様は、被験試料中のカンピロバクター属細菌を検出する方法であって、カンピロバクター属細菌のcdtCゲノムDNAまたはmRNAに特異的に結合しうる2つのポリヌクレオチドからなるプライマー対「(a)配列番号：25および26記載の配列からなるプライマー対（実施例プライマー：Cc-CdtCU1およびCc-CdtCR1）」によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtCゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対」を用いて被験試料に対し核酸増幅反応を行う工程を含む方法、である。上記方法は、C.コリのcdtCゲノムDNAまたはmRNAに特異的に結合するプライマー対によってcdtCゲノムDNAまたはmRNAの一部を増幅し、増幅断片の有無または増幅断片の分子量から、C.コリの検出を可能とする。上記第三の態様の方法は、上記プライマー対(a)に加え、カンピロバクター属細菌のcdtAゲノムDNAまたはmRNAに特異的に結合しうる2つのポリヌクレオチドからなるプライマー対「(b)配列番号：27および28記載の配列からなるプライマー対（実施例プライマー：Cj-CdtCU1およびCj-CdtCR2）」によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtCゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対、および/または「(c)配列番号：29および30記載の配列からなるプライマー対（実施例プライマー：Cf-CdtCU2およびCf-CdtCR1）」によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtCゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対」を同時に使用することにより、C.コリと同時に、C.ジェジュニおよびC.フィータスのいずれかまたは両方をも検出することが可能である。

## 【 0 0 2 8 】

本発明の方法は、上述した、C.ジェジュニ、C.フィータス、C.コリに対する特異的プライマーを用いて核酸増幅反応を行う工程の後に、「カンピロバクター属細菌のcdtCゲノムDNAまたはmRNAの増幅断片の有無または該増幅断片の分子量から、カンピロバクター属細菌の存在を判定する工程」または「カンピロバクター属細菌のcdtCゲノムDNAまたはmRNAの増幅断片量を定量する工程」を含む。

## 【 0 0 2 9 】

本発明の方法の第四の態様は、被験試料中のカンピロバクター属細菌を検出する方法であって、カンピロバクター属細菌のcdtゲノムDNAまたはmRNAに特異的に結合しうる2つのポリヌクレオチドからなるプライマー対「(a)配列番号：37および38記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対」、「(b)配列番号：40および41記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対」および「(c)配列番号：43および44記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対」のうちいずれか1以上のプライマー対を用いて被験試料に対し核酸増幅反応を行う工程を含む方法である。

## 【 0 0 3 0 】

上記方法は、C.ジェジュニ、C.コリおよびC.フィータスについて、それぞれのcdtCゲノムDNAまたはmRNAに特異的に結合するプライマー対によってcdtCゲノムDNAまたはmRNAの一部を増幅し、増幅断片の有無または増幅断片の分子量から、細菌を検出する方法である。

## 【 0 0 3 1 】

上記方法において使用するプライマーとしては、C.ジェジュニについては、第一に「配列番号：37および38に記載の配列からなるプライマー対（実施例プライマー：Cj cdtRTU2およびCj cdtRTR2）」を挙げることができるが、上記配列そのものに限らず、C.ジェジュニのcdtCゲノムDNAまたはmRNAに特異的に結合しうる2つのポリヌクレオチドからなるプライマー対であって、C.ジェジュニのcdtCゲノムDNAを鋳型として「配列番号：37および38記載の配列からなるプライマー対」によって増幅される領域または相当するmRNA領域を増幅可能なプライマー対であれば、他の配列であっても使用することができる。「配列番号：37および38記載の配列からなるプライマー対」が結合するC.ジェジュニ 計11株のcdtCゲノムDNAの位置を図12に示す。また配列番号：37および38記載の配列からなるプライマー対によって、C.ジェジュニの変異欠損型cdt遺伝子（アクセッション番号：AY442300）についても増幅産物が得られる。

## 【 0 0 3 2 】

また、C.コリについては、第一に「配列番号：40および41記載の配列からなるプライマー対（実施例プライマー：Cc cdtRTU5およびCc cdtRTR5）」を挙げることができるが、上記配列そのものに限らず、C.コリのcdtCゲノムDNAを鋳型として「配列番号：40および41記載の配列からなるプライマー対」によって増幅される領域または相当するmRNA領域を増幅可能なプライマー対であれば、他の配列であっても使用することができる。「配列番号：40および41記載の配列からなるプライマー対」が結合するC.コリ 計18株のcdtCゲノムDNAの位置を図13に示す。

## 【 0 0 3 3 】

さらに、C.フィータスについては、第一に「配列番号：43および44記載の配列からなるプライマー対（実施例プライマー：Cf cdtRTU1およびCf cdtRTR1）」を挙げることができるが、上記配列そのものに限らず、C.フィータスのcdtCゲノムDNAを鋳型として「配列番号：43および44記載の配列からなるプライマー対」によって増幅される領域または相当するmRNA領域を増幅可能なプライマー対であれば、他の配列であっても使用す

ることができる。「配列番号：43および44記載の配列からなるプライマー対」が結合するC. フィータス 計12株のcdtCゲノムDNAの位置を図15に示す。また配列番号：43および44記載の配列からなるプライマー対によって、タイで分離されたC. フィータスC90株のcdt遺伝子についても増幅産物が得られる。

【0034】

本発明の方法は、「(a)配列番号：37および38記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対」、「(b)配列番号：40および41記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対」および「(c)配列番号：43および44記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対」とを別々に用いてもよいが、単一の核酸増幅反応において3種のプライマー対を組み合わせ、同時に使用することもできる。本発明は、マルチプレックスPCR法を代表とする、複数の核酸領域の増幅に好適に用いられるプライマーおよびその組み合わせを用いた核酸増幅法によるカンピロバクター属細菌の検出方法を提供する。本発明における核酸増幅の方法は、目的とする増幅物が得られる限り種類は問わない。PCR法は、本発明において好ましい核酸増幅法の具体例である。

【0035】

本発明の方法は、上述した、C. ジェジュニ、C. フィータス、C. コリに対する特異的プライマーを用いて核酸増幅反応を行う工程の後に、「カンピロバクター属細菌のcdtCゲノムDNAまたはmRNAの増幅断片の有無または該増幅断片の分子量から、カンピロバクター属細菌の存在を判定する工程」または「カンピロバクター属細菌のcdtCゲノムDNAまたはmRNAの増幅断片量を定量する工程」を含む。

【0036】

増幅断片量を定量する工程は、リアルタイムPCR法などによって実施してもよい。リアルタイムPCR法とは、PCRの増幅量をリアルタイムでモニターし解析する方法であり、核酸断片増幅後の電気泳動が不要で、迅速性と定量性に優れている。本発明における、リアルタイムPCR法による菌体量の定量の一例として、まず段階希釈した既知量の菌体サンプルから調整したDNAをスタンダードとしてPCRを行い、増幅が指数関数的に起こる領域で一定の増幅産物量になるサイクル数(threshold;Ct値)を横軸に、初発のDNA量を縦軸にプロットし、検量線を作成する。その後、被検試料についても同様の条件下で反応を行いCt値を求め、検量線から被検試料におけるDNAを測定し、菌体の定量を行う。

【0037】

リアルタイムPCRのモニターは一般的に蛍光試薬を用いて行われ、サーマルサイクラーと分光蛍光光度計を一体化した装置にて行う。蛍光モニター法には、インターカレーターを用いる方法や、TaqManプローブ法など既知の方法が挙げられるが、これに限定されない。

本発明における、リアルタイムPCR法を用いた本発明の核酸増幅断片の検出には、例えば、「(i)配列番号：37および38記載の配列からなるプライマー対によって増幅される核酸断片の検出に使用できる、配列番号：39に記載のプローブ(実施例プローブ：Cj RTP2)」、「(ii)配列番号：40および41記載の配列からなるプライマー対によって増幅される核酸断片の検出に使用できる、配列番号：42に記載のプローブ(実施例プローブ：Cc RTP5)」および「(iii)配列番号：43および44記載の配列からなるプライマー対によって増幅される核酸断片の検出に使用できる、配列番号：45に記載のプローブ(実施例プローブ：Cf RTP1)」のうちいずれか1以上のプローブを用いることができる。

【0038】

これらのプローブは、適宜検出可能な標識が付加されていることが好ましい。標識成分

としては蛍光物質、放射性同位元素、発光物質、酵素活性物質、あるいは磁氣的に観察可能な物質などが用いられる。本発明において最も好ましい標識としては、蛍光標識が挙げられる。

#### 【0039】

リアルタイムPCRの検出に用いる場合には、プローブの5'末端を蛍光物質、3'末端をクエンチャー物質で修飾する。PCRの伸長反応ステップの際にDNAポリメラーゼの5' 3'エキソヌクレアーゼ活性により、PCRの鋳型となるDNA領域にハイブリダイズしたプローブが分解されることで、クエンチャーにより抑制されていた蛍光が発せられ、増幅断片の定量が可能となる。本発明において修飾に用いる蛍光物質の例としては、FAM、TAMRA、Orange560などが挙げられるがこれに限定されない。また、クエンチャー物質の例としてはBHQ (ブラックホールクエンチャー)などが挙げられるが、これに限定されない。実施例のように、それぞれのプローブに異なる蛍光標識を付加することによって、同時に複数の核酸増幅断片を検出することが可能である。

10

#### 【0040】

本発明の方法により、ヒトまたは動物の各種生体試料(例えば、糞便、直腸等のスワブ検体)、食品中のC.コリ、C.ジェジュニ、およびC.フィータスの存在について、簡便かつ迅速に、菌種毎に知ることができる。本発明の方法を実施する際は、カンピロバクター属細菌の存在が疑われる生体試料や食品等から当業者に周知のポリヌクレオチド調製方法(ボイル法等)によってポリヌクレオチドを調製し、得られたポリヌクレオチドを本発明の被験試料とすることができる。

20

#### 【0041】

##### <キット>

本発明は、上記本発明の検出方法に用いるためのキットを提供する。これらキットは、本発明のプライマー対の他、使用説明書を含むものである。さらなる他の要素、例えば、蛍光プローブ、インターカレーター、ポリヌクレオチド調製用の試薬、陽性または陰性プライマー対などを含んでいてもよい。

#### 【0042】

本発明のキットの第一の態様は、「(a)配列番号：1および2記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtBゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対」、および「(b)配列番号：3および4記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtBゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対」のうち、少なくとも1のプライマー対を含むキットである。上記プライマー対(a)はC.ジェジュニについて、上記プライマー対は(b)C.フィータスについて、それぞれのcdtBゲノムDNAまたはmRNAに特異的な領域(特徴的に存在する領域)を増幅する。

30

#### 【0043】

上記プライマーとしては、C.ジェジュニについては、第一に「配列番号：1および2記載の配列からなるプライマー対(実施例プライマー：Cj-CdtBU5およびCj-CdtBR6)」を挙げることができるが、上記配列そのものに限らず、C.ジェジュニのcdtBゲノムDNAまたはmRNAを鋳型として「配列番号：1および2記載の配列からなるプライマー対」によって増幅される領域または相当するmRNA領域を増幅可能なプライマー対であれば、他の配列のポリヌクレオチドであっても使用することができる。

40

#### 【0044】

同様に、C.フィータスについては、第一に「配列番号：3および4記載の配列からなるプライマー対(実施例プライマー：Cf-CdtBU6およびCf-CdtBR3)」を挙げることができるが、上記配列そのものに限らず、C.フィータスのcdtBゲノムDNAまたはmRNAを鋳型として「配列番号：3および4記載の配列からなるプライマー対」によって増幅される領域または相当するmRNA領域を増幅可能なプライマー対であれば、他の配列のポリヌクレオチドであっても使用することができる。

50

## 【 0 0 4 5 】

このような本発明のプライマー対を構成する「他の配列のポリヌクレオチド」は、C.ジェジュニまたはC.フィータスのcdtBゲノムDNAまたはmRNAに相補的な、少なくとも15塩基または20塩基以上の鎖長を有するポリヌクレオチド、例えば、15～100塩基、20～100塩基、15～35塩基長、20～35塩基長のポリヌクレオチドである。ここで「相補鎖」とは、A:T（ただしRNAの場合はU）、G:Cの塩基対からなる2本鎖核酸の一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したもの他、当業者が相同性を決定するために通常使用するアルゴリズムを使用することができる。上記「本発明のプライマー対を構成する他のポリヌクレオチド」は、ハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントな条件下で、cdtBゲノムDNAとハイブリダイズし、他のポリペプチドをコードするDNAとはハイブリダイズしない。また本発明のプライマー対は、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントな条件下で、各種カンピロバクター属細菌のcdtBゲノムDNAに共通する領域にはハイブリダイズしない。上記「本発明のプライマー対を構成する他の配列のポリヌクレオチド」は、例えば、配列番号：1、2、配列番号：3および4のいずれかの記載の塩基配列に1または複数の塩基（例えば1～10個または1～5個、好ましくは1～4個、より好ましくは1～3個、最も好ましくは1または2個の塩基）が付加、欠失、置換および/または挿入した塩基配列からなる、少なくとも15塩基または20塩基以上の鎖長を有するポリヌクレオチドである。

10

20

## 【 0 0 4 6 】

上記「本発明のプライマー対を構成する他の配列のポリヌクレオチド」は、当業者であれば、上記配列番号に記載のポリヌクレオチド配列、および/または公知cdtBゲノムDNA配列にもとづき、適宜設計し、合成により調製することができる。また、上記のように調製したポリヌクレオチドが、変異前のプライマー対と同一のゲノムDNA領域を増幅しうるかは、該調製した変異プライマーを用いて核酸増幅反応を行い、その増幅産物を分析することにより、簡便に評価することができる。

## 【 0 0 4 7 】

本発明のキットは、C.ジェジュニcdtBゲノムDNAまたはmRNAに特異的な領域を増幅する上記プライマー対（a）、およびC.フィータスcdtBゲノムDNAまたはmRNAに特異的な領域を増幅する上記プライマー対に加え、C.コリcdtBゲノムDNAまたはmRNAに特異的な領域を増幅するプライマー対を含むことができる。このように、C.ジェジュニ、C.フィータス、C.コリの3種それぞれについて特異的なプライマー対をすべて含む本発明のキットは、マルチプレックスPCR法等により、上記カンピロバクター属細菌の混合感染を一度に検出することができる。上記C.コリcdtBゲノムDNAに特異的な領域を増幅するプライマー対としては、「配列番号：5および6記載の配列からなるプライマー対（実施例プライマー：Cc-CdtBU5およびCc-CdtBR5）」、および該「配列番号：5および6記載の配列からなるプライマー対」によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtBゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるその他のプライマー対を挙げることができる。

30

40

## 【 0 0 4 8 】

本発明のキットの第二の態様は、本発明のプライマー対として、「（a）：配列番号：19および20記載の配列からなるプライマー対（実施例プライマー：Cc-CdtAU1およびCc-CdtAR1）によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtAゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対」を含むキットである。上記プライマー対（a）は、C.コリのcdtAに特異的に結合する。上記第二の態様のキットは、上記プライマー対（a）に加え、プライマー対「（b）配列番号：21および22記載の配列からなるプライマー対（実施例プライマー：Cj-CdtAU2およびCj-CdtAR2）によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtAゲノムDNAの領域、または

50

増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対」、および/または「(c)配列番号：23および24記載の配列からなるプライマー対(実施例プライマー：Cf-CdtAU1およびCf-CdtAR1)によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtAゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対」を含むことができる。上記プライマー対(a)に加え、プライマー対(b)および/または(c)を含むキットは、マルチプレックスPCR法等により、上記カンピロバクター属細菌の混合感染を一度に検出することができると考えられる。

【0049】

本発明のキットの第三の態様は、本発明のプライマー対として、「(a)配列番号：25)および26記載の配列からなるプライマー対(実施例プライマー：Cc-CdtCU1およびCc-CdtCR1)によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtCゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対」を含むキットである。上記プライマー対(a)は、C.コリのcdtCに特異的に結合する。上記第三の態様のキットは、上記プライマー対(a)に加え、プライマー対「(b)配列番号：27および28記載の配列からなるプライマー対(実施例プライマー：Cj-CdtCU1およびCj-CdtCR2)によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtCゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対」、および/または「(c)配列番号：29および30記載の配列からなるプライマー対(実施例プライマー：Cf-CdtCU2およびCf-CdtCR1)によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtCゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対」を含むことができる。上記プライマー対(a)に加え、プライマー対(b)および/または(c)を含むキットは、マルチプレックスPCR法等により、カンピロバクター属細菌の混合感染を一度に検出することができると考えられる。

【0050】

本発明のキットの第四の態様は、本発明のプライマー対として、「(a)配列番号：37および38記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対(実施例プライマー：Cj cdtRTU2およびCj cdtRTR2)」、「(b)配列番号：40および41記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対(実施例プライマー：Cc cdtRTU5およびCc cdtRTR5)」および「(c)配列番号：43および44記載の配列からなるプライマー対によって増幅されるカンピロバクター属細菌のcdtゲノムDNAの領域、または増幅される前記ゲノムDNAの領域に相当するmRNAの領域を増幅しうるプライマー対(実施例プライマー：Cf cdtRTU1およびCf cdtRTR1)」のうち、少なくとも1のプライマー対を含むキットである。上記プライマー対(a)、プライマー対(b)および/または(c)を含むキットは、マルチプレックスPCR法等により、カンピロバクター属細菌の混合感染を一度に検出することができると考えられる。

さらに、上記キットには、「(i)配列番号：37および38記載の配列からなるプライマー対によって増幅される核酸断片の検出に使用できる、配列番号：39に記載のプロープ(実施例プロープ：Cj RTP2)」、「(ii)配列番号：40および41記載の配列からなるプライマー対によって増幅される核酸断片の検出に使用できる、配列番号：42に記載のプロープ(実施例プロープ：Cc RTP5)」および「(iii)配列番号：43および44記載の配列からなるプライマー対によって増幅される核酸断片の検出に使用できる、配列番号：45に記載のプロープ(実施例プロープ：Cf RTP1)」のいずれか1以上の検出用プロープが含まれていてもよい。

【0051】

さらに本発明のキットは、上述した共通プライマー対のいずれか1つ以上を含むことができる。

【0052】

10

20

30

40

50

本発明のキットを用いて行う核酸増幅反応の種類は、目的とする増幅産物が得られる限り、特に制限はない。例えば、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法（RT-PCR法を含む）、ICAN法、LAMP法、SDA法、LCR法、NASBA法等、公知の核酸増幅反応の中から選択することができる。好適な方法としては、PCR法を示すことができる。

#### 【0053】

本発明のキットは、上記プライマー対および使用説明書の他に、他の構成要素を含むことができる。他の構成要素として、たとえば、陽性プライマー、陰性プライマー、ポリヌクレオチド調製用試薬、蛍光標識プローブ等を含むことができるが、これらに限定されない。陽性プライマーは、当業者であればカンピロバクター属細菌の公知配列から適宜設計して作ることができる。カンピロバクター属細菌の公知配列はデータベースから容易に入手でき、例えば、*C. ジェジュニ* ATCC 33560株の16SrRNA配列はアクセッション番号：M59298（配列番号：34）によって、*C. コリ* ATCC 33559株16SrRNA配列はアクセッション番号：M59073（配列番号：35）によって、*C. フィータス* ATCC 27374株16SrRNA配列はアクセッション番号：M65012（配列番号：36）によって、入手可能である。

10

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

#### 【実施例】

#### 【0054】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

20

#### 【0055】

#### [1. 材料と方法]

#### (1-1 菌株)

ATCC、患者および動物由来のカンピロバクター属細菌、カンピロバクター属細菌以外のcdt遺伝子陽性菌およびその他の腸管感染症菌を使用した（表1）。また、PCRの陽性コントロールとして*C. ジェジュニ*（*C. jejuni*）Co1-008株、*C. コリ*（*C. coli*）Co1-243株、*C. フィータス*（*C. fetus* Co1-187株）を使用し、陰性コントロールとして大腸菌 *E. coli* C600株を使用した。

#### 【0056】

#### [表1]

30

（CdtB遺伝子を標的としたマルチプレックスPCRの評価に用いたカンピロバクター属細菌、カンピロバクター属細菌以外のCdt陽性細菌、およびその他の腸管感染症菌）



Species	Strain	Origin	cdt gene	Species	Strain	Origin	cdt gene	Species	Strain	Origin	cdt gene
<i>C. jejuni</i>	Co1-008	Clinical	+	<i>C. coli</i>	Co1-106	clinical	+	<i>C. fetus</i>	19438	ATCC	+
<i>C. jejuni</i>	Co1-119	Clinical	+	<i>C. coli</i>	Co1-124	clinical	+	<i>C. lari</i>	43675	ATCC	+
<i>C. jejuni</i>	Co1-126	Clinical	+	<i>C. coli</i>	Co1-192	clinical	+	<i>C. hyointestinalis</i>	35217	ATCC	+
<i>C. jejuni</i>	Co2-037	Clinical	+	<i>C. coli</i>	Co1-130	clinical	+	<i>C. upsaliensis</i>	43954	ATCC	+
<i>C. jejuni</i>	Co2-127	Clinical	+	<i>C. coli</i>	Co1-194	clinical	+	<i>C. heuvelicus</i>	51209	ATCC	+
<i>C. jejuni</i>	Co2-128	Clinical	+	<i>C. coli</i>	Co1-245	clinical	+	<i>H. hepaticus</i>	51449	ATCC	+
<i>C. jejuni</i>	Co2-130	Clinical	+	<i>C. coli</i>	Co1-247	clinical	+	<i>H. ducreyi</i>	700724	ATCC	+
<i>C. jejuni</i>	Co2-132	Clinical	+	<i>C. coli</i>	Co2-060	clinical	+	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	S01	Clinical	+
<i>C. jejuni</i>	Co2-146	Clinical	+	<i>C. coli</i>	Co2-082	clinical	+	<i>S. dysenteriae</i>	155 AQ	Clinical	+
<i>C. jejuni</i>	Co2-150	Clinical	+	<i>C. coli</i>	Co2-147	clinical	+	<i>S. dysenteriae</i>	SD-102	Clinical	+
<i>C. jejuni</i>	Co2-193	Clinical	+	<i>C. coli</i>	Co2-173	clinical	+	<i>S. dysenteriae</i>	153 AQ	Clinical	+
<i>C. jejuni</i>	Co2-200	Clinical	+	<i>C. coli</i>	Co2-215	clinical	+	<i>S. dysenteriae</i>	SD-104	Clinical	+
<i>C. jejuni</i>	Co2-214	Clinical	+	<i>C. coli</i>	Co2-218	clinical	+	<i>S. dysenteriae</i>	SD-107	Clinical	+
<i>C. jejuni</i>	Co2-217	Clinical	+	<i>C. coli</i>	Co1-243	clinical	+	<i>S. dysenteriae</i>	SD-112	Clinical	+
<i>C. jejuni</i>	Co3-007	Clinical	+	<i>C. coli</i>	Co3-134	clinical	+	<i>S. sonnei</i>	7 AQ	Clinical	+
<i>C. jejuni</i>	Co3-008	Clinical	+	<i>C. coli</i>	33559	ATCC	+	<i>E. coli (cdtI)</i>	VS-1	Clinical	+
<i>C. jejuni</i>	Co3-011	Clinical	+	<i>C. coli</i>	43478	ATCC	+	<i>E. coli (cdtI)</i>	NT3363	Clinical	+
<i>C. jejuni</i>	Co3-012	Clinical	+	<i>C. fetus</i>	Co1-099	clinical	+	<i>E. coli (cdtI)</i>	GB1371	Clinical	+
<i>C. jejuni</i>	Co3-024	Clinical	+	<i>C. fetus</i>	Co1-187	clinical	+	<i>E. coli (cdtI)</i>	P3	Clinical	+
<i>C. jejuni</i>	Co3-036	Clinical	+	<i>C. fetus</i>	7914c	Bovine	+	<i>E. coli (cdtI)</i>	b52	Animal	+
<i>C. jejuni</i>	Co3-072	Clinical	+	<i>C. fetus</i>	7915a	Bovine	+	<i>E. coli (cdtII)</i>	P101	Clinical	+
<i>C. jejuni</i>	Co3-078	Clinical	+	<i>C. fetus</i>	7915b	Bovine	+	<i>E. coli (cdtII)</i>	S9	Swine	+
<i>C. jejuni</i>	Co3-082	Clinical	+	<i>C. fetus</i>	8013a	Bovine	+	<i>E. coli (cdtIII)</i>	S45	Swine	+
<i>C. jejuni</i>	81-176	Clinical	+	<i>C. fetus</i>	8013b	Bovine	+	<i>E. coli (cdtIII)</i>	P183	Clinical	+
<i>C. jejuni</i>	B01	Bovine	+	<i>C. fetus</i>	8013c	Bovine	+	<i>E. coli (cdtIII)</i>	P194	Clinical	+
<i>C. jejuni</i>	B86	Bovine	+	<i>C. fetus</i>	8614c	Bovine	+	<i>E. coli (cdtIII)</i>	B10	Bovine	+
<i>C. jejuni</i>	10114a	Bovine	+	<i>C. fetus</i>	8813a	Bovine	+	<i>E. coli (cdtIII)</i>	b1	Bovine	+
<i>C. jejuni</i>	10114c	Bovine	+	<i>C. fetus</i>	8813c	Bovine	+	<i>E. coli (cdtIV)</i>	AQ25179	Clinical	+
<i>C. jejuni</i>	8214c	Bovine	+	<i>C. fetus</i>	9512a	Bovine	+	<i>E. coli (cdtIV)</i>	AQ13328	Clinical	+
<i>C. jejuni</i>	8215a	Bovine	+	<i>C. fetus</i>	9813a	Bovine	+	<i>E. coli (cdtIV)</i>	P132	Clinical	+
<i>C. jejuni</i>	8414c	Bovine	+	<i>C. fetus</i>	2-1	Bovine	+	<i>E. coli (cdtIV)</i>	P140	Clinical	+
<i>C. jejuni</i>	9914b	Bovine	+	<i>C. fetus</i>	3-1	Bovine	+	<i>E. coli (cdtIV)</i>	b95	Bovine	+
<i>C. jejuni</i>	33560	ATCC	+	<i>C. fetus</i>	7	Bovine	+	<i>E. coli (cdtIV)</i>	AQ11333	Clinical	+
<i>C. jejuni</i>	43432	ATCC	+	<i>C. fetus</i>	23-1	Bovine	+	<i>E. coli (cdtIV)</i>	P150	Clinical	+
<i>C. coli</i>	Co1-017	Clinical	+	<i>C. fetus</i>	86c	Bovine	+	<i>E. coli (cdtIV)</i>	P336	Clinical	+
<i>C. coli</i>	Co1-071	Clinical	+	<i>C. fetus</i>	27374	ATCC	+	<i>E. coli (cdtIV)</i>	b1	Bovine	+
								<i>E. coli (cdtV)</i>	B102	Bovine	+

10

20

30

40

Species	Strain	Origin	cdt gene	Species (Serogroup)	Strain	Origin	cdt gene	Species	Strain	Origin	cdt gene
<i>Salmonella</i> spp.	ST4, 311	Clinical	-	<i>V. cholerae</i> (O1)	N16961	Clinical	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP11	Shrimp	-
<i>Salmonella</i> spp.	ST1, 312	Clinical	-	<i>V. cholerae</i> (O1)	569B	Clinical	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP12	Shrimp	-
<i>Salmonella</i> spp.	ST3, 307	Clinical	-	<i>V. cholerae</i> (O1)	VC406	Clinical	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP13	Shrimp	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM101	Clinical	-	<i>V. cholerae</i> (non-O1/non-O139)	C-1	Clinical	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP14	Shrimp	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM103	Clinical	-	<i>V. cholerae</i> (non-O1/non-O139)	C-2	Clinical	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP15	Shrimp	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM104	Clinical	-	<i>V. cholerae</i> (non-O1/non-O139)	C-3	Clinical	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP16	Shrimp	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM105	Clinical	-	<i>V. cholerae</i> (non-O1/non-O139)	C-4	Clinical	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP18	Shrimp	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM106	Clinical	-	<i>V. cholerae</i> (non-O1/non-O139)	C-5	Clinical	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP19	Shrimp	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM107	Clinical	-	<i>V. cholerae</i> (non-O1/non-O139)	C-6	Clinical	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP20	Shrimp	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM109	Clinical	-	<i>V. cholerae</i> (non-O1/non-O139)	C-7	Clinical	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP21	Shrimp	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM110	Clinical	-	<i>V. cholerae</i> (non-O1/non-O139)	C-8	Clinical	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP22	Shrimp	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM111	Clinical	-	<i>V. cholerae</i> (non-O1/non-O139)	C-9	Clinical	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP23	Shrimp	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM112	Clinical	-	<i>V. cholerae</i> (non-O1/non-O139)	C-10	Clinical	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP24	Shrimp	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM113	Clinical	-	<i>V. cholerae</i> (O1)	A5	Clinical	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP25	Shrimp	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM114	Clinical	-	<i>V. cholerae</i> (O1)	A10	Clinical	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP26	Shrimp	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM116	Clinical	-	<i>V. cholerae</i> (O1)	A15	Clinical	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP28	Shrimp	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM117	Clinical	-	<i>V. cholerae</i> (O1)	B5	Clinical	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP30	Shrimp	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM118	Clinical	-	<i>V. cholerae</i> (O1)	B10	Clinical	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP31	Shrimp	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM119	Clinical	-	<i>V. cholerae</i> (O1)	C5	Clinical	-	<i>V. enterocolitica</i>	Ye09	Clinical	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM121	Clinical	-	<i>V. cholerae</i> (O1)	C9	Clinical	-	<i>S. dysenteriae</i>	SD1	Clinical	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM122	Clinical	-	<i>V. cholerae</i> (O1)	D5	Clinical	-	<i>S. dysenteriae</i>	SD2	Clinical	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM123	Clinical	-	<i>V. cholerae</i> (O1)	E5	Clinical	-	<i>S. dysenteriae</i>	SD3	Clinical	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM125	Clinical	-	<i>V. cholerae</i> (O1)	E10	Clinical	-	<i>S. dysenteriae</i>	SD5	Clinical	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM126	Clinical	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP1	Shrimp	-	<i>S. dysenteriae</i>	H14 174	Clinical	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM127	Clinical	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP2	Shrimp	-	<i>S. dysenteriae</i>	BCM519	Clinical	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM128	Clinical	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP3	Shrimp	-	<i>S. dysenteriae</i>	HU29	Clinical	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM129	Clinical	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP4	Shrimp	-	<i>S. sonnei</i>	SS2	Clinical	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM130	Clinical	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP5	Shrimp	-	<i>S. sonnei</i>	SS3	Clinical	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM132	Clinical	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP6	Shrimp	-	<i>S. flexneri</i>	SF3	Clinical	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM134	Clinical	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP7	Shrimp	-	<i>S. flexneri</i>	SF4	Clinical	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM135	Clinical	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP8	Shrimp	-	<i>S. flexneri</i>	SF5	Clinical	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM136	Clinical	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP9	Shrimp	-	<i>S. flexneri</i>	SF6	Clinical	-
<i>Salmonella</i> spp.	TM137	Clinical	-	<i>V. parahaemolyticus</i>	VP10	Shrimp	-	<i>S. flexneri</i>	SF7	Clinical	-

## ( 1 - 2 培地および培養条件、試薬、酵素 )

カンピロバクター属細菌および大腸菌、Shigella属細菌の培養は、以下のように行った。カンピロバクター属細菌の培養には、CM271 BLOOD AGAR BASE No.2 (Oxoid、Basings toke、UK) [7.5 g Proteose peptone、1.25 g Liver digest、2.5 g Yeast extract、2.5 g NaCl、6.0 g Agar/500 mL distilled water (DW)、pH 7.4±0.2 at 25 ] に馬無菌脱繊維血 (日本生物材料センター、東京) を5%となるように添加した馬血液寒天培地および Campylobacter selective supplement (Skirrow) (OXOID) (5 mg Vancomycin、2.5 mg Trimethoprim Lactate、1,250 i.u. Polymyxin B/500 mL) を加えた培地 (以下Skirrow培地) を用いた。カンピロバクター属細菌の培養は37 で2から 4日間、LOW TEMPERATURE O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> INCUBATER MODEL-9200 (和研薬、東京) を用いた微好気条件下 (10%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>、8 5%N<sub>2</sub>) で行った。大腸菌は、LB-Lenox液体培地 (Difco Laboratories、Detroit、MI、USA) (5.0 g Bacto tryptone、2.5 g Bacto yeast extract、2.5 g NaCl/500 mL DW)、LB-Lenox寒天培地 (Difco Laboratories) (5.0 g Bacto tryptone、2.5 g Bacto yeast extract、2.5 g NaCl、Agar 7.5 g/500 mL DW) を使用し、37 で16から20時間培養した。

10

## 【 0 0 5 8 】

ヘリコバクター・ヘパティカス (H. hepaticus) は、Brucella Agar (Becton Dickinson、Franklin Lakes、NJ、USA) (5 g Proteose peptone、5 g Pancreatic digest of casein、0.5 g Dextrose、1 g Yeast extract、2.5 g NaCl、6.0 g Agar/500 mL DW、pH 7.4±0.2 at 25 ) に終濃度が5%となるように羊無菌脱繊維血 (日本生物材料センター) を添加した羊血液寒天培地を用いて、37 で12日間、微好気条件下 (10%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>、85%N<sub>2</sub>) で行った。

20

## 【 0 0 5 9 】

軟性下痢菌 Haemophilus ducreyi (H. ducreyi) は、Solution A [25 g Heart infusion broth (Difco Laboratories)、15 g Agar /500 mL DW、pH 7.4±0.2 at 25 ] と Solution B [10 g Hemoglobin (Becton Dickinson) /500 mL DW] を121 15分間高圧蒸気滅菌した物とSolution C [Fetal bovine serum 100 mL (Invitrogen)、IsoVitaleX (Becton Dickinson) 10 mL] をフィルター濾過した物を混合して調製した培地を用いて37 で7日間、微好気条件下 (10%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>、85%N<sub>2</sub>) で行った。

## 【 0 0 6 0 】

アクチノバチルス・アクチノミセテムコミタンス Actinobacillus actinomycetemcomitans (A. actinomycetemcomitans) は、Trypticase soy agar (Becton Dickinson) (2.5 g Papaic digest of soybean meal、7.5 g Pancreatic digest of casein、2.5 g NaCl、7.5g Agar/500 mL DW、pH 7.3±0.2 at 25 ) に0.6% Yeast extract (Difco Laboratories) を加えた培地で 10%CO<sub>2</sub> と90%の空気を含む条件下で37 、2日間培養した。

30

## 【 0 0 6 1 】

サルモネラ菌 (Salmonella spp.) は、Trypticase soy broth (Becton Dickinson) (1 .5 g Papaic digest of soybean meal、8.5 g Pancreatic digest of casein、2.5 g NaCl、1.25g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.25 g Dextrose/500 mL DW、pH 7.3±0.2 at 25 ) を用いて37 で16から20時間振とう培養した。

## 【 0 0 6 2 】

またエルシニア エンテロコリチカ (Yersinia enterocolitica) はTrypticase soy broth (Becton Dickinson) で30 、2日間振とう培養した。

40

## 【 0 0 6 3 】

コレラ菌 (Vibrio cholerae) は、LB-Lenox Broth (Difco Laboratories) で37 、24時間培養した。

## 【 0 0 6 4 】

腸炎ビブリオ菌Vibrio parahaemolyticus (V. parahaemolyticus) は3%NaClを含むアルカリペプトン水 「ニッスイ」 (日水製薬、東京) (5g Peptone、5g NaCl/500 mL DW、pH8.8±0.2 at 25 ) を用いて37 で24時間培養した。

## 【 0 0 6 5 】

50

## ( 1 - 3 PCRおよびアガロースゲル電気泳動、塩基配列の解析 )

PCRの鋳型DNAは、ポイル法にて調製した。具体的には、プレートから掻き取ったコロニーをTE 200  $\mu$ Lに加え、10 分間加熱処理し、12,800  $\times$  gで 10分間遠心して(Himac CT13 R、HITACHI、以下、特に記載のないものは本機器を使用した)得られた上清をPCR用の鋳型DNAとして用いた。

## 【 0 0 6 6 】

PCRはすべてGeneamp PCR System 2400 (PerkinElmer、Wellesley、MA、USA) もしくはGeneamp PCR System 9700 (PerkinElmer) を用いて行った。なお、PCRプライマー及びPCR条件は、表 2 に示した。すなわち、Degenerated PCRプライマー GNW、LPF-D (10 pmol/ $\mu$ L) 各 5  $\mu$ L、調製したゲノムDNA 40 ng、2.5 mM dNTP 4  $\mu$ L、10 $\times$ Ex Taq Buffer 5  $\mu$ L、Takara Ex Taq (5 U/ $\mu$ L) 0.25  $\mu$ Lを滅菌DWで50  $\mu$ Lにし、PCRを行った。PCR産物は、1 %アガロースゲルで電気泳動した。アガロースゲル電気泳動は、ミューピッド(アドバンス、東京)を用いて1 $\times$  TAE Buffer [40 mM Tris-acetate (pH8.5)、1 mM EDTA]、100Vの条件で行った。電気泳動後、1.0  $\mu$ g/mL のエチジウムブロマイド (Sigma) で15分間染色し、DWで脱色した後、ゲルドキュメンテーション解析システム Gel Doc 2000 (Bio-Rad、Hercules、CA、USA) を用いて、PCR産物を紫外線下(260 nm)で撮影した。

## 【 0 0 6 7 】

塩基配列の解析は以下のとおりに行った。プラスミドDNA 100 ngに、表4に示した塩基配列解析用プライマー (3.2 pmol) を各1  $\mu$ L、Big Dye terminator 4  $\mu$ L、5 $\times$  sequence buffer 2  $\mu$ Lを加え、DWで20  $\mu$ Lにメスアップした。96 5分間反応後、96 30 秒、50 15 秒、60 4分の反応を25回繰り返した。PCR産物をCENTRI SPIN 20 Spin Columns (Princeton Separations、Adelphia、NJ、USA) によって精製し、TOMY CENTRIFUGAL CONCENTRATOR CC-105 (トミー精工、東京) にて減圧乾燥させ、Template Suppression Reagent (Applied Biosystems、Foster City、CA、USA) 20  $\mu$ Lに溶解した。これを3分間煮沸後氷上で急冷し、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列の解析を行った。得られた塩基配列は、DNASIS (HitachiSoft、東京)、Lasergene software (DNASTar、WI、USA) を用いて解析した。また、相同性検索はBLAST (DDBJ、<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/blast-j.html>) を用いて行った。

## 【 0 0 6 8 】

## [ 表 2 ]

(C. ジェジュニ、C. コリ、およびC. フィータスのcdtA、cdtB、およびcdtC遺伝子に対するマルチプレックスPCRプライマーとcdtB遺伝子に対する共通プライマーおよびそれらのPCR条件)

10

20

30

【 0 0 6 9 】

Name	Sequence (5'-3')	Target	PCR condition			Amplicon (bp)
			Denaturing	Annealing	Extention	
C-CdtBcom1	ACTTGGAATTGCAAGGC (配列番号:7)	Cj-/Ce-/Cf-cdtB	94°C, 30 s	50°C, 30 s	72°C, 30 s	717/723/712
C-CdtBcom2	TCTAAATTTACHGGAAAATG (配列番号:8)					
Cj-CdtAU2	AGGACTTGAAACCTACTTTTC (配列番号:21)	Cj-cdtA	94°C, 30 s	55°C, 30 s	72°C, 30 s	631
Cj-CdtAR2	AGGTGGAGTAGTTAAAAACC (配列番号:22)					
Cj-CdtBU5	ATCTTTAAACCTTGCTTTGC (配列番号:1)	Cj-cdtB	94°C, 30 s	56°C, 30 s	72°C, 30s	714
Cj-CdtBR6	GCAAGCATTAATAATCGCAGC (配列番号:2)					
Cj-CdtCU1	TTTAGCCTTTGCAACTCCTA (配列番号:27)	Cj-cdtC	94°C, 30 s	55°C, 30 s	72°C, 30 s	524
Cj-CdtCR2	AAGGGGTAGCAGCTGTAA (配列番号:28)					
Ce-CdtAU1	ATTGCCAAGGCTAAAATCTC (配列番号:19)	Ce-cdtA	94°C, 30 s	55°C, 30 s	72°C, 30 s	329
Ce-CdtAR1	GATAAAGTCTCCAAAACCTGC (配列番号:20)					
Ce-CdtBU5	TTTAATGTATTATTGCGCG (配列番号:5)	Ce-cdtB	94°C, 30 s	56°C, 30 s	72°C, 30 s	413
Ce-CdtBR5	TCATTGCCTATGCGTATG (配列番号:6)					
Ce-CdtCU1	TAGGGATATGCACGCAAAAG (配列番号:25)	Ce-cdtC	94°C, 30 s	55°C, 30 s	72°C, 30 s	313
Ce-CdtCR1	GCTTAATACAGTTACGATAG (配列番号:26)					
Cf-CdtAU1	AACGACAAATGTAAGCACTC (配列番号:23)	Cf-cdtA	94°C, 30 s	55°C, 30 s	72°C, 30 s	487
Cf-CdtAR1	TATTTATGCAAGTCGTGCGA (配列番号:24)					
Cf-CdtBU6	GGCTTTGCAAAACCAGAAAG (配列番号:3)	Cf-cdtB	94°C, 30 s	56°C, 30 s	72°C, 30 s	553
Cf-CdtBR3	CAAGAGTTCCTCTTAAACTC (配列番号:4)					
Cf-CdtCU2	AAGCATAAGTTTTTGCAACG (配列番号:29)	Cf-cdtC	94°C, 30 s	55°C, 30 s	72°C, 30 s	397
Cf-CdtCR1	GTTTGGATTTTCAAAATGTTCC (配列番号:30)					

H: A, C, or T

Cj は *C. jejuni*, Ce は *C. coli*, Cf は *C. fetus* を示す。

## [ 実施例 1 ] cdt遺伝子のマルチプレックスPCR

cdtA遺伝子に対するマルチプレックスPCRでは、陽性コントロールと同様、*C. ジェジュニ*、*C. コリ*、および*C. フィータス*で約630 bp、330 bpおよび490 bpの菌種特異的な断片がそれぞれ増幅された。cdtB遺伝子に対するマルチプレックスPCRでも、陽性コントロールと同様、*C. ジェジュニ*、*C. コリ*、および*C. フィータス*で約710 bp、410 bpおよび550 bpの菌種特異的な断片がそれぞれ増幅された。さらにcdtC遺伝子に対するマルチプレックスPCRでも、陽性コントロールと同様、*C. ジェジュニ*、*C. コリ*、および*C. フィータス*で約500 bp、300 bpおよび400 bpの菌種特異的な断片がそれぞれ増幅された（図1）。一方、cdt遺伝子陽性の*C. hyointestinalis*、*C. lari*、*C. upsaliensis*、*C. helveticus*等の他のカンピロバクター属細菌や、*H. ヘパティカス*、軟性下痢菌（*H. ducreyi*）、*A. アクチノミセテムコミタンス*、*Shigella* spp. や異なる5種類のcdt遺伝子（I、II、III、IV、V）をそれぞれ保有する大腸菌のcdtA、cdtB、cdtC遺伝子のいずれも増幅されず、*C. ジェジュニ*、*C. コリ*、および*C. フィータス*の3菌種のcdt遺伝子にのみ特異的であった（図1、表3）。さらに、その他の代表的な腸管感染症菌である*Salmonella* spp.、*エルシニア エンテロコリチカ*、*Vibrio* spp.でも増幅バンドは見られなかった（表3）。

10

【 0 0 7 0 】

## [ 表 3 ]

（患者および動物から分離したcdt遺伝子陽性菌およびその他の腸管感染症菌のマルチプレックスPCRと共通プライマーによるPCRの結果）

Species	Origin (n*)	<i>C. jejuni</i>						<i>C. coli</i>			<i>C. fetus</i>			Common PCR
		Multiplex PCR			Multiplex PCR			Multiplex PCR			Multiplex PCR			
		<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	<i>cdtC</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	<i>cdtC</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	<i>cdtC</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	<i>cdtC</i>	
<i>C. jejuni</i>	Clinical (24)	24	24	24	-	-	-	-	-	-	-	-	24	
<i>C. jejuni</i>	Animal (8)	8	8	8	-	-	-	-	-	-	-	-	8	
<i>C. jejuni</i>	ATCC33560 (1)	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
<i>C. jejuni</i>	ATCC43432 (1)	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
<i>C. coli</i>	Clinical (17)	-	-	-	17	17	17	-	-	-	-	-	17	
<i>C. coli</i>	ATCC33559 (1)	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	1	
<i>C. coli</i>	ATCC43478 (1)	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	1	
<i>C. fetus</i>	Clinical (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	2	2	
<i>C. fetus</i>	Animal (16)	-	-	-	-	-	-	-	-	16	16	6	16	
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	ATCC27374 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	ATCC19438 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	
<i>C. lari</i>	ATCC43675 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. hyointestinalis</i>	ATCC35217 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. helveticus</i>	ATCC51209 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. upsaliensis</i>	ATCC43954 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>H. hepaticus</i>	ATCC51209 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>H. ducreyi</i>	ATCC700724 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	Clinical (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Shigella</i> spp.	Clinical (21)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>E. coli</i> ( <i>cdtI</i> )	Clinical and Aminimal (5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>E. coli</i> ( <i>cdtII</i> )	Clinical and Aminimal (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>E. coli</i> ( <i>cdtIII</i> )	Clinical and Aminimal (5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>E. coli</i> ( <i>cdtIV</i> )	Clinical and Aminimal (5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>E. coli</i> ( <i>cdtV</i> )	Clinical and Aminimal (5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Salmonella</i> spp.	Clinical (33)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Y. enterocolitica</i>	Clinical (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>V. cholerae</i>	Clinical (23)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>V. parahaemolyticus</i>	Shrimp (28)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

(\*)は調べた菌株数を示す。

# 【 0 0 7 1 】

[ 実施例 2 ] *cdtB*遺伝子に対する共通プライマーによるカンピロバクター属細菌の検出

カンピロバクター属細菌を*cdt*遺伝子を標的とした一度のPCRで検出できるかどうかにつ

10

20

30

40

50

いて、菌種間を越えて最も相同性が高かったcdtB遺伝子を標的とした共通プライマーを設計し、検討した。共通プライマーでPCRを行ったところ、*C. ジェジュニ*、*C. コリ*、および*C. フィータス*のcdtB遺伝子由来の約720 bpの特異的なバンドが増幅された。さらに、*C. ジェジュニ*、*C. コリ*、*C. フィータス*以外の他のカンピロバクター属細菌、すなわち、*C. hyointestinalis*、*C. lari*、*C. upsaliensis*および*C. helveticus*においても、約720 bpの断片が増幅された(図2)。*C. ジェジュニ*、*C. コリ*、*C. フィータス*以外のカンピロバクター属細菌で得られたPCR産物の塩基配列を解析した結果、それぞれ*C. ジェジュニ*のcdtB遺伝子に相同性の高い遺伝子が確認された。一方、カンピロバクター属細菌以外のcdt遺伝子陽性細菌及びその他の腸管感染症菌においては、カンピロバクター属細菌と最も高い相同性を有するcdt遺伝子を保持していた*H. ヘパティカス*においても、共通プライマーで増幅断片は得られなかった(図2、表3)。以上の結果から、カンピロバクター属細菌のcdtB遺伝子には菌種間を越えて保存されている領域があり、カンピロバクター属細菌のcdtB遺伝子を標的することによって、少なくとも7菌種のカンピロバクター属細菌を一度のPCRで検出することが可能であった。

#### 【0072】

[実施例3] cdtB遺伝子を標的としたマルチプレックスPCRによる複数のカンピロバクター属細菌の同時検出

混合感染を想定して、複数菌種のカンピロバクター属細菌を一度に検出できるかどうかについてcdtB遺伝子を標的としたマルチプレックスPCRの評価を行った。前項において、cdtA、cdtB、およびcdtC遺伝子を対象としたマルチプレックスPCRすべてにおいて、その特異性は確認できたが、各サブユニット遺伝子の保存性はcdtB遺伝子が最も高かったので、以後の実験ではcdtB遺伝子を標的としたマルチプレックスPCRを用いた。

#### 【0073】

*C. ジェジュニ*、*C. コリ*、および*C. フィータス*のゲノムDNAをそれぞれ2種類、あるいは3種類混ぜた系で、cdtB遺伝子に対するマルチプレックスPCRを行った。その結果、図3に示したように、*C. ジェジュニ*、*C. コリ*、および*C. フィータス*単独の場合のみならず、それぞれ2菌種、3菌種存在した場合でもそれぞれに対して特異的なバンドを増幅することができた。よって、cdtB遺伝子を対象としたマルチプレックスPCRは混合感染の検査にも適用出来ると考えられた。

#### 【0074】

[実施例4] cdtB遺伝子を標的としたマルチプレックスPCRの*C. ジェジュニ*、*C. コリ*、および*C. フィータス*の検出限界

cdtB遺伝子を標的としたマルチプレックスPCRの検出限界を*C. ジェジュニ*、*C. コリ*、および*C. フィータス*を用いて調べた。その結果、*C. ジェジュニ*と*C. コリ*においては、特異的な増幅断片を検出するにPCRチューブあたり、 $10^1$  colony forming unit (cfu) の菌数が必要であった。一方、*C. フィータス*では、特異的な増幅断片を検出するにPCRチューブあたり、 $10^2$  cfuの菌数が必要であった(図4)。

#### 【0075】

本願のプライマーは、設計した他のプライマー(WO2005/054472 配列番号:11-16)と比較して、感度および特異性の向上が確認された。以前のプライマーセットで非特異的な増幅が認められた9検体のboil templateを用いて本願のプライマーセットでPCRを行ったところ、全ての検体において非特異的な増幅が見られなくなった。また、116検体の健常小児便を本願のプライマーセットでPCRを行ったところ、1検体にのみ非常に弱い非特異的な増幅が認められたのみであった。

#### 【0076】

[実施例5] *C. ジェジュニ*、*C. コリ*、および*C. フィータス*におけるリアルタイムPCR検出用プライマーおよびプローブの設計

*C. ジェジュニ*のプライマー、及びプローブはcdtB遺伝子欠損株を含む計11株について、*C. コリ*のプライマー、及びプローブはcdt遺伝子変異株を含む計18株について、*C. フィータス*のプライマー、及びプローブはthaiで分離されたcdt遺伝子変異株を含む計12株



について、それぞれのcdt遺伝子配列を菌種ごとに比較し、各菌種ごとに全ての菌株で検出が可能となる領域を調べ、かつ特異性を検査し、最も良好な組み合わせを選んだ。

#### 【 0 0 7 7 】

##### ( 1 ) C. ジェジュニ

C. ジェジュニの変異欠損型cdt遺伝子 (AY442300) と81-176株のcdt遺伝子と比較した場合、変異欠損型cdt遺伝子はcdtAからcdtBの前半および、cdtBの中央部を大きく欠損しており、また、cdtB遺伝子についても多くの塩基置換が認められた (図 1 1)。そこで、比較的保存性の高いcdtC遺伝子領域に着目し、この領域でのリアルタイムPCR用プライマー、及びプローブのデザインを試みた。

リアルタイムPCR用プライマー、及びプローブのデザインの為、欠損型を含むいくつかのcdtC遺伝子と比較し、最も変異が少なく、かつリアルタイムPCR用プライマー、及びプローブに使用できる領域を検索した。その後、各プライマーセットを用いてPCRを行い、最も適したプライマーセットを設定した (図 1 2)。

##### 塩基配列解析用プライマー

Cj cdtRTU2: 5' GCAAAATCTTGTCAGATGATCTAAAAG 3' (配列番号: 3 7)

Cj cdtRTR2: 5' TCCAAACTAAAGAACGAATTTGCA 3' (配列番号: 3 8)

##### 検出用プローブ

Cj RTP2: 5' (FAM)-AAACTGTATTTTCTATAATGCCAACAACTTCAG-(BHQ-1) 3' (配列番号: 3 9)

BHQ: ブラックホールクエンチャー (蛍光吸収色素)

#### 【 0 0 7 8 】

##### ( 2 ) C. コリ

リアルタイムPCR用プライマー、及びプローブのデザインの為、いくつかのC. コリのcdt遺伝子と比較し、最も変異が少なく、かつリアルタイムPCR用プライマー、及びプローブに使用できる領域を検索した。その後、各PCRプライマーを用いてPCRを行い、最も適したプライマーセットを設定した (図 1 3)。

##### 塩基配列解析用プライマー

Cc cdtRTU5: 5' TTTAACCAATGGTGCAATCAAT 3' (配列番号: 4 0)

Cc cdtRTR5: 5' ATTCTCCTAAACCAAGCGATTTTC 3' (配列番号: 4 1)

##### 検出用プローブ

Cc RTP5: 5' (TAMRA)-CATGAGCACTTTTCTGACTCTAGTATCGCCA-(BHQ-2) 3' (配列番号: 4 2)

#### 【 0 0 7 9 】

##### ( 3 ) C. フィータス

C. fetusの複数の菌株についてcdt遺伝子の配列決定を行ったが、Thaiで分離されたC. fetus C90株のcdt遺伝子が国内の株のcdt遺伝子と若干異なる事がわかった。そこで、両者を比較し、保存性の高い領域を検索した (図 1 4)。

リアルタイムPCR用プライマー、及びプローブのデザインの為、いくつかのC. コリのcdt遺伝子と比較し、最も変異が少なく、かつリアルタイムPCR用プライマー、及びプローブに使用できる領域を検索した。その後、各PCRプライマーを用いてPCRを行い、最も適したプライマーセットを設定した (図 1 5)。

##### 塩基配列解析用プライマー

Cf cdtRTU1: 5' CTTTTCTTTTGGATACGTGCAA 3' (配列番号: 4 3)

Cf cdtRTR1: 5' AAAAATCCGCTAGGAGCGATCTG 3' (配列番号: 4 4)

##### 検出用プローブ

Cf RTP1: (Orange560)-CAAGTAGCAGCCGACGTAAAAATGTGCCT-(BHQ-1) 3' (配列番号: 4 5)

#### 【 0 0 8 0 】

[ 実施例 6 ] Real-Time PCRによるC. ジェジュニ, C. コリ, およびC. フィータスの検出および検出限界

テンプレートの調製は、C. ジェジュニ: 81-176株、C. コリ: Col-243株、C. フィータ

10

20

30

40

50

ス: Co1-187株、それぞれの菌種を1, 10,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  cfu/ $\mu$ Lとなるように菌液を調製し、ボイル法 (10 min煮沸後、遠心分離して上清を得る) にて作製した。すなわち、1PCR チューブあたり、それぞれ1個から $10^5$ 個の菌量となる。

リアルタイムPCRは以下のとおりに行った。調整したテンプレート 各1  $\mu$ Lに、TaqMan Master Mix (Applied Biosystems) 10  $\mu$ L、上述の塩基配列解析用プライマー (900 nM) を各2  $\mu$ L、検出用プローブ (250 nM) を各10  $\mu$ L加え、DWで20  $\mu$ Lにメスアップした。95 5分間反応後、95 15秒、60 60秒の反応を40回繰り返し、4 で保存した。検出は、Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system(Applied Biosystems)を用いて行った。

#### 【0081】

10

C. ジェジュニにおいて $10^5$  cfu/tubeの濃度では22サイクル目から立ち上がりが認められた。 $10^3$  cfu/tubeの濃度では30サイクル目から立ち上がりが認められたが、 $10^2$  cfu/tubeでは有意な蛍光発光が認められなかった。検出限界は $10^3$  cfu/tubeであった (図8)。

C. コリでは $10^5$  cfu/tubeの濃度では20サイクル目から立ち上がりが認められた。 $10^2$  cfu/tubeでは34サイクル目から立ち上がりが認められた。検出限界は $10^2$  cfu/tubeであった (図9)。

C. フィータスにおいても $10^5$  cfu/tubeの濃度では21サイクル目から立ち上がりが認められた。 $10^2$  cfu/tubeでは35サイクル目から立ち上がりが認められた。検出限界は $10^2$  cfu/tubeであった (図10)。

#### 【0082】

20

3菌種とも、良好な結果を示し、実用に十分な性能を持っていると考えられた。

各菌種の検出にはC. ジェジュニはFAM、C. コリはTAMRA、C. フィータスはOrange560と、それぞれ蛍光波長の異なる蛍光物質でラベルされたプローブを使用しており、多蛍光を検出できるApplied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR systemを用いた場合、1チューブで3菌種が検出できるMultiplex Real-Time PCRが可能である。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0083】

本発明によって、カンピロバクター属細菌の新規検出方法および該検出方法用キットが提供された。本発明の方法は、従来法と比べ、簡便かつ迅速な検査を可能とする。特に、本発明の方法は、複数種のカンピロバクター属細菌存在下においてマルチプレックスPCRを行い、各種細菌を菌種まで同定できることが確認された。上述のとおり、カンピロバクター属細菌は食中毒の起因菌として公衆衛生上重要な細菌である。実際の感染患者や食品汚染では、複数種の細菌が混合して存在している場合が少なくない。本発明の方法は、各菌種毎に分離せず一度に検出できるため、簡便かつ迅速に食中毒等の起因菌をいち早く突き止めることを可能にする。本発明の方法は、臨床上のみならず、食品等の製造工程管理、工場衛生管理などにおいて極めて有用性が高い。

30

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0084】

【図1】 cdtA、cdtB、およびcdtC遺伝子を標的としたマルチプレックスPCRの結果を示す写真である。各菌株のボイルテンプレートを用いてcdtA遺伝子(A)、cdtB遺伝子(B)、およびcdtC遺伝子(C)のマルチプレックスPCRを行い、PCR産物を2% アガロースゲル電気泳動で解析した。PCR産物及び分子量マーカーはそれぞれ5  $\mu$ Lアプライした。レーン1、16: 100 bp Ladder marker、レーン2: C. ジェジュニ ATCC33560、レーン3: C. ジェジュニ ATCC43432、レーン4: C. コリ ATCC33559、レーン5: C. コリ ATCC43478、レーン6: C. フィータス ATCC27374、レーン7: C. フィータス ATCC19438、レーン8: C. *hyointestinalis* ATCC35217、レーン9: C. *lari* ATCC43675、レーン10: C. *upsaliensis* ATCC43954、レーン11: C. *helveticus* ATCC51209、レーン12: H. ヘパティカス ATCC51449、レーン13: 軟性下痢菌 (H. *ducreyi*) ATCC700724、レーン14: A. アクチノミセテムコミタンス S01、レーン15: E. coli C600。

40

【図2】 cdtB遺伝子を標的とした共通プライマーによる各種カンピロバクター属細菌に対

50

するPCRの結果を示す写真である。各菌株のボイルテンプレートを用いてcdtB遺伝子を標的とした共通プライマーを用いてPCRを行った。PCR産物は2% アガロースゲル電気泳動にて解析した。PCR産物及び分子量マーカーは、それぞれ5  $\mu$ Lアプライした。

【図3】複数菌種を鋳型DNAとして用いたcdtB遺伝子を標的としたマルチプレックスPCRの結果を示す写真である。C. ジェジュニ Co1-008、C. コリ Co1-192、C. フィータス Co1-187のボイルテンプレートを1  $\mu$ Lずつ様々な組み合わせで混合したものを用いて、cdtB遺伝子を標的としたマルチプレックスPCRを行った。PCR産物は2% アガロースゲル電気泳動にて解析した。PCR産物及び分子量マーカーはそれぞれ5  $\mu$ Lアプライした。

【図4】cdtB遺伝子を標的としたマルチプレックスPCRの検出限界を示す写真である。1PCRチューブ当たり $10^0$  colony forming unit (cfu) から $10^3$  cfu になるように調製した各菌株のボイルテンプレートを用いて、cdtB遺伝子を標的としたマルチプレックスPCRを行った。PCR産物は2% アガロースゲル電気泳動にて解析した。PCR産物及び分子量マーカーはそれぞれ5  $\mu$ Lアプライした。

【図5 - 1】C. ジェジュニ81-176のcdtBゲノムDNA配列上の、配列番号：1記載の配列からなるプライマー（プライマー名：Cj-CdtBU5）および配列番号：2記載の配列からなるプライマー（プライマー名：Cj-CdtBR6）が結合する位置を示す図である。各プライマーが結合する位置を下線で示した。アスタリスク（\*）は終止コドンを示す。塩基配列の下のアミノ酸配列は、それぞれ順に、cdtA、cdtB、cdtCによってコードされるCDTサブユニットのアミノ酸配列である。

【図5 - 2】図5 - 1の続きを示す図である。

【図5 - 3】図5 - 2の続きを示す図である。

【図6 - 1】C. フィータス Co1 - 187のcdtBゲノムDNA配列上の、配列番号：3記載の配列からなるプライマー（プライマー名：Cf-CdtBU6）および配列番号：4記載の配列からなるプライマー（プライマー名：Cf-CdtBR3）が結合する位置を示す図である。各プライマーが結合する位置を下線および各プライマー名で示した。プライマー名の付いていない下線はSD配列を示す。アスタリスク（\*）は終止コドンを示す。塩基配列の下のアミノ酸配列は、それぞれ順に、cdtA、cdtB、cdtCによってコードされるCDTサブユニットのアミノ酸配列である。矢印はコードされたポリペプチドの翻訳の方向を示す。

【図6 - 2】図6 - 1の続きを示す図である。

【図7 - 1】C. コリCo1 - 243のcdtBゲノムDNA配列上の、配列番号：5記載の配列からなるプライマー（プライマー名：Cc-CdtBU5）および配列番号：6記載の配列からなるプライマー（プライマー名：Cc-CdtBR5）が結合する位置を示す図である。各プライマーが結合する位置を下線および各プライマー名で示した。プライマー名の付いていない下線はSD配列を示す。アスタリスク（\*）は終止コドンを示す。塩基配列の下のアミノ酸配列は、それぞれ順に、cdtA、cdtB、cdtCによってコードされるCDTサブユニットのアミノ酸配列である。矢印はコードされたポリペプチドの翻訳の方向を示す。

【図7 - 2】図7 - 1の続きを示す図である。

【図8】Real-Time PCRによるC. jejuniの検量線を示す図である。

【図9】Real-Time PCRによるC. coliの検量線を示す図である。

【図10】Real-Time PCRによるC. fetusの検量線を示す図である。

【図11 - 1】C. ジェジュニ81-176株のcdt遺伝子（配列番号：31）およびC. ジェジュニ cdt遺伝子欠損株のcdt遺伝子（Genbankアクセッション番号：AY442600）の配列比較の図である。鎖線（- - -）はcdtA遺伝子領域、実線はcdtB遺伝子領域、点線はcdtC遺伝子領域を示す。(1) 遺伝子欠損変異型cdt遺伝子（AY442300）のcdtC遺伝子3'末端領域は報告されていないため不明。ドット「.」は81-176株の塩基と相同な塩基、バー「-」はギャップを示す。

【図11 - 2】図11 - 1の続きを示す図である。

【図12 - 1】C. ジェジュニcdtC遺伝子とC. ジェジュニ cdt遺伝子欠損変異株のcdtC遺伝子（Genbankアクセッション番号：AY442300）の比較とリアルタイムPCR用プライマー、及びプローブの位置を示す図である。

【図 1 2 - 2】図 1 2 - 1 の続きを示す図である。

【図 1 2 - 3】図 1 2 - 2 の続きを示す図である。

【図 1 2 - 4】図 1 2 - 3 の続きを示す図である。

【図 1 3 - 1】C. コリ Col-243株 cdt遺伝子（配列番号：33）およびその他のC. コリ cdt遺伝子の比較とリアルタイムPCR用プライマー、及びプローブの位置を示す図である。鎖線（- - -）はcdtA遺伝子領域、実線はcdtB遺伝子領域、点線はcdtC遺伝子領域を示す。ドット「.」はCo1-243株の塩基と相同な塩基、バー「-」はギャップを示す。

【図 1 3 - 2】図 1 3 - 1 の続きを示す図である。

【図 1 3 - 3】図 1 3 - 2 の続きを示す図である。

【図 1 3 - 4】図 1 3 - 3 の続きを示す図である。

【図 1 3 - 5】図 1 3 - 4 の続きを示す図である。

【図 1 3 - 6】図 1 3 - 5 の続きを示す図である。

【図 1 3 - 7】図 1 3 - 6 の続きを示す図である。

【図 1 3 - 8】図 1 3 - 7 の続きを示す図である。

【図 1 3 - 9】図 1 3 - 8 の続きを示す図である。

【図 1 3 - 10】図 1 3 - 9 の続きを示す図である。

【図 1 3 - 11】図 1 3 - 10 の続きを示す図である。

【図 1 3 - 12】図 1 3 - 11 の続きを示す図である。

【図 1 3 - 13】図 1 3 - 12 の続きを示す図である。

【図 1 3 - 14】図 1 3 - 13 の続きを示す図である。

【図 1 4 - 1】C. フィータス Co1-187株cdt遺伝子（配列番号：32）とThai由来C. フィータス C90株のcdt遺伝子の配列比較の図である。鎖線（- - -）はcdtA遺伝子領域、実線はcdtB遺伝子領域、点線はcdtC遺伝子領域を示す。ドット「.」はCo1-187株の塩基と相同な塩基、バー「-」はギャップを示す。

【図 1 4 - 2】図 1 4 - 1 の続きを示す図である。

【図 1 4 - 3】図 1 4 - 2 の続きを示す図である。

【図 1 5 - 1】C. フィータス cdtC遺伝子とThai由来C. フィータス C90株 のcdtC遺伝子の比較とリアルタイムPCR用プライマー、及びプローブの位置を示す図である。

【図 1 5 - 2】図 1 5 - 1 の続きを示す図である。

【図 1 5 - 3】図 1 5 - 2 の続きを示す図である。

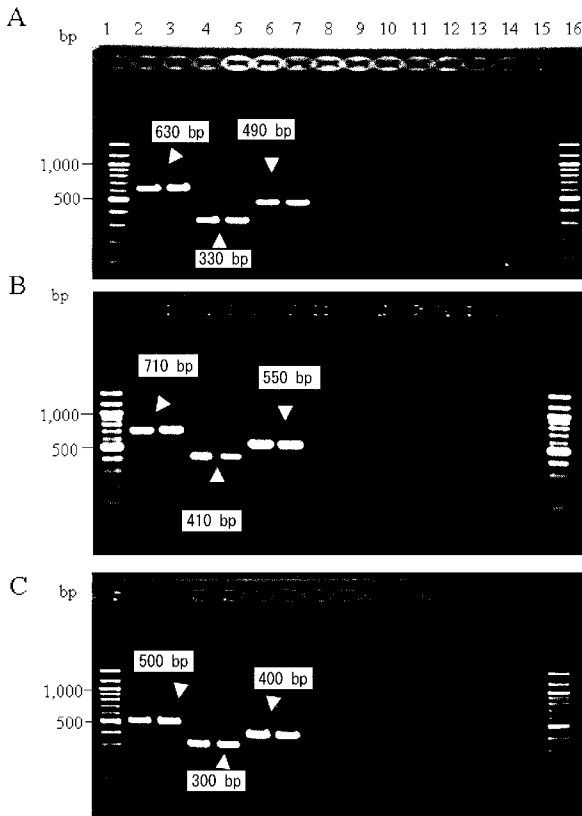
【図 1 5 - 4】図 1 5 - 3 の続きを示す図である。

10

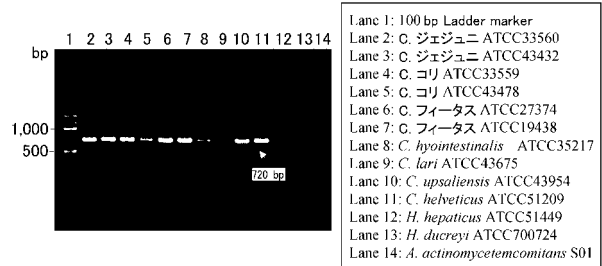
20

30

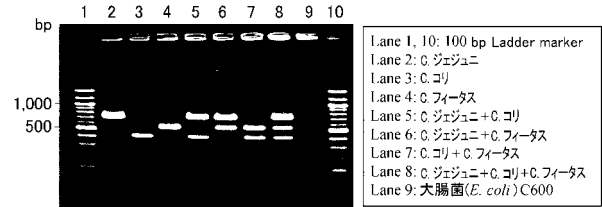
【図 1】



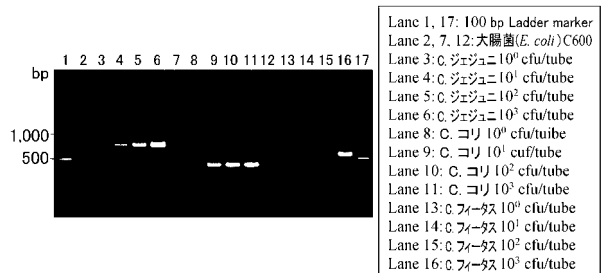
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【図 5 - 1】

```

TGCTAAATATAAGTGTGTTAAGATACATATAAATCTACCTTTAAAAACAACAAATATAA 60
ACATTTTAAAAAGCGGAAATATAATGAAATTTATGTTATTTTCTTAAAAATTTA 120
AATACATATCAAGGTTTAAATGCAAAAAATATAGTTTATTTATGTTGTTTATGA 180
      M Q K I I V F I L C C F M
CTTTTCTTATGATGCTTCTCTAAATTTGAAATGTAATCCTTTGGGCGTTCAT 240
T F F L Y A C S S K F E N V N P L G R S
TTGGAGAAATTTGAAGTACTGCTCTTAAAGTACTGAACTACTTTTCTACCA 300
P G E F E D T D P L K L G L E P T F P T
ATCAAGAAATTTCAAGCTTAAATAGCGGTGCTGATTTAGTACCTATTACTCTATTACCC 360
N Q E I P S L I S G A D L V P I T P I T
CACCTTTAACTAGAACAAATAGTGCAACAAATAGTCAAGCAATGGGATCAATCCTC 420
P P L T R T S N S A N N N A A N G I N P
GCTTTAAAGAGCAAGCTTTTAAATGATGTTTAAATTTTGAATCGCCCTGCGGTTCTG 480
R F K D E A F N D V L I F E N R P A V S
ATTTTTAAACCTTTTACCGTACTGCGGAGGAGCTTTAAACGTTTGGGCTTTAGCACAAG 540
D F L T I L G P S G A A L T V W A L A Q
GAAATTTGATTTGGGCTATCTTTAATCGATAGCAAGGATTTGGCGATGCTAGAGTTT 600
G N W I W G Y T L I D S K G F G D A R V
GGCACTTTTGTCTTATCCTAATGATTTTGAATGATTTAAATGCAAAACCAATACTT 660
W Q L L L Y P N D F A M I K N A K T N T
GTCTTAATGCTTATGGAATGGAATTTGCAATTTCTTGTGATGCAAGCAATCAAGCAC 720
C L N A Y G N G I V H Y P C D A S N H A
AAATGTGAAATTTATCCTATGAGCAATACAGCGGTTCAAAATAAAAATTTAGGAAATG 780
Q M W K L I P M S N T A V Q I K N L G N
GAAATGCAATACAGCACTTATCAAACTTTATGTTGATTTTCAAGGCTTTTAAAA 840
G K C I Q A P I T N L Y G D F H K V F K
TTTTTACCGTAGAGTGTGCAAAAAAGATAATTTTATGCAACAAATGTTTAACTACTC 900
I F T V E C A K K D N F D Q Q W F L T T
CACCTTTTACCGCAAAACCTTTATATCGCAAGGAGAGTACGATGAAAAAATTTATATG 960
P P F T A K P L Y R Q G E V R ***
      M K K I I C
TTTTTTTATCTTTTAACTTGTCTTTTGAATTTAGAAAAATTTAATGTTGCACTTG 1020
      Cj-CdtBU5
L F L S F N L A F A N L E N F N V G T W
GAATTTGCAAGGCTCATCCGAGCCACAGAAAGCAATGGAGTGTAGTGTAGACAACT 1080
N L Q G S S A A T E S K W S V S V R Q L

```

【図 5 - 2】

```

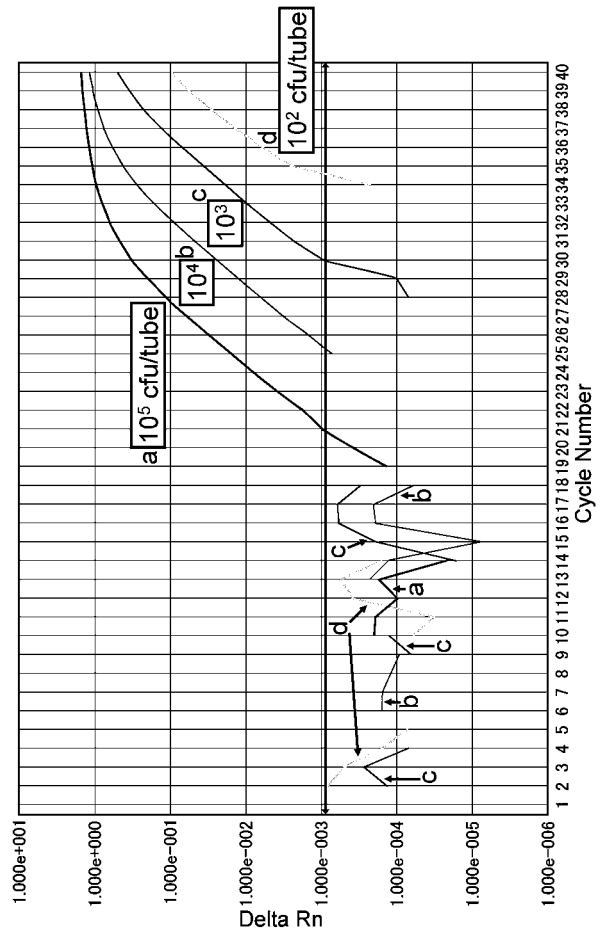
TGTAAGTGGAGCAAAACCCCTTAGATATCTTAATGATACAAGAGCAGGAAGTTTACCAAG 1140
V S G A N P L D I L M I Q E A G T L P R
AACAGCCACTCCAAGCAGGACGCTGTGCAACAAAGTGGAAACACCTATTGATGAATATGA 1200
T A T P T G R H V Q Q G G T P I D E Y E
GTGGAATTTAGGAAGCTTTTCAAGGCTGATAGGCTTTTATTATTATTCCTCCGCTTGA 1260
W N L G T L S R P D R V F I Y S R V D
TGTAAGGAGCTAATCGTGTAAATTTAGCTATAGTTTCAAGAAATGCAAGCTGAAGAAGTGAT 1320
V G A N R V N L A I V S R M Q A E E V I
TGTTTTACCTCCACCTACTACAGTTTCAAGACCCATTATAGGAATTCGCAATGGAATAT 1380
V L P P P T T V S R P I I G I R N G N D
TGCTTTTTTCAATATCCATGCTTTAGCTAATGGAGAACAGATGTAGGAGCAATTTATCAC 1440
A F F N I I A L A N G G T D V G A I I T
AGCTGTAGATGCACATTTTGAATATGCTCAAGTTAACTGGATGATAGCAGGGGATTT 1500
A V D A H F A N M P Q V N W M I A G D F
TAACCGTGATCTTCTACTATAACAAGTACAGTGATAGAGAATTAGCAATAGAAATAG 1560
N R D P S T I T S T V D R E L A N R I R
AGTGGTTTTTCAAGTACGCAAGTCAAGCAAGGAGGAGTCTTGATTTGCAATATAC 1620
V V F P T S A T Q A S G G T A G A I T
AGGAAATTCAAATAGACAAACCACTATACCTCCACCGCTTTTACCTGCGATTTTAACTGCT 1680
      Cj-CdtBR6
G N S N R Q Q T Y T P P L L A A I I M I L
TGCAAGTTTAAAGTCTCATATAGTTTACAGATCATTTTCCAGTAAATTTTGAAGAAATTTTA 1740
A S L R S H I V S D H F P V N F R K F **
GGACATTTAATATGAAAAAATTTATCTTTGTTTATGTTTATTAACCTTTAGCCTTTTG 1800
*      M K K I I T L F F M F I T L A F
CAACTCCTACTGGAGATTTGAAAGATTTTACCGAAATGTTTCTATAAGAGCTTAGAAA 1860
A T P T G D L K D F T E M V S I R S L E
CGGGAATTTTAAAGCGCTTTAGGATACCTCAAAAGATCTTATGATCAAAATTTGGA 1920
T G I F L S A F R D T S K D P I D Q N W
ATATTAAAGAAATTTGTTTAAAGCATGAGTTAAACAAAGAGATAAATAGCTGATGAAC 1980
N I K E I V L S D E L K Q K D K L A D E
TTCTTTTGGTTATGCAATTTACAAATCCAAAGAAAGGATCTTTTGTAGGATCTT 2040
L P F G Y V Q F T N P K E S D L C L A I
TAGAAGATGGAACCTTTGAGCAAAATCTTGTCAAGATGATCTAAAGATGAGTAAATAG 2100
L E D G T F G A K S C Q D D L K D G K L

```



【 図 8 】

【 図 1 0 】



【 図 1 1 - 2 】

1122	TCGGCTTGGATGAGGAGCAATATCGTGTAAATTAGCTATAGTTCACAAATGACAGCTGGAAGATCGATTGTTTACCTG	Cjoid81-176
438	.....G.....	AY442300
1192	CACCTACTACAGTTTCAAGGCCATTATAGAAATTGCGAATGCGAATGAGTCTTTTTCAAATATCGCTTTTAGCTAAAT	Cjoid81-176
427	.....G.....G.....T.....C.....	AY442300
1287	GGGAGAACAGATGTAGAGCAATTATCACAGCT-CTAGATGCACATTTTGCGAAATAGCCTCAAGTTTAAGTGGATATAG	Cjoid81-176
545	.....T.....CC..A..A.....T.....A.....C.....	AY442300
1351	CAGCGAATTTAACTCGTATCTTCTACTATACAGATACAGTGGATAGCAATTAACAAATAGAAATACAGATGGTTTTT	Cjoid81-176
624	.....A.....G.....-..A.....	AY442300
1431	CCAACTAGCGAAGTCAAGCAAGCGAGGAGCTTCGATTATGCAATTCAGAGAAATCCAAATAGACACAAACCTATAC	Cjoid81-176
700	.....CA.AGA..G.....T..CC..CA.C..G.....	AY442300
1511	TCACAGGTTTTTAACTGCGTTTTTAACTGCTGCAAGTATAGACTTCATATAGCTTTCAGATATTTTCAGATAAATTTA	Cjoid81-176
780	.....A.....T.....--..T---C..P.A---..A.....	AY442300
1591	GAATAATTATGACATATTTAAATGAAAAAATATATACTTTGTGTTTTATGTTTATATACTTTAGGCTTTCAGACTCTAC	Cjoid81-176
853	G.C...A..TAGG AAA.....G..G..A.....	AY442300
1671	TGGAGTTTCAAGATTTTAACTCGAATGCTTCTATATAGCTATAGAACGGGAATTTTTTAAAGCCCTTAGGCAATA	Cjoid81-176
933	.....G.....A.....	AY442300
1751	CTCCTAAGACCTCTATTGATCAAAATGGAATATTAAGCAATTCGTTTATAGCGATGAGTTAAACAAAAGATAAATTA	Cjoid81-176
1013	T.....A.....	AY442300
1831	GCTATGAGCTTCCTTTTGGTATGTCGAATTTTACAAATCCAAAAGAGCGATCTTGTGTTAGCGAATCTAGAGATGG	Cjoid81-176
1093	.....A.....C.G.....TC.....	AY442300
1911	AACTTTGGACCAAAATCTTCTCAAGATCATTAAGAATGCGAAATAGAACGTGATTTTCTATATATGCCAACAACT	Cjoid81-176
1172	.....A.....A.....C.....	AY442300
1991	CTTCAGTCGTCGAATTCGTTCTAGTTTATGATCAATCGAAGATATAGACTACTTTTCTTTTAACTCAAAATATCCCTATA	Cjoid81-176
1252	.....C.....T.....G.....-..C.....	AY442300
2071	CAAAAAGCTTTGGAATAGCCCTTCAGCACTGATGCTATTTTCTTGGATGAATTAAGACTAATGATATATACCC	Cjoid81-176
1330	.....(1).....	AY442300
2151	ACCTTTAACAGCTGCTACCCCTTTTGAATTA, Cjoid81-176	
1356	AY442300	

【 図 1 2 - 2 】

161	AAAATGGAAATATTAAAGAAATGTTTAAAGCGATGAGTTAAACCAAAAGATAAATAGCTGAGACTTCCTTTTGT	81-176cdtC
161	.....	AT43432cdtC
161	.....	B01cdtC
161	.....C.....	ChB43cdtC
161	.....	Co2-037cdtC
161	.....C.....AA..	Co2-130cdtC
161	.....	Co2-146cdtC
161	.....	Co2-150cdtC
161	.....	Co2-217cdtC
161	.....	Co3-008cdtC
548	.....A.....A.....	AY442300
	Cj cdtRTU2	→
241	TATGTGCAATTTACAAATCCAAAGAAAGCATCTTTGTTAGCACTTAGAATGGAACCTTTGGAGCAAAATCTTG	81-176cdtC
241	.....	AT43432cdtC
241	.....	B01cdtC
241	.....G.....G..T.....	ChB43cdtC
241	.....G.....T.....A.....	Co2-037cdtC
241	.....G.....G..T.....	Co2-130cdtC
241	.....	Co2-146cdtC
241	.....	Co2-150cdtC
241	.....	Co2-217cdtC
241	.....	Co3-008cdtC
628	.....C..G.....-.....TG.....	AY442300



## 【 図 1 2 - 3 】

		Cj RTP2	
321	TCAGATGATCTAAAGTGGTAAATTAGAACTGATTTCTATATGCGAACACCACTTCAGCTGTGCAAAATCGTT	81-176cdtC	
321	.....	AT43432cdtC	
321	.....	B01cdtC	
321	.....	ChB43cdtC	
321	.....C.....A.....	Co2-037cdtC	
321	.....	Co2-130cdtC	
321	.....	Co2-146cdtC	
321	.....	Co2-150cdtC	
321	.....	Co2-217cdtC	
321	.....	Co3-008cdtC	
707	.....A.....A.....C.....C.....T...	AY442300	
		Cj odtRTR2	
401	CTTAGATTGGAACTGATGATGTATAGTACTTTTTTAATCCAATATTCCTACAGAAAACGCTTTGGAATAGCC	81-176cdtC	
401	.....	AT43432cdtC	
401	.....	B01cdtC	
401	.....	ChB43cdtC	
401	.....	Co2-037cdtC	
401	.....	Co2-130cdtC	
401	.....	Co2-146cdtC	
401	.....	Co2-150cdtC	
401	.....	Co2-217cdtC	
401	.....	Co3-008cdtC	
787	.....G.....-.....C.....	AY442300	

## 【 図 1 2 - 4 】

481	CCTTGCAACCCCTAGATCCTATTTTTTCTGAGTAATGACTAATGATTATAACCCACCTTTACAGCTGCTACCCC	81-176cdtC	
481	.....	AT43432cdtC	
481	.....	B01cdtC	
481	.....A.....	ChB43cdtC	
481	.....A.....A.....	Co2-037cdtC	
481	.....A.....	Co2-130cdtC	
481	.....	Co2-146cdtC	
481	.....	Co2-150cdtC	
481	.....	Co2-217cdtC	
481	.....	Co3-008cdtC	
865	.....	AT442300	
561	TTTAGATAAA	81-176cdtC	
561	.....	AT43432cdtC	
561	.....	B01cdtC	
561	.....	ChB43cdtC	
561	.....	Co2-037cdtC	
561	.....	Co2-130cdtC	
561	.....	Co2-146cdtC	
561	.....	Co2-150cdtC	
561	.....	Co2-217cdtC	
561	.....	Co3-008cdtC	

## 【 図 1 3 - 1 】

1	ATGCAAAAATAAAATTAAGCTTAATGTTTGAATGTAACATCATTTTT-TAGCTTGCTTCTTCAAAAGACACAA	Co1-243cdt	
1	.....	W8-13cdt	
1	.....	WLD4-8cdt	
1	.....	WLD4-1cdt	
1	.....	Iris odt	
1	.....	LW9-1cdt	
1	.....	LW9-9cdt	
1	.....TC.....	Co1-017cdt	
1	.....TC.....	Co1-106cdt	
1	.....TC.....	Co1-247cdt	
1	.....TC.....	Co2-060cdt	
1	.....TC.....	Co2-215cdt	
1	.....TC.....	Co1-192cdt	
1	.....-C.....	Co2-147cdt	
1	.....-C.....	AT33559cdt	
1	.....-C.....	AT43478cdt	
1	.....-C.....	W8-11cdt	
1	.....T.A.....CG.....C.....C.....	26 odt	
80	TCAATGCTTTAGGAGATCTTACGGTAAATTTACGATAAGCAATCTTTAAACCTTGGTTCAAAACCTACACCCCTGTC	Co1-243cdt	
80	.....	W8-13cdt	
80	.....	WLD4-8cdt	
80	.....	WLD4-1cdt	
80	.....	Iris odt	
80	.....	LW9-1cdt	
80	.....	LW9-9cdt	
81	.....A.....T.....	Co1-017cdt	
81	.....A.....T.....	Co1-106cdt	
81	.....A.....T.....	Co1-247cdt	
81	.....A.....T.....	Co2-060cdt	
81	.....A.....T.....	Co2-215cdt	
81	.....A.....T.....	Co1-192cdt	
80	.....T.....	Co2-147cdt	
80	.....T.....	A.....AT33559cdt	
80	.....T.....	AT43478cdt	
80	.....T.....	W8-11cdt	
80	.....C.C.....C.T.....G.....G.....C.....C.....T	26 odt	

## 【 図 1 3 - 2 】

160	AACCAAAAACCAAGCTTGGTAGAGGTAAAAATTTCCCGCCATACCACTTGTCACCTGTAATCACTCCTAATAC	Co1-243cdt	
160	.....	W8-13cdt	
160	.....	WLD4-8cdt	
160	.....	WLD4-1cdt	
160	.....	Iris odt	
160	.....	LW9-1cdt	
160	.....	LW9-9cdt	
161	.....	Co1-017cdt	
161	.....	Co1-106cdt	
161	.....	Co1-247cdt	
161	.....	Co2-060cdt	
161	.....	Co2-215cdt	
161	.....	Co1-192cdt	
160	.....	Co2-147cdt	
160	.....	AT33559cdt	
160	.....	AT43478cdt	
160	.....	W8-11cdt	
160	.....C.....A.G.....T.....G.....	26 odt	
240	CTTTAAAGGAGATAATGCGGTCAAGGCCATTCACAGCTTAAATCTCCAAACGATTTGCTTCAAAAGCTTATACG	Co1-243cdt	
240	.....	W8-13cdt	
240	.....	WLD4-8cdt	
240	.....	WLD4-1cdt	
240	.....	Iris odt	
240	.....	LW9-1cdt	
240	.....	LW9-9cdt	
241	.....T.....	Co1-017cdt	
241	.....T.....	Co1-106cdt	
241	.....T.....	Co1-247cdt	
241	.....T.....	Co2-060cdt	
241	.....T.....	Co2-215cdt	
241	.....T.....	Co1-192cdt	
240	.....T.....	Co2-147cdt	
240	.....T.....	AT33559cdt	
240	.....T.....	AT43478cdt	
240	.....T.....	W8-11cdt	
240	.....G.....C.A.T.....A.T.....T.....	26 odt	

## 【 図 13 - 3 】

320	AAACACAGTATGTAAGTATTTTGTCACTATTATGAATCTTAATGAGCATCTTAAACATCTGGGCTTTAAATCT	Col-243cdt
320	.....	WB-13cdt
320	.....	WLD4-8cdt
320	.....	WLD4-1cdt
320	.....	Iris cdt
320	.....	LN9-1cdt
320	.....	LN9-9cdt
321	.....	Col-017cdt
321	.....	Col-106cdt
321	.....	Col-247cdt
321	.....	Co2-060cdt
321	.....	Co2-215cdt
321	.....	Col-192cdt
320	.....C.....	Co2-147cdt
320	.....C.....	AT33559cdt
320	.....	AT43478cdt
320	.....	WB-11cdt
320	.....	26 cdt

400	GCAATGGAATGCGGATATAGTTTATTCGTACTAGACCTTTTGAGATGCAAGGCTTGGCAGCTTATGAAATTC	Col-243cdt
400	.....	WB-13cdt
400	.....	WLD4-8cdt
400	.....	WLD4-1cdt
400	.....	Iris cdt
400	.....	LN9-1cdt
400	.....	LN9-9cdt
401	.....	Col-017cdt
401	.....A.....	Col-106cdt
401	.....	Col-247cdt
401	.....	Co2-060cdt
401	.....A.....	Co2-215cdt
401	.....	Col-192cdt
400	.....	Co2-147cdt
400	.....	AT33559cdt
400	.....	AT43478cdt
400	.....	WB-11cdt
400	.....C.....	26 cdt

## 【 図 13 - 4 】

480	AAACATACAGTAATGATTAAAAATGAAAAACATTTACTTCTTAAACGCTATAGAAATGGCATCTTCATTATCTCT	Col-243cdt
480	.....	WB-13cdt
480	.....	WLD4-8cdt
480	.....	WLD4-1cdt
480	.....	Iris cdt
480	.....	LN9-1cdt
480	.....	LN9-9cdt
481	.....	Col-017cdt
481	.....	Col-106cdt
481	.....	Col-247cdt
481	.....	Co2-060cdt
481	.....	Co2-215cdt
481	.....	Col-192cdt
480	.....	Co2-147cdt
480	.....	AT33559cdt
480	.....	AT43478cdt
480	.....	WB-11cdt
480	.....T.....T.....	26 cdt

560	GTGATCAACAAATTTTGGCAGCTTTTGAGACTTTATCCGATGACTATGGAGCTTATCAATTCAAAAATTTGCGACG	Col-243cdt
560	.....	WB-13cdt
560	.....	WLD4-8cdt
560	.....	WLD4-1cdt
560	.....	Iris cdt
560	.....	LN9-1cdt
560	.....	LN9-9cdt
561	.....	Col-017cdt
561	.....	Col-106cdt
561	.....	Col-247cdt
561	.....	Co2-060cdt
561	.....	Co2-215cdt
561	.....	Col-192cdt
560	.....	Co2-147cdt
560	.....	AT33559cdt
560	.....	AT43478cdt
560	.....C.....C.....C.....T.....T.....	WB-11cdt
560	.....C.....C.....C.....T.....T.....	26 cdt

## 【 図 13 - 5 】

640	CACAAATGATACAAACACTGTTTCAATGTAATGAAGATTTAATTGAGCTTTATATATTTATTAAACGTTG	Col-243cdt
640	.....	WB-13cdt
640	.....	WLD4-8cdt
640	.....	WLD4-1cdt
640	.....	Iris cdt
640	.....	LN9-1cdt
640	.....	LN9-9cdt
641	.....	Col-017cdt
641	.....	Col-106cdt
641	.....	Col-247cdt
641	.....	Co2-060cdt
641	.....	Co2-215cdt
641	.....	Col-192cdt
640	.....	Co2-147cdt
640	.....	AT33559cdt
640	.....	AT43478cdt
640	.....	WB-11cdt
640	.....C.....	26 cdt

720	TTTGAAAGAAAGAAAGAAATTTGGTATACAGCTGCTATAGGCTCTCTATTATTTTTCGCTATGAAGGAAAG	Col-243cdt
720	.....	WB-13cdt
720	.....	WLD4-8cdt
720	.....	WLD4-1cdt
720	.....	Iris cdt
720	.....	LN9-1cdt
720	.....	LN9-9cdt
721	.....	Col-017cdt
721	.....	Col-106cdt
721	.....	Col-247cdt
721	.....	Co2-060cdt
721	.....	Co2-215cdt
721	.....	Col-192cdt
720	.....	Co2-147cdt
720	.....	AT33559cdt
720	.....	AT43478cdt
720	.....	WB-11cdt
720	.....A.....A.....G.....A.....T.....	26 cdt

## 【 図 13 - 6 】

800	TATGAAAAAATAGTATTTTGTATTTAAGTTTATGATATTATTGCGCTTTAGAAATACAAACGGAATCTGG	Col-243cdt
800	.....	WB-13cdt
800	.....	WLD4-8cdt
800	.....	WLD4-1cdt
800	.....	Iris cdt
800	.....	LN9-1cdt
800	.....	LN9-9cdt
801	.....	Col-017cdt
801	.....	Col-106cdt
801	.....	Col-247cdt
801	.....	Co2-060cdt
801	.....	Co2-215cdt
800	.....	Col-192cdt
800	.....	Co2-147cdt
800	.....	AT33559cdt
800	.....	AT43478cdt
800	.....	WB-11cdt
800	.....C.....T.....	26 cdt

880	AATTGCAAGCTCATCAGCTGCACTGAACCAAGCAATGGAATGTTAGTATAAGCAACTCATACCGGTGCAATCTAT	Col-243cdt
880	.....	WB-13cdt
880	.....	WLD4-8cdt
880	.....	WLD4-1cdt
880	.....	Iris cdt
880	.....	LN9-1cdt
880	.....	LN9-9cdt
881	.....	Col-017cdt
881	.....	Col-106cdt
881	.....	Col-247cdt
881	.....	Co2-060cdt
881	.....	Co2-215cdt
881	.....	Col-192cdt
880	.....	Co2-147cdt
880	.....	AT33559cdt
880	.....	AT43478cdt
880	.....	WB-11cdt
880	.....T.....C.....G.....C.....	26 cdt

## 【 図 13 - 7 】

960	GGATGTTTACCTGTTCAAGAGCGGGGCTTTACCTAGTACAGCTATGATGACTCTAGACAGGTACACCCCTGGGCG	Col-243cdt
960		NR-13cdt
960		WLD4-8cdt
960		WLD4-1cdt
960		Iris cdt
960		W9-1cdt
960		W9-9cdt
961		Col-017cdt
961	C	Col-106cdt
961	C	Col-247cdt
961	C	Col-060cdt
961	C	Col-215cdt
961	C	Col-192cdt
960		Col-147cdt
960		AT33559cdt
960		AT43478cdt
960		NR-11cdt
960	A A A G	26 cdt

1040	TGGGTATTCCTATACATGAATACATATGGAATTTAGGCTCTGTATCAAGACCTAGCTCTGTTATATATATATTTCTAGA	Col-243cdt
1040		NR-13cdt
1040		WLD4-8cdt
1040		WLD4-1cdt
1040		Iris cdt
1040		W9-1cdt
1040		W9-9cdt
1041		Col-017cdt
1041		Col-106cdt
1041		Col-247cdt
1041		Col-060cdt
1041		Col-215cdt
1041		Col-192cdt
1040		Col-147cdt
1040		AT33559cdt
1040		AT43478cdt
1040		NR-11cdt
1040	G	26 cdt

## 【 図 13 - 8 】

1120	GTGGATGTAGGACCAATGCTGTGAATTAGCTATGCTTAGCAGAGTGCACGGGATGAAGTTTGTGTTTACCCCTCC	Col-243cdt
1120		NR-13cdt
1120		WLD4-8cdt
1120		WLD4-1cdt
1120		Iris cdt
1120		W9-1cdt
1120		W9-9cdt
1121		Col-017cdt
1121		Col-106cdt
1121		Col-247cdt
1121		Col-060cdt
1121		Col-215cdt
1121		Col-192cdt
1120		Col-147cdt
1120		AT33559cdt
1120		AT43478cdt
1120		NR-11cdt
1120	C G	26 cdt

1200	AACAGTTGCTTCAAGACCTATTATAGCATAGCATAGCAATGCTTTTTCATATACAGCTCTAGCAAGTGGG	Col-243cdt
1200		NR-13cdt
1200		WLD4-8cdt
1200		WLD4-1cdt
1200		Iris cdt
1200		W9-1cdt
1200		W9-9cdt
1201		Col-017cdt
1201	A	Col-106cdt
1201	A	Col-247cdt
1201	A	Col-060cdt
1201	A	Col-215cdt
1201	A	Col-192cdt
1200		Col-147cdt
1200		AT33559cdt
1200	A	AT43478cdt
1200		NR-11cdt
1200	T	26 cdt

## 【 図 13 - 9 】

1280	GAATGACGACGAGGCAATGCTGCTGTGGATGTTTTTAGAAATAGACCTGATATTAATTGGATATTTAGGC	Col-243cdt
1280		NR-13cdt
1280		WLD4-8cdt
1280		WLD4-1cdt
1280		Iris cdt
1280		W9-1cdt
1280		W9-9cdt
1281		Col-017cdt
1281		Col-106cdt
1281		Col-247cdt
1281		Col-060cdt
1281		Col-215cdt
1281		Col-192cdt
1280		Col-147cdt
1280		AT33559cdt
1280		AT43478cdt
1280	A	NR-11cdt
1280	A C T	26 cdt

1360	GATTTTAATAGGAATCAGGCGCTTAGTAACTTGTAGATCTGACTTAAGAGCAGCACTGCGGTAGTTGTCGCGC	Col-243cdt
1360		NR-13cdt
1360		WLD4-8cdt
1360		WLD4-1cdt
1360		Iris cdt
1360		W9-1cdt
1360		W9-9cdt
1361	G	Col-017cdt
1361	G	Col-106cdt
1361		Col-247cdt
1361	G	Col-060cdt
1361	G	Col-215cdt
1361	G	Col-192cdt
1360	G	Col-147cdt
1360	G	AT33559cdt
1360	G	AT43478cdt
1360	G	NR-11cdt
1360	C T G	26 cdt

## 【 図 13 - 10 】

1440	TTCTTCTACGCAACAGTGAAGACGATTGATTATGCTATCATCTGGAATTCACACTGCACCTTATACAACTCC	Col-243cdt
1440		NR-13cdt
1440		WLD4-8cdt
1440		WLD4-1cdt
1440		Iris cdt
1440		W9-1cdt
1440		W9-9cdt
1441		Col-017cdt
1441		Col-106cdt
1441		Col-247cdt
1441		Col-060cdt
1441		Col-215cdt
1441		Col-192cdt
1440		Col-147cdt
1440		AT33559cdt
1440		AT43478cdt
1440		NR-11cdt
1440	C GG A G	26 cdt

1520	CACCGATAGTTGCGATTTAGCTTTAGAGGATTAGAACCTTTTGGCTTCAGATCATTTTCCTGTAAATTTAGAGA	Col-243cdt
1520		NR-13cdt
1520		WLD4-8cdt
1520		WLD4-1cdt
1520		Iris cdt
1520		W9-1cdt
1520		W9-9cdt
1521	C	Col-017cdt
1521	C	Col-106cdt
1521		Col-247cdt
1521	C	Col-060cdt
1521	C	Col-215cdt
1521	C	Col-192cdt
1520	C	Col-147cdt
1520	C	AT33559cdt
1520	C	AT43478cdt
1520	C	NR-11cdt
1520	CG C A G	26 cdt

## 【 図 13 - 1 1 】

1600	CCTTAGACCTTAAATGAAAAATTTTATTATTTTGGCCCTTTGACCTTTTGAACAGACGCTAGCTTGA	Col-243cdt
1600		W8-13cdt
1600		WLD4-8cdt
1600		WLD4-1cdt
1600		Iris cdt
1600		LN9-1cdt
1600		LN9-9cdt
1601		Col-017cdt
1601		Col-106cdt
1601		Col-247cdt
1601		Co2-060cdt
1601		Co2-215cdt
1601		Col-192cdt
1600		Co2-147cdt
1600		AT33559cdt
1600		AT43478cdt
1600		W8-11cdt
1600	T C . . . . . G . . . . . A . . . . . R . . . . .	26 cdt

1680	TGAATTAGCAGACTTTACTCTAAGTTTCTTATAAGATCTTTAGAACAGGATTTCTTAAAGTCTTTTAAAGAAACTT	Col-243cdt
1680		W8-13cdt
1680		WLD4-8cdt
1680		WLD4-1cdt
1680		Iris cdt
1680		LN9-1cdt
1680		LN9-9cdt
1680		Col-017cdt
1680		Col-106cdt
1681		Col-247cdt
1680		Co2-060cdt
1680		Co2-215cdt
1680		Col-192cdt
1680		Co2-147cdt
1679		AT33559cdt
1680		AT43478cdt
1680		W8-11cdt
1680	C . . . . . C . . . . . G . . . . .	26 cdt

## 【 図 13 - 1 2 】

1760	CAAAAAGCTTAGAGATCAAAATTCGTTTTTAAAGAGATTGTAGCAAAATGATGAGCTAAAGCTAGGATATGCACGCA	Col-243cdt
1760		W8-13cdt
1760		WLD4-8cdt
1760		WLD4-1cdt
1760		Iris cdt
1760		LN9-1cdt
1760		LN9-9cdt
1760		Col-017cdt
1760		Col-106cdt
1761		Col-247cdt
1760		Co2-060cdt
1760		Co2-215cdt
1760		Col-192cdt
1760		Co2-147cdt
1759		AT33559cdt
1760		AT43478cdt
1760		W8-11cdt
1760	A . . . . . C . . . . . C . . . . . A . . . . . T T . . . . .	26 cdt

1840	AAAGATTTCCTTTTGGCTAGCTTCAGTTTATAAGCCCTAGGCGCGATGATATGCGCTAGCTGTTTAACTGAAAAAG	Col-243cdt
1840		W8-13cdt
1840		WLD4-8cdt
1840		WLD4-1cdt
1840		Iris cdt
1840		LN9-1cdt
1840		LN9-9cdt
1840		Col-017cdt
1840		Col-106cdt
1841		Col-247cdt
1840		Co2-060cdt
1840		Co2-215cdt
1840		Col-192cdt
1840		Co2-147cdt
1839		AT33559cdt
1840		AT43478cdt
1840		W8-11cdt
1840	C . . . . . C A . C . . . . . A . G . . . . . AA TACG . . . . . T . . . . . C . . . . .	26 cdt

## 【 図 13 - 1 3 】

1920	TTTGGACCAATCTTCCAAACAGATTGCCAGATGGAACAATGACAGATATTTTCTATCTACCAATGCAAAATG	Col-243cdt
1920		W8-13cdt
1920		WLD4-8cdt
1920		WLD4-1cdt
1920		Iris cdt
1920		LN9-1cdt
1920		LN9-9cdt
1920		Col-017cdt
1920		Col-106cdt
1921		Col-247cdt
1920		Co2-060cdt
1920		Co2-215cdt
1920		Col-192cdt
1920		Co2-147cdt
1919		AT33559cdt
1920		AT43478cdt
1920		W8-11cdt
1920	T A . . . . . A . . . . . AA A . . . . . G . . . . .	26 cdt

2000	GTCTTATACAAATAGATCTTTAAACCAATGCTGCAATCAATGATGAGGACTTTCTGACTCTAGTATGCGCATAGAA	Col-243cdt
2000		W8-13cdt
2000		WLD4-8cdt
2000		WLD4-1cdt
2000		Iris cdt
2000		LN9-1cdt
2000		LN9-9cdt
2000		Col-017cdt
2000		Col-106cdt
2001		Col-247cdt
2000		Co2-060cdt
2000		Co2-215cdt
2000		Col-192cdt
2000		Co2-147cdt
1998		AT33559cdt
2000		AT43478cdt
2000		W8-11cdt
2000	T . . . . . C . . . . . T . . . . .	26 cdt

## 【 図 13 - 1 4 】

2080	AAATGCTTTGCTTTAGCAATGCTTTTGGATGCTTATCTTAAGCTGATTAAGCAAACTTTCTTTTCTCCCTGCTC	Col-243cdt
2080		W8-13cdt
2080		WLD4-8cdt
2080		WLD4-1cdt
2080		Iris cdt
2080		LN9-1cdt
2080		LN9-9cdt
2080		Col-017cdt
2080		Col-106cdt
2081		Col-247cdt
2080		Co2-060cdt
2080		Co2-215cdt
2080		Col-192cdt
2080		Co2-147cdt
2078		AT33559cdt
2080		AT43478cdt
2080		W8-11cdt
2080	G G . . . . . C A C . . . . . G . . . . . T . . . . .	26 cdt

2160	TATAATCGAGCAAGCGCAATTACTAA	Col-243cdt
2160		W8-13cdt
2160		WLD4-8cdt
2160		WLD4-1cdt
2160		Iris cdt
2160		LN9-1cdt
2160		LN9-9cdt
2160		Col-017cdt
2160		Col-106cdt
2161		Col-247cdt
2160		Co2-060cdt
2160		Co2-215cdt
2159		Col-192cdt
2160		Co2-147cdt
2158		AT33559cdt
2160		AT43478cdt
2160		W8-11cdt
2160	TG C . . . . . G . . . . .	26 cdt

## 【 図 14 - 1 】

1	ATGAAAAAATTTTGGGGTATTAATCTACTACGCAAAATGATTTTAAAAATTCACAAAACAAAAATCTAAAT	Col-187odt
1	.....T.....T.....T.....CAG...C.....T.....T.....TA.....	C090-odt
81	AAGGAAATTTATGACTAAATATTTTCAAGCATATTAATAATAGCTTATTTTACTATTTTGTATGCTCTTTTAGTG	Col-187odt
80	.....G...C...C...A...A...C.....G.....GA...A...A.....	C090-odt
161	CTTCTCATCAAAACGACAAATGTAAGCACTCAAAAAATAATTCATTTAGGAGCAATTTTGGCAAAACGAGATGCA	Col-187odt
160	.....TA...G.GA.....C.G.....G.....T...G.A.....	C090-odt
241	GATCCATAAATTTAGGCGATTTTCAACTCTCTTACATCAAAATTTTACAAATCTATGCGCATAGAAAGCATGCGC	Col-187odt
234	.....	C090-odt
321	ACTTCAAAAGTGATTTGCGTGAATGAACCTATTAACACATGCTGCGATCTTTTCAAGTCTTTTAGTAAACGAGCT	Col-187odt
234	.....CT.....	C090-odt
401	TGAATTTCAACACCTACTACTAGTCTACAGGTATCCGCTGATCTATTGTATGACAAAGGATTTTATGGTGATA	Col-187odt
238	.....T.....G...C...A..AC.....C.C.....	C090-odt
481	ATGGGTGCAAAAGCGCTTGTGATCACTATTTGTACACATCTCCGGAACCTGGTATGGGCTACTCGCTATGAAAG	Col-187odt
315	.....A...C.....CG.....TT...A.....C.....A...G...A...ACG...I.....	C090-odt
561	CGGCAATTTAGAGGATATCGCTTTGGCGTAAATTTTACATCAAAATATGAAGTCATGATAGAAATTTCAACACTC	Col-187odt
395	.....T.....G...T...C.....G.....G.....A.....	C090-odt
641	GCAGGCTTGCATAAATCTATATAAAACGGAGTAATTCACCTACCTTGCAATAAGATATCTTTTCAAGAAATTTAGC	Col-187odt
475	.....T.....G.....T...G...C...T.....C...A.C.....A.....CGTA	C090-odt
721	TTTGTCACATGACAAACGGAGCGTACAAATTTATACAAAGCTACTAATTTGCGCTTTGCAAGCGCTGTATTAATC	Col-187odt
555	C...C...T.....G...G.....A.....A.....G...C.....	C090-odt

## 【 図 14 - 2 】

801	TATTCGGTTTTCAGCTTTTGGGGGATATAATCTACGCAAAATGCACTGATATCGATCAACAATGATTTTGTCTC	Col-187odt
634	.G..T.....A.....T.....C..G.....T.....	C090-odt
881	CCGCGCGCGCACTTGGAGACTATTTTATAGGAGTAAATTCGGAATGTTATGATTATTTATAGCAACTTTA	Col-187odt
714	.A..A...C.....A.....GA..G.....G.....	C090-odt
961	GGCTTTGCAAAACGAGATATATAAATTCCTACTTGGATTTTCAAGGCGATGCGCTATACCGAAGCAATGGA	Col-187odt
794	A..T.....C.....C.C...C.....C..A...T...C...G.T..A.....	C090-odt
1041	TATAAGCGTAAGTCAATATTAAGCGTGAATTCAGAGATATATTAGCGTTCAAGAGCAGGAATTTAAGTCAAA	Col-187odt
874	.....TA.C.C.....C.....C.....A.....A.....	C090-odt
1121	CGCTCTTCTTACAGTACAGCATATAATCAAGCGCGCAGATCTTACTGACATTTATGCGAGCTAGGCAATATCT	Col-187odt
954	...C.A...T.....A..T.....A...T...C.....	C090-odt
1201	AGACGTTCCAGCTATATATATTTATGCTCAAAATCGACAGGGGCAATAGCAATTTAGCAATGCTTCAAGCAT	Col-187odt
1034	.....T.....G.....C.....T..T..A..T.....T.....	C090-odt
1281	AAAAGCTGATGAATCATCTTTGGCGCTCTACGCTAGCTTCTGCTCGCTCATAGGTATAGAAATAGAAAGCAGC	Col-187odt
1114	C..T.....A..A.....C.....G.....T.....	C090-odt
1361	TATTTTCAACATACAGCTCTAGCAATGGCGAGTGTGCTCGCGGATATAAATTCATATTTGACAGATTAGA	Col-187odt
1134	.....CT.....T...A..T.....A.....C..GG.....T.....	C090-odt
1441	AATATGCGAAATATCAGTTGGATGATTTTACCGGATTTTACCGCTACCTGAGAGTTTAAAGAGCACTTGGATTAGA	Col-187odt
1274	.....G.....A.....A.....T.....C.....	C090-odt
1521	AATCGCGCTCAGAGTACGTTTTTACACGCTCGCGGCTACTCAAGAGGCGCGGAGCGCTTGAAGGCTATAGTTG	Col-187odt
1354	.....TA.....A.....G.G..A..T.....T.....G.....	C090-odt

## 【 図 14 - 3 】

1601	GAACTCAGCGCGGATCTTGTGCAAGTCTGCTAGCAGTATGATGCTAGCAAACTGCGGACTCACTAGTTTGG	Col-187odt
1434	.....T..A.G.A...AGA...G...C...C..GC.A...T...C.....A.....T.G...A.....	C090-odt
1681	GACCAATTTTCCGTAATTTTGAATAATTTGAGATACTAATGAAAGCTTTAGCAATAATTTTATTTGTAAGATA	Col-187odt
1514	.....A.....G...G..TC...A.C.....C..AC.....	C090-odt
1761	AGTTTGTGAAAGCAAAACATACAGAGCTTTTCAATATGCAATGCAAAACACGCGAATCTATAAATATAAGCGATT	Col-187odt
1594	.....T...C.....T.....C.....A.....	C090-odt
1841	TTCAAGGCGAGTTAATTAACCAAACTGGTTTTTAATGATTTAGGAGTAGATCTAAGATAAAAAAGTAGATAATTT	Col-187odt
1674	.....A.....CT.....G...G.....	C090-odt
1921	CAAAATCTTTTCTTTTGGATACGTCGAATTTCAAGTAGCAGCGGCTAAAAATGTCCTTCAGATCGCTCTAGCGGA	Col-187odt
1754	.....T.....G.....	C090-odt
2001	TTTTTAGCACTAAAAATGCAAGCAAGCTACGATAGCGAGGATTTGAGACTATTTTTCAGATCATCTCTACAGTAG	Col-187odt
1834	.....GT.G.....A.....T.....C.....A..G.....	C090-odt
2081	TGAGCTATGCACTAGCATCAGTACTAGTTCTAAAAACAAGAGTGTCTTAGGACATTTGAAAAATCCAAAGTGGCGATCG	Col-187odt
1914	C.....A...C...C.....T...T.....T.....A.....	C090-odt
2161	AAGATAGAGTAGGACTAGTACGCTGTTTTAGAAATTTTGTGACATAGAGCTAAACAACTTTTGTATTTTCAAGC	Col-187odt
1994	.....A.....C.....T..T.....A..T...A...G.....	C090-odt
2241	CGCTTAGTGAAGTAACTAGTAAATAGATAA	Col-187odt
2074	.....A.....C.G.....GA..C.....	C090-odt

## 【 図 15 - 1 】

1	ATGAAGCTTTAGCAATAATATTTTATTTGTAAGCATAGTTTTGCAACGAAACATAACCGAGCTTTTCAATAAGC	Col-187odtC
1	.....	2-1odtC
1	.....	3-1odtC
1	.....	23-1odtC
1	.....	7914c odtC
1	.....	8013b odtC
1	.....	9813A odtC
1	.....	Col-099odtC
1	.....C.....	AT27374odtC
1	.....	AT19438odtC
1	.....	7915a odtC
1	...G..TC...A.C.....C...AC.....T...C...T.....C.....	C090-odtC
81	CAATGCAAAACGCGAATCTCTATAAATAAAGCGATTTTCAAGGCGAGTTAATTAACCAAACTGGTTTTTAAATGATT	Col-187odtC
81	.....	2-1odtC
81	.....	3-1odtC
81	.....	23-1odtC
81	.....	7914c odtC
81	.....	8013b odtC
81	.....	9813A odtC
81	.....	Col-099odtC
81	.....	AT27374odtC
81	.....	AT19438odtC
81	.....	7915a odtC
81	.....A.....	C090-odtC

## 【 図 15 - 2 】

<div style="text-align: center;">           Cf cdtRTU1 <span style="font-size: 1.2em;">→</span> </div>	
161 TAGGACTAGATCCTAAGATAAAAACTAGATAAATTTCAAAATCTTTTCCTTTTGATAGTCAATTTCAAGTAGCA	Col-187cdtC
161 .....-.....	2-1cdtC
161 .....-.....	3-1cdtC
161 .....-.....	23-1cdtC
161 .....-.....	7914c cdtC
161 .....-.....	8013b cdtC
161 .....-.....	9813A cdtC
161 .....-.....	Col-099cdtC
161 .....T.....	AT27374cdtC
161 .....-.....	AT19438cdtC
161 .....-.....	7915a cdtC
161 .....A.....CT...G...G.....T...G.....	C090-cdtC
<div style="text-align: center;">           Cf RTF2 <span style="font-size: 1.2em;">←</span> Cf cdtRTU1         </div>	
241 GCGACGTAAAAATGTGCTTCAGATCGCTCCTAGCGGATTTTAGCACTAAAAACTGCAAGCAAGACTAGATAGCGG	Col-187cdtC
240 .....-.....	2-1cdtC
241 .....-.....	3-1cdtC
241 .....-.....	23-1cdtC
241 .....-.....	7914c cdtC
241 .....-.....	8013b cdtC
241 .....-.....	9813A cdtC
241 .....-.....	Col-099cdtC
241 .....-.....	AT27374cdtC
241 .....-.....	AT19438cdtC
241 .....-.....	7915a cdtC
241 .....GT.G.....A.....T.....	C090-cdtC

## 【 図 15 - 3 】

321 AGAGTTTGAGACTATTTTCAGATCATCCTACAAGTAGTGGAGCTATGAGCTACGATCACTAGTTCTAAAAACAACG	Col-187cdtC
320 .....-.....	2-1cdtC
321 .....-.....	3-1cdtC
321 .....G.....	23-1cdtC
321 .....-.....	7914c cdtC
321 .....-.....	8013b cdtC
321 .....-.....	9813A cdtC
321 .....-.....	Col-099cdtC
321 .....-.....	AT27374cdtC
321 .....G.....	AT19438cdtC
321 .....-.....	7915a cdtC
321 C.....A..G.....C.....A...C...C.....T..	C090-cdtC
401 AGTGCCTTAGGACATTTGAAATCCAAACGTGCCGATCGAAGTAGAGTAGGACTAGTACGCTGCGTTTATAGATTTTTT	Col-187cdtC
400 .....-.....	2-1cdtC
401 .....-.....	3-1cdtC
401 .....-.....	23-1cdtC
401 .....-.....	7914c cdtC
401 .....-.....	8013b cdtC
401 .....-.....	9813A cdtC
401 .....-.....	Col-099cdtC
401 .....-.....	AT27374cdtC
401 .....-.....	AT19438cdtC
401 .....-.....	7915a cdtC
401 ...T.....T.....A...A.....C.....T..T.....	C090-cdtC

## 【 図 15 - 4 】

481 GTGACATAGAGCCTAACAACATTTTGTATTTTACACCGCGCTTAGTGAAGCTAAGGTAATTAGATAA	Col-187cdtC
480 .....-.....	2-1cdtC
481 .....-.....	3-1cdtC
481 .....C.....	23-1cdtC
481 .....-.....	7914c cdtC
481 .....-.....	8013b cdtC
481 .....-.....	9813A cdtC
481 .....-.....	Col-099cdtC
481 .....-.....	AT27374cdtC
481 .....C.....	AT19438cdtC
481 .....-.....	7915a cdtC
481 ..A..T...A...G.....A...C.G...GA..C.....	C090-cdtC

【配列表】

0005465403000001.app

## フロントページの続き

特許法第30条第1項適用 特許法第30条第1項適用、平成19年6月20日、公立大学法人大阪府立大学の図書館において学位論文として発表

## 前置審査

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(72)発明者 山崎 伸二

大阪府堺市中区学園町1番1号 公立大学法人 大阪府立大学内

(72)発明者 朝倉 昌博

大阪府大阪市城東区森之宮2-3-30 扶桑薬品工業株式会社 研究開発センター内

審査官 三原 健治

(56)参考文献 国際公開第2005/054472(WO, A1)

ASAKURA M. et al., Comparative analysis of cytolethal distending toxin (cdt) genes among *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *Microb. Pathog.*, 2007年 2月 6日, vol. 42, pages 174-183

MARTINEZ I. et al., Detection of cdtA, cdtB, and cdtC genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR, *Int. J. Med. Microbiol.* (2006) vol. 296, pages 45-48

第143回日本獣医学会学術集会講演要旨集(Mar.2007)p.201(FP2-195)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/68

C12N 15/00 - 15/90

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDREAMIII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq

UniProt/GenSeq