

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 10 年度博士課程 入学

氏名 菊池 栄作

指導教官 伊藤 喜久治

論文題目：

16S rDNA の塩基配列を利用したヒト腸内に生息する *Clostridium* の検出・同定法の開発

Clostridium はヒト腸管内に生息する優勢菌であり、ヒトの健康に多大な影響を与えている。*Clostridium* 属に所属する菌群は、分類学上多様性に富んでおり、菌の形態学的特徴および生物・生化学的性状所見による従来の分類の再検討の必要性が生じた。近年、細菌の DNA 内保存領域である 16S rDNA 塩基配列を標的とした cluster という概念を用いた再分類が精力的に進められている。これまで腸管内に生息する *Clostridium* を検出するには、培地を用いて菌を分離し、菌の形態や生物・生化学的性状所見により同定する手法が用いられてきたが、従来の方法により腸管内における *Clostridium* の生態を把握することは多くの時間と労力を要し、また高度な技術と経験が必要とされた。近年、腸管内に生息する菌の検出に分子生物学的手法が導入され、16S rDNA 塩基配列を標的としたプライマーを用いた PCR 法による菌の検出法の開発が進んでおり、現在 *Clostridium perfringens*、*C. difficile*、そして *C. clostridiiforme* に対する菌種特異的プライマーの報告がある。

今回ヒト腸管内に多く生息し、分類学的、生態学および機能学的に重要であり、なおかつ多くの cluster に所属する *Clostridium* 13 菌種を選択し、それらに対する菌種特異的プライマーの作製を行い、ヒト糞便から分離した菌株の菌種を同定する方法およびヒト糞便から PCR 法を用いて直接 *Clostridium* 13 菌種を検出する方法の開発を行った。

第一章にて、選択したヒト腸管内に多く生息する *Clostridium* 13 菌種に対する菌種特異

的プライマー、CIPER (*C. perfringens*)、CIBUT (*C. butyricum*)、CIPAR (*C. paraputrificum*)、CIBIF (*C. bifermentans*)、CIDIF (*C. difficile*)、CISOR (*C. sordellii*)、CICLO (*C. clostridiiforme*)、CINEX (*C. nexile*)、CISPH (*C. sphenoides*)、CIIND (*C. indolis*)、CIINN (*C. innocuum*)、CIRAM (*C. ramosum*)、CICOC (*C. cocleatum*) を作製した。全てのプライマーに関して、アニーリング温度 (60°C) をはじめ、PCR の諸条件を統一することが出来、PCR 法で同時に *Clostridium* 属 13 菌種の検出が可能となった。

続いて、プライマーの特異性の確認を標的とした *Clostridium* 属 13 菌種の基準株、参照株 (group 1)、group 1 の 13 菌種以外の *Clostridium* 属菌種の基準株 (group 2)、ヒト腸内に生息する *Clostridium* 属以外の菌群 (group 3)、そしてヒト糞便から分離し、菌の形態学的特徴や生物・生化学的性状所見により同定を行った *Clostridium* 分離株 (group 4) を用いて行った。Group 1、2 において、10 種類のプライマー (CIPER、CIPAR、CIDIF、CISOR、CINEX、CISPH、CIIND、CIINN、CIRAM、CICOC) を用いた PCR で、プライマーが標的とした菌種の基準株および参照株にのみバンドが出現した。PCR 法でバンドが出現しなかった *Clostridium butyricum* JCM 7838、*C. clostridiiforme* NCTC 7155 については、それぞれの菌種の基準株との 16S rDNA 塩基配列の相似度が 97%未満であり、両菌株はそれぞれ *C. butyricum*、*C. clostridiiforme* と同種ではないと考えられた。また、やはり PCR 法でバンドが出現しなかった *C. bifermentans* NCTC 6927、*C. bifermentans* NCTC 6929 については、16S rDNA 塩基配列の相似度は 97%以上であったが、DNA-DNA ホモロジーは 70%未満であり、両菌株ともに *C. bifermentans* と同種ではないと考えられた。今後、PCR 法においてバンドが出現しなかったこれらの菌株の系統分類学的な位置付けを検討する必要がある。Group 3、4 において、CIBUT、CISOR、CIINN プライマーを用いた PCR 法で、菌の形態および生物・生化学的性状により、それぞれのプライマーが標的とした菌種と同定されなかったいくつかの菌株で非特異的な DNA の増幅が確認されたが、それらは PCR 産物のサイズにより、プライマーが標的とした菌種と判別が可能であった。また、Group 4 において PCR 法でバンドが出現しなかった菌株 *Clostridium clostridiiforme* Q-34、*C. nexile* F-17、*C. nexile* J-13、*C. indolis* Q-34、*C. difficile* K-8 については、プライマーが標的とした菌種の基準株との 16S rDNA 塩基配列の相似度は全ての菌株で 97%未満であり、菌の形態および生物・生化学的性状所見により同定を行った結果と異なる同定結果を得た。以上より 13 種類全てのプライマーで高い特異性が確認され、PCR 法でプライマーが標的とした菌種を容易に同定することが可能と考えられた。

第二章では、ヒト腸内に生息する *Clostridium* 属菌の生態を正確に把握するために、第一章で作製したプライマーを用いて、直接ヒト糞便から菌を検出するための前段階として、多くの PCR 阻害物質が存在するヒト糞便から、直接 *Clostridium* 属菌の DNA を抽出する方法の検討を行った。Benzyl chloride 法、N-acetylmuramidase 法、Guanidine isothiocyanate 法、Heat denatured 法、Beads 法、そして Beads+Benzyl chloride 法を用いてヒト糞便からの DNA 抽出効率の比較、検討を行った。その結果、Beads+Benzyl

chloride 法が最も高い DNA 抽出効率を示した。*Clostridium* の細胞壁は強固であり、物理的手法および化学的手法を併用しなければ、十分な DNA 抽出効率は望めないことが強く示唆された。また、プライマーが標的とする菌種が存在しない糞便に既知量の菌液を接種して、Beads+Benzyl chloride 法を用いて DNA を抽出し、CIPER、CIBUT、CIPAR、CIDIF プライマーを用いて PCR をおこなったところ、ヒト糞便 1 g 中に標的とした菌が 10^4 個程度存在すれば、菌が検出可能であることが明らかになった。

第三章では、実際にヒト糞便を用いて、作製したプライマーを用いた PCR 法および nested PCR 法を実施して菌の検出を行い、培養法による菌の検出結果と比較を行った。その結果、従来の培養法よりも PCR 法は菌の検出感度が高いこと、さらに nested PCR 法を実施すれば、菌の検出感度が飛躍的に上昇することが判明した。

また、ヒト糞便から分離した菌株に関して、プライマーを用いたコロニー PCR 法と従来の菌の形態学的特徴および生物・生化学的性状所見を用いて同定を行ったところ、それぞれの同定結果がほぼ一致し、プライマーの特異性および信頼性を改めて確認することが出来た。

以上の結果より、ヒト腸管内に生息する *Clostridium* 属菌を、Beads+Benzyl chloride 法を用いてヒト糞便から抽出した DNA をテンプレートとし、菌種特異的プライマーを用いた PCR 法または nested PCR 法を実施すれば、ヒト糞便から直接菌種レベルで検出することが可能である。また、分離菌株の同定手段として、プライマーを用いたコロニー PCR 法は十分に使用出来ると考えられる。PCR 法は簡便かつ短時間で菌を検出、同定することが可能であり、今回作製したプライマーは、様々な菌が混在するヒト腸管内における *Clostridium* の生態の解明に大きく寄与するものと考えられる。