

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 菊池 栄作

*Clostridium* はヒト腸管内に生息する優勢菌の一つであり、ヒトの健康に多大な影響を与える。また、*Clostridium* 属に所属する菌群は、分類学上多様性に富んでおり、近年、細菌の 16S rDNA 塩基配列を元した cluster という概念を用いた再分類が進展している。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菌種を同定する手法が用いられてきたが、従来の方法を用いて腸管内の *Clostridium* の生態を把握するには、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る。

今回ヒト腸管内に多く生息し、分類学的、生態学的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 (*C. perfringens*, *C. butyricum*, *C. paraputrificum*, *C. bifermentans*, *C. difficile*, *C. sordellii*, *C. clostridiiforme*, *C. nexile*, *C. sphenoides*, *C. indolis*, *C. innocuum*, *C. ramosum*, *C. cocleatum*) 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。本論文は 3 章から構成され、各章の要約は以下のとおりである。

第一章では、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を作製した。続いて標的とした *Clostridium* 属 13 菌種の基準株、参照株 31 株 (Group 1)、group 1 の 13 菌種以外の *Clostridium* 属菌種の基準株 9 株 (Group 2)、ヒト腸管内に生息する *Clostridium* 属以外の菌群 25 株 (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・生化学的性状により同定を行った *Clostridium* 分離株 20 株 (Group 4) を用いて、作製したプライマーの特異性の確認を行った。Group 1 において、菌の形態および生物・生化学的性状により、各プライマーが標的とした菌種と同定された菌株でバンドが出現しなかった菌株があったが、それらの菌株とプライマーが標的とした菌種の基準株との 16S rDNA 塩基配列の相似度あるいは DNA-DNA ホモロジーを測定したところ、それぞれ 97% 未満、70% 未満であった。Group 2 において、全てのプライマーについて、PCR 法でバンドは出現しなかった。Group 3、4 において、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、それらの菌株は 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・生化学的性状により同定を行った結果と異なる同定結果であった。以上の結果より、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、ヒト腸管内に生息する *Clostridium* 属菌の生態を把握するために、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。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 を抽出して PCR 法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、実際にヒト糞便で作製したプライマーを用いた PCR 法および一度 16S rDNA を増幅した後に菌種特異的プライマーを用いる nested PCR 法を実施して糞便から直接菌の検出を行い、培養法による菌の検出結果と比較した。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 法は、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、作製したプライマーを用いた PCR 法による同定と従来の菌の形態学的特徴および生物・生化学的性状による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、本論文は 16S rDNA 塩基配列を利用して作製したプライマーを用いて、分離菌株の同定およびヒト糞便から直接 *Clostridium* 属 13 菌種を PCR 法または nested PCR 法により検出する方法を開発したことで、様々な菌が混在するヒト腸管内に生息する *Clostridium* の生態を簡便かつ短時間に明らかにすることが可能となったと考える。これらの知見は、学術上、応用上貢献するところが大きい。よって審査員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。