

rRNA を標的とした定量的 RT-PCR 法による
ヒト腸内細菌叢の解析法の開発

松 田 一 乗

目 次

緒 言	1
第 1 章 定量的 RT-PCR 法による細菌の高感度定量法の構築.....	7
序論.....	7
材料および方法.....	7
結果.....	14
考察.....	16
第 2 章 定量的 RT-PCR 法によるヒト腸内細菌叢解析システムの構築.....	19
序論.....	19
材料および方法.....	20
結果.....	24
考察.....	27
第 3 章 定量的 RT-PCR 法によるヒト糞便中の <i>Enterococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , および <i>Lactococcus</i> の検出.....	30
序論.....	30
材料および方法.....	31
結果.....	34
考察.....	38
総 括	41
引用文献	45
図 表	59
謝 辞	83

略語一覽

C_T	Threshold cycle	
CFU	Colony forming unit	
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole	
DNA	Deoxyribonucleic acid	
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization	
PBS	Phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
PCR	Polymerase chain reaction	
qPCR	Quantitative PCR	定量的 PCR
RNA	Ribonucleic acid	
rRNA	Ribosomal RNA	リボソーム RNA
RT-PCR	Reverse transcription PCR	
RT-qPCR	Quantitative RT-PCR	定量的 RT-PCR
TE	Tris-EDTA	

緒 言

ヒト腸内細菌叢

ヒトの腸管内には多種多様な微生物群がバランスを保ちながら生息しており、この複雑な微生物群集は総称して腸内細菌叢と呼ばれる。ヒト腸内細菌叢は Firmicutes, Actinobacteria, Fusobacteria, Fibrobacteres, Proteobacteria, Treonema, および Bacteroidetes の 7 つの門にまたがる 100 ~ 300 種類の菌種から構成されている [1]。それらの生息レベルは菌種により糞便 1 g あたり 10^2 個から 10^{11} 個に及ぶ範囲で非常に多様であるが、その構成は各個人に固有でありかつ安定している。腸内細菌叢構成菌はさまざまな生理活性を有しており、その代表的なものとして食物を発酵し消化を助長すること、その過程で有機酸や腐敗物質を産生すること [2]、外来物質(薬物)や内在物質(胆汁酸)を代謝すること [3]、宿主の腸管の成熟を促すこと [4]、宿主の免疫系と相互作用すること [5]、外来病原菌を排除すること [6]、などが知られている。腸内細菌叢はこれらの機能を介して宿主の健康状態と密接に関係しており、そのバランスが崩れることにより腸の機能異常(下痢, 便秘, 過敏性腸症候群)や腸疾患(感染性腸炎, 潰瘍性大腸炎, クロウン病, 大腸癌)が引き起こされることが示唆されている [7, 8]。また、近年では腸内細菌叢が肥満およびメタボリックシンドローム発症に関係することを示す研究が相次いで発表されている [9-11]。一方で、食事 [12, 13] や宿主の健康状態(病気, 年齢) [6, 14]、医薬品の服用 [15, 16] などが腸内細菌叢の形成に重要な影響を与えることが知られている。したがって、ヒトの健康増進において宿主と腸内細菌叢との相互作用を明らかにすることは非常に重要であり、そのためにはまずこの複雑多様な生態系の微生物構成を正確に把握することが必要である。

腸内細菌叢の解析技術の変遷

腸内細菌叢の構成の解析は主に培養法により行われてきた。1950 年代には嫌気性菌の培養技術が確立され [17-19]、これにより偏性嫌気性菌が優勢である

腸内細菌叢の構造が次第に明らかとされてきた [20]。培養法による解析手順として、まず検査材料を希釈したものを各種の選択培地および非選択培地に接種し、それらを嫌気または好気条件下で培養する。続いて、各培地上に発育したコロニーについて、そのグラム染色性や菌形態などの直接観察によって菌群を同定し、各菌群の菌数を算定する。さらに菌種レベルの構成を調べるには、分離した菌株の生物・生化学的性状あるいは菌体膜の脂肪酸構成や色素、抗原性などの菌体の構成成分といった表現形質をもって菌種の同定が行なわれる。本手法は、目的とする細菌が検体 1 g あたり 100 個程度の低い菌数レベルで存在する場合でも、それを選択的に分離培養することができる。しかしながら、これらの解析作業は多大な労力と時間を必要とするうえ、細菌の同定精度は技術者の経験に寄るところが大きいという問題点があった。また、結果が選択培地の性能による影響を受けやすく、例えば選択性が強すぎる場合には実際の菌数よりも低く検出され、弱すぎる場合には目的とする菌を選択的に分離できないことがある。さらに、難培養性の細菌の存在により、現在の培養技術が検出し得る細菌は腸内細菌叢の 20% から 30% に限られていることが明らかとなってきた [1, 21]。

一方、1980 年代より分子・遺伝学的手法が細菌分類学の分野に用いられるようになった。分離された菌株の DNA の塩基組成 (GC 含量)、DNA の塩基配列の相同性 (DNA/DNA hybridization)、リボソーム RNA (rRNA) 遺伝子の塩基配列などを調べることにより、細菌を系統分類と種概念に基づいて分類・同定することが可能となった。特に、細菌のリボソームを構成する小型のサブユニット (16S) に存在する RNA をコードする遺伝子 (16S rRNA 遺伝子) の塩基配列の解読が急速に進み、これを指標とした系統分類が幅広く用いられるようになった [22]。これを受けて、腸内細菌叢に生息する難培養菌を含む多くの細菌を培養することなしに検出・同定・定量する手法が開発されてきた。

分子生物学的手法による腸内細菌叢の解析

分子生物学的手法による腸内細菌叢の解析で標的とされる 16S rRNA 遺伝子

はすべての細菌に共通する遺伝子であるが、本遺伝子内にはほとんどの細菌で塩基配列が一致する保存領域と、細菌の菌属・グループ・菌種によって配列の異なる九つの可変領域が存在する。この可変領域における塩基配列の類似性を利用して菌種・菌属特異的な検出を行うことができる。それら解析法の代表的なものとして FISH (fluorescence *in situ* hybridization) 法, ランダムシーケンス法, フィンガープリント法, 特異的 PCR 法などがある。

FISH 法とは、特定の菌群あるいは菌種に特異的な蛍光標識プローブを菌体内に浸透させ、核酸の標的部位にハイブリダイズさせることにより、そのシグナルを蛍光顕微鏡下で検出、定量化する方法である。標的遺伝子には、検出感度を上げるため、細菌の細胞内で高発現している 16S rRNA 分子が用いられる。本手法の特長として、微生物の形態さらには試料中での微生物の局在を保持したまま観察できることがあげられる。信頼性の高いデータを得るためには、解析対象の菌種が最低でも全菌数のおよそ 0.5%以上の割合で存在する必要がある、そのため検出下限値は糞便 1 g あたり 10^8 個から 10^9 個である。これまでに、最優勢菌群に対する菌群特異的プローブや、*Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium* の菌種特異的プローブを用いた解析が数多く報告されている [23-26]。また、フローサイトメーターを用いてシグナルを検出する FISH-フローサイトメトリー法も用いられており [27, 28] , この方法では蛍光顕微鏡による画像取得および画像データの解析に伴う煩雑な作業を省力化することができる。

ランダムシーケンス法とは、糞便から抽出された DNA を鋳型として細菌の 16S rRNA 遺伝子に共通なプライマーを用いた PCR を行い、得られた増幅産物の塩基配列を解読することにより構成菌種を解析する方法である。これにはクローンライブラリー法 [1, 29-31] とピロシーケンス法 [13] の異なる解析手法がある。前者は増幅産物を大腸菌にクローニングした後、その培養により増幅されたクローンをシーケンシングする方法である。一方、後者はビーズ上で 1 分子 PCR により増幅されたクローンについて、次世代型シーケンサーを用いて万単位のクローンを同時にシーケンシングする方法である。これら手法の特長として、未知の細菌を含む腸内細菌叢の構造に関する詳細な情報が得られること

があげられる。クローンライブラリー解析は操作が煩雑であり解析できるクローン数にも限りがあったが、次世代型シーケンサーの出現によりその問題は大幅に改善されている [32]。ひとつの検体について 10 万クローンの塩基配列を解読した場合、菌数レベルが糞便 1 g あたり 10^6 個の細菌を解析することができる。

腸内細菌叢解析に用いられているフィンガープリント法としては、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE : denaturing gradient gel electrophoresis) [33, 34] , 温度勾配ゲル電気泳動法 (TGGE : temperature gradient gel electrophoresis) [28] , T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) 法 [35-38] がある。DGGE 法および TGGE 法では、まず PCR により糞便 DNA 中の 16S rRNA 遺伝子を増幅する。得られた増幅産物について、変性剤濃度勾配あるいは温度勾配が付加されたアクリルアミドゲル中で電気泳動を行う。複数の DNA 断片を塩基組成の違いをもとにバンドとして分離し、それをプロファイル化することで腸内細菌叢の構成を解析する。また、T-RFLP 法では、5'末端を蛍光標識したプライマーを用いた PCR により糞便 DNA 中の 16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅する。得られた増幅産物を制限酵素で処理した後、蛍光標識された末端配列を含む DNA 断片をキャピラリー電気泳動法を用いた DNA シーケンサーによって検出する。制限酵素による切断部位による断片長の違いを波形として検出し、それらの数・種類・サイズ等を解析することにより糞便中の構成菌種および割合を推定する。これら方法の特長として、細菌叢の違いをバンドやピークとして視覚化できること、また T-RFLP 法では操作が非常に簡便であることが挙げられる。なお、本法により分離できる細菌は糞便 1 g あたり 10^8 個以上の細菌に限られる。

特異的 PCR 法は、糞便より抽出された DNA を鋳型として 16S rRNA 遺伝子を標的とした菌群・菌種特異的プライマーを用いた PCR を行い、その増幅産物を電気泳動やリアルタイム PCR 装置等により検出する方法である。標的細菌のみを特異的に PCR 増幅する本手法は、これまでに紹介したその他の手法に比べて検出感度が高く、標的細菌が糞便 1 g あたり 10^5 個以上であればそれを特異的に検出することができる。特にリアルタイム PCR 装置を用いる方法は定量的 PCR 法 (qPCR : quantitative PCR) と呼ばれ、糞便中の標的細菌の菌数をその標準菌

株の DNA を用いて作製する検量線により算出することができる [39-42]。一方で、菌数を定量するには標準菌株の DNA が必要であるため、定量的な解析は分離培養可能な細菌に限定される。

高感度かつ網羅的な解析法の開発の試み

以上で紹介した分子生物学的手法を用いることにより、難培養菌を含む腸内に優勢に存在する嫌気性菌群を詳細に解析することが可能となった。しかしながら、それらの手法の検出下限値は最も低いとされる特異的 PCR 法でも糞便 1 g あたり 10^5 個であり、低い菌数レベルで存在する細菌を精度よく解析するには十分ではなかった。この特異的 PCR 法で高い検出感度が得られない主な要因として、解析に供試するサンプル量が制限されることが挙げられる。糞便には核酸抽出や PCR の阻害物質 (糖, 胆汁酸など) が多く含まれているため [43, 44], PCR に供試できる DNA 量は糞便に換算して 10 μ g 程度が上限となる。核酸の精製法の改良や PCR 阻害の低減操作を加えることにより、PCR 法の検出感度を向上できると考えられるが、それのみでの大幅な改善は見込めないと考えられる。これとは別の手段として、細胞内に高発現している RNA 分子を標的とすることが挙げられる。特にリボソームの構成成分である rRNA 分子は、細胞内に数千から数万分子存在していることが報告されており [45, 46], 本分子を標的とすることにより従来の DNA を標的とする手法に比べて検出感度を飛躍的に向上できる可能性がある。一方、一般的に RNA は DNA と比較して安定性が低く [47], 熱処理や栄養状態の変化などの環境的要因、また増殖効率の違いなどで細胞中の rRNA 量が変動することが報告されている [48-50]。したがって、rRNA 分子を菌数測定の指標として使用するには、細菌の増殖状態と rRNA 量の関係を明らかにする必要がある。

そこで本研究では、ヒト腸内細菌を低い菌数で存在する菌群も含めて網羅的に定量できる手法として、細菌中に多コピー存在する rRNA 分子を標的とした定量的 RT-PCR (RT-qPCR : reverse transcription qPCR) 法による腸内細菌叢解析システムの構築を試みた。まず rRNA 分子を標的とした RT-qPCR 法を細菌数の

測定に応用可能であることを確認するため、本法の検出感度および測定精度を中心に解析を行った。続いて、腸内細菌叢の中で低い菌数レベルで存在する細菌を標的とした菌群・菌属・サブグループ・菌種特異的なプライマーを作製し、これらを用いた網羅的解析法の開発を行った。さらには、本法を日和見感染症起因菌の検出に応用することを試みた。

第 1 章

定量的 RT-PCR 法による細菌の高感度定量法の構築

序論

ヒトの腸管内には多様で複雑な微生物生態系が構築されている。これまで腸内細菌叢の群集構造の解析は主に培養法により行われてきたが、近年それに代わる手法として、16S rRNA 遺伝子を標的とする分子生物学的手法が腸内細菌叢の解析に盛んに用いられるようになった。これにより腸内に優勢に存在する嫌気性菌群を正確かつ簡便に解析することが可能となった。しかしながら、これら手法の検出感度は最も高いとされる qPCR 法で糞便 1 g あたり 10^5 個から 10^6 個であり、低い菌数レベルで存在する細菌を解析するには不十分であった。

そこで本研究では、ヒト腸内細菌を高感度かつ網羅的に定量できる手法を開発するため、細胞内に高発現している rRNA 分子を標的とした RT-qPCR 法による細菌定量法の開発を検討した。最初に *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, および *Clostridium perfringens* に特異的な菌群・菌属・菌種プライマーを作製し、これら細菌を RT-qPCR 法により高感度に定量可能であるかを検討した。次に、各種細菌に関して、培養状態の違いが RT-qPCR 法による測定菌数に及ぼす影響を調べた。さらに、RT-qPCR 法によりヒト糞便の内在性菌およびヒト血液に添加した細菌を測定し、培養法による結果との比較を行った。

材料および方法

使用菌株

Table 1-1 に示した菌株を用いた。*Escherichia coli* ATCC 11775^T, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433^T, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600^T, および *Pseudomonas aeruginosa* IFO 12689^T については、brain heart infusion (BHI) ブロス (Becton

Dickinson) により 37°C, 好気条件下で振盪培養した。培養菌液中の CFU 数を測定する場合, 試料を BHI 寒天培地に塗抹し, これを 37°C で 24 時間好気培養した後培地上に検出されるコロニーを計測した。*C. perfringens* JCM 1290^T については, MRS ブロス (Becton Dickinson) により 37°C, 嫌気条件下で静置培養した。また, 同株の CFU 数測定には GAM 寒天培地 (日水製薬) を用い, これを 37°C で 24 時間嫌気培養した。なお, 一連の嫌気培養操作は嫌気チャンバー (Coy Laboratory Products) 内で実施した。

rRNA 標的プライマーの設計

ヒト腸管内から分離が報告されている菌種について, DDBJ/Genbank/EMBL データベースより 16S rRNA 遺伝子配列を入手した。Clustal X ソフトウェア [51] を用いて得られた配列の多重整列を行い, 近隣接合法による系統樹を作成した。整列配列の比較から Enterobacteriaceae, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, および *Pseudomonas* にそれぞれ特異的な配列を同定し, それらをもとに菌群・菌属特異的プライマーを設計した (Table 1-2)。なお, Enterobacteriaceae については, 16S rRNA 遺伝子上で特異的な配列が同定できなかったことから, 別途 23S rRNA 遺伝子配列を用いてプライマーを設計した。設計したプライマー配列については, Ribosomal Database Project (RDP-II) (<http://rdp.cme.msu.edu/>) [52] の Check Probe プログラムを用いて, データベース上の rRNA 遺伝子配列との交叉がないことを確認した。

ヒト糞便試料

名古屋大学医学部器官調節外科の胆管癌患者 19 名より採取された排泄便 38 検体を用いた。約 1 g の排泄便を 3 ml の嫌気輸送培地 {KH₂PO₄, 0.0225% (wt/vol); K₂HPO₄, 0.0225% (wt/vol); NaCl, 0.045% (wt/vol); (NH₄)₂SO₄, 0.0225% (wt/vol); CaCl₂, 0.00225% (wt/vol); MgSO₄, 0.00225% (wt/vol); Na₂CO₃, 0.3% (wt/vol); L-cysteine hydrochloride, 0.05% (wt/vol); resazurin, 0.0001% (wt/vol); Lab Lemco powder (Oxoid), 1.0% (wt/vol); glycerol, 10% (wt/vol)} の入った試験管チューブに採取し, これをヤクルト中央研究所まで低温輸送した。研究所に到着後, 重

量を測定した上で、嫌気輸送培地をさらに加えて均一に懸濁し、10% (wt/vol) の糞便懸濁液を作製した。この糞便懸濁液の一部を以降の RNA 抽出および培養法による解析に用いた。

糞便懸濁液を嫌気希釈液 {0.0225% (wt/vol) KH_2PO_4 , 0.0225% (wt/vol) K_2HPO_4 , 0.045% (wt/vol) NaCl , 0.0225% (wt/vol) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.00225% (wt/vol) CaCl_2 , 0.00225% (wt/vol) MgSO_4 , 0.3% (wt/vol) Na_2CO_3 , 0.05% (wt/vol) L-cysteine hydrochloride, 0.0001% (wt/vol) resazurin, 0.05% (wt/vol) BACTO agar (Difco) , 0.05% (wt/vol) Tween 80} を用いて 10 倍段階希釈し、適宜の希釈濃度の検体 50 μl を DHL 寒天培地 (日研生物医学研究所) および NAC 寒天培地 (栄研化学) に塗抹した。本培地を 37°C で 24 時間好気培養した後、培地上に検出されたコロニーについて、性状およびグラム染色性から Enterobacteriaceae および *Pseudomonas* と推定されるものの個数を計測した。

ヒト血液の細菌添加試験

健康成人から採血した末梢血に 1/10 量の 3.8% (wt/vol) クエン酸ナトリウム水溶液を添加して抗凝固処理した。2 ml の抗凝固血液に *S. aureus* および *P. aeruginosa* の純培養菌液を 10 倍段階希釈したものを 40 μl 添加した。各サンプルうち 0.5 ml を全 RNA 抽出に、別の 0.5 ml を混釈培養法に供した。

血液サンプルを滅菌生理食塩水により 10 倍段階希釈し、適宜の希釈濃度の検体 500 μl を 55°C に保持した BHI 寒天培地 20 ml と混和し、これを室温で静置し固化した。37°C で 24 時間好気培養した後、培地に検出されたコロニーの個数を計測した。

総 RNA 抽出

各種試料 (細菌懸濁液 50 μl , 糞便懸濁液 200 μl , 血液試料 500 μl) に、2 倍量の RNa protect Bacterial Reagent (QIAGEN) を加え、ボルテックスにより懸濁した。室温で 5 分間静置した後、遠心分離 (5,000 $\times g$, 4°C, 10 分間) した。上清をすべて除去した後、-80°C で凍結保存した。

上記保存液に溶菌バッファー 450 μl [Buffer RLT (QIAGEN) 346.5 μl ,

β -メルカプトエタノール 3.5 μ l, TE バッファー (pH 8.0) 100 μ l] およびガラスビーズ (直径 0.1 mm) 300 mg (BioSpec Products) を添加し, FastPrep FP120 (Bio101) により出力レベル 5.0 で 1 分間激しく振とうした。破砕液に水飽和フェノール 500 μ l を添加し, 60°C で 10 分間反応させた。これにクロロホルム : イソアミルアルコール (24 : 1) (CIA) 100 μ l を加えて攪拌した後, 遠心分離 (13,000 \times g, 4°C, 5 分間) した。上清を別のマイクロチューブに回収し, これに等量の CIA を加えて攪拌した後, 再度同条件にて遠心分離した。上清 400 μ l を別のマイクロチューブに回収し, これに等量のイソプロピルアルコールおよび 1/10 量の 3M 酢酸ナトリウムを加えて転倒混和した後, 遠心分離 (20,000 \times g, 4°C, 10 分間) した。上清を取り除いたものに 75% エタノール 500 μ l を加えて転倒混和した後, 遠心分離 (20,000 \times g, 4°C, 2 分間) した。上清を除去し, チューブ内を風乾させた後, 50 μ l の Nuclease-free Water (Life Technologies) で沈殿物を溶解させたものを全 RNA 粗抽出溶液とした。

続いて, 全 RNA 粗抽出溶液に混入している DNA の除去を行った。全 RNA 粗抽出溶液全量, 1 \times DNase I Buffer (タカラバイオ), および RNase-free DNase I (タカラバイオ) 20 U を含む反応液 (総量 100 μ l) を 37°C で 20 分間反応させた。その後, 反応液に Nuclease-free Water 200 μ l, 水飽和フェノール 150 μ l, および CIA 150 μ l を添加・攪拌した後, 遠心分離 (13,000 \times g, 4°C, 5 分間) した。上清を別のマイクロチューブに回収し, これに等量の CIA を加えて攪拌した後, 再度同条件にて遠心分離した。上清 250 μ l を別のマイクロチューブに回収し, 抽出過程と同様にアルコール沈殿を行った後, 50 μ l の Nuclease-free Water に沈殿物を溶解させたものを全 RNA 溶液とした。

RT-qPCR

QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN) を用いた。RT-PCR は, 1 \times QIAGEN OneStep RT-PCR buffer, 0.4 mM dNTP Mix, 1/20 量の QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix, 1/100,000 量の SYBR Green I (BioWhittaker Molecular Applications), 0.6 μ M 各プライマー, および 2 μ l の鋳型 RNA 溶液を含む反応液 (総量 20 μ l) で行った。最初に反応液を 50°C で 30 分間加温することにより逆転写反応を行

ない、その後、逆転写酵素を失活させるため同反応液を 95°C で 15 分間加熱した。続いて、94°C で 20 秒間、60°C で 20 秒間、72°C で 50 秒間を加熱する一連の工程を繰り返し 40 回行い、そのサイクルごとに増幅産物の量を SYBR Green I の蛍光強度として測定した。引き続き PCR の特異性を検定するため、増幅産物の変性温度の測定を行った。94°C で 15 秒間加温した後、60°C から 95°C にかけて毎秒 0.2°C の速度で緩やかに温度を上昇させ、増幅産物の乖離曲線を取得した。これらの一連の反応については、ABI PRISM 7900HT (Life Technologies) により行った。PCR 終了後、得られた増幅曲線について、蛍光強度のベースラインおよび閾値を設定し、PCR 曲線と閾値が交差するサイクル数 (Threshold cycle : C_T 値) を求めた。これらの解析には Sequence Detection System ソフトウェア (Life Technologies) を用いた。

DNA 抽出

松木ら [40] により報告されている方法に従い行った。試料には細菌懸濁液 50 μ l を用い、これにダルベッコ PBS (-) (D-PBS) (日水製薬) を加えて総量 200 μ l とした。これに 1 ml の D-PBS を加えて攪拌した後、遠心分離 (13,000 \times g, 4°C, 5 分間) し、上清 1 ml を除去するという一連の操作を繰り返し 3 回行った。その後 DNA 抽出までの間、サンプルを -30°C で凍結保存した。

上記保存液に溶菌バッファー 300 μ l (100 mM Tris-HCl, 40 mM EDTA, 1% SDS, pH 9.0), TE 飽和フェノール 500 μ l, およびガラスビーズ 300 mg を添加した。FastPrep FP120 により出力レベル 5.0 で 30 秒間激しく振とうした後、遠心分離 (20,000 \times g, 4°C, 5 分間) した。上清を別のマイクロチューブに回収し、これに等量の TE 飽和フェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) を加えて、FastPrep FP120 により出力レベル 4.0 で 45 秒間激しく振とうした。再度同条件にて遠心分離した後、上清 250 μ l を別のマイクロチューブに回収し、アルコール沈殿を行った。得られた沈殿物を 50 μ l の TE バッファーに溶解させたものを DNA 溶液とした。

qPCR

RT-qPCR と同一組成の試薬, および 2 μ l の鋳型 DNA 溶液を含む反応液 (総量 20 μ l) を用いて qPCR を行った。反応液を 95°C で 5 分間加熱した後, 94°C で 20 秒間, 60°C で 20 秒間, 72°C で 50 秒間を加熱する一連の工程を繰り返し 40 回行い, そのサイクルごとに増幅産物の量を SYBR Green I の蛍光強度として測定した。引き続き PCR の特異性を検定するため, RT-qPCR と同様に増幅産物の乖離曲線を取得した。これらの一連の反応については, ABI PRISM 7900HT により行った。

生菌数の測定

LIVE/DEAD BacLight bacterial viability kit (Molecular Probes) を用いた。純培養菌液に SYTO9 (励起波長 480 nm, 蛍光波長 500 nm) および propidium iodide (PI) (励起波長 490 nm, 蛍光波長 635 nm) をそれぞれ終濃度が 5 μ M および 30 μ M になるように添加し, これを遮光した状態で 30°C で 10 分間反応させた。この時, SYTO9 は非特異的に細菌の細胞内に浸透し, PI は細胞原形質膜が損傷した細胞のみに浸透する [53]。その後, 反応液を封入剤: VECTASHIELD with DAPI (Vector Laboratories) と混和し, これをスライドガラス・カバーガラス間に封入した。これを fluorescein isothiocyanate-tettrarhodamine isothiocyanate (FITC/TRITC) フィルターセット (Chroma Technologies) を用いた蛍光顕微鏡 Olympus BX-50/BXFLA (オリンパス) により観察し, 得られた画像を Image-Pro Plus ver. 4 ソフトウェア (Media-Cybernetics) により解析した。SYTO9 のみで染色された細胞数 (生菌), および SYTO9 と PI の両色素で二重染色された細胞数 (生菌および死菌) を測定すると同時に, 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (励起波長 358 nm, 蛍光波長 461 nm) により染色された細胞数を菌液中の総菌数として測定した [54]。それぞれの数値をもとに次式により菌液中の生菌数を算出した: 生菌数 = (SYTO9 染色された細胞数 / 両色素で二重染色された細胞数) \times DAPI 染色による総菌数。

RT-qPCR 法による菌数測定

各標的細菌の標準曲線の作製には以下の菌株を使用した：*E. coli* ATCC 11775^T (Enterobacteriaceae 測定用)，*E. faecalis* ATCC 19433^T (*Enterococcus*)，*S. aureus* ATCC 12600^T (*Staphylococcus*)，*P. aeruginosa* ATCC 10145^T (*Pseudomonas*)，および *C. perfringens* JCM 1290^T (*C. perfringens*)。各菌株を 18 時間培養し，その菌液の菌数濃度を DAPI 染色法により測定した。同菌液から抽出された総 RNA を 10 倍段階希釈し，DAPI 染色法による菌数に基づき 10^{-3} 個から 10^5 個に相当する RNA を RT-qPCR に供試した。供試 RNA 量と PCR データ (C_T 値) との比較により近似曲線を作製し，直線性が認められる範囲のものを標準曲線とした。

各種試験試料の菌数定量には以下に示す量の RNA を鋳型に RT-PCR を行った：純培養菌体（純培養菌液 50 μ l の抽出物のうち 1/1,000，1/10,000，1/100,000 量），糞便（糞便 20 mg の抽出物のうち 1/20,000，1/200,000，1/2,000,000 量），血液（血液 500 μ l の抽出物のうち 1/50，1/500，1/5000 量）。反応後，鋳型 RNA 量に対して直線性が認められる C_T 値を標的細菌の標準曲線に代入し，鋳型 RNA あたりの菌数を算出した。これにサンプル量を換算した菌数の平均値をサンプルあたり（純培養菌液 50 μ l，糞便 1 g，血液 1 ml）の菌数として求めた。

プライマーの特異性の検討

Table 1-1 に示した菌株について，RT-qPCR 法によりプライマーの特異性の検討を行った。各菌株の純培養菌体から抽出された総 RNA の 10^5 個相当を鋳型に RT-qPCR を行い，各菌株より得られた C_T 値を標準曲線に代入した時に，菌数が 10^4 個以上であったものを陽性 (+)， 10^1 個以下であったものを陰性 (-)，その間のものを (±) と判定した。また，増幅産物の乖離曲線が標的菌株のそれと異なったものも陰性 (-) と判定した。

統計処理

統計ソフト SPSS 14.0J (日本 IBM) を用いた。2 法による測定結果の相関の解析には単回帰分析を用い，ピアソンの積率相関係数を求めた。 $P < 0.05$ を有意とした。

結果

RT-qPCR 法および qPCR 法による検出限界値の測定

E. coli, *E. faecalis*, *S. aureus*, *C. perfringens*, および *P. aeruginosa* の各純培養菌体より抽出された総 RNA の 10 倍段階希釈液を鋳型として, En-lsu-3F/En-lsu-3'R, Ec-ssu1'F/Ec-ssu1R, STPYF/STPYR2, CIPER-F/CIPER-R [55] , および PSD7F/PSD7R の各プライマー (Table 1-2) を用いた RT-qPCR 法による検出感度を解析した (Fig. 1-1)。その結果, *E. faecalis*, *S. aureus*, *C. perfringens*, および *P. aeruginosa* では RNA 鋳型量が反応あたり 10^{-3} 個から 10^5 個の範囲で, *E. coli* では 10^{-1} から 10^5 個の範囲で C_T 値に対する近似曲線に直線性が認められた ($R^2 > 0.99$)。En-lsu-3F/En-lsu-3'R プライマーを用いた RT-qPCR において, RT-PCR 試薬に混入していると思われる DNA/RNA に由来する非特異的増幅が観察されたが (データ未掲載), 鋳型量が 10^{-1} 個の時にそれと特異的増幅とを区別することが可能であった。

RT-qPCR 法による標準曲線を qPCR 法によるそれと比較したところ, 曲線傾きに大きな差は確認されず, PCR 増幅効率は両手法間で同等であると考えられた。一方で, Y 軸切片の値は RT-PCR が PCR よりも 6 から 10 低く, RT-PCR 法の検出感度が PCR 法に対して 64 から 1,024 倍高いことが認められた。

プライマーの特異性の評価

本試験で新規に作製したプライマー En-lsu3F/En-lsu3'R (Enterobacteriaceae 検出用), Ec-ssu1'F/Ec-ssu1R (*Enterococcus*), STPYF/STPYR2 (*Staphylococcus*), および PSD7F/PSD7R (*Pseudomonas*) を用いた RT-PCR の検出特異性を調べたところ (Table 1-1), いずれのプライマーでも標的菌種のみが検出されることが確認された。また, 既報の CIPER-F/CIPER-R についても, その特異性が再確認された。

純培養菌液中の菌数測定

E. coli, *E. faecalis*, *S. aureus*, *C. perfringens*, および *P. aeruginosa* の純培養菌

液の段階希釈液を作製した。各希釈液 50 μ l 中の菌数を培養法および RT-qPCR 法により測定し、得られた測定菌数を手法間で比較した (Fig. 1-2)。その結果、解析した全ての菌株において、CFU 数が $10^0 \sim 10^5$ CFU/50 μ l の範囲で両手法による測定菌数の間に相関が認められた ($R^2 > 0.90$)。本結果より、rRNA 分子を標的とした RT-qPCR 法により培養菌液中の標的細菌を 1 個から精度よく定量できることが認められた。

培養状態の違いが RT-qPCR 菌数に及ぼす影響の解析

培養状態の違いが RT-qPCR 菌数に及ぼす影響を調べるため、様々な培養期の菌体を用いて、CFU 数と RT-qPCR 法による菌数の関係を調べた。*E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus*, および *C. perfringens* を 60 時間連続培養し (*C. perfringens* のみ 72 時間)、その間の菌数の変動を培養法および RT-qPCR 法により測定した (Fig. 1-3)。なお、RT-qPCR 法の検量線の作製には、各菌株を 18 時間培養した菌液より抽出された総 RNA を使用した。

その結果、解析した全菌株において、対数増殖期から定常期の間、RT-qPCR 法による菌数は CFU 数とよく一致していた。*E. coli* については、培養開始後 42 時間目から 60 時間目にかけて CFU 数が急速に減少したが、RT-qPCR 菌数もほぼ同じ変動パターンを示した (Fig. 1-3A)。*E. faecalis* および *S. aureus* では、菌数が上限に達してから培養開始後 60 時間目まで、CFU 数および RT-qPCR 菌数ともにほぼ同じレベルで推移した (Fig. 1-3B および C)。一方、*C. perfringens* では、培養開始後 42 時間目までは両手法による菌数に乖離は認められなかったが、そこから 72 時間目にかけて CFU 数が減少し、RT-qPCR 菌数よりも低い値を示した (Fig. 1-3D)。そこで、この手法間での菌数の乖離現象を考察するため、次に、培養後期の *C. perfringens* の菌液中の生菌数を測定し、CFU 数および RT-qPCR 菌数との比較を行った。

RT-qPCR 法と生菌測定法による菌数の比較

細胞膜の透過性を指標とした生菌死菌判別法である SYTO9-PI 二重染色法 [56, 57] を用いて、死滅期にある *C. perfringens* 菌液中の生菌数を測定した (Fig. 1-4)。

その結果、CFU 数が著しく減少した一方で、生菌数はほぼ同じレベルで推移した。この結果より、平板培地上でのコロニー形成能を失った菌体のほとんどにおいて、その細胞膜は損傷していない状態で維持されていること、その状態で検出される菌数は RT-qPCR 法による菌数とほぼ同等であることが認められた。

ヒト糞便および血液中の細菌の定量

最後に、ヒト糞便および血液中の細菌定量に関して、RT-qPCR 法を応用することが可能であるかを検討した。19 名の入院患者より複数回提供された糞便について、RT-qPCR 法および培養法により Enterobacteriaceae および *Pseudomonas* の菌数を測定した (Fig. 1-5)。RT-qPCR 法および培養法の両方で Enterobacteriaceae が検出された 38 検体について、両手法による測定菌数を比較したところ、それらの間に相関が認められた ($R^2 = 0.901$)。同様に *Pseudomonas* が検出された 7 検体においても、両手法による測定菌数の間に相関が認められた ($R^2 = 0.981$)。

一方、血液については、臨床上問題となる *S. aureus* あるいは *P. aeruginosa* を終濃度が $10^0 \sim 10^6$ CFU/ml になるように添加したヒト末梢血を調製し、これを RT-qPCR 法および培養法により解析した (Fig. 1-6)。その結果、RT-qPCR 法により *S. aureus* および *P. aeruginosa* をそれぞれ血液試料 500 μ l あたり 2 CFU および 1 CFU の感度で検出できた。また、細菌非添加コントロールにおいて偽陽性は認められなかったことから、試薬のコンタミネーションやヒト由来核酸との交叉反応はなかったと考えられた。

考察

本研究において、rRNA 分子を標的とした RT-qPCR 法による高感度かつ高精度な細菌定量法の構築を試みた。本法の検出感度は DNA を標的とする qPCR 法よりもおよそ 100 倍から 1,000 倍高かった (Fig. 1-1)。rRNA 分子はリボソームの構成因子であり、細菌では 5S, 16S, 23S の 3 種類が存在する。これらをそれぞれコードする遺伝子はオペロンを形成しており、*E. coli* ではそのオペロンがゲノム上に 7 コピー存在している。細菌のリボソームは 2 つのサブユニットから

構成され、スモールサブユニットに 16S rRNA が、ラージサブユニットに 5S と 23S の rRNA が含まれている。細胞内のリボソーム量は *E. coli* では最大で 20,000 個以上になることが知られており [45]，構成因子である rRNA 分子もそれと同程度存在すると考えられる。また，総 RNA に占める割合は rRNA 分子が最も高く，その値は 80%以上にもなる [46]。このように rRNA 分子はそれをコードする遺伝子に対して 1,000 倍以上の比率で存在しており，このことが RT-qPCR 法が qPCR 法よりも感度が高かった理由であると考えられた。

rRNA の発現量は他の遺伝子のそれよりも安定であると考えられており，遺伝子の発現解析における内在コントロールとしてよく用いられている。その一方で，rRNA 分子の合成は細菌の増殖効率に依存してコントロールされ，急速に分裂増殖する細菌内の rRNA 分子量は増殖が緩やかな細菌のそれよりも高いことがこれまでに示されている [49]。例えば *E. coli* では，ダブリングタイムが 100 分から 24 分に変化すると rRNA 分子量が 10 倍以上増加する [50]。また，細菌の増殖が定常期に差し掛かると，フィードバックメカニズムにより rRNA 分子の過剰合成が抑制される [48, 49]。本試験において，増殖時期が RT-qPCR 法による測定菌数に及ぼす影響を調べたところ，対数増殖期の細菌では RT-qPCR 菌数が CFU 数を上回る傾向が観察されたが，その差は最大で 4 倍であり両測定法による菌数に有意な差はなかった (Fig. 1-3)。本結果は rRNA 分子が菌数測定の指標となり得ることを支持するものであり，本分子を標的とした RT-qPCR 法を菌数測定に適用可能であると考えられた。ただし，この増殖状態と rRNA 分子量の関係については，本法により正確な結果を得る上で引き続き考慮すべき現象であると考えられる。

近年，コロニー形成能に代わるあらたな細菌の生死判別の指標として RNA 分子が用いられてきている [58-61]。rRNA 分子は DNA よりも不安定で分解されやすく，その細胞内含量は生菌活性と相関するという報告もある [62]。本試験において，60 時間培養した *E. coli* の RT-qPCR 菌数の減少パターンは CFU 数のそれとよく一致していた (Fig. 1-3A)。加えて，ヒト糞便中の Enterobacteriaceae および *Pseudomonas* について，RT-qPCR 菌数は CFU 数と相関していた (Fig. 1-5)。一方で，熱処理 [63] や UV 照射 [62]，エタノール処理 [64] といった厳しい

ストレスを細菌に与えた場合には、CFU 数と rRNA 分子量が乖離することが報告されている。したがって、rRNA 分子が細菌の生死判別の絶対的な指標となり得るかはさらなる解析および議論が必要であるが、本試験の結果からは少なくとも消化管などの生理学的環境に生息する菌を測定する上では rRNA 分子がその指標となり得ることが示唆された。

C. perfringens において、培養開始後 42 時間目以降に CFU 数が RT-qPCR による菌数よりも顕著に低く検出されたが (Fig. 1-3D)、細胞膜の安定性で評価される生菌測定法による菌数は RT-qPCR による菌数とほぼ同等であった (Fig. 1-4)。細菌が厳しい環境に晒された際に生き残るための手段として、生きているが培養不可能な状態 (viable but not culturable : VBNC) をとることが報告されている [65]。その状態の細菌は通常の培地では増殖しないが、代謝活性や病原性は維持されており [66]、また環境条件が増殖に適した範囲に戻ると増殖が再開するといった例も報告されている [67, 68]。VBNC 状態であるかの判定は、substrate responsive assay, 呼吸活性 (CTC アッセイ), 細胞膜電位 [69]、細胞膜の安定性 [56, 57] などを指標として実施される。これまでに、60 種類以上の細菌が VBNC 状態を示すことが報告されているが *Clostridium* 属細菌については未だ報告がない [65]。したがって、*C. perfringens* で今回観察された現象が VBNC に該当するかについては、上述の手法を用いたさらなる解析が必要である。

RT-qPCR 法の血液検査への応用性を検討したところ、本法により血液に添加された細菌を 1 個から精度よく検出することができた (Fig. 1-6)。臨床検査では感染菌の迅速な診断が必須であるが、現在当領域で用いられている分子生物学的手法では、その検出感度を上げるために最初に試料を数日間増菌培養する必要がある [70]。それに対して本研究で構築した方法では、RNA 抽出から RT-qPCR 解析までを 5 時間以内で終了することができるうえ、上記の培養操作が不要になるため偽陽性の発生リスクの低減が期待される。したがって、本法はその高い検出感度と簡便性から、血液検査において非常に有効な細菌検出法となり得ると考えられた。本法の適用可能範囲は非常に広いと考えられ、組織感染症の迅速診断や口腔および膣細菌叢の解析、さらには環境微生物の解析や食品の細菌検査においても有効な手段となることが期待される。

第2章

定量的 RT-PCR 法によるヒト腸内細菌叢解析システムの構築

序論

前章の研究において、rRNA 分子を標的とした RT-qPCR 法による菌数定量法を構築し、本法によりヒト糞便から目的の細菌を正確かつ高感度に定量することが可能となった。この結果を受けて、次に RT-qPCR 法によるヒト腸内細菌叢解析システムの構築を試みた。

これまでの PCR 法を用いた解析において、ヒト腸内に優勢に存在する嫌気性菌群 (*Clostridium coccooides* group, *Clostridium leptum* subgroup, *Bacteroides fragilis* group, *Bifidobacterium*, *Atopobium* cluster, *Prevotella*) を特異的に検出するプライマーは多く報告されている [40, 71]。一方で, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* といった腸管内に低い菌数レベルで生息する細菌については PCR 法による検出が難しく、解析例は非常に限られている。前章の研究において *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, および *C. perfringens* を RT-qPCR 法により検出するため、それぞれに特異的なプライマー: En-lsu3F/En-lsu3'R, Ec-ssu1'F/Ec-ssu1R, STPYF/STPYR2, PSD7F/PSD7R, および CIPER-F/CIPER-R を新規に構築したが、それらのうち Ec-ssu1'F/Ec-ssu1R および STPYF/STPYR2 については腸内に多様に存在する *Enterococcus* および *Staphylococcus* 属菌種を網羅するにはその精度が十分でなかった。また, CIPER-F/CIPER-R については、それによる増幅産物長が 0.79 kb と長いため、増幅効率を安定化するためにプライマーの改良が必要と考えられた。

そこで本研究では、まず *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, および *C. perfringens* を検出するための菌属・サブグループ・菌種特異的プライマーを新たに作製または改良し、それらを用いた RT-qPCR 法により標的細菌を高感度に定量可能であるかを検討した。次に、新規に作製したプライマーおよび既報

のヒト腸内優勢菌 6 菌群に特異的なプライマーを用いた RT-qPCR 法により健康成人 40 名の糞便を解析した。

材料および方法

使用菌株

Table 2-1 に示した菌株を用いた。*Blautia producta* JCM 1471^T, *Faecalibacterium prausnitzii* ATCC 27768^T, *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482^T, *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703^T, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700^T, *Collinsella aerofaciens* DSM 3979^T, *Prevotella melaninogenica* ATCC 25845^T, および *C. perfringens* JCM 1290^T については, 1% Glucose 加変法 GAM ブロス (日水製薬) により 37°C, 嫌気条件下で静置培養した。*Lactobacillus casei* ATCC 334^T, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356^T, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917^T, *Lactobacillus reuteri* JCM 1112^T, *Lactobacillus ruminis* JCM 1152^T, *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T, *Lactobacillus brevis* ATCC 14869^T, *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931^T, *Lactobacillus fructivorans* JCM 1117^T, および *E. faecalis* ATCC 19433^T については, MRS ブロスにより 37°C, 嫌気条件下で静置培養した。一連の嫌気培養操作は嫌気チャンバー内で実施した。*E. coli* JCM 1649^T, *S. aureus* ATCC 12600^T, および *P. aeruginosa* IFO 12689^T については, 第 1 章記載の方法に従い培養した。菌液中の総菌数の測定については, 第 1 章記載の方法に従い DAPI 染色法により行なった。

rRNA 標的プライマーの設計

第 1 章に記載の方法に従って行った。16S rRNA 遺伝子配列をもとに *C. perfringens*, *Enterococcus*, および *Staphylococcus* をそれぞれ特異的に定量するためのプライマー: s-Clper-F/CIPER-R, g-Encoc-F/g-Encoc-R, および g-Staph-F/g-Staph-R を新たに設計した (Table 2-2)。なお, *C. perfringens* については, 前章の研究で用いたリバースプライマー CIPER-R との組み合わせで用いるように, フォワードプライマーのみを設計した。また, *Lactobacillus* については,

まず 80 種の *Lactobacillus* 細菌の 16S rRNA 遺伝子配列より作製した系統樹をもとに、それらを 13 のサブグループにグループ化した。そのうち、既報でヒト腸管から検出されている菌種が含まれる 9 つのサブグループについて、サブグループまたは菌種特異的プライマーを新規に作製するか、または既報の情報にもとづいて合成した (Table 2-2) : sg-Lcas-F/sg-Lcas-R (*L. casei* subgroup 標的), sg-Lgas-F/sg-Lgas-R (*L. gasseri* subgroup), sg-Lpla-F/sg-Lpla-R (*L. plantarum* subgroup), sg-Lreu-F/sg-Lreu-R (*L. reuteri* subgroup), sg-Lrum-F/sg-Lrum-R (*L. ruminis* subgroup), sg-Lsak-F/sg-Lsak-R (*L. sakei* subgroup), s-Lbre-F/s-Lbre-R (*L. brevis*), LFer-1/LFer-2 [73] (*L. fermentum*), s-Lfru-F/s-Lfru-R (*L. fructivorans*)。

糞便試料の採取

健康成人ボランティア 40 名 (性別 : 男 24 名/女 16 名, 年齢 : 20 ~ 65 才, 平均 41 ± 13 才) から提供された糞便サンプルを用いた。ビニール袋に採取した糞便サンプルをアルミジッパー密封袋にアネロパウチ・ケンキ (三菱ガス化学) とともに封入し, 密封袋内の嫌気状態を維持した状態でヤクルト中央研究所まで低温輸送した。研究所に到着後, 重量を測定した上で, 嫌気輸送培地をさらに加えて均一に懸濁し, 10% (wt/vol) の糞便懸濁液を作製した。

培養法による糞便菌叢解析

上記にて作製した糞便懸濁液を嫌気希釈液により 10 倍段階希釈し, 適宜の希釈濃度の検体 50 μ l を下記の寒天培地に塗抹した : medium 10 (M10), 総菌数測定用 ; 変法 TOS プロピオン酸 (MTP) 寒天培地 (栄研化学), *Bifidobacterium* 測定用 ; *Clostridium welchii* (CW) 寒天培地 (日研生物医学研究所), レシチナーゼ陽性 *Clostridium* [*Clostridium* (L+)] 測定用 ; DHL 寒天培地, Enterobacteriaceae 測定用 ; LBS 寒天培地 (Becton Dickinson), *Lactobacillus* 測定用 ; COBA [74] (日研生物医学研究所), *Enterococcus* 測定用 ; 卵黄加マンニット食塩 A 寒天培地 (日研生物医学研究所), *Staphylococcus* 測定用。M10, MTP, CW, および LBS 寒天培地については, それぞれ 37°C で 4, 3, 1, および 3 日間嫌気培養した。DHL, COBA, および卵黄加マンニット食塩 A 寒天培地については, それぞれ 37°C で

1, 2, および 2 日間好気培養した。培養終了後、培地上に発現したコロニーを形態毎に分類し、その代表的なコロニーをグラム染色して菌形を観察した。MTP および CW 寒天培地上のコロニーについては、それぞれ *Bifidobacterium* 属特異的プライマー (g-Bifid-F/g-Bifid-R) および *C. perfringens* 特異的プライマー (s-Clper-F/CIPER-R) (Table 2-1) を用いたコロニーPCRにより菌属または菌種の同定を行った。DHL, COBA, および卵黄加マンニット食塩 A 培地上のコロニーに関しては、API 20E, API Strep, および API Staph (bioMerieux) を用いた生化学性状検査を行い、菌種の同定を行った。なお、本法による菌数の検出限界値は $10^{2.3}$ CFU/g 糞便であった。

FISH 法

高田ら [25] が報告した方法に従い行った。DNA プローブとして、16S rRNA を標的とした下記の既報の配列あるいは新規に設計した配列をもとに、5'末端が Cy5 で蛍光標識されたものを合成した (シグマ アルドリッチ ジャパン) : Eub338 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') [75], 総菌数測定用 ; Erec482 (5'-GCTTCTTAGTCARGTACCG-3') [23], *C. coccoides* group 測定用 ; Clept1240 (5'-GTTTTRTCAACGGCAGTC-3') [76], *C. leptum* subgroup 測定用 ; Bfra602 (5'-GAGCCGCAAACCTTTCACAA-3') [23], *B. fragilis* group 測定用 ; Bif153 (5'-ACCACCCGTTTCCAGGAG-3') [25], *Bifidobacterium* 測定用 ; ATO291 (5'-GGTCGGTCTCTCAACCC-3') [26], *Atopobium* cluster 測定用 ; Prev496 (5'-CGGAATTAGCCGGTCCTTAT-3'), *Prevotella* 測定用。

総 RNA 抽出および RT-qPCR

第 1 章に記載の方法により行った。RT-qPCR については第 1 章に記載の方法に下記の改変を加えた。すなわち、反応液組成を以下の組成に変更した : 1 × QIAGEN OneStep RT-PCR buffer, 0.4 mM dNTP Mix, 1/20 量の QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix, 1/100,000 量の SYBR Green I, 0.6 μM 各プライマー (ただし, g-Bfra-F2/g-Bfra-R および sg-Lsak-F/sg-Lsak-R のみについては, それぞれ 1.2 μM および 2.4 μM とした), および 5 μl の鋳型 RNA 溶液 (総量 10 μl)。

また、各プライマーのアニーリング反応は Table 2-2 に示す温度条件で行った。

DNA 抽出および qPCR

第 1 章に記載の方法ならびに松木ら [40] により報告されている方法に従った。

RT-qPCR 法による菌数測定

第 1 章に記載の方法に従った。標準曲線の作製には測定対象ごとに以下の菌株を用いた：*R. productus* JCM 1471^T (*C. coccoides* group 測定用)，*F. prausnitzii* ATCC 27768^T (*C. leptum* subgroup)，*B. vulgatus* ATCC 8482^T (*B. fragilis* group)，*B. adolescentis* ATCC 15703^T (*Bifidobacterium*)，*B. breve* ATCC 15700^T (*B. breve*)，*C. aerofaciens* DSM 3979^T (*Atopobium* cluster)，*P. melaninogenica* ATCC 25845^T (*Prevotella*)，*C. perfringens* JCM 1290^T (*C. perfringens*)，*E. coli* JCM 1649^T (*Enterobacteriaceae*)，*L. casei* ATCC 334^T (*L. casei* subgroup)，*L. acidophilus* ATCC 4356^T (*L. gasseri* subgroup)，*L. plantarum* ATCC 14917^T (*L. plantarum* subgroup)，*L. reuteri* JCM 1112^T (*L. reuteri* subgroup)，*L. ruminis* JCM 1152^T (*L. ruminis* subgroup)，*L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T (*L. sakei* subgroup)，*L. brevis* ATCC 14869^T (*L. brevis*)，*L. fermentum* ATCC 14931^T (*L. fermentum*)，*L. fructivorans* JCM 1117^T (*L. fructivorans*)，*E. faecalis* ATCC 19433^T (*Enterococcus*)，*S. aureus* ATCC 12600^T (*Staphylococcus*)，*P. aeruginosa* IFO 12689^T (*Pseudomonas*)。また、プライマーの特異性評価は第 1 章に記載の方法により行った。

糞便への細菌添加試験

細菌添加試験には事前に RT-qPCR 解析により *B. breve*，*C. perfringens*，*L. fructivorans*，あるいは *Pseudomonas* が含まれていないことを確認した健常成人 3 名の糞便を用いた。糞便を重量の 9 倍容量の嫌気輸送培地に懸濁し (10% wt/vol)，これに *B. breve* ATCC 15700^T，*C. perfringens* JCM 1290^T，*L. fructivorans* JCM 1117^T，および *P. aeruginosa* IFO 12689^T の純培養菌液を段階希釈したものを、終濃度が $10^{2.0} \sim 10^{9.0}$ 個/g 糞便になるようにそれぞれ添加した。本糞便懸濁液か

ら抽出された総 RNA を鋳型として、添加された菌種に特異的なプライマー：BiBRE-1/BiBRE-2 [39] , s-Clper-F/CIPER-R , s-Lfru-F/s-Lfru-R , および PSD7F/PSD7R により RT-qPCR 解析を行い、懸濁液中の菌数を測定した。また、糞便に添加された各菌液の菌数濃度は DAPI カウント法により測定した。

統計処理

統計ソフト SPSS 14.0J を用いた。2 法による測定結果の相関の解析には単回帰分析を用い、ピアソンの積率相関係数を求めた。2 法による測定結果の差の検定には対応のある *t* 検定を用いた。いずれの検定においても、 $P < 0.05$ を有意とした。

結果

RT-qPCR 法による検出下限値の測定

本試験で新たに作製したプライマーおよび既報から引用したプライマーの検出下限値を検討した。各プライマーの標準曲線作製用菌株の純培養菌体から RNA を抽出し、その 10 倍段階希釈 RNA (反応あたり 10^{-3} 個から 10^5 個相当) を鋳型として、Table 2-2 に示すプライマーを用いた RT-qPCR 法による検出感度を解析した (データ未掲載)。その結果、s-Clper-F/CIPER-R, sg-Lgas-F/sg-Lgas-R, sg-Lpla-F/sg-Lpla-R , sg-Lreu-F/sg-Lreu-R , sg-Lrum-F/sg-Lrum-R , sg-Lsak-F/sg-Lsak-R, s-Lbre-F/s-Lbre-R, および s-Lfru-F/s-Lfru-R では RNA 鋳型量が反応あたり 10^{-3} 個から 10^5 個の範囲で、sg-Lcas-F/sg-Lcas-R , g-Encoc-F/g-Encoc-R, および g-Staph-F/g-Staph-R では 10^{-2} 個から 10^5 個の範囲で、LFer-1/LFer-2 では 10^{-1} 個から 10^5 個の範囲で、それぞれの C_T 値に対する近似曲線に直線性が認められた ($R^2 > 0.99$)。また、腸内優勢 6 菌群の特異的プライマーについても同様に解析を行い、その範囲は 10^{-3} 個から 10^5 個であることを確認した。なお、これらプライマーを用いて糞便を解析する場合の検出下限値は糞便 1 g あたり 10^2 個から 10^4 個になると予測された。

プライマーの特異性評価

本試験で新たに作製したプライマーおよび既報から引用した LFer-1/LFer-2 の特異性を検討した。Table 2-1 に示した 56 菌株から抽出された総 RNA のうち 10^5 個相当を鋳型として、*Lactobacillus* のサブグループあるいは菌種標的プライマーを用いた RT-qPCR を行った (Table 2-1)。その結果、いずれのプライマーでも標的菌種のみが特異的に検出されることが確認された。sg-Lgas-F/sg-Lgas-R, sg-Lreu-F/sg-Lreu-R, および sg-Lrum-F/sg-Lrum-R において、一部の非標的菌種と交叉反応する現象が認められたが、その反応性は標的菌種と比べて 1/10,000 から 1/1,000 であり、本プライマーを糞便試料の解析に応用する上で問題とならないレベルであった。また、上記の他に新たに改良または作製したその他のプライマーセット s-Clper-F/CIPER-R, g-Encoc-F/g-Encoc-R, および g-Staph-F/g-Staph-R についても、その特異性が確認された (データ未掲載)。

RT-qPCR 法による糞便添加細菌の定量

B. breve, *C. perfringens*, *L. fructivorans*, あるいは *P. aeruginosa* の純培養菌液の段階希釈液を、予め RT-qPCR 解析によりそれらが陰性であった糞便 ($n = 3$) に、終濃度が $10^2 \sim 10^9$ 個/g になるように添加した。これを RT-qPCR 法により解析した結果、*B. breve*, *C. perfringens*, *L. fructivorans*, および *P. aeruginosa* がそれぞれ $10^{2.7}$, $10^{2.4}$, $10^{2.8}$, および $10^{2.6}$ 個/g 糞便の濃度から検出された。糞便添加菌数と RT-qPCR 菌数とを比較したところ、添加菌数が $10^2 \sim 10^9$ 個/g 糞便の範囲で両者の間により相関が認められた ($R^2 > 0.99$)。本結果から、rRNA 分子を標的とした RT-qPCR 法により、ヒト糞便に添加された細菌を $10^2 \sim 10^3$ 個/g 糞便の感度で定量できることが認められた。

RT-qPCR 法, qPCR 法, および培養法によるヒト糞便細菌叢の解析

RT-qPCR 法により健常成人 40 名 (男性 24 名, 女性 16 名; 年齢 20 ~ 65 歳 [平均 41 ± 13 歳]) の糞便を解析した (Table 2-3)。その結果、本手法は標的とする細菌を $10^2 \sim 10^4$ 個/g 糞便の検出感度で定量できることが確認された。さらに、この測定結果を従来法と比較したところ、*C. coccoides* group, *C. leptum*

subgroup, *B. fragilis* group, *Bifidobacterium*, および *Atopobium* cluster に関して、RT-qPCR 法による測定菌数および検出率は qPCR 法による結果と同等であった。一方、*Prevotella*, *Lactobacillus*, および *Enterococcus* については、RT-qPCR 法による測定菌数の平均値が qPCR 法による結果よりも低値を示したが、これは RT-qPCR 法が qPCR 法の検出限界以下のレベル ($10^3 \sim 10^6$ 個/g 糞便) で生息する菌を高感度に検出したためであった。RT-qPCR 法による検出率は、*Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus*, および *Staphylococcus* において培養法による結果と同等であり、また *C. perfringens* および *Enterococcus* においては培養法よりも高い結果であった。一方、qPCR 法による *C. perfringens*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, および *Pseudomonas* の検出率は、RT-qPCR 法あるいは培養法による結果よりも極端に低かった。

Lactobacillus のサブグループ別解析

健康成人 40 名の糞便サンプルについて、RT-qPCR 法により *Lactobacillus* をサブグループ別に測定した (Table 2-4)。6 サブグループおよび 3 菌種の結果の総和を求めたところ、*Lactobacillus* が全体の 98% から検出され、 $10^{6.3 \pm 1.5}$ 個/g 糞便の菌数レベルで存在することが明らかとなった。また、ヒト一人当たり平均で 4.6 種類のサブグループが検出された。サブグループ別では *L. reuteri* subgroup, *L. plantarum* subgroup, *L. ruminis* subgroup, および *L. gasseri* subgroup が菌数レベルおよび検出率ともに高く、代表的なサブグループとして検出された。また、*L. brevis* および *L. fructivorans* は検出率がそれぞれ 13% および 5% と低かった。

RT-qPCR 法, qPCR 法, および培養法によるヒト糞便中細菌の測定結果の比較

C. coccoides group, *C. leptum* subgroup, *Bifidobacterium*, および *Atopobium* cluster について、RT-qPCR 法および qPCR 法による菌数を比較した結果、両者の間に相関が認められた ($P < 0.01$) (Fig. 2-2)。また、RT-qPCR 法および培養法による *Bifidobacterium*, *C. perfringens*, *Enterobacteriaceae*, および *Lactobacillus* の測定菌数の比較においても、両者の間に相関が認められた ($P < 0.01$) (Fig. 2-3)。

RT-qPCR 法および FISH 法によるヒト糞便中細菌の測定結果の比較

RT-qPCR 法により健常成人 4 名（男性 3 名，女性 1 名）の糞便を解析し，最優勢 6 菌群の測定菌数を FISH 法による結果と比較した (Table 2-5)。その結果，RT-qPCR 法および FISH 法による結果は，全体的に測定法間で同じレベルであったが，一部 *Bifidobacterium* において FISH 法が RT-qPCR 法よりも低い菌数を示した ($P < 0.05$, paired *t* test)。

考察

rRNA 分子を標的とした RT-qPCR 法によるヒト腸内細菌叢の高精度な解析システムを構築した。20 種類の菌群・菌属・サブグループ・菌種特異的プライマーを用いた RT-qPCR 法は，糞便中の標的細菌を $10^2 \sim 10^4$ 個/g 糞便という高い感度で正確に定量することができた (Table 2-3)。共に rRNA 分子を標的とする RT-qPCR 法および FISH 法について，各手法により糞便中の最優勢菌群を測定した結果を比較したところ，両者は概ね一致していたが，一部の菌群 (*Bifidobacterium*) で RT-qPCR 法による菌数が FISH 法による結果よりも高く検出された (Table 2-5)。本結果のみでその理由を考察するのは難しいが，可能性のひとつとして，測定法間の感度の違いが関与していることが考えられる。すなわち，細胞内の rRNA 分子量が少ない菌体が存在した場合，FISH 法ではその菌体を検出することができないが，RT-qPCR 法では rRNA 量が少量でもそれを増幅して検出できる。また，RT-qPCR 法により糞便中の最優勢菌群およびサブドミナントな菌群を測定した結果は，qPCR 法ならびに培養法による結果とよく相関していた (Fig. 2-2 および 2-3)。ただし，菌数レベルが低い検体において，RT-qPCR 法による菌数が他の測定法よりも高い値を示す現象が多く認められた。qPCR 法との結果の乖離に関しては，測定法間の感度の違いが反映されたものと推察される。すなわち，細菌の菌数レベルが 10^6 個/g 糞便程度の時，qPCR 法で検出する標的分子は数コピーであり，RT-qPCR 法のそれよりも 1,000 倍以上少ないため，測定法間で検出効率に差異が生じた可能性が考えられる。また，培養法と結果が乖離した原因については，その可能性のひとつとして，当該検体

には培養の選択圧を受けやすい細菌が多く含まれておりそれらの CFU 数が低く検出されたことが推察される。従来の分子生物学的手法では、検出限界の理由から解析対象が優勢菌群に限られていたが、今回構築した方法では腸内での生息レベルが異なる多種多様な菌種を網羅的に解析することが可能となった。RT-qPCR 法は高い検出感度と精度に加えて高い迅速性も有しており、腸内細菌叢と宿主との関係をより詳細に調べるための有効な手法になると期待される。

Lactobacillus について、PCR 法によりそれを菌種レベルで検出した報告は多く為されているが [34, 72, 77-79] , ヒト腸内に生息する本属菌種を網羅的に定量した例は限られている [80] 。現在、*Lactobacillus* は 100 種以上の膨大な数の菌種で構成されており、それらは系統的に多岐に渡ることから、本属細菌の分類は未だ不十分な点が多い [81, 82] 。加えて、*Lactobacillus* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子配列は *Streptococcus* 属、*Lactococcus* 属、および *Enterococcus* 属細菌のものと類似性が高い。これら背景より、16S rRNA 遺伝子上では *Lactobacillus* 属細菌を共通して検出し得るプライマー標的部位を同定することができなかった。そこで、16S rRNA 遺伝子配列より作製した系統樹をもとに、本属細菌を 13 のサブグループにグループ化し、そのうち既報でヒト腸管から検出されている菌種が含まれる 9 つのサブグループについて、サブグループあるいは菌種特異的プライマーを構築した (Table 2-1 および 2-2)。これら 9 種類のプライマーセットを用いた RT-qPCR 解析において、健常成人の 98% から *Lactobacillus* が検出され、この検出率は培養法による結果 (90%) よりも高かった (Table 2-3)。これまでの報告で、ヒト腸内における *Lactobacillus* の主要菌種として *L. gasseri*, *L. salivarius*, *L. ruminis*, *L. casei/paracasei*, および *L. rhamnosus* が報告されている [83-85] 。本試験では *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. ruminis*, *L. gasseri*, および *L. casei* subgroups が優勢サブグループとして検出され (Table 2-4), 本結果は既報のものと一致していた。以上の結果から、本試験で構築した *Lactobacillus* のプライマーセットによりヒト腸管内の *Lactobacillus* 菌種を網羅できると考えられた。一方、多様な *Lactobacillus* 菌種 (*L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, など) が発酵食品に含まれていたり、プロバイオティクスとして利用されてい

る [86, 87]。したがって、本試験で認められた *Lactobacillus* のサブグループ構成が内在性の細菌によるものか、あるいは食品中の細菌による一過性のものであるかを知るには、今後解析事例を蓄積した上で考察する必要がある。

糞便中の *C. perfringens* を解析したところ、複数の検体で RT-qPCR 法による菌数が培養法による結果よりも高く検出された (Table 2-3, Fig. 2-3B)。本乖離現象には培養法による本菌の検出に CW 寒天培地を用いたことが関与していると考えられる。すなわち、培養法では本培地上でレシチナーゼ C (α トキシン) 活性が陽性を示したコロニーのみが *C. perfringens* として同定されるのに対して、RT-qPCR 法ではその活性の有無に関わらずすべての *C. perfringens* が検出されるため測定法間での差異が生じた可能性がある。*C. perfringens* は食中毒菌であり、下痢および激しい腹痛といった症状を引き起こす [88, 89]。腸管内に生息する *C. perfringens* 含む日和見感染症起因菌を同定するには、毒素産生や侵入因子、薬剤耐性といった病原因子を調べる必要がある。したがって、RT-qPCR 法により菌数を測定した次の段階として、細菌の機能評価系の構築が重要になると考えられる。そのひとつの手段として菌数測定用に抽出された総 RNA を用いた機能遺伝子の発現解析が挙げられる。それにより得られる毒素遺伝子の発現に関する情報を菌数情報と組み合わせることにより、腸管内での本菌の生態をより正確に理解することが可能になると考えられる。

第3章

定量的 RT-PCR 法によるヒト糞便中の *Enterococcus*, *Streptococcus*, および *Lactococcus* の検出

序論

Enterococcus, *Streptococcus*, および *Lactococcus* は、通性嫌気性、カタラーゼ陰性のグラム陽性球菌であり、*Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *E. faecalis* といった菌種は発酵食品に広く用いられている [90-92]。また、*Enterococcus* および *Streptococcus* は、ヒト腸内のサブドミナントな構成菌としてヒト糞便からの検出が数多く報告されている [93, 94]。その一方で、*Enterococcus* および *Streptococcus* にはさまざまな感染症原因菌が含まれている [93, 95]。*Enterococcus* は軽度な感染症を引き起こす菌としてこれまで認識されていたが、近年になって本菌により引き起こされる尿路感染症や血液感染などが医療分野において重要な問題となっている [96, 97]。*Enterococcus* は種々の抗生物質に対して自然耐性であるだけでなく、獲得耐性により高度薬剤耐性となることが知られており、その中でバンコマイシン耐性腸球菌 (vancomycin resistant *Enterococcus*, VRE) の増加は世界的な問題となっている [98, 99]。また、*Streptococcus* による感染症は *Enterococcus* によるものに比べて頻度は低いものの、虫歯や咽頭炎といったものから敗血症や壊死性筋膜炎などの重篤なものまで幅広い症状の病気を引き起こすことが知られている [100]。

これまで糞便中の *Enterococcus*, *Streptococcus*, および *Lactococcus* の菌数測定には主に分離培養法が用いられてきた [101-103]。培養法における分離株の煩雑な同定作業を簡略化するためさまざまな検査キットが開発されているが、それらの解析効率は依然として低く、生理生化学性状による同定は精度が十分でないことが指摘されている [104-106]。また、腸内細菌の検出に近年広く用いられている qPCR 法 [39, 40, 80, 107-109] についても、腸管内での菌数レベルが低いといわれる本菌を検出することは困難であり、解析例は非常に限られてい

る。

前章までの研究において、rRNA 分子を標的とした RT-qPCR 法によるヒト腸内細菌叢解析システムを構築し、これにより腸内での生息レベルが異なる多種多様な菌種を高い感度で網羅的に定量することが可能となった。そこで本章の研究では、ヒト腸内に低い菌数レベルで存在する *Enterococcus*, *Streptococcus*, および *Lactococcus* に着目し、これらについて RT-qPCR 法による菌属・サブグループ・菌種別測定系を構築するとともに、構築した方法を用いてヒト糞便におけるそれらの分布を詳細に解析することを試みた。

材料および方法

使用菌株

Table 3-1 に示した菌株を用いた。*Enterococcus* 属菌株については、MRS ブロスにより 37°C、嫌気条件下で静置培養した。ただし、*Enterococcus caccae* DSM 19114^Tのみ、BHI ブロスにより 37°C、嫌気条件下で静置培養した。*Streptococcus* 属菌株のうち *Streptococcus bovis* JCM 5802^T, *Streptococcus mutans* IFO 13955^T, *Streptococcus salivarius* subsp. *salivarius* JCM 5707^T, ATCC 9759, ATCC 13419, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ATCC 19258^T, *Streptococcus sanguinis* JCM 5708^T, *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478^T, および *Streptococcus intermedius* JCM 12996^Tについては、MRS ブロスにより 37°C、嫌気条件下で静置培養し、それら以外の菌株については BHI ブロスにより 37°C、好気条件下で静置培養した。*Lactococcus garvieae* NCFB 2155^T, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435^T, ATCC 11454, ATCC 13675, NCDO 712, NCDO 509, *Lactococcus plantarum* ATCC 43199^T, および *Lactococcus raffinolactis* ATCC 43920^Tについては、MRS ブロスにより 30°C、嫌気条件下で静置培養した。*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ATCC 19257^Tについては、MRS ブロスにより 26°C、嫌気条件下で静置培養した。*Lactococcus lactis* subsp. *hordniae* ATCC 29071^T および *Lactococcus piscium* DSM 6634^Tについては、BHI ブロスによりそれぞれ 30°C および 20°C で好気培養した。一連の嫌気培養操作は嫌気チャンバー内で実施した。菌液中の総菌数の測定に

については、第1章記載の方法に従い DAPI 染色法により行なった。

rRNA 標的プライマーの設計

第1章に記載の方法に従って行った。16S または 23S rRNA 遺伝子配列をもとに、*Enterococcus* サブグループ・菌種特異的プライマーを 9 セット：s-Efs-F/s-Efs-R (*E. faecalis* 標的)，s-Ecacc-F/s-Ecacc-R (*E. caccae*)，s-Ececo-F/s-Ececo-R (*E. cecorum*)，sg-Esulf-F/sg-Esulf-R (*E. sulfureus* subgroup)，sg-Ecass-F/sg-Ecass-R (*E. casseliflavus* subgroup)，sg-Eavi-F/sg-Eavi-R (*E. avium* subgroup)，s-Edis-F/s-Edis-R (*E. dispar*)，sg-Efm-F/sg-Efm-R (*E. faecium* subgroup)，s-Efm-F/s-Efm-R (*E. faecium*)，*Lactococcus* サブグループ特異的プライマーを 2 セット：sg-Llclac-F/sg-Llclac-R (*L. lactis* subgroup)，sg-Lcpis-F/sg-Lcpis-R (*L. piscium* subgroup)，および *S. salivarius* 菌種特異的プライマー：s-Ssal-F/s-Ssal-R を新たに設計した (Table 3-2)。

総 RNA 抽出および RT-qPCR

第1章に記載の方法に改変を加えた方法により行なった。培養菌液から抽出する場合、試料 200 μ l にその 2 倍量の RNeasy Lysis Buffer (Qiagen) を加え、ボルテックスにより懸濁した。室温で 5 分間インキュベートした後、チューブを遠心分離 (13,000 \times g, 4°C, 5 分間) した。上清をすべて除去した後、チューブを -80°C で凍結保存した。また、菌体の破碎には FastPrep FP120 に代わり ShakeMaster Auto (バイオメディカルサイエンス) を用い、本装置によりチューブを 5 分間激しく振とうした。

DNA 抽出および qPCR

第1章に記載の方法ならびに松木ら [40] により報告されている方法に従って行った。

RT-qPCR 法による菌数測定

第1章に記載の方法に従って行った。標準曲線の作製には測定対象ごとに以

下の菌株を用いた：*E. faecalis* ATCC 19433^T (*Enterococcus* 属および *E. faecalis* 測定用)，*E. caccae* DSM 19114^T (*E. caccae*)，*E. cecorum* JCM 8724^T (*E. cecorum*)，*E. sulfureus* DSM 6905^T (*E. sulfureus* subgroup)，*E. casseliflavus* JCM 8723^T (*E. casseliflavus* subgroup)，*E. avium* JCM 8722^T (*E. avium* subgroup)，*E. dispar* DSM 6630^T (*E. dispar*)，*E. faecium* ATCC 19434^T (*E. faecium* subgroup および *E. faecium*)，*S. salivarius* subsp. *salivarius* JCM 5707^T (*Streptococcus* 属および *S. salivarius*)，*S. mitis* GIFU 12458^T (*S. pneumoniae* / *S. mitis*)，*S. agalactiae* JCM 5671^T (*S. agalactiae*)，*S. pyogenes* ATCC 12344^T (*S. pyogenes*)，*L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435^T (*L. lactis* subgroup)，および *L. piscium* DSM 6634^T (*L. piscium* subgroup)。また、各プライマーの特異性評価については第 1 章に記載の方法に従った。

糞便への細菌添加試験

細菌添加試験には事前に RT-qPCR 解析により *E. faecalis*，*E. faecium*，*L. lactis* subgroup，*L. piscium* subgroup，および *S. agalactiae* が含まれていないことを確認した糞便を用いた。糞便を重量の 9 倍容量の嫌気輸送培地に懸濁し (10% wt/vol)，これに *E. faecalis* ATCC 19433^T，*E. faecium* ATCC 19434^T，*L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435^T，*L. piscium* DSM 6634^T，および *S. agalactiae* JCM 5671^T の純培養菌液を段階希釈したものを、終濃度が糞便 1 g (糞便懸濁液 10 ml) あたり $10^{3.0}$ 個から $10^{10.0}$ 個になるようにそれぞれ添加した。本糞便懸濁液 200 μ l から抽出された総 RNA および DNA のうち 1/20,000 量をそれぞれ鋳型として、Table 3-2 に示すサブグループ・菌種特異的プライマーにより RT-qPCR および qPCR を行った。また、添加された各菌液の菌数濃度を DAPI カウント法により測定した。

糞便試料

健常成人 24 名 (性別: 男 15 名/女 9 名, 年齢: 20 ~ 65 才, 平均 39 ± 13 才) から提供された糞便を用いた。採便チューブ (SARSTEDT) に添付されたヘラで排泄便の一部を掻き取り、2 ml の RNAlater があらかじめ分注された採便チューブにこれを採取し、4°C にて保存した。

糞便一次処理

採取した糞便について、以下の手順により総 RNA 抽出用サンプルを作製した。チューブ内の糞便重量を測定した後、*RNAlater* をさらに加えて均一に懸濁し、10% (wt/vol) の糞便希釈液を作製した。糞便懸濁液 200 μ l をチューブに取り分け、これに 1 ml の D-PBS を加えてボルテックスにより混和した。このチューブを遠心分離 (13,000 \times g, 4°C, 5 分間) し、上清をすべて除去した後、チューブを -80°C で凍結保存した。

RT-PCR 増幅産物のシーケンス解析

糞便 RNA を鋳型として RT-qPCR を行った後の反応液 20 μ l を Montage PCR[®] Centrifugal Filter Devices (Millipore) を用いて精製した。それらを鋳型 (10 ng) として、先の RT-qPCR に使用したプライマーおよび Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Life Technologies) を用いて PCR を行った (総量 20 μ l)。PCR 反応後液について、エタノール沈殿したものを 15 μ l のホルムアミドに溶解し、これを ABI PRISM 3130 (Life Technologies) に供した。得られた塩基配列の相同性検索には、解読配列が 16S rRNA 遺伝子の場合は RDP-II の Sequence match program を、同じく 23S rRNA 遺伝子の場合は日本 DNA データバンク (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/>) の BLAST program を用いた。検索の結果、各増幅産物の配列に対して最上位の相同性 (99%以上) を示したものを、RT-qPCR により増幅された菌種として推定した。

統計処理

統計ソフト SPSS 14.0J を用いた。2 法による測定結果の相関の解析には単回帰分析を用い、ピアソンの積率相関係数を求めた。P < 0.05 を有意とした。

結果

RT-qPCR 法による検出下限値の測定

本試験で新たに作製したプライマー12セット (*Enterococcus* サブグループ・菌

種標的プライマー9セット、*S. salivarius* 標的プライマーセット、および *Lactococcus* のサブグループ標的プライマー2セット) を含む Table 3-2 に記載のプライマー16セット (g-Encoc-F/g-Encoc-R を除く) について、それらを用いた RT-qPCR 法による検出下限値を検討した。プライマー毎に標準曲線作製用菌株の純培養菌体から抽出された RNA の 10 倍段階希釈液 (反応あたり 10^{-3} 個から 10^5 個相当) を鋳型として RT-qPCR を行った。その結果、*E. faecalis*, *E. caccae*, *E. casseliflavus* subgroup, *E. avium* subgroup, および *E. dispar* 標的プライマー (それぞれ s-Efs-F/s-Efs-R, s-Ecacc-F/s-Ecacc-R, sg-Ecass-F/sg-Ecass-R, sg-Eavi-F/sg-Eavi-R, および s-Edis-F/s-Edis-R) では鋳型 RNA 量が反応あたり 10^{-3} 個から 10^5 個の範囲で、残る 11 セットのプライマーでは同 10^{-2} 個から 10^5 個の範囲で C_T 値に対する近似曲線に直線性が認められた ($R^2 > 0.99$)。なお、これらプライマーを用いて糞便を解析する場合の検出下限値は、糞便 1 g あたり 10^3 個から 10^4 個になると予測された。

プライマーの特異性評価

Table 3-2 に記載のプライマー17セットの特異性を検討した。Table 3-1 に示した 75 菌株から抽出された総 RNA のうち菌数で 10^5 個相当を鋳型として、各プライマーを用いた RT-qPCR を行った (Table 3-1)。その結果、いずれのプライマーでも標的菌種のみが特異的に検出されることが確認された。sg-Ecass-F/R, sg-Eavi-F/R, s-Edis-F/R, g-Str-F/R, および s-Spn-F/R において、一部の非標的菌種と交叉反応する現象が認められたが、その反応性は標的菌種と比べて 1/10,000 以下であり、本プライマーを糞便試料の解析に応用する上で問題とならないレベルであった。また、前章で作製した *Enterococcus* 属特異的プライマーおよび既報の *Streptococcus* 属・菌種特異的プライマー [110] についても、その特異性が再確認された。

糞便添加細菌の定量

E. faecalis, *E. faecium*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. piscium*, あるいは *S. agalactiae* の純培養菌液の段階希釈液を、予め RT-qPCR 解析によりそれらが陰性であった

糞便 ($n = 1$) に終濃度が $10^3 \sim 10^{10}$ 個/g になるように添加し、これを RT-qPCR 法および qPCR 法により解析した (Fig. 3-1)。同時に、コントロールとして、糞便の代わりに培地に細菌を添加したサンプルを解析した。RT-qPCR 法による結果 (C_T 値) を糞便添加菌数と比較したところ、添加菌数が $10^3 \sim 10^{10}$ 個/g 糞便の範囲で両者の間に相関が認められた ($R^2 > 0.99$)。また、本結果はコントロールの結果とよく一致しており、RT-qPCR 法により糞便に添加された細菌を正確に定量できていることが認められた。さらに、RT-qPCR 法による近似曲線を qPCR 法によるそれと比較したところ、曲線傾きに大きな差は確認されず、PCR 増幅効率も両手法間で同等であると考えられた。一方で、Y 軸切片の値では RT-qPCR が qPCR よりも低く、RT-qPCR 法が qPCR 法よりも 100 倍以上、最も大きいものでは 10,000 倍近く高感度であることが認められた。

ヒト糞便中の *Enterococcus*, *Streptococcus*, および *Lactococcus* の測定

Enterococcus 属, *Streptococcus* 属, および *Lactococcus* サブグループ特異的プライマー (それぞれ g-Encoc-F/g-Encoc-R, g-Str-F/g-Str-R, sg-Lclac-F/sg-Lclac-R, sg-Lcpis-F/sg-Lcpis-R) を用いた RT-qPCR 法により健常成人 24 名の糞便を解析した (Table 3-3)。その結果、*Enterococcus* 属および *Streptococcus* 属は全被験者から検出され、それらの平均菌数はそれぞれ $10^{6.2 \pm 1.4}$ 個/g 糞便および $10^{7.5 \pm 0.9}$ 個/g 糞便であった。また、*Lactococcus* については、2つのサブグループの総和として 24 名中 8 名から $10^{4.6 \pm 1.2}$ 個/g 糞便のレベルで検出された。

次に、RT-qPCR 法による検出精度を確かめるため、各プライマーによる RT-qPCR 増幅産物の塩基配列を調べた。g-Encoc-F/g-Encoc-R による増幅産物について相同性検索を行った結果、24 検体から増幅された各クローンのすべてが *Enterococcus* 属菌種として推定された。その内訳は、9 クロオンが *E. avium* (GenBank accession no. AF133535), 6 クロオンが *E. gilvus* (DQ411810), *E. raffinosus* (Y18296), *E. malodoratus* (AJ301835) のいずれか、6 クロオンが *E. faecium* (AJ301830), *E. durans* (AJ276354) のいずれか、3 クロオンが *E. faecalis* (AB012212) であった。また、g-Str-F/g-Str-R, sg-Lclac-F/sg-Lclac-R, および sg-Lcpis-F/sg-Lcpis-R による増幅産物についても推定された菌種はいずれ

も各プライマーの標的菌種と一致していた。g-Str-F/g-Str-R による増幅クローンについては、22 クロオンが *S. salivarius* subsp. *salivarius* (ACLO01000090, region 1 ~ 2878) と *S. salivarius* subsp. *thermophilus* (CP000419, region 20970 ~ 23859) のいずれかに、被験者番号 3 と 5 の 2 クロオンが *S. bovis* (AB168118) に分類された。また、sg-Lclac-F/sg-Lclac-R および sg-Lcpis-F/sg-Lcpis-R による増幅産物からは、*L. lactis* subsp. *lactis* (AB100803), *L. lactis* subsp. *cremoris* (AB100802), *L. piscium* (DQ343754), *L. garvieae* (AF061005), および *L. plantarum* (EF694029) が検出された。

Enterococcus のサブグループ・菌種別解析

同じ健常成人 24 名の糞便について、RT-qPCR 法により *Enterococcus* をサブグループ・菌種別に測定した (Table 3-4)。*E. faecium* subgroup に含まれる *E. faecium* を除いた 4 サブグループおよび 4 菌種の菌数総和は $10^{5.9 \pm 1.5}$ 個/g 糞便であり、*Enterococcus* 属特異的プライマー (g-Encoc-F/g-Encoc-R) による結果 ($10^{6.2 \pm 1.4}$ 個/g 糞便) と一致していた。サブグループ・菌種別では *E. avium* subgroup, *E. faecium* subgroup, *E. faecalis*, および *E. casseliflavus* subgroup の検出率が高かった (それぞれ 79, 46, 46, 33%)。また、本結果は先に行った g-Encoc-F/g-Encoc-R による RT-qPCR 増幅産物のシーケンス解析結果とよく一致していた。これらに対して *E. caccae* の検出頻度は 4% と低く、*E. dispar*, *E. sulfureus* subgroup, および *E. cecorum* においては全被験者で非検出であった。また、*E. faecium* の菌数は *E. faecium* subgroup の菌数とほぼ一致したが、1 名の被験者 (被験者番号 12) で両者の結果に乖離が見られた。前述の RT-PCR 増幅産物のシーケンス解析において、当該サンプルの PCR クロオンは *E. faecium* または *E. durans* として同定されていることから、当該被験者における *E. faecium* subgroup の最優勢菌種は *E. durans* であったと考えられた。

Streptococcus の菌種別解析

前の実験と同様に糞便中の *Streptococcus* を菌種別に測定した (Table 3-5)。*Streptococcus* 4 菌種の結果の総和は $10^{7.4 \pm 0.8}$ 個/g 糞便であり、菌属特異的プラ

イマー (g-Str-F/g-Str-R) による結果 ($10^{7.5 \pm 0.9}$ 個/g 糞便) と一致していた。菌種別では *S. salivarius* subsp. *salivarius* / *thermophilus* が全被験者から $10^{7.4 \pm 0.8}$ 個/g 糞便のレベルで検出された。*S. pneumoniae* / *S. mitis* も全被験者から検出されたが、菌数レベルは前のそれよりも低かった ($10^{5.7 \pm 0.8}$ 個/g 糞便)。これらに対して、*S. agalactiae* および *S. pyogenes* については、検出率がそれぞれ 29% と 0% と低かった。また、s-Ssal-F/s-Ssal-R プライマーにより検出された 24 検体の RT-qPCR 増幅産物の塩基配列を調べたところ、すべてのクローンが *S. salivarius* subsp. *salivarius* に分類された (データ未掲載)。

考察

16S または 23S rRNA 分子を標的とした RT-qPCR 法による *Enterococcus*, *Streptococcus*, および *Lactococcus* の高感度定量法を新規に構築した。本手法により糞便中の標的菌を 10^3 個から 10^4 個/g 糞便の感度で正確に定量することができ、それは従来の PCR 法よりもおよそ 100 倍から 1000 倍高かった (Fig. 3-1)。本研究で標的とした *Enterococcus*, *Streptococcus*, および *Lactococcus* のヒト糞便における菌数レベルは糞便 1 g あたり 10^3 個から 10^8 個であり (Table 3-3), このような低い菌数レベルで存在する細菌を解析する上で RT-qPCR 法は非常に有用な手法であると考えられた。

これまでの培養法による解析において、ヒト腸内に存在する *Enterococcus* の主要菌種は *E. faecalis* および *E. faecium* であること、また頻度は低いながら *E. durans*, *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* などの菌種が分離されることが報告されている [94, 95, 111-113]。これに対して、*Enterococcus* のサブグループ・菌種プライマーを用いた RT-qPCR 解析では、糞便から *E. avium* subgroup (*E. avium*, *E. raffinosus*, *E. malodoratus*, *E. gilvus*, および *E. pseudoavium* を含む) が高頻度に検出された (Table 3-4)。*E. faecalis* および *E. faecium* については、感染症や癌との関連 [95, 114-117] や抗生物質耐性菌の出現 [99, 118] など、ヒトの疾病と深く関わることを示されているが、*E. avium* subgroup については、疾病との関連性は低いと考えられている [95]。したがって、*E. avium* subgroup が高頻度に検

出された今回の結果は、本サブグループが腸管内の共生菌である可能性を示唆するものと考えられる。一方で、バンコマイシン耐性 *Enterococcus* [118-120] として問題とされている *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. flavescens* を含む *E. casseliflavus* subgroup が 4 番目に高い頻度で検出されており、本サブグループを調べることは臨床上重要であると考えられる。今回、*Enterococcus* の菌種構成が個人間で異なることが示されたことから、その構成と大腸癌、炎症性腸疾患などの宿主消化管症状との関連性の解明が今後取り組むべき課題になると考えられる。

Streptococcus について、これまで複数の菌種が腸管から分離されたとの報告 [93, 121] がある一方、それらを網羅的に解析した報告例はない。*Streptococcus* の菌属・菌種特異的プライマーを用いた RT-qPCR 解析およびその増幅産物のシーケンス解析の結果、本菌属が健常成人の糞便から 1 g あたり 10^6 個から 10^9 個の菌数レベルで検出され、その主要な構成菌種は *S. salivarius* subsp. *salivarius* であった (Table 3-5)。本菌種は主に口腔から検出されることが報告されているが [121, 122] , 今回新たに本菌種がヒト腸管内に存在していることが認められ、その高い菌数レベルと検出率からヒト腸管内の常在菌である可能性が示唆された。本菌種に加えて *S. pneumoniae* / *S. mitis* も菌数レベルは糞便 1 g あたり 10^5 個程度と低いものの全被験者から検出された。s-Spn-F/s-Spn-R により増幅される遺伝子断片 (0.36 kb) の塩基配列は *S. pneumoniae* および *S. mitis* の間で完全に一致しており、その情報からは RT-qPCR 法により検出された菌種を決定することができない。しかしながら、*S. pneumoniae* は市中肺炎の原因菌であり [100, 123] , 腸管内への定着は報告例がないのに対して、*S. mitis* は口腔細菌叢の主要な構成菌でありヒト腸管からも検出されること [121, 123] を考え合わせると、今回検出された菌種は *S. mitis* である可能性が高いと考えられた。また、新生児敗血症の主要な原因菌である *S. agalactiae* [124] が 29%の被験者から検出されたが、これは既報の結果 [125-127] と一致するものであった。*S. pyogenes* は咽頭炎などの軽微な感染症から敗血症や壊死性筋膜炎などの重篤な症状を引き起こすことが知られているが、今回解析した健常成人からは検出されなかった。一方、RT-qPCR 増幅産物のシーケンス解析において *S. bovis* が 2 検体から検出されたが、

本菌種は今回作製した菌種プライマーの標的には含まれておらず、今後当該菌種を標的としたプライマーの追加作製が必要と考えられた。

Lactococcus は環境や食品（肉，乳製品）などに遍在しているが，ヒト腸管からの検出に関する報告はほとんどなされていない [128]。本試験において，*Lactococcus* が健常成人の約3割から検出されることが新たに示され (Table 3-3)，本菌の腸管内における分布がより明確になった。今回検出された *Lactococcus* 属細菌のうち *L. lactis* subsp. *lactis* と *L. lactis* subsp. *cremoris* は乳製品の製造に広く利用されており [129, 130]，宿主に対する有益作用を示すことが報告されている [131, 132]。また，*L. garvieae* は魚に感染するため，水産養殖において注意すべき菌である [133]。一方で，本試験で認められた *Lactococcus* 属細菌の菌種構成が内在性の細菌によるものか，あるいは環境や食品中の細菌による一過性のものであるかを知るには，今後解析事例を蓄積した上で考察する必要がある。

総 括

ヒト腸内細菌を高感度かつ網羅的に定量できる手法を開発することを目的として、rRNA 分子を標的とした RT-qPCR 法による腸内細菌叢解析システムの構築を行った。最初に実施した研究では、RT-qPCR 法を菌数測定に応用するため、本法の検出感度および測定精度を中心に解析を行った（第 1 章）。RT-qPCR 法の検出感度は従来の qPCR 法に比べて 100 倍から 1,000 倍高いこと、また RT-qPCR 法による菌数は CFU 数とよく相関することを示し、本法により高感度かつ高精度に菌数を測定できることを明らかとした。これより以前に rRNA 分子を菌数定量のマーカーとして使用した報告はなく、本研究がその初めての報告となる。本結果を受けて、次に RT-qPCR 法によるヒト腸内細菌叢解析システムの構築を行った（第 2 章）。腸内の優勢菌群からサブドミナントな菌群までを網羅するため、既報のものを含む 20 種類の菌群・菌属・菌種特異的プライマーセットを製作した。本プライマーセットを用いた RT-qPCR 法により、腸内での生息レベルが異なる多種多様な菌種を糞便 1 g あたり 10^2 個から 10^4 個という高い感度で網羅的に定量することが可能となった。さらに、*Enterococcus*, *Streptococcus*, および *Lactococcus* に着目し、RT-qPCR 法による本菌のサブグループ・菌種別測定系を構築し、これを用いた解析により健常成人腸管内の当該菌属の菌数レベルおよび構成を明らかにした（第 3 章）。

Table S1 には RT-qPCR 法を含む各種腸内細菌叢解析法の特徴をまとめた。今回新たに構築した RT-qPCR 法の最大の特長は、その検出感度の高さが挙げられる。その検出下限値は最も低い場合で糞便 1 g あたり 10^2 個であり、他の分子生物学的手法と比較してその感度の高さは突出している。したがって、特に腸内に低い菌数レベルで存在する菌群を正確に定量するには RT-qPCR 法が最も有効であろう。また、RT-qPCR 法による解析操作は、RNA 抽出と PCR のみと非常に簡便であり、リアルタイム PCR 装置があれば簡単に実施することも利点としてあげられる。RT-qPCR 法、qPCR 法、ランダムシーケンス法、フィンガープリ

ント法などの核酸抽出および PCR の作業を含む手法では、核酸抽出の効率および精度、ならびに PCR プライマーの特異性といった因子がデータ精度に大きく影響する。このうち核酸抽出について、RT-qPCR 法では菌体を物理的に破砕することで幅広い細菌種に対して十分な核酸抽出効率を得ることができており、糞便に添加されたグラム陽性菌および陰性菌がいずれも正確に測定されることを確認している (Fig. 2-1 および Fig. 3-1)。また、PCR の工程について、共通プライマーは *Bifidobacterium* の増幅効率が低いことが報告されているが [134, 135] , RT-qPCR 法では菌属・サブグループ・菌種に特異的なプライマーを用いて逆転写反応および PCR を一連の工程で実施しており、標的菌種間での特異性のばらつきは共通プライマーを用いる実験に比べて非常に小さいものと考えられる。したがって、RT-qPCR 法の解析精度に関しては、他の分子生物学的手法と比べて同等またはそれ以上であると考えられる。

一方で、RT-qPCR 法の問題点としてまず懸念されるのが標的分子の安定性であろう。一般的に RNA は DNA よりも分解を受けやすいため、RT-qPCR 法による解析では検体の保存状態が結果に及ぼす影響がより大きいと考えられる。この問題点について、Life Technologies 社より市販されている RNA 安定化試薬：RNAlater に糞便試料を懸濁しておくことで、室温でも 1 か月間糞便中の rRNA 分子を安定な状態で保存できることを別の試験で確認しており (第 80 回日本細菌学会総会・大阪), RNA の安定性の問題は解決されたと考えている。逆に、rRNA 分子を標的とする方法は、DNA を標的とする方法よりも試料中の菌体の活性が結果に反映されやすいと考えられる。この点については、近年、膜透過性色素と PCR 法を組み合わせた生菌検出法が報告されており [136] , これらとの比較により考察する必要がある。

その他の RT-qPCR 法の欠点としては、qPCR 法や FISH 法と同様に、あらかじめ標的とする細菌の遺伝子配列情報を必要とし、未知の細菌を検出するには適していない点が挙げられる。また、RT-qPCR 法や qPCR 法で菌数を測定するには検量線を作製するための標準菌株が必要なため、菌株が分離されていない難培養菌の集団についてはそれらの菌数を測定することは困難となる。RT-qPCR 法により腸内細菌叢の構成菌を網羅的に解析するには、ランダムシーケンス解

析等で得られた配列情報をもとに系統的に幅広い菌種を網羅できる菌群プライマーを設計する必要がある、この点は今後の課題と考えている。

以上、RT-qPCR 法の特徴を、他の分子生物学的手法と比較しながら概説した。培養法を含めた腸内細菌叢の各種解析法はそれぞれ特徴を備えており、複雑な腸内細菌叢を正しく理解するには研究の目的に応じた手法によって解析する必要がある。

近年の分子生物学的手法の発展、特に DNA シーケンサーの技術革新を契機として腸内細菌叢の研究は新たな時代へと突入しており、次世代型シーケンサーを用いた解析により複雑な腸内細菌叢の全体像が明らかにされてきている [7, 9, 10, 137, 138]。また、細菌叢の構成に加えて細菌叢の構成ゲノム（マイクロバイーム）を網羅的に解析することにより、腸内細菌叢の形成に影響を及ぼす因子 [139] や腸内細菌叢と健康や腸疾患との関連性を考察する知見 [140] が数多く報告されてきている。これらの解析は腸内細菌叢の構造および機能についてさまざまな側面から莫大な情報を得ることができる一方で、解析対象は最優勢菌群に限られており、また大量の検体の解析には適していない。これに対して、RT-qPCR 法は非常に高い感度を有しており、また解析操作がシンプルなため、それらを自動化することが容易である。後者については、RNA 抽出から RT-qPCR 解析までを全自動で行えるシステムを既に構築している（国際微生物学協会連合 2011 札幌大会）。このシステムを用いることにより、糞便 96 検体から RNA を抽出し、それを 20 種類のプライマーで解析する作業を約 5 日間で完了することができる。したがって、RT-qPCR 法はプロバイオティクス飲用による腸内細菌叢への効果を調べる大規模な介入試験や、菌叢構成の変化が非常に大きい乳児期の腸内細菌叢の形成過程を調べる試験において非常に有効であると考えられる。さらに、本手法は、その高い検出感度と迅速性から、食品衛生や臨床検査領域において非常に有効な細菌検出法となり得る。Sakaguchi ら [110] は、癌化学療法施行後に細菌感染症と診断された患児の血中細菌を RT-qPCR 法および培養法により解析し、RT-qPCR 法による細菌検出率は培養法よりも約 4 倍高かったことを報告している。今後、本法を当領域に応用する上

で真菌，酵母を含む病原微生物に対するプライマーの拡充，また病原性に関与する遺伝子の検出システムの構築，さらには解析作業の簡素化といったことが今後の課題となるだろう。

以上より，本研究で構築した rRNA 分子を標的とした RT-qPCR 法は，腸内細菌叢を高感度かつ網羅的に解析する方法として非常に有効であることが示された。本手法により，腸内細菌叢の形成に影響を及ぼす因子や，腸内細菌叢と健康や腸疾患との関連性をより詳細に調べることができると考えられ，これらの研究に飛躍的な進展を生むことが期待される。また，本手法は，その高い検出感度と迅速性から，食品衛生や臨床検査領域において非常に有効な細菌検出法となり得る可能性も示唆されたことから，今後の応用研究も重要な検討課題と考えられる。

引用文献

1. **Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA.** 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**:1635-1638.
2. **Sato T, Matsumoto K, Okumura T, Yokoi W, Naito E, Yoshida Y, Nomoto K, Ito M, Sawada H.** 2008. Isolation of lactate-utilizing butyrate-producing bacteria from human feces and *in vivo* administration of *Anaerostipes caccae* strain L2 and galacto-oligosaccharides in a rat model. *FEMS Microbiol Ecol* **66**:528-536.
3. **Takamine F, Imamura T.** 1995. Isolation and characterization of bile acid 7-dehydroxylating bacteria from human feces. *Microbiol Immunol* **39**:11-18.
4. **Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI.** 2002. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:15451-15455.
5. **Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, Cheng G, Yamasaki S, Saito T, Ohba Y, Taniguchi T, Takeda K, Hori S, Ivanov II, Umesaki Y, Itoh K, Honda K.** 2011. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* **331**:337-341.
6. **Lupp C, Robertson ML, Wickham ME, Sekirov I, Champion OL, Gaynor EC, Finlay BB.** 2007. Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host Microbe* **2**:204.
7. **Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR.** 2007. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:13780-13785.
8. **Wu S, Rhee KJ, Albesiano E, Rabizadeh S, Wu X, Yen HR, Huso DL, Brancati FL, Wick E, McAllister F, Housseau F, Pardoll DM, Sears CL.** 2009. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med* **15**:1016-1022.

9. **Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI.** 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:11070-11075.
10. **Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI.** 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**:1022-1023.
11. **Wen L, Ley RE, Volchkov PY, Stranges PB, Avanesyan L, Stonebraker AC, Hu C, Wong FS, Szot GL, Bluestone JA, Gordon JI, Chervonsky AV.** 2008. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature* **455**:1109-1113.
12. **Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, Bewtra M, Knights D, Walters WA, Knight R, Sinha R, Gilroy E, Gupta K, Baldassano R, Nessel L, Li H, Bushman FD, Lewis JD.** 2011. Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science*.
13. **De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, Collini S, Pieraccini G, Lionetti P.** 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:14691-14696.
14. **Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, Marchesi JR, Falush D, Dinan T, Fitzgerald G, Stanton C, van Sinderen D, O'Connor M, Harnedy N, O'Connor K, Henry C, O'Mahony D, Fitzgerald AP, Shanahan F, Twomey C, Hill C, Ross RP, O'Toole PW.** 2011. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108 Suppl 1**:4586-4591.
15. **Dethlefsen L, Relman DA.** 2011. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108 Suppl 1**:4554-4561.
16. **Kanno T, Matsuki T, Oka M, Utsunomiya H, Inada K, Magari H, Inoue I, Maekita T, Ueda K, Enomoto S, Iguchi M, Yanaoka K, Tamai H, Akimoto S, Nomoto K, Tanaka R, Ichinose M.** 2009. Gastric acid reduction leads to an alteration in lower intestinal microflora. *Biochem Biophys Res Commun* **381**:666-670.
17. **Hungate RE.** 1950. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol*

- Rev **14**:1-49.
18. **Mitsuoka T, Morishita Y, Terada A, Yamamoto S.** 1969. A simple method ("plate-in-bottle method") for the cultivation of fastidious anaerobes. *Jpn J Microbiol* **13**:383-385.
 19. **Arank A, Syed SA, Kenney EB, Freter R.** 1969. Isolation of anaerobic bacteria from human gingiva and mouse cecum by means of a simplified glove box procedure. *Appl Microbiol* **17**:568-576.
 20. **Moore WE, Holdeman LV.** 1974. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Microbiol* **27**:961-979.
 21. **Kurokawa K, Itoh T, Kuwahara T, Oshima K, Toh H, Toyoda A, Takami H, Morita H, Sharma VK, Srivastava TP, Taylor TD, Noguchi H, Mori H, Ogura Y, Ehrlich DS, Itoh K, Takagi T, Sakaki Y, Hayashi T, Hattori M.** 2007. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res* **14**:169-181.
 22. **Woese CR.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**:221-271.
 23. **Franks AH, Harmsen HJ, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F, Welling GW.** 1998. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* **64**:3336-3345.
 24. **Langendijk PS, Schut F, Jansen GJ, Raangs GC, Kamphuis GR, Wilkinson MH, Welling GW.** 1995. Quantitative fluorescence *in situ* hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl Environ Microbiol* **61**:3069-3075.
 25. **Takada T, Matsumoto K, Nomoto K.** 2004. Development of multi-color FISH method for analysis of seven *Bifidobacterium* species in human feces. *J Microbiol Methods* **58**:413-421.
 26. **Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Grijpstra J, Knol J, Degener JE, Welling GW.** 2000. Development of 16S rRNA-based probes for the *Coriobacterium* group and the *Atopobium* cluster and their application for enumeration of *Coriobacteriaceae* in human feces from volunteers of different age groups. *Appl Environ Microbiol* **66**:4523-4527.
 27. **Zoetendal EG, Ben-Amor K, Harmsen HJ, Schut F, Akkermans AD, de Vos**

- WM.** 2002. Quantification of uncultured *Ruminococcus obeum*-like bacteria in human fecal samples by fluorescent *in situ* hybridization and flow cytometry using 16S rRNA-targeted probes. *Appl Environ Microbiol* **68**:4225-4232.
28. **Zoetendal EG, Akkermans AD, De Vos WM.** 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol* **64**:3854-3859.
29. **Wilson KH, Blichington RB.** 1996. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* **62**:2273-2278.
30. **Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y.** 2002. Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiol Immunol* **46**:535-548.
31. **Wang X, Heazlewood SP, Krause DO, Florin TH.** 2003. Molecular characterization of the microbial species that colonize human ileal and colonic mucosa by using 16S rDNA sequence analysis. *J Appl Microbiol* **95**:508-520.
32. **Shendure J, Ji H.** 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* **26**:1135-1145.
33. **Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans AD.** 2002. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol* **68**:219-226.
34. **Walter J, Hertel C, Tannock GW, Lis CM, Munro K, Hammes WP.** 2001. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **67**:2578-2585.
35. **Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ.** 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **63**:4516-4522.
36. **Matsumoto M, Sakamoto M, Hayashi H, Benno Y.** 2005. Novel phylogenetic assignment database for terminal-restriction fragment length polymorphism analysis of human colonic microbiota. *J Microbiol Methods* **61**:305-319.
37. **Sakamoto M, Takeuchi Y, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y.** 2003. Application of terminal RFLP analysis to characterize oral bacterial flora in saliva of healthy

- subjects and patients with periodontitis. *J Med Microbiol* **52**:79-89.
38. **Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, Dore J.** 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* **65**:4799-4807.
 39. **Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Kado Y, Takada T, Matsumoto K, Tanaka R.** 2004. Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**:167-173.
 40. **Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Takada T, Tanaka R.** 2004. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* **70**:7220-7228.
 41. **Penders J, Vink C, Driessen C, London N, Thijs C, Stobberingh EE.** 2005. Quantification of *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. *FEMS Microbiol Lett* **243**:141-147.
 42. **Rinttila T, Kassinen A, Malinen E, Krogius L, Palva A.** 2004. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J Appl Microbiol* **97**:1166-1177.
 43. **Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, Cabrita J, Megraud F.** 1997. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol* **35**:995-998.
 44. **Flekna G, Schneeweiss W, Smulders FJ, Wagner M, Hein I.** 2007. Real-time PCR method with statistical analysis to compare the potential of DNA isolation methods to remove PCR inhibitors from samples for diagnostic PCR. *Mol Cell Probes* **21**:282-287.
 45. **Arfvidsson C, Wahlund KG.** 2003. Time-minimized determination of ribosome and tRNA levels in bacterial cells using flow field-flow fractionation. *Anal Biochem* **313**:76-85.
 46. **Hansen MC, Nielsen AK, Molin S, Hammer K, Kilstrup M.** 2001. Changes in rRNA levels during stress invalidates results from mRNA blotting: fluorescence

- in situ rRNA hybridization permits renormalization for estimation of cellular mRNA levels. *J Bacteriol* **183**:4747-4751.
47. **Cenciarini C, Courtois S, Raoult D, La Scola B.** 2008. Influence of long time storage in mineral water on RNA stability of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* after heat inactivation. *PLoS One* **3**:e3443.
 48. **Asato Y.** 2005. Control of ribosome synthesis during the cell division cycles of *E. coli* and *Synechococcus*. *Curr Issues Mol Biol* **7**:109-117.
 49. **Condon C, Squires C, Squires CL.** 1995. Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **59**:623-645.
 50. **Dennis PP, Ehrenberg M, Bremer H.** 2004. Control of rRNA synthesis in *Escherichia coli*: a systems biology approach. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**:639-668.
 51. **Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG.** 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**:4876-4882.
 52. **Maidak BL, Cole JR, Lilburn TG, Parker CT, Jr., Saxman PR, Farris RJ, Garrity GM, Olsen GJ, Schmidt TM, Tiedje JM.** 2001. The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res* **29**:173-174.
 53. **Stocks SM.** 2004. Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight. *Cytometry* **61A**:189-195.
 54. **Jansen GJ, Wildeboer-Veloo AC, Tonk RH, Franks AH, Welling GW.** 1999. Development and validation of an automated, microscopy-based method for enumeration of groups of intestinal bacteria. *J Microbiol Methods* **37**:215-221.
 55. **Kikuchi E, Miyamoto Y, Narushima S, Itoh K.** 2002. Design of species-specific primers to identify 13 species of *Clostridium* harbored in human intestinal tracts. *Microbiol Immunol* **46**:353-358.
 56. **Auty MA, Gardiner GE, McBrearty SJ, O'Sullivan EO, Mulvihill DM, Collins JK, Fitzgerald GF, Stanton C, Ross RP.** 2001. Direct in situ viability assessment of bacteria in probiotic dairy products using viability staining in conjunction with confocal scanning laser microscopy. *Appl Environ Microbiol* **67**:420-425.
 57. **Gardiner GE, O'Sullivan E, Kelly J, Auty MA, Fitzgerald GF, Collins JK,**

- Ross RP, Stanton C.** 2000. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Appl Environ Microbiol* **66**:2605-2612.
58. **Bleve G, Rizzotti L, Dellaglio F, Torriani S.** 2003. Development of reverse transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable yeasts and molds contaminating yogurts and pasteurized food products. *Appl Environ Microbiol* **69**:4116-4122.
59. **Dreier J, Stormer M, Kleesiek K.** 2004. Two novel real-time reverse transcriptase PCR assays for rapid detection of bacterial contamination in platelet concentrates. *J Clin Microbiol* **42**:4759-4764.
60. **Felek S, Unver A, Stich RW, Rikihisa Y.** 2001. Sensitive detection of *Ehrlichia chaffeensis* in cell culture, blood, and tick specimens by reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* **39**:460-463.
61. **McKillip JL, Drake M.** 2004. Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food. *J Food Prot* **67**:823-832.
62. **McKillip JL, Jaykus LA, Drake M.** 1998. rRNA stability in heat-killed and UV-irradiated enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **64**:4264-4268.
63. **McKillip JL, Jaykus LA, Drake M.** 1999. Nucleic acid persistence in heat-killed *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated skim milk. *J Food Prot* **62**:839-844.
64. **Sheridan GE, Masters CI, Shallcross JA, MacKey BM.** 1998. Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Appl Environ Microbiol* **64**:1313-1318.
65. **Oliver JD.** 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* **43 Spec No**:93-100.
66. **Lleo MM, Bonato B, Signoretto C, Canepari P.** 2003. Vancomycin resistance is maintained in enterococci in the viable but nonculturable state and after division is resumed. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:1154-1156.
67. **Chaveerach P, ter Huurne AA, Lipman LJ, van Knapen F.** 2003. Survival and resuscitation of ten strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* under acid conditions. *Appl Environ Microbiol* **69**:711-714.

68. **Lleo MM, Bonato B, Tafi MC, Signoretto C, Boaretti M, Canepari P.** 2001. Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. *J Appl Microbiol* **91**:1095-1102.
69. **Lopez-Amoros R, Castel S, Comas-Riu J, Vives-Rego J.** 1997. Assessment of *E. coli* and *Salmonella* viability and starvation by confocal laser microscopy and flow cytometry using rhodamine 123, DiBAC4(3), propidium iodide, and CTC. *Cytometry* **29**:298-305.
70. **Kurupati P, Chow C, Kumarasinghe G, Poh CL.** 2004. Rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* from blood culture bottles by real-time PCR. *J Clin Microbiol* **42**:1337-1340.
71. **Matsuki T.** 2007. [Development of quantitative PCR detection method with 16S rRNA gene-targeted genus- and species-specific primers for the analysis of human intestinal microflora and its application]. *Nippon Saikingaku Zasshi* **62**:255-261.
72. **Wall R, Fitzgerald G, Hussey S, Ryan T, Murphy B, Ross P, Stanton C.** 2007. Genomic diversity of cultivable *Lactobacillus* populations residing in the neonatal and adult gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol Ecol* **59**:127-137.
73. **Watanabe K.** September 1998. Primers for *Lactobacillus*. Japan patent application 1998-260041, publication 1999-151097.
74. **Petts DN.** 1984. Colistin-oxolinic acid-blood agar: a new selective medium for streptococci. *J Clin Microbiol* **19**:4-7.
75. **Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA.** 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* **56**:1919-1925.
76. **Sghir A, Gramet G, Suau A, Rochet V, Pochart P, Dore J.** 2000. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol* **66**:2263-2266.
77. **Dubernat S, Desmasures N, Gueguen M.** 2002. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol Lett* **214**:271-275.
78. **Heilig HG, Zoetendal EG, Vaughan EE, Marteau P, Akkermans AD, de Vos**

- WM.** 2002. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol* **68**:114-123.
79. **Song Y, Kato N, Liu C, Matsumiya Y, Kato H, Watanabe K.** 2000. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microbiol Lett* **187**:167-173.
80. **Haarman M, Knol J.** 2006. Quantitative real-time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Appl Environ Microbiol* **72**:2359-2365.
81. **Collins MD, Rodrigues U, Ash C, Aguirre M, Farrow JAE, Martinez-Murcia A, Phillips BA, Williams AM, Wallbanks S.** 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiology Letters* **77**:5-12.
82. **Claesson MJ, van Sinderen D, O'Toole PW.** 2007. The genus *Lactobacillus*-a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiol Lett* **269**:22-28.
83. **Reuter G.** 2001. The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: composition and succession. *Curr Issues Intest Microbiol* **2**:43-53.
84. **Vaughan EE, de Vries MC, Zoetendal EG, Ben-Amor K, Akkermans AD, de Vos WM.** 2002. The intestinal LABs. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**:341-352.
85. **Vaughan EE, Heilig HG, Ben-Amor K, de Vos WM.** 2005. Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS Microbiol Rev* **29**:477-490.
86. **Holzappel WH, Haberer P, Geisen R, Bjorkroth J, Schillinger U.** 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr* **73**:365S-373S.
87. **Reid G, Kim SO, Kohler GA.** 2006. Selecting, testing and understanding probiotic microorganisms. *FEMS Immunol Med Microbiol* **46**:149-157.
88. **Hatheway CL.** 1990. Toxigenic clostridia. *Clin Microbiol Rev* **3**:66-98.

89. **Smedley JG, 3rd, Fisher DJ, Sayeed S, Chakrabarti G, McClane BA.** 2004. The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **152**:183-204.
90. **Casalta E, Montel MC.** 2007. The *Lactococcus* genus. *Int J Food Microbiol.*
91. **Furet JP, Quenee P, Tailliez P.** 2004. Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *Int J Food Microbiol* **97**:197-207.
92. **Ogier JC, Serror P.** 2007. The *Enterococcus* genus. *Int J Food Microbiol.*
93. **Ruoff KL, Whiley RA, D. B.** 1998. *Streptococcus*. p283-296. In P. R. Murray, E. J. Baron, M.A.Pfaller, F.C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. ASM press, Washington, DC.
94. **Gilmore MS, Clewell DB, Courvalin P, Dunny GM, Murray BE, Rice LB.** 2002. The Enterococci ; Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance. ASM press, Washington, DC.
95. **Murray BE.** 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev* **3**:46-65.
96. **Sood S, Malhotra M, Das BK, Kapil A.** 2008. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. *Indian J Med Res* **128**:111-121.
97. **Emori TG, Gaynes RP.** 1993. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* **6**:428-442.
98. **de Bruin MA, Riley LW.** 2007. Does vancomycin prescribing intervention affect vancomycin-resistant enterococcus infection and colonization in hospitals? A systematic review. *BMC Infect Dis* **7**:24.
99. **Mundy LM, Sahn DF, Gilmore M.** 2000. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* **13**:513-522.
100. **Mitchell TJ.** 2003. The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat Rev Microbiol* **1**:219-230.
101. **Schleifer KH, Kiloer-Balz R.** 1987. Molecular and Chemotaxonomic Approaches to the Classification of Streptococci, Enterococci and Lactococci: A Review. *Syst Appl Microbiol* **10**:1-19.
102. **Knudtson LM, Hartman PA.** 1992. Routine procedures for isolation and identification of enterococci and fecal streptococci. *Appl Environ Microbiol*

- 58:3027-3031.
103. **Facklam RR, Collins MD.** 1989. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J Clin Microbiol* **27**:731-734.
 104. **Poyart C, Quesne G, Coulon S, Berche P, Trieu-Cuot P.** 1998. Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *J Clin Microbiol* **36**:41-47.
 105. **Hamilton-Miller JM, Shah S.** 1999. Identification of clinically isolated vancomycin-resistant enterococci: comparison of API and BBL Crystal systems. *J Med Microbiol* **48**:695-696.
 106. **Bosshard PP, Abels S, Altwegg M, Bottger EC, Zbinden R.** 2004. Comparison of conventional and molecular methods for identification of aerobic catalase-negative gram-positive cocci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* **42**:2065-2073.
 107. **Bartosch S, Fite A, Macfarlane GT, McMurdo ME.** 2004. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* **70**:3575-3581.
 108. **Gueimonde M, Tolkkio S, Korpimäki T, Salminen S.** 2004. New real-time quantitative PCR procedure for quantification of bifidobacteria in human fecal samples. *Appl Environ Microbiol* **70**:4165-4169.
 109. **Haarman M, Knol J.** 2005. Quantitative real-time PCR assays to identify and quantify fecal *Bifidobacterium* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Appl Environ Microbiol* **71**:2318-2324.
 110. **Sakaguchi S, Saito M, Tsuji H, Asahara T, Takata O, Fujimura J, Nagata S, Nomoto K, Shimizu T.** 2010. Bacterial rRNA-targeted reverse transcription-PCR used to identify pathogens responsible for fever with neutropenia. *J Clin Microbiol* **48**:1624-1628.
 111. **Benno Y, Endo K, Mizutani T, Namba Y, Komori T, Mitsuoka T.** 1989. Comparison of fecal microflora of elderly persons in rural and urban areas of Japan. *Appl Environ Microbiol* **55**:1100-1105.
 112. **Gelsomino R, Vancanneyt M, Cogan TM, Swings J.** 2003. Effect of raw-milk

- cheese consumption on the enterococcal flora of human feces. *Appl Environ Microbiol* **69**:312-319.
113. **Noble CJ.** 1978. Carriage of group D streptococci in the human bowel. *J Clin Pathol* **31**:1182-1186.
 114. **Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS.** 1994. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* **7**:462-478.
 115. **Balamurugan R, Rajendiran E, George S, Samuel GV, Ramakrishna BS.** 2008. Real-time polymerase chain reaction quantification of specific butyrate-producing bacteria, *Desulfovibrio* and *Enterococcus faecalis* in the feces of patients with colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* **23**:1298-1303.
 116. **Vanhaecke L, Vercruyse F, Boon N, Verstraete W, Cleenwerck I, De Wachter M, De Vos P, van de Wiele T.** 2008. Isolation and characterization of human intestinal bacteria capable of transforming the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Appl Environ Microbiol* **74**:1469-1477.
 117. **Wang X, Allen TD, May RJ, Lightfoot S, Houchen CW, Huycke MM.** 2008. *Enterococcus faecalis* induces aneuploidy and tetraploidy in colonic epithelial cells through a bystander effect. *Cancer Res* **68**:9909-9917.
 118. **Patel R, Uhl JR, Kohner P, Hopkins MK, Cockerill FR, 3rd.** 1997. Multiplex PCR detection of *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, and *vanC-2/3* genes in enterococci. *J Clin Microbiol* **35**:703-707.
 119. **Leclercq R, Dutka-Malen S, Duval J, Courvalin P.** 1992. Vancomycin resistance gene *vanC* is specific to *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrob Agents Chemother* **36**:2005-2008.
 120. **Navarro F, Courvalin P.** 1994. Analysis of genes encoding D-alanine-D-alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. *Antimicrob Agents Chemother* **38**:1788-1793.
 121. **Finegold SM, Sutter VL, Sugihara PT, Elder HA, Lehmann SM, Phillips RL.** 1977. Fecal microbial flora in Seventh Day Adventist populations and control subjects. *Am J Clin Nutr* **30**:1781-1792.
 122. **Hayashi H, Takahashi R, Nishi T, Sakamoto M, Benno Y.** 2005. Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota

- using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *J Med Microbiol* **54**:1093-1101.
123. **Facklam R.** 2002. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev* **15**:613-630.
 124. **Schuchat A.** 1998. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clin Microbiol Rev* **11**:497-513.
 125. **Easmon CS, Tanna A, Munday P, Dawson S.** 1981. Group B streptococci-gastrointestinal organisms? *J Clin Pathol* **34**:921-923.
 126. **Hansen SM, Uldbjerg N, Kilian M, Sorensen UB.** 2004. Dynamics of *Streptococcus agalactiae* colonization in women during and after pregnancy and in their infants. *J Clin Microbiol* **42**:83-89.
 127. **Islam AK, Thomas E.** 1980. Faecal carriage of group B streptococci. *J Clin Pathol* **33**:1006-1008.
 128. **Woodmansey EJ, McMurdo ME, Macfarlane GT, Macfarlane S.** 2004. Comparison of compositions and metabolic activities of fecal microbiotas in young adults and in antibiotic-treated and non-antibiotic-treated elderly subjects. *Appl Environ Microbiol* **70**:6113-6122.
 129. **Beresford TP, Fitzsimons NA, Brennan NL, Cogan TM.** 2001. Recent advances in cheese microbiology. *Int Dairy J* **11**:259-274.
 130. **Cogan TM, Barbosa M, Beuvier E, Bianchi-Salvadori B, Cocconcelli PS, Fernandes I, Gomez J, Gomes R, Kalantzopoulos G, Ledda A, Medina M, Rea MC, Rodriguez E.** 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J Dairy Res* **64**:409-421.
 131. **Kimoto-Nira H, Ohmomo S, Nomura M, Kobayashi M, Mizumahi K, Okamoto T.** 2008. Interference of *in vitro* and *in vivo* growth of several intestinal bacteria by *Lactococcus* strains. *J Microbiol Biotechnol* **18**:1286-1289.
 132. **Toda T, Kosaka H, Terai M, Mori H, Benno Y, Yamori Y.** 2005. Effects of fermented milk with *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC on defecation frequency and fecal microflora in healthy elderly volunteers. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology* **52**:243-250.
 133. **Vendrell D, Balcazar JL, Ruiz-Zarzuola I, de Blas I, Girones O, Muzquiz JL.** 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comp Immunol Microbiol Infect*

- Dis **29**:177-198.
134. **Miyake T, Watanabe K, Watanabe T, Oyaizu H.** 1998. Phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* and related genera based on 16S rDNA sequences. *Microbiol Immunol* **42**:661-667.
 135. **Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Dymock D, Wade WG.** 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **64**:795-799.
 136. **Cenciarini-Borde C, Courtois S, La Scola B.** 2009. Nucleic acids as viability markers for bacteria detection using molecular tools. *Future Microbiol* **4**:45-64.
 137. **Nakayama J, Kobayashi T, Tanaka S, Korenori Y, Tateyama A, Sakamoto N, Kiyohara C, Shirakawa T, Sonomoto K.** 2011. Aberrant structures of fecal bacterial community in allergic infants profiled by 16S rRNA gene pyrosequencing. *FEMS Immunol Med Microbiol* **63**:397-406.
 138. **Davis LM, Martinez I, Walter J, Goin C, Hutkins RW.** 2011. Barcoded pyrosequencing reveals that consumption of galactooligosaccharides results in a highly specific bifidogenic response in humans. *PLoS One* **6**:e25200.
 139. **Islam KB, Fukiya S, Hagio M, Fujii N, Ishizuka S, Ooka T, Ogura Y, Hayashi T, Yokota A.** 2011. Bile Acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. *Gastroenterology* **141**:1773-1781.
 140. **Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, Nalin R, Jarrin C, Chardon P, Marteau P, Roca J, Dore J.** 2006. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* **55**:205-211.

図 表

TABLE 1-1. Specificity tests with newly developed primers

Taxon	Strain	Reactions with the following primers ^a :				
		En-lsu3F/ En-lsu3R	Ec-ssu1F/ Ec-ssu1R	STPYF/ STPYR2	PSD7F/ PSD7R	CIPER-F/ CIPER-R
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11775 ^T	+	—	—	—	—
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 13316 ^T	+	—	—	—	—
<i>Citrobacter koseri</i>	ATCC 27028 ^T	+	—	—	—	—
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047 ^T	+	—	—	—	—
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048 ^T	+	—	—	—	—
<i>Enterobacter sakazakii</i>	JCM 1233 ^T	+	—	—	—	—
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883 ^T	+	—	—	—	—
<i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC 13182 ^T	+	—	—	—	—
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 13880 ^T	+	—	—	—	—
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 29906 ^T	+	—	—	—	—
<i>Proteus vulgaris</i>	JCM 1668	+	—	—	—	—
<i>Proteus penneri</i>	JCM 3948 ^T	+	—	—	—	—
<i>Hafnia alvei</i>	JCM 1666 ^T	+	—	—	—	—
<i>Edwardsiella tarda</i>	ATCC 15947 ^T	+	—	—	—	—
<i>Providencia alcalifaciens</i>	ATCC 9886 ^T	+	—	—	—	—
<i>Providencia rettgerii</i>	DSM 4542 ^T	+	—	—	—	—
<i>Morganella morganii</i>	JCM 1672 ^T	+	—	—	—	—
<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>choleraesuis</i> serotype enteritidis	DSM 9898	+	—	—	—	—
<i>Yersinia enterocolitica</i>	DSM 4780 ^T	+	—	—	—	—
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433 ^T	—	+	—	—	—
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 19434 ^T	—	+	—	—	—
<i>Enterococcus hirae</i>	ATCC 8043 ^T	—	+	—	—	—
<i>Enterococcus avium</i>	JCM 8722 ^T	—	+	—	—	—
<i>Enterococcus gallinarum</i>	JCM 8728 ^T	—	+	—	—	—
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	JCM 8723 ^T	—	+	—	—	—
<i>Enterococcus flavescens</i>	DSM 7370 ^T	—	+	—	—	—
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 12600 ^T	—	—	+	—	—
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 14990 ^T	—	—	+	—	—
<i>Staphylococcus schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	JCM 7470 ^T	—	—	+	—	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145 ^T	—	—	—	+	—
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 291 ^T	—	—	—	+	—
<i>Clostridium perfringens</i>	JCM 1290 ^T	—	—	—	—	+
<i>Ruminococcus productus</i>	ATCC 27340 ^T	—	—	—	—	—
<i>Ruminococcus obeum</i>	ATCC 29174 ^T	—	—	—	—	—
<i>Clostridium orbiscindens</i>	DSM 6740 ^T	—	—	—	—	—
<i>Bacteriodes fragilis</i>	DSM 2151 ^T	—	—	—	—	—
<i>Bacteroides vulgatus</i>	JCM 5826 ^T	—	—	—	—	—
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	ATCC 15703 ^T	—	—	—	—	—
<i>Bifidobacterium longum</i>	ATCC 15707 ^T	—	—	—	—	—
<i>Collinsella aerofaciens</i>	ATCC 25986 ^T	—	—	—	—	—
<i>Eggerthella lenta</i>	ATCC 25559 ^T	—	—	—	—	—
<i>Prevotella melaninogenica</i>	ATCC 25845 ^T	—	—	—	—	—
<i>Veillonella parvula</i>	ATCC 10790 ^T	—	—	—	—	—
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356 ^T	—	—	—	—	—
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 334 ^T	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus intermedius</i>	ATCC 27335	—	—	—	—	—
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33560 ^T	—	—	—	—	—
<i>Candida albicans</i>	ATCC 18804 ^T	—	—	—	—	—
<i>Bacillus cereus</i>	JCM 2152 ^T	—	—	—	—	—
<i>Bacillus subtilis</i>	JCM 1465 ^T	—	—	—	—	—

^a The specificity of the RT-qPCR assay for target bacteria with each primer was investigated using RNA extracts corresponding to 10⁵ cells of each strain. Specificity was judged using the criteria described in Materials and Methods.

TABLE 1-2. Primers based on 16S or 23S rRNA sequences

Target	Primer	Sequence (5' - 3')	Product size (bp)	Reference
Enterobacteriaceae 23S rRNA	En-lsu-3F	TGCCGTA ACTTCGGGAGAAGGCA	428	This study
	En-lsu-3R	TCAAGGACCAGTGTTCAGTGTC		
<i>Enterococcus</i> 16S rRNA	Ec-ssu1F	CCCATCAGAAGGGGATAA CACTT	115	This study
	Ec-ssu1R	ACCGCGGGTCCATCCATC		
<i>Staphylococcus</i> 16S rRNA	STPYF	ACGGTCTTGCTGTCACTTATA	257	This study
	STPYR2	TACACATATGTTCTTCCCTAATAA		
<i>Pseudomonas</i> 16S rRNA	PSD7F	CAAAACTACTGAGCTAGAGTACG	215	This study
	PSD7R	TAAAGATCTCAAGGATCCCAACGGCT		
<i>Clostridium perfringens</i> 16S rRNA	CIPER-F	AGATGGCATCATCATCAAC	793	55
	CIPER-R	GCAAGGGATGTCAAGTGT		

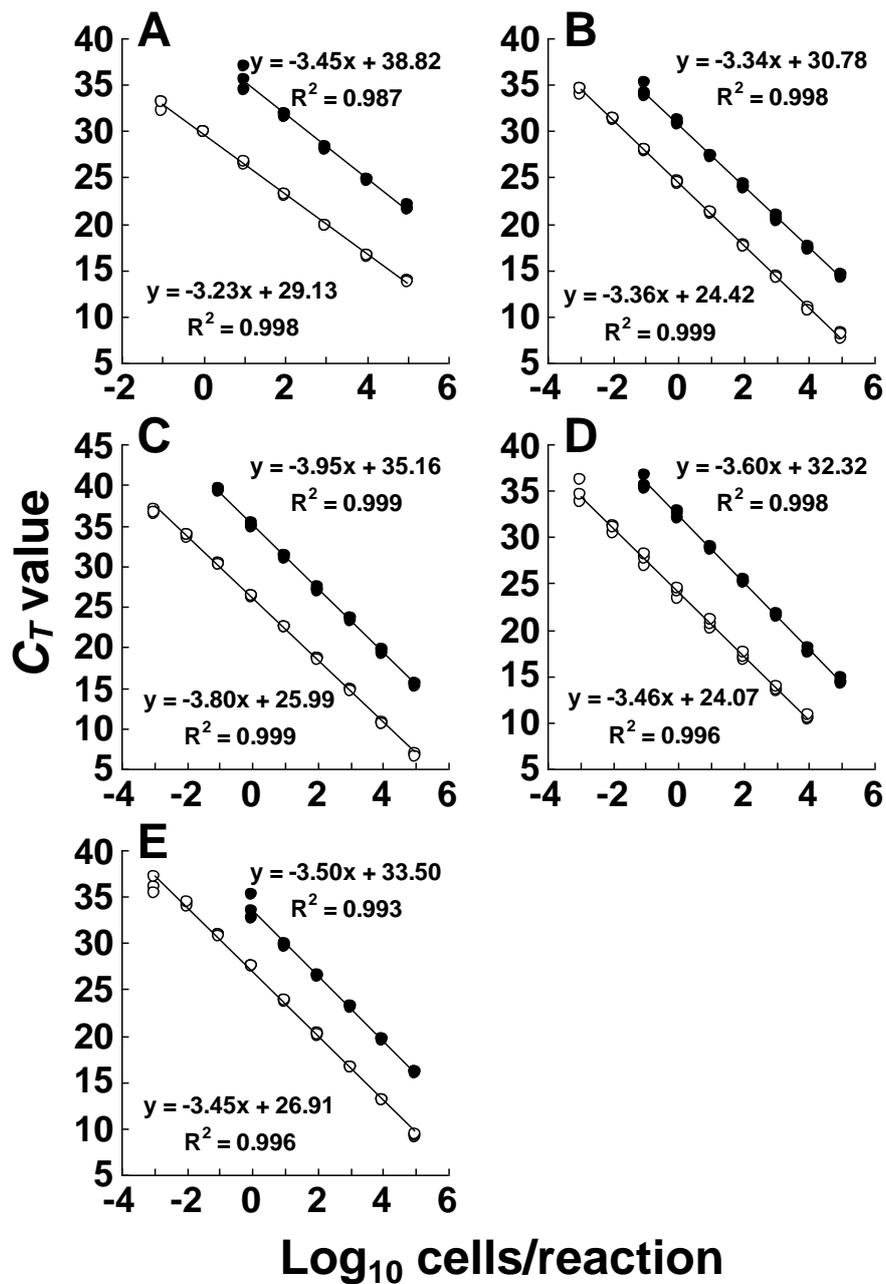


FIG. 1-1. Quantitative detection of bacteria by RT-qPCR and by qPCR. *E. coli* ATCC 11775^T (A), *E. faecalis* ATCC 19433^T (B), *S. aureus* ATCC 12600^T (C), *C. perfringens* JCM 1290^T (D), and *P. aeruginosa* ATCC 10145^T (E) were cultivated separately in BHI or MRS broth. RNA and DNA fractions were extracted from culture samples in the early stationary phase (18 h), and the bacterial counts were determined microscopically with DAPI staining. Based on the bacterial counts, 10-fold serial dilutions of RNA or DNA from 10⁻³ to 10⁵ bacteria were assessed by RT-qPCR (○) and qPCR (●) assays. The C_T values for triplicate samples obtained were plotted against the log₁₀ number of bacterial cells subjected to each reaction.

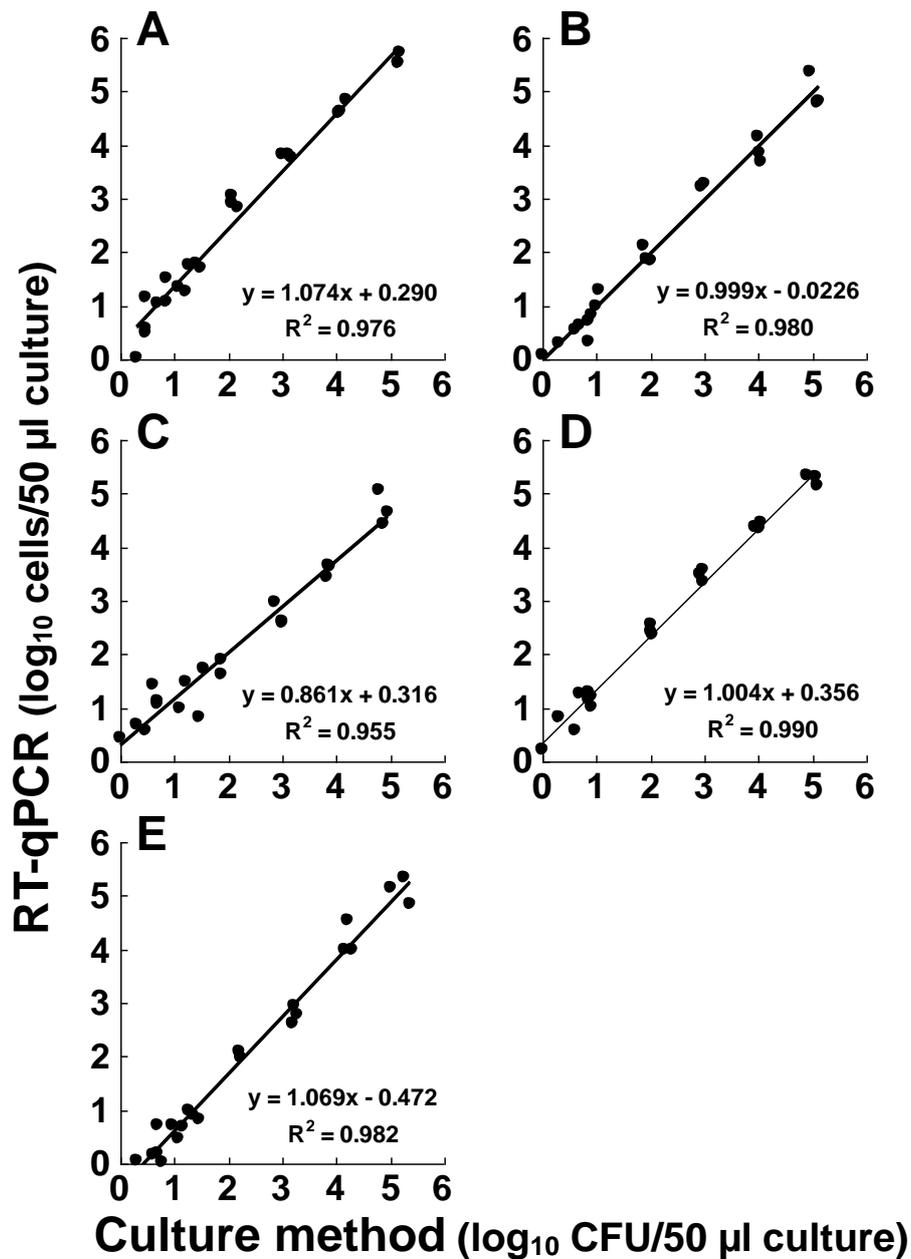


FIG. 1-2. Comparison of bacterial counts in cultures determined by RT-qPCR and by the culture method. *E. coli* ATCC 11775^T (A), *E. faecalis* ATCC 19433^T (B), *S. aureus* ATCC 12600^T (C), *C. perfringens* JCM 1290^T (D), and *P. aeruginosa* ATCC 10145^T (E) were cultivated in BHI or MRS broth. RNA fractions were extracted from 10-fold serial dilutions of each bacterial culture (50 µl) in the range from 10⁰ to 10⁵ CFU. The number of bacteria in each sample was determined by RT-qPCR and then plotted against the CFU count for the same sample determined on BHI (for *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus*, and *P. aeruginosa*) or GAM (for *C. perfringens*) agar plates; data for single samples from each of the three different cultures are shown for each dilution. For RT-qPCR, an analytical curve generated with the RNA dilution series for each target strain (Fig. 1-1) was used.

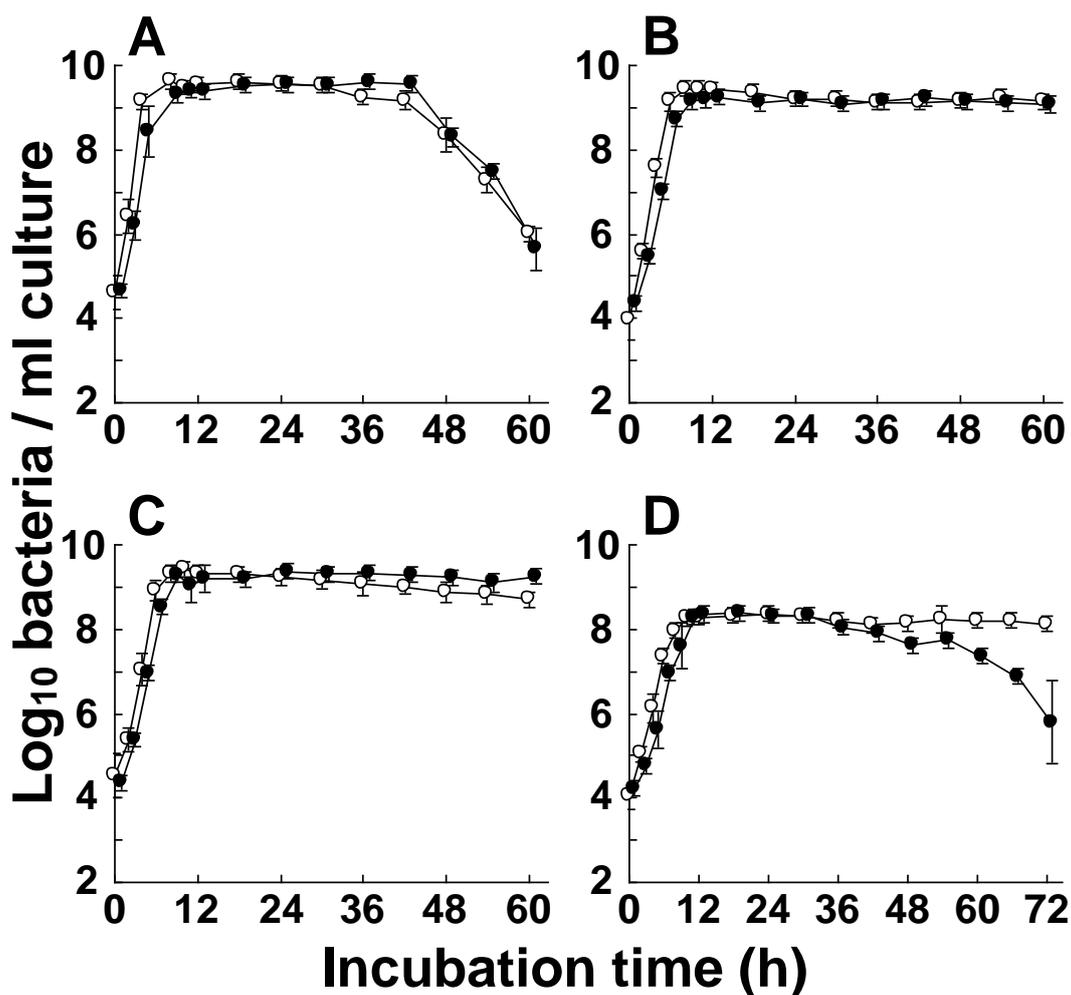


FIG. 1-3. Effect of growth phase on bacterial counts determined by RT-qPCR. Throughout the growth phase in broth culture, the numbers of *E. coli* ATCC 11775^T (A), *E. faecalis* ATCC 19433^T (B), *S. aureus* ATCC 12600^T (C), and *C. perfringens* JCM 1290^T (D) cells were determined by RT-qPCR (○) and the culture method (●). The analytical curves generated with the RNA dilution series for each target strain in the stationary phase (18 h) (Fig. 1-1) were used to quantify the bacteria. The CFU counts were determined on BHI (for *E. coli*, *E. faecalis*, and *S. aureus*) or GAM (for *C. perfringens*) agar plates. The results are the means and standard deviations of triplicate samples.

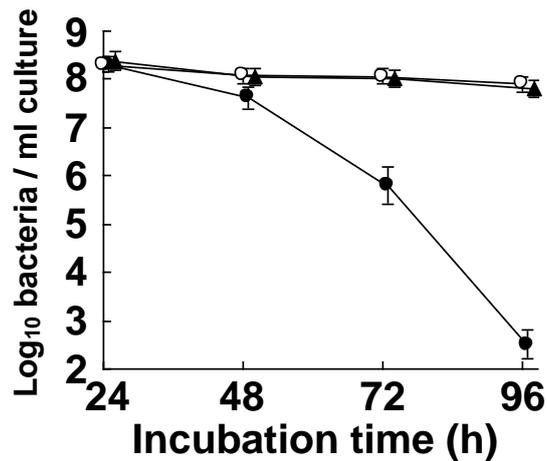


FIG. 1-4. Comparison of RT-qPCR counts and viable bacterial cell counts determined by a combination of DAPI staining and SYTO9-PI double staining of cultured bacteria. *C. perfringens* JCM 1290^T was incubated in MRS broth for 4 days and examined by RT-qPCR (○), SYTO9-PI double staining (▲), and the culture method (●) at 24, 48, 72, and 96 h. The viable bacterial count was calculated with the following equation: viable bacterial count = (number of cells labeled with SYTO9/number of cells labeled with both SYTO9 and PI) × (number of cells stained with DAPI). For RT-qPCR, the analytical curve generated with the dilution series of RNA extracted from *C. perfringens* cells at 18 h (Fig. 1-1D) was used to determine the bacterial number. The CFU count was determined by culturing samples on GAM agar plates for 24 h. The results are the means and standard deviations of triplicate samples.

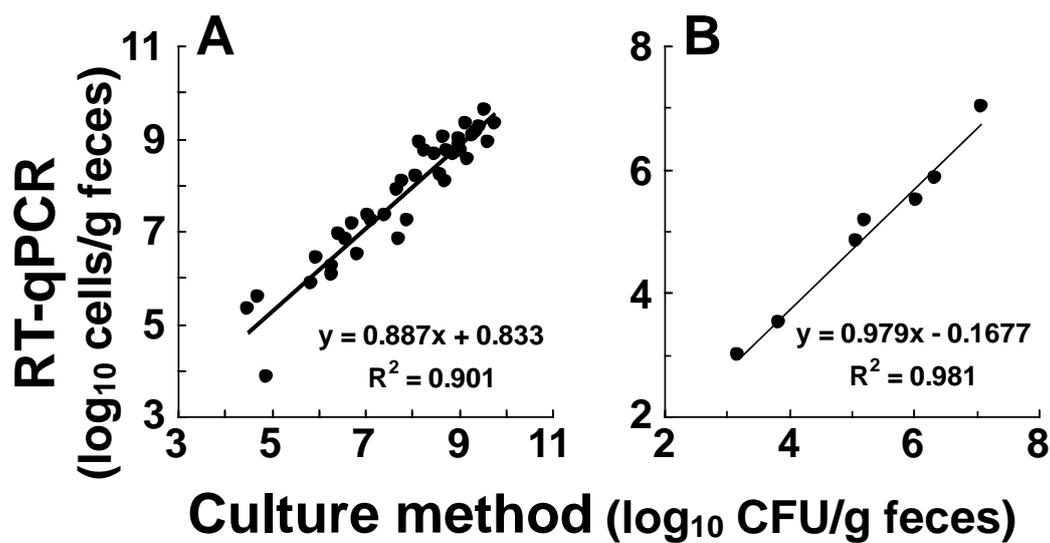


FIG. 1-5. Correlation between RT-qPCR counts and cultural counts in human feces. Total RNA fractions extracted from 38 human fecal homogenates were assessed by the RT-qPCR assay to determine the indigenous population levels of Enterobacteriaceae (A) and *Pseudomonas* (B). The C_T values obtained were applied to the analytical curves for *E. coli* ATCC 11775^T and *P. aeruginosa* ATCC 10145^T (Fig. 1-1A and E) to determine the RT-qPCR counts. The CFU counts were determined by culturing the same fecal samples on DHL (A) or NAC (B) agar plates and then were plotted against the RT-qPCR counts.

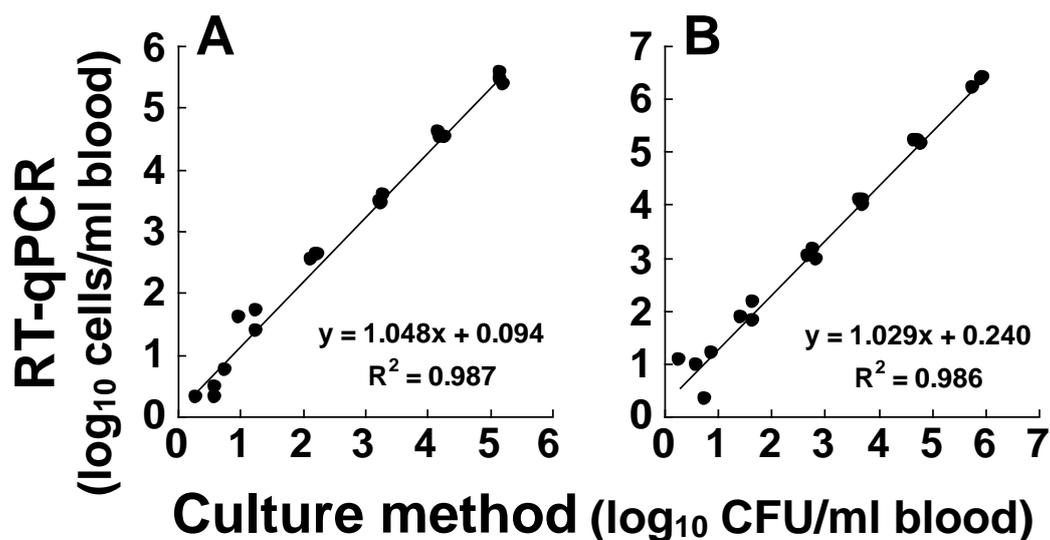


FIG. 1-6. Comparison of bacterial counts in human peripheral blood determined by RT-qPCR and the culture method. Human peripheral blood samples (0.5 ml) from three individuals were spiked with various amounts of live *S. aureus* ATCC 12600^T (A) or *P. aeruginosa* ATCC 10145^T (B) to obtain final concentrations ranging from 10⁰ to 10⁶ CFU per ml. RNA fractions extracted from each sample were then assessed by the RT-qPCR assay. The C_T values obtained were applied to the analytical curves for *S. aureus* ATCC 12600^T and *P. aeruginosa* ATCC 10145^T (Fig. 1-1C and E) to determine the RT-qPCR counts. The CFU counts were determined by culturing the same samples on BHI agar plates and then were plotted against the RT-qPCR counts; data for single samples from the three different donors are shown.

TABLE 2-1. Specificity of the newly developed primer sets for *Lactobacillus*

Taxon	Strain	Subgroup ^a	Reactions with the following primer set ^b :									
			sg-Lcas-F/ sg-Lcas-R	sg-Lgas-F/ sg-Lgas-R	sg-Lpla-F/ sg-Lpla-R	sg-Lreu-F/ sg-Lreu-R	sg-Lrum-F/ sg-Lrum-R	sg-Lsak-F/ sg-Lsak-R	s-Lbre-F/ s-Lbre-R	LFer-1/ LFer-2	s-Lfu-F/ s-Lfu-R	
<i>L. casei</i>	ATCC 334 ^T	<i>L. casei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. rhamnosus</i>	ATCC 7469 ^T	<i>L. casei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. zeae</i>	ATCC 393	<i>L. casei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. acidophilus</i>	ATCC 4356 ^T	<i>L. gasseri</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. amylovorus</i>	JCM 1126 ^T	<i>L. gasseri</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. crispatus</i>	JCM 1185 ^T	<i>L. gasseri</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	ATCC 11842 ^T	<i>L. gasseri</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	ATCC 9649 ^T	<i>L. gasseri</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	ATCC 12315 ^T	<i>L. gasseri</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. gasseri</i>	DSM 20243 ^T	<i>L. gasseri</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. helveticus</i>	ATCC 15009 ^T	<i>L. gasseri</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. jensenii</i>	ATCC 25258 ^T	<i>L. gasseri</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. johnsonii</i>	JCM 2012 ^T	<i>L. gasseri</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i>	ATCC 14917 ^T	<i>L. plantarum</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. pentosus</i>	JCM 1558 ^T	<i>L. plantarum</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. reuteri</i>	JCM 1112 ^T	<i>L. reuteri</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>L. oris</i>	NCFB 2160 ^T	<i>L. reuteri</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>L. panis</i>	JCM 11053 ^T	<i>L. reuteri</i>	-	±	-	+	±	-	-	-	-	-
<i>L. vaginalis</i>	JCM 9505 ^T	<i>L. reuteri</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>L. ruminis</i>	JCM 1152 ^T	<i>L. ruminis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>L. animalis</i>	JCM 5670 ^T	<i>L. ruminis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>L. mali</i>	JCM 1116 ^T	<i>L. ruminis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>L. salivarius</i>	ATCC 11741 ^T	<i>L. ruminis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>L. satsumensis</i>	JCM 12392 ^T	<i>L. ruminis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>L. sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	JCM 1157 ^T	<i>L. sakei</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>L. sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	JCM 11031 ^T	<i>L. sakei</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>L. curvatus</i>	JCM 1096 ^T	<i>L. sakei</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>L. graminis</i>	NRIC 1775 ^T	<i>L. sakei</i>	-	-	-	-	±	+	-	-	-	-
<i>L. brevis</i>	ATCC 14869 ^T	<i>L. brevis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>L. fermentum</i>	ATCC 14931 ^T	<i>L. fermentum</i>	-	-	-	±	-	-	-	+	-	-
<i>L. fructivorans</i>	JCM 1117 ^T	<i>L. fructivorans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i>	JCM 1164 ^T	<i>L. coryniformis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. vaccinostercus</i>	JCM 12184	<i>L. vaccinostercus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. farciminis</i>	JCM 1097 ^T	<i>L. farciminis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. sharpeae</i>	JCM 1186 ^T	<i>L. sharpeae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a The species of *Lactobacillus* were differentiated into 13 subgroups based on 16S rRNA gene sequences.

^b The specificity of the RT-qPCR assay for target bacteria with each primer was investigated using RNA extracts corresponding to 10⁵ cells from each strain described. Specificity was judged using the criteria described in Materials and Methods. In addition, negative PCR results were obtained for the following bacterial strains: *Ruminococcus productus* JCM 1471^T, *Ruminococcus obeum* ATCC 29174^T, *Faecalibacterium prausnitzii* ATCC 27768^T, *Clostridium orbiscindens* DSM 6740^T, *Bacteroides ovatus* JCM 5824^T, *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482^T, *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703^T, *Bifidobacterium longum* ATCC 15707^T, *Collinsella aerofaciens* DSM 3979^T, *Eggerthella lenta* ATCC 25559^T, *Prevotella melaninogenica* ATCC 25845^T, *Escherichia coli* JCM 1649^T, *Acinetobacter calcoaceticus* JCM 6842^T, *Pseudomonas aeruginosa* IFO 12689^T, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433^T, *Streptococcus anginosus* GIFU 8327, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600^T, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435^T, *Bacillus cereus* JCM 2152^T, *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* DSM 4688^T, and *Candida albicans* IFO 1385^T.

TABLE 2-2. 16S or 23S rRNA gene-targeted primers used in this study

Target ^a	Primer	Sequence (5' - 3')	Product size ^b (bp)	Annealing temp (°C)	Reference or source
<i>Clostridium coccooides</i> group	g-Ccoc-F	AAATGACGGT ACCTGACTAA	440	55	40
	g-Ccoc-R	CTTTGAGTTTCATTCCTGCGAA			
<i>Clostridium leptum</i> subgroup	sg-Clept-F	GCACAAGCAGTGGAGT	239	55	40
	sg-Clept-R3	CTTCCTCCGTTTTGTCAA			
<i>Bacteroides fragilis</i> group	g-Bfra-F2	AYAGCCTTCGAAAGRAAGAT	495	50	71
	g-Bfra-R	CCAGTATCAACTGCAATTTTA			
<i>Bifidobacterium</i>	g-Bifid-F	CTCCTGGAAACGGGTGG	552	55	40
	g-Bifid-R	GGTGTCTCCCGATATCTACA			
<i>Bifidobacterium breve</i>	BiBRE-1	CCGGATGCTCCATCACAC	288	55	39
	BiBRE-2	ACAAAGTGCCTTCTCCCT			
<i>Atopobium</i> cluster	g-Atopo-F	GGGTTGAGAGACCGACC	190	55	40
	g-Atopo-R	CGGRGCTTCTCTGCAGG			
<i>Prevotella</i>	g-Prevo-F	CACRGTAAACGATGGATGCC	513	55	40
	g-Prevo-R	GGTCGGGTTGCAGACC			
<i>Clostridium perfringens</i> ^c	s-Clper-F	GGGGGTTTCAACACCTCC	170	60	This study 55
	CIPER-R	GCAAGGGATGTCAAGTGT			
Enterobacteriaceae	En-lsu-3F	TGCCGTAACTTCGGGAGAAGGCA	428	60	Table 1-2
	En-lsu-3'R	TCAAGGACCAGTGTTCAGTGTCTC			
<i>Lactobacillus casei</i> subgroup	sg-Lcas-F	ACCGCATGGTCTTGGC	296	60	This study
	sg-Lcas-R	CCGACAACAGTTACTCTGCC			
<i>Lactobacillus gasseri</i> subgroup	sg-Lgas-F	GATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGAT	197	60	This study
	sg-Lgas-R	TAAAGGCCAGTTACTACCTCTATCC			
<i>Lactobacillus plantarum</i> subgroup	sg-Lpla-F	CTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCAT	54	60	This study
	sg-Lpla-R	GTTCGCCACTCACTCAAATGTAAA			
<i>Lactobacillus reuteri</i> subgroup	sg-Lreu-F	GAACGCAYTGGCCCAA	289	60	This study
	sg-Lreu-R	TCCATTGTGGCCGATCAGT			
<i>Lactobacillus ruminis</i> subgroup	sg-Lrum-F	CACCGAATGCTTGCAYTACC	182	60	This study
	sg-Lrum-R	GCCGCGGGTCCATCCAAA			
<i>Lactobacillus sakei</i> subgroup	sg-Lsak-F	CATAAAACCTAMCACCAGTGG	303	60	This study
	sg-Lsak-R	TCAGTTACTATCAGATACRTTCTTCTC			
<i>Lactobacillus brevis</i>	s-Lbre-F	ATTTTGTTTGAAAGGTGGCTTCGG	289	55	This study
	s-Lbre-R	ACCCTTGAACAGTTACTCTCAAAGG			
<i>Lactobacillus fermentum</i>	LFer-1	CCTGATTGATTTTGGTCGCCAAC	414	55	73
	LFer-2	ACGTATGAACAGTTACTCTCATACGT			
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	s-Lfru-F	TGCGCCTAATGATAGTGA	452	55	This study
	s-Lfru-R	GATACCGTCGCGACGTGAG			
<i>Enterococcus</i>	g-Encoc-F	ATCAGAGGGGAT AACACTT	337	55	This study
	g-Encoc-R	ACTCTCATCCTTGTCTTCTC			
<i>Staphylococcus</i>	g-Staph-F	TTTGGGCTACACAGTGTACAATGGACAA	79	60	This study
	g-Staph-R	AACAACCTTATGGGATTTGCWTGA			
<i>Pseudomonas</i>	PSD7F	CAAAACTACTGAGCTAGAGTACG	215	60	Table 1-2
	PSD7R	TAAGATCTCAAGGATCCCAACGGCT			

^a Specific primer sets were developed by using 16S rRNA gene sequences, except for En-lsu-3F/En-lsu-3'R, which target 23S rRNA genes.

^b RNAs extracted from the standard strains described in Materials and Methods were used as the RT-qPCR controls.

^c The forward primer s-Clper-F was newly developed in this study and was used in the combination with the reverse primer CIPER-R, which was previously reported [55].

TABLE 2-3. Comparison of RT-qPCR counts to qPCR counts and to cultural counts from human feces

Bacterial population	RT-qPCR		qPCR		Culture	
	Log ₁₀ cells /g feces ^a	Detection ratio (%)	Log ₁₀ cells /g feces ^a	Detection ratio (%)	Log ₁₀ cells /g feces ^a	Detection ratio (%)
<i>Clostridium coccoides</i> group	10.2 ± 0.5	100	10.1 ± 0.5	100	NT	-
<i>Clostridium leptum</i> subgroup	9.5 ± 0.7	100	9.4 ± 0.8	100	NT	-
<i>Bacteroides fragilis</i> group	9.8 ± 0.6	100	9.4 ± 0.5	100	NT	-
<i>Bifidobacterium</i>	9.5 ± 1.0	98	9.1 ± 0.9	98	9.5 ± 0.5	95
<i>Atopobium</i> cluster	9.1 ± 0.8	100	8.9 ± 0.7	100	NT	-
<i>Prevotella</i>	6.9 ± 1.9	88	7.7 ± 1.4	63	NT	-
<i>Clostridium perfringens</i> / <i>Clostridium</i> (L+) ^d	4.3 ± 1.6	83	6.4	6	4.4 ± 1.5	48
Enterobacteriaceae	7.1 ± 1.2	100	8.2 ± 0.5	100	6.8 ± 1.1	100
<i>Lactobacillus</i>	6.3 ± 1.5 ^e	98	7.1 ± 0.9 ^e	39	5.6 ± 1.6	90
<i>Enterococcus</i>	6.2 ± 1.4	85	8.0 ± 1.4	56	6.8 ± 1.5	45
<i>Staphylococcus</i>	5.3 ± 0.5	85	ND	0	3.7 ± 1.1	70
<i>Pseudomonas</i>	4.3 ± 0.7	30	ND	0	NT	-
Total	10.6 ± 0.5 ^b	100	10.5 ± 0.4 ^b	100	10.5 ± 0.5 ^c	100

^a Data are expressed as the means and standard deviations of fecal samples collected from 40 adult volunteers. NT, not tested. ND, not detected.

^b The total count of bacteria obtained by RT-qPCR or qPCR is expressed as the sum of the counts of 11 groups and one species.

^c The total count of bacteria cultivated with M10 plates.

^d In the culture method, *Clostridium* (L+) was selectively cultivated on CW agar plates.

^e The count of *Lactobacillus* species organisms obtained by RT-qPCR or qPCR is expressed as the sum of the counts of six subgroups and three species.

TABLE 2-4. Quantification of *Lactobacillus* species subgroups in human feces by RT-qPCR

Bacterial population	Log ₁₀ cells /g feces ^a	Detection ratio (%)
<i>L. casei</i> subgroup	4.7 ± 1.1	48
<i>L. gasseri</i> subgroup	5.1 ± 1.4	78
<i>L. plantarum</i> subgroup	4.3 ± 1.1	80
<i>L. reuteri</i> subgroup	5.1 ± 1.5	80
<i>L. ruminis</i> subgroup	5.2 ± 1.8	78
<i>L. sakei</i> subgroup	5.2 ± 1.3	23
<i>L. brevis</i>	4.3 ± 1.1	13
<i>L. fermentum</i>	5.5 ± 1.4	60
<i>L. fructivorans</i>	3.6	5
Total ^b	6.3 ± 1.5	98

^a Data are expressed as the means and standard deviations from fecal samples collected from 40 adult volunteers.

^b The total count of *Lactobacillus* species organisms is expressed as the sum of the counts of six subgroups and three species.

TABLE 2-5. Comparison of bacterial counts in human feces determined by RT-qPCR and FISH

Bacterial population	Log ₁₀ bacterial cells/g feces ^a							
	Subject A		Subject B		Subject C		Subject D	
	RT-PCR	FISH	RT-PCR	FISH	RT-PCR	FISH	RT-PCR	FISH
<i>Clostridium coccooides</i> group	10.3	10.3	10.3	10.5	10.3	10.4	10.4	10.4
<i>Clostridium leptum</i> subgroup	10.1	9.7	10.3	10.1	10.6	10.7	10.0	9.9
<i>Bacteroides fragilis</i> group	10.5	10.3	10.2	10.4	10.2	10.5	10.2	10.5
<i>Bifidobacterium</i>	10.6	10.1	10.3	10.0	10.6	10.2	10.3	9.8
<i>Atopobium</i> cluster	9.8	9.8	9.5	9.9	8.7	8.8	9.7	9.9
<i>Prevotella</i>	ND	ND	ND	ND	ND	6.6	6.0	ND
Sum of six groups	11.0	10.8	10.9	10.9	11.1	11.1	10.9	10.9
Total count of bacteria ^b	NT	11.1	NT	11.0	NT	11.3	NT	11.1
Total count of cells (by DAPI staining)		11.3		11.2		11.6		11.2

^a Fecal samples collected from four adult volunteers were used for the comparisons. NT, not tested. ND, not detected.

^b The total count of bacteria was determined by hybridization with probe Eub338[75].

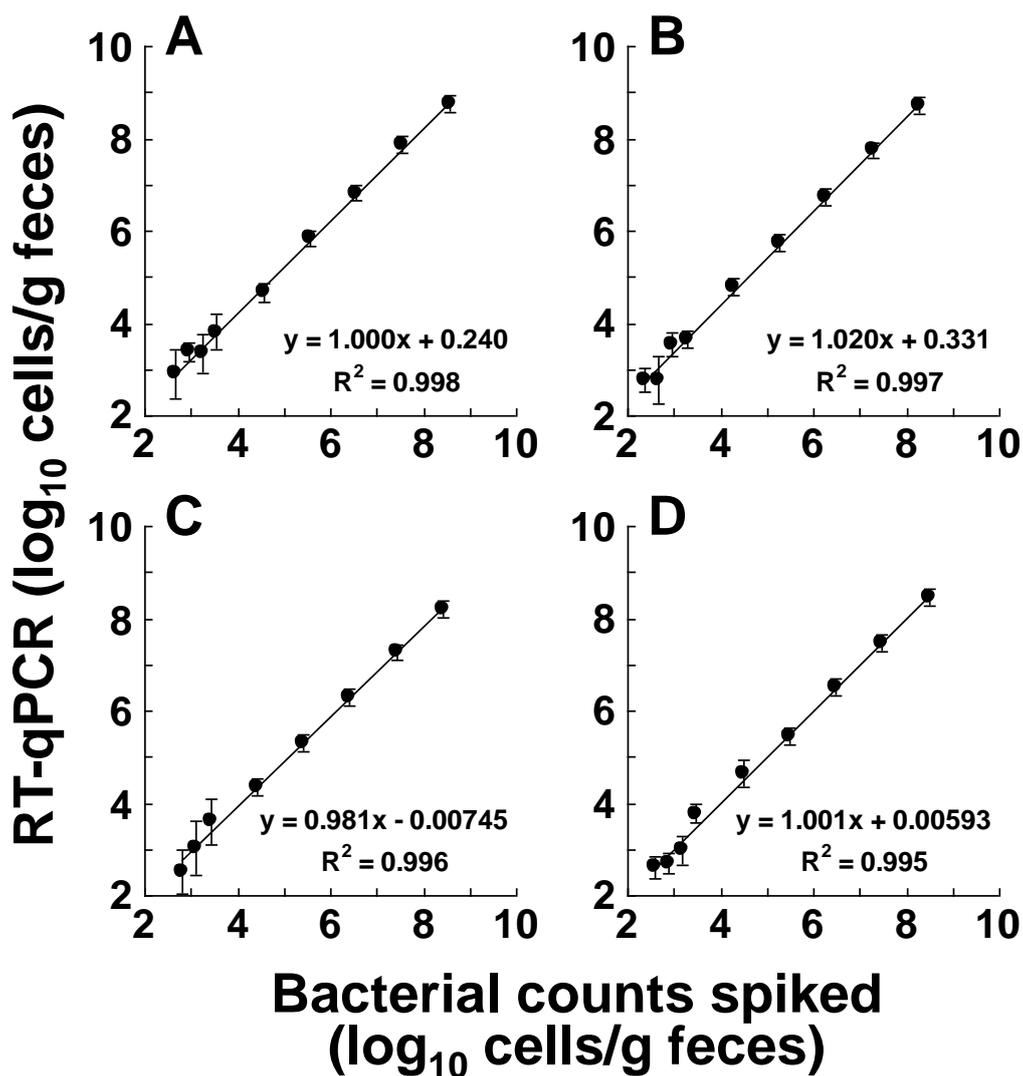


FIG. 2-1. Quantification of bacteria spiked into human feces by RTqPCR. Fecal samples from three individuals spiked with serial dilutions of *B. breve* ATCC 15700^T (A), *C. perfringens* JCM 1290^T (B), *L. fructivorans* JCM 1117^T (C), or *P. aeruginosa* IFO 12689^T (D) to final concentrations of 10² to 10⁹ cells per g were assessed by RT-qPCR. Bacterial counts were determined by the DAPI staining method and plotted against the corresponding RT-qPCR counts; data are expressed as the means and standard deviations of three individuals.

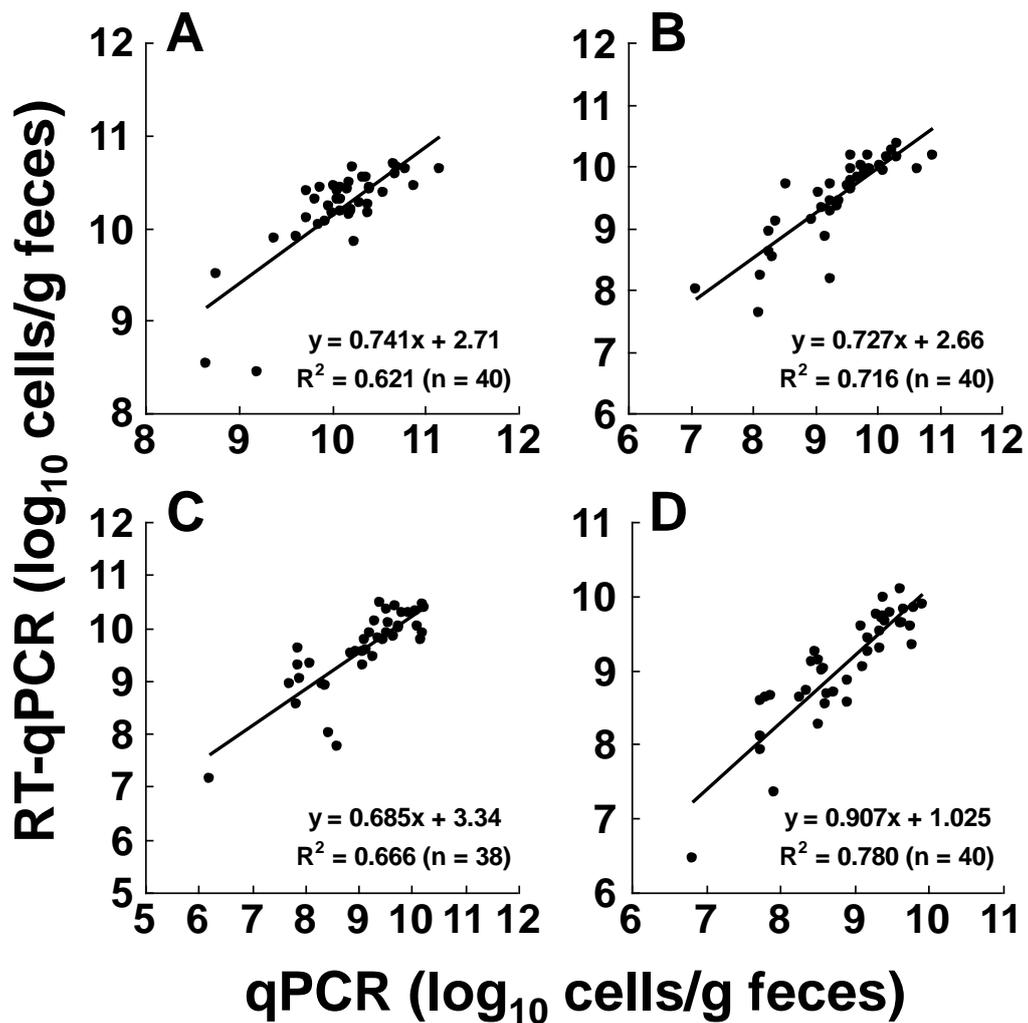


FIG. 2-2. Correlation between RT-qPCR and qPCR counts in human feces. Total RNA and DNA fractions extracted from 40 human fecal homogenates were assessed by RT-qPCR (total RNA) and qPCR (DNA) assays to enumerate indigenous population levels of the *C. coccooides* group (A), the *C. leptum* subgroup (B), *Bifidobacterium* (C), and the *Atopobium* cluster (D). qPCR counts were plotted against RT-qPCR counts.

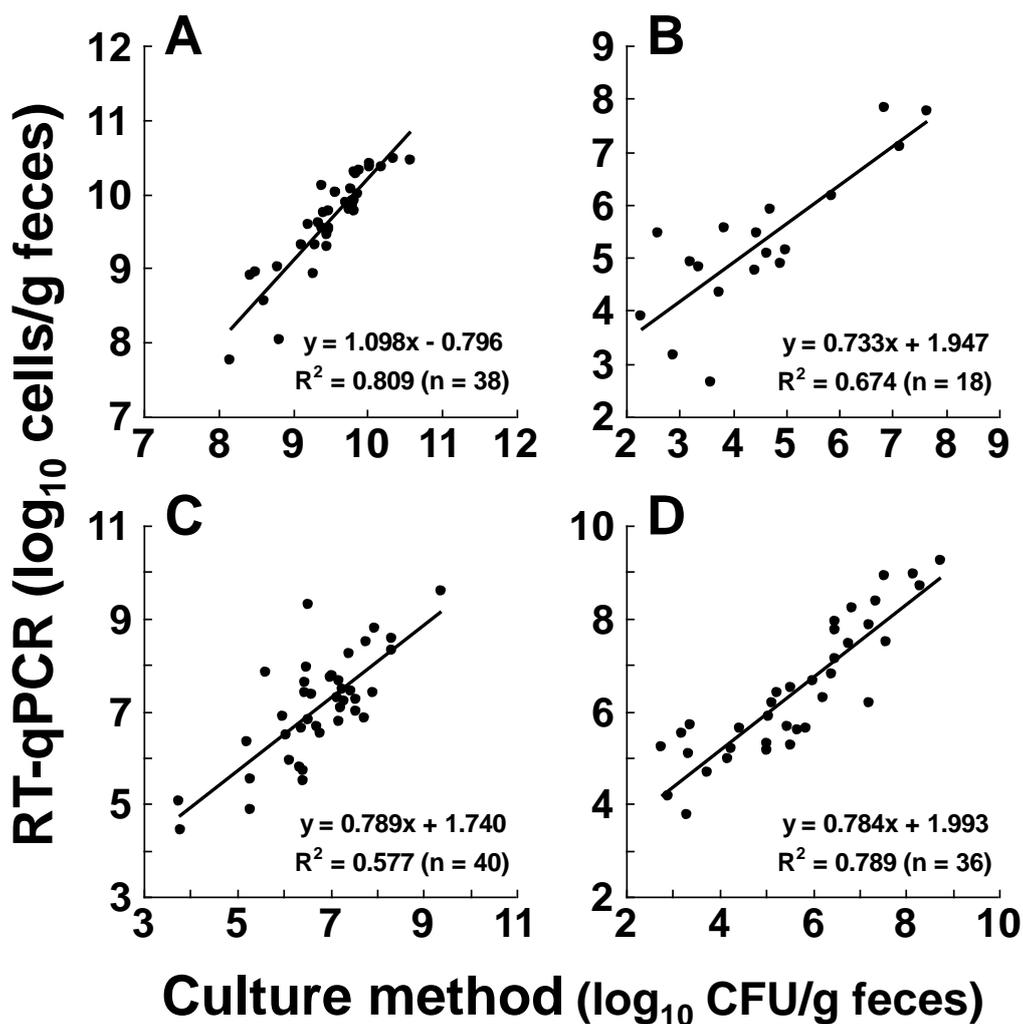


FIG. 2-3. Correlation between RT-qPCR and cultural counts in human feces. Total RNA fractions extracted from 40 human fecal homogenates were assessed by RT-qPCR to enumerate indigenous population levels of *Bifidobacterium* (A), *C. perfringens* (B), Enterobacteriaceae (C), and *Lactobacillus* (D). CFU counts were determined by culturing the same fecal samples on MTP (*Bifidobacterium*), CW (*C. perfringens*), DHL (Enterobacteriaceae), and LBS (*Lactobacillus*) agar plates and were plotted against RT-qPCR counts.

TABLE 3-1. Specificity tests with the primers

Taxon	Strain	Reactions with the following primer set ^a :																
		g-Encoc-F /g-Encoc-R	s-Efs-F /s-Efs-R	s-Ecacc-F /s-Ecacc-R	s-Ececo-F /s-Ececo-R	sg-Esulf-F /sg-Esulf-R	sg-Ecass-F /sg-Ecass-R	sg-Eavi-F /sg-Eavi-R	s-Edis-F /s-Edis-R	sg-Efm-F /sg-Efm-R	s-Efm-F /s-Efm-R	g-Str-F /g-Str-R	s-Sag-F /s-Sag-R	s-Spy-F /s-Spy-R	s-Spn-F /s-Spn-R	s-Ssal-F /s-Ssal-R	sg-Llclac-F /sg-Llclac-R	sg-Lcpis-F /sg-Lcpis-R
<i>Enterococcus</i> species																		
<i>E. faecalis</i>	ATCC 19433 ^T	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. caccae</i>	DSM 19114 ^T	+	-	+	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. cecorum</i>	JCM 8724 ^T	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. sulfureus</i>	DSM 6905 ^T	+	-	-	-	+	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. italicus</i>	DSM 15952 ^T	+	-	-	-	+	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. casseliflavus</i>	JCM 8723 ^T	+	-	-	-	-	+	-	-	-	±	-	-	±	-	-	-	-
<i>E. gallinarum</i>	JCM 8728 ^T	+	-	-	-	-	+	-	-	-	±	-	-	±	-	-	-	-
<i>E. flavescens</i>	ATCC 49996 ^T	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. avium</i>	JCM 8722 ^T	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. pseudoavium</i>	JCM 8732 ^T	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. malodoratus</i>	JCM 8730 ^T	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. gilvus</i>	DSM 15689 ^T	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. raffinosus</i>	JCM 8733 ^T	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. dispar</i>	DSM 6630 ^T	+	-	-	-	-	±	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. durans</i>	GIFU 9960 ^T	+	-	-	-	-	±	-	±	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. mundtii</i>	JCM 8731 ^T	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecium</i>	ATCC 19434 ^T	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. hirae</i>	ATCC 8043 ^T	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus</i> species																		
<i>S. agalactiae</i>	JCM 5671 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	DSM 20662 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	LMG 16026 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. pyogenes</i>	ATCC 12344 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	±	-	-	-	-
<i>S. canis</i>	DSM 20715 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i>	DSM 20561 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. mitis</i>	GIFU 12458 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>S. pneumoniae</i>	DSM 20566 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>S. oralis</i>	DSM 20627 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	±	-	-	-	-
<i>S. sanguinis</i>	JCM 5708 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. gordonii</i>	DSM 6777 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. intermedius</i>	JCM 12996 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. anginosus</i>	DSM 20563 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	JCM 5707 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-

TABLE 3-2. 16S or 23S rRNA gene-targeted primers used in this study

Target ^a	Primer	Sequence (5'-3')	Product size ^b (bp)	Annealing temp (°C)	Reference
<i>Enterococcus</i> genus	g-Encoc-F	ATCAGAGGGGAT AACACTT	336	55	Table 2-2
	g-Encoc-R	ACTCTCATCCTT GTTCTTCTC			
<i>Enterococcus faecalis</i>	s-Efs-F	CCGAGT GCTTGC ACTCAAT TGG	419	60	This study
	s-Efs-R	AGGGGACGTT CAGTTACT AACGT			
<i>Enterococcus caccae</i>	s-Ecacc-F	CCGCATAAT AGT CGACACC	318	60	This study
	s-Ecacc-R	GTCAAGGT AAGAGCAGT TACTCTCCTA			
<i>Enterococcus cecorum</i>	s-Ececo-F	TTCATT TACCGCATGGT AGATGGAT	311	60	This study
	s-Ececo-R	CCGTCAAGGGAT GAAC T TCCAC			
<i>Enterococcus sulfureus</i> subgroup	sg-Esulf-F	TTCTTTCTT ATCGAACTTCGGT TCA	410	60	This study
	sg-Esulf-R	ACTCTCATCCTT GTTCTTCTC			
<i>Enterococcus casseliflavus</i> subgroup	sg-Ecass-F	CACTATTTT CCGCATGGAAGAAAG	311	60	This study
	sg-Ecass-R	CCGTCAAGGGAT GAACATTTT AC			
<i>Enterococcus avium</i> subgroup	sg-Eavi-F	CAGCATCTTTT ATAGGATGTTACTTTTCA	213	60	This study
	sg-Eavi-R	GGTCTTCGACT ATCTCACTGG			
<i>Enterococcus dispar</i>	s-Edis-F	CCGCATAAT ATT AATGA ACTCATGTTT	318	60	This study
	s-Edis-R	CCGTCAAGGGAT GAACATTTT AC			
<i>Enterococcus faecium</i> subgroup	sg-Efm-F	AGCTTGCTCCACCGAAAAAGA	164	60	This study
	sg-Efm-R	ATCCATCAGCGACACCSKAA			
<i>Enterococcus faecium</i>	s-Efm-F	GTCTGTCCAAGCAGT AAGTCTGAAGAG	65	60	This study
	s-Efm-R	CATCACAGCTTGT CCTT AAGAAAAAG			
<i>Streptococcus</i> genus	g-Str-F	AGCTTAGAAGCAGCTATT CATT C	309	60	110
	g-Str-R	GGATACACCTTT CGGTCTCTC			
<i>Streptococcus agalactiae</i>	s-Sag-F	GTTATTT AAAAGGAGCAATTGCTT	285	60	110
	s-Sag-R	TTGGTAGATTTT CCACTCCTACCA			
<i>Streptococcus pyogenes</i>	s-Spy-F	AAGAGAGACT AACGCATGTTAGT AATTT	443	60	110
	s-Spy-R	AATGCCTTTA ACTT CAGACTTAAAAA			
<i>Streptococcus pneumoniae</i> / <i>S. mitis</i>	s-Spn-F	CAATGTGGACTCAAAGATT ATAGAAGAATG	396	60	110
	s-Spn-R	GT CATGATACTAAGGCCCCCTA			
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> / <i>thermophilus</i>	s-Ssal-F	CAATGGATGACACATGTCATTTAT	682	60	This study
	s-Ssal-R	GGCACTGAATCCCGAAAGGATCC			
<i>Lactococcus lactis</i> subgroup	sg-Lclac-F	TGTAGGGAGCT AT AAGTTCTCTGTA	613	60	This study
	sg-Lclac-R	GGCAACCTACTT YGGGTACTCCC			
<i>Lactococcus piscium</i> subgroup	sg-Lcpis-F	GCTATCCAGCCCTAAGTGA	614	60	This study
	sg-Lcpis-R	AAAGGTTAGCTCACC GGCTTGGGT A			

^a Specific primer sets were developed using 16S rRNA gene sequences, except for sg-Eavi-F/R, s-Efm-F/R, g-Str-F/R and s-Spn-F/R, which target the 23S rRNA gene.

^b RNAs extracted from the standard strains described in Materials and Methods were used as RT-qPCR controls.

TABLE 3-3. Quantification of *Enterococcus*, *Streptococcus*, and *Lactococcus* in human feces by RT-qPCR

Subject ^b	Bacterial counts (log ₁₀ cells/g feces) ^a , measured by RT-qPCR with the primer set described in parentheses.				
	<i>Enterococcus</i> (g-Encoc-F/R)	<i>Streptococcus</i> (g-Str-F/R)	<i>Lactococcus</i>		
			Total ^c	<i>L. lactis</i> subgroup (sg-Lclac-F/R)	<i>L. piscium</i> subgroup (sg-Lcpis-F/R)
1	3.9	6.1	ND	ND	ND
2	7.0	6.4	ND	ND	ND
3	5.3	8.3	ND	ND	ND
4	7.1	7.7	3.1	ND	3.1
5	4.0	8.9	ND	ND	ND
6	8.0	6.8	ND	ND	ND
7	5.0	8.1	6.0	6.0	ND
8	6.2	8.5	5.2	5.2	ND
9	7.0	7.9	ND	ND	ND
10	6.0	8.2	ND	ND	ND
11	9.3	7.2	3.2	3.2	ND
12	6.6	6.8	ND	ND	ND
13	6.8	7.9	5.1	5.1	ND
14	6.3	5.9	ND	ND	ND
15	5.4	7.8	ND	ND	ND
16	8.3	7.8	ND	ND	ND
17	5.1	6.6	ND	ND	ND
18	5.3	7.4	ND	ND	ND
19	3.6	7.9	ND	ND	ND
20	7.2	9.1	5.3	5.3	ND
21	7.6	7.7	ND	ND	ND
22	6.5	7.4	5.3	ND	5.3
23	5.0	7.7	3.3	ND	3.3
24	5.5	5.9	ND	ND	ND
Mean ± SD	6.2 ± 1.4	7.5 ± 0.9	4.6 ± 1.2	5.0 ± 1.0	3.9 ± 1.2
Det. ratio (%)	100	100	33	21	13

^a The counts obtained by RT-qPCR are expressed as the number of log₁₀ bacterial cells. ND, not detected.

^b Fecal samples were collected from 24 healthy Japanese adults (15 males and 9 females; ages, 20 to 65 years [average, 39 ± 13 years]). The means and standard deviations for the 24 subjects and the detection (Det.) ratios are expressed at the bottom.

^c The total counts of organisms belonging to *Lactococcus* species are expressed as the sum of the counts determined by sg-Lclac-F/R and sg-Lcpis-F/R primer sets.

TABLE 3-4. Quantification of *Enterococcus* species subgroups in human feces by RT-qPCR

Subject ^b	Bacterial counts (log ₁₀ cells/g feces) ^a , measured by RT-qPCR with the following primer set:											
	g-Encoc-F/R	Species- or subgroup-specific primer set										
		Total ^c	sg-Eavi-F/R	sg-Efm-F/R ^d	s-Efm-F/R ^e	s-Efs-F/R	sg-Ecass-F/R	s-Ecacc-F/R	s-Edis-F/R	sg-Esulf-F/R	s-Ececo-F/R	
1	3.9	3.4	3.4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	7.0	6.9	6.9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	5.3	4.8	3.9	4.8	4.9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	7.1	6.8	6.8	ND	4.0	3.4	4.1	ND	ND	ND	ND	ND
5	4.0	4.0	ND	ND	ND	4.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	8.0	8.2	5.9	8.2	8.3	5.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	5.0	5.0	ND	ND	ND	4.9	3.6	ND	ND	ND	ND	ND
8	6.2	6.2	6.2	5.4	5.6	ND	ND	4.0	ND	ND	ND	ND
9	7.0	7.0	7.0	ND	ND	4.9	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10	6.0	5.9	ND	5.8	6.0	4.1	3.4	ND	ND	ND	ND	ND
11	9.3	9.5	ND	9.5	9.5	7.7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	6.6	6.3	4.9	6.1	ND	5.8	4.8	ND	ND	ND	ND	ND
13	6.8	6.2	6.0	5.4	5.5	ND	5.3	ND	ND	ND	ND	ND
14	6.3	6.0	ND	6.0	6.2	ND	3.2	ND	ND	ND	ND	ND
15	5.4	5.1	5.1	4.3	4.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16	8.3	7.8	7.8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
17	5.1	4.6	4.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	5.3	5.0	4.9	ND	ND	4.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
19	3.6	3.1	3.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20	7.2	7.4	3.1	4.3	4.1	7.4	5.3	ND	ND	ND	ND	ND
21	7.6	7.4	7.4	5.4	5.4	ND	5.7	ND	ND	ND	ND	ND
22	6.5	6.3	6.3	ND	ND	5.4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
23	5.0	4.5	4.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
24	5.5	5.2	5.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Mean ± SD	6.2 ± 1.4	5.9 ± 1.5	5.4 ± 1.4	5.9 ± 1.6	5.8 ± 1.7	5.2 ± 1.4	4.4 ± 1.0	4.0				
Det. ratio (%)	100	100	79	46	46	46	33	4	0	0	0	0

^a The counts obtained by RT-qPCR are expressed as the number of log₁₀ bacterial cells. ND, not detected.

^b Fecal samples were collected from 24 healthy Japanese adults (15 males and 9 females; ages, 20 to 65 years [average, 39 ± 13 years]). The means and standard deviations for the 24 subjects and the detection (Det.) ratios are expressed at the bottom.

^c The total counts of organisms belonging to *Enterococcus* species are expressed as the sum of the counts determined by sg-Eavi-F/R, sg-Efm-F/R, s-Efs-F/R, sg-Ecass-F/R, s-Ecacc-F/R, s-Edis-F/R, sg-Esulf-F/R and s-Ececo-F/R primer sets.

^d The counts are for *E. faecium* subgroup species (*E. faecium*, *E. durans*, *E. mundtii*, and *E. hirae*).

^e The counts are for *E. faecium* species.

TABLE 3-5. Quantification of *Streptococcus* species in human feces by RT-qPCR

Subject ^b	Bacterial counts (log ₁₀ cells/g feces) ^a , measured by RT-qPCR with the following primer set:					
	g-Str-F/R	Species-specific primer set				
		Total ^c	s-Ssal-F/R	s-Spn-F/R	s-Sag-F/R	s-Spy-F/R
1	6.1	6.3	6.2	5.4	ND	ND
2	6.4	6.4	6.4	4.9	ND	ND
3	8.3	7.4	7.4	6.3	ND	ND
4	7.7	7.2	7.2	5.4	ND	ND
5	8.9	7.2	7.1	5.7	ND	ND
6	6.8	7.2	7.2	5.3	4.3	ND
7	8.1	8.0	8.0	6.3	5.6	ND
8	8.5	8.9	8.9	7.1	ND	ND
9	7.9	7.6	7.6	5.8	ND	ND
10	8.2	8.2	8.2	6.6	ND	ND
11	7.2	7.4	7.4	5.3	ND	ND
12	6.8	7.0	7.0	4.6	ND	ND
13	7.9	8.1	8.1	4.8	ND	ND
14	5.9	6.1	6.1	4.8	ND	ND
15	7.8	7.6	7.6	5.6	4.1	ND
16	7.8	7.8	7.8	5.5	ND	ND
17	6.6	7.0	7.0	4.7	5.1	ND
18	7.4	7.4	7.4	5.9	ND	ND
19	7.9	7.7	7.7	5.4	ND	ND
20	9.1	8.8	8.8	7.6	5.5	ND
21	7.7	7.6	7.5	6.1	ND	ND
22	7.4	7.2	7.2	6.1	ND	ND
23	7.7	7.5	7.5	6.2	4.6	ND
24	5.9	5.8	5.8	4.9	4.8	ND
Mean ± SD	7.5 ± 0.9	7.4 ± 0.8	7.4 ± 0.8	5.7 ± 0.8	4.9 ± 0.6	
Det. ratio (%)	100	100	100	100	29	0

^a The counts obtained by RT-qPCR are expressed as the number of log₁₀ bacterial cells. ND, not detected.

^b Fecal samples were collected from 24 healthy Japanese adults (15 males and 9 females; ages, 20 to 65 years [average, 39 ± 13 years]). The means and standard deviations for the 24 subjects and the detection (Det.) ratios are expressed at the bottom of the table.

^c The total counts of organisms belonging to *Streptococcus* species are expressed as the sum of the counts determined by s-Ssal-F/R, s-Spn-F/R, s-Sag-F/R, and s-Spy-F/R primer sets.

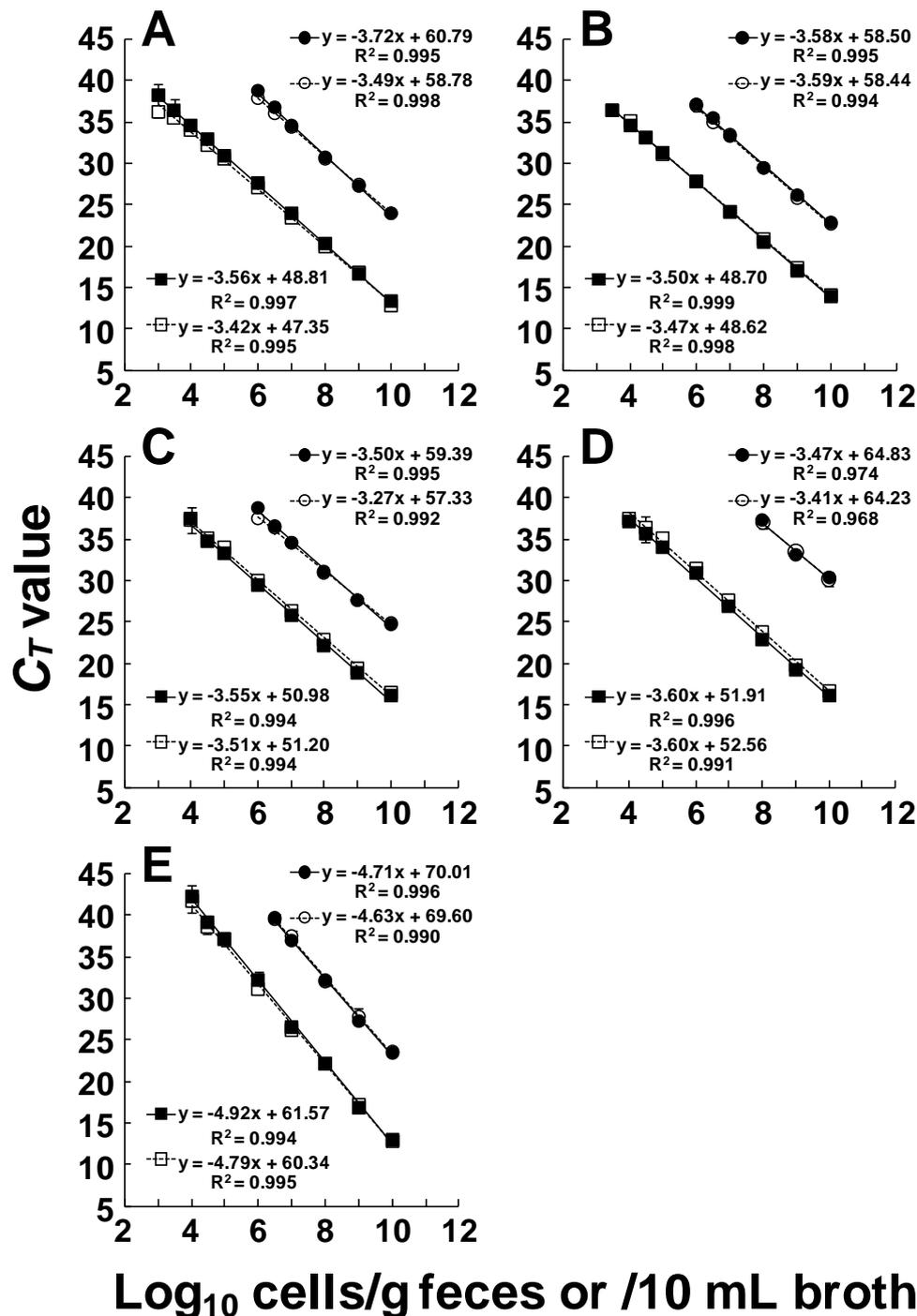


FIG. 3-1. Comparison of the quantitative detection of bacteria added to human feces by RT-qPCR and by qPCR. Fecal samples of a healthy adult supplemented with serial dilutions of *E. faecalis* ATCC 19433^T (A), *E. faecium* ATCC 19434^T (B), *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435^T (C), *L. piscium* DSM 6634^T (D), and *S. agalactiae* JCM 5671^T (E) at final concentrations ranging from 10³ to 10¹⁰ cells per g were assessed by RT-qPCR (□) and qPCR (○) using s-Efs-R/R, s-Efm-F/R, sg-Lclac-F/R, sg-Lcpis-F/R, and s-Sag-F/R, respectively. As a reference, MRS broths supplemented with the same serial dilutions at final concentrations ranging from 10³ to 10¹⁰ cells per 10 mL broth were also assessed by RT-qPCR (■) and qPCR (●).

Table S1. 腸内細菌叢解析手法の比較

	培養法	分子生物学的手法						
		RT-qPCR	qPCR	FISH	クローンライブラリー	ピロシーケンス	DGGE/TGGE	T-RFLP
検出感度 (CFU or cells/g)	>10 ²	>10 ²	>10 ⁵	>10 ⁸	>10 ⁸	>10 ⁶	>10 ⁸	>10 ⁸
定量性	高	高	高	高	高	高	半定量的	半定量的
特異性	菌株 ~	菌種 ~ 菌群	菌株 ~ 菌群	菌種 ~ 菌群				
精度	低	高	高	中	中	高	中	低
簡便性	難	中	中	難	難	中	難	易
備考	培養できる菌株に限られる	予め標的菌の配列情報が必要			未知菌を含めて解析することが可能			

謝 辞

本論文を作成するに当たり、御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました
東京大学大学院農学生命科学研究科・比較動物医科学講座 伊藤 喜久治 教授に
厚く御礼申し上げます。

本研究の機会を与えて下さいました、株式会社ヤクルト本社中央研究所
澤田 治司 所長、石川 文保 所長代理、田中 隆一郎 顧問に深く感謝致します。

本研究の遂行に当たり、株式会社ヤクルト本社中央研究所 野本 康二 主席研
究員、諸富 正巳 特別研究員、梅崎 良則 特別研究員、高橋 琢也 主任研究員、
辻 浩和 主任研究員、朝原 崇 主任研究員には数多くの御指導、御鞭撻を頂き
ました。また、松本 一政 主任研究員、高田 敏彦 主任研究員、松木 隆広
主任研究員、角 有希子 主事補、倉川 尚 研究員、久保田 博之 研究員には
数多くの貴重な御助言を頂きました。ここに深く感謝の意を表します。

さらに、日頃から多大なる御協力を頂きました、株式会社ヤクルト本社中央
研究所 基礎研究二部の皆様に深く感謝致します。

最後に、本研究を蔭から支えてくれた家族とその暖かい励ましに心より感謝
します。

2012 年 2 月