

## 腸内フローラの同定：DNAプローブとプライマー

江崎 孝行\*, 大楠 清文\*

\*岐阜大学大学院医科学系病原体制御分野

### Identification of Intestinal Flora : DNA Probe and Primers

Takayuki EZAKI\*, Kiyofumi OHKUSU\*

\*Department of Microbiology, Gifu University Graduate School of Medicine, Yanagido 1-1, Gifu 501-1194, Japan

#### 細菌のDNAの抽出と精製

糞便から核酸を抽出する場合、フローラを形成する菌種には clostridia, lactobacilli, ruminococci などグラム陽性菌が多いので抽出にはこれらの菌の核酸もグラム陰性の bacteroides と抽出効率に差が出ない方法を採用すべきである。多くの抽出キットが市販されている (Table 1), アルカリ溶解や酵素だけを使った方法では核酸回収率に差が出るので我々は物理的破碎方法で菌を壊し、核酸を抽出している。

##### 1. 糞便の前処理

フローラを解析するための糞便は出来るだけ新鮮な糞便を使用し、凍結や冷蔵庫による保存を避ける。糞便を凍結すると溶解する際に菌が壊れ、核酸の回収率が低下し、定量解析ができなくなる。冷蔵庫保存でも一日保存しておくと、菌の自己融解が進み、定量解析に影響する。糞便内の菌数の偏りの影響を避けるため、我々は通常は 2 g の糞便を 18 ml のリン酸バッファーと混合し 10 倍のけん濁液を作成している。この過程で食物残渣のような大きな混入物も除去出来るので定量性が向上する。

けん濁液を 2 ml とり、菌体を遠心沈殿させ、沈査を Girconium beads を使って物理的破碎を行っている (Fig. 1)。保存が必要な場合はこの段階で市販されている核酸保存液や、Guanidinium 塩が入った RNA 抽出液 (19, Molecular) にけん濁すれば室温保存でも数週間は核酸の抽出効率は変わらない。Girconium Beads は Glass beads と異なり密度が 2 倍高く、破碎効率がよく

DNA を吸着しないという特色がある。グラム陽性菌とグラム陰性菌を Girconium beads で物理破碎を行う方法と行わない方法と比較すると、DNA の回収率に明らかな差が出てくる。我々は細胞破碎液には RNase の活性を押さえるため Guanidinium を含んだ溶解液を使用し、DNA と RNA を同時に回収する方法を採用している。通常は PCR で DNA を解析するが、生きた菌を解析するために、RNA も回収し、RT-PCR 法かあるいは NASBA 法 (Landry, ML, 2005) で RNA 増幅を行う方法にも利用できるようにしている。

沈査を Girconium beads で破碎後、フェノールで蛋白及び PCR の阻害物質を除き、エタノール沈殿させ、精製する方法を採用している。一度フェノール処理を行ったサンプルはシリカゲルをコートした市販の磁気ビーズで精製してもよい。

界面活性剤や酵素を使った破碎は菌種間の溶菌率の差が出てくることから定量解析には適さない。特にフローラを構成する菌群にはグラム陽性菌である *Firmicutes* 門や *Actinobacteria* 門の菌種が多いことから、グラム陰性菌との核酸の抽出効率に差が出ないような破碎方法を採用する必要がある (Table 2)。

界面活性剤や酵素での破壊後、シリカゲルをコートした磁気ビーズで精製するプロトコルが血液の細胞の DNA/RNA の回収に商品化されているが (Table 1), 我々は糞便から抽出した DNA/RNA の阻害物質を完全に取り除くには、フェノールによる処理を一度必ず行う必要があると考えている。エタノールで一度沈殿させたあと高い塩濃度液に DNA をけん濁し、シリカをコートした磁気ビーズで精製するかエタノールの洗浄を繰り返す。この段階ではシリカをコートした磁気ビーズの法が簡便である。

遺伝子増幅に使用する DNA/RNA は精製度が高くな

2005 年 12 月 7 日受付

\* 〒501-1194 岐阜市柳戸 1-1 1-1 Yanagido, Gifu 501-1194, Japan

Table 1. Bacterial nucleic acid extraction methods and kits

Lysis method and kits	Extractable nucleic acid	Comments
1 Guanidium based Lysis solution	RNA	Sambrook and Russel, 2001
2 Zirconium beads based lysis (MORA <sup>®</sup> extract kit)	DNA/RNA	AMR inc.
3 Lysis solution & Silica coated magnet beads (NucliSens <sup>®</sup> easy MAG <sup>™</sup> kit)	DNA/RNA	bioMérieux
4 Lysis solution & Column purification (QIAamp DNA Stool Mini Kit)	DNA	QIAGEN Inc
5 Beads & Column Method (UltraClean Microbial DNA isolation kit)	DNA	MO BIO Laboratories, Inc
6 Lysis solution & Silica beads	DNA	MERCK & Co. Inc
7 Lysis solution & DNA absorption filter (Extraction kit)	DNA	FUJIFILM

Table 2. Difference of DNA recovery before and after physical disruption

	Species	Strain	Lysis+Zirconium (A) μg/ml	Lysis only (B) μg/ml	A/B ratio
Gram negative	<i>Escherichia coli</i>	GTC 1061	117.4	51.2	1.89
	<i>Salmonella enterica</i> var. Enteritidis	GTC 133	104.3	76.5	1.36
Gram positive	<i>Staphylococcus aureus</i>	GTC1186	94.3	48.4	1.95
	<i>Bacillus cereus</i>	GTC1784	76.1	32.6	2.33
	<i>Clostridium botulinum</i> A	GTC1788	68.4	20.5	3.34
Fungi	<i>Candida albicans</i>	GTC1745	51.4	28.3	1.82
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	GTC1741	63.1	20.0	3.1



Fig. 1. Gironia tube and disruptors

Right Upper: Disruptor mini (Low power disruptor without safty box).

Right Lower: Multibeads shocker (High power disruptor with safty close box).

ければ定量は難しい。260 nmの吸光度だけでなく260/280を測定し、その比率が1.8以上であれば純度が高い。DNA測定の際に従来型の吸光度計を使うとコンタミの原因を作るので、我々は1 μlでDNA濃度が測定できる吸光度計 (Nanodrop Technologies Inc.) を使用

して測定に使用したDNAを使い捨てにしている。

## 2. 糞便からの核酸の抽出プロトコール例

### <前処理>

糞便2 gを18 mlPBSと混合し、糞便をよくけん濁する。約1-2分、静置し、上層2 mlを細菌検査へ。この操作で糞便を均一化し、検査の再現性をあげ、大きな食物残渣を除くことができる。

### <糞便処理>

- 2 ml容積のEppendorf tubeに2 mlの糞便けん濁液を加え、微量遠心機で15000 rpm、3分間遠心し、上澄みを捨てる。
- 沈殿に150 μlのGuanidiumが入ったLysis buffer (文献20参照)を加え、けん濁したのち、全量をBeadsが入ったScrew cap tubeに移す。
- 70-90℃で10分保ち、溶菌を促進する。  
\*RNAの場合70℃で処理、DNAの場合も通常70℃、グラム陽性菌のみを対象とする場合は90℃がより破碎効率がよい。この操作で無芽胞病原体はほぼ死滅する。
- しっかりと蓋を閉めたのちmultibeads shocker (安井器械)で、2500 rpm、60秒、振とう。  
\*他の機械の場合 FastPrep (Funakoshi) : 4.5,

- 60 sec, Smart Smash (Tomy) : 2500 rpm, 60 sec.
5. 破碎処理後, 200  $\mu$ l の final 0.1 % になるように Saline-EDTA SDS solution を加え, 再び 70 °C 10 分加温して溶菌を促進する.
  6. 400  $\mu$ l の Phenol-chloroform-isoamylalcohol (25:24:1) を加え, 1 分間ミキサーで振とうもしくは Vortex したのち 15000 rpm で 3 分間遠心し, 上澄みを粗 DNA 液として回収する.

### < DNA/RNA の精製 >

アルコール法もしくは Magnet beads 法で精製をおこなう.

Magnet beads による精製キットとして bioMerieux 社, 東洋紡, Promega 社など多くのキットが市販されている.

#### ・アルコール法による精製

1. 粗 DNA 液約 200  $\mu$ l を 2 ml 容積の Eppendorf tube に移し, 99-100 % のエタノール 1000  $\mu$ l を加え, Vortex したのち, 15000 rpm, 3 分間遠心し, 上澄みを捨てる.
  2. 70 % のエタノール 1000  $\mu$ l を加え, 15000 rpm, 3 分間遠心し, 上澄みを pipetting で捨てる. 沈殿物 (DNA・RNA) を捨てないように上澄みのアルコールを取り除く.
- \* 70 % のエタノールを自作する場合は, 99-100 % のエタノールに RNase Free の蒸留水を加えて作成する
3. 200  $\mu$ l の RNase Free の蒸留水にけん濁する.
- \* DNA 濃度が濃すぎると RNA 増幅, および DNA 増幅反応が抑制されるので 2  $\mu$ l を Nanodrop を使って 260 nm, 280/260, 235 nm/260 nm の吸光度を記録し, 遺伝子増幅に適正な使用量を選択する.

PCR に使用する DNA は 20  $\mu$ l の反応系であれば 20 ng-50 ng/tube ぐらいが最適で, 96 well で PCR を行うと約 5  $\mu$ g が必要になる.

この方法では通常 100-200 ng/  $\mu$ l の DNA が回収できるので, 全量で 20-40  $\mu$ g の DNA が精製出来る. 96 種類の増幅反応には 5  $\mu$ g の DNA が必要だが十分量の核酸が回収されることになる.

活性のある生きた菌のみを解析するためには RNA を解析する.

RNase Free の蒸留水にけん濁し, RNase free の DNase で処理後, NASBA 法あるいは RT-PCR 法で RNA の増幅をおこなう.

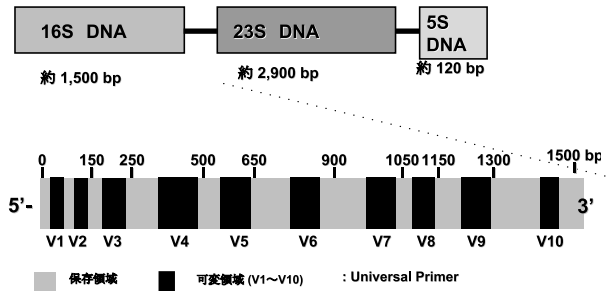


Fig. 2. 16S rDNA: Conserved area and hypervariable area.

### 菌種特異的プローブとプライマーの設計

細菌は 16S rDNA で系統分類されているのでこの遺伝子を使った primer の設計が最も容易である. 菌種に特異的な遺伝子はしばしば株単位で遺伝子の脱落があり, 菌種を特定できないことがある. 病原性の株を検出するのが目的ではないので種に良く保存された配列を選択する必要がある. 16S rDNA 配列はすべての細菌種が保有するので, その意味で 16S rDNA にかわる配列の蓄積はまだほど遠い.

16S rDNA 配列は Fig. 2 に示したごとく, 保存領域と, 可変領域があり, V (variable) と記載した場所が可変領域で 10 カ所存在する. そのうち V3, V10 は特に変化に富んでおり菌種に特異的な配列が含まれていることが多い. 一方, Genus に保存された配列を検索するにはその Genus に全菌種を比較し, さらにその属が含まれる Family の菌種を比較に使用しなければ Genus 特異的な配列は検索できない.

実際に 16S rDNA 配列を使用して特異配列のプローブをデザインする際の問題点は次の二つにある.

- (1) genus の菌種間の配列の違いが少なく菌種に特異的な配列を選択するのが困難
- (2) 株間, 及び一つの菌種の染色体に存在する複数の operon 間で配列に違いがある.

一番目の課題は腸内細菌科の菌種を識別する際に特に問題となる. *Klebsiella* 属に含まれている独立した菌種の 16S rDNA の配列はお互いに 98 % 以上類似しており, 菌種に特異的な配列を選択することは出来ない. 従ってこの属の 16S rDNA 配列を使う場合は菌種レベルでの特異配列のデザインは困難である.

一方, V3 の領域を使って菌種に特異的な配列を選択しようとする, 株ごとにこの領域の配列に違いがある場合が見られる. これは株間の配列の違いがある場合, 配列情報の測定エラー, あるいは登録された菌種の同定そのものが間違っている場合などがあり, 比較に出来る

だけ多くの株の情報を集めて、多重アラインメントの信頼度を上げる必要がある。

### 菌種に特異的なプローブ、プライマーのデザイン

ネット上に公開されている無料のソフトとして分類学者が系統樹の作成によく利用する Clustal Wあるいは Clustal Xソフトには多種類の遺伝子を比較する多重アラインメント機能があり便利である。しかしこのソフトにはプローブとプライマーのペアを最適化するサービスプログラムが付属していないので特異的な遺伝子増幅用の配列を見つける目的には適していない。逆にひとつの配列の中の最適なプライマーとプローブを自動検索してくれるソフトもネット上には無償で利用できる環境がある。しかしこちらは多数の菌株を使った多重アラインメントができないで、特異性の高いプローブをデザインすることはできない。

市販されているソフトでは多重アラインメントを行い、さらにプライマーとして最適な場所を自動検索してくれるので、多重アラインメントと最適なプライマーを選択する機能の両方をリンクさせるプログラムがなければ実用的なソフトにはならない。

多くの市販のソフトが存在するが、100種類のDNAの多重アラインメントができる DNASIS Pro (日立ソフト)を使った手順を記載する。DNASIS Proではプライマーのデザインでユーザーが設定できる基本条件はプライマーの長さ、増幅産物の長さ、プライマーのTmの範囲、増幅産物のTm等でそのほかはソフトが自動的に最適な場所を決定してくれる。菌種に特異的なプローブを選択する場合は、可能な限りの同一菌種の株の配列、同一属の独立した菌種をデータベースから収集し、多重アラインメントを行う。

ソフトはユーザーが設定した条件の中でPCRに最適な配列を自動的に選択するので、選択された配列が特異的かどうかを多重アラインメントされた配列から確認する。株間で保存され、菌種間で特異性が確認されたら、配列をネット上のデータベースでBlast検索を行い、登録されたデータで同一性を確認する。同一性検索の結果その菌種の株間で100%一致し、他の独立した菌種と同一性がないことが確認されれば、特異プローブのデザインは完了したことになる。実際にデザインしたプローブがin situで利用できるかは基準株や野生株を使って特異性の検証を行なう。プローブの立体構造や相手の標的菌種の配列に影響され、予測どおりの反応がおきない場合もある。

ソフトが自動的に検索したプライマーも実際に特異的に増幅できるかを当該菌種のDNAを使って確認し、類

縁の菌種では増えないことを実証しなければプライマーとして使用できない。最後の確認は感度の検定が必要で最適なプライマーを選択しても予測どおりの感度がでるとは限らない。16S rDNAの配列から最適なプライマーをプログラムで自動選択する場合、菌種間の配列が類似しているため、特異性のある場所から外れた領域をソフトウェアが選択することがしばしばある。

以下具体的に手順を説明する。

Fig. 3に示したようにV3領域をグラム陽性の *Firmicutes* 門と *Actinobacteria* 門の菌種で比較を行うと保存領域と可変領域が見えてくる。両方の可変領域には含まれた領域が可変領域になり、菌種に特異的な配列はこの領域で見つかることが多い。

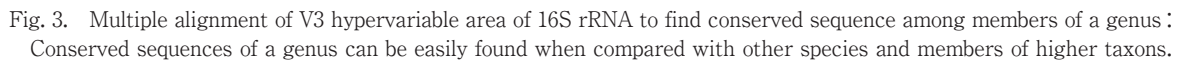
しかしこのアラインメントで菌種特異的な配列を選択するのは危険で、菌種特異的な配列は検索するには、ひとつの菌種に複数の株を使用し、さらに同一属内の類縁の菌種の配列をアラインメントに使用して比較する必要がある。

属内に50種類以上の菌種が分類され、菌種間の類似度に関する情報がない場合は、まず分類学上の基準種 type strainの配列をネット上のデータベース (DDBJ, NCBI, EMBL) から抽出し、多重アラインメントを行い、ソフトに付随している系統樹作成プログラム (通常はNJ法) を作成し、菌縁関係にある菌種の情報を収集する。

次のステップでソフトの容量内でできるだけ沢山の株を使い同一菌種の株と類縁関係の菌種の多重アラインメントを行う。Fig. 4には *Ruminococcus* 属の菌種で複数の株を使った多重アラインメントの結果を示している。各菌種の株に保存されている領域と類縁菌種と異なった領域が明瞭に見えてくる。

前述したようにこの領域のアラインメントから特異的なプローブ (18から24塩基) は肉眼で容易に選択できるが、プライマーをソフトに自動選択させても最適な領域が選択されるとは限らない。ソフトではForwardとReverseプライマーの配列からやTmや、相補配列の有無を自動計算し、最適なプライマーの組み合わせを抽出するようになっている。

Fig. 5では増幅産物を120塩基以内に設定してプライマーを自動選択させた結果を示している。最適なプライマーと内部のプローブ領域を矢印で表示してある。ソフトではひとつの菌種の塩基配列を元に指定された条件内で最適なプライマーを選択するだけで、他の菌種と比較して特異的な部分を自動選択するわけではない。そこで選択された領域の特異性を多重アラインメントを行った



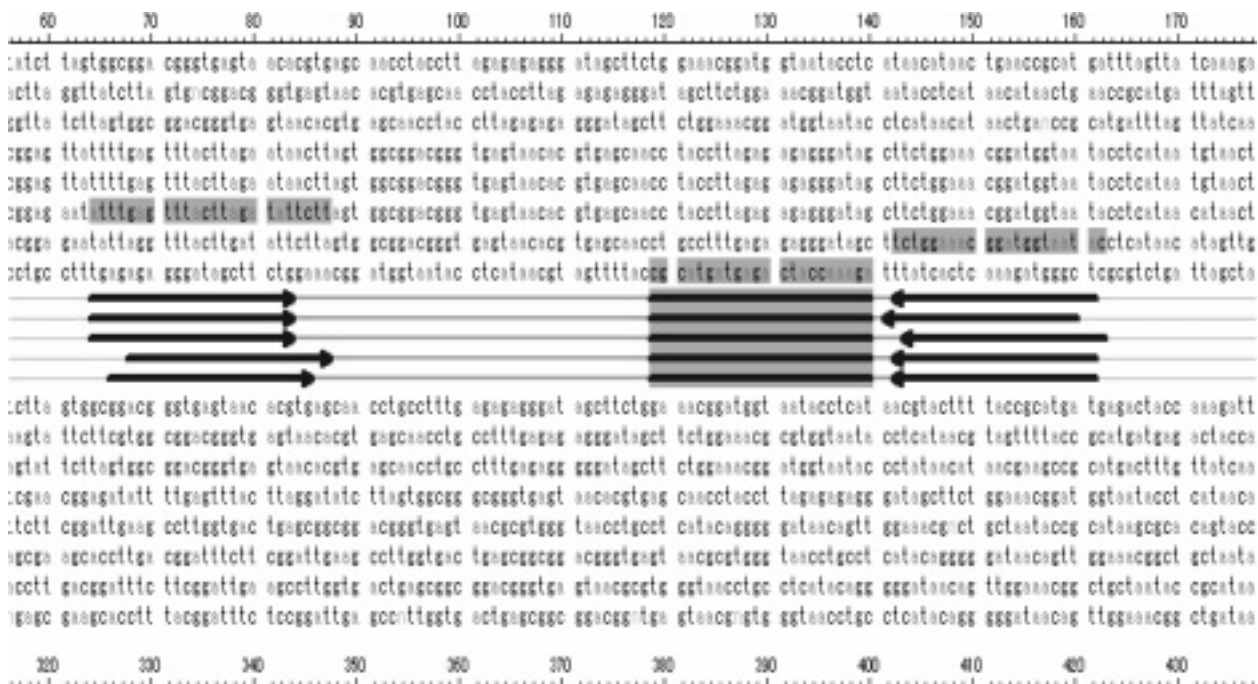


Fig. 5. Primer design software usually cannot select specific primers because the software selects only best area for amplification without comparing sequences of other species.

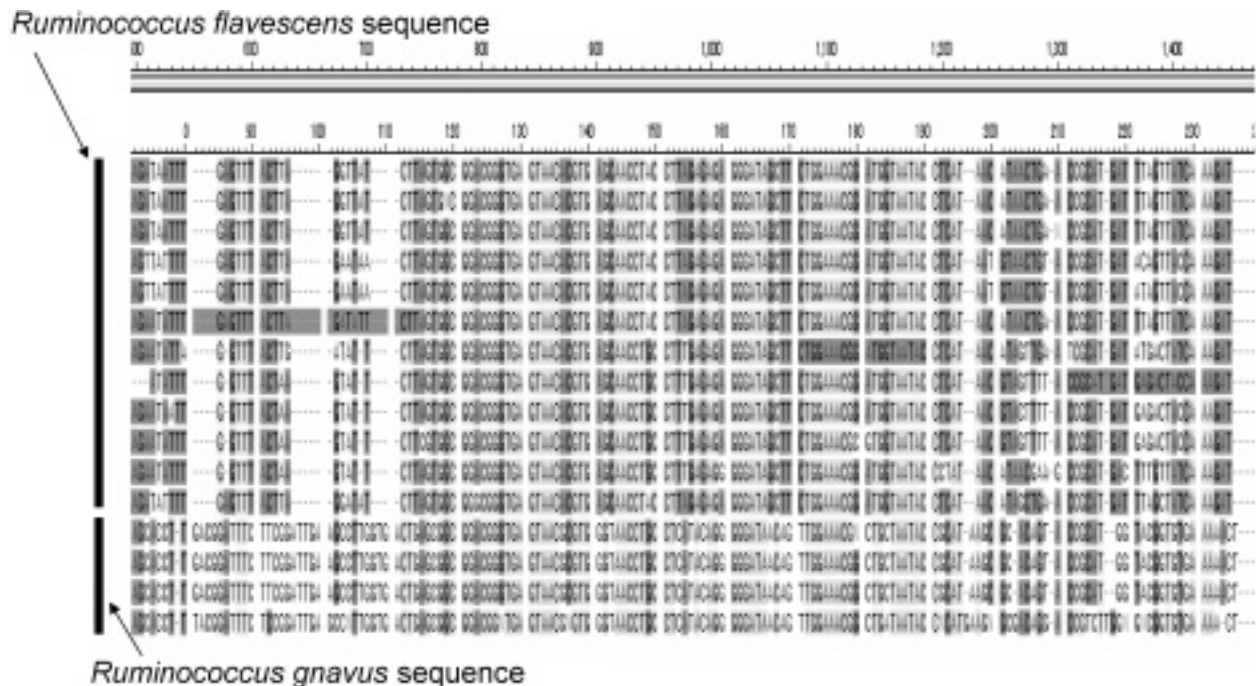


Fig. 6. After designing primers, confirm the sequence conservation using multiple alignment software and data set of strains within a species.

画面 (Fig. 4) から確認する作業が必要になる。

Fig. 6 には選択した領域の特異性を確認した。この画面からわかるように同一菌種のすべてを増幅する場所を

選択していない。さらにプローブ領域は同一属のほかの菌種にも共通の配列で特異プローブとはいえない。

この手順を逆に特異的な領域を先に決定し、Tmや相

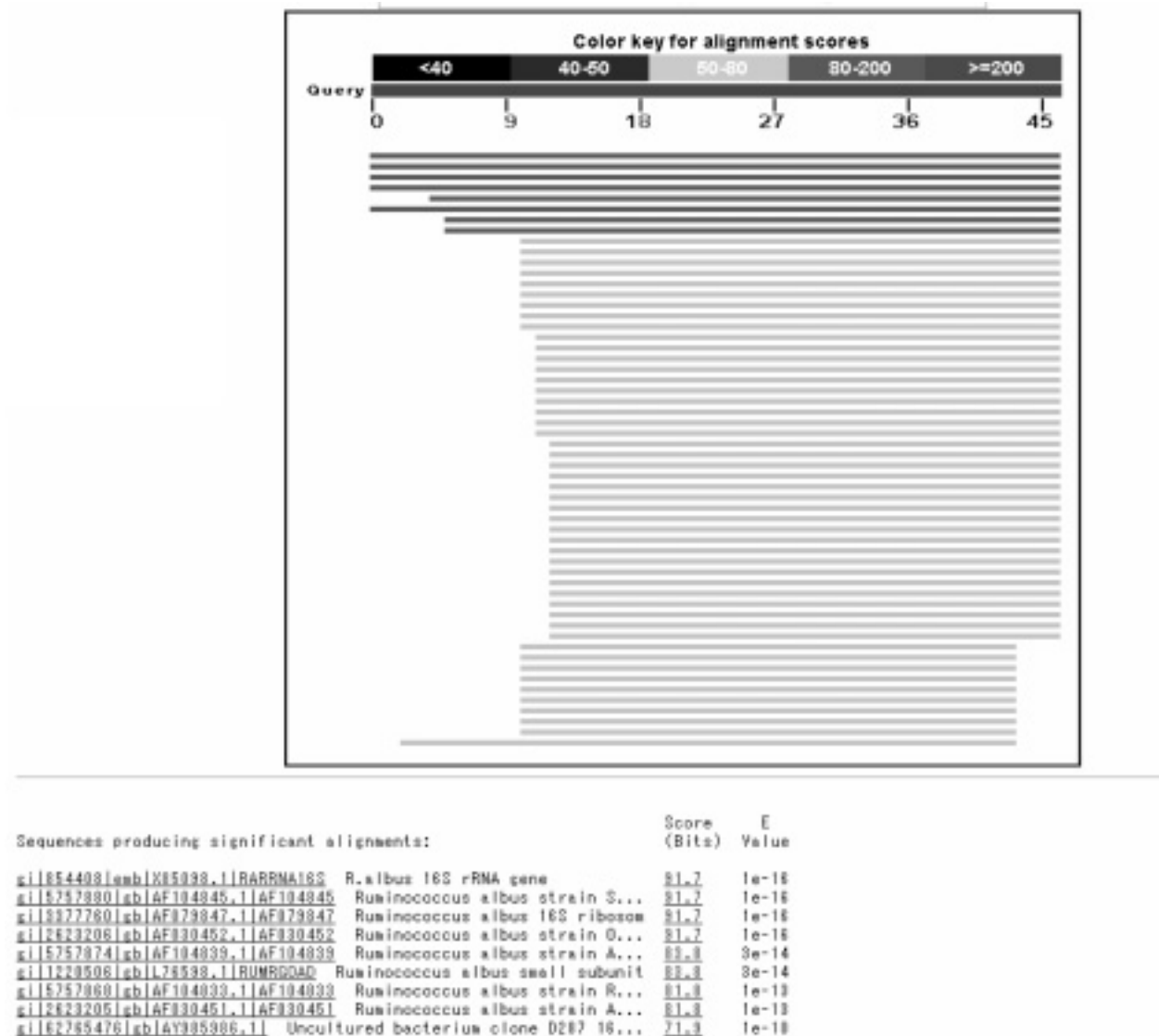


Fig. 7. Search the primer sequence through Blast to find sequence variation among strains within a species. A strain of *R. albus* in the figure cannot be amplified with designed primer.

補配列を無視し、プライマーを選択することもできる。これは分離された菌の同定確認に利用する場合のプライマーセットを作成する場合には使用可能になるが、糞便から直接増幅する目的に使用すると、感度の問題が出てきて実用的なプライマーとして機能するとは限らないので、糞便を用いた実際の検証が必要になる。

選定したプライマーの特異性は上記の分類体系の流れに沿って作成すれば、ほとんどの場合特異的なデザインが出来上がっている。しかし菌種の比較配列情報が少ない場合、あるいは16S rDNA以外の遺伝子を使った場合は、特異性の確認をインターネットのデータベースに登録された配列とのホモロジー検索が必要になってくる

(Fig.7). *Ruminococcus albus* のプローブをインターネット上のサービスプログラムBlastを使って検索した結果、一部の菌株でホモロジーが低く、すべての株を検出できないことが、わかる。しかし、このプローブが駄目と判断する前に、間違った菌種名が記載されている場合があるので、全領域の配列データを取り出し、菌種名が正確かどうかを再びアラインメントをおこない、判断する必要がある。

### Nested PCRのプライマーのデザイン

検出の感度を上げるためにPCRのプライマーを同一範囲内で2箇所設定し増幅すると10倍から時には100倍

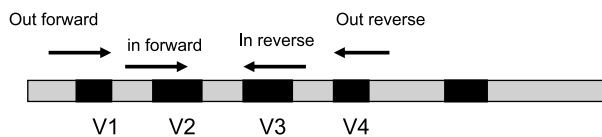


Fig. 8. Nested PCR

感度が上昇する。一回目をアウタープライマーで増幅し、増幅産物を電気泳動で確認しても見えなくとも微量の増幅産物があれば、二度目のインナープライマーで増幅産物が確認できるぐらいまで増幅する場合がある。Fig. 8のごとく、最初 Out forward, Out reverse で増幅する。通常は増幅産物を Fig. 2 の V1, V4, 5 の領域、あるいは V7-V10 の領域から選択する。二度目の Inner forward, Inner reverse を V2, V3, もしくは V8-V9 から選択し増幅する。

16S rDNA を検出に使用する場合、可変領域に制限があるので、上記のようにプライマーの設定部位が制限される欠点がある。場所の特性から一回目の産物が 400-500 塩基程度、二度目の増幅が 120-300 塩基程度になる。

このような方法で Nested PCR をデザインすると 2 回目の増幅産物を特異的に確認するプローブのデザインができなくなる。そこでアウタープライマーの片方を属に普遍的な領域から選択し、可変領域をインナープローブの検出に温存した設計をすればプローブのデザインも可能になる。

アウタープライマーをさらに細菌すべてに共通なユニバーサルプライマー (Table 3) 領域で増幅する方法もあるが、この方法を糞便のような多種類の微生物が存在するようなサンプルに利用すると、優位な菌の増幅のみが強調される。同じ属に分類される 2 種類の菌種をユニバーサルプライマーで増幅すると 2 種類の DNA の混合比が一万対 1 以上に開くと少ないほうのシグナルが増幅できなくなる。それに対して菌種に特異的なプライマー

を選択すると百万対 1 の比率で菌が存在しても少ないほうのシグナルを検出できる。

Nested PCR 法を使用する際の問題点はコンタミネーションである。一度目の PCR 反応が終わった後、増幅産物を 2 回目のインナープライマーが入ったチューブに移す操作があるが、チューブの蓋を開ける操作で、一度増幅産物がエアゾルとして実験室に飛散すると、次のチューブの開封時に混入する。

このコンタミネーションを避けるための工夫として 2 つの解決方法がとられている。

- (1) 増幅する際の塩基に T の代わりに U を使用する。増幅産物は必ず U が入り込むため、PCR を行う前にウラシル-グルコシダーゼで U を含んだ増幅産物を分解して、95℃ で酵素を不活化させてから次の増幅を行う方法で、ロッシュ社の PCR キットにはこの方法が採用されている。
- (2) 作業スペースを分割する。材料のから核酸を抽出する部屋、遺伝子増幅試薬を増幅チューブに移す部屋、増幅を行い産物を確認する部屋と 3 つの部屋に仕事エリアを分割し、増幅産物の混入を避ける。

市販のキットの多くはプローブとプライマーが混合され増幅と同時に増幅がモニターできるリアルタイム PCR が主流になりつつあるため増幅産物が入ったチューブの蓋を開ける必要はない。研究室では独自のプライマーやプローブを使うので蓋を開けるのを前提に実験室の使用方法を工夫する必要がある。われわれは実験を 3 つの異なった部屋で実施するようにした結果、コンタミネーションの課題は (2) の対応だけでほとんど克服できた。

さらにピペットを実験室ごとに準備、チップにフィルターがついたものを使用しバブルが崩壊してもフィルターでブロックできるようにするなどの工夫が必要になる。

Table 3. Universal primers to amplify 16S rDNA

Probe name	sequence	reference
27 Forward	5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Delong 1992
1492 Reverse	5-GGTTACCTTGTTACGACTT	Delong 1992
519 Reverse	5-ATTACCGCGGCKGCTG	Stackebrandt 1991
519 Forward	5-CAGCMGCCGCGGTAAT	Stackebrandt 1991
774 Forward	5-GTAGTCCACGCTGTAACGATG	Stackebrandt 1991
774 Reverse	5-CATCGTTTACAGCGTGACTAC	Stackebrandt 1991
907 Forward	5-AAACTYAAAKGAATTGACGG	Stackebrandt 1991
907 Reverse	5-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT	Stackebrandt 1991

Number of probe names represent the position of 16S rDNA of *E. coli*.

## ハイブリダイゼーション

オリゴプローブを使ったハイブリダイゼーションには多くの記載がある。

16S rDNAから菌種に特異的オリゴプローブ、属に特異的なプローブ、Phylum門レベルで共通なプローブ、Bacteriaに共通なプローブ等が多くデザインされている(1)。腸内フローラの解析にこれらのプローブを使用し *in situ* hybridization法で糞便から集菌した菌体を識別する FISH法 がとられている。*Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* *Clostridium*, *Veillonella*,

*fibrobacteri*, および *Ruminococcus* などが代表的な記載されたプローブ (7, 13, 30) で Table 4 に示した。

これらの報告は、膨大な数の菌種をプローブで識別するために多くのプローブを必要とするので菌種より、属レベル、あるいは数種類の属にまたがったグループレベルのプローブでひとまとめにして解析する方法を採用していることが多い。

糞便の定量解析データを見ると乾燥重量あたり  $10^7$ – $10^{11}$  cells/g レベルまで解析されており、 $10^7$  cells/g は解析糞便の最大の菌数が  $10^{11}$  cells/g あった場合の一万分の1に相当し、ユニバーサルプライマーを使用して糞便の菌を増殖させクローニングをおこなう解析方法と

Table 4. Probes reported to analyse intestinal flora

Probe name	Species	Probe sequence	reference
Phasco741	Phascolarctobacterium faecium Acidaminococcus fermentans Succiniclasticum ruminis	5-TCAGCGTCAGACACAGTC	Harmsen et al. 2002
Vei223	Veillonella dispar,V. parvula,V. atypica	5-AGACGCAATCCCCTCCTT	Harmsen et al. 2002
Eha1469	Eubacterium hallii Clostridium herbivorans, C. polysaccharolyticum	5-CCAGTTACCGGCTCCACC	
Lach571	Lacnospira multipara, L. pectinoschiza Eubacterium eligens	5-GCCACCTACACTCCCTTT	Harmsen et al. 2002
Ecyl387	Eubacterium cylindroides, E. biforme, E. tortuosum, E. dolichum, Clostridium innocuum Streptococcus pleomorphus	5-CGCGGCATTGCTCGTTCA	Harmsen et al. 2002
Rfla729	Ruminococcus albus, R. flavefaciens	5-AAAGCCCAGTAAGCCGCC	Harmsen et al. 2002
Rro730	Clostridium sporosphaeroides, C. leptum Ruminococcus bromii	5-TAAAGCCCAGYAGGCCGC	Harmsen et al. 2002
Ecoli 1531	Enterobacteriaceae	5-CACCGTAGTGCCTCGTCATCA	Pouslen, et al. 1995
Bfra0602	Bacteroides fragilis group	5-GAGCCGCAAACCTTTCACAA	Franks et al. 1998
Bdis656	Bacteroides distasonis group	5-CCGCCTGCCTCAAACATA	Franks et al. 1998
Strc0493	Streptococcus salivarius,S. oralis,S.mutans, S. equi, S. intermedius, Lactococcus lactis Leuconostoc lactis, Weisseria kandleri	5-GTTAGCCGTCCCTTTCTGG	Franks et al. 1998
Bif164	Bifidobacterium	5-CATCCGGCATTACCACCC	Langendijk, et al. 1995
Erec482	Eubacterium rectale Bifidobacterium fibrisolvens Clostridium coccoides	5-GCTTCTTAGTCARGTACCG	Franks et al. 1998
Clit0135	Clostridium lituesburense, C. difficile, C. bif fermentans Eubacterium tenue	5-GTTATCCGTGTGTACAGGG	Franks et al. 1998
Clhis0150	Clostridium histolyticum, C. beijerinckii, C. perfringens C. botulinum, C. kluyveri Flexibacter canadensis	5-TTATGCGGTATTAATCTYCCTTT	Franks et al. 1998
Uni 515	Bacteria universal	5-GTATTACCGCGGCTGCTG	Langendijk, et al. 1995
Uni 8	Bacteria universal	5-ACGGGCGGTGTGTRC	Delong 1992
Archaea	Archaea universal	5-GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	Delong 1992

比較すると10000個のクローンを解析したのに相当する精度に到達している。記載されたプローブは各々独自のハイブリッド条件で実施しなければならない。フォルムアミド濃度、ハイブリッドの温度条件はプローブごとに異なっておりすべてを同時に実施することはできない。

同一条件で実施できるものには複数の蛍光色素を組み合わせて実施できるが蛍光の種類に制限があり、表のすべてを同時に解析できる環境は構築されていない。

フローラを構成する多種類の菌種を対象にプローブを作成し、アレイで同時に数百種類のフローラの解析を行う方法も開発されている (5, 15, 28, 30)。

16S rDNAのV3領域の配列からフローラを構成する菌種のオリゴプローブをデザインし、プローブのTmをあわせて、アレイに固定する。

すべての細菌に共通なユニバーサルプライマー (Table 3) で糞便のDNAを増幅し、アンチセンス配列を蛍光標識し、スライドに固定したプローブとハイブリッドを形成させる。感度を上げるために通常は18時間、ハイブリッドを形成させ、スライド上のプローブと結合した蛍光プローブをレーザスキャナーで計測する。

この方法では同時に数百種類から数千種類のターゲットと反応させることができるので、フローラ解析に適している。我々は一千種類のプローブを搭載し、解析しているが、ヒトの糞便では通常150-250種類の菌種のシグナルを捕捉することができる。しかし定量PCRに比較し、どのレベルのシグナルが陰性になるのか判断は難しいので、バックグラウンドのノイズの平均値から、実験ごとに切り捨てるシグナルの値 (カットオフ値) を設定に一定の基準を作成しているが、菌の有無を蛍光強度の絶対値で評価することは困難である。

アレイとの結合量から相対的に増加する蛍光強度を定量すれば、菌数の予測も可能であるが、絶対的な定量には内部標準、外部標準DNAを準備するなど定量化の設定は容易ではない。通常は同じスライドに別々のDNAサンプルから増幅した2種類の蛍光プローブを反応させ、菌数の増減を2種類の蛍光シグナルを比較して測定するという菌数の変動を比較するには適している。

#### ユニバーサルプライマーと 属特異的プライマーを使った菌種の同定

ユニバーサルプライマーを使用して糞便の細菌を増幅すると一度に多種類の菌の16S rDNAが増幅できる。前述のごとく、この方法では混在している一万分の一の菌のポピュレーションを補足できるので、増幅産物を大腸菌にクローン化し一万のクローンをシーケンスすれば、主要なフローラを解析できる。あるいはV3の可変

領域をはさんで500塩基ほどの増幅を行えば、同定レベルでは十分な情報が得られる。われわれはユニバーサルプライマーの場合はTable 3の27 forwardと519 reverseのプライマー、属レベルでは27 forwardとV4-V5の間の保存領域から属に特異的なプライマーをデザインし、属レベルで増幅し、より感度よく特定の微生物を増幅し、増幅産物をシーケンスする方法を取って、未知の菌群の検出同定を行っている。

約500塩基の増幅産物をデータベースでBlast検索し類似した菌種の配列を選択し、アラインメントを行う。この方法で一般細菌の場合、同定ができる場合が多いが、16S rDNAの配列が98%以上類似している菌群ではこの領域だけの情報では同定が確定できないこともしばしばある。

分類学的には16S rDNA配列が既存の菌種と98%以上の配列の類似度がある場合は、定量的DNA/DNAハイブリッドを実施し菌種の最終決定を行ってきた (5, 21)。ところがこの方法では客観性に乏しく、16S rDNA配列に変わる多型遺伝子の情報を使った菌種の同定方法が推奨された (22)。多型遺伝子候補としてどの菌種にも存在し、16S rDNAより遺伝子の変化が大きいハウスキーピング遺伝子のデータの蓄積が望まれ、gyrB, rpoB, HSP60などの配列情報が蓄積されてきている。Fig. 9では*Staphylococcus*属の遺伝子を比較した結果、DnaJ配列の多型が最も大きいことがわかる。これらの複数の遺伝子を比較し、菌種を同定するためには同一属内の菌種のデータが蓄積され、16S rDNAの系統と比較してできる環境を構築する必要がある。ハウスキーピング遺伝子の蓄積は現在では、腸内に生息する菌群では腸内細菌科、連鎖球菌群など一部の菌群にしか適応で

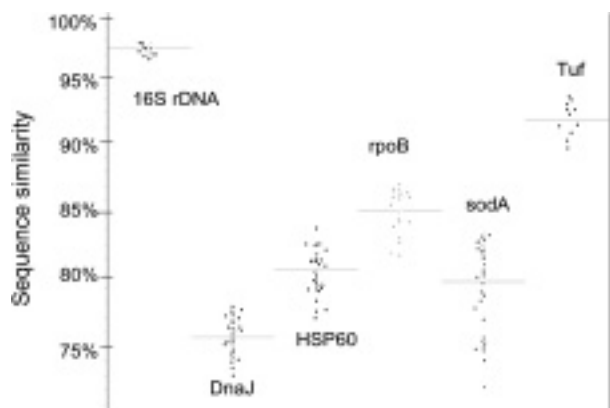


Fig. 9. Six candidate genes useful to differentiate closely related species because their sequences are more variable than 16S rDNA sequences (comparison 6 genes within a member of genus *Staphylococcus*).

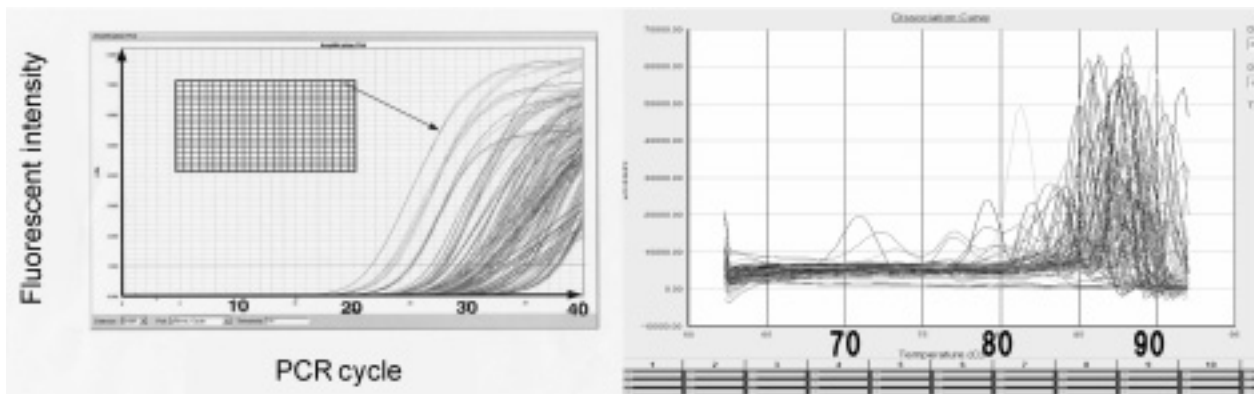


Fig. 10. Realtime PCR and measured  $T_m$  after amplification.  $T_m$  of most primer-dimer were lower than 80°C in this case.

きない。Fig. 10では *Streptococcus* 属の菌種の 16S rDNA と *gyrB* の配列で系統樹を作成し比較した。明らかに *gyrB* 配列が多型が大きいことがわかる。

Hayashi (8) は糞便から抽出した DNA で 16S rDNA のほぼ全領域、あるいは 500 塩基を蛍光標記したプライマーで増幅して増幅産物を特定の制限酵素で切断し、その断片をシーケンサーを使ってフラグメントの長さのピークの高さから菌種を推定する方法で優位なフローラ構成菌種を計測している。増幅産物の制限酵素のパターンはあらかじめ菌種ごとにデータベースを作っておけば推測できる。ただしこの方法もフローラの主要構成菌種の解析が主になる。菌種の数が増えるとパターンへの組み合わせが多くなり、解析も複雑になる。この方法で消化管の小腸から大腸までの菌叢の変化を報告している。この方法の優位性は属レベルの共通な PCR 産物を解析する場合に生かされる。乳酸菌に特異的な属プライマーで増幅し増幅産物を制限酵素で切断し解析すれば、一人の人の腸管に多種類の乳酸菌が生息することは通常はありえないので、1-2 種類であれば、フラグメントのパターンは予測できる。このような属レベルのプライマーセットを沢山準備すれば全体のフローラの解析に幅が広がり、新しい構成菌種の発見にもつながる。

われわれは 96well の市販のマイクロプレートに Table 5 にあるような菌種特異的、属特異的、あるいはグループ特異的プライマーセットを搭載させた腸内細菌解析用プライマーセットを作成し、一枚のプレートでフローラの解析を行っている。この方法をとれば 16S rDNA だけではなく機能性遺伝子の解析も同時にできるので発がん物質の蓄積に関与する菌群などの解析に利用している。

この方法でメタン生産菌やマイコプラズマなど従来のフローラ解析では報告がほとんど見られなかった菌群のシグナルが得られるようになり、フローラ解析の意義を

拡張する目的につながる。96 種類の増幅の確認には ABI の realtime PCR 法を使っており増幅産物は SYBR Green I が反応液に入れているので、定量と増幅産物の  $T_m$  の測定ができる (Fig. 10)。Fig. 11 では *Bacteroides distasonis* の  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  希釈の糞便の realtimePCR では蛍光の図かがめられ  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  でも増幅しているように見えるが、 $T_m$  を測定すると  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  の  $T_m$  は 87°C で  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  の  $T_m$  は 76°C 付近にあるので、 $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  では Primer-dimer が形成され、一見、増幅しているようにみえたことがわかる。

我々は 96 種類の primer を 384well の 4 箇所に分注し糞便を 4 段階希釈して定量解析を行って精度の高い定量解析を行っている。糞便の菌数の幅は大きく、最高で  $10^{11}$  ないし  $10^{12}$ /g に達するため、4 段階希釈では低い菌の濃度はカバーできないが PCR の検出限界は固形糞便では  $10^5$  から  $10^6$  CFU/g であるので、目的は達成できる。

定量を行う場合は菌種ごとに定量曲線を作成し、定量する方法がより正確なデータの解析ができる (16)。Matsuki らは bifidobacteria に対してこのような定量曲線を作成し腸内の bifidobacteria の定量法を確立し報告している。しかし菌種ごとの定量曲線をすべての菌種に対して作成すると解析する菌種の種類が限られてくる。96 種類のプライマーセットに対してひとつの標準曲線で定量値を補正できるような解析方法を作成すれば、全データの定量がより正確なものになる。

多種類を同時に解析するとき、個々の病原体の定量 PCR を確立することが今後の残された課題であると認識している。

## 最 後 に

16S rDNA 情報を利用したフローラ解析データが爆発的な勢いで蓄積されている (3, 10, 24)。

従来一人の糞便の定量解析には膨大な時間を費やし、

Table 5. Prerepresentative primer lists reported to analyse intestinal bacterial flora

Phylum	Species	Amplicon	Forward primer	Reverse primer	文献
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium breve</i>	288	CCGGATGCTCCATCAGAC	5-ACAAAGTGCTTGTCTCCT	Matsuki T, et al. 1998
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	279	CTCAGGTGATGATGATC	5-CGAAGGCTTGCTCCAGT	Matsuki T, et al. 1998
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	278	CCACATGATCGCATGTGTTG	5-CCGAAGGCTTGCTCCCAA	Matsuki T, et al. 1998
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium catenulatum group</i>	289	CGGATGCTCCGACTCCT	5-CGAAGGCTTGCTCCGAT	Matsuki T, et al. 1998
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium longum-Infantis</i>	277	TTCCAGTTGATCGCATGTGTC	5-TCSGCTTGCTCCCCGAT	Matsuki T, et al. 1998
Actinobacteria	<i>Collinsella aerofaciens</i>	592	5-TGACGAGGGAAGTGAAGACTGT	5-TGCACCACTGTATGGGTCCTCT	Kageyama A, et al. 1998
Bacteroidetes	<i>Bacteroides distasonis</i>	273	5-TGCGGACTAATACGATGAA	5-TTACGATCCATAGAACCTTCAT	Wang RF, et al. 1994
Bacteroidetes	<i>Bacteroides egghrii</i>	279	5-AACTCGCGATAACTCGGG	5-TGGCTGGTTCAGACTCTCGT	In this report
Bacteroidetes	<i>Bacteroides fragilis group</i>	462	5-GGCGACGGGTGAGTAAC	5-AAATCCGGATAACGCTCG	In this report
Bacteroidetes	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	423	5-GGCAGATTTTCAAGTTGCTTG	5-GGTACATACAAAATTTCCACACGT	Wang RF, et al. 1996
Bacteroidetes	<i>Bacteroides vulgatus</i>	287	5-GCATCATGATCCGCGATGTC	5-TCCATACCGACTTTATTCCTT	Wang RF, et al. 1994
Bacteroidetes	<i>Prevotella ruminicola</i>	484	5-GGTTATCTTGAGTGAGTT	5-CTGATGGCAACTAAAGAA	Koike S, 2002
Fibrobacteres	<i>Fibrobacter succinogenes</i>	446	5-GGTATGGGATGAGCTTGC	5-GCCTGCCCTGAACTATC	Tajima K, et al. 2001
Firmicutes	<i>Acidaminococcus fermentans</i>	412	5-AAGGGAGAACTTTCTTGGAA	5-ATAGATCGGTGCTTTCGTCCCTG	In this report
Firmicutes	<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	597	5-TGGGTGTTAGAAATGGATTC	5-CTCTCTGCACCTCAAGAAAT	Tajima K, et al. 2001
Firmicutes	<i>Clostridium clostridioforme</i>	255	5-CTGCATGGCTCCGTGTGAAA	5-CTGCTGATAGAGCTTTACATA	Wang RF, et al. 1996
Firmicutes	<i>Clostridium Cluster XIV</i>	439	5-AAATGACGGTACCTGACTAA	5-CTTTGAGTTTCAITCTTCCGAA	In this report
Firmicutes	<i>Clostridium perfringens</i>	279	5-AAAGATGGCATCATCTCAAC	5-TACCGTCAATATCTCCCAA	Wang RF, et al. 1994
Firmicutes	<i>Clostridium difficile</i>	513	5-AGTAACGCTGGGTAACCT	5-CTCCTGACTTGAAGACCGC	In this report
Firmicutes	<i>Coprococcus spp.</i>	349	5-CGTGGGTAACTGCTCA	5-TCAATATCTCCCTGCTGATAG	In this report
Firmicutes	<i>Eubacterium bifforme</i>	463	5-GTAAGGCCATGAACATGGA	5-GCCGTCTCTTCTTGTCTC	Wang RF, et al. 1994
Firmicutes	<i>Eubacterium limosum</i>	274	5-GGCTTGTGACAAATACTG	5-CTAGCTCTGCACAGGA	Wang RF, et al. 1994
Firmicutes	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	199	5-AGATGGCTCGCGTCCGA	5-CCGAAGACCTTCTCTCCTC	Wang RF, et al. 1994
Firmicutes	<i>Fruegoldia magna</i>	342	5-TTAGTAGACAGAGCGCTCGG	5-CCCATTTGCAATAATTC	In this report
Firmicutes	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	420	5-ACAGATTCACCTTCGGTG	5-AAAGCCAGTACTACCTCTATC	Watanabe K, et al. 1998
Firmicutes	<i>Lactobacillus casei</i>	327	5-CGAGTCTCGTTGATGATC	5-AAGATTCCCTACTGCTGCC	Watanabe K, et al. 1998
Firmicutes	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	404	5-GGTGATTTGTTGGACGT	5-AAAGACCAGTACTGCGCTCTATC	Watanabe K, et al. 1998
Firmicutes	<i>Lactobacillus gasseri</i>	319	5-GATGAATTTGGTGTGTTGCCAG	5-AAGATTCCCTACTGCTGCC	Watanabe K, et al. 1998
Firmicutes	<i>Lactobacillus helveticus</i>	312	5-GCAGATTTACTTCGGTAATGACG	5-AAGATTCCCTACTGCTGCC	Watanabe K, et al. 1998
Firmicutes	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	319	5-GATGATTTTGTGCTTGCACTAA	5-AAGATTCCCTACTGCTGCC	Watanabe K, et al. 1998
Firmicutes	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	446	5-GCAAGTCGAACGAGTTCGATTAT	5-GCCGACACAGTACTCTGCCGACCA	Watanabe K, et al. 1998
Firmicutes	<i>Lactobacillus zeae</i>	327	5-CGAGTTTGGTCGATGAAC	5-AAGATTCCCTACTGCTGCC	Watanabe K, et al. 1998
Firmicutes	<i>Lactococcus lactis susp. cremoris</i>	412	5-ATTGGTCTTGACCAAAITTGAA	5-CTTGATGAGCTTTCACCTCTACCAA	Watanabe K, et al. 1998
Firmicutes	<i>Lactococcus lactis susp. lactis</i>	412	5-GTTGGTACTTGTACCGACTGGAT	5-CTTGATGAGCTTTCACCTCTACCAA	Watanabe K, et al. 1998
Firmicutes	<i>Megasphaera elsdenii</i>	243	5-GAAGCTTGCTTCTTCTTATGA	5-CTGATCTGCGCTTGTGG	In this report
Firmicutes	<i>Micromonas micros</i>	630	5-TAACACGTGACCAACCTACCT	5-GCTTTGTTGACCTGACGCTCAGT	In this report
Firmicutes	<i>Ruminococcus albus</i>	176	5-CCCTAAAAGCAGCTTAGTTGCG	5-CTCTCTGGGGTTAGAACA	Wang RF, et al. 1997
Firmicutes	<i>Ruminococcus bromii</i>	444	5-GAAGTAGAGATACATAGGTG	5-ACGAGTTGGACTACTGA	Wang RF, et al. 1997
Firmicutes	<i>Ruminococcus callidus</i>	286	5-GCATAAATCATGATGATCG	5-CGTCAATATGCTCTCTTCA	Wang RF, et al. 1997
Firmicutes	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	835	5-GGACGATAAATGACGTACTT	5-GCAATGYAACTGGACAAAT	Tajima K, et al. 2001
Firmicutes	<i>Ruminococcus obeum</i>	312	5-TGAGGAGACTGCCAGGA	5-CTCTCTCTTGGAGTTAGGT	Wang RF, et al. 1997
Firmicutes	<i>Ruminococcus productus</i>	269	5-AACTCGGTGGTATGAGATG	5-GGGCTTCTTAGTCAGGTA	Wang RF, et al. 1996
Firmicutes	<i>Sarcina ventriculi</i>	199	5-GTGGCAACCTGCCTCAT	5TATGAGCAGGTTGCCAC	In this report
Firmicutes	<i>Streptococcus intermedius group</i>	422	5-ATGACCGTAGTTTACTACAC	5-GTATGAACCTTCCACTCTCACAC	In this report
Firmicutes	<i>Streptococcus thermophilus</i>	302	5-TGGATGCACATGTCATTTA	5-CTGTGTGAACCTTCCACTC	Watanabe K, et al. 1998
Firmicutes	<i>Veillonella sp.</i>	270	5-GATGAAGCTTGTCTCTATC	5-GCCGCTTCACTCTCTACAG	In this report
Proteobacteria	<i>Campylobacter spp.</i>	353	5-GTATAGTAACTGCGCTAC	5-TATTCTTAGGTACCGTCA	In this report
Proteobacteria	<i>Enterobacteriaceae (major species)</i>	282	5-CCTAACACATGCAAGTCGA	5-CCCAGTGTGCTCCCTCCCGT	In this report
Proteobacteria	<i>Escherichia coli-Shigella spp.</i>	410	5-GTAACAGGAAGAAGGTTGCT	5-GAGCAAGGTATTAACCTTACTC	In this report
Proteobacteria	<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	853	5-TGGGAAGCTACCTGATAGAG	5-CTTTACAGAGGTTCTCTACT	Tajima K, et al. 2001
Archaea	<i>Archaea universal</i>	520	5-TCCGGTTGATCTCTGCCG	5-TGYCAGCCGCCGCGGTAA	Delong 1992, Barns, et al. 1994
Bacteria	<i>Bacteria universal</i>	510	5-GAGTTTGATCTMTGGCTCAG	5-GTATTACCGCGGCKGCTG	Stackebrandt E, Goodfellow M, 1991

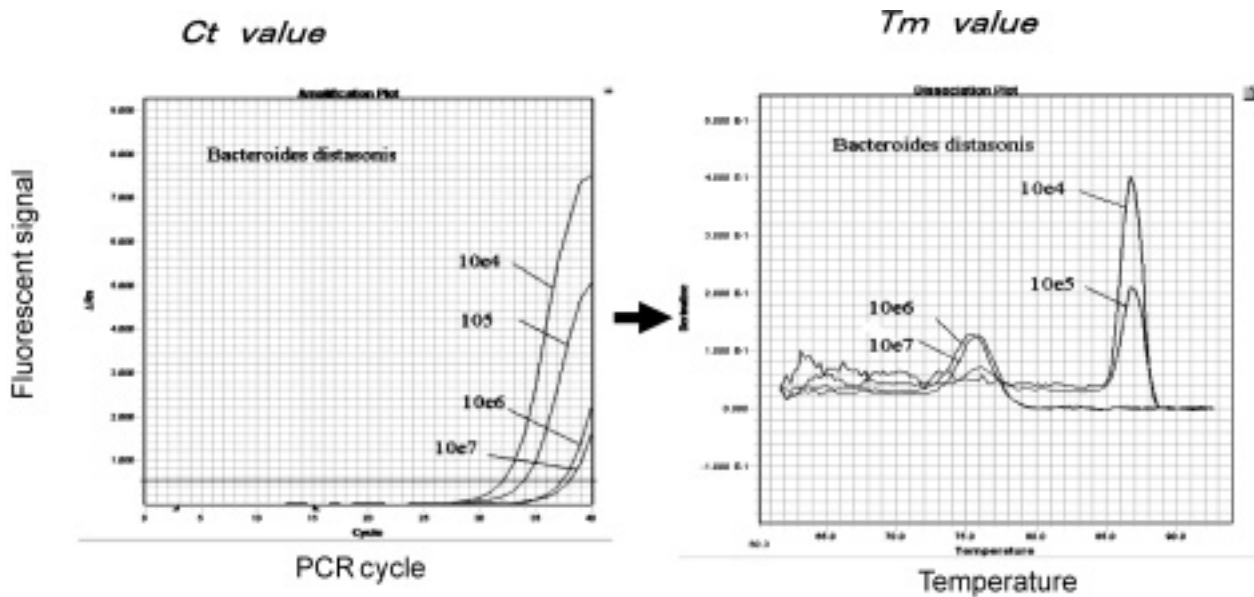


Fig. 11. Quantitative detection of *Bacteroides distasonis*  
 $-10^6$ ,  $-10^7$  signals seem to be detected in left figure. After  $T_m$  calculation,  $-10^6$ , and  $-10^7$  signals found to be primer-dimers from their  $T_m$  values in right figure.

一ヶ月以上の日数を要していたが遺伝子解析法では、realtime PCR法を使った迅速測定法では半日で一人の人のフローラ解析が終了するので、大量の解析が可能になった。今後、詳細な配列情報が蓄積し、384wellで384種類の菌の解析が現実になっている。また排出便だけでなく上部消化管のサンプリングと解析ができるようになった(3, 8)。

このことはこれまでの優位な菌の解析から少数でも重要な機能を持った細菌に標的を絞り、より詳細なフローラ解析が出来るようになったことを意味しているので、今後の展開を期待したい。

#### 参 考 文 献

- (1) Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**: 143-169.
- (2) Delong, EF. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 5685-5689.
- (3) 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**(5728): 1635-1638.
- (4) Ezaki T, Hashimoto Y, Yabuuchi E. 1989. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Bacteriol* **39**: 224-229.
- (5) 江崎孝行. 2004. DNAマイクロアレイを用いた環境サン
- ブル中の微生物群衆の解析. 難培養微生物研究の最新技術, p94-100. シーエムシー出版, 東京.
- (6) Franks AH, Harmsen HJ, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F, Welling GW. 1998. Variation of bacterial population in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3336-3345.
- (7) Harmsen HJ, Raangs GC, He T, Degener JE, Welling GW. 2002. Extensive set of 16S rRNA based probes for detection of bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2982-2990.
- (8) 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.
- (9) 影山亜紀子, 辨野義巳. 1998. 16S rRNAを用いた *Eubacterium aerofaciens* のグループの分類学的新展開. 光岡知足編, 腸内フローラの分子生態学, p.77-94. 学会出版センター, 東京.
- (10) Koike S, Kobayashi Y. 2002. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS Microbiol Lett* **204**: 361-366.
- (11) Landry ML, Garner R, Ferguson D. 2005. Real-time nucleic acid sequence-based amplification using molecular beacons for detection of enterovirus RNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol* **43**: 3136-3139.
- (12) 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.
- (13) Lee N, Nielsen PH, Andreasen KH, Juretschko S, Nielsen JL, Schleifer KH, Wagner M. 1999. Combination of fluorescent hybridization and microaudiography- a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1289-1297.
- (14) Levitt MD, Furne J, Springfield J, Suarez F, DeMaster E. 1999. Detoxication of hydrogen sulfide and methanethiol in the cecal mucosa. *J Clin Invest* **104**: 1107-1114.
- (15) Loy A, Lehner A, Lee N, Adamczyk J, Meier H, Ernst J, Schleifer KH, Wagner M. 2002. Oligonucleotide microarray for 16SrRNA gene based detection all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Appl Environ Microbiol* **68**: 50664-5081.
- (16) Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, Fukuda M, Oyaizu H. 2004. Quantitative PCR with 16S rRNA-Gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**: 167-173.
- (17) 松木隆広, 渡辺幸一, 田中隆一郎, 小柳津広志. 1998. 16SrRNA配列を利用した腸内フローラの解析. 光岡知足編, 腸内フローラの分子生態学, p.25-45. 学会出版センター, 東京.
- (18) Poulsen LK, Licht TR, Rang C, Krogfelt KA, Molin S. 1995. Physiological state of *Escherichia coli* BJ4 growing in the large intestines of streptomycin-treated mice. *J Bacteriol* **177**: 5840-5845.
- (19) Raue HA, Musters W, Rugers CA, Riet JV, Planta RJ. 1990. rRNA: from structure to function. Hill WE, Dahlberg A, Garrett RA, Moore PB., Schlessinger D, Warner JR (Eds) *The Ribosome*, p.217-235. ASM Press, Washington DC.
- (20) Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning*, A Laboratory Manual, 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- (21) Stackebrandt E, Goodfellow M. 1991. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England.
- (22) Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PA, Kampfer P, Maiden MC, Nesme X, Rossello-Mora R, Swings J, Truper HG, Vauterin L, Ward AC, Whitman WB. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1043-1047.
- (23) Tajima K, Aminov RI, Nagamine T, Matsui H, Nakamura M, Benno Y. 2001. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2766-2774.
- (24) Volker M, Morris JG Jr. 2004. Colonic bacterial flora: changing understandings in the molecular age. *Appl Environ Microbiol* **134**: 459-464.
- (25) Wang RF, Cao WW, Campbell WL, Hairston L, Franklin W, Cerniglia CE. 1994. The use of PCR to monitor the population abundance of six human intestinal bacterial species in an in vitro semicontinuous culture system. *FEMS Microbiol Lett* **124**: 229-238.
- (26) Wang RF, Cao WW, Cerniglia CE. 1996. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Appl Environ Microbiol* **62**: 1242-1247.
- (27) Wang RF, Cao WW, Cerniglia CE. 1997. PCR detection of *Ruminococcus spp.* in human and animal faecal samples. *Mol Cell Probes* **11**: 259-265.
- (28) Wang RF, Chen H, Paine DD, Cerniglia CE. 2004. Microarray method to monitor 40 intestinal bacterial species in the study of azo dye reduction. *Biosensors and bioelectronics* **20**: 699-705.
- (29) 渡辺幸一, 三宅妙子, 松木隆広, 小柳津広志. 1998. 16SrRNA配列を利用した発酵乳製品中の *Lactobacillus* の菌種の同定. 光岡知足編, 腸内フローラの分子生態学. p.129-154, 学会出版センター, 東京.
- (30) 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**: 4225-432.