

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト腸内由来 *Eubacterium* 属の分類学的、系統学的研究と PCR による検出

氏名 影山 亜紀子

ヒトや動物の腸内には様々な細菌群が常在し複雑な腸内細菌叢を形成している。その数は糞便 1 g あたり 10^{12} で、種類は約 400~500 種に達することが知られている。それらを構成する最優勢菌群のひとつとして嫌気性無芽胞グラム陽性桿菌 *Eubacterium* 属が挙げられ、本菌属はヒトや動物の腸内に常在し、特に *E. aerofaciens*、*E. rectale*、*E. lentum*、*E. cylindroides* などが高菌数、高頻度に検出される。

一方、分類学上 *Eubacterium* 属は、偏性嫌気性、無芽胞、グラム陽性桿菌のうち、*Propionibacterium* 属でも *Bifidobacterium* 属でも *Lactobacillus* 属でもないものを *Eubacterium* と定義しており非常に曖昧であるが、それらとはグルコースからの代謝産物の違いにより分けられている。

Eubacterium 属の DNA の GC 含量は 32~62 mol% と非常に広範囲にわたっており、本菌属はさまざま菌属が包括された菌属であると言える。現在では基準菌種である *E. limosum* と *E. barkeri*、*E. callanderi* の 3 菌種を限局した意味での *Eubacterium* 属とする考え方も浸透しており、いくつかの *Eubacterium* 属に属す菌種が別の属に移行されている。しかしまだ整理が不十分であり更なる検討が必要とされるとともに、分類学的に種として確立されていない *Eubacterium*-like 株も多数存在していることも事実である。またこれらヒト腸内細菌の分離同定は時間と技術が必要であり、迅速で簡便な方法の確立が望まれている。ヒト腸内には培養が著しく困難な菌種も多数存在しているため、培養によらない菌種の同定法を確立する目的で本研究を行った（第一章）。

第二章では分類学上混乱している *Eubacterium* 属の整理をするため、まずヒト腸内に最優勢に存在している *E. aerofaciens* の分類学的位置付けを明らかにすることとした。研究には 1977 年から 1987 年の間にヒトの腸管から分離された分離株 178 菌株と基準株である *E. aerofaciens* JCM 10188^T、参考株である *E. aerofaciens* JCM 7790 および JCM 7791 を用いて行った。糖分解試験の結果、シュークロース、セロビオースの分解結果により 4 つのグループに分けられ、更にエスクリン、サリシン、アミグダリンの分解結果により 16 のサブグループに分けられた。系統解析の結果、*Eubacterium* 属の基準種である *E. limosum* とは懸け離れた位置にあり、*Coriobacteriaceae* 科に属し、*Coriobacterium* 属や *Atopobium* 属と近い位置にあることが明らかとなった。*E. aerofaciens* は糖分解試験の結果、性状が多様性を示すにもかかわらず、系統学的にまとまったクラスターを形成することが明らかとなった。また、これらの DNA の GC 含量は 60~61 mol% で DNA-DNA 相同性試験の結果、73~84% の相同性を示し同一種であると確認した。16S rDNA 塩基配列による系統解析の結果一番近いと思われる *Coriobacterium glomerans* も DNA の GC 含量が 60~61 mol% と高い値を示すが、*E. aerofaciens* とは細胞壁のアミノ酸組成に違いが見られ、*Co. glomerans* は Lys-Asp タイプであるのに対して、*E. aerofaciens* は Orn-Asp タイプである。以上の結果より *E. aerofaciens* は独立した新属として提唱するのが妥当であると考え、*Collinsella aerofaciens* として提唱した。更に *C. aerofaciens* を簡便に同定するために種特異的プライマーを作成し PCR 法により簡便に同定できる方法を確立した。種特異的プライマーを用いた PCR 法により、実際に分離された *C. aerofaciens* の同定を試み、全供試菌株 178 菌株が *C. aerofaciens* であることを確認した。また同時に表現形質上は非常に *C. aerofaciens* と類似しているものの、種特異的プライマーを用いた PCR 法では *C. aerofaciens* であると同定出来ない分離株も存在していることが明らかとなった。そこでこれら分離株の詳細な分類学的研究を行った結果、*C. aerofaciens* とは別種が 2 種存在することが明らかとなり、それぞれ *C. intestinalis* および *C. stercoris* として新しく提唱した。これら 2 種は細胞形態、糖分解性状、DNA の GC 含量、細胞壁のアミノ酸組成などが *C. aerofaciens* と非常に類似している。そこで簡便に *C. aerofaciens* と区別する目的でそれぞれ *C. intestinalis* と *C. stercoris* に特異的なプライマーを作成し、PCR により簡便に同定出来る方法も同時に確立した。*Collinsella* 属とは系統的にはなれた *C. aerofaciens*-like 株も存在し、これらは新属新種 *Coprobacillus catenaformis* として新しく提唱した。これらについても特異的なプライマーを作成し、PCR により簡便に同定出来る方法も同時に確立した。

第三章ではヒト腸内に優勢に存在する *Eubacterium lentum* と *Eubacterium*-like 株について分類学的位置付けを明らかにした。これまでの研究により *E. lentum* が他の *Eubacterium* 属の菌種と異なった性状を持つことが報告されてきた。本研究ではこの特異な性状を持つ *E. lentum* の 16S rDNA の塩基配列を決定し、系統樹を作成した。その結果、*Eubacterium* 属の基準種である *E. limosum* とは系統的に離れた位置にあり、*C. aerofaciens* と同様に *Coriobacterioaceae* 科に属し、*Co. glomerans*

や *E. aerofaciens* と近い位置にあることが明らかとなった。よって特徴的な性状を持つという点と系統解析の結果より *E. lentum* は独立した新属として提唱するのが妥当であると考え、*Eggerthella lenta* として提唱した。*Eubacterium* 属は最初に述べたように定義が曖昧ということもあり、現在でも多くの新種が *Eubacterium* として提唱されている。しかし一方では *Eubacterium* とせず、*Eubacterium* 様の菌株を新属として提唱する動きも見られる。例えば *Holdemania* 属の提唱などが挙げられる。我々もヒトの腸内から分離された *Eubacterium*-like 株に付いて糖分解性状試験、細胞壁のアミノ酸組成の決定および 16S rDNA の塩基配列の決定などを行い、新たに 2 つの *Eubacterium*-like グループを新属として、それぞれ *Catenibacterium mitsuokai* および *Solobacterium moorei* として提唱した。

第四章ではヒト腸内優勢 *Eubacterium* の PCR 法を用いた簡便検出法について述べた。糞便材料から直接分離培養せずに検出する目的で nested PCR を用いた検出法を確立し、*Eubacterium* 属のどの種がどれくらいの頻度で存在しているのかを調べた。また *C. aerofaciens* については LightCycler™ を用いたリアルタイム PCR 法により糞便材料から直接菌数を測定する方法も確立した。これによりヒト糞便内の *C. aerofaciens* の菌数が簡便に測定でき、ヒトの腸管内 *C. aerofaciens* の定性定量解析に有効であることを明らかにした。またこの方法は他の菌種にも応用可能であり、更なる発展が期待できる。

第五章では総合考察として *Collinsella* 属の提唱とその意味について、また *C. aerofaciens*-like 株や *Eubacterium*-like 株についての分類学的位置付けの決定とその意義、更に種特異的プライマーを用いた PCR 法による同定、検出、定量の有用性についてまとめて述べた。

本研究ではヒト腸内優勢菌種である *Eubacterium* 属の研究として分類学的位置付けの不明瞭であった *E. aerofaciens* および *E. lentum* の再整理、ヒトの腸内に優勢に存在している *Collinsella* 属の種特異的プライマーを用いた PCR 法による同定法の確立、またその PCR 法を用いることによりこれまで未同定だった新たな新種（新属）の発見、ヒトの腸内から分離された *Eubacterium*-like 株の整理を行った。本研究で作成した *C. aerofaciens* 特異的プライマーを用いた PCR 法により従来 *C. aerofaciens* であると思われていた菌株のなかに実は別種が存在していることが初めて明らかとなり、新たに新種として提唱されたことは、腸内細菌学の研究に貢献し得るものと考えられる。

またヒト腸内に優勢に常在している代表的な *Eubacterium* 属の種特異的プライマーを用いた nested PCR 法を確立し、糞便から直接分離培養によらない迅速で簡便な方法を確立した。更に *C. aerofaciens* については糞便からの培養によらない LightCycler™ を用いた定量法も確立した。