

## 論文内容の要旨

論文題名 ヒト腸内フローラ構成菌の定量的 PCR 検出法の確立および菌属、菌種分布の解析

氏名 松木 隆広

ヒトの腸管内には多種多様な細菌が在住し、複雑な微生物生態系(腸内フローラ)が形成されている。これらの微生物群集は、食物の分解、生体内・生体外成分の代謝、必須ビタミンの生産、免疫力の活性化、病原性菌の増殖抑制等のさまざまな生理活性を有しており、それゆえに宿主であるヒトの健康と密接な関係がある。この腸内フローラの機能を解析するには、腸内フローラを構成する菌を正確に把握することが必要である。

これまで腸内フローラの群集構造の解析は主に培養法により行われており、各個人の腸内フローラは 100 から 300 種類の微生物から構成されることや各個人に固有でその構成は安定していること、菌数は大便 1gあたり  $10^{11}$ 個に及ぶこと、その 99%以上が嫌気性菌で占められていること、等が明らかとなっている。しかし、培養法による解析は、多大な労力と時間を必要とすること、培養法ではすべての菌株を分離培養することが困難であること、従来の生物・生化学性状を指標とした分類・同定は、現在の遺伝子配列を指標とした分類体系とは必ずしも一致しないことが、次第に認識されてきた。

近年、16S rRNA 配列の比較による微生物の分類・同定法が確立され、16S rRNA 配列をターゲットとしたプローブやプライマーによって、幅広い菌種の迅速かつ特異的な検出が可能となっている。この分子生物学的手法を用いたフローラ解析法には FISH 法やクローンライブラリー法、DGGE/TGGE 法、特異的 PCR 法などがあるが、特異的プライマーを用いた PCR 法は、検出能力が高く操作が簡便であることから、最も有効な手法であると考えられる。そこで、腸内フローラを構成する菌属・菌種を標的とした、正確で簡便な PCR 解析手法を確立することを目的として、研究を開始した。

第1章では緒論として、FISH法やクローンライブラリー法、DGGE/TGGE法、特異的PCR法などの分子生物学的手法の原理や特徴、それぞれの手法により得られた腸内フローラの知見を比較して、菌種・菌属特異的プライマーを用いたPCR法を選択するに至った経緯を述べる。また、16S rRNA遺伝子を指標とした、微生物分類の再分類の現状について、腸内フローラを構成する菌種を中心にまとめた。

第2章では、腸内フローラの構造を菌属・菌群レベルで解析するための検討を行った。第1節では、まずヒト腸内フローラ最優勢菌群の*Bacteroides fragilis* group、*Bifidobacterium*、*Clostridium coccooides* group、*Prevotella*の4つの菌群に特異的なプライマーを16S rRNA配列情報をもとに作製し、分離株(合計300株)の菌属同定を試みた。その結果、74%の株がこれら4つの菌群のいずれかに属することが明らかとなった。また、残り26%の株の16S rRNA配列を解析した結果、*Clostridium leptum* subgroupに属する菌株は8%、*Atopobium* clusterに属する菌株は13%を占めていた。そこで第2節では、*C. leptum* subgroupと*Atopobium* clusterの特異的プライマーを追加作製した。さらに、この最優勢6菌群の特異的プライマーとReal-time PCR法を組み合わせ、健常成人46名について分布を調べたところ、*C. coccooides* group ( $\log_{10}$  10.3  $\pm$  0.3 cells per g、検出率100%)がもっとも菌数高く検出され、*C. leptum* subgroup ( $\log_{10}$  9.9  $\pm$  0.7, 100%)、*B. fragilis* group ( $\log_{10}$  9.9  $\pm$  0.3, 100%)、*Bifidobacterium* ( $\log_{10}$  9.4  $\pm$  0.7, 100%)、*Atopobium* cluster ( $\log_{10}$  9.3  $\pm$  0.7, 100%)、*Prevotella* ( $\log_{10}$  9.7  $\pm$  0.3, 46%)が続くことが明らかとなった。

第3章では、腸内フローラ最優勢菌属の一つで、宿主に対する有用な働きが数多く報告されている*Bifidobacterium*に着目し、菌種レベルの詳細な解析を行った。第1節では、ヒト腸内より頻度高く分離される*B. adolescentis*、*B. angulatum*、*B. bifidum*、*B. breve*、*B. catenulatum* group (*B. catenulatum*と*B. pseudocatenulatum*)、*B. longum* group (*B. longum*と*B. infantis*)の菌種特異的プライマーを作製した。このプライマーによって、従来の生物・生化学性状では区別できなかった*B. adolescentis*と*B. catenulatum* groupを明確に区別することが可能となった。第2節では、ヒト腸内から分離されるすべての菌種を網羅するために、*B. dentium*、*B. gallicum*のプライマーと、*B. longum*と*B. infantis*を区別するプライマーを追加で作製した。定性的PCRによってヒト成人における菌種分布を解析したところ、*B. adolescentis*と*B. longum*に加えて*B. catenulatum* groupがヒト成人に広く分布していることが明らかとなった。また、乳児の解析では*B. breve*と*B. infantis*が広く分布していることが確認された。第3節ではReal-time PCR法の導入によって、*Bifidobacterium*の各菌種の分布を定量的に解析した。その結果、ヒト成人においては、*B. adolescentis*、*B. catenulatum* groupと*B. longum*が広く最優勢に分布していることが確認された。また、長期間におけるビフィズスフローラの安定性を解析した結果、各個体の菌種構成は基本的に安定であることが明らかとなった。

菌群・菌種特異的プライマーを用いた定量的PCR法は、検出感度が高く、正確でハイスループットな解析が可能であり、腸内フローラの構造解析に非常に有効な手法である。したがって、このReal-time PCR法によって、腸内フローラと健康・腸疾患(例えば炎症性腸疾患や過敏性腸症候群、大腸がんなど)の関連性や、プロバイオティクスや抗生物質が腸内フローラに与える影響を詳細に調べることが可能となり、これらの研究に飛躍的な進展が見られるものと期待される。