

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 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%以上が嫌気性細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ている。近年、分子的な手法として 16S rRNA配列をターゲットとしたFISH法やクローンライブラリー法、DGGE/TGGE法、特異的PCR法などが開発されたが、正確な定量分析には十分な手法とは言えない。このような背景を踏まえ、本論文では簡便で正確に分析可能な手法の開発を行った。

本論文は 4 章で構成される。第1章の序論に続き、第2章ではヒト腸内フローラの最優勢な菌群の簡便な動態解析手法を開発する研究を行った。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%) がもっとも菌数が高く検出され、*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*) の菌種特異的のプラ

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。

第4章では、総合的な考察を行い、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ことを考察した。

以上、本論文は、腸内フローラの簡便で迅速な分析手法の確立とその応用研究を行ったものであり、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の効果の評価に役立つ研究と考えられる。よって、審査委員一同は学術上、応用上価値あるものと認め、博士(農学)の学位論文として十分な内容を含むものと認めた。