



一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。本プライマーを用いた RT-qPCR 法により標的細菌を定量的に検出することができ、その感度は従来の qPCR 法に対して 64 倍から 1,024 倍高かった。すなわち、RT-qPCR 法はヒト糞便中の Enterobacteriaceae および *P. aeruginosa* を  $10^3$  個/g 糞便の感度で定量することが可能であった。さらに、RT-qPCR 法による菌数測定の結果は、菌体の増殖時期に関わらず培養法あるいは細胞膜の安定性で評価される生菌測定法による菌数とよく一致することが確認された。また、RT-qPCR 法によりヒト末梢血に添加された *S. aureus* および *P. aeruginosa* を血液 1 ml 中 2 個の感度で定量可能であった。上記の結果から、rRNA を標的とした RT-qPCR 法はヒト糞便および血液中の細菌を正確、高感度、簡便に定量可能であることが示唆された。

第 2 章の研究では、rRNA を標的とした RT-qPCR 法によるヒト腸内細菌叢の高感度な解析システムの構築を行った。16S rRNA 遺伝子配列をもとに *Lactobacillus* 9 サブグループ、*Enterococcus*、および *Staphylococcus* を特異的に定量するためのプライマーを新たに作製した。また、*C. perfringens*、*Enterococcus*、および *Staphylococcus* について、前章の研究で作製したプライマーの改良を行った。これらの新規プライマーと既報の腸内優勢菌 6 菌群 (*Clostridium coccooides* group, *Clostridium leptum* subgroup, *Bacteroides fragilis* group, *Bifidobacterium*, *Atopobium* cluster, *Prevotella*) の特異的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。その結果、本手法は標的とする細菌を  $10^2$  から  $10^4$  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、RT-qPCR 法による最優勢菌群の測定菌数は qPCR 法による結果と同等であった。一方、菌数レベルが低い細菌については、RT-qPCR 法は qPCR 法あるいは培養法よりもはるかに高感度にこれらを定量することができた。さらに、*Lactobacillus* 属細菌をサブグループ・菌種別に解析したところ、ヒト一人あたり平均で 4.6 種類のサブグループ・菌種が  $10^{6.3}$  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。上記結果より、RT-qPCR 法はヒト腸内の優勢菌群および低い菌数レベルで存在する細菌を網羅的にしかも正確に解析できる有効な手法であることが認められた。

第 3 章の研究では、RT-qPCR によるヒト腸内のカタラーゼ陰性、グラム陽性球菌の解析システムを構築し、ヒト糞便におけるそれらの分布を解析した。16S または 23S rRNA 遺伝子配列をもとに *Enterococcus*、*Streptococcus*、および *Lactococcus* のサブグループあるいは菌種特異的プライマーを新たに作製し、これらと既報の菌属・菌種特異的プライマーを用いた RT-qPCR 法により健康成人 24 名の糞便を解析した。その結果、*Enterococcus* および *Streptococcus* は、全被験者からそれぞれ平均で  $10^{6.2}$  個/g 糞便および  $10^{7.5}$  個/g 糞便の菌数レベルで検出された。サブグループまたは菌種特異的プライマーを用いてさらに

詳細に解析したところ、*Streptococcus* 属細菌としては *S. salivarius* が健常成人の腸管内に広く分布していること、*Enterococcus* 属細菌については *E. avium* subgroup, *E. faecium* subgroup, *E. faecalis*, *E. casseliflavus* subgroup, および *E. caccae* が同程度の菌数レベルおよび頻度で検出され、その分布が多様なことが明らかとなった。また、*Lactococcus* の菌数レベルおよび検出頻度はいずれも低く（平均菌数  $10^{4.6}$  個/g 糞便，検出頻度 33%），*L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. garvieae*, *L. piscium*, および *L. plantarum* がその構成菌種として同定された。

以上より，本研究で構築した rRNA 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，当該領域における応用研究も今後の重要な検討課題と考えられる。

以上