

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 松田 一乗

---

ヒトの腸管内には多種多様な細菌群がバランスを保ちながら生息しており、この複雑な微生物群集は総称して腸内細菌叢と呼ばれる。腸内細菌叢は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。腸内細菌叢の機能を明らかにするには、この複雑多様な生態系の構成を正確に把握することが重要である。これまで腸内細菌叢の構成の解析は主に培養法により行われてきたが、本法には、すべての細菌を培養できない、従来の分類・同定法は正確性を欠く、解析作業に多大な労力と時間を要する、などの欠点があった。一方で、近年、16S rRNA 遺伝子を標的としたさまざまな分子生物学的手法が腸内細菌叢の研究に幅広く用いられるようになった。これらの方法を用いて、腸内に生息する難培養菌を含む多くの細菌を培養することなしに検出・同定・定量することが可能となったが、一方で当該手法は検出限界が高いため腸内に低い菌数レベルで存在する細菌の検出には不向きであった。本論文では、ヒト腸内細菌を低い菌数で存在する菌群も含めて網羅的に定量できる手法として、細菌がその細胞内に多コピーを有する rRNA を標的とした定量的 RT-PCR (RT-qPCR) 法による腸内細菌叢解析システムの構築を目的とした研究である。

第1章の研究では RT-qPCR による高感度定量法の確立を行った。16S または 23S rRNA 遺伝子配列をもとに *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium perfringens*, および *Pseudomonas* を標的としたプライマー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。上記の結果から、RT-qPCR 法はヒト糞便中の細菌を正確、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 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。前章に続きプライマーの作製を行い、*Lactobacillus* 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するとともに、*C. perfringens*, *Enterococcus*, および *Staphylococcus* 特異的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 菌群の特異的プライマーを用いた RT-qPCR 法により健常成人 40 名の糞便を解析した。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 法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 法により健常成人 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・菌種別に解析したところ、*Streptococcus* 属細菌としては *S. salivarius* が広く分布していること、*Enterococcus* 属細菌については *E. avium* subgroup をはじめとする複数のサブグループ・菌種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* をはじめとする 4 菌種 5 亜種がその構成菌種として同定された。

以上より、本論文で構築した 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。本研究の成果が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。よって、審査委員一同は本論文が博士 (獣医学) の学位論文として価値あるものと認めた。