

称号及び氏名	博士（獣医学）	倉川 尚
学位授与の日付	平成27年8月31日	
論文名	定量的 <b>RT-PCR</b> 法によるヒト常在細菌叢の解析	
論文審査委員	主査	山崎 伸二
	副査	向本 雅郁
	副査	笹井 和美

## 論文要旨

### 第1章 ヒト常在細菌叢とその解析技術

ヒトの腸管内には多種多様な細菌が棲息しており、複雑な微生物生態系（腸内細菌叢）を形成している。腸内細菌叢は免疫系の成熟、ビタミン等の必須栄養素の合成、難消化性多糖の分解等の有益な生理活性を有する。それゆえ、腸内細菌叢はヒトの健康と密接な関係を持ち、その構成を正確に把握することは腸内細菌叢の機能を理解する上で重要である。これまで、腸内細菌叢解析法として、培養法や各種分子生物学的手法（定量的 **PCR [qPCR]** 法、**T-RFLP** 法、クローンライブラリー法等）が主に用いられてきたが、これらの手法には、操作の煩雑性や検出感度等に問題がある。このような状況のもと、近年、高感度かつ高精度に腸内細菌叢を解析する手法として、菌群および菌種特異的プライマーを用いた定量的 **RT-PCR (RT-qPCR)** 法が開発された。本手法は操作が簡便であり、細菌 1 個あたり約 **10,000** 個存在する **rRNA** を標的とするため、細菌ゲノム 1 個あたり数コピーしか存在しない **rRNA** 遺伝子を標的とする従来の **qPCR** 法と比較して、**100~1,000** 倍高い検出感度を有している。さらに、**RNA** は死菌中で速やかに分解されるため、本手法により、高精度な生菌の定量が可能である。このような特長を有する **RT-qPCR** 法により、腸内細菌叢を構成する

一部の細菌群および菌種の正確な定量が可能となったが、ヒト腸管内において、多くの細菌の分布はいまだ不明である。また、**RT-qPCR** 法はその汎用性の高さから、腸内細菌叢解析のみにとどまらず、他の微生物生態系の解析にも応用が可能である。以上の背景から、本研究では、**RT-qPCR** 法の対象となる重要な細菌群および菌種について、測定系を拡充するとともに、これらを用いた微生物生態系の比較解析研究を行うことを目的とした。

## 第2章 *Clostridium coccoides* group の詳細な定量測定系の構築および応用

ヒト腸内細菌叢の最優勢嫌気性細菌群の1つである *C. coccoides* group には、酪酸産生、二次胆汁酸産生および腸管免疫系の誘導等の様々な生理機能を有する細菌が含まれており、それゆえ、本グループの細菌種は宿主の健康に大きな影響を与えている。しかしながら、ヒト腸管内におけるそれらの分布の詳細は明らかにされていない。そこで、既存のデータベースをもとに本グループを便宜的に3菌群19菌種に系統化し、それぞれを標的とした特異的プライマーを構築した。これらを用いた **RT-qPCR** 法により、96名の被験者（32名の幼児、32名の成人および32名の高齢者）の腸内細菌叢を解析した結果、いずれの年代においても *Blautia* 属菌が腸内最優勢細菌群であること、また *Ruminococcus gnavus* や *Ruminococcus torques* も高い菌数レベルで広く分布していることが明らかとなった。一方、次のような各年齢層における本菌群構成の特徴が明らかになった。すなわち、①成人において、*Fusicatenibacter saccharivorans*、*Eubacterium ramulus* および *Dorea* 属菌の検出頻度が高いこと、②幼児において、*Clostridium nexile* の検出頻度が高いこと、さらに、③高齢者において、*Clostridium scindens* および *Clostridium hylemonae* の検出頻度が高いこと等の特徴が初めて明らかとなった。クラスタリング解析および主成分分析の結果、高齢者における *C. coccoides* group 細菌叢パターンは、成人のそれと大きく異なることが示唆された。

## 第3章 ヒト腸内における腸内細菌科細菌の菌種構成の解析

腸内細菌科には、その代表菌種である大腸菌 (*Escherichia coli*) の他、臨床上重要な菌種が多く含まれている。しかし、腸内細菌科細菌の菌種を正確に定量する手法がこれまで存在しなかったため、ヒト腸内におけるそれらの構成は明らかにされていない。そこで、世界で初めて *E. coli* 特異的プライマーを開発し、**RT-qPCR** による高感度な *E. coli* 定量系を確立した。本定量系および既報の腸内細菌科定量系を併用して、35名の健常成人糞便細菌叢を **RT-qPCR** 法により解析した結果、腸内細菌科細菌および *E. coli* はいずれも35名中29名から検出され、菌数はそれぞれ糞便1gあたり  $10^{7.1 \pm 0.9}$  個および  $10^{6.8 \pm 0.7}$  個だった。さらに、クローンライブラリー法を用いた解析の結果、多くの被験者では *E. coli* が主体であるが、*E. coli* 以外にも、*Citrobacter freundii*、*Enterobacter cloacae*、

*Klebsiella oxytoca* 等の様々な腸内細菌科細菌がヒト腸内に広く分布していることが明らかとなった。

#### 第4章 腸管病原細菌の高感度定量システムの構築

腸管病原細菌の高感度かつ高精度な検出は、腸管感染症の診断や感染患者の早期治療に重要である。そこで、代表的な腸管病原細菌 (*Vibrio cholerae/mimicus*、*V. parahaemolyticus*、*Campylobacter jejuni/coli*)、それぞれに特異的なプライマーを作製し、**RT-qPCR** 法による腸管病原細菌定量系を構築した。本手法の導入により、既存の **PCR** 法と比較して、標的菌種を  $10^2 \sim 10^3$  倍高い感度で検出可能となった。また、純培養した上記病原細菌を健常人の糞便に接種し、**RT-qPCR** 法と培養法により当該菌の菌数定量を行った結果、両者には高い相関が認められた。

#### 第5章 定量的 **RT-PCR** 法の膣内細菌叢解析への応用

膣内では、腸内とは異なる微生物生態系（膣内細菌叢）が形成されているが、その構成の詳細は明らかにされていない。そこで、膣内常在菌を標的とした **10** セットのプライマーを新規に開発した。これらのプライマーセットと既報の **25** プライマーセットを用いて、**12** 名の健常日本人女性の膣内細菌叢を **RT-qPCR** 法により解析した。その結果、膣内細菌叢は多種多様な菌種から構成されていることが明らかとなり、中でも数種類の乳酸桿菌が粘液 1ml あたり  $10^7$  個レベルの主要な菌群として検出された。*Gardnerella vaginalis*、*Atopobium vaginae*、*Mobiluncus curtisii*、*Prevotella* 属菌といった膣炎関連菌も数名の被験者から検出され、一部の被験者ではこれらが粘液 1ml あたり  $10^9$  個レベルで検出された。さらに、*Streptococcus* 属菌や *Staphylococcus* 属菌といったグラム陽性球菌が、既報と比較して高頻度に検出された。

#### 総括

以上の結果から、ヒト腸内において主要な細菌群である *C. coccoides* group および大腸菌の高感度な定量が可能となり、健常人の腸内におけるこれらの分布が明らかとなった。本手法を用いた腸内細菌叢解析と宿主の健康状態の追跡調査により、腸内細菌叢の機能についての理解が深まることが期待される。また、主要な腸管病原細菌の高感度な定量が可能となり、腸管感染症患者の高精度な診断のみにとどまらず、潜在的な保菌者の同定も可能となった。現に、本手法を導入した調査研究により、インド・コルカタ市在住の一部の健常者の腸内に *V. cholerae/mimicus* が常在していることが明らかとなる等、今まで知られていなかった画期的な研究成果が得られている。さらに、**35** プライマーセットを使用した、これまでに例のない高感度かつ高精度な膣内細菌叢解析が可能となり、

この成果は、膣炎および膣感染症の高精度な診断法の確立に繋がるものと考えられる。今後も、標的細菌種を拡充することで、**RT-qPCR** 法による腸内および膣内細菌叢解析技術の発展、さらに他の微生物生態系の解明への応用が期待される。

## 審査結果の要旨

ヒトの腸管内には多種多様な細菌が棲息して、複雑な微生物生態系(腸内細菌叢)を形成している。腸内細菌叢は免疫系の成熟、ビタミン等の必須栄養素の合成、難消化性多糖の分解等に関わっており、ヒトの健康と密接な関係をもつ。それゆえ、その構成を正確に把握することは腸内細菌叢の機能を理解する上で重要である。これまで、腸内細菌叢解析法として、培養法や定量的 **PCR [qPCR]** 法、**T-RFLP** 法、クローンライブラリー法等の各種分子生物学的手法が主に用いられてきたが、操作の煩雑性や検出感度等に問題がある。近年、高感度かつ高精度に腸内細菌叢を解析する手法として、菌群及び菌種特異的プライマーを用いた定量的 **RT-PCR (RT-qPCR)** 法が開発された。本手法は操作が簡便であり、細菌 1 個あたり約  $10^4$  個存在する **rRNA** を標的とするため、細菌ゲノム 1 個あたり数コピーしか存在しない **rRNA** 遺伝子を標的とする従来の **qPCR** 法と比較して、**100~1,000** 倍高い検出感度を有している。さらに、**RNA** は死菌中で速やかに分解されるため、本手法により、高精度な生菌の定量が可能である。このような特長を有する **RT-qPCR** 法により、腸内細菌叢を構成する一部の細菌群及び菌種の正確な定量が可能となったが、ヒト腸管内において、多くの細菌の分布はいまだ不明である。また、**RT-qPCR** 法はその汎用性の高さから、腸内細菌叢解析のみにとどまらず、他の微生物生態系の解析にも応用が可能である。

申請者は、**RT-qPCR** 法の対象となる重要な細菌群及び菌種について、測定系を拡充するとともに、これらを用いた微生物生態系の比較解析研究を行った。

第 1 章で研究の背景を述べ、第 2 章では、ヒト腸内細菌叢の最優勢嫌気性細菌群の 1 つである *Clostridium coccoides* group を 3 菌群 20 菌種に系統化し、それぞれを標的とした定量測定系を構築し、幼児、成人及び高齢者ごとの腸内細菌叢を解析した。*C. coccoides* group は、酪酸産生、二次胆汁酸産生及び腸管免疫系の誘導等の様々な生理機能を有する細菌が含まれ、人の健康に大きな影響を与えられているが、ヒト腸管内におけるそれらの分布の詳細は明らかにされていない。構築した **RT-qPCR** で細菌叢を解析した結果、いずれの年代においても *Blautia* 属菌が腸内最優勢細菌群で、*Ruminococcus gnavus* や *Ruminococcus torque* も高い菌数レベルで広く分布していることを明らかとした。さらに、成人において、*Fusicatenibacter*

*saccharivorans*、*Eubacterium ramulus* 及び *Dorea* 属菌の検出頻度が高いこと、幼児において、*Clostridium nexile* の検出頻度が高いこと、さらに、高齢者において、*Clostridium scindens* 及び *Clostridium hylemonae* の検出頻度が高いことを初めて明らかとし、高齢者における *C. coccoides group* 細菌叢パターンは、成人のそれと大きく異なることを示した。

第 3 章では、世界で初めて *E. coli* 特異的プライマーを開発し、RT-qPCR による高感度な *E. coli* 定量系を確立し、ヒト腸内における腸内細菌科細菌の菌種構成を解析した。その結果、腸内細菌科細菌及び *E. coli* はいずれも調べた 35 名中 29 名から検出され、菌数はそれぞれ糞便 1 g あたり  $10^{7.1 \pm 0.9}$  個及び  $10^{6.8 \pm 0.7}$  個であった。さらに、クローンライブラリー法を用いた解析の結果、多くの被験者で *E. coli* が主体であるが、*E. coli* 以外にも、*Citrobacter freundii*、*Enterobacter cloacae*、*Klebsiella oxytoca* 等の様々な腸内細菌科細菌がヒト腸内に広く分布していることを明らかとした。

第 4 章では、代表的な腸管病原細菌、すなわち *Vibrio cholerae*/*V. mimicus*、*V. parahaemolyticus*、*Campylobacter jejuni*/*C. coli* それぞれに特異的なプライマーを製作し、RT-qPCR 法による腸管病原細菌定量系を構築した。本 RT-qPCR 法を用いることで、既存の PCR 法と比較して標的菌種を 100~1,000 倍高い感度で検出可能となった。また、純培養した上記病原細菌を健常人の糞便に接種し、RT-qPCR 法と培養法により当該菌の菌数定量を行った結果、両者には高い相関が認められた。

第 5 章では、膣内細菌叢の詳細を解析することを目的に、膣内常在菌を標的とした 10 セットのプライマーを新規に開発した。これらのプライマーセットと既報の 25 プライマーセットを用いて、12 名の健常日本人女性の膣内細菌叢を RT-qPCR 法により解析した。その結果、膣内細菌叢は多種多様な菌種から構成されていることが明らかとなり、中でも数種類の乳酸桿菌が粘液 1 ml あたり  $10^7$  個程度の主要な菌群として検出された。*Gardnerella vaginalis*、*Atopobium vaginae*、*Mobiluncus curtisii*、及び *Prevotella* 属菌といった膣炎関連菌も数名の被験者から検出された。さらに、*Streptococcus* 属菌や *Staphylococcus* 属菌といったグラム陽性球菌が、既報と比較して高頻度に検出された。

本研究において、ヒト腸内において主要な細菌群である *C. coccoides group* 及び大腸菌群の高感度な定量が可能となり、健常人の腸内におけるこれらの分布が明らかとなった。また、主要な腸管病原細菌の高感度な定量が可能となり、腸管感染症患者の診断精度を高めただけでなく、潜在的な保菌者の同定も可能となった。さらに、高感度かつ高精度な膣内細菌叢解析を可能とし、膣炎及び膣感染症の新たな診断法の確立に繋がるものと考えられる。これらの成果は、人のみならず他の動物種における腸内及び膣内細菌叢の解析、さらには他の微生物生態系の解明への応用が期待され、医学領域のみならず獣医学領域においても多大な貢献をするものと考えられる。従って、本論文の審査及び学力確認の結果をあわせて博士(獣医学)の学位を授与することを適当と認める。