

氏名(本籍)	坂田 慎治 (埼玉県)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	甲第12号
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	<i>Bifidobacterium</i> 属の系統分類学的研究 —系統解析および生態に関する検討—
論文審査委員	(主査) 福山 正文 (副査) 松田 基夫 本田 政幸 辨野 義巳 (理化学研究所微生物系統保存施設室長)

論文内容の要旨

Bifidobacterium 属は1900年に乳児から初めて分離され、その後、1963年に *Bifidobacterium* 属の基準種となる *B.bifidum* が命名提案された。また、その分類・同定方法は表現形質に基づいて分類されてきたが、1969年からはDNA-DNA相同性試験による分類が主流になり、現在においても分類の基準となっている。ところが、*Bifidobacterium* 属には、異なる菌種間で類似した表現型や高いDNA-DNA相同性を示す菌種が存在することが示唆され、これのみでは *Bifidobacterium* 属の分類・同定に混乱を招くことから要因となることから、これらの代わる明確な分類・同定法の開発が必要とされてきた。また、16S rDNA塩基配列に基づいた系統解析が行われるようになり、表現型やDNA-DNA相同試験と同様に、*Bifidobacterium* 属の菌種間で高い類似性を示す菌種が存在することが報告されている。このことから、これらの菌種については明確な分類法あるいは新たな分類体系が必要であると考えられる。また、*Bifidobacterium* 属の分類学的な問題が指摘されてきた菌種のなかでも、*B.infantis*、*B.longum* および *B.suis* の3菌種は高いDNA-DNA相同性を示すことが知られている。そのことから、同一菌種であるかどうか論じられているが、明らかにされていないのが実情であり、分類学的な検討を行う必要がある。一方で、ヒトおよび動物の腸管内に多種類の菌群が存在し、特に乳児の腸管内において *Bifidobacterium* 属が優勢菌種として存在し、本菌が大腸内細菌叢の環境の改善や免疫調整または感染防御などとの関連性が重要視されている。また、腸管内には、高度嫌気生菌や特殊な培養法を必要とし、通常の培養法では培養が困難な菌種が存在することが知られている。しかしながら、*Bifidobacterium* 属とそれら培養困難な菌種との拮抗関係、培養困難な菌種の構成または培養困難な菌種と乳児の健康との関連性は把握されていないのが実情である。そこで、上述のことから加味して、*Bifidobacterium* 属における系統分類を明確するため、新しい分類・同定方法としてリボタピング解析を行い、16S rDNA塩基配列に基づく系統解析と比較を行った。また、*B.infantis*、*B.longum* および *B.suis* については糖分

解性状、DNA-DNA 相同性試験、リボタイピングおよび RAPD-PCR を用いて分類学的な検討を行った。さらに、*Bifidobacterium* 属の生体に関する研究として、1ヶ月齢の乳児の糞便（母乳栄養、混合栄養、人工栄養）を対象とし、乳児の栄養法の違いに伴う *Bifidobacterium* 属と大腸内細菌叢の関連性を検討するために、従来の培養法と PCR 法による *Bifidobacterium* 属の検出、さらに分子生物学的手法の1つである Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 解析および 16S rRNA クローンライブラリーを用いた乳児の大腸内細菌叢の解析を行った。その成績は以下の通りである。

1) *Bifidobacterium* 属 28 菌種 2 亜種の計 97 株を使用し、RiboPrinter[®] System (TaKaRa) を用いたりボタイピング解析と 16S rDNA 塩基配列に基づいた系統解析を行った。今回用いた RiboPrinter[®] System による *Lactobacillus* や *Staphylococcus* の分類学的検討では、類似度 50~60% を基準とした型別でそれぞれの菌種を識別されている。そのことから、リボタイピング解析後、得られた各 *Bifidobacterium* のリボパターンを類似度 60% で型別を行ったところ、クラスター I から IX の 9 つのクラスターに型別され、そのうちクラスター V には供試した 28 菌種のうち 18 菌種が含まれた。このことから、さらに詳細に検討するために、類似度 90% を基準としてさらに細分類を行ったところ、各クラスターはさらに細分類された。なかでもクラスター V は a~w の 23 のサブクラスターに分けられた。これまでに *B. indicum* および *B. coryneforme* グループ、*B. catenulatum* および *B. pseudocatenulatum* グループ、*B. saeculare*、*B. gallinarum* および *B. pullorum* グループおよび *B. infantis*、*B. longum* および *B. suis* グループの各菌種間では高い DNA-DNA 相同性を示すが、これらの各菌種はそれぞれ異なるサブクラスターに含まれ、分けることが可能であった。その一方で、2 菌種以上が含まれるサブクラスターや 2 つ以上のクラスターに分かれる菌種が認められた。リボタイピング解析において、異なる菌種間で類似したパターンを示す場合や 1 菌種が異なるパターンを示す場合、前者は同一菌種、後者は別種であることが推定される。そこで、各供試菌株の 16S rDNA 塩基配列を決定し比較したところ、各菌種は基準株に対し、類似度 98% 以上の類似度を示しそれぞれ同一菌種であることが認められた。このことから、*Bifidobacterium* 属の場合リボパターンの多様性は種により異なることが考えられた。また、*B. adolescentis* の供試菌株はすべて異なるサブクラスターに分けられた。その 16S rDNA 塩基配列を比較したところ、V1 および V2 領域に違いが認められ、このことから *B. adolescentis* は他の種よりもヘテロである事が認められた。さらに、*B. pseudolongum* subsp. *globosum* および *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum* は DNA-DNA 相同性試験において基準株とは異なるグループ（中間型 I および II）が存在することが報告されている。そこで、サブクラスターと比較したところ各中間型に相当する菌株は、基準菌株と異なるクラスターに含まれた。これらのことから、リボタイピング解析は *Bifidobacterium* 属の分類・同定に有効であることが認められた。

2) *B. infantis* 12 株、*B. longum* 11 株および *B. suis* 2 株の計 25 株について分類学的な検討を行ったところ、DNA-DNA 相同性試験では、各菌種間の DNA-DNA 相同値が 42℃ の条件下では 67~81%、さらに 52℃ では 63~85% の相同性を示し、同一菌種であることが認められた。*B. longum* は *B. infantis* および *B. longum* に対し命名の優先性をもつことから、*B. infantis* と *B. suis* を *B. longum* として統合するこ

とを提案した。ところが、これらの供試菌株の糖分解性状は多様であったが、リボタピングおよび PAPD-PCR によって3つに型別できることが認められた。このことから、3つの生物型； *Infantis* type、*Longum* type および *Suis* type として分類することを提案した（以下、*B. longum* を *B. longum longum* type、*B. infantis* を *B. longum infantis* type および *B. suis* を *B. longum suis* type とする）。

3) *Bifidobacterium* 属の生態学的な検討として、2002年2～8月に1ヶ月齢の栄養法の異なる健康乳児67例（母乳30例、混合26例および人工11例）から得られた新鮮排泄便を用いて、培養法による *Bifidobacterium* 属の検出を試みたところ、その検出率は72.7%であったが、PCR法による検出では100%から検出された。PCR法による各菌種別の検出率では、*B. longum longum* type が16例（62.7%）と最も高率に検出され、次いで *B. longum infantis* type が22例（32.8%）、*B. breve* が16例（23.9%）から検出された。また、各栄養法からの各菌種の検出率は同じ傾向を示した。さらに、糞便中の総菌数と培養菌数の比較を行った結果、大腸内細菌叢の22～94%（平均70%）が培養困難な大腸内細菌であることが明らかになった。そこで、培養困難な大腸内細菌を含めた解析を行うために、T-RFLP解析を行ったところ、各検体は2クラスター（I；34例、II；33例）に分けられ、さらにa、b、c、dおよびeとして5つのサブクラスターに分けられた。クラスターと栄養法との関連性を調べたところ、各クラスターにそれぞれの栄養法が混在して含まれるため、栄養法ごとにその構成に特定の傾向がないことが明らかとなった。しかしながら、母乳栄養に比べ特徴的なクラスターは形成しなかった。このことから、母乳栄養の大腸内細菌叢は比較的類似した構成であるのに対し、混合栄養または人工栄養の大腸内細菌叢の構成は多様であることが明らかとなった。

4) PCR法により検出された *Bifidobacterium* 属と各クラスターとの比較では、*B. bifidum* は7例（10.4%）から検出されて、サブクラスターa（4例）およびd（3例）のみから検出された。検出された16例の *B. breve* のうち13例がクラスターIに含まれ、その11例がサブクラスターaに含まれた。T-RFLPのクラスターにより *Bifidobacterium* 属の検出率が異なる傾向が見られた。さらに、T-RFLPの各ピークを解析する目的で母乳栄養児1例（baby 4：男児、生後一ヶ月齢）について16S rDNAクローンライブラリーを構築したところ、*B. breve*、*Rothia dentocariosa*、*Staphylococcus epidermidis*、*Streptococcus indantis*/*Streptococcus mitis* および *Streptococcus salivarius* の5菌種のクローンが検出された。このうちT-RFLP解析において *Hha* I で全体のピーク面積の60.6%を占める579bpと *Msp* I で58.5%を占める553bpのピークには *S. salivarius* が該当した。一方、培養法で最優勢に分離された *B. breve* のピーク面積は *Hha* I が4.4%および *Msp* I が3.6%であった。baby 4からは培養法では *Bifidobacterium* 属が10.2log/g、*Streptococcus* 属が9.2log/gであるのに対し、T-RFLPおよび16S rDNAクローンライブラリーは定量的には一致しない成績であった。このことは培養可能な菌種数が約30%であることから、培養では検出されにくい *Streptococcus* 属が優勢に存在し、それが検出されていることが考えられた。その一方で、16S rDNAのコピー数やPCRバイアスにより *Streptococcus* 属が優勢に検出された可能性も考えられ、さらに定量PCR法やFISH法を併用した定量的な検討を行う必要があると考えられた。

論文審査の結果の要旨

Bifidobacterium 属は1900年にTissierによって、母乳栄養児の糞便から初めて分離され、当初 *Bacillus bifidus communis* と命名された。それ以降、*Bifidobacterium* 属の分類に関しては様々な提案および統合が行われてきた。現在、*Bifidobacterium* 属の分類・同定方法は表現型やDNA-DNA相同性試験に基づいて行われているが、これのみでは *Bifidobacterium* 属の分類・同定に混乱を招く要因があることから、これらに代わる明確な分類・同定法の開発が必要とされている。最近、16S rDNA塩基配列に基づいた系統解析が行われるようになり、表現型やDNA-DNA相同性試験と同様に *Bifidobacterium* 属の菌種間で類似した高い相同性を示すことが報告されている。このことを考慮するとこれらの菌種については明確な分類法または新たな分類体系が必要と考えられる。また、*Bifidobacterium* 属の中で、従来から分類学的な問題が指摘されてきた *B. infantis*、*B. longum* および *B. suis* の3菌種は高いDNA-DNA相同性を示すことから同一菌種であるかどうか論じられているが、明らかにされていないのが実情であり、分類学的解析を検討する必要がある。一方、ヒトおよび動物の腸管内には多種類の菌群が存在し、特に乳児の腸管内において *Bifidobacterium* 属が優性菌種として存在し、本菌が腸管内細菌叢の環境の改善や免疫調整または感染防御などに関与していることから重要視されているが、培養困難な菌種と明確な関連性やその存在が把握されていないのが実情である。

著者は上述のことから、*Bifidobacterium* 属における系統解析を解明するため、糖分解性状、DNA-DNA相同性試験を行うとともに、新しい分類・同定方法としてリボタイピング解析およびRAPD-PCRを用いて、16S rDNA塩基配列に基づく系統解析と比較を行った。さらに、*Bifidobacterium* 属の生態に関する研究として、1ヶ月齢乳児の糞便（母乳栄養、混合栄養、人工栄養）を対象とし、乳児の栄養法の違いに伴う *Bifidobacterium* 属と大腸内細菌叢の関連性を検討するために、従来の培養法とPCR法による *Bifidobacterium* 属の検出、さらに分子生物学的手法の一つである Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 解析および16S rDNAクローンライブラリーを用いた乳児の大腸内細菌叢の解析を行った。その概要は以下の通りである。

1) *Bifidobacterium* 属 28菌種2亜種の計97株について、リボタイピング解析と16S rDNA塩基配列に基づいた系統解析を行ったところ、類似度90%で1つのクラスターに含まれる菌種が認められたが、一方で1菌種であるが複数のクラスターに型別される菌種の存在が認められた。特に、*B. adolescentis* の供試菌株は全て異なるクラスターに型別された。また、供試した各 *B. adolescentis* 株の16S rDNA塩基配列を比較したところ、16S rDNAのV1およびV2領域において配列の違いが認められ、*B. adolescentis* は他の菌種よりも種内の多様性に富むことが明らかになった。

2) *B. infantis*、*B. longum* および *B. suis* について、DNA-DNA相同性試験を行ったところ、42℃の条件下では67-81%、さらに52℃では63-85%の相同性を示した。また、*B. longum* は *B. infantis* および *B. suis* に対して命名の優先性を持つことから、*B. infantis* および *B. suis* を *B. longum* として統合することを提案した。ところが、これらの供試菌株の糖分解性状は多様性を示し、さらにリボタイピングおよびRAPD-PCRにおいて3つの型に分類された。そのことから、*B. longum* を3つの生物型：*Infantis type*、

Longum type および Suis type として分類することを提案した。

1) 培養法別による *Bifidobacterium* 属の培養菌数および検出率において、培養法では *Bifidobacterium* 属の検出率は 72.7%であったが、PCR法では *Bifidobacterium* の検出率は 100%であった。各菌種別の検出率では *B. longum* longum type が全体の 62.7%と最も多く、次に *B. longum* infantis type が 32.8%、*B. breve* が 23.9%であった。また、*B. adolescentis*, *B. bifidum* および *B. catenulatum* group は 10.5～13.4%であった。*Bifidobacterium* 属の検出率の各栄養法による差は認められなかった。また、乳児の大腸内細菌叢の総菌数と培養菌数を比較したところ、培養菌数は総菌数の約 30%程度に過ぎず、残りの約 70%が培養困難な菌種であることが明らかとなった。一方、*Hha* I および *Msp* I による T-RFLP 解析において、各検体の T-RFLP はクラスター I および II さらにサブクラスター a～e に型別された。そのうち、母乳栄養はサブクラスター a に多く含まれる傾向が認められたが、混合栄養や人工栄養は母乳栄養に比べ特徴的なクラスターは形成しなかった。このことから、母乳栄養の大腸内細菌叢は比較的類似した構成であるのに対し、混合栄養または人工栄養に大腸内細菌叢の構成は多様であることが考えられた。

2) *Bifidobacterium* 属の菌種構成との比較では、*B. breve* がサブクラスター a に多く含まれる傾向が認められ、母乳栄養の大腸内細菌叢と *B. breve* に関連性があることが明らかになった。さらに、T-RFLP の各ピークを解析する目的で母乳栄養児 1 例について 16S rDNA クローンライブラリーを構築したところ、*B. breve*, *Rothia dentocariosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus indantis*/*Streptococcus mitis* および *Streptococcus salivarius* の 5 菌種のクローンが検出された。このうち T-RFLP 解析の *Hha* I で全体のピーク面積の 60.6%を占める 579 bp と *Msp* I で 58.5%を占める 553 bp のピークには *S. salivarius* が相当した。一方、培養法で最優勢に分離された *B. breve* のピーク面積は *Hha* I が 4.4% および *Msp* I が 3.6% であり、培養法と T-RFLP および 16S rDNA クローンライブラリーは定量的には一致しなかった。このことは 16S rDNA のコピー数や PCR バイアスにより *Streptococcus* が優性に検出された可能性も考えられ、さらに定量 PCR 法や FISH 法を併用し定量的な検討を行う必要があることが考えられた。

以上の成績から、*Bifidobacterium* 属の分類にリボタイピング解析を行い、DNA-DNA 相同性試験および 16S rDNA 塩基配列に基づく系統解析で相同性を示す菌種間の鑑別が可能であることを明らかにした。また、リボタイピングおよび RAPD-PCR において、Infantis type、Longum type および Suis type の 3 つの型に分類されたが、同一菌種内でも異なるグループであることから *B. longum* として統合し、それらを 3 つの生物型に分類できることを明らかにした。培養法による *Bifidobacterium* 属の培養菌数および検出率は各栄養別に顕著な差は認められなかったが、母乳栄養の大腸内細菌叢は比較的類似していたが、混合栄養及び人工栄養の大腸内細菌叢の構成は母乳栄養に比べ、多種多様の菌種であることを明らかにした。

以上のように本研究は *Bifidobacterium* 属の分類に分子生物学的手法を取り入れた研究および乳児の大腸内細菌叢の改善や免疫調整または感染防御に関する研究として、細菌学上、公衆衛生学的上高く評価される業績であり、博士（学術）の学位授与に値するものと認める。