第23回麻布環境科学研究会　講演B4

分子生物学的手法を用いた乳児の大腸内細菌叢の解析

坂田　慎治[1]，外岡　俊樹[2]，北原　真樹[1]，坂本　光央[1]，
高田　昌亮[3]，石関しのぶ[3]，福山　正文[4]，辨野　善己[1]

[1]理研・系統保存，[2]（株）和光堂，[3]都立豊島病院・小児科，[4]麻布大学院・微生物

1. はじめに

健康乳児の糞便1gには$10^{11\sim12}$個の細菌が存在し，培養法による検索で，その約90％以上がBifidobacterium属である。近年，分子生物学的手法を用いたヒトの大腸内細菌叢の解析が進み，培養法では検出困難な菌種（群）が実際には多く存在することが分かってきた。また，乳児の大腸内細菌叢における培養困難な菌種（phylotype）は，約70％にも達している。そのことから，大腸内細菌叢におけるBifidobacterium属の動態を難培養細菌も視野に入れながら明らかにするために，Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism（T-RFLP）法を用いた腸内細菌叢の多様性解析と培養法およびPCR法によるBifidobacterium属菌種の検出・同定を行った。

2. 材料および方法

2.1　供試検体

供試検体は，2002年2月から2002年8月に，都立豊島病院小児科で一ヶ月齢の健康乳児を対象とした。各乳児はその栄養の摂取形態により母乳栄養のみで育児したものを母乳栄養，母乳栄養に人工栄養を併用し育児したものを混合栄養そして，人工栄養のみで育児したものを人工栄養として区別を行った。排泄便は病院で採取後，3時間以内に実験に供した。

2.2　培養方法

糞便中の大腸内細菌叢はMitsuoka（1969）の方法に準拠し，100％CO2条件下でEG培地およびBL培地を用いて培養を行った。

2.3　T-RFLP法

片側を6-FAMでラベルした27Fプライマーおよび1492Rを用いてPCR法により糞便DNA中の各菌種の16S rDNAを増幅後，制限酵素Hha IおよびMsp Iを用いて16S rDNAの切断を行った。その後，ABI PRIZUM 310のGeneScanモードを用いて，蛍光ラベルのDNA断片の検出を行った。

2.4　PCR法によるBifidobacterium属の検出

Bifidobacterium属はMatsukiらの方法に準拠し，PCR法でB. adolescentis, B. bifidum, B. breve, B. catenulatum group, B.longum infantis typeおよびB. longum longum typeの6菌種の検出を試みた。

3. 結果および考察

T-RFLP法により得られた各T-RFパターンより作製したデンドログラムを図1に示す。本研究におけるT-RFLP解析では，各クラスターにおいて明確な栄養法の差は見られなかった。次に，PCR法でBifidobacterium属の菌種構成を比較したところ，B. longum longum typeが最優勢で，ついでB. longum infantis type，そしてB. breveの順に高率に検出され，その傾向は各栄養法ともに同じであった（図2）。これをT-RFLPのクラスター別に比較したところ，クラスターa，bおよびcからは約30％から検出されていたB. breveがクラスターdからは1例からも検出されず，T-RFパターンで得られたクラスターから，本属の菌種構成が異なることが認められた。また，培養法により大腸内細菌叢の培養綜菌数中のBifidobacterium属の占有率を比較したところ，栄養法別では顕著な差は認められなかったものの，クラスター別に比較したところ，クラスターaおよびbは平均60～70％であったのに対し，クラスターc

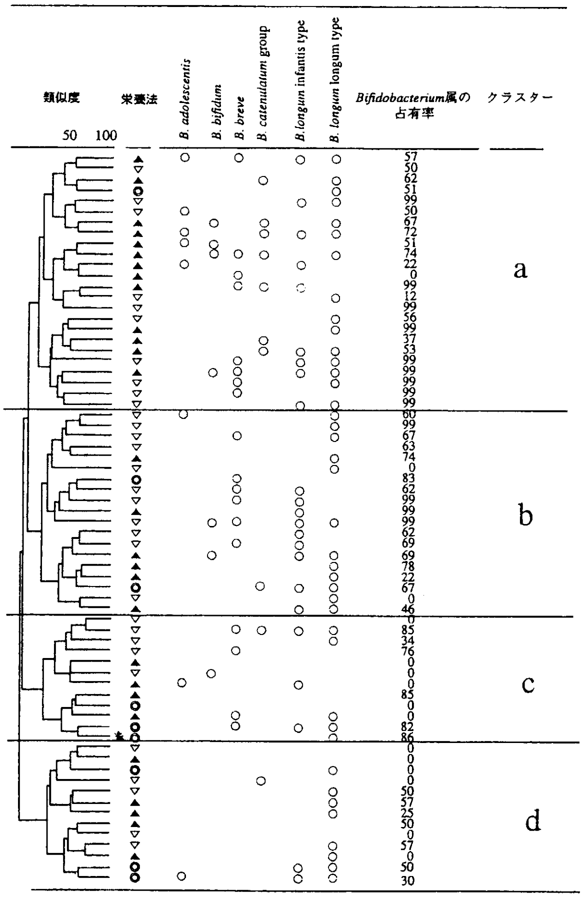

図1．乳児の大腸内細菌叢のT-RFLPデンドログラム
▽ 母乳栄養児、▲混合栄養児，◎人口栄養児
○はBifdobacterium属のPCR法での陽性検体を示す。

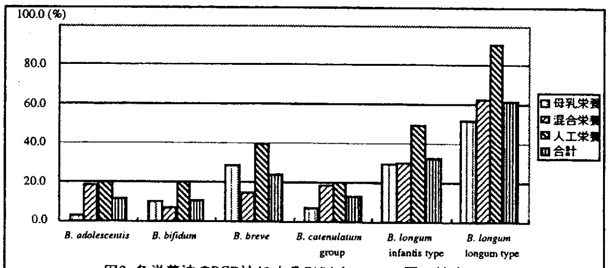

図2. 各栄養法のPCR法によるBifidobacterium属の検出

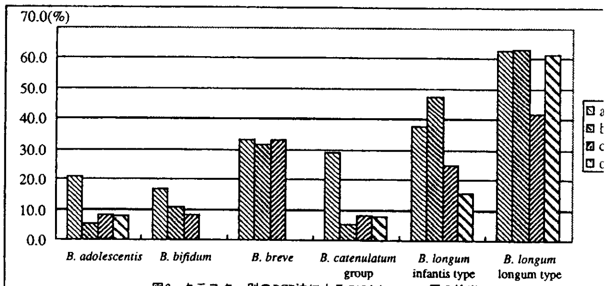

図3. クラスター別のPCR法による Bifidobacterium属の検出

表1. クラスターのBifidobacterium 属の培養法による占有率

	Bifidobacterium 属の占有率*
クラスターa	62.3±30
クラスターb	73.8±27
クラスターc	32.8±37
クラスターd	30.5±33

*Bifidobacterium 属培養菌数/培養総菌数

およびdでは約30％であった（表1）。Bifidobacterium属の占有率もPCRの検出率と同様にクラスターにより異なることが認められた。

これまでの従来の培養法を用いた乳児の腸内細菌叢の解析では，栄養法の違い（母乳栄養，混合栄養，人工栄養）により菌種構成が異なることが示されてきたが，T-RFLP解析では，同じ栄養法でも多様な菌種構成を示すことが認められた。また，主要菌種であるBifidobacterium属の構成はクラスターごとに異なることが認められ，Bifidobacterium属の菌種あるいは定量的な構成が大きく影響していることが考えられた。

大腸内細菌叢はアトピー性皮膚炎や壊死性腸炎などの発症に深く関係しているかもしれないとされている。また，未熟児においては感染症予防から腸内細菌叢の管理が必要とされている。今後は，腸内細菌叢（クラスター）と疾患との関係を解明する研究へ応用したい。