

厚生労働科学研究費補助金  
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

抗菌剤治療により寛解する難治性炎症性腸疾患患者の  
網羅的細菌叢解析と病因・増悪因子細菌群の解明

平成22年度 研究報告書

平成23年3月

研究代表者

黒田 誠

(国立感染症研究所)

平成22年度厚生労働科学研究費補助金  
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

抗菌剤治療により寛解する難治性炎症性腸疾患患者の網羅的細菌叢解析と病因・増悪因子細菌群の解明

研究報告書

研究代表者 黒田 誠 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター センター長  
研究協力者 関塚剛史 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室

研究要旨

難治性腸疾患、特に潰瘍性大腸炎 (UC) は、個有の遺伝的背景と腸内細菌叢が密接に関連して発症する事が示唆されている。三種の抗菌剤 (アモキシシリン/テトラサイクリン/メトロニダゾール) を二週間投薬するだけで、その疾患が1年以上緩解する治療例が報告されている。しかしながら、その患者腸管内の膨大な細菌叢の中で、どの細菌が最もその疾患と相関するのかは不明である。本研究は、UC 発症の環境要因となる細菌叢を抗菌剤治療前後で網羅的且つ定量的に解析を行い、本疾患と密接に関連する細菌の探索を行い、本疾患の発症機序を環境要因の側から理解することを目的とする。これまでに、UC 患者の腸内細菌叢は、T-RFLP、定量 PCR、16S rDNA のシーケンス等の手法で解析されてきた。しかしながら、上記手法は網羅性もしくは定量性のどちらかに特化しており、密接に関連する菌種の特定に至らず、より網羅的且つ定量的解析が必要となる。細菌叢の新解析手法として、パイロシーケンス法による次世代シーケンサーが用いられているが、コストが高いのが難点である。本研究課題により、Illumina 社の次世代シーケンサーを用いて糞便中の minor group ( $1 \times 10^3 \sim 10^4$  cfu/1g) の細菌の検出も可能な、簡便で安価、網羅的且つ定量的解析手法を開発した。本手法を用いることで、複数検体の治療前後の細菌叢を詳細に比較する事が可能となり、本疾患に密接に関与する細菌が明らかになると期待される。

A. 研究目的

難治性腸疾患、特に潰瘍性大腸炎 (UC) は、個有の遺伝的背景と腸内細菌叢が密接に関連して発症する事が示唆されている。*Fusobacterium varium*がUCの増悪因子である可能性が報告されており、三種の抗菌剤 (アモキシシリン/テトラサイクリン/メトロニダゾール) を二週間投薬するだけで、その疾患が1年以上緩解することが明らかとなってきた。しかしながら、その患者腸管内の膨大な細菌叢の中で、どの細菌が最もその疾患と相関するのかは不明である。本研究は、UC発症の環境要因となる細菌叢を抗菌剤治療前後で網羅的且つ定量的に解析を行い、本疾患と密接に関連する細菌の探索を行い、本疾患の発症機序を環境要因の側から理解することを目的とする。

B. 研究方法

腸内細菌叢の網羅解析法を開発するために、糞便試料の調整法の検討を行った。16S rDNA 配列の糞

便中の DNA を市販のキット(QIAGEN DNA stool kit) のみで DNA 精製した場合と、糞便懸濁液を溶菌酵素 (lysozyme と achromopeptidase の混合) にて溶菌処理を施し、上記キットを用いて DNA 精製した場合の2通りを比較検討した。判定は、T-RFLP(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis)法にて検出される細菌種の多様性で判定した。

より多くの細菌種に分別できる 16S rDNA の可変領域を情報解析にて選別した。糞便検体の 16S rDNA 可変領域の PCR 増幅断片およびメタゲノム DNA ライブラリーを illumina GAII を用いて網羅配列解読し、細菌種鑑別に有効な配列対象を検討した。解読リードを相同性検索により細菌種を鑑別した。配列検索に使用したデータベースは、RDP10 (Ribosomal Database project release 10) と NCBI non-redundant nt データベースを用いた。

(倫理面への配慮)

特になし

## C. 研究結果

糞便試料の DNA 調整法を T-RFLP 法により検討した。16S rDNA を 8F および 1492R プライマーを用いて増幅し、制限酵素 MspI もしくは HhaI にて切断したプロファイルのフラグメント解析の結果、溶菌酵素による前処理により、Firmicutes などのグラム陽性菌の検出率が大幅に向上していることが分かった (図 1)。つまり、DNA 調整法によっては異なる成績結果をだしてしまうことを示唆していた。これ以降の網羅解読において、溶菌酵素による前処理を行った DNA サンプルを用いた。

次に、より多くの細菌種に分別できる 16S rDNA の可変領域を情報解析にて選別した。16S rRNA の二次構造と 8 箇所の可変領域 (V1 - V3) を図 2 に示している。情報解析の結果、最もバリエーションに富む可変領域 V3 を軸にして PCR 増幅し、イルミナ網羅解読用のライブラリーを作成した。

16S-rDNA ライブラリーおよびメタゲノム・ライブラリーの両方をイルミナ GAII で 78 mer 解読した。得られた解読リードを 100% 相同性を指標にして細菌種の鑑別を行った (図 3)。16S-rDNA を対象とした場合、55% 以上の解読リードの細菌種を分別できたのに対し、メタゲノム解読法では 25% 程度にとどまっていた。その理由として、全ての腸内細菌種のゲノム配列が明らかにされていない現状では、100% 相同性による厳しい閾値だと明確な鑑別ができないものと推察された。

さらに、100% 相同性検索で no hit に分類された 16S-rDNA 解読リード (44.5%) を分別するために、Type 株以外 (uncultured bacterium) の 16S-rDNA データベースで相同性検索したところ、80% 程度 (総計 90.5%) もの解読リードが類縁の細菌種に分類することができた。例を挙げると、Firmicutes で非常に潤沢に検出される配列 3 種類 (3 tag sequences) を見出すことができ、既存の配列データベースに登録されていない新規 Firmicutes の存在を明らかにした。

さらに解読リードを細菌属レベルで詳細に分類した (図 5)。ヒト糞便において最優勢グラム陰性菌である *Bacteroides* 属は  $10^6$  リード数検出されて

おり、幅広いダイナミックレンジで検出できることを示している。溶菌酵素処理の DNA 調整法によってグラム陽性菌の検出感度が向上し、ヒト糞便において最優勢グラム陽性菌である *Clostridia* の検出感度が全般的に向上していた (図 5)。

解読リードの検出量が定量的であるかどうか検討するために、細菌属特異的な PCR プライマーを用いた定量的 PCR の結果と比較検討した。結果、*Bifidobacterium* / *Prevotella* を除く対象を用いた相関係数は  $R^2=0.8546$  であり、非常に定量性のある網羅解読であることを示唆していた (図 6)。この定量性から、イルミナ解読リード 1000 万本あれば、 $10^7$  のダイナミックレンジで網羅的に細菌種を定量的に鑑別することができる。*Bifidobacterium* において相関性が見られないのは、V3 領域を増幅する際使用する 8F プライマーとの相同性が低いことが理由だと推察された。

図 5 における細菌属レベルの分類から更に種レベルにまで拡大して鑑別できるかどうか検討した。ヒト糞便において最優勢菌である *Bacteroides* 属と *Clostridium* 属に絞って詳細に分類した (図 7)。健常日本人の糞便から最も検出量の多い *Bacteroides* は、*B. plebeius* であることが分かった。また、メタゲノム法により分類された検出量と相関するかどうか比較検討した。16S-rDNA 配列が検出されないにも関わらず、メタゲノム法で大量に検出される細菌種が多数存在した (*Bacteroides fragilis* など)。そのメタゲノム法で検出された解読リードを再検証したところ、IS 配列、トランスポゾン、プラスミド配列など、*Bacteroides* 属間で伝達しあう因子であり、ある特定の *Bacteroides* sp. 種に確定的な配列ではないことが明らかになった。この結果は、メタゲノム解読により細菌種を鑑別する際、誤った検査結果を抽出する危険性を示唆していた。

## D. 考察

従来の 16S-rDNA を元にした細菌フローラ解析法では、 $10^{11}$  菌/g の菌数を有する腸内細菌フローラの氷山の一角しか検討されてこなかった。本研究課題により、 $\sim 10^4$  菌/g の検出感度まで深く解析・同定できる方法を開発した。

16S-rDNA を指標にした場合と、網羅解読によるメタゲノム解析法とで比較検討した。16S-rDNA を指標にしたほうが多くの細菌種を同定することができ、16S-rDNA データベースによる判定のほうが好ましいことが分かった。この結果は、現状の細菌ゲノム・データベース (Microbiome) は未だ不十分であ

り、網羅的な細菌種の特定のためにはより広範なデータベース策定が必須であることを示している。

本研究課題で開発した網羅的細菌種鑑別法は、属によっては種レベルの分類が可能である。また、比較的安価に網羅的かつ定量的に腸内細菌叢の全貌を解析する事ができる。優勢腸内細菌として知られるバクテロイデス属を一例に示すと、ヒト健常者の糞便から、*Bacteroides plebeius* が最優勢のバクテロイデスであることが明らかになった。*B. plebeius* は、海藻等の寒天を分解するβ-ポルフィラナーゼを産生し、日本人特有の*Bacteroides* 菌種として最近知られるようになった。日本人の腸内に特徴的に存在すると報告される*Bacteroides plebeius* は、健康な日本人の腸管内の*Bacteroides* 属内に於いて最優位を占めており、海藻を多く食する日本食文化と腸内細菌叢との関連が強く示唆される。

#### E. 結 論

コッホの4原則に適合する感染症は、その病原体が培養可能であり、且つ感染実験系が確立している為、その理解がし易い。しかしながら、その原則に当てはまらない培養不可能な病原体、および、病原性は低いが数種の要因で疾患を呈するものに関する理解は進んでいない。この様な、新たに提唱可能な新興感染症となりうる病原体の理解は、今後更に重要となる。また、難治性疾患であるUCは、上記のような新興感染症の可能性が強く示唆されるため、感染症と難治性疾患との関係をより詳細に理解

する為の研究が必要不可欠となる。本研究課題で開発した細菌叢の網羅鑑別法は、近年発症患者数が増加の一途を辿るUCの発症機序を細菌叢側から理解する事が可能であり、本疾患発症に重要な、新たな細菌の特定が可能となる。次年度以降にUC患者の糞便を用いた細菌叢網羅鑑別を行う予定である。得られた研究結果は、日本国内のみならず、全世界の本疾の予防、患者の治療、更にはその診断に重要な知見を提供できると考えている。

F. 健康危険情報  
特になし

G. 研究発表

1) 論文発表  
なし

2) 学会発表

① 関塚 剛史、黒田 誠。次世代シーケンサーを用いた16S rDNA配列解読による網羅的且つ定量的な腸内細菌叢解析。BMB2010(第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会) 東京 2010年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)  
該当なし

## T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis)法

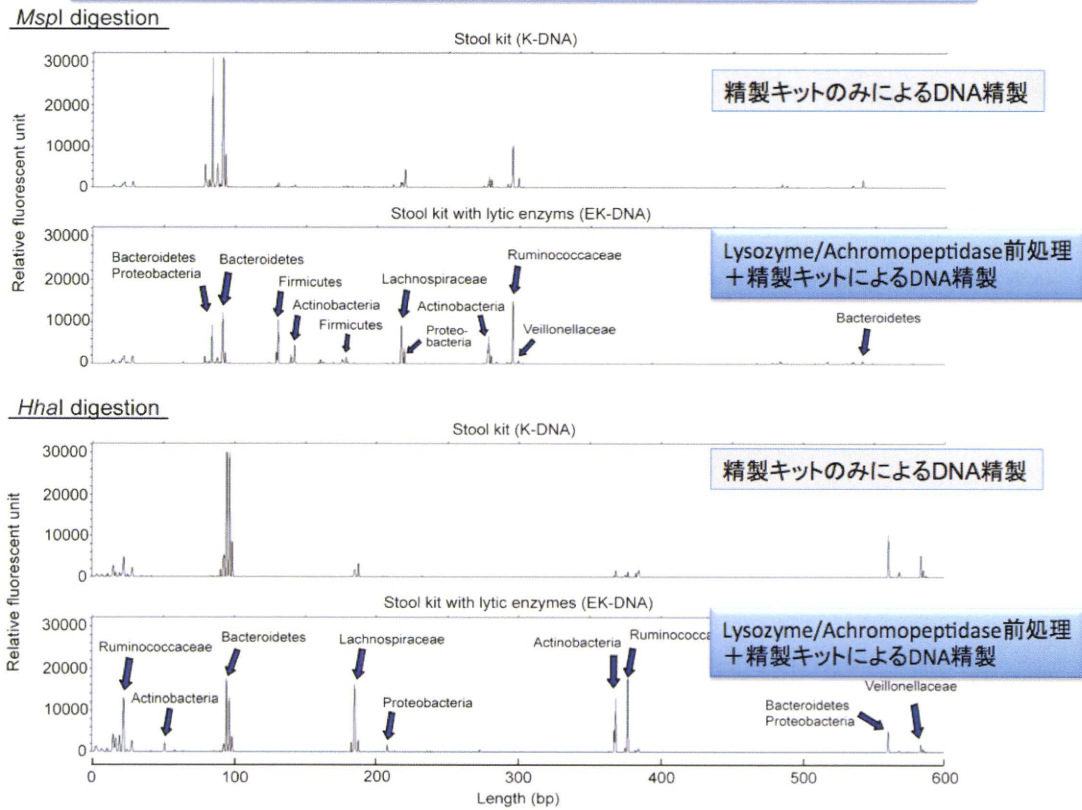


図1 T-RFLP法による糞便検体の細菌種同定。16S rDNAを8Fおよび1492Rプライマーを用いて増幅し、制限酵素MspIもしくはHhaIにて切断したプロファイルのフラグメント解析。溶菌酵素による前処理により、Firmicutesなどのグラム陽性菌の検出率が大幅に向上している。

## 16S-rDNAを元にした網羅的細菌叢解析

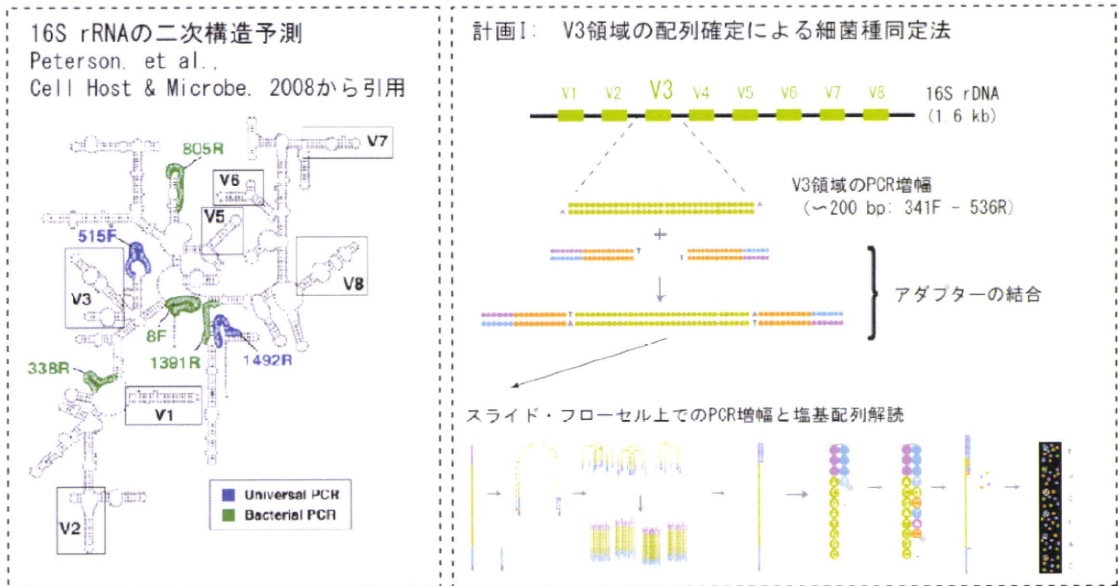


図2 16S rRNAの二次構造と8箇所の可変領域(V1 - V3)。情報解析の結果、最もバリエーションに富む可変領域V3を軸にしてPCR増幅し、イリミナ網羅解読用のライブラリーを作成した。

## 16S-rDNAを指標にした細菌フローラ解析

明らかに16S-rDNAを指標にしたほうが多く分類できる

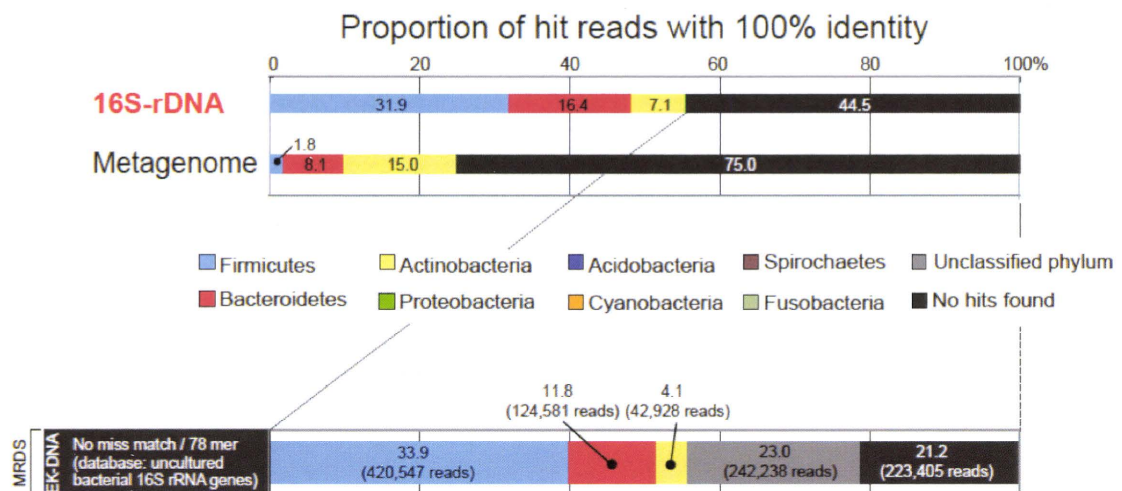


図3 16S-rDNA ライブラリーおよびメタゲノム・ライブラリーの両方をイルミナ GAI II で 78 mer 解読した。得られた解読リードを 100% 相同性を指標にして細菌種の鑑別を行った。16S-rDNA を対象とした場合、55% 以上の細菌種を分別できたのに対し、メタゲノム解読法では 25% 程度にとどまっていた。その理由として、全ての腸内細菌種のゲノム配列は明らかにされていない現状では、100% 相同性による厳しい閾値だと明確な鑑別ができないものと推察された。

## 16S-rDNAを指標にした細菌フローラ解析

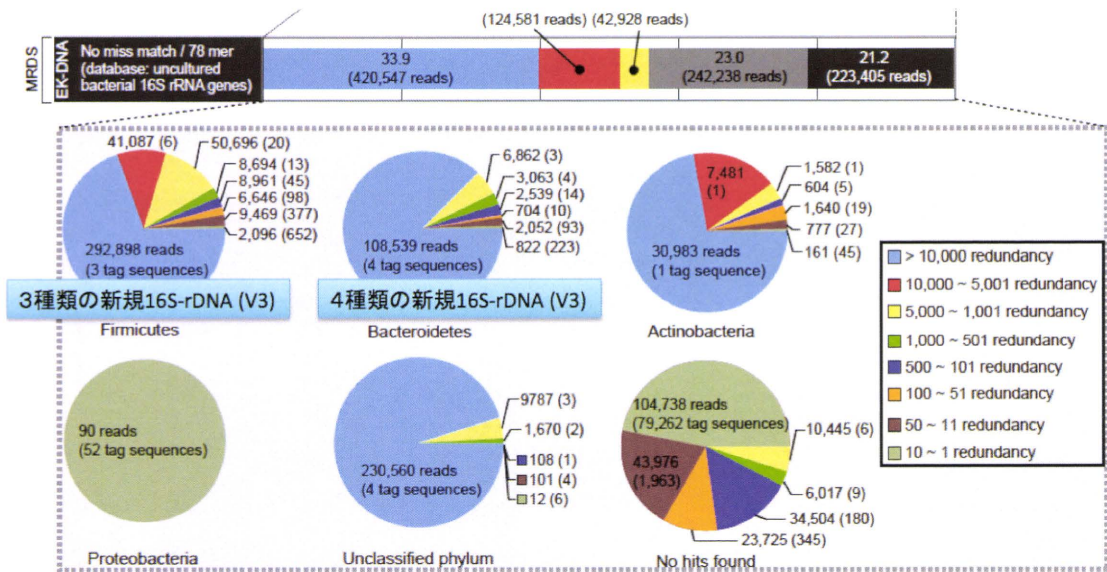
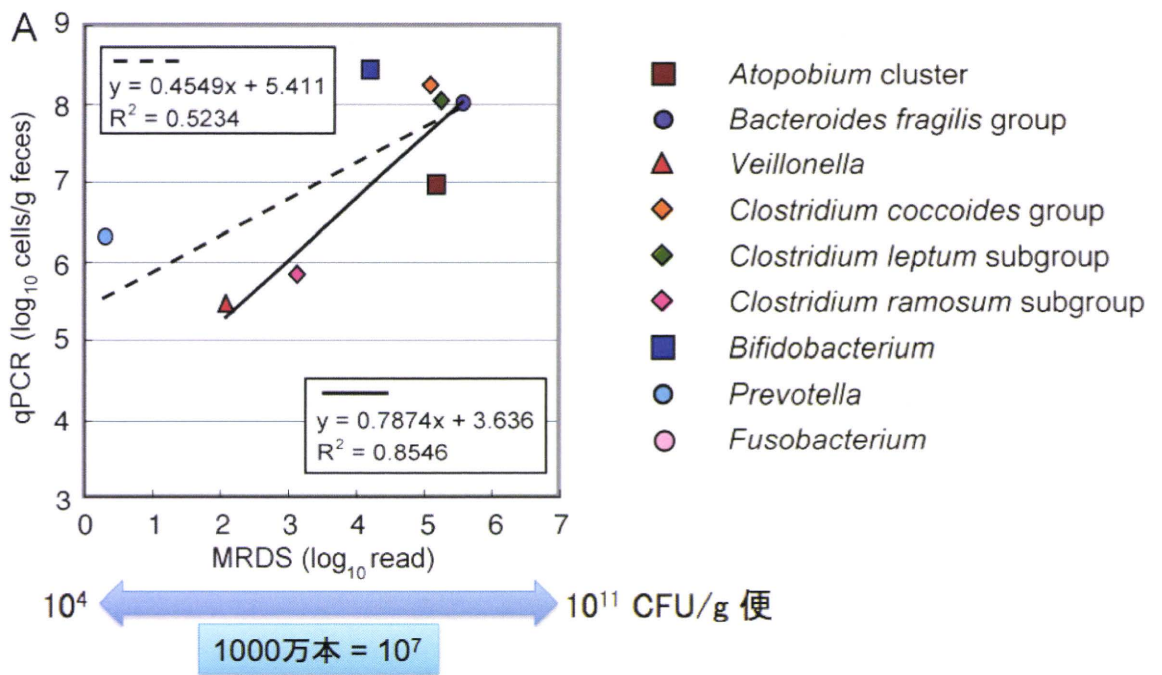


図4 上記図3において100%相同性検索で no hit に分類された16S-rDNA解読リード (44.5%) を分別するために、Type株以外(uncultured bacterium)の16S-rDNAデータベースで相同性検索したところ、80%程度(総計90.5%)もの解読リードが類縁の細菌種に分類することができた。例を挙げると、Firmicutesで非常に潤沢に検出される配列3種類(3 tag sequences)を見出すことができ、現存の配列データベースに登録されていない新規Firmicutesの存在を明らかにした。





次世代シーケンサーによる網羅性・定量性・広範な検出ダイナミックレンジ



- ・ 網羅性 ... 難培養・未同定細菌の検出も可能
- ・ 定量性 ... qPCRの結果と高い相関性
- ・ 幅広いダイナミックレンジ ... 10<sup>4</sup> - 10<sup>11</sup> CFU/gの細菌種を一度に同定できる

図6 細菌属特異的なPCRプライマーを用いた定量的PCRとの比較検討。*Bifidobacterium*/*Prevotella*を除く対象を用いた相関係数はR<sup>2</sup>=0.8546であり、非常に定量性のある網羅解読であることを示唆していた。イルミナ解読リード1000万本あたり、10<sup>7</sup>のダイナミックレンジで網羅的に細菌種を定量的に鑑別することができる。

## 日本人(健常人)の糞便細菌フローラ

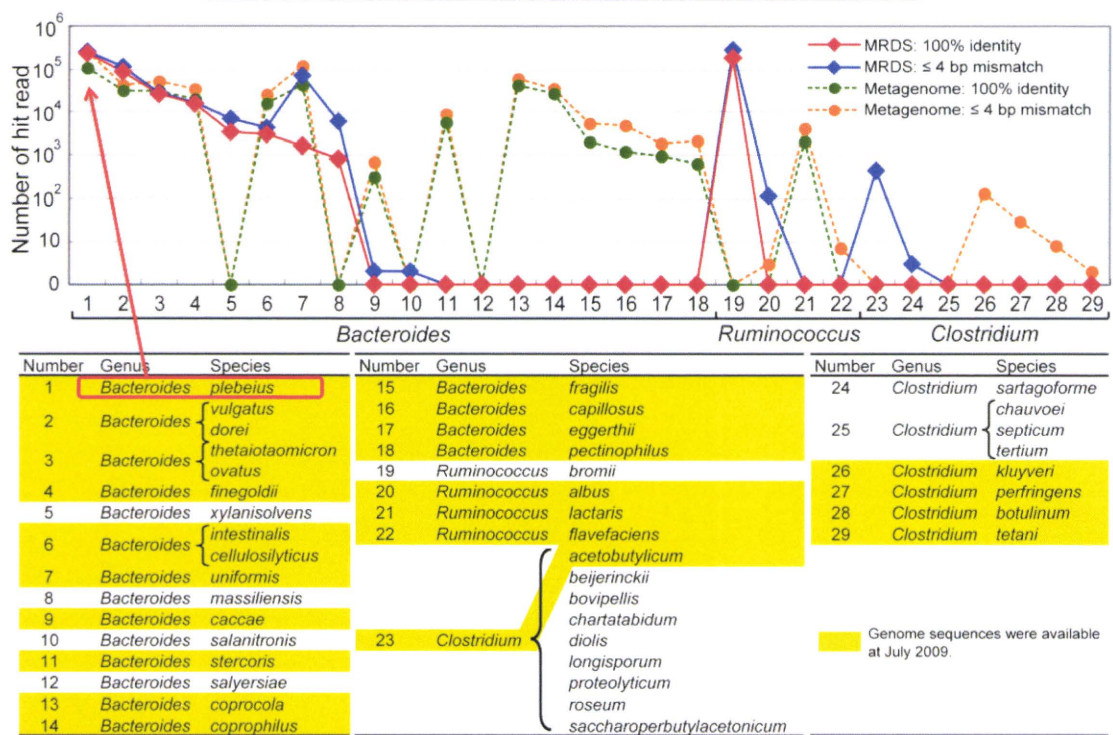


図7 細菌種レベルに拡大して鑑別できるかどうか検討した。ヒト糞便において最優勢菌である *Bacteroides* 属と *Clostridium* 属に絞って詳細に分類した。健常日本人の糞便から最も検出量の多い *Bacteroides* は、*B. plebeius* であることが分かった。16S-rDNA 配列が検出されないにも関わらず、メタゲノム法で大量に検出される細菌種が多数存在した (15: *Bacteroides fragilis* など)。そのメタゲノム法で検出された解読リードを再検証したところ、IS 配列、トランスポゾン、プラスミド配列など、*Bacteroides* 属間で伝達しあう因子であり、ある特定の *Bacteroides* sp. 種に確定的な配列ではないことが明らかになった。

