

**一般演題 B-4****ヒト糞便から分離された新菌種 *Fusicatenibacter saccharivorans* gen. nov., sp. nov. の分類と特徴****Characterization and classification of a novel microbe, *Fusicatenibacter saccharivorans* gen. nov., sp. nov., isolated from human feces**

○高田敏彦, 倉川 尚, 辻 浩和, 野本康二  
(株)ヤクルト本社中央研究所

**【目的】** ヒト腸内細菌叢の最優勢菌群の一つである *Blautia coccooides* group (*Clostridium* cluster XIV a) は, 宿主の腸内環境維持において重要な菌群であると考えられるが, クローンライブラリー法などにより, 未だ分離, 同定されていない菌種の存在が明らかにされている. 我々は, 最優勢の未同定菌種 (以後, LCR24 菌群と呼称) の単離を試み, 新菌種として提唱するために, 遺伝的および表現形質的特徴について調べた.

**【方法】** 16S rRNA 塩基配列の比較から, LCR24 菌群に特異的な部分塩基配列を決定し, その配列を基に PCR 用プライマーおよび FISH 用プローブを作製した. PCR 法により LCR24 菌群が糞便中に高菌数存在する健康成人 4 名を選抜し, その糞便を羊血液加ブルセラ寒天培地により培養した. コロニー PCR 法により LCR24 菌群である菌株を探索し, single colony isolation 後, 16S rRNA シークエンシング, 短鎖脂肪酸産生能, 各種酵素活性および糖発酵性状試験等を実施した.

**【結果】** 健康成人 3 名の糞便から LCR24 菌群が 3 菌株 (HT03-11, KO-38 および TT-111 株) 分離された. LCR24 菌群 3 菌株は, 16S rRNA 塩基配列に基づく系統樹では, *Blautia coccooides* group 内の既知菌種と独立したクラスターを形成し, 最も近縁な菌種 (*Clostridium bolteae* WAL 16351<sup>T</sup> および *C. saccharolyticum* WM-1<sup>T</sup>) との相同性が 93.7%であった. LCR24 菌群の表現形質的特徴として, 主要な短鎖脂肪酸として蟻酸, 酢酸, 乳酸およびコハク酸を産生し (前記近縁種では, 蟻酸とコハク酸を産生しない), 菌体 DNA の GC 含量が 46.9-47.2% (前記近縁種では, それぞれ 50.5%および 28.0%), イヌリンを資化し,  $\alpha$ -Galactosidase と Esterase lipase 活性を有する点が前記近縁種とは異なっていた.

**【考察】** LCR24 菌群 3 菌株は, 最も近縁な既知菌種との 16S rRNA 相同性が 97%未満であり, その他各種生化学的性状試験の結果から新属, 新菌種であると判断し, 新菌種 *Fusicatenibacter saccharivorans* gen. nov., sp. nov. として提唱した.

## 一般演題 B-5

## アジア 5 ヶ国児童の腸内細菌叢解析

## Diversity in gut bacterial community structure of Asian children profiled by 16S rRNA gene pyrosequencing

○ Jiro Nakayama<sup>1</sup>, Jiahui Jiang<sup>1</sup>, Koichi Watanabe<sup>2</sup>, Kazunori Matsuda<sup>2</sup>, Takashi Kurakawa<sup>2</sup>, Hirokazu Tsuji<sup>2</sup>, Fa-Zheng Ren<sup>3</sup>, Sunee Nitisinprasert<sup>4</sup>, Endang S. Rahayu<sup>5</sup>, Chii-Cherng Liao<sup>6</sup>, Ying-Chieh Tsai<sup>7</sup>, Yuan-Kun Lee<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Kyushu Univ., <sup>2</sup>Yakult Central Institute, <sup>3</sup>China Agric. Univ., <sup>4</sup>Kasetsart Univ.,

<sup>5</sup>Gadjah Mada Univ., <sup>6</sup>Food Industry R&D Institute, <sup>7</sup>National Yang-Ming Univ.,

<sup>8</sup>National Univ. of Singapore

**OBJECTIVE:** To investigate bacterial community structure in Asian gut microbiota and its correlation with varied ethnic characteristics, we analyzed fecal bacterial composition of healthy youngsters living in 10 cities in Asia [Lanzhou (LZ), Beijing (BJ), Tokyo (TK), Fukuoka (FK), Taipei (TP), Taichung (TC), Khon Kean (KK), Bangkok (BK), Yogyakarta (YY) and Bali (BL)]. The bacterial composition was analyzed by using pyrosequencing-based 16S rRNA profiling which has become an advantaged way for visualizing the community structure of gastro-intestinal (GI) tract microbiota.

**MATERIALS & METHODS:** Fecal samples were collected from healthy children aged 7 to 11 years living in the 10 cities with in total 303 subject samples (at least 25 subjects from one city) used for flora analysis. The V6-V8 segment of fecal bacterial 16S rDNA was amplified by PCR using eubacterial universal primers with barcode-sequence tag and subjected to sequence analysis by 454 GS FLX Titanium Sequencing System (Roche). After the chimera check, 1,689,054 reads were obtained and dereplicated into 20,654 OTUs with 97% identity. The RDP Classifier search and the RDP Seqmatch search were employed to identify taxonomy of each OTU. Relative abundance of each taxon from phylum to species was determined individually and subjected to statistical analysis, e.g., ANOVA and Mann Whitney U-test and multivariate analyses, e.g., principal component analysis (PCA) and random forest analysis.

**RESULTS & DISCUSSION:** Comparative analysis of bacterial composition among 10 cities indicated dominance of *Prevotella* in KK, YK and BL instead of dominance of *Bifidobacterium* and *Bacteroides* in the other cities. PCA showed two distinctive enterotypes: one was defined by *Bacteroides* and *Bifidobacterium*, which mainly found in Chinese, Taiwanese and Japanese as well as the other one was observed in most of KK, YK and BL subjects, which was defined by *Prevotella* and some other related genera, e.g., *Xylanibacter*, *Desulfovibrio* and *Slackia*. Also, alpha diversity simulation based on OTU profile in each subject indicated that children in KK, YK, and BL have higher diversity and richness in their microbiota composition than in the rest of the countries, especially Japan. Children in Japan showed some other distinct features in their microbiota, such as high abundance in *Bifidobacterium* and low abundance in *Enterobacteriaceae*, *Phascolarctobacterium*, and *Clostridium perfringens*. These differences in bacterial community structure found in Asian youngsters may reflect different dietary habit and living environment.

**一般演題 B-6****経管栄養施行中の重症心身障害児（者）の腸内菌叢についての検討****Fecal microbiota and fecal characteristics of patients with severe motor and intellectual disabilities undergoing long-term tube feeding**

○大森啓充<sup>1</sup>, 松本信夫<sup>1</sup>, 市川麻紀子<sup>1</sup>, 山崎雅美<sup>1</sup>, 村田芳夫<sup>1</sup>, 福場浩正<sup>1</sup>, 原田 暁<sup>1</sup>, 竹本将彦<sup>1</sup>, 池田政宣<sup>1</sup>, 住元 了<sup>1</sup>, 児玉浩子<sup>2</sup>, 難波希三子<sup>3</sup>

<sup>1</sup>(独)国立病院機構柳井医療センター, <sup>2</sup>帝京平成大学健康栄養学科, <sup>3</sup>フローラサービスジャパン(株)

【はじめに】20世紀後半には、腸内フローラの研究は飛躍的に進展し、腸内フローラは宿主の健康に有利にも不利にも働き、腸内に有害菌が優勢に存在すると、種々の疾病の原因ともなることが明らかにされている。一方、重症心身障害児（者）（以下、重症児）では、脊柱変形（側彎）、筋緊張の亢進、腹圧の上昇などから慢性的な便秘状態を呈することが多く、腸管蠕動運動障害による麻痺性イレウスの症状がしばしばみられ、摂食嚥下機能障害などから経管栄養を余儀なくされることも多い。今回、我々は消化管運動機能障害による腸内フローラへの影響も指摘されていることもあり、長期に経管栄養で栄養管理されている重症心身障害者の糞便菌叢と糞便性状を検索し、同年齢層の健常人の成績とで比較し、腸内菌叢のバランスの異常や腸内環境の悪化の有無について検討した。

【対象と方法および結果】対象は、長期に経腸栄養製品（濃厚流動食品および経腸栄養剤）で栄養管理されている重症児13例（男性5名、女性8名、平均年齢33.5歳）で、糞便菌叢を検索し、Mitsuoka and Hayakawa (1972)の健常人の成績と比較した。その結果、総菌数をはじめ *Clostridium*-others および酵母を除くすべての菌群の菌数が低く、*Lactobacillus* および L (+) *Clostridium* (*Clostridium perfringens*) は総ての患者で全く検出されなかった。一方、糞便形状は、多くの重症児で、泥状便・軟便傾向であり、糞便 pH はアルカリ性の傾向を示した。また、栄養剤の成分にラクチュロース、オリゴ糖を含む濃厚流動食品 A を摂取していた症例では、非摂取例と比べ、総菌数および Bacteroidaceae の占有率は変わらなかったが、*Bifidobacterium* の占有率が有意に高かった。

【考察】今回摂取されていた経腸栄養製品のなかで、特に成分にラクチュロース、ガラクトオリゴ糖を含む濃厚流動食品 A 摂取群の *Bifidobacterium* の占有率がそれ以外の群に比べ有意に高かったが、オリゴ糖は、*Bifidobacterium* の増殖因子として、腸内フローラに影響を及ぼし、腸内菌叢を良好に保つことが言われており、これらの結果は、経腸栄養製品投与および栄養剤の種類により便の細菌叢が変化し、便性状に影響を与えたと考えられる。このことが、患者の臨床症状や感染防御、免疫機能などにどのように関係しているのかについては、今後さらに詳細に検討する必要があると思われる。

## 一般演題 B-7

MLST 法および AFLP 法による *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* の母子伝播の検証

Transmission of intestinal *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strains from mother to infant, determined by multilocus sequencing typing and amplified fragment length polymorphism

○久代 明<sup>1</sup>, 牧野 博<sup>2</sup>, 石川英司<sup>1</sup>, 久保田博之<sup>2</sup>, 酒井隆史<sup>1</sup>, 大石憲司<sup>2</sup>,  
Rocio Martine<sup>3</sup>, Kaouther Ben Amor<sup>3</sup>, Raish Oozeer<sup>3</sup>, Jan Knol<sup>3</sup>, 田中隆一郎<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>(株)ヤクルト本社中央研究所, <sup>2</sup>ヤクルトヨーロッパ研究所,  
<sup>3</sup>Danone Research Center for Specialised Nutrition

【目的】 出産前の母親の腸管に常在する腸内細菌が新生児の腸管に伝播するかを菌株レベルで検証する。

【方法】 母子ともに比較的高頻度・高菌数で検出される *B. longum* subsp. *longum* をターゲットとした。母親については出産前2回、新生児については、胎便、出生3日後、7日後、1ヵ月後、3ヵ月後の便を採取し、TOS プロピオン酸培地によりビフィズス菌を単離した。母子ともに *B. longum* subsp. *longum* が検出された場合、MLST (Multilocus Sequencing Typing) 法により菌株レベルの同一性を検証した。解読した7遺伝子3,527塩基が完全に一致した場合、同一菌株とみなし、それらの菌株を染色体全体の同一性を検証する AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 法に供した。クラスター解析は BioNumerics ソフトウェアを用いた。

【結果】 *B. longum* subsp. *longum* が検出された8組の母子から計207株のビフィズス菌を単離し、MLST法で解析したところ、26のシーケンスタイプに分類され、6組の母子で11系統(43株)の同一菌株の伝播が確認された。これら43株を AFLP 法により解析したところ、MLST法で同一菌株と同一菌株と判定された菌株同士はすべて同じフラグメントパターンを示し、MLST法の解析結果を裏付けるものであった。また、クラスター解析の結果、家族毎に独立したクラスターを形成しており、異なる母子間で同一クラスターを形成することはなかった。

【考察】 11系統の中には、新生児の胎便から検出された菌株もあり、出生後早い時期に母親由来のビフィズス菌が新生児の腸管に伝播していることが示唆された。また、伝播した株は出生後3ヵ月に亘って経時的に新生児から検出された例もあり、母親から伝播した株が新生児の腸管に定着していることも示された。今回は *B. longum* subsp. *longum* での検証結果を示したが、他の菌群においても母親腸管由来の株が新生児に伝播している可能性が考えられる。

**一般演題 B-8****PMA と菌株特異的 primer を用いた定量的 PCR 法による生きた *Bifidobacterium bifidum* BF-1 株のヒト糞便からの定量検出****Quantitative detection of viable *Bifidobacterium bifidum* BF-1 in human feces by using propidium monoazide and strain-specific primers**

○藤本淳治, 渡辺幸一  
(株)ヤクルト本社中央研究所

**【目的】** プロバイオティクス製品の飲用効果試験での投与菌株の追跡調査には, これまで選択培地や抗体反応など培養法に基づく煩雑で労力を必要とする方法が用いられてきた. 近年では, 特異的 primer を用いた定量的 PCR (qPCR) 法により対象菌株の定量検出が行われている. しかしながら, 通常の qPCR 法では生菌と死菌の分別は困難である. そこで, プロバイオティクス *Bifidobacterium bifidum* BF-1 株 (YIT 10347) の菌株特異的 primer (pBF-1) の開発を行い, 選択的膜透過性色素 propidium monoazide (PMA) を組み合わせた qPCR 法 (PMA-qPCR) により, 糞便中の生きた YIT 10347 を迅速・正確に定量する方法を開発した.

**【方法】** pBF-1 の作製には YIT 10347 に特異的な RAPD バンド由来の配列を用いた. 生きた YIT 10347 の糞便からの回収率は, YIT 10347 の新鮮培養菌体あるいは加熱処理菌体 (80°C, 10 分) を添加し, PMA 処理 (50  $\mu$ M PMA 添加で 5 分間室温放置後, 2 分間光照射) した PMA-qPCR 法により調べた. 長期培養 (10 日間), および人工胃液処理 (pH2.8, 3 時間) における YIT 10347 の膜完全性の変化を PMA-qPCR 法で解析し, DAPI カウント, 16S rRNA を標的とする RT-qPCR 法, 菌体 ATP 活性, および YIT 10347 の選択培地による菌数と比較した. BF-1 株を含む発酵乳製品を 1 日 1 本 (約  $10^{11.0}$  CFU), 28 日間飲用した成人 12 名の糞便からの YIT 10347 の回収菌数を PMA-qPCR 法と培養法で比較した.

**【結果と考察】** *B. bifidum* 30 菌株を含む計 127 菌株の腸内細菌に対する PCR により, pBF-1 が YIT 10347 に菌株特異的であることを確認した.

PMA-qPCR 法は, YIT 10347 の加熱死菌体の PCR 増幅を通常の qPCR 法と比較して約 1/10,000 に抑制し, 糞便中の生きた YIT 10347 の定量に有効であった. 長期培養における生きた YIT 10347 の菌数は, 培養法, ATP 活性および PMA-qPCR 法で  $10^{10}$  cells/ml から  $10^6$  cells/ml に減少することが確認されたが, DAPI カウント, 通常の qPCR 法および RT-qPCR 法では菌数変動は見られなかった. ヒト糞便に生きた YIT 10347 を添加して PMA-qPCR 法を行うと, 添加菌数と PMA-qPCR 法による菌数には  $10^{5.3} - 10^{10.3}$  cells/g の間で非常に高い相関がみられた ( $r > 0.99$ ,  $p < 0.001$ ).

BF-1 株を含む発酵乳製品の飲用後の 12 名の糞便から, 培養法で  $10^{4.5 \pm 1.5}$  CFU/g, qPCR 法で  $10^{7.6 \pm 0.7}$  cells/g, PMA-qPCR 法で  $10^{6.2 \pm 0.4}$  cells/g の YIT 10347 がそれぞれ定量され, 膜完全性を指標とする PMA-qPCR 法により, コロニー形成能を指標とする培養法に比べ 50 倍量 ( $p < 0.01$ ) の YIT 10347 が生きて腸内に存在することが確認された. PMA 処理と菌株特異的 primer を用いた qPCR 法の組み合わせは, 糞便中の生きた YIT 10347 の迅速かつ正確な定量を可能とした.