

Development of molecular methods for the detection of *Lactobacillus thermotolerans*, a thermotolerant lactic acid bacteria, in chicken intestine

(分子生態学的手法による鶏腸管内における
耐熱性乳酸菌 *Lactobacillus thermotolerans* 検出方法の開発)

学位論文内容の要旨

本論文は6章から構成され、表5、図19、引用文献118編を含む93頁の英文論文であり、別に2編の参考論文が添えられている。

本研究は、タイ国で飼養されている鶏糞便から分離された新規耐熱性乳酸菌 *Lactobacillus thermotolerans* を家禽用プロバイオティクス（腸内環境制御に資する生菌剤）候補と位置づけ、本菌の特異的検出方法の開発とその応用を介して、鶏腸管内での分布動態を精査しようとしたものである。とくに検出方法は本菌の有するDNA情報を活用し、特異性を高めたもので、定量的および視覚的に優れたものを提示しようとしたものである。得られた成果は、次のように要約される。

第1章では、乳酸菌とプロバイオティクスに関する研究動向の整理と問題点の指摘を行った。とくに鶏糞便から新規に分離された *Lactobacillus thermotolerans* の特性や家禽用プロバイオティクス候補として選択した理由、本菌の利用にあたっての評価に関する課題などを指摘した。プロバイオティクスとしての利用にあたりひとつの評価基準となるのが腸管内での対象菌の分布と密度であるが、これらを査定する有効な手法が欠如している問題点をあげ、それらの開発の重要性を強調した。

第2章では *Lactobacillus thermotolerans* の検出法として蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（FISH）を新たに開発し、その特異性および検出結果について考察した。分子系統上近縁の乳酸菌19種の中から本菌だけを分別検出できるような蛍光標識DNAプローブの設計を、16SrDNA配列の特異領域を利用することで可能にした。その後、10羽の初生ヒナから定期的に採取した新鮮糞便や、それらをと殺した時の盲腸内容物標本をFISHに供し、*Lactobacillus thermotolerans* と他の菌との分別・視覚化が可能であること、すなわち鶏糞便および盲腸内容物中に存在する本菌を明確に認識・計数できることを明らかにした。

Lactobacillus thermotolerans の動態を精査するのに必要な、感度および精度が高いリアルタイムPCR定量系確立について記述したのが第3章である。確立した定量系は16SrDNA

特異領域から設計した PCR プライマーを利用したもので、*Lactobacillus thermotolerans* を最少 2 細胞から定量できるほどの高い感度を有するものであった。さらに糞便に既知量添加した純菌の定量値もよく添加量を反映し、本定量系が極めて精度の高いものであることを明示した。また 10 羽のヒナを糞便ソースとし、本定量系を用いて、ヒナ糞便中の *Lactobacillus thermotolerans* を定量することで本菌の分布密度を査定した。本法で定量された *Lactobacillus thermotolerans* は、最小で $10^4/\text{g}$ 、最大で $10^7/\text{g}$ 糞便のレベルで存在し、ヒナ腸内フローラの常在メンバーの一員であることを初めて明らかにした。本定量系は、これまでの煩雑な培地作成、培養分離をへた計数法に比し、簡便、迅速であるとともに、特異性、感度、精度のいずれにおいても秀でたものであり、本定量系の確立は今後のプロバイオティクス候補菌株の選択に際し、ひとつのモデル評価系を示したともいえる。

第 4 章では、実際の鶏腸管上皮の *Lactobacillus thermotolerans* をさらに高解像度で、かつ 3 次元的な視覚化を可能にすべく、上述の FISH と共焦点レーザー顕微鏡を組み合わせた新しい検出法 (FISH-CSLM) を確立し、その応用性について検討した。その結果、本菌は盲腸腸管上皮および上皮壁に集落化して成鶏でも永続的に生存していることが明らかになった。この結果は前述したように、本菌が鶏腸管フローラの常在構成員であることを強く裏付けるものである。また腸管上皮で集落形成するということは腸管定着に促進的に働く可能性が高いという点で、*Lactobacillus thermotolerans* がプロバイオティクス候補として非常に有利な特性をもっていることが判明した。

総合考察 (第 5 章) では、分子生態学的手法が腸内環境の解析に重要なツールであること、とくに培養法では追跡できない近縁菌の多い乳酸菌ではこういった解析法が必須なことを要約した。本研究で確立した FISH 法、リアルタイム PCR 法、FISH-CSLM 法を駆使することで腸内フローラの解析や理解が格段に深まる可能性があることなどを論じた。終章 (第 6 章) では一連の結果を要約し、深まった知見と課題を整理した。

以上のように、本研究では鶏腸管由来新規乳酸菌の動態解析に有用な検出方法を開発し、それらを応用することで本菌の腸管内分布やその密度を、量的、視覚的に追跡することに初めて成功した。対象の乳酸菌である *Lactobacillus thermotolerans* は家禽用のプロバイオティクス候補として期待されており、応用面での貢献も期待される。加えてこれらの検出法は、感度、精度、迅速性いずれにおいても秀でたものであり、後発研究にとって基準となりうるものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 泰 男
副 査 教 授 近 藤 誠 司
副 査 教 授 浅 野 行 蔵
副 査 教 授 横 田 篤

学 位 論 文 題 名

Development of molecular methods for the detection of *Lactobacillus thermotolerans*, a thermotolerant lactic acid bacteria, in chicken intestine

(分子生態学的手法による鶏腸管内における
耐熱性乳酸菌 *Lactobacillus thermotolerans* 検出方法の開発)

本論文は6章から構成され、表5、図20、引用文献118編を含む95頁の英文論文であり、別に2編の参考論文が添えられている。

本研究は、タイ国で飼養されている鶏糞便から分離された新規耐熱性乳酸菌 *Lactobacillus thermotolerans* を家禽用プロバイオティクス（腸内環境制御に資する生菌剤）候補と位置づけ、本菌の特異的検出方法の開発とその応用を介して鶏腸管内での分布動態を精査しようとしたものである。とくに検出方法は本菌の有する DNA 情報を活用し特異性を高めたもので、定量的および視覚的に優れたものを提示しようとしたものである。成果は次のように要約される。

第1章では、乳酸菌とプロバイオティクスに関する研究動向の整理と問題点の指摘を行った。とくに鶏糞便から新規に分離された *L. thermotolerans* の特性や家禽用プロバイオティクス候補として選択した理由などを指摘した。プロバイオティクスとしての利用にあたり評価基準となるのが腸管内での対象菌の分布と密度であるが、有効な査定法が欠如している問題点をあげ、それらの開発の重要性を強調した。

第2章では *L. thermotolerans* の検出法として蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（FISH）を新たに開発し、その特異性および検出結果について考察した。分子系統上近縁の乳酸菌19種の中から本菌だけを分別検出できるような蛍光標識 DNA プローブの設計を、16SrDNA 配列の特異領域を利用することで可能にした。その後10羽の初生ヒナから定期的に採取した新鮮糞便やそれらをと殺した時の盲腸内容物標本を FISH に供し、*L. thermotolerans* と他の菌との分別・視覚化が可能であることを明らかにした。

*L. thermotolerans*の動態を精査するのに必要な、感度および精度が高いリアルタイムPCR定量系確立について記述したのが第3章である。確立した定量系は *L. thermotolerans* を最少2細胞から定量できるほどの高い感度を有するものであった。さらに糞便に既知量添加した純菌の定量値もよく添加量を反映し、本定量系が極めて精度の高いものであることを明示した。また10羽のヒナを糞便ソースとし、本定量系を用いてヒナ糞便中の *L. thermotolerans* を定量することで本菌の分布密度を査定した。本法で定量された *L. thermotolerans* は最小で 10^4 /g、最大で 10^7 /g 糞便のレベルで存在し、ヒナ腸内フローラの常在メンバーの一員であることを初めて明らかにした。本定量系は、これまでの煩雑な培地作成、培養分離をへた計数法に比し簡便、迅速であるとともに、特異性、感度、精度のいずれにおいても秀でたものであり、本定量系の確立は今後のプロバイオティクス候補菌株の選択に際し、ひとつのモデル評価系を示したともいえる。

第4章では、実際の鶏腸管上皮の *L. thermotolerans* をさらに高解像度でかつ3次元的な視覚化を可能にすべく、上述のFISHと共焦点レーザー顕微鏡を組み合わせた新しい検出法（FISH-CSLM）を確立し、その応用性について検討した。その結果、本菌は盲腸腸管上皮および上皮襞に集落化して成鶏でも永続的に生存していることが明らかになった。この結果は本菌が鶏腸管フローラの常在構成員であることを強く裏付けるものである。また腸管上皮で集落形成するということは、腸管定着に促進的に働くという点で、*L. thermotolerans* がプロバイオティクス候補として非常に有利な特性をもっていることが判明した。

総合考察（第5章）では分子生態学的手法が腸内環境の解析に重要なツールであること、とくに培養法では追跡できない近縁菌の多い乳酸菌ではこういった解析法が必須なことを要約した。本研究で確立したFISH法、リアルタイムPCR法、FISH-CSLM法を駆使することで腸内フローラの解析や理解が格段に深まる可能性があることなどを論じた。終章（第6章）では一連の結果を要約し、深まった知見と課題を整理した。

以上のように、本研究では鶏腸管由来新規乳酸菌の動態解析に有用な検出方法を開発し、それらを応用することで本菌の腸管内分布やその密度を、量的、視覚的に追跡することに初めて成功した。対象の乳酸菌 *L. thermotolerans* は家禽用のプロバイオティクス候補として期待されており、応用面での貢献も期待される。加えてこれらの検出法は、感度、精度、迅速性いずれにおいても秀でたものであり、後発研究にとって基準となりうるものと考えられる。

よって審査員一同は、アブ サデクェ エムデ セリムが博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。