Title	Detection of potentially novel bacterial components of the human skin microbiota using culture-independent molecular profiling
Sub Title	培養を介さない分子生物学的プロファイリング法を用いた新規ヒト皮膚常在細菌の探索
Author	出来尾, 格
Publisher	慶應医学会
Publication year	2006
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.83, No.2 (2006. 6) ,p.20-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20060602-0020

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Detection of potentially novel bacterial components of the human skin microbiota using culture-independent molecular profiling

(培養を介さない分子生物学的プロファイリング法を用いた新規ヒト皮膚常在細菌の探索)

出来尾 格

内容の要旨

論文審査の要旨

【緒言】 皮膚の常在微生物は、*Staphylococcus epidermidis*などの好気性細菌、*Propionibacterium acnes*などの通性嫌気性細菌、*Malassezia furfur*などの真菌からなるが、それぞれがアトピー性皮膚炎、さ瘡などの病態に関与しており臨床的に重要である。しかし従来の常在微生物の知見は培養法に基づいているため、これまで難培養難分離性の微生物については解析されておらず、その存在についてすら明らかではない。著者は、難培養難分離性の細菌を含む皮膚常在細菌の全体像を明らかにするため、培養を介さない細菌16S rRNA遺伝子の種間多様性を用いたプロファイリング解析を試み、培養法による解析と比較した。

【材料・方法】 5人の健康成人の前額部皮膚より、滅菌したプラスチック製の円筒と液体培地を含ませた滅菌綿棒を使用して、皮膚擦過サンプルを採取した。これをTS培地（好気）、EG培地（嫌気）、BL培地（嫌気）に接種して培養可能な細菌について解析する一方、サンプルから直接DNAを抽出し、細菌種ごとに異なる配列をもつ16S rRNA遺伝子のクローンライブラリを構築した。クローンごとに塩基配列を解析し、DDBJ遺伝子データベース上の既知種16S rRNA遺伝子との相対性検索により、サンプル中に含まれる細菌種を推定した。

【結果】 培養法による解析では、全サンプルから*P. acnes*と*Staphylococcus* sp.が培養同定された。菌数は1 cm²あたり3.7x10⁴から1.2x10⁶CFUで、過去の報告と同等であった。一方、クローンライブラリ法による解析では、培養法で検出された種に加えて、多彩な難培養難分離性の細菌が検出された。得られた計416個の16S rRNA遺伝子配列を解析したところ、これらは19の既知種と13の難培養難分離性の細菌群 (phylotypes) 由来であった。検出された19の既知種には、皮膚常在細菌として過去に報告がある10種のほか、皮膚常在細菌としての報告がない9種が含まれていた。一方で13のphylotypesが検出されたが、この中でもっとも多く検出されたphylotype Aは、3つのサンプルで検出され、特に1つのサンプルでは全菌種中もっとも多く検出された。得られた塩基配列の系統樹解析においては、検出された細菌はfirmicutes, actinobacteria, cyanobacteria, bacteroidetes, proteobacteriaの5つのcladeに属していた。

【考察】 本研究において、細菌16S rRNA遺伝子を用いたプロファイリング法により、ヒト皮膚常在細菌の全体像が難培養難分離性の細菌群を含む多彩なものであることが明らかになった。特にphylotype Aは5サンプル中3サンプルに検出され、クローン数と検出頻度のいずれもphylotypesの中で最も多く、重要な細菌と考えられた。これはヒトの皮膚に高頻度で存在する細菌である可能性があり、特異的プライマーを用いた分子生物学的な解析を含めた更なる検討が必要であろう。

【結論】 細菌16S rRNA遺伝子を用いた分子生物学的プロファイリング法により、ヒト皮膚常在細菌として19の既知種と13のphylotypesを検出した。うち9の既知種と13のphylotypesは新規の皮膚常在細菌の可能性がある。この培養を介さない手法は、今後皮膚常在細菌の解析に有用な技術となることが期待される。

細菌16S rRNA遺伝子は全ての細菌に存在するが、系統発生を反映した多様性を持ち、種の同定に有用である。本研究において、5例の健康人の顔面皮膚サンプルより細菌16S rRNA遺伝子のクローンライブラリを作成した。得られた416個の遺伝子の塩基配列データを解読したところ、従来知られている皮膚常在細菌に加え、通常の方法では分離・培養が困難な細菌を含めた多様な細菌種が検出された。またその後、細菌16S rRNA遺伝子を用いたterminal RFLP法により健康人とアトピー性皮膚炎患者の皮膚細菌叢の解析が進められ、健康人・患者それぞれの細菌叢の構成の差が明らかにされつつあることが簡潔に示された。

審査ではまず、1クローンのみ検出された塩基配列が、分離・培養が困難な細菌種由来ではなくPCR増幅などの技術的なエラーに起因する可能性はないかとの質問がなされた。これに対し、2種のプライマーを用いて同じ部分の配列を二重に読んだことと、異なる16S rRNA遺伝子の塩基配列のキメラを検出するソフトを用いてキメラ配列を除外したことが、解読のエラーを最小限にするために行われていたと説明された。しかし誤判断につながる解読エラーやキメラ配列が存在する可能性は残されており、実際は分離・培養が困難な細菌種が検出されたものより少ない可能性はあると回答された。

次に、サンプル採取の状況により、環境由来の微生物が混入している可能性はないかと質問があった。これに対し、皮膚細菌叢の解析には水道水や塵芥などに含まれる微生物の混入が避けられず、これは培養法を含む皮膚常在微生物の解析の不可避の問題点であるが、混入の影響を小さくするため菌数の多い顔面皮膚を用いたことが回答された。

さらに、抗生剤の内服等による細菌叢の個人内変動と個体間較差のどちらが大きいかについて質問がなされた。これに対し、過去の培養法による報告では、日内変動や抗菌ペプチドに起因すると思われる培養結果の不安定性のため、個人内変動と個体間較差の比較が不可能であったことが回答された。一方で論文作成後に施行された16S rRNA遺伝子を用いたterminal RFLP法を用いた解析により、日内変動に関わらず細菌種の数比は保たれており個人内変動は個体間較差に比べ小さいと判明したことが示された。

最後に、DNAチップを用いた解析キットの実用化の可能性について質問があった。これに対し、チップ作成の前提として菌種ごとの特異的プライマーを作成する必要があり、チップ作成に至るまでには時間がかかるものの、信号強度を段階的に検出できる検出系を用いれば実用的な解析ができる可能性は十分にあり、10程度の細菌を検出するチップであれば臨床応用が可能であろうと回答がなされた。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき課題を残しているものの、ヒト皮膚の細菌叢の解析に初めて分子生物学的な網羅的解析法を用い、新規な皮膚常在細菌の検出に成功した点で、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 皮膚科学 天谷 雅行
分子生物学 清水 信義 微生物学・免疫学 小安 重夫
臨床検査医学 村田 満
学術確認担当者：
審査委員長：清水 信義

試問日：平成18年2月8日