

研究概要集2023 目次 【研究開発部】

実用化実証事業

「腸内環境デザイン」グループ

◆ 総括	114
◆ 腸内環境制御基盤技術の開発に向けた研究ツールの開発	117
◆ 腸内細菌の単離・培養法の確立および腸内細菌特異的抗体の実用化に向けた評価	120
◆ 業績	124

腸内環境デザイングループ

グループリーダー 福田 真嗣

【基本構想】

本プロジェクトは、様々な疾患との関連が示唆されている腸内細菌叢を含む腸内環境を適切に制御することで、腸内環境のバランスの悪化が起因となる疾患の予防や治療に向けた基盤技術の構築を目的としている。ヒトの腸管内にはおよそ 1,000 種類、40 兆個にも及ぶとされる腸内細菌が生息している。正常なバランスを保っている腸内細菌叢は外部から侵入する外来細菌の定着を防ぎ、宿主免疫系を活性化することで腸管内の恒常性を維持している。一方で、腸内細菌叢のバランスの乱れは大腸炎や大腸がんといった消化器関連疾患のみならず、代謝疾患やアレルギー疾患などの発症にも関連することが報告されている。遺伝子解析技術の進歩により、腸管内に生息する細菌叢の構成や種類については多くの情報が得られているが、生息する個々の腸内細菌が果たす役割、もしくはその培養法については研究途上である。また、腸内細菌叢由来の代謝物質も宿主の健康維持や疾患に深く関与していることが示唆されてきたが、それらがどのような腸内細菌から産生されているかなど不明な点が多い。

腸内細菌叢をはじめとする腸内環境を適切に制御するには、個々の腸内細菌の特性を理解し、腸内細菌叢由来の代謝物質や菌体自身が宿主へ与える影響を知ることが重要となる。腸内細菌が主に生息する大腸は嫌気環境であり、腸内細菌叢を構成する細菌のほとんどは偏性嫌気性細菌に区分されている。これらの腸内細菌を培養するために、グローブボックスなどの嫌気環境を構築する装置や、これらを用いた嫌気培養による腸内細菌の単離培養法が構築され、腸内細菌の単離培養に使用する培地もいくつか市販されている。しかしながら、現段階の技術では培養できない難培養性腸内細菌も報告されるなど、腸内細菌の培養技術については改善の余地が数多く残されている。本プロジェクトの鍵となる腸内環境制御基盤技術の構築を行うためには、難培養性腸内細菌を含む腸内細菌を安定的に単離・培養することで、標的とする腸内細菌の特性を理解し、自在に操るためのツール開発が必要となる。そこで、本研究では、構築した嫌気培養方法を用いた腸内細菌の単離および安定培養方法の確立、標的となる腸内細菌を選択的に取得するためのツール開発、およびその有用性の検証に取り組んだ。これらの課題に取り組むことで、腸内環境を適切に制御するための基盤技術を確立し、将来的には腸内環境の乱れが素因となるような疾患の新たな予防法や治療法開発への貢献が期待できる。

1. 2022 年度の研究目的

2022 年度は以下の 3 つの項目を重点項目として定めた。

(1) ヒト由来腸内細菌の単離・培養技術の確立

ヒトの腸内細菌叢において主要な割合を占める菌は、基準株として単離されているものが多い。一方で、腸内細菌叢の中でその割合が低く、数が少ない菌の単離・培養は困難であり、単離・培養するための培地の工夫や既存の方法とは異なる新たな培養法の開発が必要不可欠である。多くの腸内細菌は偏性嫌気性細菌に分類され、単離・培養中に少量の酸素が混入するだけで死滅することもある。このような特徴を持つ腸内細菌を単離・培養するには、培養環境中の酸素を可能な限り除去することが必要である。加えて、われわれの体内には食物由来の多くの栄養素や未消化物が存在しており、腸内細菌はそれらを栄養源として増殖している。これまでに開発した腸内細菌培地や嫌気培養法を活用することによりヒトの便試料から腸内細菌の単離・培養を試みた。

(2) 標的腸内細菌を単離するためのツール開発およびその

有効性の評価

腸内細菌叢を構成する腸内細菌の中には、ビフィズス菌や乳酸桿菌などに代表される宿主の健康維持や免疫系の亢進に作用する有用菌が存在する(参考文献 1-3)。その一方、病原性大腸菌などの消化器関連疾患や代謝疾患やアレルギー疾患に関与する腸内細菌などが存在することも報告されている(参考文献 2-4)。多種多様な腸内細菌により構成される腸内細菌叢から特定の腸内細菌を単離・培養するには、便試料懸濁液を培地プレートに播種し、コロニーを形成させ単離する方法が採用されることが多い。選択培地や培地に特定の物質を添加することにより、ある程度の選択は可能であるが、標的細菌のみを単離する効率は低いことが課題となっている。そこで、標的腸内細菌を効率よく単離するためのツールとして腸内細菌特異的抗体の開発を実施し、その有効性を評価した。

(3) 新型コロナウイルス抗体価社会調査プロジェクト

世界規模でパンデミックを引き起こした新型コロナウイルスは今後も変異を重ね、オミクロンに匹敵するウイルスが出現する可能性もある。そのためワクチンや感染によ

り獲得した免疫機能を維持・増強することが今後の課題となる。新型コロナ感染症においては、欧米では感染者数や死亡率が高く、アジアでは低いといった地域的な違いも指摘されており、その要因として遺伝子配列の違いや BCG ワクチン接種率（参考文献 5）、食生活をはじめとした生活習慣の違いなどが挙げられている。また、新型コロナ感染症の重症度や後遺症と腸内細菌叢との関連も示唆されている。本プロジェクトではこれまでに神奈川県立保健福祉大学、神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター、株式会社メタジェンとともに新型コロナウイルス抗体保有者の生活習慣や腸内環境の調査に関する共同研究を実施してきた。本年度から株式会社明治も参画し、あらたな産官学連携による共同研究として「神奈川県産官学共同 新型コロナウイルス抗体価社会調査プロジェクト」をスタートした。

2. 2022 年度の研究成果

2022 年度は、以下に挙げる具体的な研究成果を得ることができた。実験方法、結果の詳細は各研究員からの報告書に記載しているため、本項では要点のみを示す。

(1) ヒト由来の腸内細菌の単離・培養

これまで蓄積してきた嫌気培養法のノウハウを用いて、ヒト便試料からの腸内細菌の単離・培養を試みた。便試料を選択培地プレートに播種し、嫌気チャンパー内にてコロニーを形成させた（図 1）。プレートに形成されたコロニー群からシングルコロニーを釣菌し、再度選択培地プレート、液体培地内にて培養を継続した。増幅が認められたものから DNA を抽出し、その配列をシーケンス解析することで、菌種の同定を行った。本年度はヒト便試料より疾患への関連が示唆される 2 種類のグラム陰性菌の単離ならびにその安定培養法の確立に成功した。

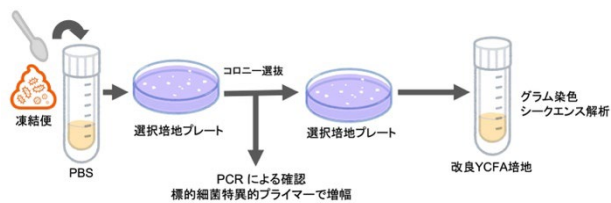
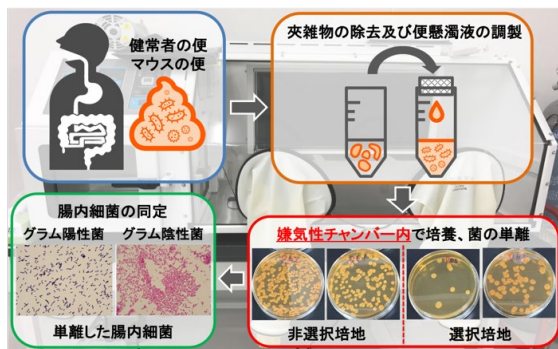


図 1 ヒト便試料からの腸内細菌の単離・安定培養法構築の流れ、疾患への関連が示唆される腸内細菌の単離・安定培養法の構築手順

(2) 標的腸内細菌単離に向けたツールの開発とその応用利

用法の検証

多種多様の腸内細菌から構成される腸内細菌叢から標的となる細菌を単離・培養するには、選択培地や特定の基質を添加した培地による培養を経る必要がある。そこで、より効率良く標的細菌のみを単離・濃縮する方法を検討するツールとして抗体に着目した。抗体は抗体産生細胞が産生する糖タンパク分子で、特定の分子を認識して結合する働きを担う。実際に生体内に侵入した外来抗原を認識し、排除する機構にも抗体は関与している。腸内細菌を認識する抗体の作製は過去にも報告はあるが、その特異性は低く分類学的に類似の腸内細菌も認識してしまうなどの課題があった。このような課題を解決するために本プロジェクト独自の抗体作製法を用い、腸内細菌に対する抗体の作製を試みた。

本年度は疾患に関連するグラム陰性菌に発現するタンパク質（タンパク質 X）に対する抗体の作製を行った。様々な腸内細菌との交差反応を検証し、タンパク質 X を発現する腸内細菌ならびに細菌破砕溶液に対して反応する抗体の作製に成功した。また抗体の作製と並行して、タンパク質 X を簡易的に検出する方法の検討を行なった。その結果、タンパク質 X を発現する腸内細菌を添加した便懸濁溶液からタンパク質 X 特異的プライマーを用いた PCR 法により簡便にタンパク質 X を検出する方法を構築することができた。次に、これまでに作製した腸内細菌特異的抗体の機能解析を実施した。本年度はヒト由来腸内細菌を特異的に認識する抗体について標的分子の解析を実施した。抗体を用いた免疫沈降法ならびに遺伝子欠損細菌を用いたウェスタンブロット解析から、予想とは異なり抗体 A は細菌に広く保存されている細胞内酵素を認識していることが明らかとなった。昨年度までの研究から本抗体を作製した際に用いたヒト由来腸内細菌では抗体が表層の分子を認識していることが示される結果が得られていた。そこで免疫組織染色や腸内細菌培養上清を用いたウェスタンブロット解析により、酵素の局在ならびに酵素が細胞外に分泌されるかどうか検討を実施した。その結果、ヒト由来腸内細菌では酵素が細菌の表層に発現し、菌体外へと放出されることを見出した。

(3) 新型コロナウイルス抗体価社会調査プロジェクト

本年度は神奈川県が中心となり進めている大規模ゲノムコホートである「神奈川県みらい未病コホート研究」の研究基盤を活用し、新型コロナウイルス抗体市中モニタリングを進めた。さらに追跡調査として、新型コロナウイルス抗体保有者の健康状態や腸内環境の特徴について、アンケート調査や、腸内環境の解析、免疫グロブリン A (IgA) の測定を実施し、特に不顕性感染者の腸内環境の特徴を明らかにした。併せて、生活習慣や食習慣、健康状態に関するアンケートや腸内環境の網羅的解析、さらには免疫系への影響を検討するための末梢血単核球等の評価に向けた研究体制の構築を進めた（図 2、プロジェクト URL: https://www.kistec.jp/kistec-manage/wp-content/uploads/press_221104.pdf）。

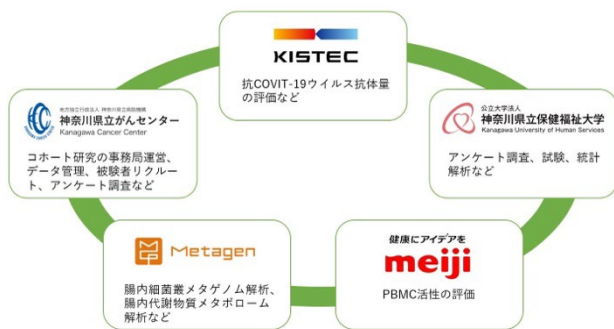


図 2 新型コロナウイルス抗体価社会調査プロジェクトに参画する産学官の研究機関並びに各拠点における研究実施項目

3. 研究体制

本プロジェクトでは、研究を円滑に進めるために様々な研究機関との共同研究を実施した。共同研究先との綿密な連携はプロジェクトを推進する上で重要な項目となる。本プロジェクトではオンラインを活用し、研究室同士を繋ぐ環境を構築していたため、COVID-19 による制限下においても、共同研究先とも定期的に進捗状況を報告する機会を設け、プロジェクトの成果や課題の共有し、共同研究の進め方を議論することができた。

4. 総括

本プロジェクトでは前身となる腸内細菌叢プロジェクトから引き続き、腸内環境制御基盤技術の構築への礎となる腸内細菌に関する新たな知見の取得、制御技術・ツールの開発を実施している。特に個々の腸内細菌の特性を理解するため、一つでも多くの腸内細菌を単離・培養するための手法の開発に注力し、その方法を活用することで腸内細菌の単離・安定培養法の確立を進めている。本年度はヒト便試料より新たに 2 種類の疾患への関連が示唆される腸内細菌を単離、安定培養することに成功した。今後は、腸内細菌単独定着マウスの構築や、腸内細菌の投与実験により、腸内細菌の特性や宿主に及ぼす影響を評価する。

腸内環境制御基盤構築に向けたツールの一つとして、腸内細菌特異的抗体の作製に着手し、独自に見出した作製法を利用することで、本年度は疾患に関連するグラム陰性菌に発現するタンパク質を標的とする抗体の作製ならびに、PCR を用いたタンパク質の簡易検出法の構築に成功した。またこれまでに作製した腸内細菌特異的抗体の評価によりヒト腸内細菌が持つ新たな特性の一端を明らかにした。本プロジェクトを通じて作製した抗体は、これまで作製されてきた既報・販売されている細菌に対する抗体とは異なり、標的細菌に対する特異性が高い。また、抗体の機能解析を実施することで新たな腸内細菌の特性を見出すことができた。これらの結果は、本プロジェクトで使用した新規抗体作製法は標的細菌に特異性の高い抗体を作出する上で優れた方法であり、作製された抗体を解析することにより新たな腸内細菌の性質を明らかにすることができる可能性を示唆するものであった。今後は、これまでに蓄積した腸内細菌の基礎データの中から、機能性食品開発

への応用や創薬の標的として活用することができる腸内細菌に対する抗体の作製を引き続き進め、腸内環境制御基盤技術開発ツールとして活用する。

本年度からはアフターコロナを見据え、産官学共同で新型コロナウイルス抗体価社会調査プロジェクトを開始した。今後は抗体市中モニタリングの結果と生活習慣や食習慣、健康状態に関するアンケート、腸内環境の網羅的解析、免疫系への影響の評価を統合的に解析・評価することで、生活習慣、特に食習慣がもたらすワクチン抗体価への影響について調べる。これらの研究成果を元に、免疫機能を高めるようなサプリメントや食品開発など行い、食を基盤としたアフターコロナ時代に求められる感染症に強い身体作りを実現する。

プロジェクト実施中に蓄積したデータやツールを活用することで、腸内環境制御を目指した有用菌を用いたサプリメントや機能性食品の開発、病原性細菌や疾患に対する予防・治療薬の開発など、医療やヘルスケア産業への応用を実施する。最終的には腸内環境を「意のままに」制御するための基盤技術を構築し、健康寿命の延伸を目指す。

【参考文献】

- 1 Zheng, D., Liwinski, T., Elinav, E. Interaction between microbiota and Immunity in health and disease *Cell Res.* Jun;30(6):492-506. (2020)
- 2 Sanders, ME., Merenstein, DJ., Gibson, GR., Rastall, RA. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: form biology to the clinic *Nat Rev Gastroenterol.* Oct; 16(10):605-616, (2019).
- 3 Fan, Y., Pedersen, O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol.* Jan;19(1):55-71, (2021).
- 4 Chen, Y., Zhou, J., Wang, L. Role and Mechanism of gut microbiota in human disease *Front cell Infect Microbiol.* Mar 17;11:625913 (2021).
- 5 Escobar LE, Molina-Cruz A, Barillas-Mury C.. BCG vaccine protection from severe coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 28;117(30):17720-17726 (2020).

腸内環境制御基盤技術の開発に向けた研究ツールの開発

「腸内環境デザイン」グループ

大縄悟志、中藤学、井上浄

1. はじめに

ヒトの腸管内に生育する腸内細菌は食物由来の未消化物（食物繊維）を異化代謝することで短鎖脂肪酸を産生して増殖し、腸管上皮細胞の恒常性維持や粘膜免疫系の構築に寄与している。中には腸内環境改善効果を有する細菌も存在しており、それらを含む製品や食品はプロバイオティクスと呼ばれ、腸内環境を整え、宿主に良い影響をもたらす。その一方で、生活習慣の乱れやストレスなどにより腸内細菌叢が攪乱されると、腸内細菌叢より産生される代謝物質が疾患の発症に関与することも知られている。機能性食品やプロバイオティクス、疾患に関連する腸内細菌を標的とした創薬を効率よく開発する為には、標的となる腸内細菌を宿主の腸内細菌叢から効率よく検出するツールの開発が必要不可欠である。

(1) 腸内環境を整える方法と課題

腸内細菌叢を含む腸内環境を整える方法としては、ヨーグルトや発酵食品等の機能性食品の摂取が一般に浸透しており、日常的に取り入れられるという観点から予防的アプローチとして広く利用されている。しかしながら、機能性食品を摂取している間は便中から機能性食品に含まれる有用菌が検出されるものの、摂取をやめてしまうと腸管から有用菌は検出されなくなる（参考文献1）。そのため、機能性食品の効果は一時的であることが示唆されている。その一方で、ヒトから分離した有用菌を人が摂取することで200日間経過しても摂取した有用菌が検出されるという報告もある（参考文献2）。このように有用菌が定着する、もしくはしない人がどのように決定されているかについては現在研究途上となっている。臨床的面上においては、潰瘍性大腸炎やクローン病などの特定疾患に指定されている炎症性腸疾患治療において「便微生物叢移植療法」が一定の効果を示すことが報告されている（参考文献3、4）。しかしながら、これらの方法は同一個人由来の細菌叢ではなく他人の細菌叢のため、投与した腸内細菌群が患者の腸内に定着できないなどの課題も残る。そこで腸内環境を整える一つの手法として、外来性細菌ではなく宿主由来の腸内細菌を利用し、再度体内に戻すことにより、持続的な腸内環境改善が期待できるのではないかと考えた。このような腸内環境制御基盤技術の開発を行うには宿主由来の特定の腸内細菌を多種多様な腸内細菌が存在する腸内細菌叢の中から効率よく標的細菌のみを検出する為のツールの開発が重要となってくる。

(2) 標的腸内細菌由来タンパク特異的抗体の作製意義

抗体は免疫細胞の一つであるB細胞から産生される糖タンパク質で、抗原と呼ばれる免疫応答を引き起こす物質に特異的に結合する能力を持つ。細菌も抗原としての性質を有しており、実際に特定の細菌を認識する抗体も報告されている。例えば、有用菌の一つである *Bifidobacterium longum* (*B. longum*) に対する抗体作製の報告がある。本抗体は *B. longum* を認識するものの、他の *Bifidobacterium* 属細菌にも広く交差性を示すため腸内細菌叢などの集団から標的となる *B. longum* のみを単離・濃縮するために利用することは困難であることが示唆される（参考文献5）。*B. longum* に対する抗体以外にも細菌に対する市販の抗体の多くが標的細菌以外の細菌に反応するという問題がある。そのため、腸内細菌叢を構成する多種多様な腸内細菌の中から標的となる細菌のみを検出するには、より特異性の高い抗体の使用が求められる。

(3) 腸内環境制御基盤技術の構築のための研究ツールの開発

腸内細菌叢を含む腸内環境を適切に制御する基盤技術の構築は、我々の健康維持や疾患予防、治療もしくは診断への有効な手段となる可能性がある。これまで本プロジェクトにおいて、独自の抗体作製方法を確立し、複数の腸内細菌に対して特異性の高い抗体の作製に成功している。標的細菌のみを認識する抗体作製の成功については昨年度報告したが、本年度は疾病の新規診断法開発へと枠を広げ、疾病への関連が示唆される腸内細菌に発現するタンパク質の検出用抗体の取得、ならびにその遺伝子の簡易的検出について評価を行った。

2. 実験と結果

(1) 標的腸内細菌由来タンパク特異的抗体の作製

これまでに構築した独自の抗体作製方法を用いることでグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対する特異性が高い抗体作製に成功している。そこで本年度は、安定培養法を確立した腸内細菌の中から特定の疾病時に増加が認められる細菌由来タンパク（以下、タンパク X と仮称する）を標的とした特異的抗体の作製を行った。はじめに一般的に使用されている抗体の作製方法（従来法）と本プロジェクト独自の抗体作製法（独自法）を比較した。抗原感作後における血清中に含まれるタンパク X に対する抗体価の上昇を ELISA 法により検討した。最終抗原感作

が終了した時点で血清を採取し、抗体価を検討したところ、従来法に比べ、独自法では過去の作製時と同様に血清における抗体価が高くなる傾向を示した。(図1)。

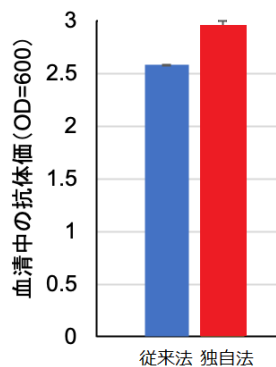


図1 最終抗原感作後の血清中のタンパク X に対する抗体価の比較。青は従来法、赤は独自法を示す。

(2) タンパク X に対する特異的な抗体の選抜

血清中のタンパク X に対する抗体価の上昇が確認されたマウスの脾臓を用いて、抗体産生細胞（ハイブリドーマ）の構築を行なった。はじめに、タンパク X に対する特異性を検証するために、タンパク X を発現する細菌に対する反応性の検証をフローサイトメーターと ELISA で行なった(図2、図3)。図2(A)と図3で示すようにタンパク X に特異的に結合する抗体を選抜した。

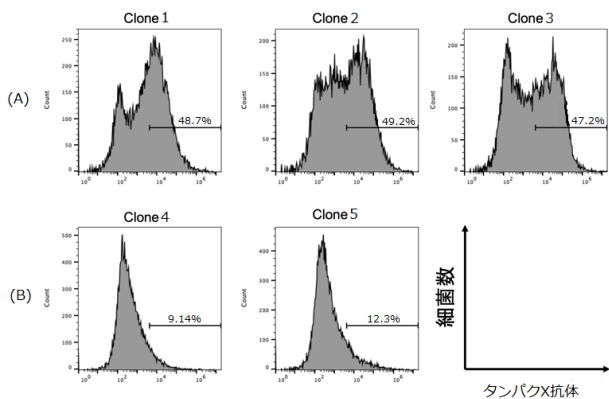


図2 フローサイトメーターによる抗体とタンパク X 発現細菌への結合の検証(一部)。(A)は陽性反応クローン、(B)は陰性反応クローンをそれぞれ示す。

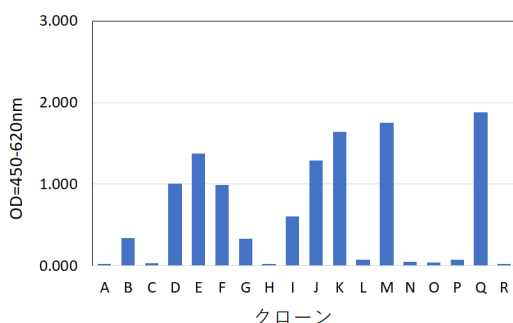


図3 ELISA による抗体とタンパク X 発現細菌への結合の検証(一部)。

(3) タンパク X を発現する腸内細菌を含んだヒト便試料からのタンパク X 遺伝子検出の検討

次に、抗体の作製と並行して、タンパク X を簡易的に検出するための方法の構築を試みた。実際に便懸濁液を DNA テンプレートとして使用した際に PCR で検出できるかどうかの検討を行なった。健常者便懸濁液にタンパク X を発現する細菌を3段階の濃度(0.1, 1, 10%)で添加し、3つの処理を行った懸濁液を調製した。各処理が完了した懸濁液をテンプレートとし、PCR を行い各試料における反応性の検討を行なった(図4)。その結果、便懸濁液をテンプレートとして使用しても PCR 反応を阻害しないこと、また便中に1%のタンパク X 発現細菌が含まれていればタンパク X 特異的プライマーにて検出できることを明らかにした。

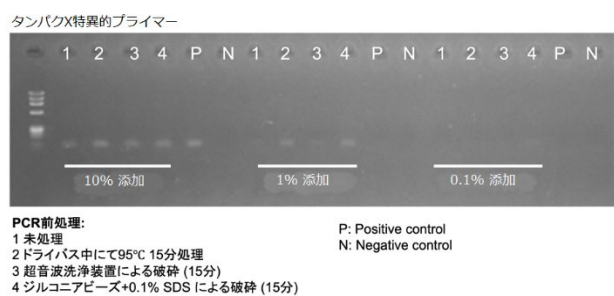


図4 タンパク X 発現細菌を添加した便懸濁液からのタンパク X 遺伝子の検出。タンパク X 発現細菌を含んだ便懸濁液を事前処理した後に、タンパク X 特異的プライマーにて PCR 増幅した後に PCR 産物をアガロースゲル電気泳動した結果を示す。

3. 考察及び今後の展望

腸内環境制御基盤技術の構築に向けたツールの一つとして腸内細菌由来タンパク特異的抗体の作製に着手し、独自法を利用することで標的細菌のみを検出する抗体の作製に成功した。作製した抗体は特定の疾病時に増加が認められる細菌由来タンパクに対して特異性が高いものであった。タンパク X は一種類の腸内細菌のみならず、同属細菌にも同様に発現しており、本タンパク質は疾病への関与が示唆されている。次の課題としては、現在取得している様々なハイブリドーマの中から、特定の菌におけるタンパク X に特異的な抗体のみならず同属菌に発現するタンパク X についても認識する抗体作製の取得も行い、用途に応じた使い分けをできるようにする。また、これまでに蓄積した腸内細菌の基礎データの中から機能性食品開発への応用や創薬の標的として活用することができる腸内細菌に対する抗体の作製についても引き続き進めていく。

4. 謝辞

本実験の遂行にあたり、公益財団法人 実験動物中央研究所の高橋利一氏、小倉智幸氏、何裕遥氏、富山香代氏、野津量子氏にご協力を賜りました。厚く御礼申し上げます。

本研究の一部は、文部科学省地域イノベーション・エ

コシステム形成プログラム、JST 戦略的創造研究推進事業により実施しました。

【参考文献】

1. Kim, S., Suda, W., Kim, S., Oshima, K., Fukuda, S., Ohno, H., Morita, H., Hattori, M., Robustness of Gut Microbiota of Healthy Adults in Response to Probiotic Intervention Revealed by High-Throughput Pyrosequencing. *DNA Res.* Jun;20(3):241-53, (2013).
2. Maldonado-Gomez, M.X., Martinez, S., Bottacini, F., O'Callaghan, A., Ventura, M., van Sinderen, D., Hillmann, B., Vangay, P., Knights, D., Hutkins, R.W., Walter, J. Stable Engraftment of *Bifidobacterium Longum* AH1206 in the Human gut depends on individualized features of resident microbiome. *Cell Host Microbe.* Oct 12; 20(4):515-526, (2016).
3. Ishikawa, D., Sasaki, T., Osada, T., Kuwahara-Arai, K., Haga, K., Shibuya, T., Hiramatsu, K., Watanabe, S. Changes in intestinal microbiota following combination therapy with fecal microbial transplantation and antibiotics for Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis.* Jan;23(1):116-125, (2017).
4. Paramsothy, S., Kamm, M.A., Kaakoush, N.O., Walsh, A.J., van den Bogaerde, J., Samuel, D., Leong, R.W.L., Connor, S., Ng, W., Paramsothy, R., Xuan, W., Lin, E., Mitchell, H.M., Borody, T.J. Multidonor intensive fecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet.* Mar 25;389(10075):1218-1228 (2017).

腸内細菌の単離・培養法の確立および腸内細菌特異的抗体の 実用化に向けた評価

「腸内環境デザイン」グループ
中藤学、大縄悟志、井上浄

1. はじめに

ヒトを含む哺乳類は、生後すぐに外部の環境に曝されることにより微生物との共生関係が始まる。体内にありながら外界とも繋がる消化管内も例外ではない。ヒトの腸管にはおよそ 1000 種類、40 兆個もの腸内細菌が生息しており、地球上のあらゆる環境の中で最も生息密度が高い場所である。腸内細菌同士は互いに生存競争を繰り返したり、支えあったりしながら一定のバランスを保っている。腸内に生息する細菌たちは腸内細菌叢とも呼ばれる。腸内細菌叢は食生活の変化が大きい乳幼児期では変動も大きくなるが、大人になると日々の食事や生活様式により多少の変動はあるものの、腸内細菌叢は安定した状態となる（参考文献 1）。

（1）腸内細菌叢が宿主に与える影響

宿主と共存関係を構築している腸内細菌叢は宿主に有益な効果をもたらしている。我々は呼吸や飲食などにより、常に外来抗原が体内へと侵入するリスクを抱えている。腸内細菌叢は消化管内に侵入してくるこれらの外来抗原の定着を防ぐ役割を果たしている。また、腸内細菌は食物由来の未消化物を栄養源として発酵分解し、その際に代謝物質である低分子を菌体外に放出する。腸内細菌叢由来代謝物質は腸管上皮細胞のエネルギー源となるだけでなく、腸管上皮同士の結合の強化にも寄与し腸管上皮細胞の恒常性維持にも重要な役割を果たしている（参考文献 2）。更に、一部の腸内細菌由来代謝物質は宿主の免疫機能を活性化する。例えば、腸内細菌叢を構成する主要な細菌群の一種であるクロストリジウム目細菌群が食物繊維を代謝発酵し産生する酪酸は、炎症やアレルギーの起因となる過剰な免疫応答を抑制する細胞である制御性 T 細胞の分化誘導を促進するといった重要な役割を果たしている（参考文献 3、4）。

一方で、ストレスや生活習慣の乱れにより腸内細菌叢のバランスが崩れること（ディスバイオーシス）が疾病につながることも知られている。実際に腸内細菌叢の乱れが大腸がんや大腸炎などの腸管関連疾患のみならず、糖尿病、動脈硬化、自閉症、アレルギー疾患など多岐にわたる疾患の発症にも関連することが報告されている（参考文献 5）。また、ディスバイオーシス時の腸内細菌叢由来の代謝物質も、これらの疾患を引き起こす要因となっている。ゆえに、腸内細菌叢をはじめとする腸内環境を正常に保つことは

病気を防ぎ、健康維持にとって重要となる。

（2）個々の腸内細菌を対象とした研究の重要性と課題

これまでの研究から、各個人の腸内細菌叢の構成および経時的変化については多く知見が得られている。また、項目 1.1 で述べたように腸内細菌叢由来代謝物質は宿主の健康維持に重要な要素となっているのみならず、様々な疾患とも深く関わる事が明らかになってきた。そのため個々の腸内細菌の特性や腸内細菌由来代謝物質を理解することは健康維持ならびに疾患を予防するために重要となる。メタボローム解析などにより疾患時などにおいて変化する代謝物質は明らかとなっているが、それらの代謝物質が腸内細菌叢を構成するどの腸内細菌由来によるものであるかについては、不明な点が多い。個々の腸内細菌における研究報告数が少ない一番の要因は、腸内細菌の培養法が十分に確立されていないことが挙げられる。腸内細菌の多くが偏性嫌気性細菌に分類されており、わずかな酸素の混入により生育が阻害されてしまう。脱酸素剤などを利用した簡易嫌気環境の構築やグローブボックスなどの嫌気培養装置を利用した腸内細菌の培養法の開発が進んでいるものの、依然として単離・培養が困難な腸内細菌が数多く存在している。

（3）腸内環境制御基盤技術の構築に向けて

腸内細菌叢を含む腸内環境を適切に制御する基盤技術の構築は、我々の健康維持や疾患予防に有効な手段となる。このような基盤技術を構築するためには、以下に示す課題に取り組む必要がある。

1. 腸内細菌の安定培養方法の確立ならびにヒトやマウスからの有用性の高い腸内細菌の単離
2. 単独腸内細菌定着マウスの構築および解析による腸内細菌投与が宿主に与える影響の評価
3. 腸内細菌研究ツールの開発およびその評価

個々の腸内細菌がもつ特徴を明らかにすることや、それらの安定培養方法のノウハウの蓄積は、腸内環境制御基盤技術に結びつく創薬、栄養補助食品、機能性食品の開発にも直結するのみならず基礎研究の発展にも大きな役割を果たす。

2. 実験と結果

本年度はヒト便試料からの腸内細菌の単離およびその安定培養方法の確立、本プロジェクトにて作製した腸内細菌特異的抗体の標的分子の解析ならびに腸内細菌の特性の解析の3つの項目に取り組んだ。

(1) ヒト由来腸内細菌の単離および安定培養法の確立

これまでに蓄積してきた嫌気培養技術と腸内細菌選択培地を組み合わせることで、腸内環境制御基盤技術への応用が期待される腸内細菌の単離ならびにその安定培養方法を確立した。

標的となる腸内細菌が多く含まれる便懸濁液を選択培地プレートに播種し、嫌気環境下においてコロニーを形成させた。24-72 時間後に形成されたコロニー群から単コロニーを釣菌し、別な選択培地プレートへの植菌し、PCR により標的細菌であるか否かの検討を実施した。目的の細菌コロニーをビタミンやミネラル成分が多く含まれる YCFA 培地に更に数種類の栄養素を添加した本グループ独自の改良型 YCFA 培地(mYCFA)を用いて培養した。その中から増殖が認められたものは DNA を抽出し、その配列を 16S rRNA 遺伝子増幅用ユニバーサルプライマーで遺伝子増幅した後にシーケンス解析を実施し、菌種の同定を行った(図1、A)。その結果、本年度は疾患との関連性が示唆されている2種類、計14菌株のグラム陰性菌の単離・培養に成功した(図1、B)。

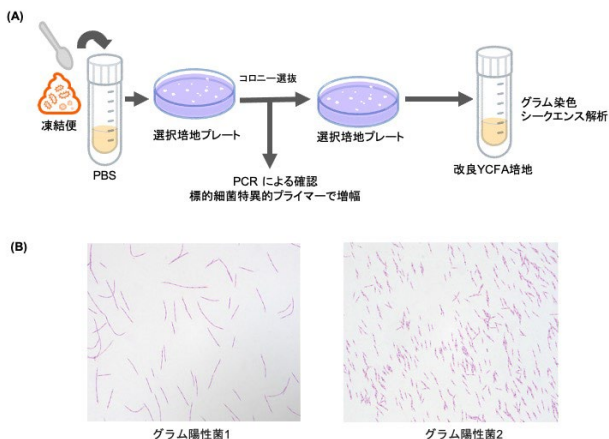


図1 本年度ヒト便試料より単離した疾患との関連が示唆される腸内細菌の単離方法(A)とグラム染色画像(B)

(2) 作製した腸内細菌特異的抗体の標的分子の同定

本プロジェクトにおいて、これまでにヒト由来腸内細菌 A に対する細菌特異的抗体(抗体 A)を作製し、標的腸内細菌を含む腸内細菌混合液から標的となる腸内細菌を分離濃縮する手法の確立を実施してきた。本年度は抗体の機能解析として、抗体 A の標的分子の検討を行った。抗体 A が認識する抗原分子を同定するため、標的となる抗原を標的腸内細菌の細胞壁分画溶液から免疫沈降法により濃縮した(図2、A)。はじめに、Protein A ビーズ、アイソタイプ

コントロール抗体、抗体 A を使用し、標的分子の濃縮を検討した。その結果、抗体 A を使用すると 55kDa 付近に標的分子のシグナルが検出された。一方でアイソタイプコントロール抗体においてはそのシグナルが検出されなかった(図2、B)。抗体 A を用いると銀染色においても同様の位置にバンドを確認することができた(図2、C)。次に銀染色ゲルから標的分画を含むゲルを切り出し、質量分析計により標的タンパク質の同定を行なった。その結果、細菌間においても広く保存されている細胞内酵素(酵素 X)が抗体 A の標的分子であることが明らかとなった。また、抗体 A の標的が酵素 X であるかどうか検討するために、酵素 X を欠損する大腸菌株を用いて検討を行った。その結果、酵素 X を欠損する大腸菌ではバンドはなく、抗体 A の標的は酵素 X であることが確かめられた(図2、D)。

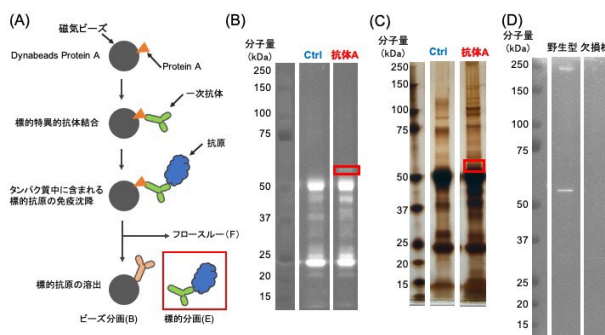


図2 抗体 A の標的分子の検討

(A)免疫沈降法の概略 (B) アイソタイプコントロール抗体(Ctrl)と抗体 A による免疫沈降後のウェスタンブロット、図の赤枠は標的分子を示す (C) 免疫沈降後の銀染色ゲル、赤枠で示される標的部分を切り出した (D)抗体 A を用いたウェスタンブロットによる酵素 X の検出、欠損株は酵素 X を欠損する大腸菌を示す

(3) 抗体 A 標的腸内細菌の特性の解析

項目 2.2 で記載したように抗体 A の標的分子である酵素 X は通常細胞内に発現する分子であった。しかしながら、昨年度までの研究から抗体 A を作製した際に用いた腸内細菌(細菌 A)では本酵素を表層に発現することが示される結果が得られている。そこで免疫組織染色を行い蛍光顕微鏡にて観察し、局在の検討を行なった。その結果、腸内細菌 A では酵素 X が細菌表層に強く発現していることが明らかとなった。一方で、腸内細菌 A の基準株である腸内細菌 B においては細胞表層での発現は見られなかった(図3、A)。腸内細菌 A は表層において酵素 X を強く発現していたことから、最後に酵素 X が菌体外へと放出されるかどうかを検討した。腸内細菌 A および腸内細菌 B を液体培地にて 24 時間培養し、細菌培養上清をもちいてウェスタンブロット解析を行った。その結果、腸内細菌 A では酵素 X が細胞外へと放出されていたが、一方で腸内細菌 B では放出されないことが明らかとなった。(図3、B)。

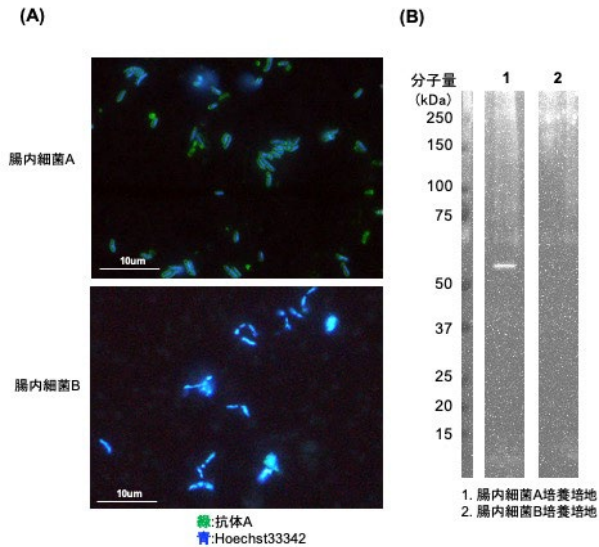


図 3 腸内細菌 A における酵素 X の発現

(A) 抗体 A による免疫組織染色画像。緑は抗体 A、青はヘキスト 33258 による細菌を示す。(B) 腸内細菌培養上清中に含まれる酵素 X をウェスタンブロットにより検討したもの

3. 考察及び今後の展望

本年度はこれまでに培ってきた嫌気培養法を用い、ヒト便試料から疾患への関与が示唆される 2 種類の腸内細菌を単離し、安定培養することができた。これらの菌は、作製した腸内細菌を標的とする細菌に対する機能評価ならびに腸内細菌の特性の解明に有用である。今後は、腸内細菌単独定着マウスを構築することで、代謝物質の網羅的解析、腸管上皮細胞や免疫細胞の変化を検討することで疾患との関連性を評価する。

抗体の機能評価においては抗体 A の標的分子が細胞内酵素の一つである酵素 X であることを明らかにした。また、腸内細菌 A が同種の腸内細菌を含む多くの腸内細菌とは異なり酵素 X を表層に発現し、それを細胞外へと放出することを新たに見出した。酵素 X は細胞内において代謝物質の産生を触媒する酵素であるが、本機能以外にも別な機能を持つことも知られ、細菌の接着にも関与する報告もある。腸管内において酵素 X のような挙動を示す分子については、大腸菌のペリプラズムに発現する分子が細胞表層に分泌され、宿主から分泌される IgA 抗体により認識されることが報告されている (参考文献 6)。今後は腸内細菌 A が酵素 X を表層に発現する分子機構や、酵素 X が腸内細菌の表層に発現し、菌体外へと放出されることが腸内細菌 A や宿主にとってどのような利点があるのかについて検討する。一方で、昨年度実施した標的腸内細菌を含むヒト腸内細菌叢からの分離について、標的分画において濃縮は見られたものの、標的分画内には標的以外の腸内細菌も含まれており、標的細菌の純度を上げることが課題であった。本年度も実験条件の変更などを試みたが、根本的な改善には至らなかった。本課題についても引き続き抗体と標的腸内細菌の非特異的な反応を抑える手法を検討し、精度を上げることに取り組む。

4. 謝辞

本実験の遂行にあたり、腸内細菌の分離、新規培養技術の構築では慶應義塾先端生命科学研究所の楊佳約博士、筑波大学トランスボーダー医学センターの尾花望博士をはじめ多くの方々のご協力を賜りました。厚く御礼申し上げます。

本研究の一部は、文部科学省地域イノベーション・エコシステム形成プログラム、JST 戦略的創造研究推進事業により実施しました。

【参考文献】

- 1 Odamaki, T., Kato, K., Sugahara, H., Hashikura, N., Takahashi, S., Xiao, J.Z., Abe, F., Osawa, R., Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol.* 25:16:90, (2016).
- 2 Okada, T., Fukuda, S., Hase, K., Nishiumi, S., Izumi, Y., Yoshida, M., Hagiwara, T., Kawashima, R., Yamazaki, M., Oshio, T., Otsubo, T., Inagaki, O. K., Kakimoto, K., Higuchi, K., Kawamura, Y. I., Ohno, H., Dohi, T. Microbiota-derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice. *Nat. Commun.* 4: 1654, (2013).
- 3 †Furusawa, Y., †Obata, Y., †*Fukuda, S. (†co-first and *corresponding author), Endo, T. A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., Takahashi, M., Fukuda, N.N., Murakami, S., Miyauchi, E., Hino, S., Atarashi, K., Onawa, S., Fujimura, Y., Lockett, T., Clarke, J.M., Topping, D.L., Tomita, M., Hori, S., Ohara, O., Morita, T., Koseki, H., Kikuchi, J., Honda, K., †* Hase, K., * Ohno, H. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504: 446-450, (2013).
- 4 Atarashi, K., Tanoue, T., Suda, W., Oshima, K., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., Kim, S.W., Fritz, J.V., Wilmes, P., Ueha, S., Matsushima, K., Ohno, H., Olle, B., Sakaguchi, S., Taniguchi, T., Morita, H., Hattori, M., Honda, K. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* 500: 232-236, (2013).
- 5 Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C., Finlay, B.B. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* Jul;90(3):859-904. (2010).
- 6 Okai S, Usui F, Yokota S, Hori-I Y, Hasegawa M, Nakamura T, Kurosawa M, Okada S, Yamamoto K, Nishiyama E, Mori H, Yamada T, Kurokawa K, Matsumoto S, Nanno M, Naito T, Watanabe Y, Kato T, Miyauchi E, Ohno H, Shinkura R. High-affinity monoclonal IgA regulates gut microbiota and prevent colitis in mice. *Nat. Microbiol.* Jul 4;1(9):16103 (2016)

業績

【原著論文】

(投稿掲載)

1. Zhu X, Sakamoto S, Ishii C, Smith MD, Ito K, Obayashi M, Unger L, Hasegawa Y, Kurokawa S, Kishimoto T, Li H9, Hatano S, Wang TH, Yoshikai Y, Kano S, Fukuda S, Sanada K, Calabresi PA, Kamiya A. Dectin-1 signaling on colonic $\gamma\delta$ T cells promotes psychosocial stress responses. *Nat. Immunol.* in press
2. Morita H, Kano C, Ishii C, Kagata N, Ishikawa T, Hirayama A, Uchiyama Y, Hara S, Nakamura T, Fukuda S. *Bacteroides uniformis* and its preferred substrate, α -cyclodextrin, enhance endurance exercise performance in mice and human males. *Sci Adv.* 2023 Jan 25;9(4):eadd2120.
3. Nishimoto Y, Fujisawa K, Ukawa Y, Kudoh M, Funahashi K, Kishimoto Y, Fukuda S. Effect of urolithin A on the improvement of vascular endothelial function depends on the gut microbiota. *Front Nutr.* 2023 Jan 5;9:1077534.
4. Sezaki, M*, Hayashi, S*, Nakato, G., Wang, Y., Nakata, S., Biswas, S., Morishima, T., Fakruddin, M., Moon, J., Ahn, S., Kim, P., Miyamoto, Y., Baba, H., Fukuda, S., and Takizawa, H. (* equal contribution) Hematopoietic stem and progenitor cells integrate microbial signals to promote gut tissue repair. *EMBO J.* 2022 Nov 17;41(22):e110712.
5. Nakamura Y, Suzuki S, Murakami S, Nishimoto Y, Higashi K, Watarai N, Umetsu J, Ishii C, Ito Y, Mori Y, Kohno M, Yamada T, Fukuda S. Integrated gut microbiome and metabolome analyses identified fecal biomarkers for bowel movement regulation by *Bifidobacterium longum* BB536 supplementation: A RCT. *Comput Struct Biotechnol J.* 2022 Oct 25;20:5847-5858.
6. Tanaka Y, Yamashita R, Kawashima J, Mori H, Kurokawa K, Fukuda S, Gotoh Y, Nakamura K, Hayashi T, Kasahara Y, Sato Y, Fukudo S. Omics profiles of fecal and oral microbiota change in irritable bowel syndrome patients with diarrhea and symptom exacerbation. *J Gastroenterol.* 2022 Oct;57(10):748-760.
7. Yoshida Y, Shimizu I, Shimada A, Nakahara K, Yanagisawa S, Kubo M, Fukuda S, Ishii C, Yamamoto H, Ishikawa T, Kano K, Aoki J, Katsuumi G, Suda M, Ozaki K, Yoshida Y, Okuda S, Ohta S, Okamoto S, Minokoshi Y, Oda K, Sasaoka T, Abe M, Sakimura K, Kubota Y, Yoshimura N, Kajimura S, Zuriaga M, Walsh K, Soga T, Minamino T. Brown adipose tissue dysfunction promotes heart failure via a trimethylamine N-oxide-dependent mechanism. *Sci. Rep.* 2022 Sep 1;12(1):14883.
8. Goto Y, Nishimoto Y, Murakami S, Nomaguchi T, Mori Y, Ito M, Nakaguro R, Kudo T, Matsuoka T, Yamada T, Kobayashi T, *Fukuda S. Metabologenomic Approach Reveals Intestinal Environmental Features Associated with Barley-Induced Glucose Tolerance Improvements in Japanese: A Randomized Controlled Trial. *Nutrients.* 2022 Aug 24;14(17):3468.
9. Yukawa-Muto Y, Kamiya T, Fujii H, Mori H, Toyoda A, Sato I, Konishi Y, Hirayama A, Hara E, Fukuda S, Kawada N, Ohtani N. Distinct responsiveness to rifaximin in patients with hepatic encephalopathy depends on functional gut microbial species. *Hepatol. Commun.* 2022 Aug;6(8):2090-2104.
10. Jangid A, Fukuda S, Seki M, Suzuki Y, Taylor TD, Ohno H, Prakash T. Gut microbiota alternation under the intestinal epithelium-specific knockout of mouse Piga gene. *Sci. Rep.* 2022 Jun 25;12(1):10812.
11. Yamagishi R, Kamachi F, Nakamura M, Yamazaki S, Kamiya T, Takasugi M, Cheng Y, Nonaka Y, Yukawa-Muto Y, Thuy LTT, Harada Y, Arai T, Loo TM, Yoshimoto S, Ando T, Nakajima M, Taguchi H, Ishikawa T, Akiba H, Miyake S, Kubo M, Iwakura Y, Fukuda S, Chen WY, Kawada N, Rudensky A, Nakae S, Hara E, Ohtani N. Gasdermin D-mediated release of IL-33 from

- senescent hepatic stellate cells promotes obesity-associated hepatocellular carcinoma. *Sci. Immunol.* 2022 Jun 24;7(72):eabl7209.
12. Nishimoto Y, Mizuguchi Y, Mori Y, Ito M, Miyazato S, Kishimoto Y, Yamada T, Fukuda S. Resistant maltodextrin intake reduces virulent metabolites in the gut environment: A randomized control study in a Japanese cohort. *Front. Microbiol.* 2022 May 4;13:644146.
 13. Shiroma H, Shiba S, Erawijantari PP, Takamaru H, Yamada M, Sakamoto T, Kanemitsu Y, Mizutani S, Soga T, Saito Y, Shibata T, Fukuda S, Yachida S, Yamada T. Surgical Treatment for Colorectal Cancer Partially Restores Gut Microbiome and Metabolome Traits. *mSystems.* 2022 Apr 26;7(2):e0001822.
 14. Jangid A, Fukuda S, Suzuki Y, Taylor TD, Ohno H, Prakash T. Shotgun metagenomic sequencing revealed the prebiotic potential of a grain-based diet in mice. *Sci Rep.* 2022 Apr 25;12(1):6748.
 15. Kure A, Tsukimi T, Ishii C, Aw W, Obana N, Nakato G, Hirayama A, Kawano H, China T, Shimizu F, Nagata M, Isotani S, Muto S, Horie S, Fukuda S. Gut environment changes due to androgen deprivation therapy in patients with prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2022 Apr 13.
 16. Ishihara S, Sato T, Fujikado N, Miyazaki H, Yoshimoto T, Yamamoto H, Fukuda S, Katagiri K. Rap1 prevents colitogenic Th17 cell expansion and facilitates Treg cell differentiation and distal TCR signaling. *Commun Biol.* 2022 Mar 4;5(1):206.
 17. Jangid A, Fukuda S, Kato T, Seki M, Suzuki Y, Taylor TD, Ohno H, Prakash T. Impact of dietary fructooligosaccharides (FOS) on murine gut microbiota and intestinal IgA secretion. *3 Biotech.* 2022 Feb;12(2):56.
 18. Maruyama Y, Nishimoto Y, Umezawa K, Kawamata R, Ichiba Y, Tsutsumi K, Kimura M, Murakami S, Kakizawa Y, Kumagai T, Yamada T, *Fukuda S. Comparison of oral metabolome profiles of stimulated saliva, unstimulated saliva, and mouth-rinsed water. *Sci. Rep.* 2022 Jan 13;12(1):689.
- 【口頭発表】**
1. 福田真嗣 腸内環境に基づく層別化医療・ヘルスケアがもたらす未来、第 32 回泌尿器科分子・細胞研究会、秋田市にぎわい交流館 AU(秋田)、2023 年 2 月 25 日
 2. 福田真嗣 腸内デザイン:腸内環境に基づく層別化がん治療の可能性、お茶の水がんアカデミア第176回集会、オンライン、2023 年 2 月 22 日
 3. Shinji Fukuda The impact of gut microbiota-derived metabolites on endurance exercise performance, China-Japan Life Science Workshop, オンライン開催、2023 年 1 月 13 日
 4. 福田真嗣 腸内環境に基づく層別化医療・ヘルスケアがもたらす未来、第 20 回日本機能性食品医学学会総会、ホテルルビノ京都堀川(京都)、2022 年 12 月 4 日
 5. 福田真嗣 腸内環境に基づく層別化医療・ヘルスケアがもたらす未来、日本放射線技術学会第 69 回関東支部研究発表大会、つくば国際会議場(筑波)、2022 年 12 月 3 日
 6. 福田真嗣 腸内環境に基づく層別化医療・ヘルスケアがもたらす未来、第 9 回食品薬学シンポジウム、富山県パレブラン高志会館カルチャーホール(富山)、ハイブリット開催、2022 年 10 月 15 日
 7. 中藤学 研究者としての視座を高める海外留学のススメ、第 46 回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム(若手企画シンポジウム)、東京大学(東京)、2022 年 10 月 28 日
 8. 福田真嗣 腸内環境に基づく層別化医療・ヘルスケアがもたらす未来、第 165 回日本獣医学会学術集会、麻布大学(東京)、ハイブリット開催、2022 年 9 月 6 日
 9. 福田真嗣 腸内環境に基づく層別化医療・ヘルスケアがもたらす未来、日本ペット栄養学会第 23 回定例会、東京農工大学府中キャンパス(東京)、ハイブリット開催、2022 年 7 月 24 日
 10. 福田真嗣 ウィルス感染と腸内細菌、第 8 回がん代謝研究会、あいぼーと佐渡(新潟県)、2022 年 7 月 22 日

11. 福田真嗣 腸内細菌叢を活用した新たな医療・ヘルスケア産業の創出、日本微生物資源学会第 28 回大会、東京理科大学野田キャンパス(千葉)ハイブリット開催、2022 年 7 月 1 日
12. 福田真嗣 腸内環境に基づく層別化医療がもたらす未来、第 37 回日本臨床栄養代謝学会学術集会、パシフィコ横浜(神奈川)ハイブリット開催、2022 年 5 月 31 日
13. 福田真嗣 腸内環境に基づく層別化医療がもたらす未来、日立一高科学講演会、オンライン開催、2022 年 5 月 10 日
14. 福田真嗣 腸内環境に基づく層別化医療がもたらす未来、第 122 回日本外科学会定期学術集会、熊本城ホール(熊本)、2022 年 4 月 14 日

【ポスター発表】

15. 楊佳約, 尾花望, 中藤学, 野村暢彦, 富田勝, 福田真嗣 腸管粘膜最近傍に局在する腸内細菌が宿主免疫機能に与える影響、第 96 回日本細菌学会総会、アクリエ姫路(姫路)、2023 年 3 月 17 日
16. 市村涼葉, 田中一己, 清水映輔, 小川葉子, 坪田一男, 福田真嗣 便微生物叢移植および骨髄移植併用による腸内細菌叢定着への影響、第 45 回日本分子生物学会年会、幕張メッセ(千葉)、ハイブリット開催、2022 年 11 月 30 日

【特許】

- (1)国内特許出願 なし
- (2)国際特許出願 1 件