

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】

本グループは、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、38 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、遠隔臓器や全身における様々な疾患の発症に関連することが示唆されている。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ものの、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も多い。

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、消化管内に存在する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どのような影響を与えるか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。本グループ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. 2023 年度の研究目的

2023 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・培養技術の確立ならびに腸内細菌の特性の解明

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理化学研究所バイオリソース研究センターをはじめとする国内外のバイオリソースセンター寄託されているものも多い。一方で、腸内細菌叢の中でもその割合が低く、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に由来する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。そこで本グループにおいて培ってきた腸内細菌培地や嫌気培養法を活用し、ヒト便試料から有用性の高い腸内細菌の単離・培養を試みた。さらなる腸内細菌培養方法の検討のため、本年度は新たに

腸内細菌-腸管上皮細胞共培養試験を行った。これらの実験に加え、これまでに単離・安定培養を確立した腸内細菌の特性を見出すために、単独腸内細菌定着マウスの解析や腸内細菌定着競合試験を行った。

(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）。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、検出するためのツール開発として疾患関連細菌由来タンパク質を標的とした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現在も変異を重ねており、オミクロン株に匹敵するような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・増強することがウイルスの脅威から私たちを守るために重要となる。新型コロナ感染症は、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。そこで、本グループは神奈川県立保健福祉大学、神奈川県立病院機構神奈川県がんセンター、株式会社メタジェン、株式会社明治による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」を進め、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た。

2. 2023 年度の研究成果

2023 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。便試料を血液寒天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、液体培地内にて培養を継続した。増殖が認められたものから DNA を抽出し、標的細菌プライマーによる PCR 選抜を行った。選抜されたコロニーを再度培養し、標的細菌プライマーによる PCR による最終確認を経たのち、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 1 種類のグラム陽性菌の単離ならびにその安定培養法の確立に成功した。

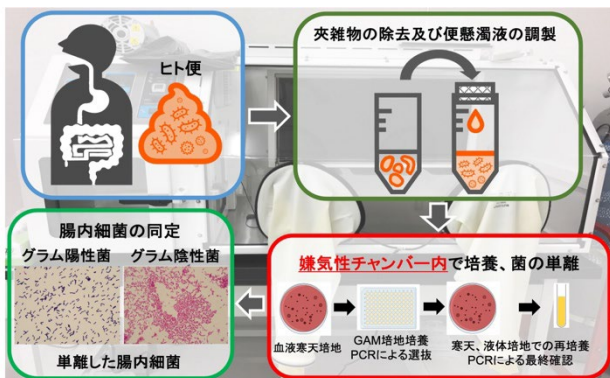


図 1 ヒト便試料からの疾患関連腸内細菌の単離法の概要

腸内細菌が存在する消化管内は、腸内細菌同士の相互関係のみならず、腸内細菌—宿主細胞の相互関係も腸内細菌の定着に必要となる。すなわち、宿主—微生物共生系を検討することは腸内細菌の特徴や機能を評価する上で重要である。そこで、本年度は新たな腸内細菌培養方法として腸管上皮細胞培養株と腸内細菌の共培養系の構築を行った。その結果、腸内細菌と腸管上皮細胞培養株を共培養したところ、一部の細菌は形状が培地のみでの単独培養時と異なる形状に変化することが明らかとなった。

これまでに作製した腸内細菌特異的抗体の機能解析から腸内細菌特異的抗体に使用したヒト由来腸内細菌 A は同基準株と表面構造が異なることが示唆されていた。そこで本年度はヒト由来腸内細菌 A が宿主に与える影響を評価した。それぞれの腸内細菌の単独腸内細菌定着マウスの構築し、宿主への影響を解析したが、ヒト由来腸内細菌 A と基準株の間に大きな違いは認められなかった。一方、腸管への定着効率を検討するため、ヒト由来腸内細菌 A と基準株によるマウス腸内への競合定着試験を実施したところ、ヒト由来腸内細菌 A はマウスの腸内において基準株よりも優勢になることが明らかとなった。

(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グループ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。本年度も引き続き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。タンパク質 X を発現する標的細菌、細菌破碎溶液、および細菌培養上清を使用し、得られた抗体の機能を検討した。その結果、作製した抗体は標的タンパク質を持つ、幅広い疾患関連細菌を認識できるだけでなく、標的タンパク質を有さない同属の細菌には交差反応を示さなかった。次に作製した抗体の応用利用法の検討を実施するために、標的タンパク質 X を添加したヒト便懸濁液から作製した抗体を活用し、標的タンパク質 X が検出できるかどうかの検討を行った。その結果、ELISA で便に添加した標的タンパク質 X を検出することができた。また、作製した抗体はウェスタンブロット法にも適用できることも明らかとなった。

(3) 新型コロナウイルス抗体価社会調査プロジェクト

本プロジェクトで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。本年度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た。その結果、血中のワクチン抗体価は、ワクチン接種後日数に依存して抗体価は低下したが、接種直後でも抗体価が低い人や接種半年後でも抗体価が維持されている人など個人ごとに大きく異なることが明らかとなった。また新型コロナウイルスワクチンと食、および腸内環境の関連性を調べたところ、ヨーグルトの習慣的な摂取が抗体価の上昇や維持、抗原特異的T細胞の活性化と関連すること、ヨーグルトの習慣的な摂取が腸内細菌叢や代謝物質を変化させることが明らかとなった（図2）。

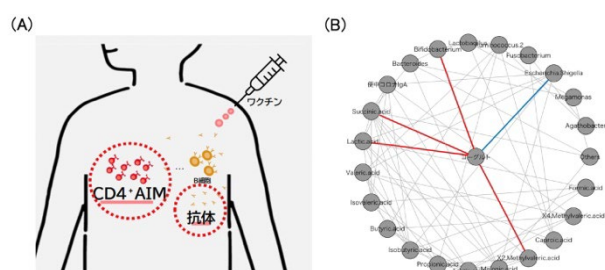


図2 本年度の研究成果

(A) ヨーグルト摂取がコロナワクチン投与に与える影響

URL:<https://www.kistec.jp/aboutus/press/pr20231130-2/>

(B) ヨーグルトの摂取頻度と腸内環境の相関解析結果

3. 研究体制

本グループでは、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ており、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。本グループではオンラインを活用し、多拠点の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しながら進めた。

4. 総括

本グループは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1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。また腸管上皮細胞株と腸内細菌の共培養系の構築し、宿主-微生物共生系の解析のための有効なツールとなる可能性を見出した。これまでに見出してきた有用性の高い腸内細菌については、引き続き腸内細菌単独定着マウスの構築や、腸内細菌

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。

腸内環境制御基盤技術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応用利用法の検討を行い、ELISAやウェスタンブロット法にて標的タンパク質を検出することができた。昨年度までに構築した、PCRを用いた疾患関連タンパク質の簡易検出法と組み合わせることで、新規特定疾患診断法の開発に繋げる。今後も、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。

昨年度より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。今年度の研究成果から新型コロナウイルスワクチン、食、腸内環境は密接に関連していることが示唆された。今後解析予定の200名のデータも加え、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更に検討を進める。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を行い、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も実施する。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（食物繊維やオリゴ糖など）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、それらはプロバイオティクスと呼ばれる。プロバイオティクスを含む製品や食品の摂取は、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などに関与することも知られている。機能的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的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、機能的食品を摂取している間は便中から機能的食品に含まれる有用菌が検出されるものの、摂取をやめる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、機能的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腸内に定着する、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質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。また標的細菌のみを認識する抗体作製にも成功した。昨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い、今年度も引き続き抗体の機能評価と解析を行う。

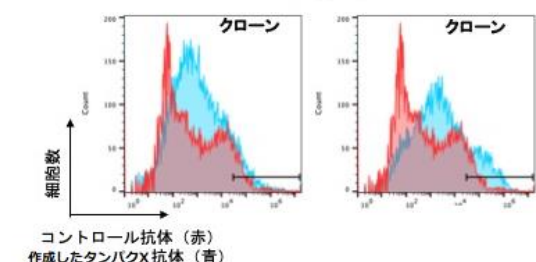
2. 実験と結果

(1) 特定疾患関連細菌検出に向けたタンパク X 標的抗体の機能評価

(1-1) FACS による抗タンパク X 抗体と特定疾患関連細菌の交差反応の検討

昨年度までに作製した特定疾患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）に対する抗体の最終クローンの評価を実施した。はじめに口腔由来細菌基準株 8 種、単離株 2 種ならびに非口腔由来細菌 4 種に対して抗体が交差反応を示すかフローサイ

トメーターにより検討した。その結果2つのクローンにおいて2種の細菌に対する交差反応が認められたが、その他の細菌に対しては交差反応は認められなかった（図1、表1）。



基準株	A	B	C	D	E	F	G
クローン							
1	×	×	×	×	×	×	×
2	×	×	×	×	×	×	×
3	×	△(10.0%)	×	×	×	×	×
4	×	×	×	×	×	×	×
5	×	×	△(5.61%)	×	×	×	×
6	×	×	×	×	×	×	×
7	×	○(18.9%)	○(10.7%)	×	×	×	×

分離株	H	I	J	K
クローン				
1	×	×	×	×
2	×	×	×	×
3	×	×	×	×
4	×	×	×	×
5	×	×	×	×
6	×	×	×	×
7	×	×	×	×

図1 (上)、表1 (下) FACSによる抗タンパク X 抗体と特定疾患関連細菌の交差反応の検討

(1-2) ELISA による抗タンパク X 抗体と特定疾患関連細菌由来タンパク質との交差反応の検討

次に特定疾患関連細菌の破砕分画、膜分画を用いた ELISA による交差反応の検討を実施した。すべてのクローンにおいて免疫抗原であるタンパク X に対する高い交差反応があり、ネガティブコントロールタンパク質である複数種の非口腔由来細菌タンパク質混合液への交差性はなかった一方で、FACS の結果とは異なり、口腔由来タンパクタンパク質に対する交差反応はクローン2を除くすべてのクローンで見られた。中でもクローン1、3、4、5は特定疾患由来細菌由来タンパク質を含むすべての口腔由来細菌に対して交差反応を示した。(表2)

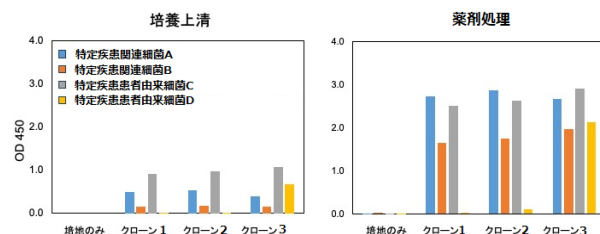
タンパク質	A	B	C	D	E	F	G
クローン							
1	○	×	○	○	○	○	△(0.825)
2	○	×	△(0.438)	△(0.484)	△(0.484)	○	×
3	○	×	○	○	○	○	△(0.974)
4	○	×	○	○	○	○	○
5	○	×	○	△(0.889)	○	○	○
6	○	×	×	×	×	×	×
7	○	×	○	△(0.425)	○	×	△(0.777)

表2 ELISAによる抗タンパク X 抗体と特定疾患関連細菌由来タンパク質との交差反応の検討

(1-3) 抗タンパク X 抗体を用いた ELISA による特定疾患関連細菌培養上清に含まれるタンパク X

の検出

タンパク X は細菌の表層に発現するだけでなく、細菌外への分泌されている。そこで特定疾患関連細菌の培養上清に含まれるタンパク X が作製した抗体により検出できるかどうかの検討を実施した。特異的疾患関連細菌と特定の疾患患者由来細菌を用いて検討したところ、培養上清を直接添加した場合でもタンパク X を検出することができた。また、薬剤処理による濃縮を実施することで



検出感度を向上させることができた（図2）。

図2 特定疾患関連細菌培養上清に含まれるタンパク X の検出結果

次に口腔由来および非口腔由来特定疾患関連細菌に対する交差反応の検討を行なった。その結果、クローン3はすべての口腔由来特定疾患関連細菌由来の培養上清に含まれるクローン X を検出することができ、実用化へ有用なクローンであることが見出された。また、クローン1と2についても全てではないものの、ほとんどの口腔由来特定疾患関連細菌由来の培養上清からクローン X を検出することができた。一方で、クローン4は交差反応性が低かった（表3）。

細菌	クローン	1	2	3	4
1	○	○	○	○	×
2	○	○	○	○	△
3	○	○	○	○	×
4	○	○	○	○	×
5	○	○	○	○	○
6	×	×	○	○	○
7	○	○	○	○	△
8	×	×	○	○	×
9	○	○	○	○	×
10	○	○	○	○	△
11	○	○	○	○	○
12	×	×	○	×	×
13	×	×	×	×	×
14	×	×	×	×	×
15	×	×	×	×	×

○: OD=>2.0, ○: OD=1.0-2.0, △: OD=0.1-1.0, ×: OD<0.1
緑: 非口腔由来特定疾患関連細菌

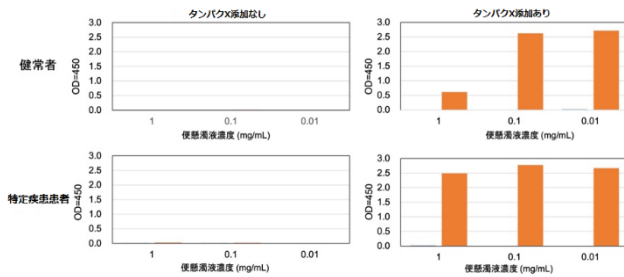
表3 抗タンパク X 抗体を用いた ELISA による細菌培養上清に含まれるタンパク X の検出結果

特定疾患関連細菌の単離方法については共同研究先大学と連携し、4つの抗生物質を組み合わせた培地による選択方法が有用であることを見出した。

(1-4) 抗タンパク X 抗体を用いた ELISA による便懸濁液に含まれるタンパク X の検出

得られた抗体を用いてヒト便懸濁液からタンパク X が検出できるかどうか検討した。健常者と特定疾患患者由来の便から便懸濁液を調製し、便懸濁液と便懸濁液にタンパク X を添加したサンプルを用いて ELISA による検出を行った。その結果、タンパク X を添加した便懸濁液か

らはタンパク X を検出することができた。一方で、未添加の便懸濁液からは健常者ならびに特定疾患患者のどちら



からもタンパク X が検出されなかった (図 3)。

図 3 抗タンパク X 抗体を用いた ELISA による便懸濁液に含まれるタンパク X の検出結果

(1-5) 抗タンパク X 抗体によるウェスタンブロットによるタンパク X の検出

ELISA による検出において特定疾患患者由来の便からタンパク X が検出できなかった要因の一つとして、タンパク X 自体が便中に含まれる何らかの因子によりマスクされており、抗体による検出ができなくなっている可能性が示唆された。そこで、ウェスタンブロット法による検出法の構築を行った。はじめに、タンパク X がどのくらいの濃度まで検出できるかの検討を行い、0.8 ng まで検出できることを見出した。また、特定疾患関連細菌の細菌破砕溶液を用いて同様の検討を行った。その結果、タンパク X を持つ細菌破砕溶液では 0.1 μ g まで検出可能であった (図 4,A)。一方で、非口腔由来特定疾患関連細菌である細菌破砕溶液からはシグナルが検出されなかった (図 4,B)。

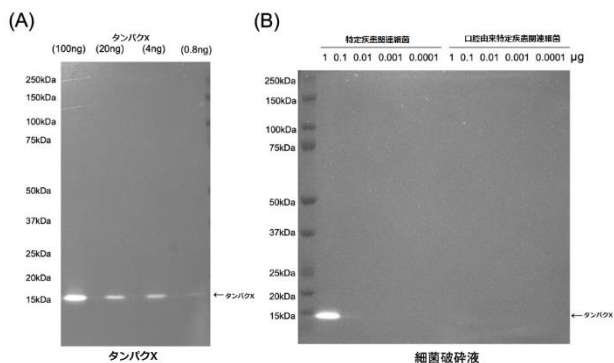


図 4 抗タンパク X 抗体によるウェスタンブロットによるタンパク X の検出 (A)タンパク X 組み換えタンパク質の検出限界の検討 (B)特定疾患関連細菌破砕溶液からのタンパク X の検出結果

3. 考察及び今後の展望

本年度の研究成果より特定疾患関連細菌に発現するタンパク X に対する抗体の構築並びにその機能解析が完了した。そこで今後は抗体や PCR を組み合わせたタンパク X 検出による新規特定疾患診断法の構築を実施する。具体的には、ELISA やウェスタンブロットを用いた便懸濁液からのタンパク X の検出法の開発および PCR による口腔内特定疾患関連細菌と非口腔内特定疾患関連細菌の

判別法の開発を行い、研究成果の知財化を行う。また有用性が高い抗体を産生する 2 つのハイブリドーマについては抗体可変領域配列解析および腹水化による抗体の取得を行う。本年度に引き続き、特定疾患患者便検体から抗体の機能評価に使用するための特定疾患関連細菌の単離および安定培養法を確立する。

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、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】

- 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).
- 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).
- 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).
- 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 faecal 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・培養法の確立及び腸内細菌の特性の解明

「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、38 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（参考文献 1）。腸内細菌同士は共生したり、生存競争をしながら一定のバランスを保っている。腸内細菌の集団は腸内細菌叢と呼ばれ、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、成人になるにつれ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 2）。

(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。我々は呼吸や飲食を通じ、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きた外来抗原が体内に侵入するのを防ぐのみならず、腸管内へ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はなく、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 3）。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 4、5）。また、ビフィズス菌により産生される酢酸が腸管バリア機能を強固にし、腸管感染症を予防することや、酢酸により誘導される免疫グロブリン A (IgA) が病原性片利共生細菌に結合することで、大腸表面の粘液層への侵入を防ぐことも明らかとなっている（参考文献 6、7）

一方、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消化器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 8）。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適切な状態に保つことは病気を防ぎ、健康維持に重要となる。

(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変化については多く知見が得られている。また、前述し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. 腸内細菌の特性の解明ならびに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ことが期待されている。

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、有用性の高い腸内細菌の特性の解明ならびに新たな腸内細菌培養方法の検討を実施した。

(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溶液を血液寒天培地に播種し、嫌気環境下においてコロニーを形成させた。24-48 時間後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、液体 GAM 培地に植菌、PCR により標的細菌であるかどうか検討した。選択された標的細菌コロニーを再度、血液寒天培地、液体 GAM 培地にて嫌気環境下で培養した。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 1 種類、計 5 菌株のグラム陰性菌の単離・培養に成功した(図 1、B)。

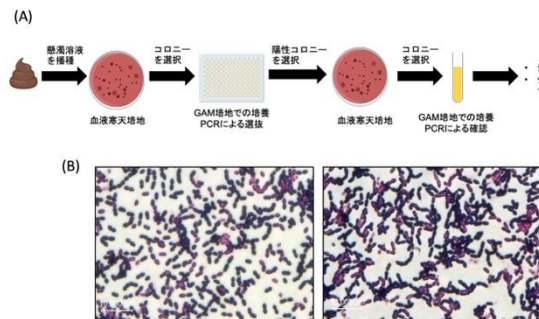


図 1 本年度ヒト便試料より単離した疾患との関連が示唆される腸内細菌の単離方法(A)とグラム染色画像(B)

(2) 腸内細菌の特性の解明

本グループにおいて、これまでにヒト由来腸内細菌 A (以下細菌 A) に対する細菌特異的抗体を作製し、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。昨年度までに、細菌 A は同腸内細菌基準株(以下基準株)と異なる表層構造を持つことを明らかにした。そこで本年度は、細菌 A の特性の解明ならびに宿主への影響についての解析を実施した。

はじめに宿主へ与える影響を評価するために無菌マウス、単独腸内細菌定着マウスの構築を行なった。無菌マウスに細菌 A 及び基準株を投与して定着させ 4 週間維持した後、腸管組織、血液、盲腸内容物ならびに便を採取した。便中の IgA を測定したところ、細菌 A と基準株を定着させた単独腸内細菌定着マウスにおいて有意な差はなかった。

次に宿主への影響の評価の一つとして、腸管への定着について検討するために、細菌 A と基準株の競合試験を実施した。競合試験では共投与したどちらの腸内細菌が定着したかを判断する必要がある。これまでに構築した腸内細菌特異的抗体を用い検討することも可能ではあったが、菌数測定にて正確に定量するために細菌 A と基準株のゲノム情報を比較し、それぞれに特徴的な配列部分を見出すことで、それぞれの腸内細菌を検出可能な特異的プライマー

を設計した。それぞれの細菌から DNA を抽出し、作成したプライマーにて PCR を行なった。その結果、設計したプライマーはそれぞれ標的となる腸内細菌を判別するために使用できることが明らかとなった(図 2)。

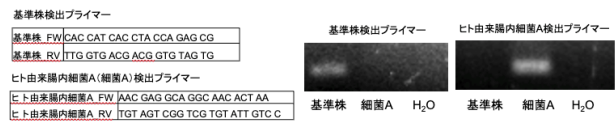


図 2 競合定着試験に向けた腸内細菌検出用プライマーの検討

次に、細菌 A と基準株を無菌マウスに共投与し、腸管内での定着を比較した(図 3、A)。作成した菌特異的プライマーを用いて定量 PCR を行なったところ、細菌 A はマウスの腸内において基準株よりも優勢になることが明らかとなった(図 3、B)。

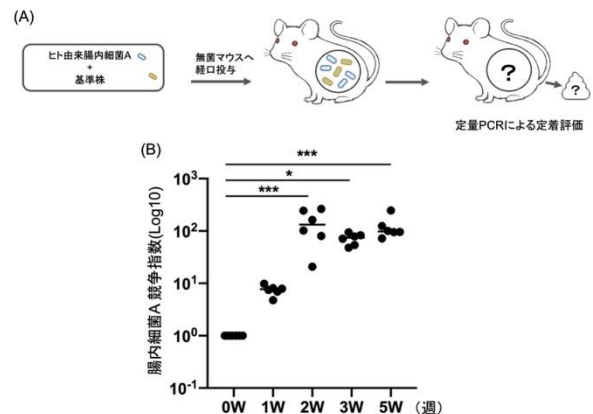


図 3 競合試験による腸内定着の評価

(A) 競合定着試験の概要(B) 腸内細菌 A と基準株の競合定着試験の結果。log10 競合指数(腸内細菌 A DNA 量÷基準株 DNA 量)を示す。* $p < 0.05$ *** $p < 0.001$ 。

(3) 新たな腸内細菌培養方法の検討

腸内細菌は宿主の消化管内の限られた生存領域を確保しており、宿主由来の代謝物質の利用も消化管内への定着に重要な役割を果たしていることが示唆され、宿主—微生物共生系を検討することは腸内細菌の特性を理解する上で重要となる。そこで本年度はこれまで培ってきた腸内細菌培養技術と腸管上皮培養細胞を組み合わせることで、宿主—微生物共生系の検討を実施した。細胞培養用のトランズウェル上に腸管上皮細胞培養株を播種し 3-4 週間ほど細胞培養用培地にて培養を行い、極性を形成させた。次に図 4A に示すように、トランズウェル下部には細胞培養用培地、上部には細菌培養用培地ならびに腸内細菌を添加し、嫌気環境下で 48-72 時間、37℃にて共培養を行った。共培養後にトランズウェル内培地を回収し、グラム染色を行った。いくつかの腸内細菌について本培養方法を用いて共培養したところ、共培養あり、なしにおいて腸内細菌の形状に変化はなかったが、興味深いことに一部の細菌は腸管上皮細胞培養株と共培養すると形状が変化することが明らかとなった(図 4B)。

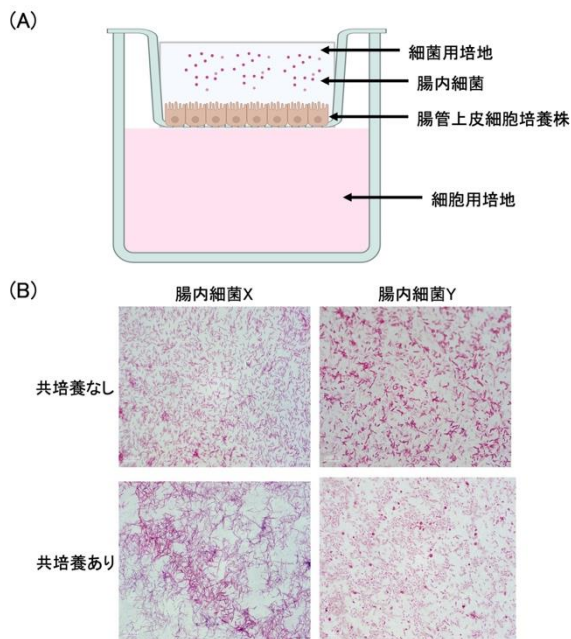


図4 腸内細菌と腸管上皮細胞培養株の共培養の検討

(A) 共培養の概略図、Biorenderを用いて作成 (B) 共培養後の腸内細菌のグラム染色画像、腸内細菌 X および Y は共培養後に細菌の形状が変化した。

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腸内細菌を単離し、安定培養することができた。本年度分離された疾患関連細菌は理化学研究所バイオリソース研究センターに寄託されている基準株と特性を比較したところ細菌の構造の一部に違いがあることが示唆された。そこで今後は全ゲノム解析を実施することで、本細菌の特性を明らかにする。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。

昨年度、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本来細胞内に存在する酵素 X を表層に発現し、それを細胞外へと放出することを見出した。本酵素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、細菌の接着にも関与する報告もあった。そこで、本年度は細菌 A が宿主へ与える影響を評価した。細菌 A もしくは基準株単独腸内細菌定着マウス解析では宿主側で大きな変化は認められなかった。一方で、無菌マウスを用いた細菌 A と基準株の競合試験では細菌 A が腸内への定着に優位性を持つことを明らかにした。本年度の解析からは酵素 X の発現箇所の差異が腸内への定着に直接寄与しているかどうかまでは明らかにできなかったが、今後は酵素 X 欠損細菌 A 株を作製することで腸内への定着に酵素 X が関連するかどうか検討する。

新たな腸内細菌培養方法の検討では、腸内細菌培養技術と腸管上皮培養細胞株を組み合わせることで、宿主—微生物

共生系の検討を実施し、いくつかの腸内細菌は共培養することで細菌の形状が変化することを見出した。本結果は腸管上皮細胞培養株から供給される栄養素、腸内細菌自体の増殖効率や環境が変化することにより生じていることが示唆された。腸管上皮細胞培養株と腸内細菌の共培養は腸内細菌の単独培地培養と比較すると、より宿主—微生物共生系に近い状態となっている可能性もあり、腸内細菌が実際に腸管に定着している状況を捉えられる可能性もある。これらのことから本培養方法は今後、腸内細菌の特性を知る上での重要な研究手法の一つになることが期待される。

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研究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、JST 戦略的創造研究推進事業、一般財団法人糧食研究会の支援を受け実施しました。

【参考文献】

- Sender, R., Fuchs, S. & Milo, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol* 14, e1002533 (2016).
- Odumaki, 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).
- 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).
- [†]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).
- 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).

6 Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J., Topping, D., Suzuki, T., Taylor, T., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., Ohno, H. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469, 543-547 (2011).

7 Takeuchi, T. Miyaichi, E., Kaynaya, T., Kato, T., Nakanishi, Y., Watanabe, T., Kitami, T., Taida, T., Sasaki T., Negishi, H., Shimamoto, S., Matsuyama, A., Kimura, I., Williams, I., Ohara, O., Ohno, H. Acetate differentially regulates IgA reactivity to commensal bacteria. *Nature* 595, 560-564 (2021).

8 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).

業績

【原著論文】

(投稿掲載)

1. Lin YH, Tahara-Hanaoka S, Obana N, Fukuda S, Shibuya A. An inhibitory immunoreceptor Allergin-1 regulates the intestinal dysbiosis and barrier function in mice. *Int Immunol*. 2024 in press.
2. Song I, Yang J, Saito M, Hartanto T, Nakayama Y, Ichinohe T, Fukuda S*. Prebiotic inulin ameliorates SARS-CoV-2 infection in hamsters by modulating the gut microbiome. *npj Sci. Food*. 8: 18, 2024.
3. Yamauchi Y, Masutomi H, Ishihara K, Hartanto T, Lee CG, Fukuda S*. The differential effect of two cereal foods on gut environment: a randomized, controlled, double-blind, parallel-group study. *Front. Nutr*. 10: 1254712, 2024.
4. Matsuzaki J, Kurokawa S, Iwamoto C, Miyaho K, Takamiya A, Ishii C, Hirayama A, Sanada K, Fukuda S, Mimura M, Kishimoto T, Saito Y. Intestinal metabolites predict treatment resistance of patients with depression and anxiety. *Gut Pathog*. 16: 8, 2024.
5. Tsukimi T, Obana N, Shigemori S, Arakawa K, Miyauchi E, Yang J, Song I, Ashino Y, Wakayama M, Soga T, Tomita M, Ohno H, Mori H, Fukuda S*. Genetic mutation in *Escherichia coli* genome during adaptation to the murine intestine is optimized for the host diet. *mSystems*. 20;9(2): e0112323, 2024.
6. Tanaka A, Sanada K, Miyaho K, Tachibana T, Kurokawa S, Ishii C, Noda Y, Nakajima S, Fukuda S, Mimura M, Kishimoto T, Iwanami A. The relationship between sleep, gut microbiota, and metabolome in patients with depression and anxiety: A secondary analysis of the observational study. *PLoS One* 18: e0296047, 2023.
7. Kawamata T, Wakimoto A, Nishikawa T, Ikezawa M, Hamada M, Inoue Y, Kulathunga K, Salim FN, Kanai M, Nishino T, Gentleman K, Liu C, Mathis BJ, Obana N, Fukuda S, Takahashi S, Taya Y, Sakai S, Hiramatsu Y. Natto consumption suppresses atherosclerotic plaque progression in LDL receptor-deficient mice transplanted with iRFP-expressing hematopoietic cells. *Sci. Rep*. 13: 22469, 2023.
8. Nishimoto Y, Salim F, Yamauchi Y, Mori Y, Murakami S, Suzuki A, Fukuda S, Yamada T. Kale improves bowel movements in constipated women and affects some intestinal microbes and metabolites: a pilot study. *Front. Nutr*. 10: 1247683, 2023.
9. Fujita H, Ushio M, Suzuki K, Abe MS, Yamamichi M, Okazaki Y, Canarini A, Hayashi I, Fukushima K, Fukuda S, Kiers ET, Toju H. Metagenomic analysis of ecological niche overlap and community collapse in microbiome dynamics. *Front. Microbiol*. 14: 1261137., 2023.
10. Oshibuchi K, Yang J, Obana N, Fukuda S, Arakawa K. Complete genome sequence of *Solobacterium moorei* JCM 10645T isolated from a human stool sample. *Microbiol. Resour. Announc*. e0096523, 2023.
11. Nishimoto Y, Salim F, Yama K, Kumagai K, Jo R, Harada M, Maruyama Y, Aita Y, Fujii N, Inokuchi T, Kawamata R, Sako M, Ichiba Y, Tsutsumi K, Kimura M, Mori Y, Murakami S, Kakizawa Y, Kumagai T, Fukuda S*. Integrated analysis of the oral and intestinal microbiome and metabolome of elderly people with more than 26 original teeth: a pilot study. *Front. Microbiol*. 14: 1233460, 2023.
12. Wang Y, Morishima T, Sezaki M, Sato R, Nakato G, Fukuda S, Kobiyama K, Ishii KJ, Li Y, Takizawa H. *Akkermansia muciniphila* induces slow extramedullary hematopoiesis via cooperative IL-1R/TLR signals. *EMBO Rep*. 2023 Oct 23:e57485. doi: 10.15252/embr.202357485. Epub ahead of print. PMID: 37870318.
13. Zhu X, Sakamoto S, Ishii C, Smith MD, Ito K, Obayashi M, Unger L, Hasegawa Y, Kurokawa S, Kishimoto T, Li H, Hatano S, Wang TH, Yoshikai Y, Kano SI, Fukuda S, Sanada K, Calabresi PA, Kamiya A. Dectin-1 signaling

- on colonic $\gamma\delta$ T cells promotes psychosocial stress responses. *Nat Immunol.* 2023 Apr;24(4):625-636.
14. Kawamoto S, Uemura K, Hori N, Takayasu L, Konishi Y, Katoh K, Matsumoto T, Suzuki M, Sakai Y, Matsudaira T, Adachi T, Ohtani N, Standley DM, Suda W, Fukuda S, Hara E.
Bacterial induction of B cell senescence promotes age-related changes in the gut microbiota. *Nat Cell Biol.* 2023 Jun;25(6):865-876.
 15. 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.
 16. Fujita H, Ushio M, Suzuki K, Abe MS, Yamamichi M, Okazaki Y, Canarini A, Hayashi I, Fukushima K, Fukuda S, Kiers ET, Toju H.
Facilitative interaction networks in experimental microbial community dynamics. *Front Microbiol.* 2023 Apr 11;14:1153952.
 17. Fujita H, Ushio M, Suzuki K, Abe MS, Yamamichi M, Iwayama K, Canarini A, Hayashi I, Fukushima K, Fukuda S, Kiers ET, Toju H.
Alternative stable states, nonlinear behavior, and predictability of microbiome dynamics. *Microbiome.* 2023 Mar 29;11(1):63.
 18. Nagai M, Moriyama M, Ishii C, Mori H, Watanabe H, Nakahara T, Yamada T, Ishikawa D, Ishikawa T, Hirayama A, Kimura I, Nagahara A, Naito T*, Fukuda S*, Ichinohe T*. High body temperature increases gut microbiota-dependent host resistance to influenza A virus and SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun.* 2023 Jun 30;14(1):3863.
 19. 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.* 2023 Jun;26(2):323-330.
 20. Tanaka K, Tanigawa N, Song I, Komatsu T, Kuriki Y, Tanaka Y, Fukudo S, Urano Y, Fukuda S*. A protease activity-based machine-learning approach as a complementary tool for conventional diagnosis of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Front Microbiol.* 2023 Jul 7;14:1179534.
 21. 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.
 22. Tanaka Y, Yamashita R, Kawashima J, Mori H, Kurokawa K, Fukuda S, Gotoh Y, Nakamura K, Hayashi T, Kasahara Y, Sato Y, Fukuda S. Further notice of omics profiles of fecal and oral microbiota change in irritable bowel syndrome patients with diarrhea and symptom exacerbation. *J Gastroenterol.* 2023 Apr;58(4):427-428.
 23. Yama K, Nishimoto Y, Kumagai K, Jo R, Harada M, Maruyama Y, Aita Y, Fujii N, Inokuchi T, Kawamata R, Sako M, Ichiba Y, Tsutsumi K, Kimura M, Murakami S, Kakizawa Y, Kumagai T, Yamada T, Fukuda S*.
Dysbiosis of oral microbiome persists after dental treatment-induced remission of periodontal disease and dental caries. *mSystems.* 2023 Sep 12:e0068323
 24. Nishimoto Y, Kawai J, Mori K, Hartanto T, Komatsu K, Kudo T, Fukuda S*. Dietary supplement of mushrooms promotes SCFA production and moderately associates with IgA production: A pilot clinical study. *Front Nutr.* 2023 Jan 9;9:1078060.

【口頭発表】

1. 福田真嗣 腸内細菌を医薬品に：腸内環境層別化による新たな医療・創薬・ヘルスケア、日本薬学会第 144 回年会、パシフィコ横浜（神奈川）、2024 年 3 月 29 日
2. 福田真嗣 食がもたらす腸内細菌叢の多重安定性とその機能、第 71 回日本生態学会大会、横浜国立大学（神奈川）、2024 年 3 月 19 日
3. Nakato G, Inoue H, Onawa S, Agematsu H, Obana N, Furukawa R, Inoue J and Fukuda S. Development of

- bacteria-specific antibody for isolation of target bacteria and functional analysis of antibody-targeted bacterial molecules. 日本農芸化学会 2024 年度東京大会、東京農業大学 世田谷キャンパス(東京) 2024 年 3 月 26 日
4. 福田真嗣 マウス腸内適応時の大腸菌遺伝子変異と食事との関連、第 46 回日本分子生物学会年会、オンライン開催、2023 年 11 月 29 日
 5. 福田真嗣 腸内環境に基づく層別化医療・創薬・ヘルスケア産業の創出、第 10 回 JCR ベーシックリサーチカンファレンス、富士ソフトアキバプラザ(東京)、2023 年 11 月 25 日
 6. 福田真嗣 腸内環境層別化による新たな医療・ヘルスケア、第 63 回日本臨床化学会年次学術集会、御茶ノ水ソラシティーカンファレンスセンター(東京)、2023 年 10 月 28 日
 7. 福田真嗣 腸内環境層別化による新たな医療・ヘルスケア、第 25 回日本神経消化器病学会、京王プラザホテル(東京)、2023 年 9 月 29 日
 8. 楊佳約、尾花望、中藤学、野村暢彦、福田真嗣 腸管粘膜関連細菌が宿主健康に与える教訓、日本遺伝学会 第 95 回大会 くまもと県民交流館パレア(熊本)、2023 年 9 月 7 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、第 64 回日本心身医学会総会ならびに学術講演会、パシフィコ横浜(神奈川)、2023 年 7 月 1 日
 10. Yang J, Obana N, Nakato G, Nomura N, Tomita M and Fukuda S. An intestinal mucosa-associated bacterium which modulates host health. Gordon Research Seminar on Animal-Microbe Symbioses, Renaissance Tuscany II Ciocco, Lucca, Italy, June 17-18th, 2023.
 11. Shinji Fukuda Bacteroides uniformis: A dominant bacterial species in the human gut enhances endurance exercise performance. Gordon Research Conference on Animal-Microbe Symbioses, Renaissance Tuscany II Ciocco, Lucca, Italy, June 18-23th, 2023.
 12. Shinji Fukuda Genetic mutation in Escherichia coli genome during adaptation to the murine intestine is optimized for the host diet, Wolbachia Conference 2023, Orthodox Academy of Creta, Creta, Greece, June 11-16th, 2023.
 13. 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、日本化学会第 103 春季年会、東京理科大学野田キャンパス(千葉)、ハイブリット開催、2023 年 3 月 25 日
- 【ポスター発表】**
1. 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 46 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド(兵庫)、2023 年 12 月 8 日
 2. Nakato G, Inoue H, Onawa S, Furukawa R, Tanaka K, Inoue J and Fukuda S. Development of bacteria-specific antibody for isolation of target bacteria and functional analysis of antibody-targeted bacterial molecules. Gordon Research Conference on Animal-Microbe Symbioses, Renaissance Tuscany II Ciocco, Lucca, Italy, June 18-23th, 2023.
 3. Yang J, Obana N, Nakato G, Nomura N, Tomita M and Fukuda S. An intestinal mucosa-associated bacterium which modulates host health. Gordon Research Conference on Animal-Microbe Symbioses, Renaissance Tuscany II Ciocco, Lucca, Italy, June 18-23th, 2023.
- 【特許】**
- (1)国内特許出願 1 件
 - (2)国際特許出願 なし