

2.3.3 マイクロバイオーム

(1) 研究開発領域の定義

土壌、海洋、大気、動植物の体内や体表など、あらゆる環境中に存在する微生物叢（マイクロバイオータ）と、それが持つ遺伝子や機能（マイクロバイオーム）を解析することで、生命の理解の深化や、新たな概念に基づく健康維持や疾患の予防、治療技術の開発、農産物生産技術や物質生産技術の創出が期待される研究開発領域。

ヒトを宿主とした常在微生物叢は全身の体表面に存在するが、特に研究が進んでいるのが、腸内フローラと呼ばれる腸内の微生物叢である。微生物叢のバランスの破綻がいかなる疾患・健康被害をもたらすかを理解することで、健康維持や疾患治療への応用を目指すほか、常在微生物叢に含まれる有用微生物の可能性の探索や、プロバイオティクスや機能性食品の利用可能性の拡大を目指す。また、常在微生物叢の差異に着目することで、より精緻な疾患のサブグループ化、さらには医薬品や食品の有効性を見極める個別化医療や、個別化もしくは層別化栄養の実現も期待できる。

植物を宿主とする微生物叢の研究も活発化してきている。主に葉や根などの植物組織における常在微生物叢プロファイルの解析や、それを制御する環境要因や宿主側遺伝子基盤の探索、および、常在微生物叢による植物の成長や生存における潜在的な役割とその基盤を解明しようとする基礎研究が進む。さらには、得られた基礎的知見を活用した微生物の農業利用など、応用にも直結した研究開発領域である。

(2) キーワード

微生物叢、マイクロバイオーム (microbiome)、マイクロバイオータ (microbiota)、常在菌、腸内フローラ、感染症、免疫、食事、肥満、プロバイオティクス、メタゲノム、メタボローム、個別化医療、個別化栄養、ワクチン、ファージ、機能性食品、病原菌、共生菌、植物免疫、植物栄養応答、植物成長促進、植物保護、シロイヌナズナ、16S・ITSメタ解析、微生物カタログ情報、無菌化

(3) 研究開発領域の概要

[本領域の意義]

腸内フローラは、ヒトでは通常約1,000種類の細菌種が含まれ、食餌成分の代謝を介した有用代謝物質の産生、有害代謝物質の解毒、病原体に対する生物学的防御バリア、腸管の分化誘導など、宿主の生理や健康維持に非常に大きな役割を果たしている。宿主は、腸内フローラの働きに大きく依存する形で進化してきたと考えられ、ノーベル賞受賞者であるLederbergは、宿主と腸内フローラは1つの超有機体(superorganism)であると提唱している¹⁾。腸内フローラの研究の加速により、生命の理解は大きく深化し、同時に健常状態の維持（栄養を通じた腸内フローラ改善や腸内フローラに応じた適切な栄養供給など）、革新的な医療技術の創出（有用菌群あるいは抽出分子の製剤化、腸内フローラ機能に対応した薬物代謝・動態制御）など、社会にもたらすインパクトも極めて大きい研究開発領域であると言える。

わが国の社会動向の観点からも腸内フローラの研究の重要性は高い。潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患、多発性硬化症、肥満、糖尿病、脂質異常症（高脂血症）、喘息、アトピー性皮膚炎はすべて患者数が増加している。特に、潰瘍性大腸炎、クローン病、多発性硬化症は、厚生労働省により難病指定されており医療費助成の対象であるが、今後このまま患者数が増加すれば、助成基準の厳密化や難病指定からの除外を考慮せざるを得ない状況も考えられ、社会問題となっている。これまでに、これらの疾患の原因解明のために宿主のゲノムワイド関連解析（Genome Wide Association Study: GWAS）が盛んに行われ、疾患に関連する多数のSNPsが明らかになっている。しかし、このような罹患者数の漸増が、遺伝的要因が増加したためとは考えにくく、外的要因、特に腸内フローラの変化の関与が強く疑われている。実際、海外の大規模メタゲノム解析によって、上記のいずれの疾患にも、構成菌種の「多様性の減少・単純化」「特定の細

菌の定着・増加」「菌叢構成の不安定」などを特徴とする dysbiosis (ディスバイオーシス) が見られることが報告されている。腸内フローラは、食生活の影響を大きく受けることが知られていることから、近年の生活習慣や食生活の変化によって日本人の腸内フローラが大きく変化し、疾患感受性に影響を与えている可能性が示唆されている。すなわち、わが国の疾患動態の変遷のカギを握るのが腸内フローラであるとも言え、その解析と解決策の提示は高い社会ニーズを有すると言える。

また、食料問題や環境問題が地球規模で解決すべき喫緊の課題となっており、持続可能な農業のための基盤技術開発と社会実装が求められている。農作物、資源作物、および樹木などの植物は、基本的に野外で栽培されるが、野外環境では無数の微生物が土壌中や空気中に存在しており、それらが植物と共棲している。根粒細菌や菌根菌など、植物と相互作用して有益な効果をもたらすことが知られていた代表的な共生菌については、基礎研究や社会実装が進んできた。しかしながら、近年開発された次世代シーケンサーにより存在が明らかになった、それら以外の膨大な微生物叢の機能および宿主側との相互作用については未解明の部分が多い。植物を宿主とした微生物叢のなかには、植物の生育促進や植物病原菌の生育抑制などの効果を示す細菌種の存在が知られており、微生物叢と植物との相互作用の研究から、化学肥料に依らない栄養供給・生育促進や、農薬に依らない病害防除などの技術開発への応用が期待されている。

【研究開発の動向】

腸内フローラの研究は、1950年代、培養法を基盤とした研究から本格的に始まった。腸内細菌の培養、特に嫌気性培養技術の発展には、わが国の細菌学者の大きな貢献があった。しかし、腸内細菌の多くは培養が困難な「難培養性菌」である。また、菌の単離培養に基づく生化学的性状による分類だけでは、腸内フローラ全体を俯瞰するには至らず、その解析には限界があった。これに対して1980年代に、PCR法などの分子生物学的手法を用いた、培養に依存しない研究手法が導入された。すべての細菌は16SリボソームRNA遺伝子(16S rRNA遺伝子)というタンパク質合成に関わる必須遺伝子を持つ。16S rRNA遺伝子には、ほとんどの細菌がもつ共通配列領域があり、この領域にプライマーを設計し、菌種によって多様な領域を挟む形でPCRを行い、増幅されたPCR産物の遺伝子配列をシーケンスすることで、どのような細菌がその環境に存在していたかがわかる。これをクローンライブラリー法と呼ぶ。第3の方法として1998年頃から提唱されたのが「メタゲノム解析」である。メタゲノムとはサンプル中の全細菌集団からそのDNAプールを抽出・純化し、細菌叢に含まれるすべての細菌のゲノム塩基配列を直接読むものである。特に、上述した16S rRNA遺伝子のPCR増幅産物を網羅的に解析する手法は「16S rRNA遺伝子解析(16S解析)」と呼ばれ、今日最もよく用いられる細菌叢解析法である。しかし、当時のシーケンサーではあまりにも時間と費用を要したため、腸内フローラの細菌種の構成、個人差、年齢差、具体的な遺伝子数とその機能、などの基本的な疑問に答えることも困難であった。その後、次世代シーケンサーが相次いで開発され、シーケンシングコストの低下、ロングリード解析技術の向上、解析スピードの圧倒的な向上などにより、メタゲノム解析研究は急速な広がりを見せた。

腸内フローラの構成や機能理解のため、2008年から米国で開始されたヒトマイクロバイームプロジェクト(HMP)と、欧州中心のMetagenomics of Human Intestinal Tract(MetaHIT)プロジェクトは、特筆すべき成果をあげた。これらのプロジェクトでは、ヒト腸内フローラから細菌DNAを抽出し、腸内フローラに含まれるすべての細菌のゲノム塩基配列を次世代シーケンサーで直接解読する、いわゆる「ショットガンメタゲノム解析」が行われた。その結果、腸内フローラが保有する遺伝子数は、全体で数十万~数百万種類と、ヒトゲノムの約2万種類を遥かに超えることが明らかとなり、予想を大きく上回る多彩な機能をもつことが想定された。

腸内フローラは一つの「臓器」として働いており、その不全は、様々な慢性疾患の原因・増悪因子となることがわかってきた。実際、メタゲノム解析から、腸内フローラの異常(腸内細菌の構成異常)が、慢性炎症性腸疾患(IBD)、慢性関節リウマチ、喘息、2型糖尿病、肥満、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)、

移植片対宿主病、肝硬変、自閉症など様々な全身性疾患において観察されている。また、ワシントン大学の Gordon らが、肥満のヒトの便を無菌マウスに投与し、肥満が腸内フローラによって伝搬することを報告している²⁾など、dysbiosisと呼ばれる腸内フローラの異常が、疾患と単に相関するだけではなく原因となることも明らかにされてきた。それに対し、健常者の糞便投与（便移植）が、dysbiosisを起こしたフローラを改善し、難治性偽膜性腸炎が極めて効果的に改善・治癒したという無作為抽出試験が発表された³⁾。この便移植の有効性は、「dysbiosisがある種の疾患の原因となる」ことを示すと同時に、「腸内フローラは操作可能である」と明確に示した proof of principle と言える。さらに最近では、疾患だけでなく、様々な身体機能にも腸内フローラが影響を与えることが判明している。例えば、マラソン選手を対象にした研究から、マラソン後に増加する菌として *Veillonella* 属が同定され、さらに動物モデルを用いた検証から、運動中に筋肉から産生された乳酸の一部が腸管内に流れ込み、*Veillonella* 属菌が乳酸からプロピオン酸を産生し、その後、門脈から再吸収されたプロピオン酸が運動パフォーマンスの向上につながることを示唆された⁴⁾。国内の研究例でも、日本人長距離ランナーの腸内に *Bacteroides uniformis* が多く存在し、走行タイムと関連があることが明らかとなった。動物モデルを用いた実験から、*B. uniformis* は腸内での短鎖脂肪酸産生を介して肝臓での内因性グルコース産生を促進することにより、持久運動パフォーマンスの向上に寄与する可能性が示唆された。さらに、*B. uniformis* が好む基質である α -シクロデキストリンを摂取することで、マウスとヒトの持久運動パフォーマンスが向上することも報告されている⁵⁾。このように、動物モデルを併用することで、各身体機能における腸内細菌の役割とメカニズムが徐々に解明されつつある。

腸内フローラは食事に大きな影響を受けることが明らかになっている。例えば、高脂肪食や低繊維食、単一の食事は容易に腸内フローラを変化させ、多様性を減少させる。また、アフリカ原住民と欧州の子どもでは、食事の違い（食物繊維の摂取量の違い）によって腸内フローラに大きな違いが見られ⁶⁾、それによってアレルギーなどに対する感受性の違いが示唆されている。バングラデシュやアフリカにおける飢餓・低栄養も、腸内フローラを大きく変化させ、この場合も腸管バリア機能を低下させ、感染症リスクが非常に高くなることが報告されている⁷⁾。正しい食事・食料支援は、単に栄養問題を解決するだけではなく、腸内フローラの正常化に繋がり、様々な意味で良い影響を与えることが再認識され、社会的・公衆衛生的にも非常に重要である。また、Irish Travellers と呼ばれる一般社会から離れてキャンプ生活を送るアイルランドの人々を対象とした研究からも、生活様式の変化が腸内フローラに影響を与えることが示されている⁸⁾。日本国内においても、古来の生活様式が変化する中、日本の地域特性を踏まえた統合的な研究が進むことで、今後、どのような食品・食生活が腸内フローラの機能を向上させ、健康・長寿・疾患治癒に役立つのか、徐々に解き明かされていくものと考えられる。

近年、腸内フローラと健康への関心が世界的に高まる中で、プロバイオティクス市場は拡大を続けている。現在の最も一般的なプロバイオティクスの定義は、「適正な量を摂取することにより宿主に有用な作用を発揮する生きて微生物」である^{9,10)}。「有用な作用」としては、整腸作用（便秘や下痢の軽減など）、感染症、アレルギー、自己免疫疾患、ストレス軽減や睡眠の質の改善、あるいは様々な生活習慣病の予防や症状の軽減が期待されている。プロバイオティクスは主にこれを含有する食品やサプリメントとして広く世界の一般生活者に普及してきた。多岐にわたるプロバイオティクスの作用やその作用メカニズムの多くは、製品に用いられる菌株特異的に示されており科学的証拠のレベルも異なるため、プロバイオティクスの有用性に関する統一的な見解を得ることは困難である。将来的に同様の作用メカニズムを有する複数のプロバイオティクス菌株のカテゴリー化も予想されるが、これを達成するための課題は多い¹⁰⁾。

腸内フローラは、腸管局所だけでなく全身臓器に影響を与えている。例えば、遠隔臓器におけるアレルギーや自己免疫疾患に対する感受性を変えることが知られている。喘息、アトピー性皮膚炎、関節リウマチ、多発性硬化症、2型糖尿病などにおける dysbiosis が報告されている¹¹⁾ ほか、乳幼児期の抗生物質の使用や食事が、成人してからの腸内フローラにも影響することで、免疫疾患に対する感受性を決定することが示唆されている¹²⁾。免疫系以外にも、脂質代謝や耐糖能制御、精神・脳機能など、宿主の生理活動や健康維持におい

て広く影響を与えていることが明らかになっており、例えば、自閉症と腸内フローラのバランス異常との関係が報告されている¹³⁾。このような腸内フローラの全身への影響は、多くの場合、腸内フローラが生み出す代謝物質が重要な働きをしている。腸内フローラによって生み出される生理活性を持つ代謝物質を明らかにする目的で、次世代シーケンサーによるメタゲノム解析と、質量分析によるメタボローム解析を組み合わせた、いわゆる統合オミクスアプローチによる腸内フローラ由来代謝物質の網羅的解析が行われている。例えば、腸内フローラの *dysbiosis* は、腸以外の発がんにも影響を与えることが知られているが、大阪大学の原は、高脂肪食とそれに伴う肥満が腸内フローラを変化させ、二次胆汁酸の一つであるデオキシコール酸の産生能の高い細菌種の増殖を促し、産生されたデオキシコール酸が肝臓における発がんを促進することを報告している¹⁴⁾。また京都大学の小川や木村は、食用油に含まれるリノール酸の代謝物である 13-hydroxy-9 (Z), 15 (Z) -octadecadienoic acid が腸内細菌依存的に産生され、上皮細胞に発現する GPR40 を介して腸管バリアを増強し、炎症性腸疾患を改善することを示している。同じく小川らは、医薬健栄研の國澤と共同で、健康効果が知られているオメガ3脂肪酸の一つである α リノレン酸の微生物代謝物として α KetoA を同定し、PPAR γ を介したマクロファージの活性化抑制を介してアレルギー性皮膚炎や糖尿病症状を改善することをマウスモデルで示している¹⁵⁾。重要な点として、基質となるリノール酸や α リノレン酸は必須脂肪酸であることから、その量は食事に依存しており、いくら代謝活性を持つ腸内細菌が存在しても本代謝物質の生産量は食事の内容により異なる。逆にいくらリノール酸や α リノレン酸を摂取しても、代謝できる腸内細菌が存在しなければ、この代謝物質は産生されない。実際に、人の便を用いた解析から、 α リノレン酸から α KetoA の産生には100倍以上の個人差があることが示されている¹⁵⁾。現在、メタボローム解析に用いる分析機器の高性能化と優れたパイプラインによって、腸内フローラから産生される代謝物質カタログが増えつつあるが、今後はここに、腸内フローラ由来の情報だけでなく、代謝物質の基質となる食品の情報や酵素活性の情報も付与することで、「食品-腸内フローラ間代謝による代謝物質の産生」を連動させた情報収集が必要になっていくと考えられる。

疾患と関連する腸内フローラ研究から、構成菌種の変化と同時に、特に相関して変動する菌種と遺伝子が明らかになっている。炎症性腸疾患では、健常者と比べて著しく多様性が減少する特徴があり、*Faecalibacterium prausnitzii* など炎症抑制に関わる菌種¹⁶⁾ や *Coprococcus comes* など酪酸産生遺伝子を持つ菌種の減少が見られる。つまり、単一菌が原因となるのではなく、全体の菌叢構造異常が関与すると考えられている¹⁷⁾ ことから、今後は「菌-菌」間の相互作用の解析も重要と考えられる。2型糖尿病では、菌種の多様性の減少はそれほど顕著ではないが、菌叢全体の遺伝子において機能的な *dysbiosis* が起きることが知られている¹⁸⁾。肝硬変では、*Streptococcus* や *Veillonella* など、通常口腔に定着する細菌種が腸管内で増加しており、膜輸送系の遺伝子やアンモニア産生に関わる遺伝子の増加が見られる¹⁹⁾。慢性関節リウマチでは、*Prevotella copri* の増加が観察されている²⁰⁾。このように疾患と連動して増減する細菌種や遺伝子は疾患バイオマーカーとなるため、その同定と応用に関する研究がアカデミアや企業で精力的に進められている。また、疾患と関連する腸内フローラ研究は、コホートのサイズが大きいほど正確になるため、今後、ますます大規模化していくものと考えられる。

宿主に対して特定の機能を有するヒト常在菌種を探索し、疾患治療へと結びつけようとする研究も見られる。例えば、腸管粘膜に局在する制御性T細胞の分化誘導を促進するクロストリジウム菌群²¹⁾ や、腸管出血性大腸菌 O157 に由来する志賀毒素の上皮障害作用を抑制するビフィズス菌²²⁾、褐色脂肪組織の分岐鎖アミノ酸代謝を亢進する事で肥満を抑制するバクテロイデス菌²³⁾、代謝促進作用のあるオルニチンなどの産生や難消化性デンプンと同じ働きをするアミロペクチンを蓄積することで抗肥満、抗糖尿病活性を有するブラウティア菌²⁴⁾ など、宿主にとって有益と考えられる菌種が同定されている。一方で、大腸がん粘膜に特徴的に存在する *Fusobacterium nucleatum*²⁵⁾ や *Bacteroides fragilis*²⁶⁾ など、悪影響を及ぼす細菌種も同定されている。機能細菌の同定には、ノトバイオーム技術と嫌気性菌培養技術を組み合わせた解析システムが極めて有効である。すなわち、メタゲノム解析などデータ駆動型のトップダウン戦略に対して、個々の細菌種を単

離培養し、マウスへの投与によってその実験データを1つ1つ獲得するボトムアップ型の研究である。このように同定された機能細菌を制御することで、疾患の予防や改善につなげようとする試みも開始されている。例えば、大阪公立大の植松らは、ワクチンの概念を用い、肥満や糖尿病との関連が報告されている腸内常在細菌 (*Clostridium ramosum*) に対する免疫応答をワクチン接種により誘導したところ、ヒト肥満者の糞便を定着させたノトバイオマウスに高脂肪食を与えることで誘導される肥満や糖尿病症状が改善していた²⁷⁾。さらにはファージにより腸内細菌叢をコントロールする戦略の可能性も提唱されている。例えば、アルコール性肝炎の患者で増加している *Enterococcus faecalis* に特異的なファージを投与することで、アルコール摂取により腸内で増加した *E. faecalis* の比率が低下すると共に、肝炎症状が改善することが示されている²⁸⁾。このように、抗生物質に代わる、特異性の高い腸内細菌制御の可能性が見えてきている。

植物と微生物の相互作用の研究は、2010年頃までは、モデル植物のシロイヌナズナなどを用いて、病原菌に対する植物免疫応答 (Pattern-Triggered Immunity : PTI および Effector-Triggered Immunity : ETI) のメカニズム解明が行われていた。また、根粒細菌や菌根菌 (糸状菌) に代表される共生菌の研究により、共生樹立のための共生経路の情報や、植物の共生経路が両者で共有していることなどが明らかになっていった。しかしながら、これらの研究は、ごく一部の病原菌や共生菌を用いた植物と微生物の対一相互作用のモデル実験系により行われたものであった。

一方で、野外環境では無数の微生物が土壌中や空気中に存在しており、それらが植物と共棲している。これらの微生物群の中のごく一部に関してのみ、植物の成長を促進することや病原菌から植物を保護することが報告されていたが、モデル植物であるシロイヌナズナですら、微生物叢の研究は全く進んでいない状況であった。

2005年頃以降、次世代シーケンサーの登場・普及を契機に、細菌の保存領域である16Sや糸状菌のITSの配列を網羅的にシーケンスする、16S・ITSメタ解析という研究アプローチを取ることができるようになった。16S・ITSメタ解析を行うことで、特定の培地を用いた単離実験からは把握できなかった、微生物集団全体の構成情報の同定が可能になったのである。

このような流れの中で、2009年、植物免疫や植物-微生物相互作用分野の欧米の著名な研究者らが「Next-Generation Communication」と題して、モデル植物を用いた植物-微生物相互作用研究の重要性について *Science* 誌に投稿した²⁹⁾。その後、2012年に米国とドイツのグループがそれぞれ、シロイヌナズナの根に相互作用する細菌群の構成情報 (カタログ情報) を *Nature* 誌に報告した^{30, 31)}。この研究により、根の細菌叢の構成は土壌タイプに最も依存し、貢献度合いは低いものの植物の遺伝型にも依存することが示された。これは、植物の根が常に土壌と接することや、植物では微生物の垂直伝搬が起こりにくいことなども一致する結果であった。これまでも感覚的に、もしくは一部の微生物を用いた小規模な実験により示唆されていた知見を、細菌集団にスケールを広げ、かつ、再現性のある定量的なデータによって初めて証明したのである。一方で、発表当時はこの研究の重要性が十分には理解されなかった。多額の予算を投入したシーケンス解析を基に、これまでも言われてきた当たり前のことを、複雑なデータ解析や、見栄えはするが直には理解できない図表によって示しているという印象が持たれた。しかしながら、これらの論文発表後、モデル植物のシロイヌナズナだけに留まらず、イネなどの重要作物の根や葉における微生物構成情報が世界中から報告され始め^{32, 33)}、微生物カタログ情報の蓄積に伴い、植物を宿主としたマイクロバイオームの研究領域はますます拡大していった。

一方で、微生物カタログ情報だけでは、その微生物群が植物成長や生存においてどのような潜在的な機能をもつか明らかにすることは困難である。微生物カタログ情報からレアな微生物種を探すなど、生態学的な視点からは有意義な考察を加えられるかもしれないが、微生物叢の植物における潜在的な機能を解明するには、植物の成長などの指標と厳密にリンクした微生物カタログ情報が必要となる。そのようなデータがあれば、AIなどを用いた解析により植物-微生物相互作用の何らかの予想は可能にはなるかもしれない。しかし、現状

では、植物の指標と厳密にリンクした精密な微生物カタログ情報はほとんど存在せず、AIなどを活用できるデータ量に達していない。

植物-微生物相互作用の解明のためには、古典的ではあるが、個々の微生物を単離培養して植物に再接種し機能を解析する、ボトムアップ型の研究アプローチが重要となる。これまで、土壌中の微生物のうち99%以上が培養困難と言われていたが、植物、特にシロイヌナズナにおいては、次世代シーケンサー解析により検出できた半分以上の、かつ、植物に共生するメジャーな分類群の細菌群が単離できることが示された³⁴⁾。これにより、個々の代表的な細菌の解析が可能となった上に、系統的に網羅した細菌群を無菌環境下で植物と共培養することで、実験室内で微生物集団を人工的に再構成し、その人工集団 (Synthetic community: SynCom) の機能解析を行うことが可能となった。シロイヌナズナやイネを用いた研究から、植物ホルモンであるサリチル酸³⁵⁾、植物のリン欠乏応答因子³⁶⁾や植物の硝酸トランスポーター³⁷⁾が、細菌SynComの構成を規定する上で重要であることが報告されているほか、細菌SynComの機能として、根圏の糸状菌から植物を守ることや³⁸⁾、SynComが鉄欠乏条件下で植物成長を促すことなどが報告されている^{39, 40)}。

上述の研究の多くは、本研究領域を切り開いた欧米の研究グループや関係する研究者により実施されてきたものである。日本において、本研究領域で本質的に重要な発見をしていくためには、欧米の後追いではなく、日本独自の視点や強みをもって進めていく必要があると考えられる。例えば、上述のほとんどが細菌に関する研究であるが、糸状菌やその他の種類の微生物の研究はまだ進んでいない。糸状菌は、ゲノムサイズが細菌よりもはるかに大きく、菌糸を縦横無尽に伸ばすなど、研究者にとっては扱いづらい側面があるためと考えられる。腸内フローラは細菌がメジャーである一方、植物は、土壌等を介して多種多様な糸状菌と相互作用していることや、植物の病気の要因の7割以上が糸状菌であることなどから、糸状菌研究が進まない状況は好ましいとは言えない。貧栄養環境で生育するシロイヌナズナやアブラナ科植物と共生する糸状菌の中には、病原菌と近縁であるにもかかわらず、菌糸を介して植物にリンを供給し、菌根菌共生を失ったアブラナ科植物の成長を助けるユニークな糸状菌の研究例^{41, 42)}もあり、今後の研究の発展が望まれる。

(4) 注目動向

[新展開・技術トピックス]

・マイクロバイオーームに着目した治療・創薬

腸内フローラ改善としては、乳酸菌やビフィズス菌などのいわゆるプロバイオティクスが古くから用いられてきたが、プロバイオティクスとして用いられている細菌種は、「単独」投与ではdysbiosisの特徴である多様性の減少・単純化を補うには至らず、临床上の有効性が十分に確認されたものは少ない。こうした状況下で有望視されたのは、健康なヒトの便をそのまま投与する「便移植」である。*Clostridium difficile* (*C. difficile*) を病原とする反復性下痢症 (CDAD) に対する糞便微生物移植 (fecal microbiota transplantation: FMT) の顕著な有効性が報告³⁾されて以来、FMTは極めて短期間で世界中に広まった。2012年に、米国マサチューセッツ工科大学 (MIT) の研究者らは非営利組織OpenBiomeを設立し、簡便に、安く、安全に便移植を行える糞便バンク構築を目指すなど、現場での体制は整いつつある。日本国内においても、順天堂大学などがFMTの実用化に向けた研究を精力的に進めている。現在では、CDADにとどまらず、腸内フローラのdysbiosisが関与すると考えられる様々な慢性疾患に対しFMTの有効性が検証されている。dysbiosisの特徴が多様性の減少であるため、多様な菌が大量に含まれる便そのものを用いる便移植は、ある意味理にかなっているが、便に病原体が含まれる危険性もあり、長期的には別の疾患 (特に感染症) の発症を高めるかもしれないというリスクもある。このため、米国食品医薬局 (Food and Drug Administration: FDA) は、「便」は「New drug」と捉えるべきであり、便移植の実施には、新薬治験許可申請 (Investigational New Drug Application: IND) が必要であると勧告した。2022年11月、米Ferring Pharmaceuticals社の、健康なドナー糞便から調整され腸内投与して用いられる糞便微生物叢製品が、*C. difficile* 感染症の再発予防に対する医薬品として初めてFDAに承認された。

さらに、FDAは、より好ましい方法として、便の中で中心的な役割を担っている有効な菌種、もしくはそれ由来する生理活性物質を同定し、便移植に代わるような治療法の開発を推奨している。こうした状況を受けて、米国Seres Therapeutics社は、経口投与可能な微生物カクテル製剤であるSER-109を開発した。SER-109は第一相臨床試験において、*C. difficile* 菌感染による腸炎に対して極めて高い治療効果を示し、FDAの「Break through therapy」に指定された。2022年10月には、Phase III試験の結果を添付した生物学的製剤承認申請（BLA）がFDAに受理され、本件に対する優先審査の適用も決まっている。

これまでの研究から、微生物叢は多種多様であるが、例えば宿主（ヒト）相互作用において鍵となる微生物や生理活性物質はある程度絞られることがわかっている。このことから、ある表現型を指標として、関連性が強く示唆される微生物集団をノトバイオート技術によって絞り込み、その菌の培養に挑戦するというアプローチが非常に有効である。わが国はこのアプローチにおいて、独自の手順を確立した世界トップレベルの技術を有する。例えば、慶応大学の本田は、ノトバイオート技術を用いたスクリーニングにより、インターロイキン-17を高産生するTh17細胞を特異的に誘導するマウス腸内細菌としてセグメント細菌を同定した⁴³⁾。セグメント細菌は、世界でも日本のヤクルト中央研究所とフランスのパスツール研究所だけが単離していた菌であった。また、同様の技術を用い、免疫系恒常性維持に重要な役割を果たしている制御性T細胞（Treg細胞）を特異的に誘導する、クロストリジウム属細菌種をマウスおよびヒトで同定した^{44, 45)}。Treg細胞誘導性ヒト便由来クロストリジウム属17菌株カクテル（VE202）に関する特許は、2015年にVedanta Bioscience社を介してJanssen Biotech社へ総額2億4,100万ドルで導出された。2023年には、VE202のフェーズ2試験が開始予定とされている。臨床試験が成功した場合、特定の生理機能を指標として単離した菌株による初めての臨床応用例となり、上述のSER-109よりも優れたTransformative medicineとして世界的にも注目されている。慶応大学の福田や理化学研究所の大野らは、同研究を発展させ、Treg細胞誘導性クロストリジウム属が定着したマウスの腸内容物をメタボローム解析し、酪酸が大腸Treg細胞の分化を誘導する分子であることを報告している⁴⁶⁾。

このように、マイクロバイオームに着目した治療・創薬は、ドナー由来の便（便懸濁液上清）⇒有効な菌群を含む精製画分⇒単離された多種の有効微生物のカクテルへと研究が展開してきており、臨床応用も進みつつある。最終段階で単離された有効微生物の安全性が確立されれば、新規なプロバイオティクスとして受け入れられる可能性があり、さらに先には、健全な状態で疾病を予防することを目的とした、予防的な腸内フローラ制御法（腸内フローラワクチン）開発の可能性も考えられる。

• 腸内細菌が作り出す代謝物質の疾患との関わり

腸内細菌の作り出す代謝物質の生理作用が次々と明らかになっており^{47, 48)}、疾患との関わりも示唆されている⁴⁹⁾。最近、クローン病においても、dysbiosisに伴いフォスフォリパーゼA遺伝子を有する腸内細菌が増加し、リソフォスファチジルセリン濃度が増加し、この代謝物が直接Th1細胞に作用することにより病態が悪化することが示された⁵⁰⁾。

• ファーマコマイクロバイオミクス

最近の研究から、薬の効果も腸内フローラの影響を受けることが判明してきており、「ファーマコマイクロバイオミクス」として注目されている。例えば、免疫チェックポイント阻害薬は新たな抗がん療法の1つとして期待されているが、薬価の高さに加え、有効性が個人により異なることが課題となっている。最近、腸内フローラの構成によりその薬効が異なること⁵¹⁻⁵³⁾ や、便移植により薬効が高まることが報告されており^{54, 55)}。便移植と免疫チェックポイント阻害薬を組み合わせた臨床試験が世界中で推進されている⁵⁶⁾。また、古くから漢方薬は腸内フローラによる代謝を受けることで薬効を示すことが知られおり、腸内フローラの違いにより薬効が異なることが予想される。さらに、腸内フローラや発酵食品に使用されている微生物の一部は、代表的な薬の代謝酵素であるシトクロームP450を持つことが知られている。シトクロームP450は多くのサブタイプ

と遺伝子多型が存在し、その違いにより薬効が異なることが知られているが、微生物もこれらの酵素を有することを考えると、各種薬品の示す薬効に腸内細菌が関与することは十分にあり得ると考えられる。また、薬物代謝に関連し、パーキンソン病治療薬であり体内でドーパミンに変換されるプロドラッグとして経口投与されるL-dopaにおいて、観察される効果や副作用の個人差を説明する一因として、腸内細菌叢の関与が示されている⁵⁷⁾。この研究では、腸内細菌の一種である*Enterococcus faecalis*が腸内でL-dopaをドーパミンに変換すること、さらに*E. lenta*がドーパミンをtyramineにまで変換すること、さらには腸内細菌によるL-dopaからドーパミンへの変換を選択的に抑制可能な創薬の可能性が示されている。これらの知見から、腸内細菌叢の測定により薬剤の投与必要量を推定する臨床検査法や腸内細菌による薬物代謝活性制御を標的にした薬剤開発が期待される。

• 個別化栄養

近年の研究から、腸内フローラや食品に含まれる微生物は、食品の代謝にも関わることが示されており、その実効代謝物質も同定されている。これらを勘案すると、摂取した食品がどのように代謝され、どのような効果を発揮するののかも、腸内フローラの影響を受けると考えられる。腸内フローラを介した薬効、食事の効果の個体差を考慮することは、個別化医療や個別化栄養の観点からも重要であると言える。最近、國澤（医薬健栄研）らのグループは、脂質異常症に対する大麦の健康効果を例に、腸内細菌の種類により有効性を予測する機械学習モデルの構築に成功しており⁵⁸⁾、今後同様の戦略で個別化栄養システムを拡張していくことが期待される。

• バイローム (virome) ・ 腸内真菌叢

マイクロバイオームが主に細菌のゲノム解析を指すのに対して、バイロームは常在ウイルスに関するメタゲノム解析を指す。常在する細菌には、特にバクテリオファージが多数感染しており、それらが有する遺伝子は細菌の10倍とも言われている。ファージの存在は、細菌叢の構造を変え、多様性を増加させると考えられる。宿主細胞に潜伏感染するノロウイルスやロタウイルス、アデノウイルスやヘルペスウイルスなどが、宿主の常在菌に対する応答性を変化させることも報告されており、今後、常在ウイルスと宿主の生理機能や疾患との関連についてさらに研究が進むものと考えられる。さらに、ファージにより腸内細菌叢をコントロールする戦略の可能性も提唱されている。

最近、ウイルスに加えて、腸内の常在真菌も宿主免疫系を制御することが報告されている⁵⁹⁾。そして、腸内真菌叢の乱れが、炎症性腸疾患、アルコール性肝障害、アレルギー疾患と関わることも報告されている。特に、炎症性腸疾患では、腸内真菌叢の乱れの結果増加するカンジダ真菌が免疫システムに作用することによりその病態に関わることが示された⁶⁰⁾。

• DOHaD

“Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD)” (胎芽期・胎生期から出生後の発達期における種々の環境因子が、成長後の健康や種々の疾病発症リスクに影響を及ぼすという概念) が提唱されている⁶¹⁾。この「環境因子」として、腸内フローラの重要性は高いと考えられている^{62, 63)}。乳児における腸内フローラの形成は生後直後から始まり、いわゆる成人型に安定する3歳頃まで、急激な変化を遂げる^{64, 65)}。生後直後の腸内フローラをよりよく制御することが、乳児のその後の健康な成長に重要であることは想像に難くない。特に、乳児期間の主たる栄養である母乳に含有される母乳オリゴ糖の種類の利用能によって、腸内に生着するビフィズス菌の種類が遷移することが明らかになっている⁶⁶⁾。プロバイオティクスの介入研究として、2001年にKalliomäkiらが、アトピー性皮膚炎の家族歴を有する妊婦による周産期のプロバイオティクスの摂取により児のアトピーの発症率が有意に減じた、と報告⁶⁷⁾して以来、同様の臨床研究が多数実施されている⁶⁸⁾。京都大学の木村、慶応大学の長谷らは、様々な生理活性を有している腸内細菌の代謝

物質である短鎖脂肪酸が、妊娠時に母体から胎児の血流に入り、GPR41、GPR43を介し、胎児の代謝、内分泌系の発達を促し、成長時のエネルギー代謝を調節することを明らかにした⁶⁹⁾。

出産様式の違いによっても腸内細菌叢が変化することが示されている⁷⁰⁾。従来の経膣分娩では、出産直前に妊婦の膣で増加する乳酸菌を新生児が最初に飲み込むが、帝王切開では乳酸菌を飲み込むことがないためであると考えられている。そして、帝王切開で出産した子供は幼児期にアレルギー疾患への感受性が高まることが報告されている。そこで、帝王切開で出産する新生児に対して母親の腸内細菌や膣細菌叢を移植する試みが行われている⁷¹⁾。母親の腸内細菌を移植した新生児は、経膣分娩で出産した子供と同様の腸内細菌を有するようになることも報告されている⁷²⁾。

• 植物-微生物相互作用の農業応用可能性

近代農業は、工業的窒素固定由来の多量の窒素肥料を農地に投入して成り立っているが、窒素肥料の5～7割は作物に利用されていない。生産性向上のために過剰な施肥が行われると、土壌微生物の硝化により窒素が硝酸態窒素へ変換され、地下水へ流出して水質汚染を引き起こす。また、硝化によりCO₂の298倍もの温室効果がある亜酸化窒素(N₂O)も生じるため、地球温暖化や気候変動の観点からも問題視されている。

2021年、国際農研は、生物的硝化抑制(BNI)能を付与した世界初のBNI強化コムギの開発に成功したことを報告し⁷³⁾、米国科学アカデミー紀要(PNAS)より2021年の最優秀論文賞(Cozzarelli Prize)を受賞した。BNI強化コムギは、多収コムギ品種に、野生近縁種の持つ高いBNI能を導入した新品種であり、土壌微生物による硝化を抑制しアンモニア態窒素を効率よく活用できるため、6割少ない窒素肥料でも生産量を維持できる。コムギは三大穀物の一つで、世界で最も広く栽培されていることから、コムギへのBNI能の付加により、少ない肥料で生産量を維持しながら、コムギ農地からの硝化による温室効果ガス排出や水質汚染を低減できることが期待される。

[注目すべき国内外のプロジェクト]

• ヒトマイクロバイームプロジェクト (HMP)(米国)

NIH主導で、総額約2億ドル、8カ年計画として2008年に開始された。第一期HMP(FY2008～2012)では、健康者成人300人の気道、皮膚、口腔、消化器系および膣からサンプルを採取し、16S解析およびメタゲノム解析により最大級の「健康な遺伝子カタログ」の作成が進められた⁷⁴⁾。第二期HMP(FY2013～2016)では、疾患に関連づけられたマイクロバイームの特性を評価するため、フローラと宿主の両方に関する生理学的特徴の「統合的データセット」作製が進められた。

• Metagenomics of Human Intestinal Tract (MetaHIT)(欧州)

2008年からの4年半で公的資金(European Commission)1,140万ユーロを含む計2,120万ユーロ(28億円)が投資され、中国と欧州の協力体制のもと、124名の欧州人からの糞便DNAサンプルをシーケンスし、330万の遺伝子カタログを作成した¹⁷⁾。MetaHITはフランス政府のMetaGenoPolisプログラムへ移行し、健康と疾患に関連するマイクロバイーム解析が継続して行われた。

• AMED-CREST/PRIME 領域「微生物叢と宿主の相互作用・共生の理解と、それに基づく疾患発症のメカニズム解明」(2016年～2022年)(日本)

ヒト微生物叢の制御に着目した新しい健康・医療シーズの創出に資する、微生物叢と宿主の相互作用・共生の理解と、それに基づく疾患発症のメカニズム解明を目的とする。

• 内閣府PRISM「糖尿病個別化予防を加速するマイクロバイーム解析AIの開発」(2019年～2021年)(日本)

医薬基盤・健康・栄養研究所において、独自に立ち上げた複数のコホートを対象にした研究から、7,000

名以上の健康人を対象に腸内細菌叢の16S rRNA解析とショットガンシーケンスを終えている。現在、健康診断データや疾患歴、食事や身体活動などの生活習慣、メタボローム、サイトカインなどのメタデータと付随したNIBIOHN JMBデータベースの構築を進め、一部はウェブにて公開している (<https://microbiome.nibiohn.go.jp/>)。

- **AMED 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業 (腸内マイクロバイオーム制御による次世代創薬技術の開発) (NeDDTrim) (2021年～2026年) (日本)**

国際競争力のある国産発の腸内マイクロバイオーム制御医薬品の創出に向けた、腸内マイクロバイオーム創薬及び製造・品質管理技術基盤の構築と幅広い実用化を目指す。新しい創薬モダリティとしての安全性や製品評価などのレギュラトリーも重要な課題であり、開発とレギュラトリーが連携しながら進められている。

- **学術変革領域研究 (B) 植物超個体の覚醒 (2021年～2024年) (日本)**

植物を個の存在として捉えるのではなく、多様な微生物との相互作用を通じて成立する超個体として捉えなおし、その環境適応機構の分子レベルでの解明を目指して、植物研究と微生物研究を融合した研究が推進されている。

(5) 科学技術的課題

- **日本人のマイクロバイオームデータベース**

日本人の腸内フローラは、例えばビフィズス菌を多く保有する人の割合が多い、海藻の多糖類を分解する酵素を保有する細菌種が存在するなど、独特の特徴があることが知られている。そのため、マイクロバイオーム研究を医療や健康科学に応用する際、欧米のデータをそのまま利用できないことが予想されるが、特にメタゲノム解析において、日本は欧米に大きく遅れを取っている。個別の疾患研究 (特定の疾患と常在菌の関係の解析) の際、健康人のデータベースとの比較参照が必須となることから、日本人の正常状態の常在微生物叢データが必要である。現在、日本人の正常状態の常在微生物叢の組成・機能情報を集積した標準データベースの作成が進められているが、各疾患の発症年齢の違いおよび菌叢が年齢に沿って変化するという常在菌叢の性質から、乳幼児から超高齢者にいたる各年代別の、一定数の健康人試料を収集し解析する必要がある。各地域で食生活や生活習慣が異なることから、特定の地域に限定せず、地域特性を加味したレファレンスデータベースの構築が必要である。試料収集の際は、施設ごとの差異を最小とし、高品質のデータベースを健康診断情報や食事などの生活習慣情報と共に蓄積することが重要である。

- **微生物解析技術とデータベース化**

微生物の個別のレファレンスゲノムデータも重要であり、難培養性微生物の培養法の確立、微生物バンクの整備と並行して行う必要がある。日本人由来の個別細菌株のゲノム情報は、レファレンスゲノムデータ以外に、外国人由来の同一菌種との比較から、水平伝播による日本人に特徴的な機能遺伝子を見つける上でも有効である。例えば、海苔やワカメの多糖類分解酵素の遺伝子は欧米人よりも日本人が多く保有しており、食文化が腸内細菌叢の機能獲得と維持に大きく関係することが示唆されている。

微生物の解析法として、メタゲノム解析のみならず、一細胞リアルタイムシーケンサーを用いた長鎖DNA解析法の開発とそれによる個別の高精度・高品質の微生物ゲノム解析や一細胞メタボローム解析、細菌叢のメチローム解析、およびそれらのデータベース化も重要である。特に一細胞解析は、有用菌を株レベルで選定する際に必要となる情報を提供し、例えば、製品化過程における有効物質の産生経路の欠失の有無を確認できるなど、品質保証の観点からも重要となる。さらには、単一菌のみならず、「菌-菌」の相互作用による共生関係構築とそのメカニズム解明も重要な課題である。この場合、ランダムな菌の組み合わせを網羅的に構築できるドロップレット培養システムの構築などが重要になると考えられる。このような大規模な試料収集と

解析、データベース化を個別研究で行うことは非現実的であり、拠点を整備して行うことが必要である。

• 難培養微生物の単離培養

常在の腸内フローラ構成菌群の主体は偏性嫌気性菌であり、従来の培養方法ではすべてを単離培養することは困難である⁷⁵⁾。培養の際は、腸内における多様な菌群の相互依存性（共生関係）などの要素も考慮しなければならない。現在、環境微生物学領域などでは、土壌や海洋などに生息する微生物群のシングルセルゲノム解析のための微生物単離法（マイクロマニピュレーション、マイクロ流路、セルソーターなどを使用）が開発されている⁷⁶⁾。腸内微生物において確立されている嫌気培養法にこのようなアイデアを融合させることで、難培養微生物の単離培養の実現が加速すると考えられる。

• バイオマーカー探索

内在性微生物の宿主に対する有効性を評価できるバイオマーカー（宿主因子および微生物因子）の確立は重要テーマの一つである。宿主に対する有効性として、腸内環境の改善、腸管運動の亢進、腸管バリアの維持、腸管免疫の調整などに加え、新たな有効性訴求ポイントが期待される。微生物因子においては、菌体の代謝のみならず、菌体構造や成分、さらにはこれに関連する遺伝的な要素の詳細な解析も必要となる。ゲノムとメタボロームの統合解析は、この意味で極めて有望である。加えて、高分子化学の技術を用いた有効な菌体構造の再構築や成分合成なども発展性が高い。宿主因子としては、特に発展の目覚ましい免疫学的な因子や、有機酸レセプターなど^{77, 78)}の、腸管神経系に作用を及ぼす確かなマーカーの特定が重要と考えられる。

• ボトムアップ型研究

腸内フローラ研究は、大規模なメタゲノム解析などのトップダウン型研究が先行した一方で、構成する菌種の多くは未分離未培養のまま特徴付けがなされておらず、因果関係が明確ではない状況にあり、ボトムアップ型研究が不足している。しかも、わずか1種類の病原菌で発症する感染症とは異なり、腸内細菌叢は、複数の細菌種からなるコミュニティとして生理機能をもたらすことが多い。それにも関わらず、どの細菌種の組み合わせが機能的コミュニティとしての最小単位を構成しているのかは、わかっていない部分が多い。糞便中の菌群は容易に検体を採取できるため比較的解析が進んでいるが、小腸などの生体内や粘膜表層のように、サンプル採取自体が難しい部位の菌叢研究はほとんど手付かずである。病態悪化の原因となる菌種や、逆に病態改善へとつながる鍵となる働きをする causative な菌種を同定し、機能的腸内細菌コミュニティの理解を深めていけば、今後、新たな疾病対策・治療開発に結びついていく可能性は高い。

• 植物を宿主とした微生物叢の機能解明のための実験系の確立

植物の研究において、現状の SynCom 実験から得られた成果には課題も多い。例えば、SynCom の研究で明らかになった集団としての機能（植物成長促進や植物保護）は、既存の微生物単独でも認められることが多くのグループから報告されている。微生物単独で示された機能が集団レベルでも認められることを示した点では有意義ではあるが、微生物が集団になることで初めて創発される機能やそのメカニズムはほとんど明らかになっていない。一方で、ヒトやマウスなどの腸内細菌の研究では、腸内の特定の細菌群がつくる二次代謝物が血流を介して脳へ移動し、脳において神経活性化に重要な役割を担っていることが報告される⁷⁹⁾など、微生物の集団としての機能の研究も進みつつある。哺乳類の場合は、食事などを通して微生物を与えることで、微生物の腸内への再定着が簡便かつ安定的にできるが、植物の場合、微生物を植物に再定着させる方法がそもそも確立されていない。つまり、どのように微生物を接種すれば、野外環境の微生物集団をフィールドで構築・再現できるかの知見が乏しい。植物において微生物の再定着が難しい理由として、哺乳類の腸内と植物の根圏の環境の違いが考えられる。腸内は、外からは隔離された栄養リッチな均一環境と考えられる一方で、植物の根圏は、土壌などの外部環境に大きく影響を受け、栄養などの環境が一定ではなく不均一で

ある。その不均一性を深く理解できていないことが、植物における微生物叢の実験系確立のボトルネックになっていると考えられる。

これまでの植物マイクロバイーム研究は、シーケンス技術の発展に支えられ、データ駆動型のトップダウン戦略で発展してきた。シーケンス技術を主に用いる場合は、植物や微生物の知識がそれほど深くなくても研究ができるため、他分野の研究者でも参入でき、研究者の裾野は広がってきた。一方で、再定着実験を行うには、植物や微生物の研究の経験も含めた詳細な知識が必要になる。さらに、再定着実験を行う環境条件の設定には、微生物集団が野外で生息していた本来の環境条件を深く理解する必要がある。微生物生態学の研究者との連携もこれまで以上に深めていく必要がある。日本では、植物生理学や発酵など、植物や微生物の分子レベルでの研究がそれぞれ盛んであり、そのレベルも高いため、これらの隣接領域の研究者が結集することで、欧米が大規模に進めてきたシーケンス技術をベースとしたトップダウン型研究とは異なる、かつ、本質的な研究が推進できると考えられる。

• 植物-微生物相互作用研究における技術的課題

菌糸を伸ばし、植物の根から侵入する糸状菌を扱う場合、イメージングが難しいという技術的な課題がある。葉から侵入する糸状菌は、特定の感染器官を作ってそこから侵入するが、根では、どこから菌糸が伸びてきたかの判別が難しいため、どの菌糸から植物内に侵入したかを明らかにすることは難しい。一般的に、根はイメージングしやすいとされているが、菌糸が根と相互作用した箇所は自家蛍光が生じやすいなど、植物-微生物相互作用研究においてイメージングの課題は多い。また、あらゆる分野でシングルセル解析を活用した研究が活発に行われているが、植物-微生物相互作用の研究では、菌糸が侵入した植物細胞のプロトプラスト化が難しいという問題があった。最近、*in situ* hybridization を用いて、プロトプラスト化を経ずに一細胞レベルで植物遺伝子の応答を可視化する技術が報告された⁸⁰⁾ ことから、今後この問題が解決されていく期待感はある。

(6) その他の課題

マイクロバイーム研究では、新型シーケンサーを用いた大量のメタゲノムデータとそのバイオインフォマティクス解析、各種の無菌化・ノトバイオート動物など、特殊な技術や実験動物が不可欠であり、メタボローム解析などの大型機器を必要とする実験も多い。また、解析データを共有し、着実に知見を積み重ねていくためには、サンプル採取やシーケンス解析、サンプル保存法などのプロトコルの統一・標準化が特に重要である。本領域では、日進月歩で技術革新が行われていることを考慮すると、新旧の各プロトコルで取得したデータを連携させるためのデータブリッジングのシステム開発も重要な課題である。さらには、倫理的・法的関連事項の整備も必要とされる。これらをわが国で効果的・効率的に推進するためには、必要な設備を拠点化・整備し、長期的な視点に立った支援・ファンディングが望ましい。関連する領域の研究者が結集し連携することにより、日本独自のマイクロバイーム研究の推進が可能になると考えられる。拠点の整備と新規解析法の開発は、医療や農業応用の他にも、畜産、水産、環境領域などへの波及効果も見込まれ、海洋環境や極限環境（海底の熱水、極地など）の微生物の解析は貴重な知財を生み出す蓋然性も高い。このような意味からも、微生物ゲノムの包括的・網羅的解析拠点ならびにデータベース拠点の整備は、ライフサイエンス研究の基盤として、国が主導して進めるべきと考えられる。

新しい創薬モダリティとしての腸内細菌の研究が進む中、今後は、安全性や製品評価などレギュラトリーも重要な課題である。現在、AMEDのNeDDTrim事業の支援の下で、開発とレギュラトリーが連携しながら、関連する取り組みが進められている。

プロバイオティクスについても、レギュラトリーの観点は重要である。わが国では、保健機能食品（特定保健用食品、栄養機能食品（ビタミン、ミネラル）、機能性表示食品（2015年4月より施行）といった枠組みにおいて、食品の保健機能を個々の製品について謳うことが可能である。プロバイオティクスについても同様

であり、さまざまなプロバイオティクス菌株を用いた食品やサプリメントが上市されている。一方、諸外国における食品の健康機能表示に関する行政の規制はさまざまである。EUでは、食品の健康機能を謳うことは許可制であり、欧州食品安全機関（EFSA）により個別の許可申請が審査される。プロバイオティクスについても多くの申請がなされてきたが、2021年に、低温殺菌されたアッカーマンシア菌が肥満をコントロールするための食品として承認された⁸¹⁾。米国では、食品の構造・機能に関する作用を標榜するためのヒト臨床試験実施の際にもINDの申請が必要となっているため、本来食品やサプリメントを意図して開発されるプロバイオティクスにおける臨床研究の実施を極めて困難にしている。このように、国際的な法規制の状況はさまざまであるが、プロバイオティクスの食品としての有効性およびその作用メカニズムを適切に訴求するためのさらなる科学的証拠の蓄積は、世界的に共通する重要な課題である。プラセボ対照の二重盲検試験のような医療技術レベルの高度なエビデンス構築、多数の臨床研究結果のシステマティックレビューやメタアナリシスによる有効性の検証を進め、evidence-based medicineならぬevidence-based application of probioticsの実現が期待される。また、医薬品開発と同様、製品の均一性や安全性などの規格についても、従来の化学物質を対象としたものとは異なるガイドラインがあることが望ましい。現在、プロバイオティクスに関する多くの学術機関が設立されており、これらの科学団体がより緊密な連携の下にグローバルな影響力を発揮することも重要となる。

(7) 国際比較

国・地域	フェーズ	現状	トレンド	各国の状況、評価の際に参考にした根拠など
日本	基礎研究	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> ・マイクロバイオームと免疫系や発がんに関する研究において、特筆すべき成果が出ている。 ・植物分野では大々的に研究を進めているグループは少なく、植物と微生物の対一相互作用の研究がメインである。
	応用研究・開発	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> ・便移植の治験が開始されたが、乳酸菌やビフィズス菌などのプロバイオティクス研究から脱却できていない。 ・AMED NeDDTrim 事業により、創薬実用化に向けた研究が支援され、実用化の加速が期待される。 ・植物-微生物研究の応用に対する企業の潜在的な興味関心は高いが、形になっているものはない。
米国	基礎研究	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> ・便移植の治験が開始され、潰瘍性大腸炎に対する一定の効果は得られているものの、全体としては乳酸菌やビフィズス菌などのプロバイオティクス研究から脱却できていない。 ・植物分野では、シロイヌナズナなどのモデル植物だけでなく、主要作物を用いた研究が幅広く行われている。
	応用研究・開発	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> ・Seres Therapeutics社やVedanta Biosciences社など、マイクロバイオームに着目した創薬や、機能性細菌種探索、バイオマーカー探索に関するベンチャー企業が多く立ち上がっている。 ・植物分野では、Monsanto社やIndigo社など様々な会社が有用微生物資材を開発・売り出している。しかしながら、農薬や肥料の代替品となり得るものはまだ存在しない。
欧州	基礎研究	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> ・MetaHIT プロジェクトの成功のあと、後継プロジェクトとしてMetaGenoPolis計画がフランス政府によって支援された。 ・植物分野では、米国と比較すると基礎研究志向が強く、シロイヌナズナなどのモデル植物を用いた基礎研究がメインで行われている。
	応用研究・開発	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> ・Enterome社やMetabogen社など、MetaHITプロジェクトに貢献した研究者によって、機能性細菌種探索やバイオマーカー探索に関するベンチャー企業が多く立ち上がり、10億ユーロ以上の資金が集まっている。 ・Janssen社やDANONE社など、大企業がマイクロバイオーム研究に投資し、その成果を臨床応用する取り組みが進んでいる。 ・植物分野では、Bayer社が米Ginkgo Bioworks社と連携し、農業用微生物資材の実用化を目指している。

2.3 俯瞰区分と研究開発領域
基礎基盤

中国	基礎研究	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> ・ 欧州 MetaHIT プロジェクトにBGI 社が参画し大規模メタゲノム解析に貢献するなど、存在感を示した。また、Zhejiang 大学のグループは、IHMCの主要メンバーとして活動しており、肝硬変に関するマイクロバイオーム研究を Nature 誌に報告した¹⁹⁾。 ・ 植物分野では、欧米から帰ってきた一部の研究者が大々的に研究を行っているが、全体として研究グループは少ない。シロイヌナズナを用いた基礎研究よりも作物関連の研究が多い。
	応用研究・開発	△	→	特記事項無し
韓国	基礎研究	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> ・ National Research Foundation による支援 (2010~2015 年、約2億円) のもと、Seoul National University の Ko を中心に、韓国双子コホートを利用した、韓国人の上皮に存在する健康と疾患に関連するマイクロバイオーム解析が行われた。
	応用研究・開発	△	→	特記事項無し

(註1) フェーズ

基礎研究：大学・国研などでの基礎研究の範囲

応用研究・開発：技術開発（プロトタイプの開発含む）の範囲

(註2) 現状 ※日本の現状を基準にした評価ではなく、CRDS の調査・見解による評価

◎：特に顕著な活動・成果が見えている

○：顕著な活動・成果が見えている

△：顕著な活動・成果が見えていない

×：特筆すべき活動・成果が見えていない

(註3) トレンド ※ここ1~2年の研究開発水準の変化

↗：上昇傾向、→：現状維持、↘：下降傾向

関連する他の研究開発領域

<ul style="list-style-type: none"> ・ 免疫・炎症（ライフ・臨床医学分野 2.1.12）
--

参考文献

- 1) Joshua Lederberg, "Infectious History," *Science* 288, no. 5464 (2000) : 287-293., <https://doi.org/10.1086/10.1126/science.288.5464.287>.
- 2) Vanessa K. Ridaura, et al., "Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice," *Science*. 341, no. 6150 (2013) : 1241214., <https://doi.org/10.1126/science.1241214>.
- 3) Els van Nood, et al., "Duodenal Infusion of Donor Feces for Recurrent Clostridium difficile," *New England Journal of Medicine* 368, no. 5 (2013) : 407-415., <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1205037>.
- 4) Jonathan Scheiman, et al., "Meta-omics analysis of elite athletes identifies a performance-enhancing microbe that functions via lactate metabolism," *Nature Medicine* 25, no. 7 (2019): 1104-1109., <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0485-4>.
- 5) Hiroto Morita, et al., "Bacteroides uniformis and its preferred substrate, α-cyclodextrin, enhance endurance exercise performance in mice and human males," *Science Advances* 9, no. 4 (2023) : eadd2120., <https://doi.org/10.1126/sciadv.add2120>.
- 6) Carlotta De Filippo, et al., "Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa," *PNAS* 107, no. 33 (2010) : 14691-14696., <https://doi.org/10.1073/pnas.1005963107>.
- 7) Sathish Subramanian, et al., "Persistent gut microbiota immaturity in malnourished

- Bangladeshi children,” *Nature* 510, no. 7505 (2014) : 417-421., <https://doi.org/10.1038/nature13421>.
- 8) David M. Keohane, et al., “Microbiome and health implications for ethnic minorities after enforced lifestyle changes,” *Nature Medicine*, 26, no. 7 (2020) : 1089-1095., <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0963-8>.
 - 9) Gregor Reid, et al., “New Scientific Paradigms for Probiotics and Prebiotics,” *Journal of Clinical Gastroenterology* 37, no. 2 (2003) : 105-118., <https://doi.org/10.1097/00004836-200308000-00004>.
 - 10) Colin Hill, et al., “The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic,” *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 11, no. 8 (2014) : 506-514., <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>.
 - 11) Petra Ina Pfefferle and Harald Renz, “The mucosal microbiome in shaping health and disease,” *F1000Prime Reports* 6 (2014) : 11., <https://doi.org/10.12703/P6-11>.
 - 12) Shannon L. Russell, et al., “Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma,” *EMBO Reports* 13, no.5 (2012) : 440-447., <https://doi.org/10.1038/embor.2012.32>.
 - 13) Elaine Y. Hsiao, et al., “Microbiota Modulate Behavioral and Physiological Abnormalities Associated with Neurodevelopmental Disorders,” *Cell* 155, no. 7 (2013) : 1451-1463., <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.024>.
 - 14) Shin Yoshimoto, et al., “Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome,” *Nature* 499, no. 7456 (2013) : 97-101., <https://doi.org/10.1038/nature12347>.
 - 15) Takahiro Nagatake, et al., “Intestinal microbe-dependent ω 3 lipid metabolite α KetoA prevents inflammatory diseases in mice and cynomolgus macaques,” *Mucosal Immunology* 15, no. 2 (2022) : 289-300., <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00477-5>.
 - 16) Harry Sokol, et al., “Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients,” *PNAS* 105, no. 43 (2008) : 16731-16736., <https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105>.
 - 17) Junjie Qin, et al., “A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing,” *Nature* 464, no. 7285 (2010) : 59-65., <https://doi.org/10.1038/nature08821>.
 - 18) Junjie Qin, et al., “A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes,” *Nature* 490, no. 7418 (2012) : 55-60., <https://doi.org/10.1038/nature11450>.
 - 19) Nan Qin, et al., “Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis,” *Nature* 513, no. 7516 (2014) : 59-64., <https://doi.org/10.1038/nature13568>.
 - 20) Jose U. Scher, et al., “Expansion of intestinal Prevotella copri correlates with enhanced susceptibility to arthritis.” *eLife* 2 (2013) : e01202., <https://doi.org/10.7554/eLife.01202>.
 - 21) Koji Atarashi, et al., “T_{reg} induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota,” *Nature* 500, no. 7461 (2013) : 232-236., <https://doi.org/10.1038/nature12331>.
 - 22) Shinji Fukuda, et al., “Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate,” *Nature* 469, no. 7331 (2011) : 543-547., <https://doi.org/10.1038/nature09646>.

- 23) Naofumi Yoshida, et al., “Bacteroides spp. promotes branched-chain amino acid catabolism in brown fat and inhibits obesity,” *iScience* 24, no. 11 (2021) : 103342., <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103342>.
- 24) Koji Hosomi, et al., “Oral administration of *Blautia wexlerae* ameliorates obesity and type 2 diabetes via metabolic remodeling of the gut microbiota,” *Nature Communications* 13 (2022) : 4477., <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32015-7>.
- 25) Mara Roxana Rubinstein, et al., “*Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin,” *Cell Host & Microbe* 14, no. 2 (2013) : 195-206., <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.07.012>.
- 26) Shaoguang Wu, et al., “A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses,” *Nature Medicine* 15, no. 9 (2009) : 1016-1022., <https://doi.org/10.1038/nm.2015>.
- 27) Kosuke Fujimoto, et al., “Antigen-Specific Mucosal Immunity Regulates Development of Intestinal Bacteria-Mediated Diseases,” *Gastroenterology* 157, no. 6 (2019) : 1530-1543.e4., <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.08.021>.
- 28) Yi Duan, et al., “Bacteriophage targeting of gut bacterium attenuates alcoholic liver disease,” *Nature* 575, no. 7783 (2019) : 505-511., <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1742-x>.
- 29) Ton Bisseling, Jeffery L. Dangl and Paul Schulze-Lefert, “Next-Generation Communication,” *Science* 324, no. 5928 (2009) : 691., <https://doi.org/10.1126/science.1174404>.
- 30) Davide Bulgarelli, et al., “Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota,” *Nature* 488, no. 7409 (2012) : 91-95., <https://doi.org/10.1038/nature11336>.
- 31) Derek S. Lundberg, et al., “Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome,” *Nature* 488, no. 7409 (2012) : 86-90., <https://doi.org/10.1038/nature11237>.
- 32) Davide Bulgarelli, et al., “Structure and Function of the Bacterial Root Microbiota in Wild and Domesticated Barley,” *Cell Host & Microbe* 17, no. 3 (2015) : 392-403., <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.01.011>.
- 33) Joseph Edwards, et al., “Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice,” *PNAS* 112, no. 8 (2015) : E911-E920., <https://doi.org/10.1073/pnas.1414592112>.
- 34) Yang Bai, et al., “Functional overlap of the *Arabidopsis* leaf and root microbiota,” *Nature* 528, no. 7582 (2015) : 364-369., <https://doi.org/10.1038/nature16192>.
- 35) Sarah L. Lebeis, et al., “Salicylic acid modulates colonization of the root microbiome by specific bacterial taxa,” *Science* 349, no. 6250 (2015) : 860-864., <https://doi.org/10.1126/science.aaa8764>.
- 36) Gabriel Castrillo, et al., “Root microbiota drive direct integration of phosphate stress and immunity,” *Nature* 543, no. 7646 (2017) : 513-518., <https://doi.org/10.1038/nature21417>.
- 37) Jingying Zhang, et al., “NRT1.1B is associated with root microbiota composition and nitrogen use in field-grown rice,” *Nature Biotechnology* 37, no. 6 (2019) : 676-684., <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0104-4>.
- 38) Paloma Durán, et al., “Microbial Interkingdom Interactions in Roots Promote *Arabidopsis* Survival,” *Cell* 175, no. 4 (2018) : 973-983.e14., <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.020>.

- 39) Ioannis A. Stringlis, et al., "MYB72-dependent coumarin exudation shapes root microbiome assembly to promote plant health," *PNAS* 115, no. 22 (2018) : E5213-E5222., <https://doi.org/10.1073/pnas.1722335115>.
- 40) Mathias J. E. E. Voges, et al., "Plant-derived coumarins shape the composition of an Arabidopsis synthetic root microbiome," *PNAS* 116, no. 25 (2019) : 12558-12565., <https://doi.org/10.1073/pnas.1820691116>.
- 41) Kei Hiruma, et al., "Root Endophyte Colletotrichum tofieldiae Confers Plant Fitness Benefits that Are Phosphate Status Dependent," *Cell* 165, no. 2 (2016) : 464-474., <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.028>.
- 42) Juliana Almario, et al., "Root-associated fungal microbiota of nonmycorrhizal Arabis alpina and its contribution to plant phosphorus nutrition," *PNAS* 114, no. 44 (2017) : E9403-E9412., <https://doi.org/10.1073/pnas.1710455114>.
- 43) Ivaylo I. Ivanov, et al., "Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria," *Cell* 139, no. 3 (2009) : 485-498., <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.033>.
- 44) Koji Atarashi, et al., "Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous Clostridium Species," *Science* 331, no. 6015 (2010) : 337-341., <https://doi.org/10.1126/science.1198469>.
- 45) Koji Atarashi, et al., "T_{reg} induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota," *Nature* 500, no. 7461 (2013) : 232-236., <https://doi.org/10.1038/nature12331>.
- 46) Yukihiro Furusawa, et al., "Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells," *Nature* 504, no. 7480 (2013) : 446-450., <https://doi.org/10.1038/nature12721>.
- 47) Marija S. Nadsombati, et al., "Detection of Succinate by Intestinal Tuft Cells Triggers a Type 2 Innate Immune Circuit," *Immunity* 49, no. 1 (2018) : 33-41.e7., <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.06.016>.
- 48) Yong-Soo Lee, et al., "Microbiota-Derived Lactate Accelerates Intestinal Stem-Cell-Mediated Epithelial Development," *Cell Host & Microbe* 24, no. 6 (2018) : 833-846.e6., <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.11.002>.
- 49) Eran Blacher, et al., "Potential roles of gut microbiome and metabolites in modulating ALS in mice," *Nature* 572, no. 7770 (2019) : 474-480., <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1443-5>.
- 50) Yuriko Otake-Kasamoto, et al., "Lysophosphatidylserines derived from microbiota in Crohn's disease elicit pathological Th1 response," *Journal of Experimental Medicine* 219, no. 7 (2022) : e20211291., <https://doi.org/10.1084/jem.20211291>.
- 51) Bertrand Routy, et al., "Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors," *Science* 359, no. 6371 (2018) : 91-97., <https://doi.org/10.1126/science.aan3706>
- 52) Vancheswaran Gopalakrishnan, et al., "Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients," *Science* 359, no. 6371 (2018) : 97-103., <https://doi.org/10.1126/science.aan4236>
- 53) Vyara Matson, et al., "The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients," *Science* 359, no. 6371 (2018) : 104-108., <https://doi.org/10.1126/science.aao3290>

- 54) Diwakar Davar, et al., “Fecal microbiota transplant overcomes resistance to anti-PD-1 therapy in melanoma patients,” *Science* 371, no. 6529 (2021) : 595-602., <https://doi.org/10.1126/science.abf3363>
- 55) Erez N. Baruch, et al., “Fecal microbiota transplant promotes response in immunotherapy-refractory melanoma patients,” *Science* 371, no. 6529 (2021) : 602-609., <https://doi.org/10.1126/science.abb5920>
- 56) Hui Xu, et al., “Antitumor effects of fecal microbiota transplantation: Implications for microbiome modulation in cancer treatment,” *Frontiers in Immunology* 13 (2022) : 949490., <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.949490>
- 57) Vayu Maini Rekdal, et al., “Discovery and inhibition of an interspecies gut bacterial pathway for Levodopa metabolism,” *Science* 364, no. 6445 (2019) : eaau6323., <https://doi.org/10.1126/science.aau6323>.
- 58) Satoko Maruyama, et al., “Classification of the Occurrence of Dyslipidemia Based on Gut Bacteria Related to Barley Intake,” *Frontiers in Nutrition* 9 (2022) : 812469., <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.812469>.
- 59) Itai Doron, et al., “Human gut mycobiota tune immunity via CARD9-dependent induction of anti-fungal IgG antibodies,” *Cell* 184, no. 4 (2021) : 1017-1031.e14., <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.016>.
- 60) Xin V. Li, et al., “Immune regulation by fungal strain diversity in inflammatory bowel disease,” *Nature* 603, no. 7902 (2022) : 672-678., <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04502-w>.
- 61) Mark Hanson and Peter Gluckman, “Developmental origins of noncommunicable disease: population and public health implications,” *American Journal of Clinical Nutrition* 94, Suppl 6 (2011) : 1754S-1758S., <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.001206>.
- 62) Maria Carmen Collado, et al., “Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid,” *Scientific Reports* 6 (2016) : 23129., <https://doi.org/10.1038/srep23129>.
- 63) Hiroshi Makino, et al., “Transmission of Intestinal *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* Strains from Mother to Infant, Determined by Multilocus Sequencing Typing and Amplified Fragment Length Polymorphism,” *Applied and Environmental Microbiology* 77, no. 19 (2011) : 6788-6793., <https://doi.org/10.1128/AEM.05346-11>.
- 64) 野本康二, 辻浩和, 松田一乗「腸内フローラ解析システム YIF-SCAN®」『腸内細菌学雑誌』29 巻 1 号 (2015) : 9-18., <https://doi.org/10.11209/jim.29.9>.
- 65) Tanya Yatsunenko, et al., “Human gut microbiome viewed across age and geography,” *Nature* 486, no. 7402 (2012) : 222-227., <https://doi.org/10.1038/nature11053>.
- 66) Takahiro Matsuki, et al., “A key genetic factor for fucosyllactose utilization affects infant gut microbiota development,” *Nature Communications* 7 (2016) : 11939., <https://doi.org/10.1038/ncomms11939>.
- 67) Marko Kalliomäki, et al., “Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial,” *Lancet* 357, no. 9262 (2001) : 1076-1079., [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04259-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04259-8).
- 68) Guo-Qiang Zhang, et al., “Probiotics for Prevention of Atopy and Food Hypersensitivity in Early Childhood: A PRISMA-Compliant Systematic Review and Meta-Analysis of

- Randomized Controlled Trials,” *Medicine* 95, no. 8 (2016) : e2562., <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002562>.
- 69) Ikuo Kimura, et al., “Maternal gut microbiota in pregnancy influences offspring metabolic phenotype in mice,” *Science* 367, no. 6481 (2020) : eaaw8429., <https://doi.org/10.1126/science.aaw8429>.
- 70) Maria G. Dominguez-Bello, et al., “Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns,” *PNAS* 107, no. 26 (2010) : 11971-11975., <https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107>.
- 71) Maria G. Dominguez-Bello, et al., “Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer,” *Nature Medicine* 22, no. 3 (2016) : 250-253., <https://doi.org/10.1038/nm.4039>.
- 72) Katri Korpela, et al., “Maternal Fecal Microbiota Transplantation in Cesarean-Born Infants Rapidly Restores Normal Gut Microbial Development: A Proof-of-Concept Study,” *Cell* 183, no. 2 (2020) : 324-334., <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.047>.
- 73) Guntur V. Subbarao, et al., “Enlisting wild grass genes to combat nitrification in wheat farming: A nature-based solution,” *PNAS* 118, no. 35 (2021) : e2106595118., <https://doi.org/10.1073/pnas.2106595118>.
- 74) The Human Microbiome Project Consortium, “A framework for human microbiome research,” *Nature* 486, no. 7402 (2012) : 215-221., <https://doi.org/10.1038/nature11209>.
- 75) Hilary P. Browne, et al., “Culturing of ‘unculturable’ human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation,” *Nature* 533, no. 7604 (2016) : 543-546., <https://doi.org/10.1038/nature17645>.
- 76) 雪昌広, 大熊盛也 「シングルゲノム解析技術の現状と展望」 第4章 『難培養微生物研究の最新技術III : 微生物の生き様に迫り課題解決へ』 大熊盛也, 野田悟子 監 (東京: シーエムシー出版, 2015), 30-40.
- 77) Ikuo Kimura, et al., “Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41),” *PNAS* 108, no. 19 (2011) : 8030-8035., <https://doi.org/10.1073/pnas.1016088108>.
- 78) Ikuo Kimura, et al., “The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43,” *Nature Communications* 4 (2013) : 1829., <https://doi.org/10.1038/ncomms2852>.
- 79) Brittany D. Needham, et al., “A gut-derived metabolite alters brain activity and anxiety behaviour in mice,” *Nature* 602, no. 7898 (2022) : 647-653., <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04396-8>.
- 80) Tatsuya Nobori, et al., “PHYTOmap: Multiplexed single-cell 3D spatial gene expression analysis in plant tissue,” bioRxiv, <https://doi.org/10.1101/2022.07.28.501915>, (2023年2月7日アクセス) .
- 81) EFSA Panel on Nutrition, et al., “Safety of pasteurised *Akkermansia muciniphila* as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283,” *EFSA Journal* 19, no. 9 (2021) : e06780., <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6780>.