

NITE講座:微生物の同定や解析のための基盤技術

ーMALDI-TOF MSを用いた微生物同定と、マイクロバイーム解析の精度向上ー



マイクロバイーム解析の信頼性向上への取り組みと 新しいNBRC微生物カクテル

2025年11月28日(金)

独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE)

バイオテクノロジーセンター(NBRC)

バイオ技術評価・開発課

三浦 隆匡

1. マイクロバイオーム解析の広がりと課題
2. NBRC皮膚常在微生物カクテルの開発

1. マイクロバイオーム解析の広がりと課題
2. NBRC皮膚常在微生物カクテルの開発

マイクロバイオーム: ある特定の生態系に存在する微生物(集合体)、それらの遺伝子および代謝産物すべてを指す

> DNAを読む = メタゲノム

- 微生物ゲノムの仮構築(MAG等)
- どんな種がいるか
- どんな遺伝子があるか

> RNAを読む = トランスクリプトーム

- 発現している遺伝子を捉える
- どんな種が高活性か
- どんな代謝経路が動いているか



医療・ヘルスケア (腸内フローラ、疾患予測)

食品産業 (発酵、品質管理)

環境科学 (土壌、海洋、廃水処理)

農業 (作物生育、土壌改良)

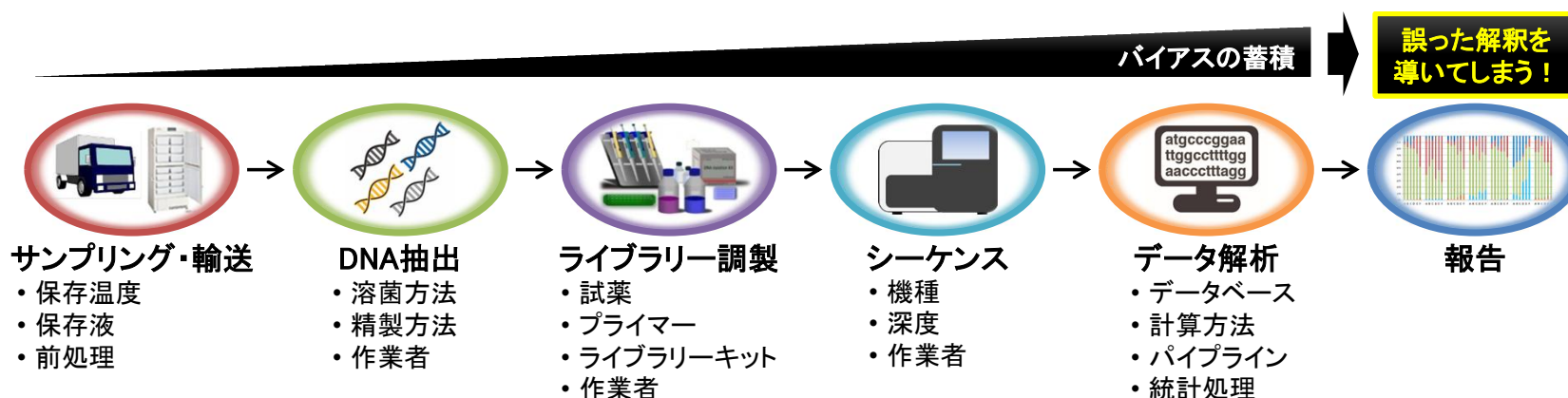
バイオエネルギー (メタン生成、バイオ燃料)

法医学 (死後微生物解析)

etc...

次世代シーケンサーの発展により様々な分野で
マイクロバイオーム解析による技術革新が進んでいる

マイクロバイオーン解析における課題



2018年4月、米国では、NSTC Life Sciences Subcommitteeにより、マイクロバイオーン研究のための省庁間戦略(Interagency Strategic Plan for Microbiome Research)が作成された。

- ✓ 提言1: 学際的研究開発・共同研究の推進
- ✓ 提言2: コア技術の開発(1.標準整備、2.オープンDB開発、3.計測技術開発)
- ✓ 提言3: マイクロバイオーン人材(workforce)育成

- ・標準プロトコル
- ・参照物質(mock community)

	USAID	NIST/DOC	NOAA/DOC	DOD	SC/DOE	EPA	CDC/HHS	FDA/HHS	NIH/HHS	DHS	NPS/DOI	USGS/DOI	FBI/DOJ	NIJ/DOJ	NASA	NSF	SI	ARS/USDA	FS/USDA	NIFA/USDA	NRCS/USDA	VA
Agriculture	X	X	X	X	X		X		X		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Aquatic		X	X	X	X							X		X	X	X		X	X			
Atmosphere			X						X	X		X	X	X	X			X		X		
Built Environment	X		X	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X					X		X
Human	X	X		X	X	X	X	X	X		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Energy				X	X							X								X		
Laboratory			X	X	X	X	X	X	X		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Terrestrial				X	X	X		X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

米国各機関が実施するマイクロバイオーン研究の領域

多種多様な工程が存在するマイクロバイオーン解析においてはデータの信頼性確保が課題と認識されている



- 和訳：“模擬菌叢”
- あるサンプルに存在する微生物叢を模して、その代表種の培養菌体、または抽出DNAを人工的に混合したもの。
- 通常、数種～数十種の微生物が代表種として選定され、予め定められた量と比率で混合される。
- プロトコル特有の実験バイアスの特徴づけ、手法の最適化や検証を行う目的で利用される。
- 作業や事業所間の再現性および実験ごとの変動性を評価するために用いられている。

国際規模で行われている解析プロトコルの検証

●IHMSプロジェクト(2011年～2015年)

- ・欧州中心
- ・糞便検体と10株の細菌を混合したmock communityを用いてヒト腸内微生物叢のメタゲノム解析手法の最適化が検討された。
- ・メタゲノム解析におけるバイアスの最大要因はDNA抽出にあり、この最適化を含む、全解析工程のSOPを公開 (<https://human-microbiome.org/index.php>)

●Mosaic Standards Challenge(2018年～2020年)

- ・米国立標準技術研究所(NIST)等が主導
- ・疑似糞便試料とDNA mockを用いたNGS解析試験への参加を世界に公募
- ・44機関の参加により、解析手法の違いが結果に及ぼす影響が調べられた。

nature
biotechnology

Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies

Paul I Costea^{1,2}, Georg Zeller¹, Shinichi Sunagawa^{1,2}, Eric Pelletier³⁻⁵, Adriana Alberti³, Florence Levenez⁶, Melanie Tramontano¹, Marja Driessen¹, Rajna Herczeg¹, Ferris-Elias Jung¹, Jens Roat Kultima¹, Matthew R Hayward¹, Luis Pedro Coelho¹, Emma Allen-Vercos⁷, Laurie Bertrand³, Michael Blaut⁸, Jillian R M Brown⁹, Thomas Carton¹⁰, Stéphanie Cools-Portier¹¹, Michelle Daigneault⁶, Muriel Derrien¹¹, Anne Druet¹¹, Willem M de Vos^{12,13}, B Brett Finlay¹⁴, Harry J Flint¹⁵, Francisco Guarner¹⁶, Masahira Hattori^{17,18}, Hans Heilig¹², Ruth Ann Luna¹⁹, Johan van Hylckama Vlieg¹¹, Jana Junick⁸, Ingeborg Klymiuk²⁰, Philippe Langella⁶, Emmanuelle Le Chatelier⁶, Volker Mai²¹, Chaysavanh Manichanh¹⁶, Jennifer C Martin¹⁵, Clémentine Mery¹⁰, Hidetoshi Morita²², Paul W O'Toole⁹, Céline Orvain³, Kiran Raosaheb Patil¹, John Penders²³, Søren Persson²⁴, Nicolas Pons⁶, Milena Popova¹⁰, Anne Salonen¹³, Delphine Saulnier⁸, Karen P Scott¹⁵, Bhagirath Singh²⁵, Kathleen Slezak⁸, Patrick Veiga¹¹, James Versalovic¹⁹, Liping Zhao²⁶, Erwin G Zoetendal¹², S Dusko Ehrlich^{6,27}, Joel Dore⁶ & Peer Bork^{1,28-30}

Nature biotechnology (2017), 35(11): 1069-1075.

scientific reports

OPEN Variability and bias in microbiome metagenomic sequencing: an interlaboratory study comparing experimental protocols

Samuel P. Forry^{1,2}, Stephanie L. Servetas¹, Jason G. Kralj³, Keng Soh², Michalis Hadjithomas³, Raul Cano⁴, Martha Carlin⁴, Maria G. de Amorim⁵, Benjamin Auch⁶, Matthew G. Bakker⁷, Thais F. Bartelli⁵, Juan P. Bustamante^{10,8,9}, Ignacio Cassol⁸, Mauricio Chalita¹¹, Emmanuel Dias-Neto⁵, Aaron Del Duca¹², Daryl M. Gohl^{13,6}, Jekaterina Kazantseva¹⁴, Muyideen T. Haruna¹⁵, Peter Menzel¹⁶, Bruno S. Moda^{17,5}, Lorieza Neuberger-Castillo¹⁸, Diana N. Nunes⁵, Isha R. Patel¹⁹, Rodrigo D. Peralta^{10,8}, Adrien Saliou²⁰, Rolf Schwarzer¹⁶, Samantha Sevilla^{21,22}, Isabella K. T. M. Takenaka⁵, Jeremy R. Wang²³, Rob Knight²⁴, Dirk Gevers²⁵ & Scott A. Jackson¹

scientific reports (2024), 14: 9785.

●WHO(2023年)

- WHOが実施
- NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control; 英国)の20株の腸内細菌を混合したmock community (WC-Gut RR)を用いて様々なDNA抽出法を比較し評価
- 種構成のデータに基づきMinimum Quality Criteria (MQC)を設定
- WC-Gut RRをWHO国際標準試薬として提案



World Health
Organization

WHO/BS/2023.2455
ENGLISH ONLY

EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION
Geneva, 16 to 19 October 2023

A WHO collaborative study to evaluate the candidate WHO International
Reference Reagent for DNA extraction of the Gut Microbiome

Saba Anwar¹, Ryan Mate¹, Preni Sinnakandu¹, Laura Hassall¹, Sharon Tierney¹, Carmelina Vinci¹, Paul Matejtschuk¹, Kiran Malik¹, Carmen Coxon, Peter Rigsby¹, Chrysi Sergaki¹ and study participants²

<https://www.who.int/publications/m/item/who-bs-2023.2455>

プロトコルの評価のためには“ものさし”となる参照物質が必要不可欠

Mock Communityの開発と メタゲノム解析手法標準化の現在地

メタゲノム解析の精度を向上させ相互比較を実現する

大山良文^{*1}, 三浦隆匡^{*1}, 関口勇地^{*2}

(参考) 大山ら、化学と生物 Vol. 63, No. 8, 2025
→表1 現在世界で流通しているmock community と実サンプル
型標準試料

(参考) マイクロバイオーム検査に関する動き

●国際コンセンサス声明: **臨床**における マイクロバイオーム検査遵守すべき事

International consensus statement on microbiome testing in clinical practice

Serena Porcari, Benjamin H Mullish, Francesco Asnicar, Siew C Ng, Liping Zhao, Richard Hansen, Paul W O'Toole, Jeroen Raes, Georgina Hold, Lorenza Putignani, Christian Lodberg Hvas, Georg Zeller, Omry Koren, Hein Tun, Mireia Valles-Colomer, Maria Carmen Collado, Monika Fischer, Jessica Allegretti, Tariq Iqbal, Benoit Chassaing, Josbert Keller, Simon Mark Baunwall, Maria Abreu, Giovanni Barbara, Faming Zhang, Francesca Romana Ponziani, Sam P Costello, Sudarshan Paramsothy, Dina Kao, Colleen Kelly, Juozas Kupcinskas, Ilan Youngster, Francesco Franceschi, Sahil Khanna, Maria Vehreschild, Alexander Link, Flavio De Maio, Edoardo Pasolli, Aitor Blanco Miguez, Patrizia Brigidi, Brunella Posteraro, Franco Scaldaferri, Mirjana Rajilic Stojanovic, Francis Megraud, Peter Malferttheiner, Luca Masucci, Manimozhiyan Arumugam, Nadeem Kaakoush, Eran Segal, Jasmohan Bajaj, Rupert Leong, John Cryan, Rinse K Weersma, Robert Knight, Francisco Guarner, Fergus Shanahan, Patrice D Cani, Eran Elinav, Maurizio Sanguinetti, Willem M de Vos, Emad El-Omar, Joel Doré, Julian Marchesi, Herbert Tilg, Harry Sokol, Nicola Segata*, Giovanni Cammarota*, Antonio Gasbarrini*, Gianluca Ianiro*

The Lancet Gastroenterology & Hepatology (2024), 10: 154.

●一般財団法人腸内環境ヘルスケア協会

<https://gut-healthcare.or.jp/>

腸内細菌叢**検査サービス**自主規制ガイドライン

国内初の「腸内細菌叢検査サービス自主規制ガイドライン」を策定

～ 業界の品質向上と消費者保護へ、日本発の市場ルール形成が本格始動。国際展開も視野に ～

一般社団法人腸内環境ヘルスケア協会 2025年10月23日 11時00分

101



<https://prtimes.jp/main/html/rd/p/0000000002.000153502.html>

共通点

・標準化の必要性

Lancet: 検査とレポートの必須項目・禁止項目を提言
ガイドライン: 自社内SOPや精度管理を義務化

・科学的エビデンス重視

・患者・消費者の保護・誤解防止

・教育・情報提供



MQC設定や精度管理にmock communityは非常に有効

相違点

・対象領域

・枠組み

Lancet: 国際標準化・規制を提言

ガイドライン: 自主規制＋認証制度検討

・エビデンスの扱い

NBRCヒト常在微生物カクテルとプロトコル検証例

2022年1月13日 提供開始
ヒトマイクロバイオーム研究開発をサポート

NBRCヒト常在微生物カクテル

糞便・口腔・皮膚などの
常在菌を中心とした20種類の微生物で構成

NBRCヒト常在微生物カクテルに含まれる20種の微生物

品名	学名	NBRC番号	グラム	サイズ	GC	16S rRNA	16S rRNA
糞便	■ <i>Anaerostipes cacciae</i>	114412	陽性	3.3	44.5	4	1
	■ <i>Bifidobacterium longum</i>	114370	陽性	2.6	60.1	5	1
	■ <i>Bifidobacterium longum subsp. longum</i>	114494	陽性	2.5	60.1	4	1
	■ <i>Blautia</i> sp.	113351	陽性	6.2	46.7	5	1*
	■ <i>Collinsella aerofaciens</i>	114504	陽性	2.3	60.3	5	1*
	■ <i>Enterocloster clostridioformis</i>	113352	陽性	5.7	48.9	5	1*
	■ <i>Flavonifractor plautii</i>	113805	陽性	4.3	60.4	3	1
	■ <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii</i>	32027	陽性	1.9	50.1	8	1
	■ <i>Ruminococcus gnavus</i>	114413	陽性	3.8	42.5	5	1
	■ <i>Akkermansia muciniphila</i>	114322	陰性	2.8	55.7	3	1
口腔	■ <i>Bacteroides uniformis</i>	113350	陰性	5.0	46.2	4	1*
	■ <i>Escherichia coli</i> (K-12株)	3301	陰性	4.8	50.8	7	1
	■ <i>Megamonas funiformis</i> (DNA-Mock-003 の3%)	114415	陽性	2.5	31.5	6	1
	■ <i>Megasphaera massiliensis</i> (DNA-Mock-003 の3%)	114414	陽性	2.6	50.6	7	1
	■ <i>Parabacteroides distasonis</i>	113806	陰性	5.2	45.0	7	1*
	■ <i>Streptococcus mutans</i>	139557	陽性	2.0	36.9	5	1*
	■ <i>Corynebacterium acnes subsp. acnes</i>	113869	陽性	2.6	60.0	3	1*
	■ <i>Staphylococcus epidermidis</i>	113846	陽性	2.5	32.2	6	1*
	■ <i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	137197	陽性	4.3	43.3	10	1
	■ <i>Pseudomonas putida</i>	141647	陰性	6.2	62.3	7	1*

※ 16S rRNA配列の類似度は、NCBI GenBankデータベースのBLAST検索結果に基づく。

- 日本人のヒトマイクロバイオームを模したカクテル(mock community)
- NEDO「新産業創出新技術先導研究プログラム」ヒトマイクロバイオームの産業利用に向けた解析技術および革新的制御技術の開発(2018～2020年)において、日本マイクロバイオームコンソーシアム(JMBC)から公開されている**日本人のヒトマイクロバイオーム解析の推奨プロトコル**^{1,2)}策定のために開発されました。
- 本カクテルは、**推奨プロトコルの検証に最適な参照用サンプル**です³⁾。

- 1) Tourlousse, D.M., et al., Microbiome, 9, 95 (2021).
- 2) <https://jmabc.life/news/images/SOPv1.2.pdf>
- 3) Tourlousse, D.M., et al., Microbiology Spectrum, 10(2): e01915-21 (2022).



菌体カクテル Cell-Mock-003

内容量	500 μL
保存溶媒	15% glycerol in PBS (pH7.4)
含有量	2 x 10 ¹⁰ cells/500 μL
保存形態	凍結 (-80℃)



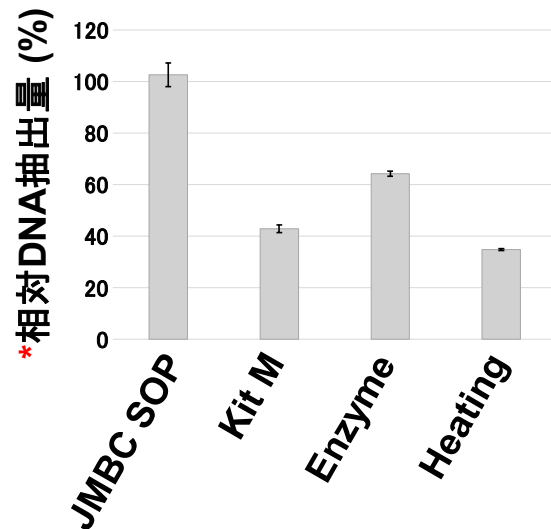
DNAカクテル DNA-Mock-003

内容量	30 μL
保存溶媒	10 mM Tris-HCl (pH8.5)
含有量	1500 ng/30 μL
保存形態	凍結 (-80℃)

DNA抽出方法の違いが生むバイアス

NBRCヒト常在菌菌体カクテル

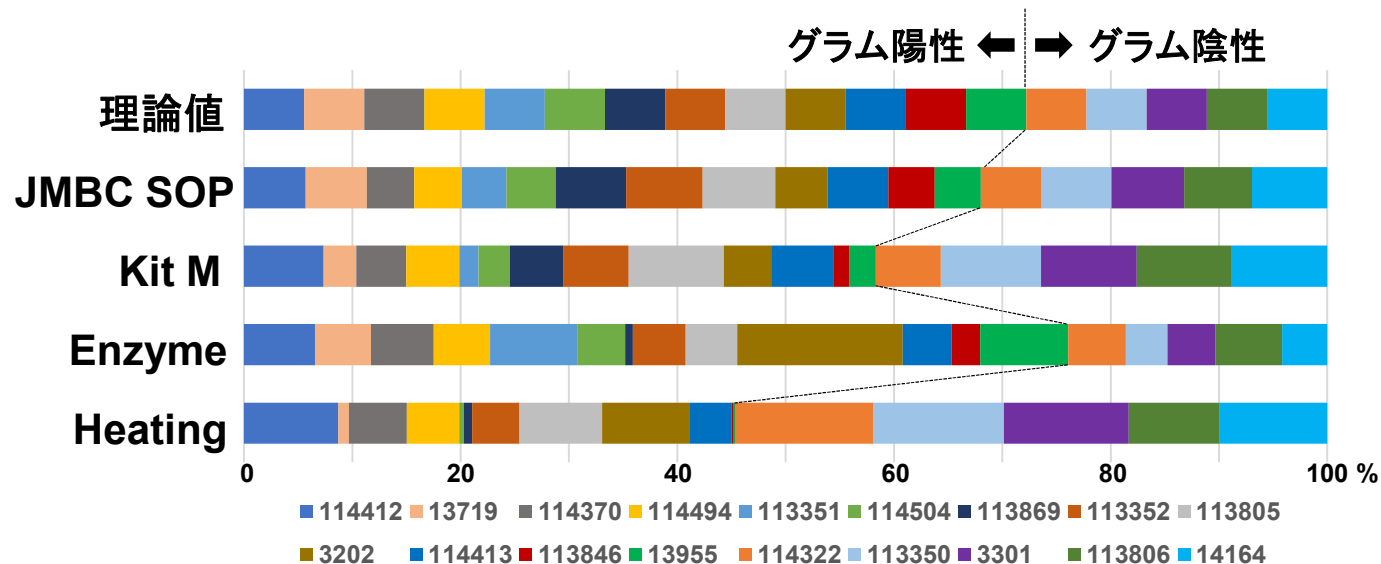
DNA抽出量



DNA
抽出方法

*DNA抽出方法ごとの構造的な抽出ロスは考慮していない

ショットガン解析

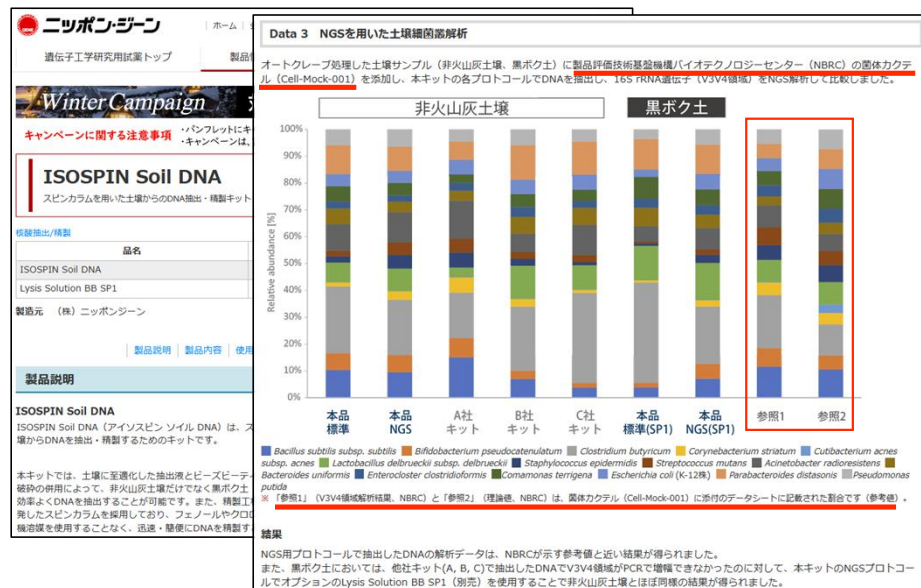


mock communityを用いることで、実験バイアスの存在が明らかとなる

NBRC微生物カクテルの使用例

nite

●製品・サービスの性能を評価するための参照サンプルとして



<https://www.nippongene.com/siyaku/product/extraction/isospin-soil-dna/isospin-soil-dna.html>

株式会社

生物技研

Bioengineering Lab

リーズナブルな価格 & 短納期の遺伝子解析サービス

お知らせ

PacBio Sequel IIを利用したロングアンプリコン解析のサービス変更（良くなります）

2023.01.24

お知らせ

PacBio Sequel IIを利用したロングアンプリコン解析のサービス変更（良くなります）

<https://gikenbio.com/news/pacbio-sequel-ii%e3%82%92%e5%88%a9%e7%94%a8%e3%81%97%e3%81%9f%e3%83%ad%e3%83%b3%e3%82%b0%e3%82%a2%e3%83%b3%e3%83%97%e3%83%aa%e3%82%b3%e3%83%b3%e8%a7%a3%e6%9e%90%e3%81%ae%e3%82%b5%e3%83%bc%e3%83%93/>

●解析方法のバリデーションに利用

Original

J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn. 57(3): 224-233

Investigation of the Relationship between Skin Condition and Bacterial Counts by Establishing a Method for Quantifying the Bacteria per Unit Area of Facial Skin

Seiko Ota^{1*}, Ruka Suzuki¹, Ikuko Aoki¹, Osamu Sakata¹, Tsuyoshi Hata¹

¹Research Laboratories, Kosé Corporation, 48-18, Sakae-cho, Kita-ku, Tokyo, 114-0005, JAPAN

日本化粧品技術者会誌 (2023), 57(3): 224-233.

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY

Microbiology Spectrum

Check for updates

Human Microbiome | Research Article

Optimal 16S rRNA gene amplicon sequencing analysis for oral microbiota to avoid the potential bias introduced by trimming length, primer, and database

Takahiko Nagai,¹ Takahiko Shiba,¹ Keiji Komatsu,² Takayasu Watanabe,² Takashi Nemoto,¹ Shogo Maekawa,¹ Ryota Kobayashi,¹ Shunsuke Matsumura,¹ Yujin Ohsugi,¹ Sayaka Katagiri,¹ Yasuo Takeuchi,² Takanori Iwata¹

Microbiology Spectrum (2024), 12: e03512-23.

1. マイクロバイオーム解析の広がりと課題

2. NBRC皮膚常在微生物カクテルの開発

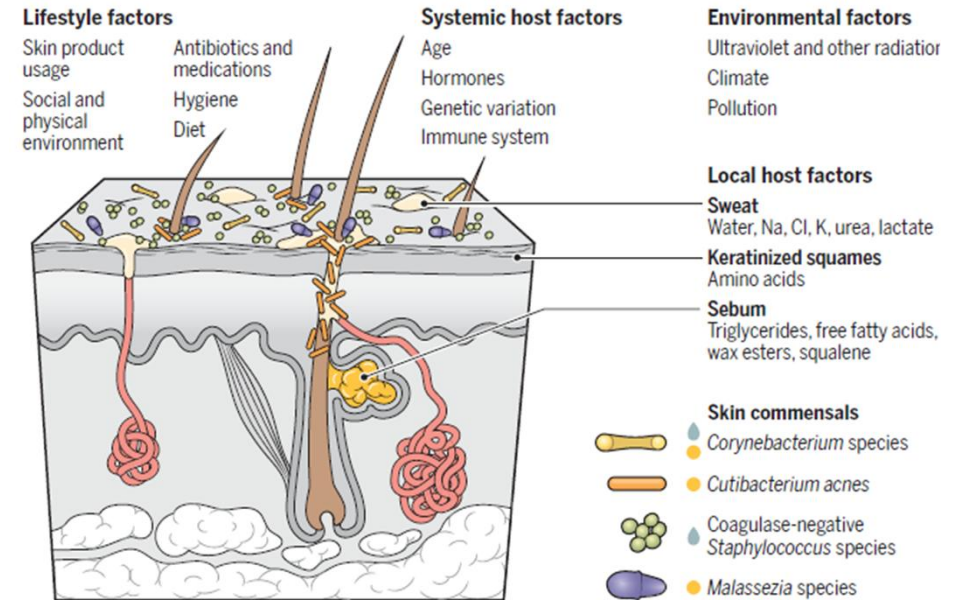
皮膚とは？

- 体の表面全体に広がる組織(器官)
- 外環境との境界面
- 環境が極めて多様
(乾燥、湿潤、油性)

皮膚の微生物叢のはたらき

- 皮膚の保護
- 健康(美容)
- 病気
(アレルギー、ニキビ、水虫、
疣贅、頭垢、脱毛)

特有の
微生物叢
を育む



Harris-Tryon and Grice, Science (2022) 376:940-945.

Forensic identification using skin bacterial communities

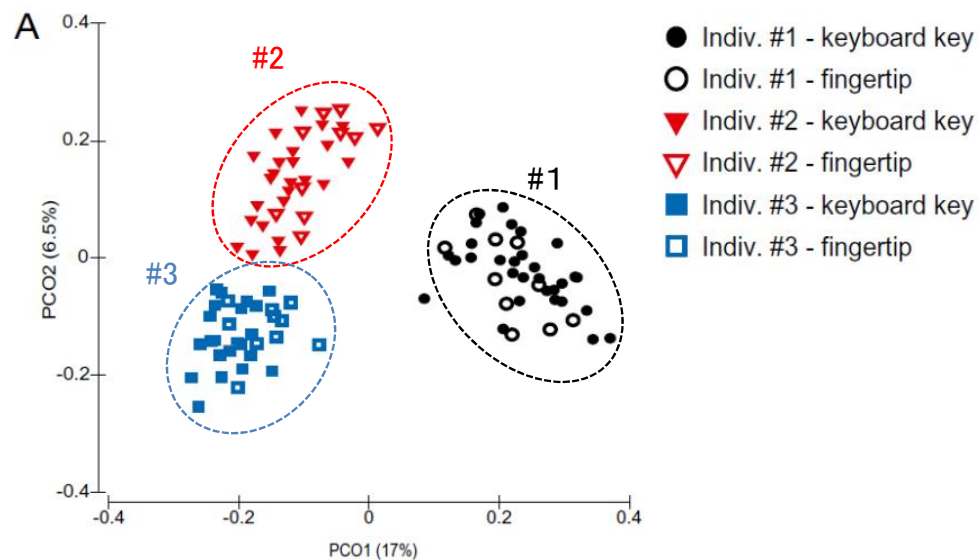
Noah Fierer^{a,b,1}, Christian L. Lauber^b, Nick Zhou^b, Daniel McDonald^c, Elizabeth K. Costello^c, and Rob Knight^{c,d}

^aDepartment of Ecology and Evolutionary Biology, ^bCooperative Institute for Research in Environmental Sciences, and ^cDepartment of Chemistry and Biochemistry, University of Colorado, Boulder, CO 80309; and ^dHoward Hughes Medical Institute

Edited by Jeffrey I. Gordon, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, and approved February 13, 2010 (received for review January 05, 2010)

PNAS (2010) 107:6477-6481.

人の指と使用しているキーボードに存在する微生物叢の類似性



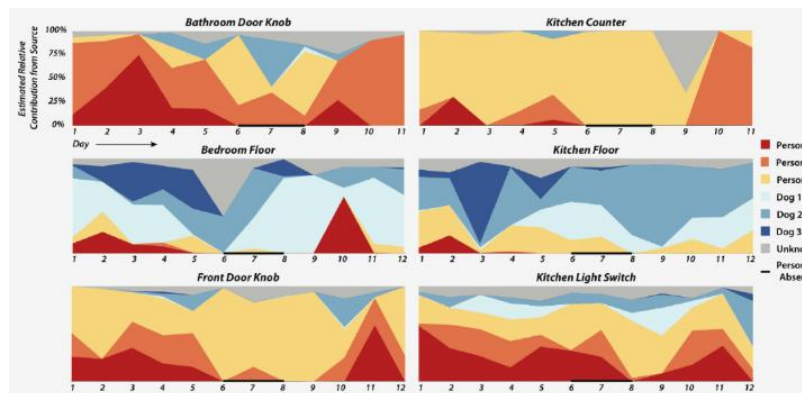
法医学へのメタゲノムの応用 (究極の個人鑑定法)



- 指とキーボードの微生物叢は類似性が高い
- 但し、個人間では大きく異なる

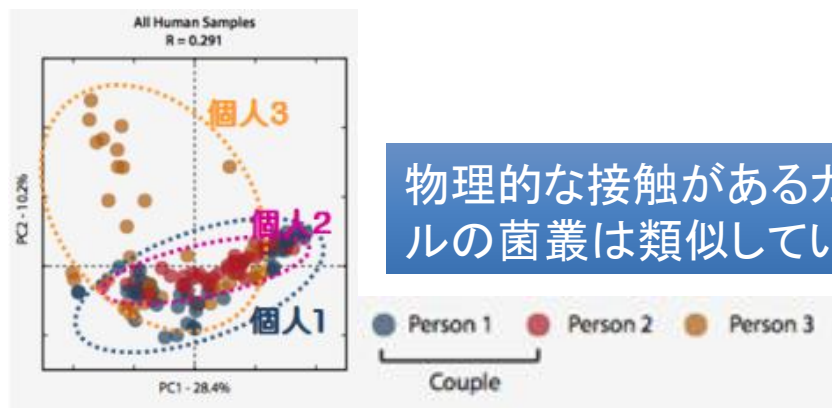
Simon Lax,^{1,2*} Daniel P. Smith,^{1,2,3*} Jarrad Hampton-Marcell,^{1,2} Sarah M. Owens,^{2,4}
Kim M. Handley,^{1,2} Nicole M. Scott,^{1,2} Sean M. Gibbons,^{2,5} Peter Larsen,^{6,7}
Benjamin D. Shogan,⁸ Sophie Weiss,^{9,10} Jessica L. Metcalf,⁹ Luke K. Ursell,^{9,11}
Yoshiki Vázquez-Baeza,^{9,11,12} Will Van Treuren,⁹ Nur A. Hasan,^{13,14} Molly K. Gibson,^{15,16,17}
Rita Colwell,^{13,14} Gautam Dantas,^{15,16,17} Rob Knight,^{9,11,18} Jack A. Gilbert,^{1,2,5,1}

Science (2014) 345:1048-1052.

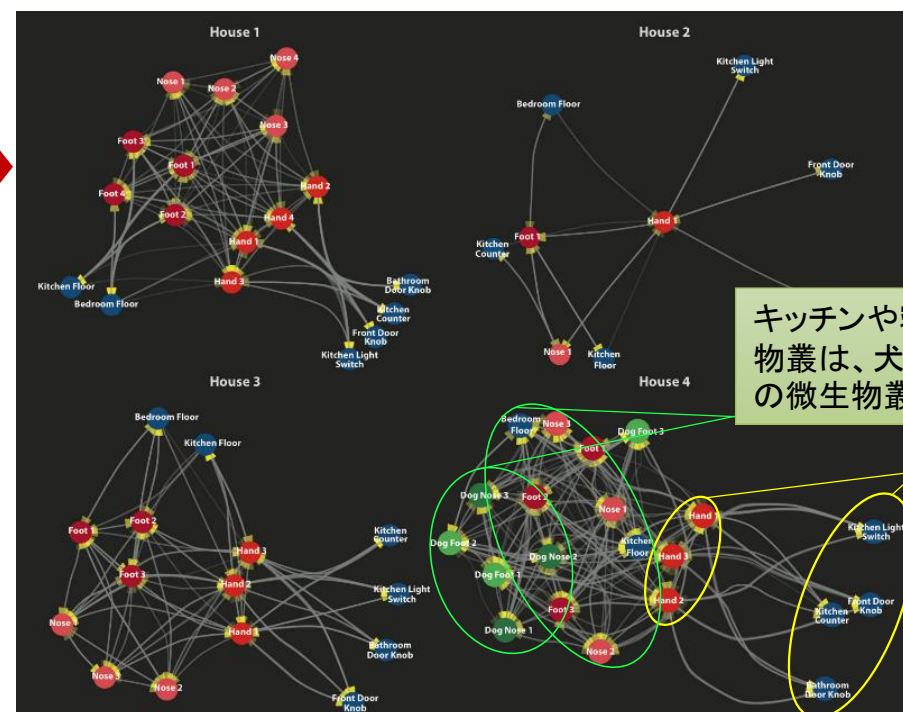


House 4の室内の床は
犬由来の微生物まみれ！

- 家の微生物叢は住人の微生物叢の平均
- 新しい家に引っ越しても、その家の微生物叢は家族の微生物叢へと変化
- どの家に住んでいるのか、住人の微生物叢を調べれば推察可能



物理的な接触があるカップルの菌叢は類似している。



キッチンや寝室の床の微生物叢は、犬と人の足(鼻も?)の微生物叢と近い

スイッチやドア
ノブの微生物叢
は、人の手の微
生物叢と近い

皮膚とは？

- 体の表面全体に広がる組織(器官)
- 外環境との境界面
- 環境が極めて多様
(乾燥、湿潤、油性)

皮膚の微生物叢のはたらき

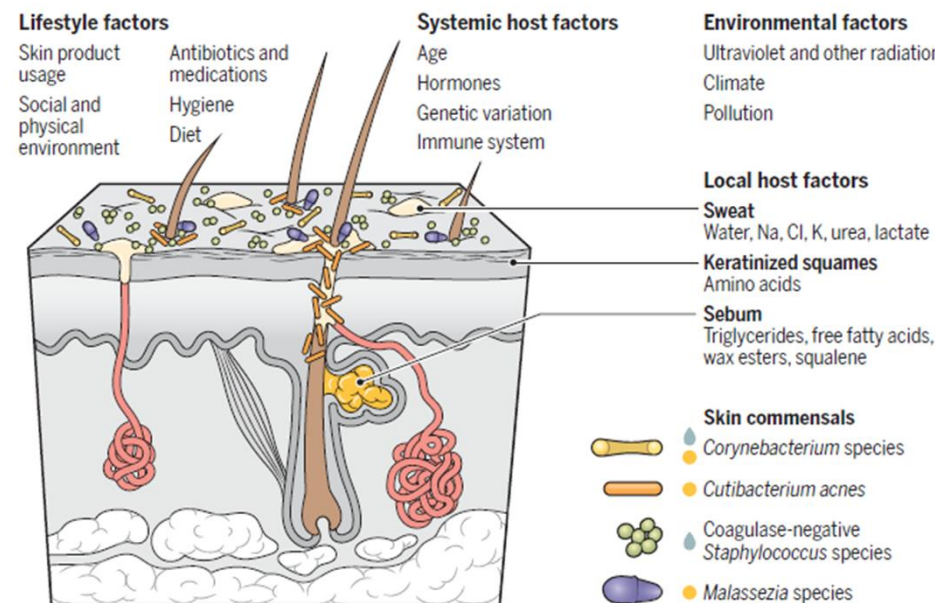
- 皮膚の保護
- 健康(美容)
- 病気
(アレルギー、ニキビ、水虫、
疣贅、頭垢、脱毛)



個人識別の可能性
住環境の菌叢制御の可能性

皮膚マイクロバイオーーム研究の
価値/将来性は極めて高い

特有の
微生物叢
を育む



Harris-Tryon and Grice, Science (2022) 376:940-945.

皮膚マイクロバイオーームの特徴(糞便との比較)

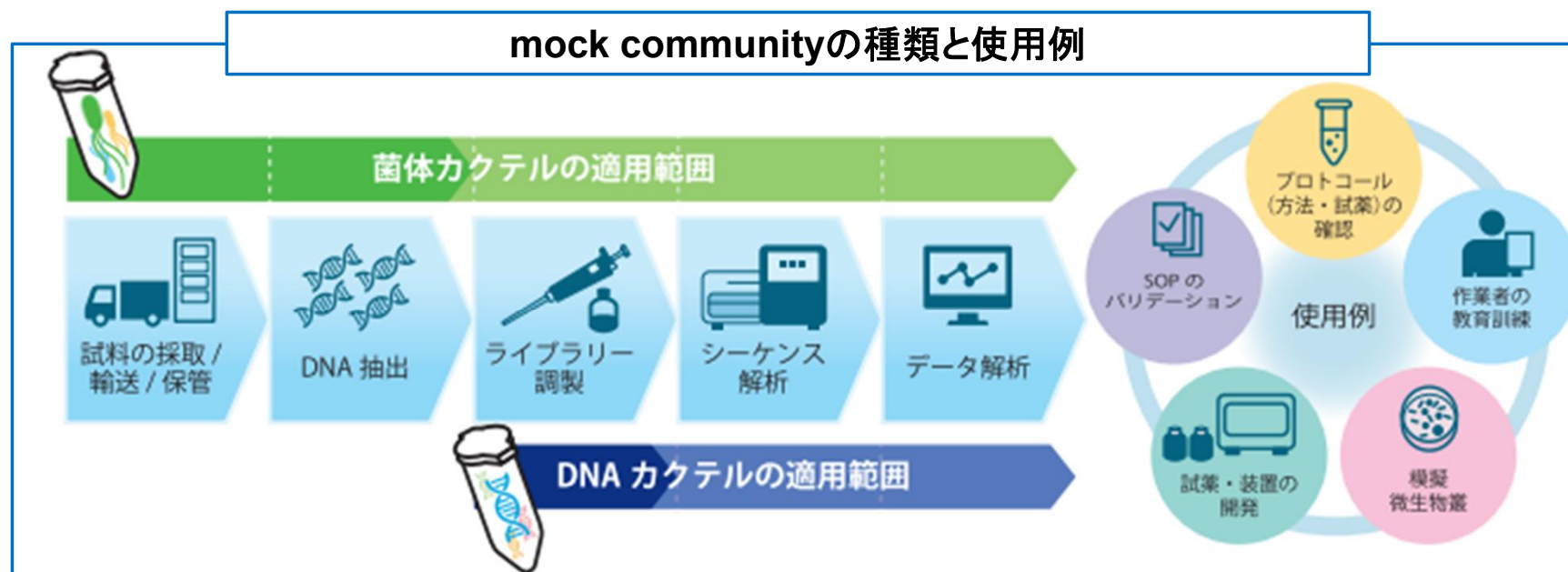
- ・ **真菌がいる**(細胞数測定が極めて困難)
- ・ 菌密度が低い
($10^5 > \text{cells/cm}^2 \Leftrightarrow 10^7\text{-}10^{12} \text{ cells/g}$; 腸管)

本開発の目的: 皮膚マイクロバイオーーム解析の課題への対応

- 皮膚においては、真菌が比較的多く存在する・他の部位に比べサンプリングが複雑など、糞便と比較して課題が多いと考えられる。
- この課題の克服には、精度管理用のmock communityや解析用推奨プロトコルが必要である。
- これまでの知見を生かし、mock communityや皮膚マイクロバイオーーム解析の推奨プロトコルの開発を目指した。



mock communityの開発
推奨プロトコルの開発



Mock communityの開発: 混合する18種の選定

Oh J et. Al., Nature. 514:59–64 (2014)

Shibagaki N et. Al., Scientific Reports. 7:10567 (2017)

NITEが取得した独自データ

日本人(アジア人含む)の皮膚に
棲息する微生物種の選定

			グラム染色	BSL	GC含量 (%)	ゲノムサイズ (Mbp)
細菌	● <i>Anaerococcus nagsya</i>	NBRC 113824	⊕	1*	30.7	1.9
	● <i>Finegoldia magna</i>	NBRC 113804	⊕	1*	32.1	1.7
	● <i>Staphylococcus capitis</i>	NBRC 115779	⊕	1*	32.8	2.5
	● <i>Staphylococcus epidermidis</i>	NBRC 113846	⊕	1*	32.1	2.5
	● <i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>	NBRC 113928	⊕	1*	31.8	2.3
	● <i>Streptococcus salivarius</i>	NBRC 13956	⊕	1*	39.9	2.1
	● <i>Corynebacterium pseudogenitalium</i>	NBRC 113660	⊕	1	59.5	2.5
	● <i>Corynebacterium striatum</i>	NBRC 15291 ^T	⊕	1*	59.1	3.1
	● <i>Cutibacterium acnes</i> subsp. <i>acnes</i>	NBRC 113869	⊕	1*	60.0	2.6
	● <i>Acinetobacter radioresistens</i>	NBRC 102413 ^T	⊖	1*	41.4	3.4
	● <i>Escherichia coli</i>	NBRC 3301	⊖	1	50.8	4.8
	● <i>Moraxella osloensis</i>	NBRC 115781	⊖	1*	43.3	2.9
	● <i>Pseudomonas putida</i>	NBRC 14164 ^T	⊖	1*	62.3	6.2
	● <i>Roseomonas mucosa</i>	NBRC 115778	⊖	1*	70.5	4.9
真菌	● <i>Aspergillus brunneoviolaceus</i>	NBRC 4062		1	50.8	36.1
	● <i>Candida tropicalis</i>	NBRC 1404		1	33.2	14.6
	● <i>Trichophyton rubrum</i>	NBRC 9185		1	48.3	22.1
	● <i>Malassezia globosa</i>	NBRC 101597		1	52.0	9.1

● *Bacillota*

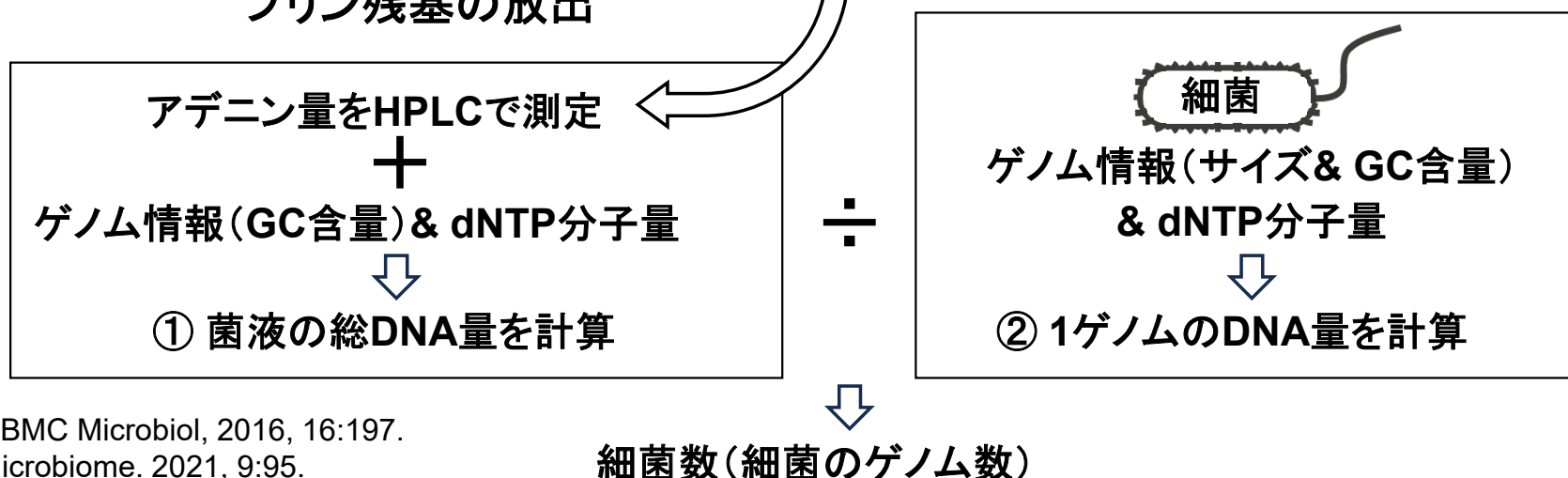
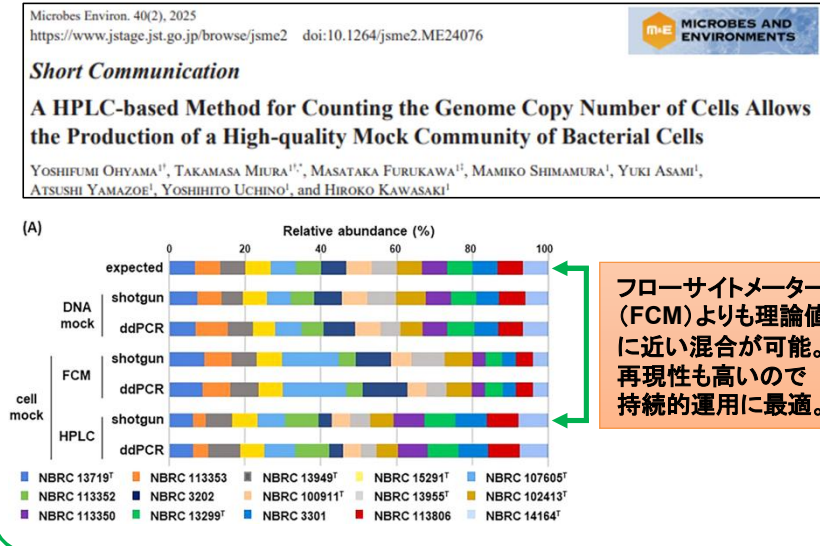
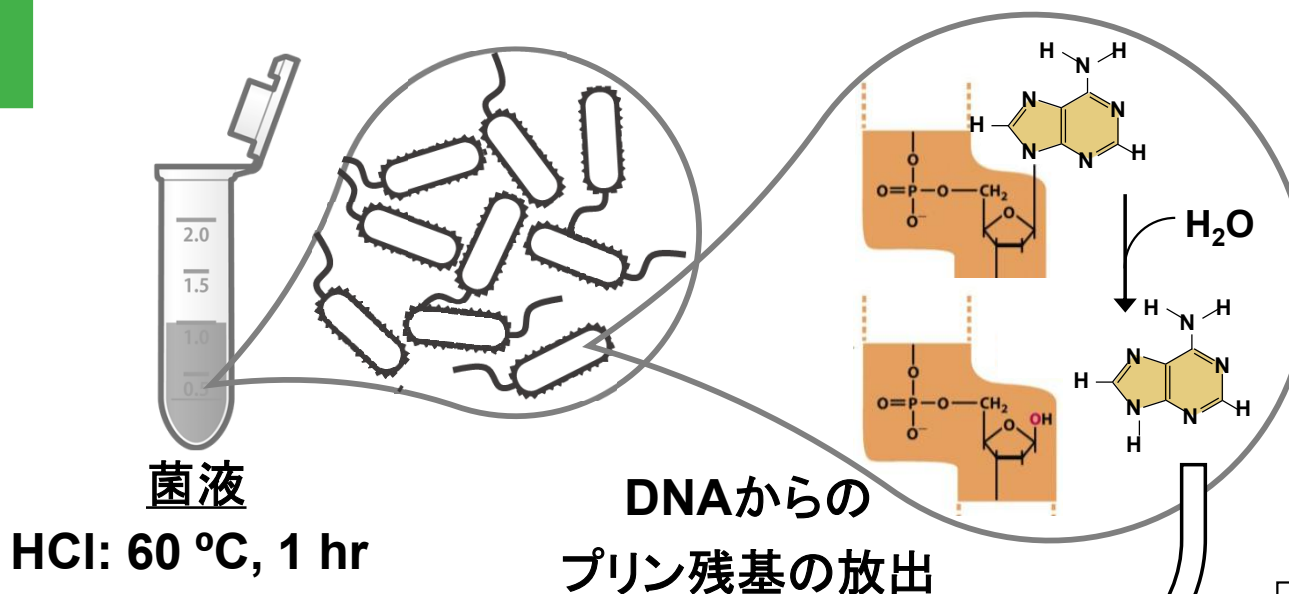
● *Actinomycetota*

● *Pseudomonadota*

● *Ascomycota*

● *Basidiomycota*

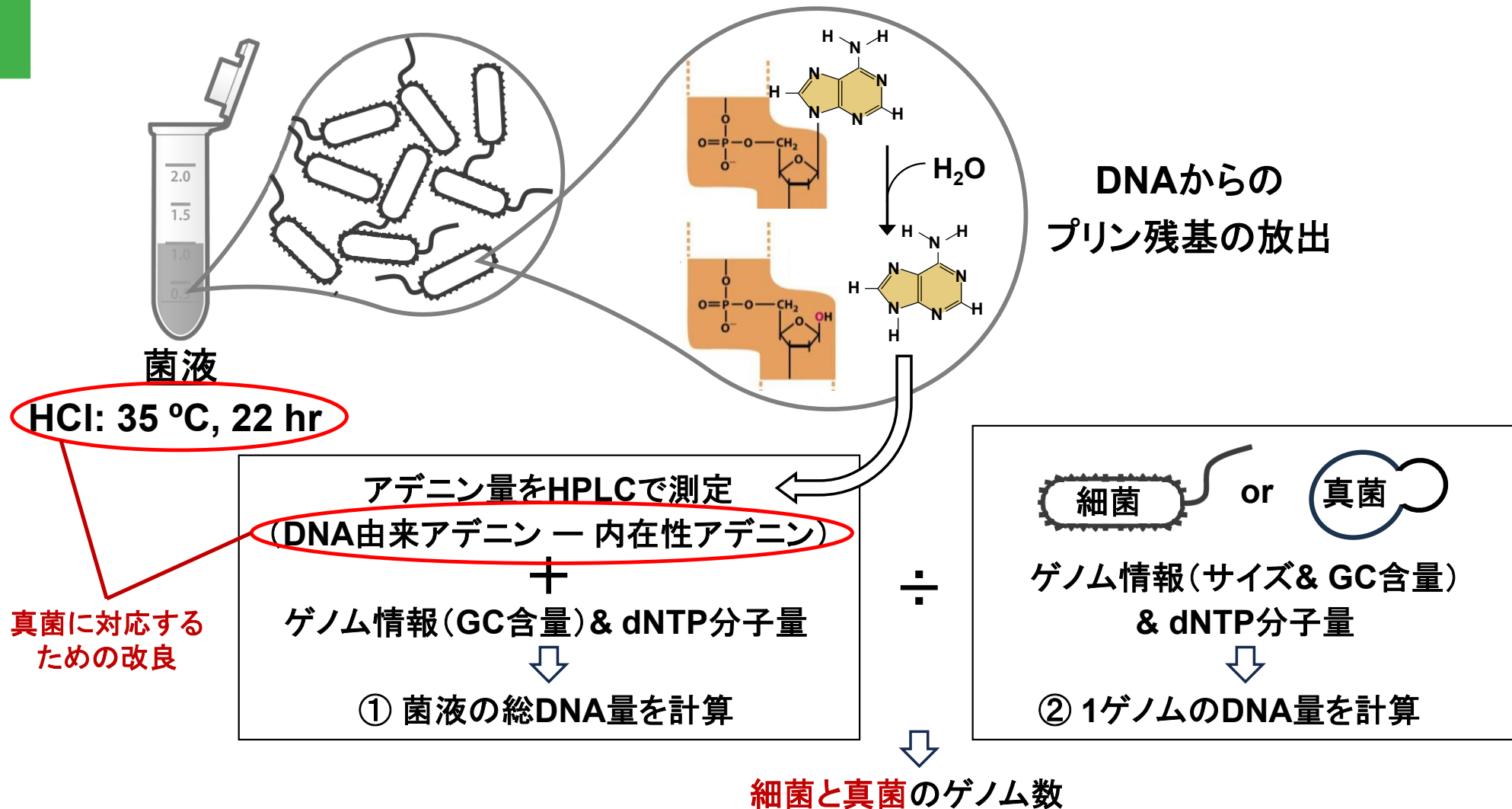
Mock communityの開発:細胞数を定量するためのアデニン-HPLC法



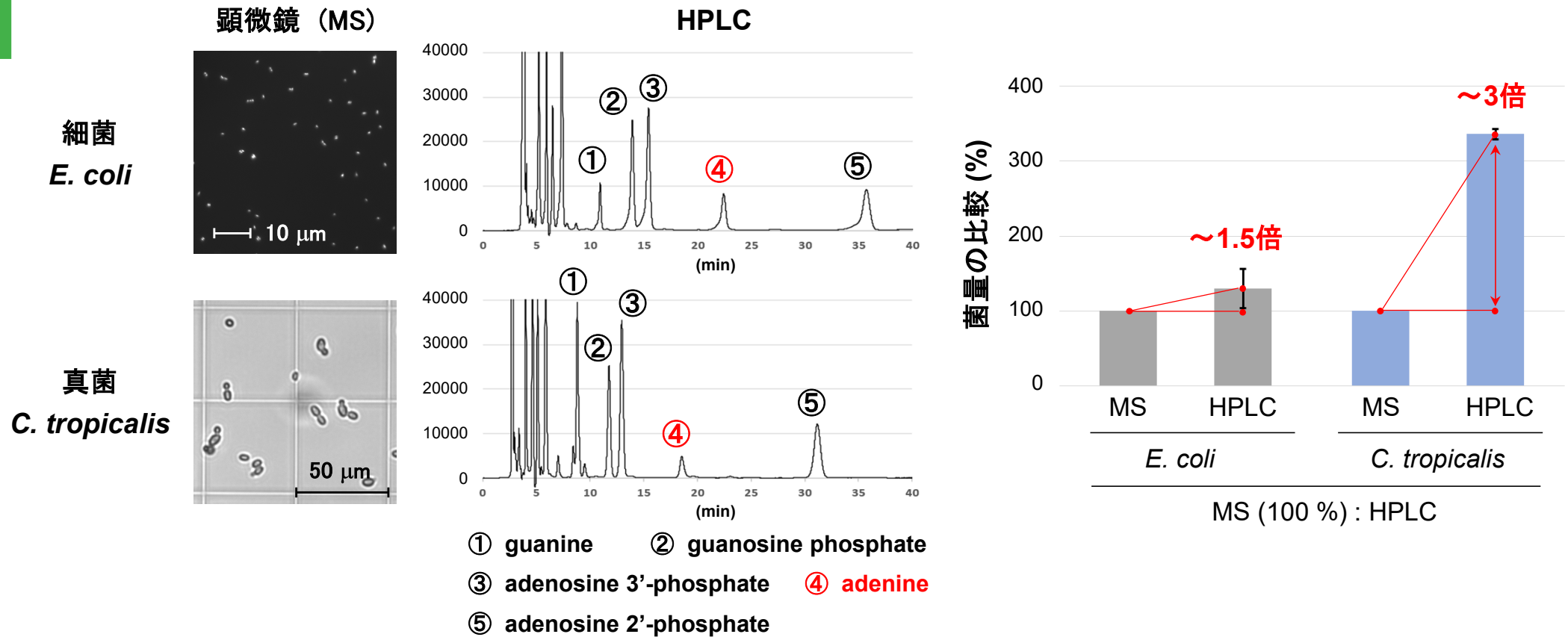
de Bruin and Birnboim, BMC Microbiol, 2016, 16:197.
Toursioulas DM et al., Microbiome. 2021, 9:95.
Ohyama et al., Microbes Environ. 2025, 40:ME24076.

Mock communityの開発: 細胞数を定量するためのアデニン-HPLC法の改良

nite



Mock communityの開発:新アデニン-HPLC法による細菌と真菌の定量



*E. coli*を一倍体、*C. tropicalis*を二倍体と仮定すると、細胞が保持する平均ゲノム数は、*E. coli* ~1.5、*C. tropicalis* ~3 と考えられるので、HPLC測定値と良く一致している。

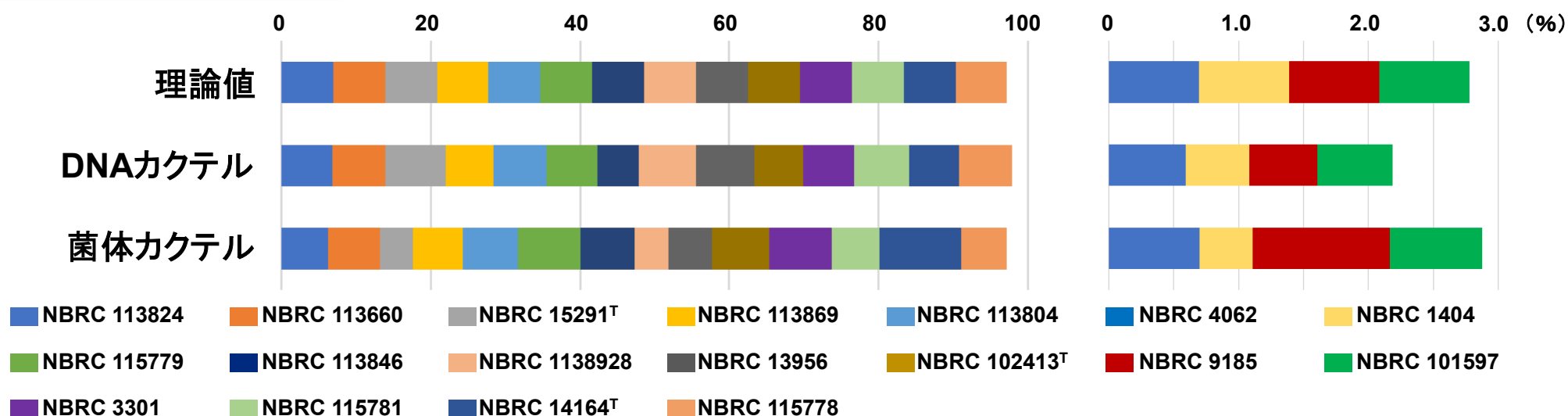
Mock communityの開発：皮膚常在微生物カクテルの作製

皮膚常在微生物カクテル		これまでの微生物カクテル	
細菌：真菌 = 10：1		細菌のみ等量	
DNAカクテル：	50 ng/μL	=	50 ng/μL
菌体カクテル：	1.0×10^8 cells/100 μL	<	4.0×10^9 cells/100 μL

皮膚常在微生物カクテル

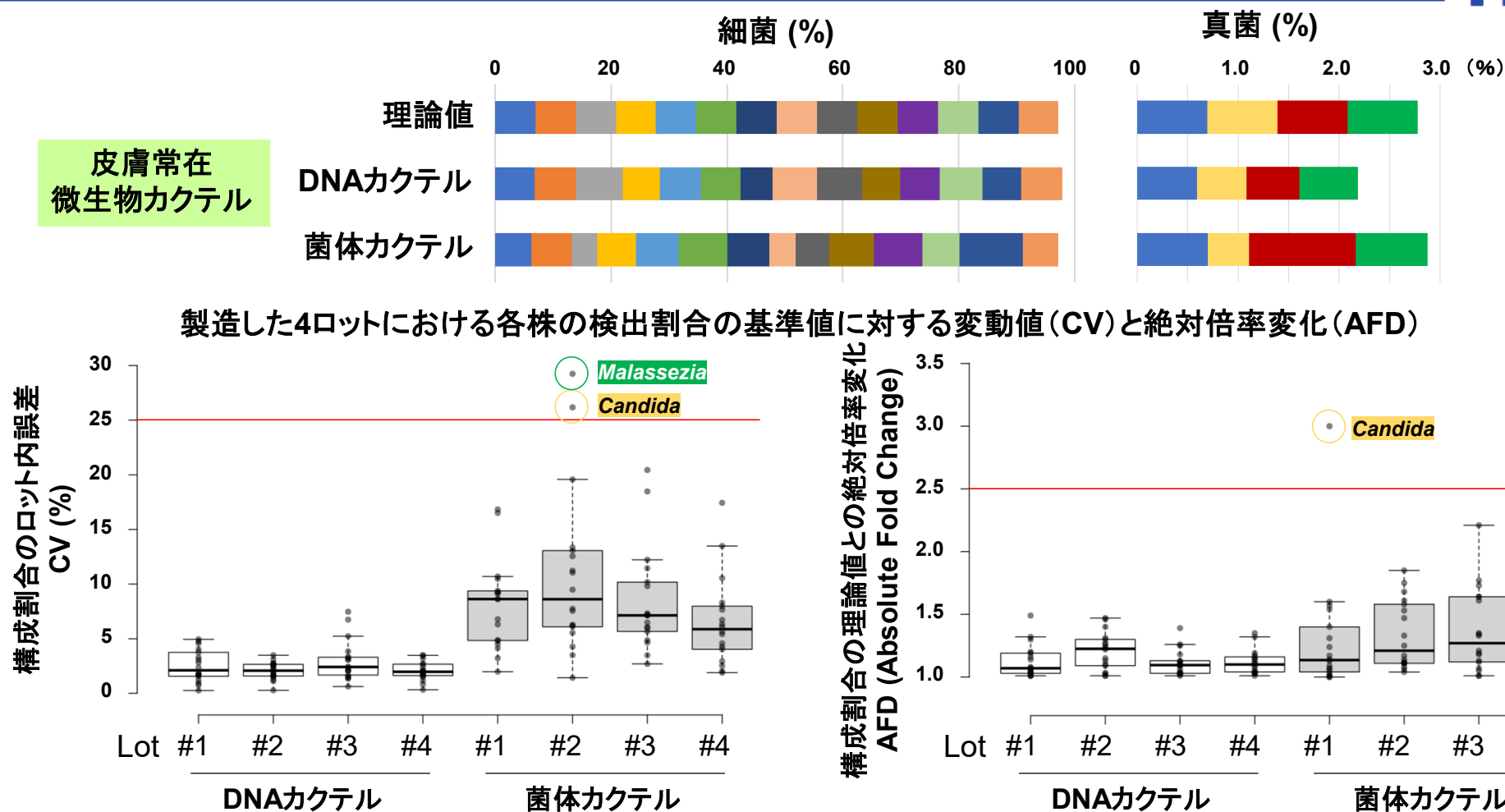
細菌 (%)

真菌 (%)



Droplet digital PCRによる各株の検出割合

Mock communityの開発：皮膚常在微生物カクテルの作製



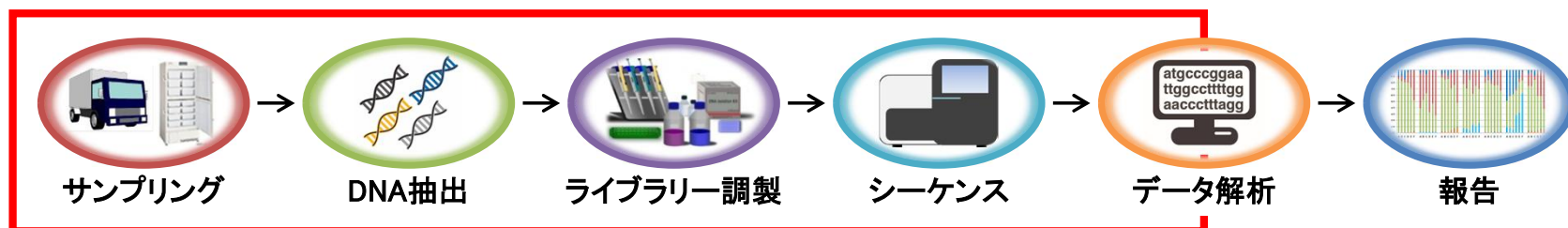
新アデニン-HPLC法により
真菌を含む菌体カクテルを高い精度で作製できた

皮膚マイクロバイオーーム解析の推奨プロトコルの開発

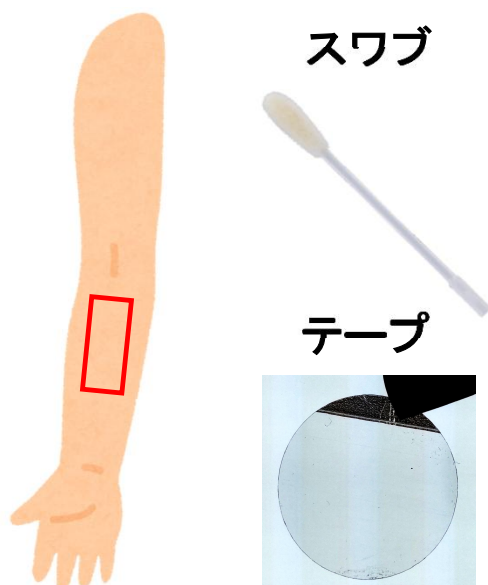


skin_ver.1.3.pdf

<https://jmabc.life/sop/index.html>



皮膚からのサンプルング



モデル皮膚実験

NBRC皮膚
常在微生物
カクテル



2倍
希釈

バイオスキンプレート



僅少サンプルからのDNA抽出

- ・ サンプルブロッキング
- ・ ヒトDNAの除去

僅少DNAからのライブラリー調製

- ・ ショットガン解析
- ・ アンプリコン解析
 - ・ 細菌: 16S rRNA
 - ・ 真菌: ITS or D1D2

イルミナシーケンシングとクオリティコントロール

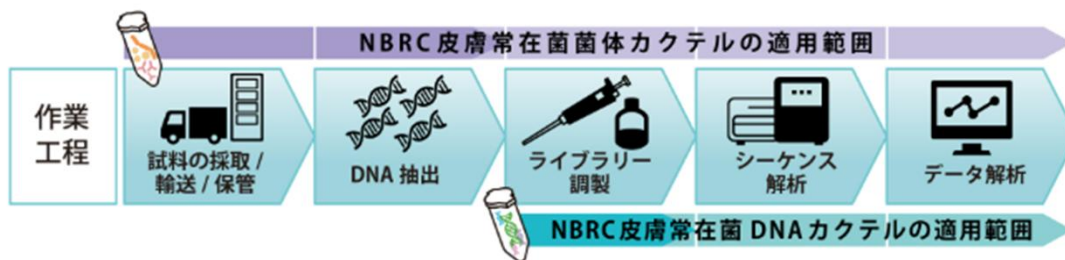
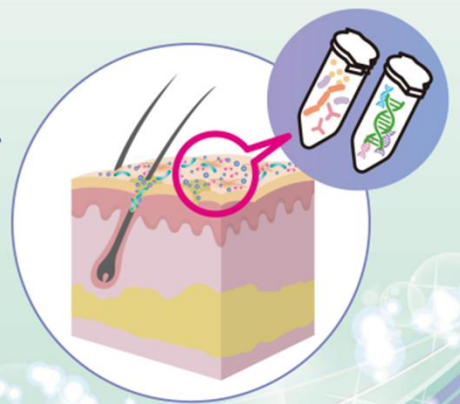
日本初！カビと酵母を含むモックコミュニティ



NBRC 皮膚常在微生物カクテル

様々な皮膚疾患に加え、美容や肌悩みに皮膚マイクロバイオームが深く関与していることが明らかになり始めています。健康長寿社会に向けた生活の質向上には、今後の皮膚マイクロバイオーム研究の進展が欠かせません。NBRCは、皮膚マイクロバイオーム研究に用いる計測用レファレンス（ポジティブコントロール）として、NBRC皮膚常在微生物カクテルを開発しました。解析手法の評価やデータの精度管理にご利用ください。

本カクテルは、皮膚に常在する細菌14種と真菌4種から構成されており、菌体を混合した「NBRC皮膚常在菌菌体カクテル」とゲノムDNAを混合した「NBRC皮膚常在菌DNAカクテル」の2種類があります。

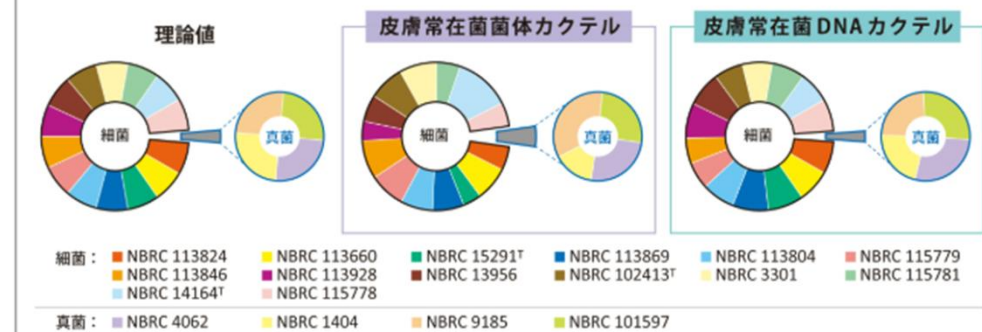


NBRC皮膚常在微生物カクテルのラインナップ



	NBRC皮膚常在菌菌体カクテル Cell-Mock-004	NBRC皮膚常在菌DNAカクテル DNA-Mock-004
内容量	500 μ L	30 μ L
手数料（送料別）	¥ 19,140（税込み）	¥ 51,150（税込み）
含有量	5×10^8 cells/500 μ L	1,500 ng/30 μ L
保存溶媒	15 % glycerol in PBS (pH 7.4)	10 mM Tris-HCl (pH 8.5)
保存形態	凍結（-80 $^{\circ}$ C）	凍結（-80 $^{\circ}$ C）

デジタル PCR による検証結果



<https://www.nite.go.jp/nbrc/industry/microbiome/skinmock.html>

●アプリケーション例

菌叢解析におけるコントロール

<https://www.nite.go.jp/data/000099959.pdf>

試薬・キットの開発におけるコントロール

<https://www.nite.go.jp/data/000101145.pdf>

事業所・作業者ごとの精度管理用サンプル

<https://www.nite.go.jp/data/000101285.pdf>

ご不明な点がありましたらお気軽にご連絡ください。

〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8
独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE)
バイオテクノロジーセンター(NBRC)

(お問い合わせはこちら)

バイオ技術評価・開発課

E-mail: bio-sangyo-inquiry@nite.go.jp

TEL: 0438-20-5764

URL: <https://www.nite.go.jp/nbrc/industry/microbiome/index.html>

以下、参考

課題(採取方法): 皮膚マイクロバイオーム解析手法の検証例1

A Comparison of Techniques for Collecting Skin Microbiome Samples: Swabbing Versus Tape-Stripping

Kazuhiro Ogai^{1†}, Satoshi Nagase^{2†}, Kanae Mukai³, Terumi Iuchi^{3‡}, Yumiko Mori², Miki Matsue², Kayo Sugitani², Junko Sugama^{3,4} and Shigefumi Okamoto^{1,2*}

[†] Wellness Promotion Science Center, Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa University, Kanazawa, Japan, ² Department of Clinical Laboratory Science, Faculty of Health Sciences, Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa University, Kanazawa, Japan, ³ Department of Clinical Nursing, Faculty of Health Sciences, Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa University, Kanazawa, Japan, ⁴ Advanced Health Care Science Research Unit, Innovative Integrated Bio-Research Core, Institute for Frontier Science Initiative, Kanazawa University, Kanazawa, Japan

Front. Microbiol. (2018) 9:2362

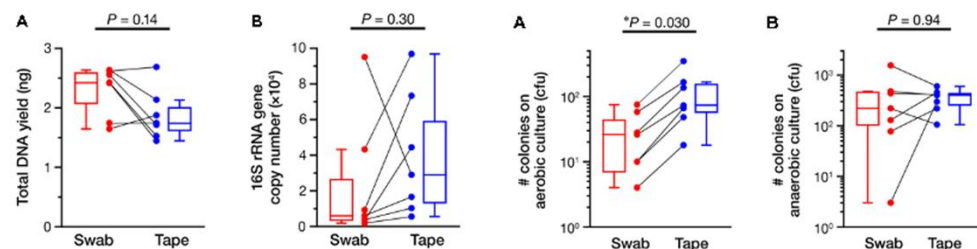


FIGURE 1 | Yield of total DNA and 16S rRNA gene. (A) The amount of total DNA collected using the swabbing and tape-stripping methods. (B) The copy number of the 16S rRNA gene obtained by the swabbing and tape-stripping methods. The data points of the swabbing and tape-stripping methods from the same participant are connected.

FIGURE 5 | The number of colonies in the culture study. The number of colonies cultured under aerobic (A) and anaerobic (B) conditions were counted. The data points of the swabbing and tape-stripping methods from the same participant are connected. * $P < 0.05$. cfu, colony forming unit.

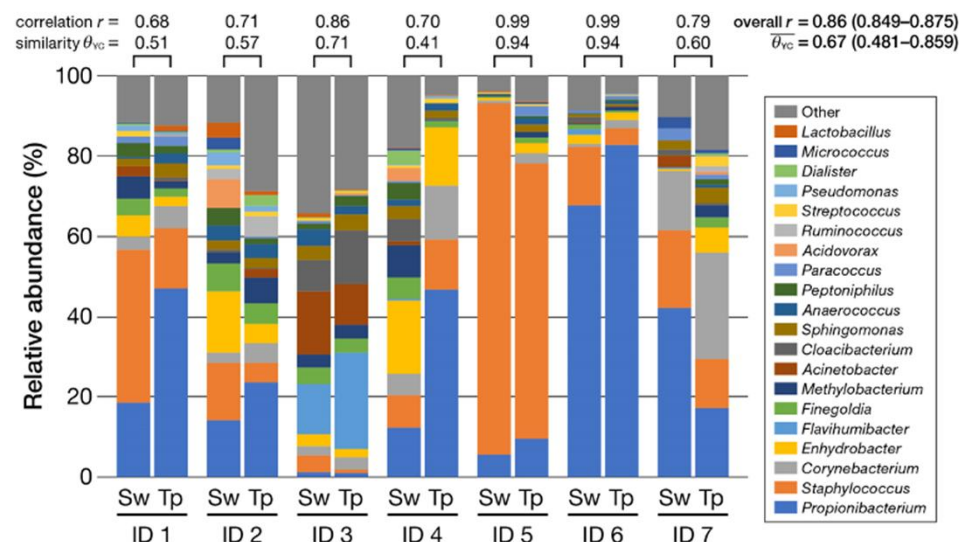


FIGURE 2 | Relative abundance of bacteria classified at the genus level (top 20). Note the high similarity between the swabbing and tape-stripping methods within each participant, indicated by the Yue and Clayton theta index (θ_{VC}) and Pearson's correlation coefficient (r). Sw, swabbing method; Tp, tape-stripping method.

- スワブ法とテープストリッピング法を比較
- NGSでは両者の微生物組成はほぼ同等
- 培養ではテープ法がより多くの生菌を回収
- 臨床応用や生菌培養を考慮する場合、テープ法が有利

課題(採取方法): 皮膚マイクロバイオーーム解析手法の検証例2

A noteworthy issue: microbiome data variation depending on sampling methods in skin microecology studies in acne vulgaris patients

De-Tian Xu^{1,2†}, Qi Chen^{1†}, Jia-Yi Yang³, Guo-Rong Yan¹, Ling-Lin Zhang¹, Xiao-Jing Liu¹, Pei-Ru Wang¹, Jia Liu¹ and Xiu-Li Wang^{1*}

¹Shanghai Skin Disease Hospital, Tongji University Medical School, Shanghai, China, ²The Ice Dermalab, Shanghai, China, ³Shanghai Children's Medical Center, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, China

Front Immunol. (2025) 16:1566786

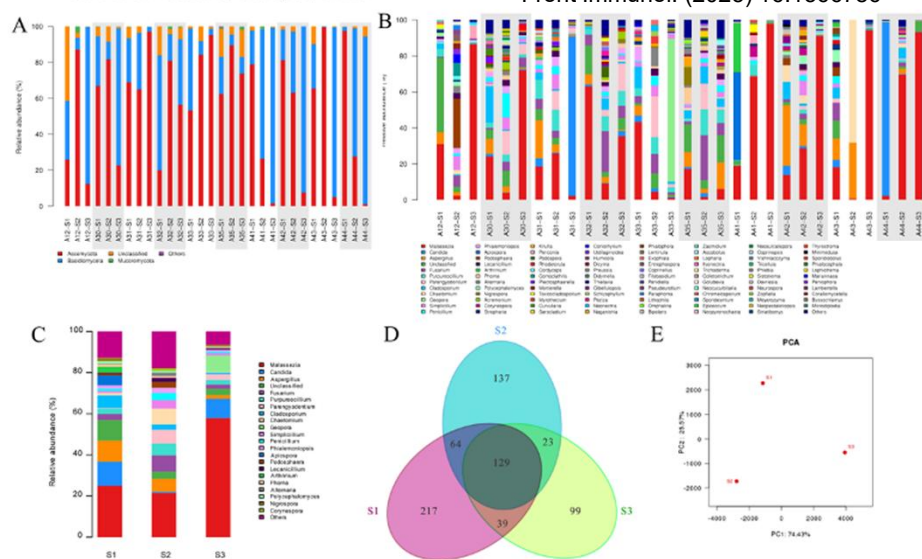


FIGURE 4
Analysis of fungal community structure in acne patients' skin samples obtained by three methods. (A) Individual analysis at phylum level. (B) Individual analysis at genus level. (C) Group analysis at genus level. (D) Venn diagram of OTU distribution of three sampling method groups. (E) PCA analysis. *A +number represents the volunteer's number; S1, S2, S3 represent samples obtained by swabbing, modified SSSB method, and individual comedone extraction method, respectively.

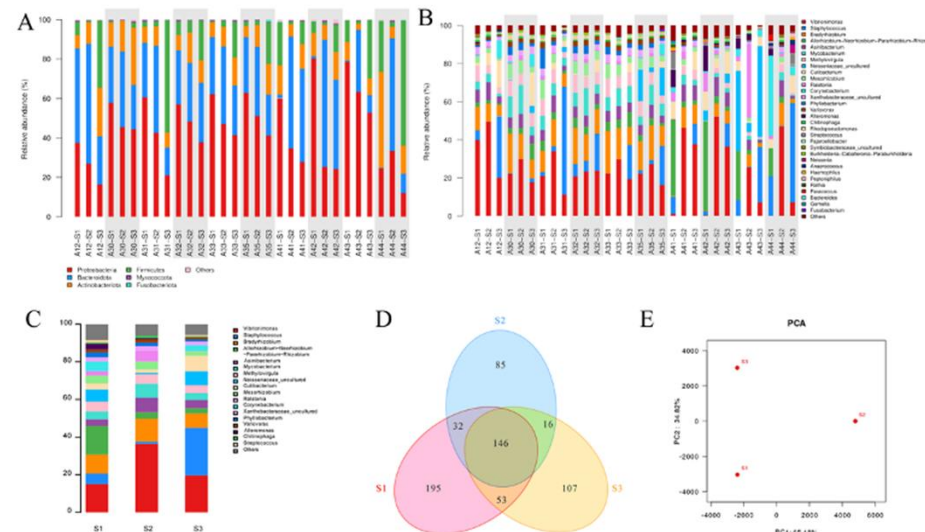


FIGURE 3
Analysis of bacterial community structure in acne patients' skin samples obtained by three methods. (A) Individual analysis at phylum level. (B) Individual analysis at genus level. (C) Pooled group analysis at genus level. (D) Venn diagram of OTU distribution of three sample groups. (E) PCA analysis between S1, S2, and S3 groups. *A+number represents the volunteer's code; S1, S2, S3 represent samples obtained by swabbing, modified SSSB method, and individual comedone extraction method, respectively.

- 3種のサンプリング法(スワブ、改良型皮膚表面バイオプシー、comedo抽出)
- サンプリング法により、*Staphylococcus*と*Malassezia*の検出量は有意に異なる
- comedo抽出では毛包内微生物(*C. acnes*や*Malassezia*)が顕著に多い

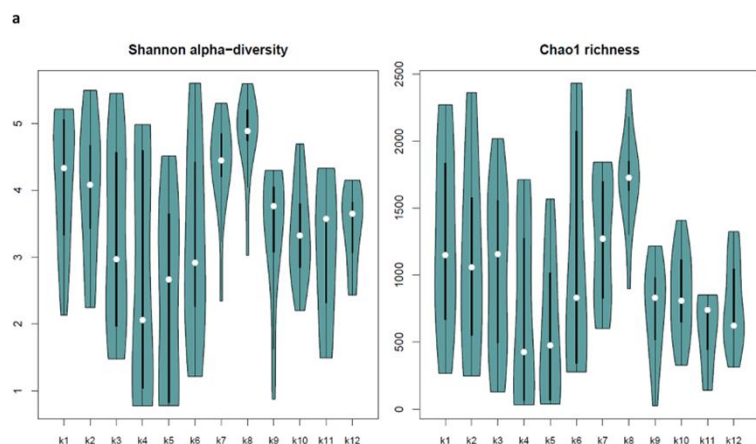
課題(DNA抽出方法)皮膚マイクロバイオーーム解析手法の検証例3

Effects of sampling strategy and DNA extraction on human skin microbiome investigations

Rie Dybboe Bjerre^{1*}, Luisa Warchavchik Hugerth², Fredrik Boulund², Maike Seifert², Jeanne Duus Johansen¹ & Lars Engstrand²

¹National Allergy Research Centre, Herlev-Gentofte Hospital, University of Copenhagen, Hellerup, Denmark. ²Center for Translational Microbiome Research, Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institutet, Science for Life Laboratory, Stockholm, Sweden. *email: rie.dybboe.bjerre@regionh.dk

SCIENTIFIC REPORTS (2019) 9:17287



- DNA抽出法によりα多様性(Shannon, Chao1)や菌叢構成に有意差
- クラスタリング結果はDNA抽出キットよりも被験者の違いの寄与が大きい
- あるキットでは潜在的に細菌のコンタミネーションの可能性はある
- ヒトDNA除去処理を行うとメタゲノム効率上昇(ヒト由来リードの減少: ~90%→~57%)
- DNA抽出法の選択は解析結果に大きく影響する
- 適切なmock communityがないため生物学的真実に近いかは不明

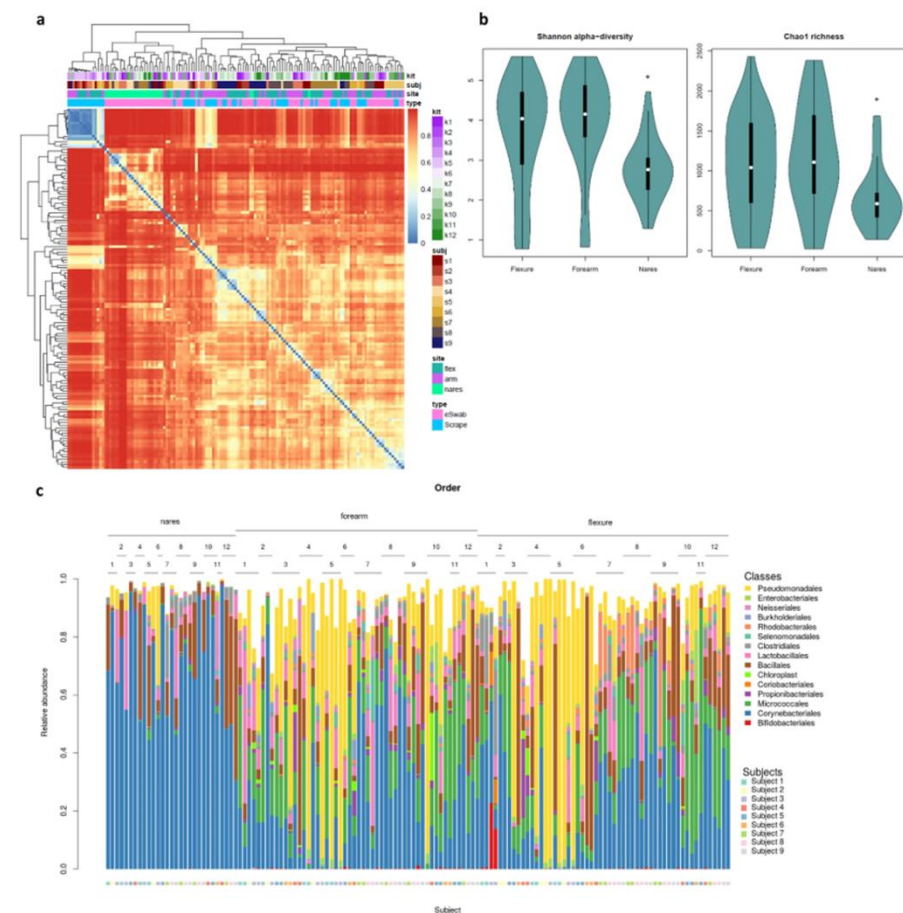
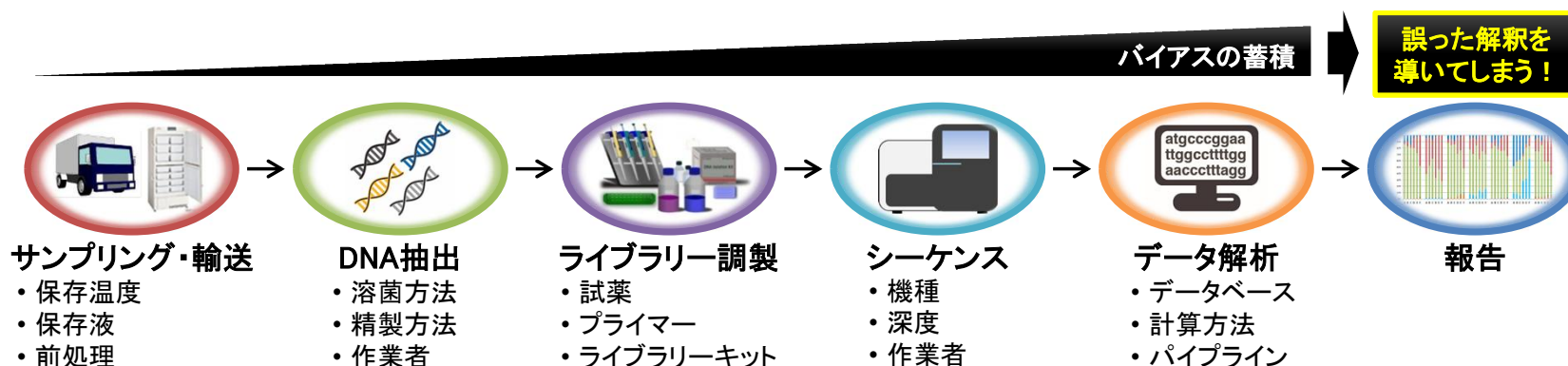


Figure 3. Variation by skin site. (a) A heatmap of Bray-Curtis distances between samples, with metadata plotted on the axis above and color code to the right. 0 indicates that samples share the same OTU and 1 that they are totally different. (b) Violin plots illustrating Shannon alpha-diversity and Chao1 richness according to skin site, * when statistical significance in a Kruskal-Wallis-test corrected for multiple testing by the Benjamini-Hochberg procedure ($p < 0.05$). (c) Bar charts depicting relative abundances of bacteria at the order taxonomic level. Samples are sorted by skin site and number of kit used is assigned above the charts. Individual subject numbers is indicated by the colour bar at the bottom of the figure.

課題(まとめ): マイクロバイーム解析における技術的課題



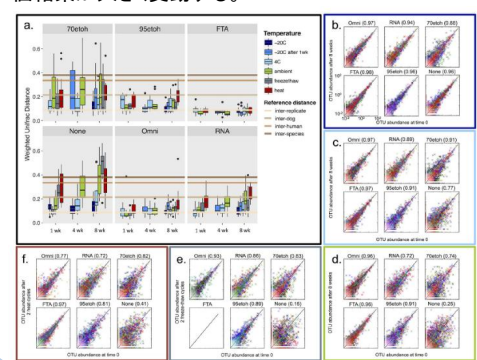
我々のグループでは、新型シーケンサーを用いたヒトマイクロバイーム解析の推奨プロトコルや精度管理のためのmock communityを開発した。

- JMBC 糞便メタゲノム解析推奨プロトコル (関連論文: Tourlousse DM et al. Microbiome. 2021, 9:95.)
- NBRCヒト常在微生物カクテル (関連論文: Tourlousse DM et al. Microbiol Spectr. 2022, 10:e01915-21.)

糞便マイクロバイーム解析でも同様の課題を抱えている



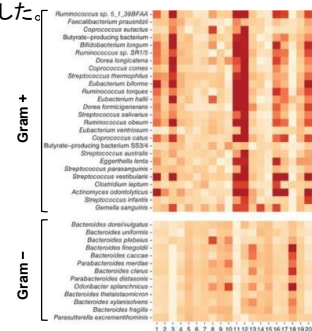
サンプル保存液によるバイアス
保存液によっては、採取直後と一定期間保存後の評価結果が大きく変動する。



Jennifer C. Martin¹, Clementine Mery², Hidetoshi Morita³, Paul W. O'Toole⁴, Céline Orvain⁵, Kiran Raoucheh Patil¹, John Penders⁶, Søren Persson⁷, Nicolas Pons⁸, Milena Popovic⁹, Anne Salonen¹⁰, Delphine Saulnier¹¹, Karen P. Scott¹², Bhagirath Singh¹³, Kathleen Slezak¹⁴, Patrick Veiga¹⁵, James Versalovic¹⁶, Liping Zhao¹⁷, Erwin G. Zoetendal¹⁸, S. Dusko Ehrlich¹⁹, Joel Dore⁶ & Peer Bork¹

Nature biotechnology (2017), 35(11): 1069–1075.

DNA抽出方法によるバイアス
366の対象種のうち、90種はDNA抽出方法により大きく結果が変動した。



データ解析方法違いによるバイアス
同一リードデータでもデータ解析アルゴリズム等の違いで結果が異なる。

