



# 「存在する菌」から「生きている菌」へ -食品に対する生菌叢解析の活用-



ファスマック太郎



バイオ研究支援事業部  
土田 咲絵

← 投影資料はこちらからダウンロードいただけます

**経営理念**：バイオの技術が日常的に使用されるような普及活動  
**経営方針**：バイオの既存技術に付加価値を

### 遺伝子検査事業部

- 遺伝子組換え食品（GMO）検査
- アレルギー食品検査
- 種苗検査（GMO・植物病）
- 遺伝子分析を用いた  
微生物同定・品種判別・異物同定
- GMO分析試薬製造・販売
- アレルギー食品分析キット販売
- 微生物検出キット製造・販売  
（サルモネラ・黄色ブドウ球菌・リステリア・レジオネラ）
- 動物病関連試薬・動物体外診断薬（牛ヨーネ病関連キット）販売
- 分子生物学研究用試薬販売
- 残留農薬・動物薬等分析
- 機能性成分分析
- 中国事業（アジア食品安全研究センター）
- 機器分析
  - 残留農薬・動物薬分析
  - 機能性成分分析
  - 創薬開発支援技術の開発



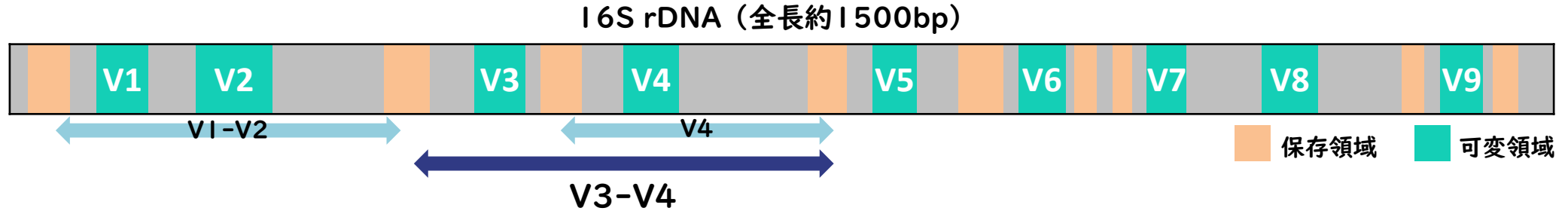
### バイオ研究支援事業部

- オリゴDNA/RNA合成
- PNA合成
- 人工遺伝子合成
- ゲノム編集用RNA合成
- 一本鎖長鎖DNA/RNA合成
- DNAシーケンス解析
- 次世代シーケンス解析
- 多型フラグメント解析
- ジェノタイピング解析
- 抗体配列シーケンス解析
- STR分析（細胞認証）
- RAISING法によるランダムインテグレーション解析

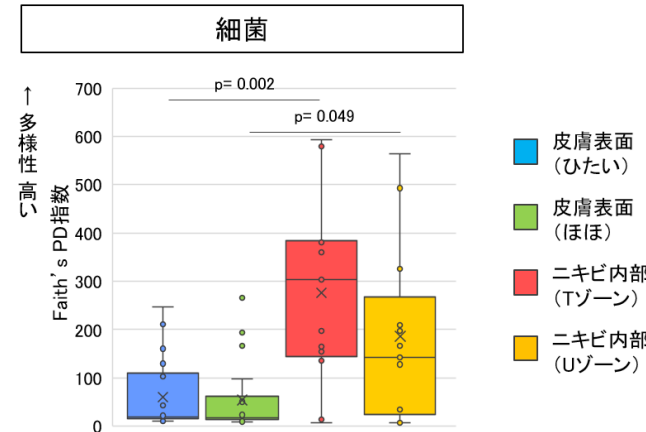
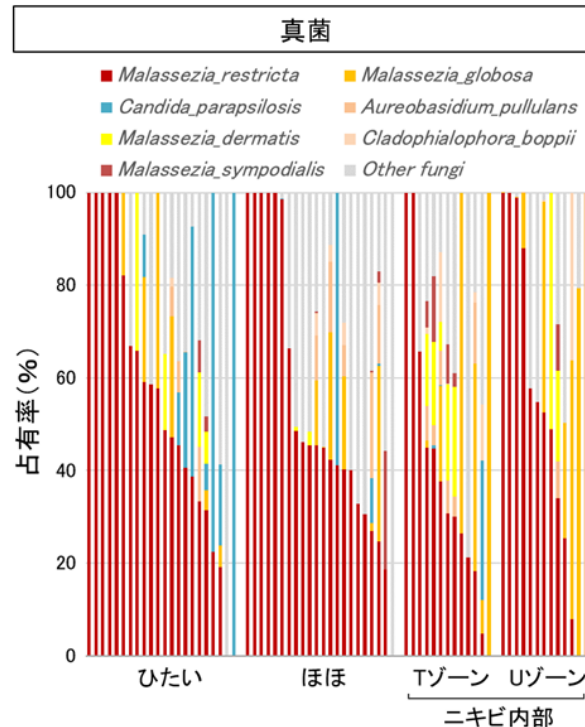
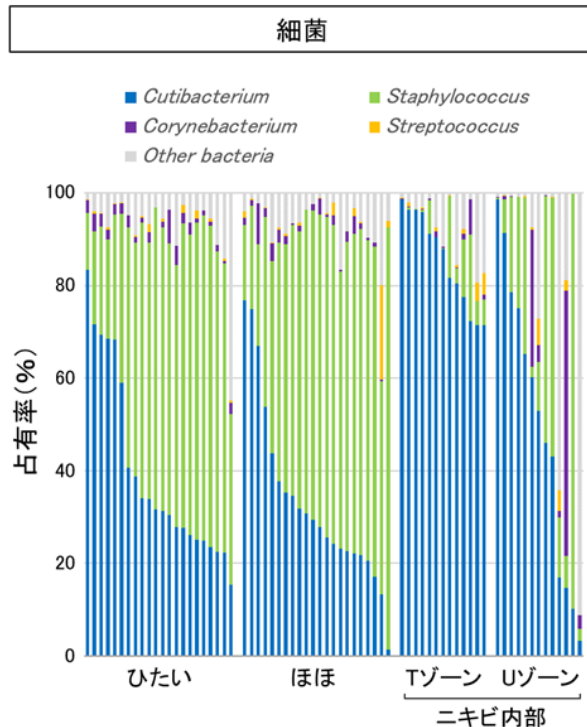


# 細菌叢解析とは？

特異的な領域を標的としてPCR増幅し、菌種の存在や割合を網羅的に解析する解析



細菌をターゲットにする場合は、16SrRNA 遺伝子領域を選択するのが一般的



日本メナード化粧品株式会社、藤田医科大学との共同研究で、  
ニキビの内部には多様な菌が生息していることを遺伝子レベルで解明

Akaza N et al., Clin Cosmet Investig Dermatol. 2022;15:2003-2012.

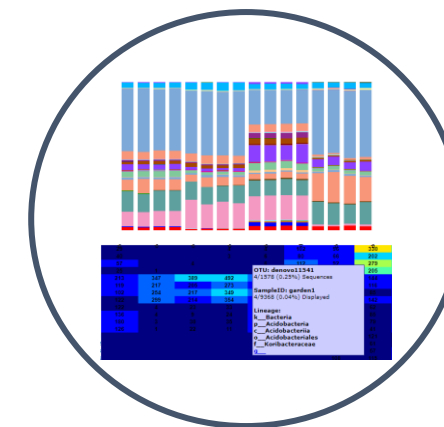
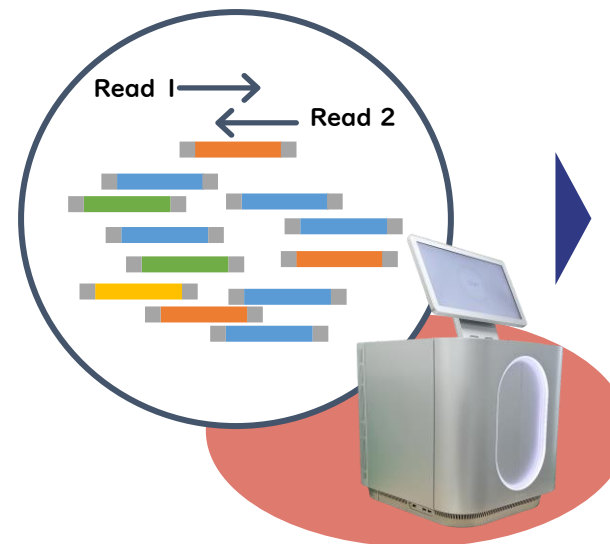
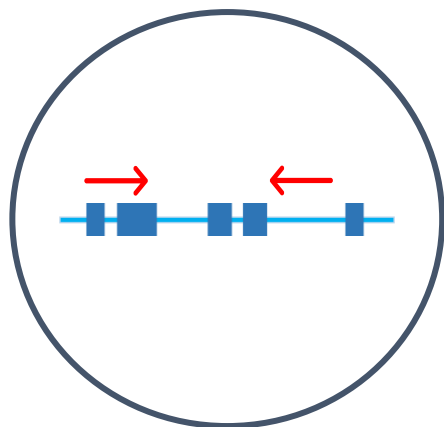
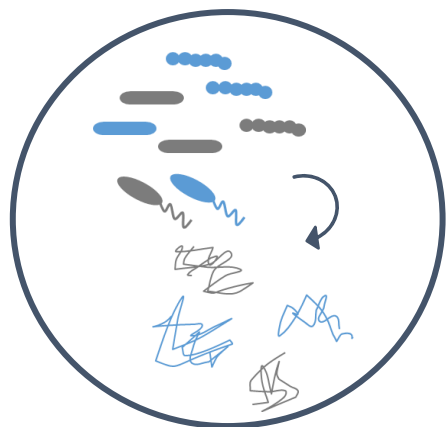
# 生菌選択的な細菌群集構造解析とは？

環境中微生物群集からのDNA抽出

特定の遺伝子領域を増幅

MiSeq i100plus 2x300bpによるシーケンス

Qiime解析



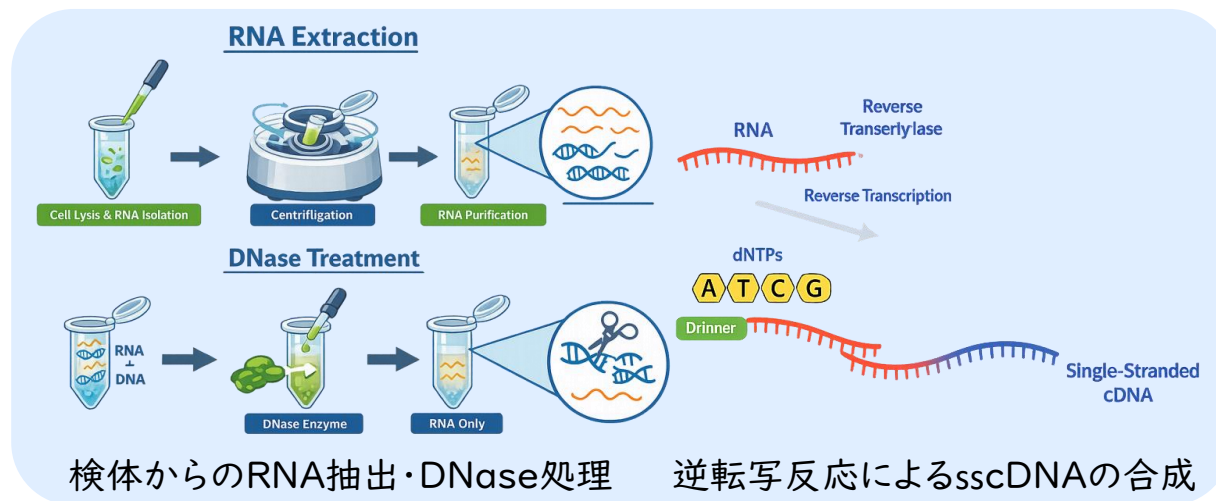
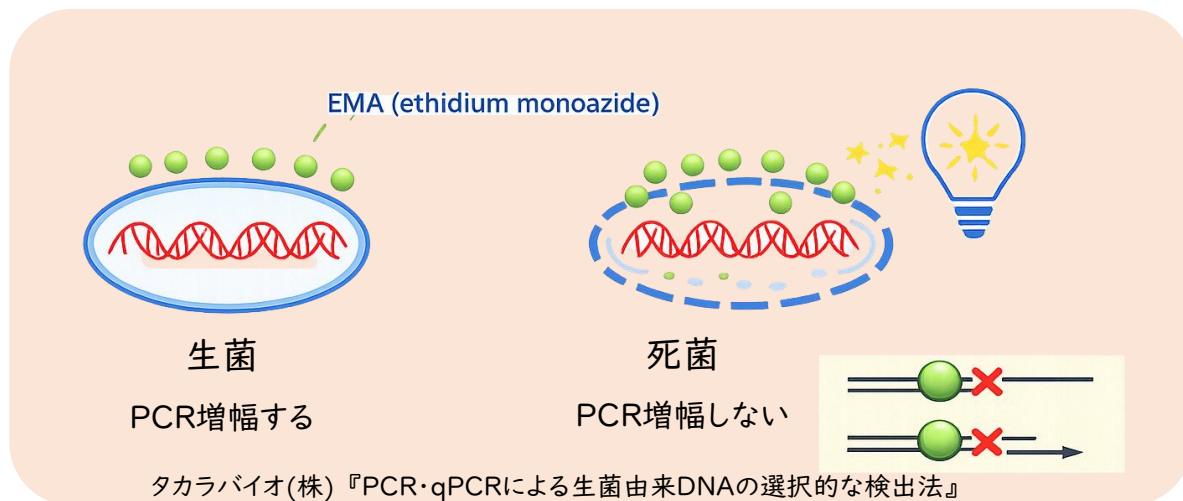
16S rRNA V3V4領域を増幅したPCR産物を対象

データベースに対して同源性検索し、  
属レベルでの存在割合を推定

## サンプル中の生菌・死菌の区別がない解析

EMA処理法

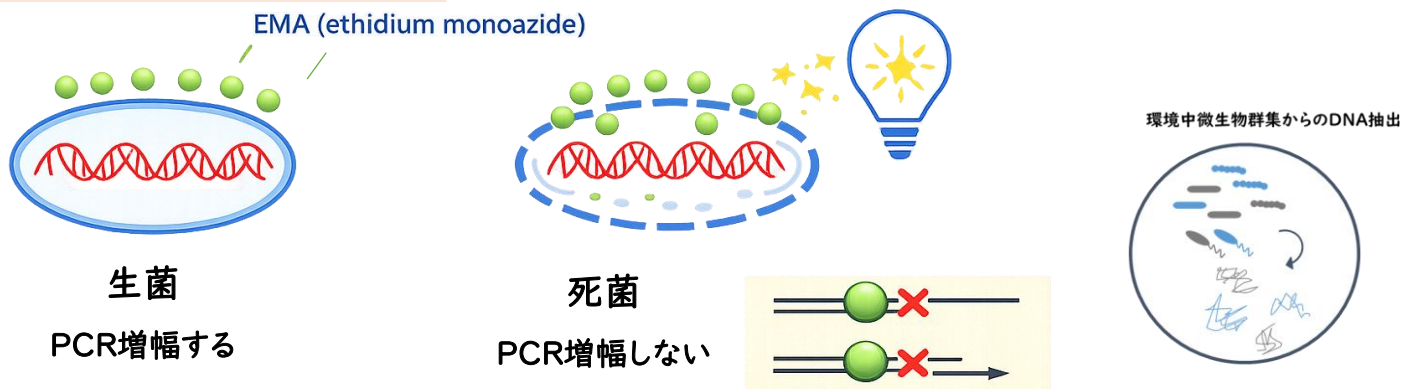
RNA逆転写法



検体からのRNA抽出・DNase処理      逆転写反応によるsscDNAの合成

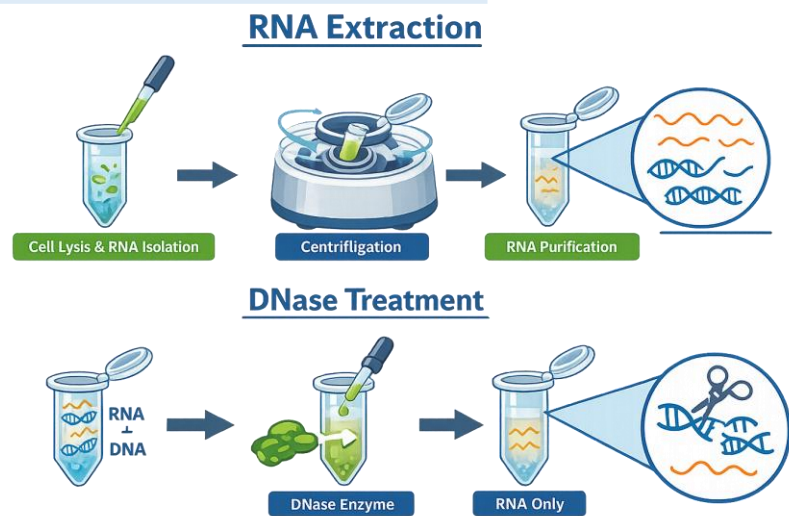
# 各手法の特長

## EMA処理法

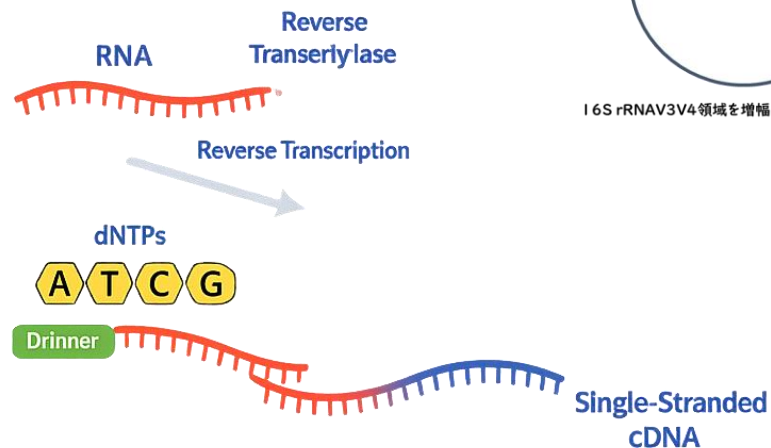


タカラバイオ(株)『PCR・qPCRによる生菌由来DNAの選択的な検出法』

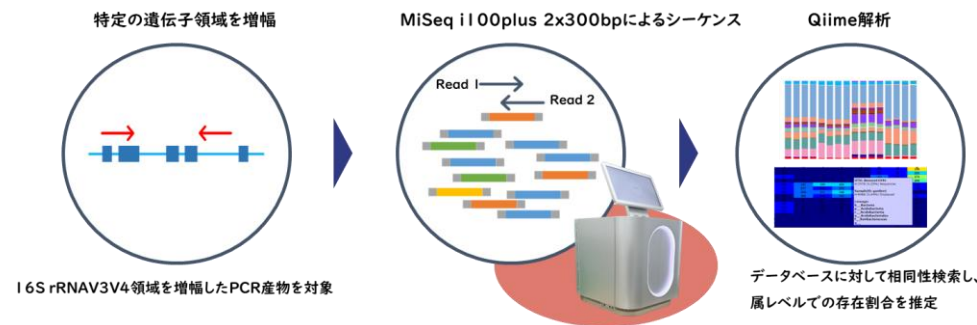
## RNA逆転写法



検体からのRNA抽出・DNase処理



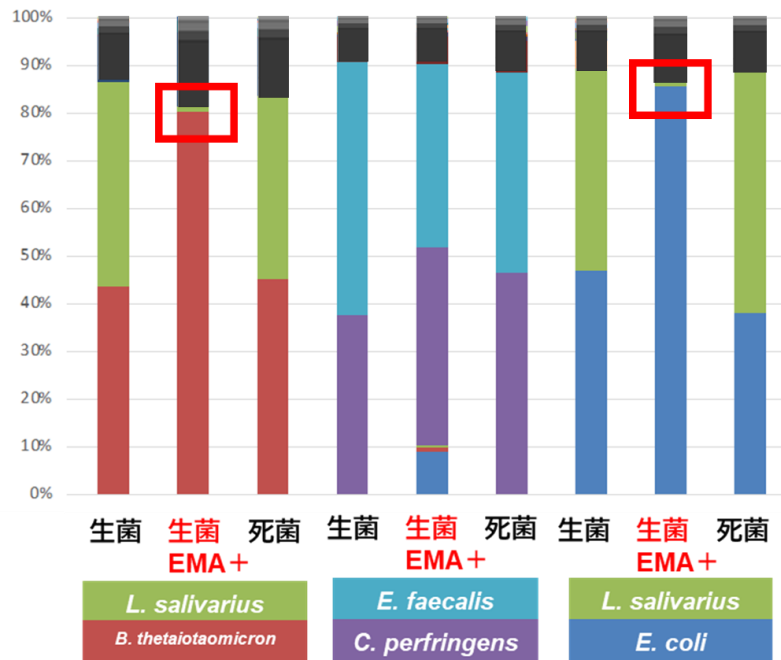
逆転写反応によるsscDNAの合成



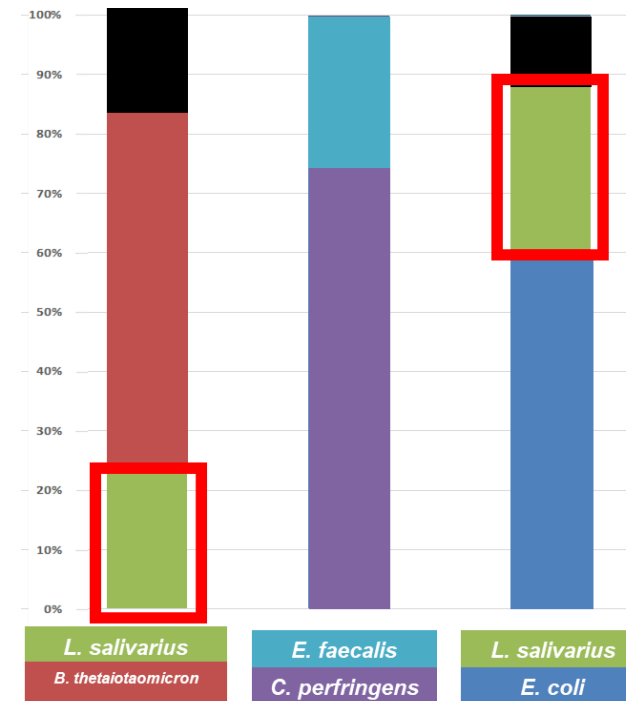
# どちらを選ぶのが最適か？

EMAは細胞膜の健全性を、RNAは代謝の活性を利用している

## EMA処理法



## RNA逆転写法



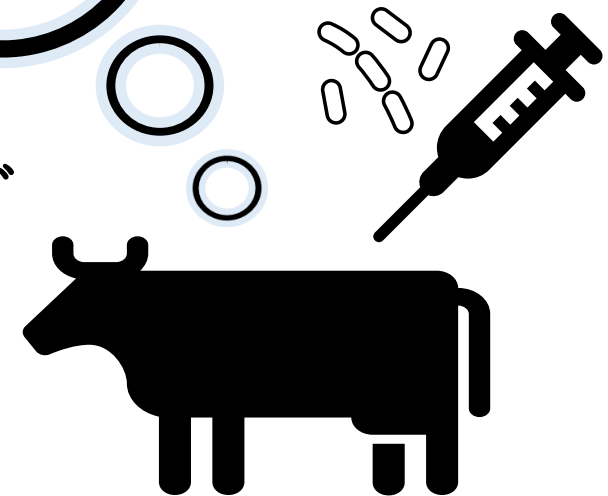
- ◆ EMAは菌種によって最適な試薬量、光照射が異なるため、単離菌のqPCRで強みを発揮する試薬である
- ◆ 試薬感受性等のバイアスがかけられないため、RNA逆転写法でより生菌検出精度が高い
- ◆ 比較研究(Li et al. 2017)では「環境サンプルに対してはRNAベースの方法が最適である」と評価

# 生菌群集構造解析 活用のヒント

- ★製品中に難培養性生菌は混在していないか
- ★保存日数の経過に伴い、生菌群集にどのような変化が生じているのか

- ★生菌剤投与前後で変化した優占生菌は？

生菌選択的に微生物群集構造を評価することで  
新たな視点・解釈を得ることが可能です



# 解析事例のご紹介

## 解析事例Ⅰ 生菌含有サプリメント

乳酸菌(生菌)が数種配合



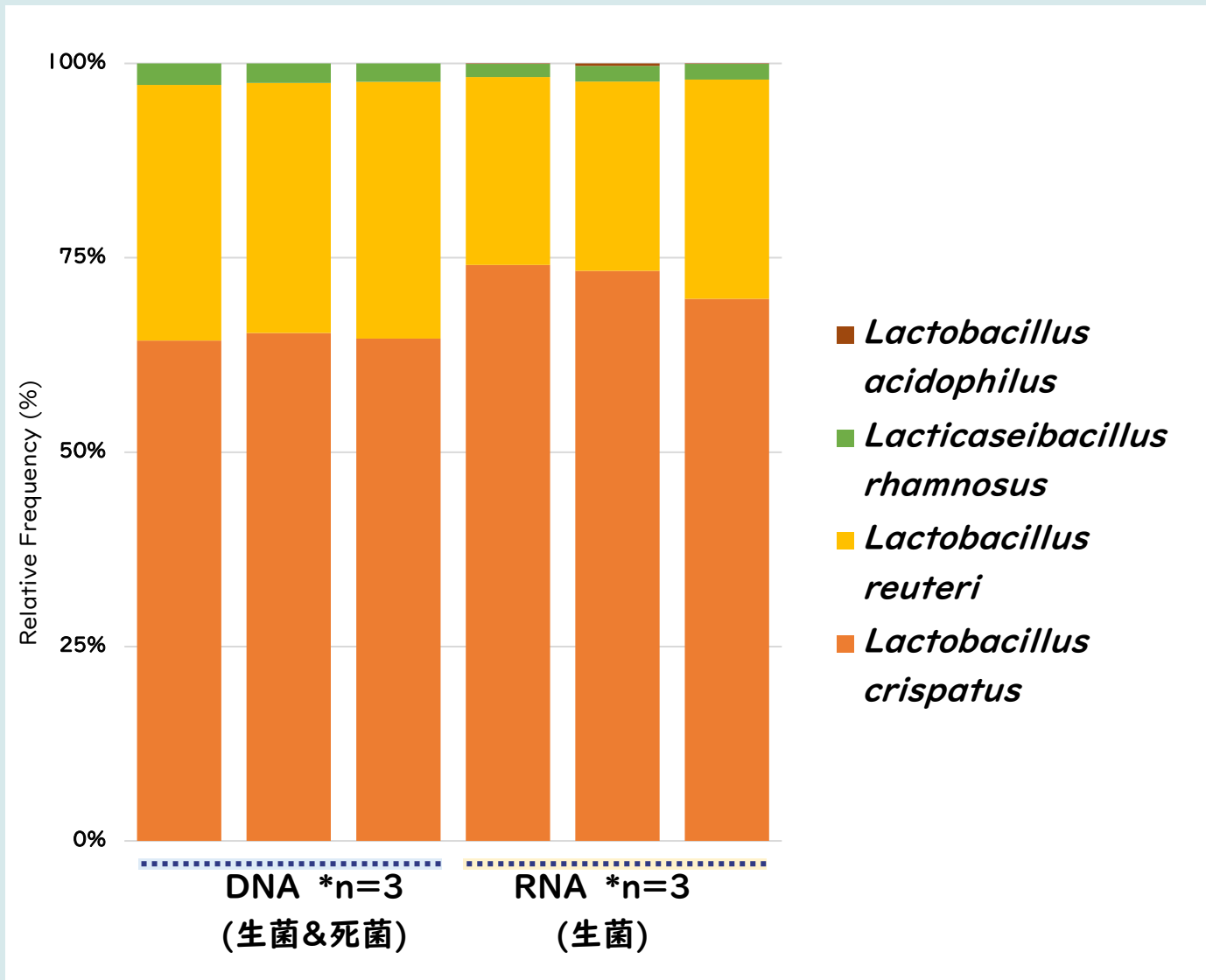
DNA



RNA

**DNA(死菌+生菌) vs RNA(生菌)の結果を比較・検証**

# 解析事例 | 生菌含有サプリメント



DNA(死菌+生菌)とRNA(生菌)で  
検出された細菌は同じ種  
存在割合にも有意な差は見られなかった

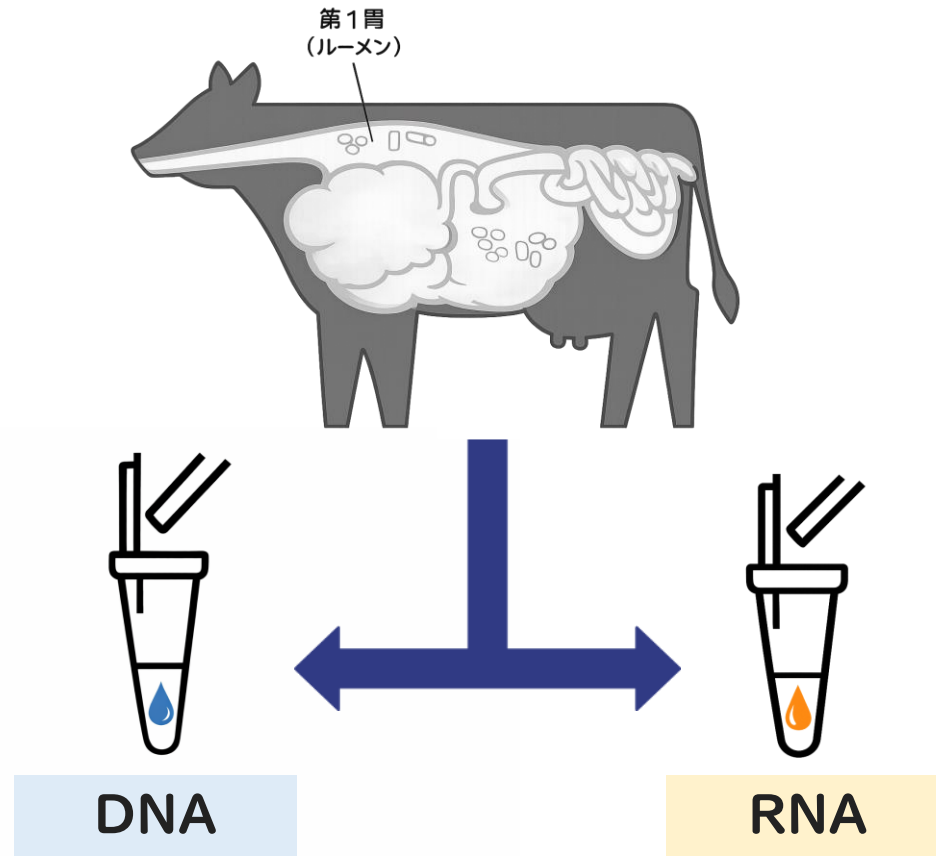
**生菌の保存状態は良好**

- ◆ 日数経過により生菌存在比に変化は生じる?
- ◆ サプリメントを摂取した被験者の腸内生菌群集構造はどう変化している?

等も追跡可能

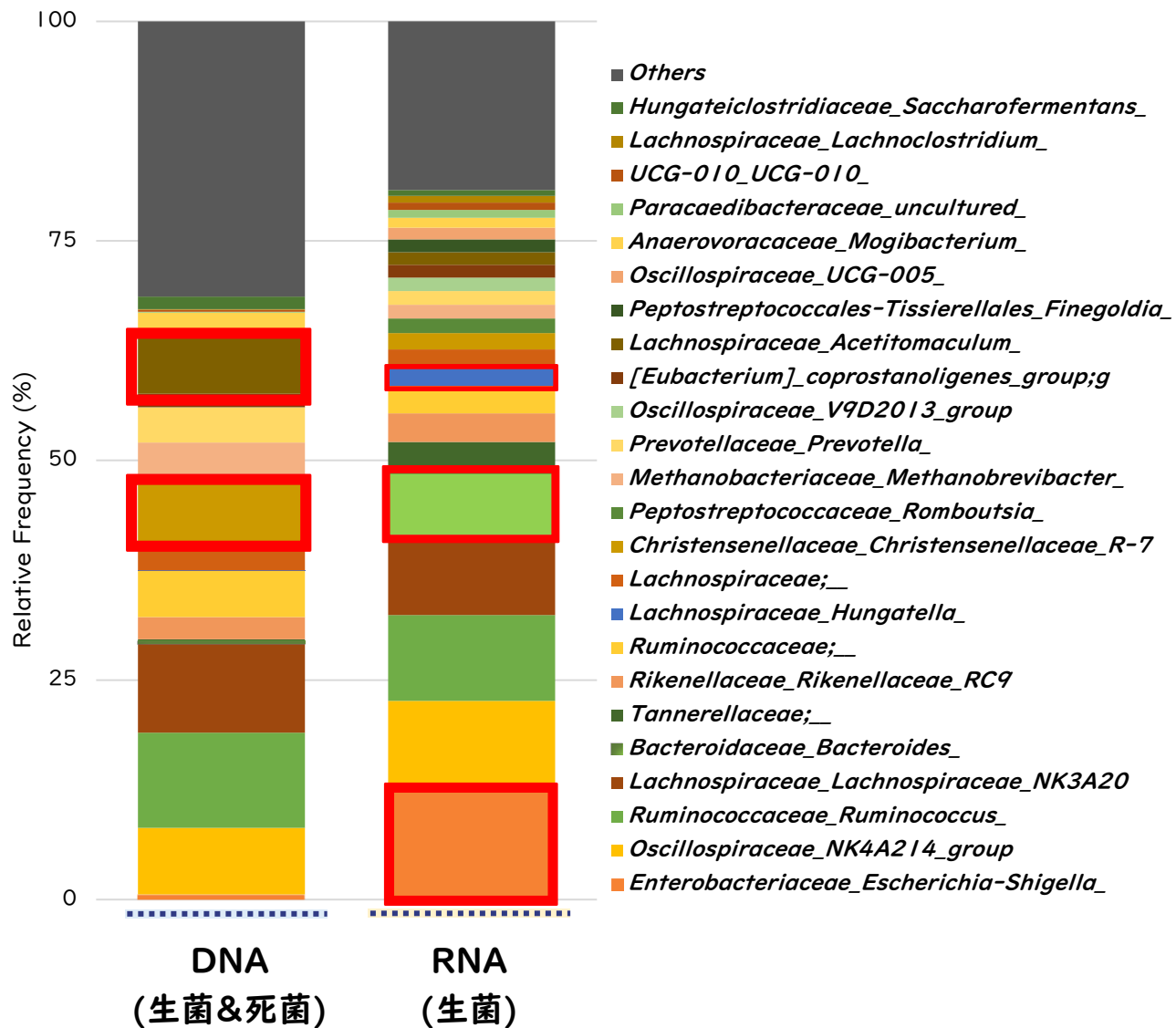
# 解析事例のご紹介

## 解析事例2 ウシルーメン(胃液)



DNA(死菌+生菌) vs RNA(生菌)の結果を比較・検証

# 解析事例2 ウシルーメン(胃液)



## RNA(生菌)で有意に増加

	DNA(死菌+生菌 %)	RNA(生菌 %)
<u>Enterobacteriaceae_Escherichia</u>	0.59	12.72
<u>Bacteroidaceae_Bacteroides</u>	0.39	6.96
<u>Lachnospiraceae_Hungatella</u>	0.08	2.12

- ◆ *Escherichia-Shigella*
- ◆ *Bacteroides*  
短鎖脂肪酸を産生する細菌
- ◆ *Lachnospiraceae\_Hungatella*  
酪酸酸性菌と同じグループに所属する菌

## DNA(死菌+生菌)で有意に増加

	DNA(死菌+生菌 %)	RNA(生菌 %)
<u>Christensenellaceae_R7</u>	7.63	1.85
<u>Lachnospiraceae_Acetitomaculum</u>	6.52	1.44

- ◆ *Christensenellaceae\_Christensenellaceae\_R-7*  
糖を代謝して、酢酸と微量の酪酸を産生する菌
- ◆ *Lachnospiraceae\_Acetitomaculum*  
酢酸生成菌

DNA(死菌+生菌)で過少or過大評価されていた、実際に生きている菌を再度評価する指標になる

# ご依頼の流れ



- ◆ まずはメールにてご相談ください  
サンプル数 / サンプル状態 / 解析目的 etc.
- ◆ ウェブミーティングでの事前打ち合わせも可能
- ◆ ご希望の条件に合わせてお見積り



- ◆ サンプル到着をもってご注文完了
- ◆ 解析状況に応じて、弊社より適宜ご報告・ご相談
- ◆ 国内自社で調製&解析
- ◆ 20~30営業日で出荷



- ◆ アフターケアも無償対応中  
メール/ウェブミーティングにてご相談ください  
結果の解釈などもお手伝いいたします
- ◆ DNAサンプルの無償返却



キーワード“ifiaで発表をみた”で

- ◆ 土田宛にお声がけいただいた方
- ◆ メールでご依頼いただいた方限定

調製費用割引キャンペーンを適用いたします!

まずはお気軽にご相談ください

少数検体で試してみたい  
見積が欲しい  
Webで詳細を打ち合わせしたい  
等々

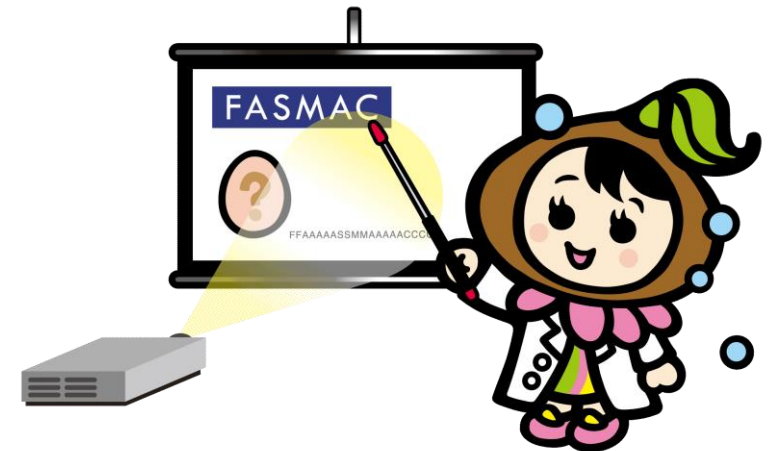


ご清聴いただき、ありがとうございました

弊社ブース“西ホール(2M10)”でお待ちしております



← 投影資料はこちらからダウンロードいただけます



ファスマック花子