

令和4年2月25日

独立行政法人医薬品医療機器総合機構
理事長 藤原康弘 殿

科学委員会
委員長 遠藤玉夫

科学委員会では、今般、下記について科学的見地からの議論をまとめました。
独立行政法人医薬品医療機器総合機構における通常業務にご活用ください。

記

マイクロバイオーム研究に基づいた細菌製剤に関する報告書

以上

マイクロバイオーターム研究に基づいた細菌製剤に関する報告書

マイクロバイオーターム専門部会

目次

序	2
1. 免疫・感染症領域・非免疫の臨床、FMT	2
1.1 LBPの開発が行われている主な疾患領域と現状	3
1.2 便微生物移植(FMT)	4
1.3 LBP製品開発における課題	6
2. 新しい技術の動向	7
2.1 分類、同定の最新の技術の動向	7
2.2 複合微生物系での解析技術(定量)の動向	10
2.3 <i>in silico</i> での安全性評価	11
2.4 <i>in vitro</i> での評価	13
3. 非臨床試験	14
3.1 薬理試験(効力を裏付ける試験等)	14
3.2 薬物動態試験	14
3.3 非臨床安全性試験	15
4. 製法(バンク樹立)・品質特性解析・規格・試験方法	16
4.1 原薬製造およびセルバンクに関する考え方	17
4.2 特性解析において留意すべき事項	21
4.3 原薬及び製剤の試験において考慮すべき事項	23
4.4 製剤化工程開発	25
4.5 分析上の留意事項	26
4.6 標準物質	26
5. 臨床試験での考慮事項	27

序

ヒトの腸管には数百種類、100兆個ほどの細菌が生息し(1-4)、腸内細菌叢（マイクロバイオーム）を形成しており、これらの細菌が産生する様々な物質やヒトの腸管との相互作用などを通じ宿主であるヒトの免疫機能、代謝活性など様々な機能に影響を与えており、ひいてはその健康維持に関与していることが明らかになりつつある。一方でいくつかの疾患で患者のマイクロバイオームに異常がみられること、腸内細菌叢の異常により様々な疾患が発症する可能性があることなどが明らかになってきている。また、健康人の便移植が患者のマイクロバイオームの変化をもたらし、疾患の治療に利用できると報告されている。

便微生物移植（Fecal Microbiota Transplantation ; FMT）ではどの菌種が疾患の治療に効果があるのかについて不明だが、特に着目すべき菌種を同定し、単一ないしは複数種の腸内細菌製剤（Live Biotherapeutic Products; LBP）を用いて疾患の治療を行うという戦略が取られるようになってきている。

本稿では、LBPを用いた治療薬の開発において作用メカニズムの解明をはじめどのような視点でその評価を行うべきか、特に製法や品質特性解析、非臨床試験や臨床試験デザインの在り方などについてまとめる。腸内生菌製剤として使用されるものには細菌だけでなく、真菌、ファージなども候補に上っているが、本稿では細菌製剤のみを取り上げて議論を行う。ただし、基本的な考え方は細菌以外の腸内微生物種にも適用可能な部分が多くあると考えられる。

1. 免疫・感染症領域・非免疫の臨床、FMT

近年のオミックス解析技術の進歩により、マイクロバイオームがヒトの生体機能の調節に多大な影響を及ぼしていることが次第に明らかになってきた。これらの知見をもとに、FMTや腸内微生物より構成されるLBP製品が、感染制御・免疫応答制御・代謝機能改善などの目的で開発がされており、大きな注目を浴びている。LBPの開発では、天然由来細菌・酵母のみならず、遺伝子組換え細菌や特定の株として単離された細菌・酵母なども対象とされている。LBPは疾患の感染制御・治療への適用を目指すものを含むが、生物学的製品であるワクチンなどの免疫応答による感染防御を目的とする製品は含まない。現在、*Clostridioides difficile* 感染症（*C. difficile* infection; CDI）、炎症性腸疾患、食物アレルギー、がんなどの、多様な疾患の治療を目的としたLBPの開発が多くの企業で行われている。また、大手製薬企業もこのような革新的な企業との提携に強い関心を持っている。マイクロバイオーム創薬市場は今後さらに増大していくと予想されている。

LBPについては、単菌製品や複数の生菌を混ぜたカクテル製品などが開発中である。LBPは特定の明確に規定された菌種のみを含むことからFMTと比べて腸内環境への影響は限定的かもしれないが、安全性はより管理しやすいと考えられる。海外では第II/III相試

験に入っている一部のものを除き LBP のほとんどは現在、非臨床/第 I 相試験中で、開発の初期段階にある。このため、科学的合理性のある LBP の開発の進め方が大きく注目されている。

現在日本国内で臨床使用が承認されている生菌製剤の適応は、腸内細菌叢の異常による諸症状の改善であり、乳酸や短鎖脂肪酸などの有機酸産生菌のフリーズドライ生菌が市販されている。投与された生菌のヒト体内での作用については十分には解明されておらず、整腸、軟便、便秘、腹部膨満感等を対象とした効能で承認されている。海外で治験が進む LBP 製品に関しては、日本国内で臨床開発が殆ど進んでいないのが現状である。一方、FMT は、先進医療や特定臨床研究として国内でも開発が進められており、有用性があるとの報告もあるが、治験として実施されていない。また有害菌の混入リスクも指摘されており安全管理上の問題が懸念されている。

本項では、CDI・多剤耐性菌感染症、炎症性腸疾患、がん免疫（免疫チェックポイント阻害抗体との併用）等、食物アレルギー及び代謝性疾患への使用を目的とする LBP の開発状況と、LBP の開発の課題、さらには既に国内で臨床研究が進められている FMT についての現状を考察する。

1.1 LBP の開発が行われている主な疾患領域と現状

1.1.1 CDI・多剤耐性菌感染症

特定の腸内細菌が、腸管病原細菌の定着を阻止する作用（colonization resistance; CR）を持つことが報告されており(5)、感染性疾患は腸内細菌創薬開発の中で現在最も盛んな領域の一つとなっている。特に、CDI に対する LBP の開発が行われている。CDI は抗菌薬の投与などにより腸内細菌叢のバランスが崩れ、CR が低下した結果、*C. difficile* が大腸で過増殖することで引き起こされる。CDI の治療に、健康な人の便を移植する FMT が行われ高い効果がみられるとの報告があり、このために複数の企業が FMT 関連製剤の開発を行っている（表 1 FMT）。一方、安全性への懸念や、糞便サンプルのロット間による細菌組成のばらつきがある FMT に代わって、特定の腸内細菌カクテルを CDI 患者に投与する動きも出てきている（表 1 LBP）。

1.1.2 炎症性腸疾患

感染症等の次に腸内細菌の創薬対象として開発が活発に行われている領域が消化器系疾患である。特に炎症性腸疾患（クローン病や潰瘍性大腸炎）や過敏性腸症候群に対する創薬開発が数多く行われている。表 2 にまとめたように、多くの LBP 製品が非臨床試験から臨床開発初期の段階にある。

1.1.3 がん免疫（免疫チェックポイント阻害抗体との併用）

近年、がん免疫療法の効果に腸内細菌叢が関与する知見に基づき、がん免疫を強化する生菌製剤（オンコバイオティクス）に多くの企業が関心を持っており、開発が進められている。これらの試験では免疫チェックポイント阻害抗体との併用によるがん免疫療法の亢進効果

が検討されている。また樹状細胞の活性化を目指したがん免疫療法の開発も行われている(表 3)。

1.1.4 食物アレルギー

食物アレルギーについては、*Clostridium cluster IV&XIVa* に属する菌群がその症状を軽減させるとの知見がある(表 4)。また最近、食物アレルギーを持つヒト乳幼児の腸内で減少しているクロストリジウム目細菌の *Anaerostipes caccae* を食物アレルギー誘導モデルマウスへ投与することによりアナフィラキシー発症による体温低下が抑えられることも報告されている(6)。その作用メカニズムとして、これらの腸内細菌が制御性 T 細胞を誘導・活性化することにより、Th2 応答を抑制することなどが報告されている(7)。これらの知見に基づいて複数の臨床開発が進んでいる(表 4)。

1.1.5 代謝性疾患

次世代シーケンサー (next generation sequencer; NGS) を用いた腸内細菌叢研究が始まった初期に腸内細菌と肥満や糖尿病との関連が報告されたこともあり、微生物製剤の臨床開発が進んでいるのが代謝性疾患領域である。非臨床試験で糖尿病改善作用が示された *Akkermansia muciniphila* や酪酸産生菌 *Anaerobutyricum soehngenii* 製剤を肥満とインスリン抵抗性を有する人に投与する臨床試験が実施されている(表 5)。

1.2 便微生物移植 (FMT)

FMT は健康ドナー由来の便から調製した腸内細菌を患者へ移植する治療である。2013 年に CDI に対して標準治療を上回る臨床成績があるとの報告(8)がされて以降、炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease) など様々な疾患に対して有効性を示唆する報告がされてきた(9)。その一方で FMT の臨床開発は腸内細菌創薬 (LBP 創薬) のディスカバリープラットフォームとしても極めて重要な意義を持っている。FMT を用いて得られた臨床成績と用いた FMT に含まれる細菌叢の解析から、対象疾患に効果のあるマイクロバイオームを見いだす試みが行われている。

再発性 CDI (recurrent CDI; rCDI) に対する FMT を用いた製品として、複数の製剤の臨床開発が進んでいる。臨床開発後期に進んでいる製品もあり、製剤処方としてはカプセル化や凍結乾燥製品なども試みられている。また投与経路の開発も進んでいる。rCDI 以外にもいくつかの疾病に対する FMT 製品の開発が進められている(10)。

米国では OpenBiome が移植用便ジュースを供給する代表的便バンクとして活動している。OpenBiome は 2012 年にマサチューセッツ州ケンブリッジで設立された非営利団体で、米国内における FMT へのアクセス拡大を目的としている。問診、便検査、血液検査によるスクリーニングにより適格性があるとされるドナー (全体の約 2.5%) から便を収集し臨床に用いる便ジュースを製造している。一方、米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration; FDA) は、安全性確保の為に FMT を用いた臨床試験を実施する場合には治験薬 (Investigative new drug; IND) 申請に基づいた臨床開発を実施することを求めている

(<https://www.fda.gov/media/86440/download>)。さらに、FMT を用いた臨床開発での感染症発症リスクを回避するためにこのような中央採取方式の FMT を用いることについてはかなり否定的であり、ウイルスや特定の微生物についてドナーの個別の検査や定期的な検査を推奨している(11)。

オーストラリアでも活発な FMT 臨床開発が行われているが、医薬品の審査や承認を所掌する医療製品管理局 (Therapeutic Goods Administration; TGA) は最新の規制的要件 (<https://www.tga.gov.au/faecal-microbiota-transplant-fmt-products-regulation>) を提示しており、特定の腸内細菌カクテルを用いる LBP は医薬品に該当するが FMT は医薬品には該当せず、いわゆる院内で調製する形での使用のみを認めるとしている。またこのような規制の背景から FMT の使用を一般に宣伝することも禁止されている。

日本でも 2020 年より rCDI に対する先進医療 B での保険適用の可否を検討するための単群検証的試験が進められているところである。その他の国においても FMT に対する規制に関する議論が始まっている。

FMT の開発に関して各国規制当局は安全性の確保と治療アクセスをどのように担保するかバランスを模索している。ヒトの便というこれまで医薬品として利用されてこなかった不均一な原料から製造される便ジュースを規制するのに適した既存の規制フレームワークが存在しないため、各国の方針が大きく異なる結果となっている。院内調剤的な医療行為として医師の裁量で FMT を行うことのみを許可する国も複数あるが、便ドナーの適格性の確認が十分なされているかが課題であり、今後多くの開発がなされれば FMT にどのようなリスクがあるのかが明確になると考えられる。

米国では 2019 年に 2 名 (1 名死亡・1 名回復) と 2020 年に 6 名 (全員回復) の重大な有害事象が報告されている。2019 年 3 月にマサチューセッツ総合病院 (MGH) で、院内において作製された同一ドナー由来の FMT 経口カプセルを投与された 2 名の患者が ESBL (Extended spectrum β -lactamases) 産生菌に感染した。1 名は C 型肝炎による肝性脳症治療目的で FMT が実施されたが ESBL 産生菌感染が発覚、抗菌薬治療により回復した。もう 1 名は骨髄異形成症候群の治療のため造血幹細胞移植を受ける患者 (シクロホスファミドとミコフェノール酸モフェチル投与後) において移植片対宿主病 (graft-versus-host disease ; GVHD) 予防の目的で FMT が実施されたが、造血幹細胞移植後に ESBL 産生菌感染が発覚し重度の敗血症により死亡した。FDA は速やかにアラートを発し、全国で FMT の提供を停止させた。原因究明を行った結果、MGH では FDA ガイドラインで求められている ESBL 検査を行っておらず、ドナー便が ESBL 産生菌に汚染されていたことが発覚したため、アラート後 3 ヶ月で ESBL 検査を徹底する勧告を出して FMT を用いた IND 試験が再開されている。

FMT の安全性に関して最も配慮すべき点は、重篤な感染症をもたらす可能性があることである。例えば COVID-19 は、便中からウイルスが検出され感染の原因になりうることがパンデミックの早い段階で指摘されていたことから、FDA は 2020 年 3 月に安全性アラートを

発し、2019年12月1日以降に取得した便を用いたFMT便ジュースの提供に際し、COVID-19の感染防止対策（ドナーの感染検査とレシピエントの追加合意取得）を要請した。FDAがFMTに関するレビューの中で提案している配慮すべき感染症の検査としては、病原性細菌、真菌、ウイルス、寄生虫などの検査があるが、わが国ではE型肝炎ウイルスなども考慮する必要がある。

FMTはrCDIの治療に効果があると期待されており、近いうちに承認申請される可能性も高い。FMTの開発においてはFMTドナーの感染症を含めた適格性をどのように評価するかが製品の安全性を担保するうえで非常に重要になると考えられる。海外で実施されているFMTの中央採取がFDAの求める規制的要件を満たすかは不明であるが、ドナーごとの検査をどのように実施していくのが安全性担保の解決手段になる可能性がある。

1.3 LBP製品開発における課題

LBPの開発は、①菌株選定、②品質特性解析、③製法開発、④非臨床試験、⑤臨床試験に大別されるが、ステップごとに課題がある。

①の菌株選定については、（1）疾患患者で相対的存在量が減少している菌であること、（2）FMT治療で主要な構成細菌であることが示唆されていること、（3）腸内細菌叢の構成又は機能を調節する特性をもつこと、（4）特定の宿主経路又は表現型に影響する可能性があること、（5）*in vitro* 及び *in vivo* スクリーニングにより得られる細菌（群）をもとに行われることが多い。しかしながら、このような方法では、相関関係が因果関係となっているかどうか、細胞レベルの応答性が個体レベルの応答性と一致するかどうか、必ずしも明確ではない。そのため、LBPの生体における効果については、実際に被験者に候補となるLBPを投与してその臨床効果を確認するか、あるいはその代替となる薬力学的指標の改善に寄与するかを確認してみないと分からない部分がある。

②の品質特性解析については、各菌株のゲノム配列決定（伝播性薬剤耐性遺伝子・毒素などの推定病原性因子の有無の確認、各菌株の腸内での定着を確認するための株特異的プライマーの設計などに利用）、表現型の確認（酵素アッセイ、細胞モデル、動物モデル、*ex vivo* モデルなどの使用）などを行う必要がある。

また、③の製法開発については、（1）LBP製造のための技術開発が進んでその製法が十分確立される段階に至っていないこと、（2）恒常性（ロット間のバラツキの有無、製品としての一貫性）の懸念、（3）嫌気性細菌を扱うための専門知識の蓄積とインフラの不足、（4）既存の製造プラットフォーム技術をどのように適用するか、（5）特殊な設備、機器、運用に関する専門知識の必要性、などの課題がある。

④の非臨床試験については、非臨床での効力を裏付けるデータ（Proof-of-concept; POC）の取得や安全性の確認が必要である。

そして⑤の臨床試験については、他の医薬品と同様に、Phase I（安全性・投与量の範囲を検討）、Phase II（LBPに期待される主要エンドポイントを中心に小さなグループサイズで

の探索的試験)及び Phase III (有効性・安全性をより大きなグループで検証)試験が行われるが、期待される効果が発揮されるかどうかは臨床開発の鍵となる。

開発企業は、規制当局の審査基準が明確になっていくことや製品の承認に関連してどのようなデータが求められるのかが明らかにされることにより開発戦略がより明確になると期待している。

以上のように、LBPの開発はまだその製法を含め今後整備されていく必要があり、手探りの状態ではあるが、今後 LBP の実際の効果が次第に明らかになっていくと考えられる。ヒトと腸内細菌は、長い人類の歴史の中で相利共生関係を築いてきたと推定される。そのため、良い腸内環境を構築することが人々に有益な作用を及ぼしてくれることが期待される。

2. 新しい技術の動向

整腸作用を治療学的特性として持つ乳酸菌製剤をはじめとして、国内ではこれまで承認された生菌製剤が複数存在する。その有効成分の確認試験法や定量法などは 1990 年代に日本薬局方外医薬品規格に記載されたが、医薬品としての承認は半世紀も前であるため、利用されている試験法は旧来の古典的な微生物学的方法で構成されている。一方で、1990 年代より PCR の関連技術の進展、NGS などの技術革新による分子生物学的な手法のめざましい発展があり、微生物の同定、定量に関する考え方が大きく変わってきている。本項では、微生物学的視点から、従来の生菌製剤の評価方法から考え方が変更されつつある部分に焦点を当て、その最新技術を概説する。

2.1 分類、同定の最新の技術の動向

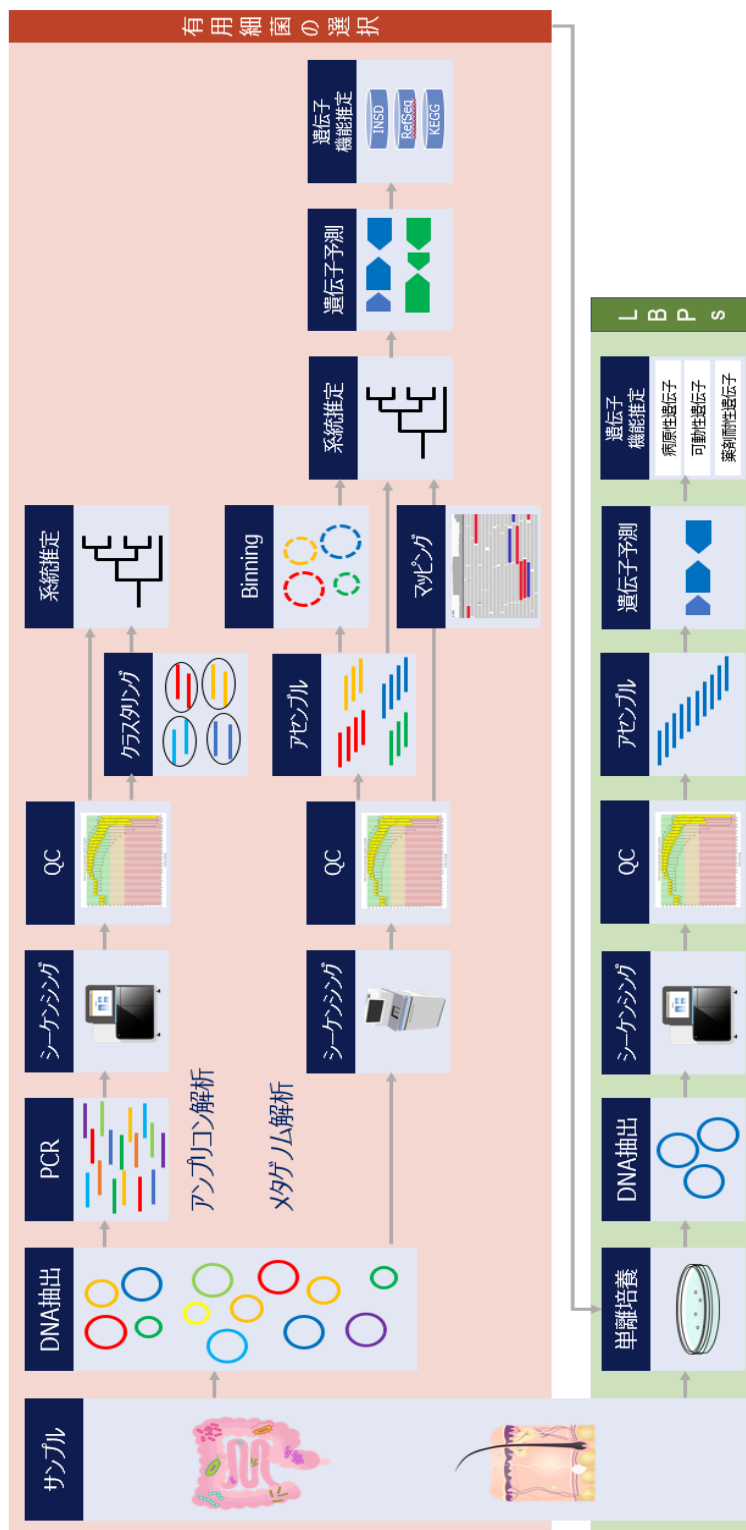
古典的な微生物学では、細胞形態やグラム染色性、生理学的な特性に基づいて細菌等の原核微生物の分類や同定がなされていたが、その分類体系が進化系統に基づく自然分類と大きく乖離していることが明らかになってきている(12)。現在では、微生物の分類、同定は、微生物が持つゲノム情報に基づく分子系統推定による分類体系や、ゲノム情報に基づく同定に移行している。現在分子系統マーカー遺伝子としては 16S rRNA 遺伝子が広く用いられている。本遺伝子は約 1,500 塩基長からなる遺伝子であり、全ての原核微生物が有している。基本的には水平伝播などが起こらない遺伝子と考えられており、その塩基配列の類似度等から各微生物の進化の道筋を分子系統解析で推定できる。また、ゲノム中に共通に存在する単一コピー遺伝子群等を対象にした系統推定も実施されており、ゲノムレベルでの詳細な微生物分類や同定が実施されている。16S rRNA 遺伝子では、遺伝子全長の比較で 98.7%以上の相同性を示す場合、その 2 つの微生物は同種とみなされる可能性が高い。ただし、現時点の原核生物の種の定義は DNA-DNA ハイブリダイゼーション法により 70%以上の値が得られることがその基準(13)となっており、16S rRNA 遺伝子で 98.7%以上相同であることをもって同種と断言することは必ずしも適切でない可能性がある。DNA-DNA ハイブリダイゼ

ーション法での 70%以上の値は、全ゲノムシーケンスデータを利用した場合（average nucleotide identity ; ANI）で 95%以上の値を示すことが多い。このため、ANI で 95%以上相同であることが 2 つの微生物間の種判定に利用される場合がある(14)。

このような遺伝子レベルでの細菌種の同定以外に、各菌体の総タンパク質プロファイルの類似性を利用した微生物の同定技術が利用される場合がある。多くの場合、MALDI-TOF-MS を利用したタンパク質のマスマスペクトラムの類似度が用いられている(15)。本法では、一般に株レベルでの差異が識別可能であり、同一の株であるか判定する際にも利用できるとされている。ただし、培養条件等によりタンパク質プロファイルが変化する可能性があることから同定への影響を考慮する必要がある。

顕微鏡下での視覚的な同定では、16S rRNA を標的とした蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法や、目的菌の持つ特異的な抗原に対する抗体を利用した蛍光染色法などにより、試料中の微生物の視覚的同定や存在比の計測が可能である。

図 1 ゲノム・メタゲノム解析のフローチャート。ヒトの腸内、皮膚や口腔、さらには自然環境中の細菌群集をターゲットとしたメタゲノム解析により、LBP 候補となる細菌を特定する。特定した LBP 候補細菌をゲノム解析し、病原性遺伝子や薬剤耐性遺伝子の予測など、*in silico* での安全性評価を経て有力な LBP 候補を選定する。



2.2 複合微生物系での解析技術（定量）の動向

複数の微生物種により構成される LBP_s 製品では、その組成（構成する細菌種とその存在比等）の評価が重要な場合があると想定される。また、非臨床試験や臨床試験などで、LBP_s 製品の有効性や安全性等を評価するために目的とする試料中（腸管内や糞便等）の微生物群集構造を評価するための解析（マイクロバイーム解析）が行われることがある。その場合に、どのような系統分類群の微生物がどのくらいの比率で試料中に存在するかが評価されることになる。現在、一般的には 16S rRNA 遺伝子を標的とした解析（NGS を利用したアンプリコン解析や、制限酵素断片長多型（Restriction Fragment Length Polymorphism ; RFLP）法（制限酵素末端断片長解析法）など各種の分子生物学的解析方法）や、NGS を利用しゲノム全体を対象としたショットガンメタゲノム解析が実施される場合が多い。NGS を利用したマイクロバイーム計測では、上記のとおり、大きく 1) アンプリコンシークエンス解析と 2) メタゲノム解析が利用される（図 1）

アンプリコンシークエンス解析は、16S rRNA 遺伝子などの分子系統分類のためのマーカー遺伝子や機能遺伝子などを対象として、広く様々な系統分類群を網羅するプライマーセットを利用し、PCR による増幅と、PCR 産物（アンプリコン）を超並列シーケンシングにより解析する方法である。本法は、これまでマイクロバイーム計測において最もよく用いられている方法である。一般に 16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析では、当該遺伝子の 200~300 塩基長の部分配列を解読し判別するため、株レベルの識別は難しく、種レベルの判別も一般には難しい。

一方、メタゲノム解析は、マイクロバイーム中の DNA 等の塩基配列を網羅的に解析することで得られるマイクロバイーム中の複数のゲノム情報（メタゲノム情報）を網羅的に解読する方法である。

アンプリコンシークエンス解析では比較的安価にマイクロバイーム計測が実施でき、様々な系統分類群のマーカー遺伝子の塩基配列情報と共に、超並列シーケンシングにより得られる塩基配列の検出頻度からそれら塩基配列の予備的な情報が得られる。一方、メタゲノム解析では、特定のマーカー遺伝子の情報ではなくゲノム全体を対象とすることから、量的な解析には比較的高い解析並列度（シーケンシング深度）の DNA シークエンスが必要になる。そのため、DNA シークエンシング時のコストが高くなる傾向がある。本法により、特定の遺伝子配列の情報及びその存在量の情報からの系統分類情報のみならず、ゲノムスケールの情報（様々な機能遺伝子の配列及びそれらの定量情報）や、個々の微生物のゲノム情報の再構築などが可能となり、マイクロバイームとしての代謝機能の予測や、個々の微生物間の相互作用などの予測も可能となる。また、アンプリコンシークエンス解析のように特定の PCR プライマーに依存しないため、原理的にはプライマーの選択性による計測の偏り（バイアス）が発生しにくいことから、より正確なマイクロバイーム計測ができる可能性がある。

これらの解析法の他、顕微鏡下での計測では、16S rRNA を標的とした蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法や、特異的な抗体を利用した蛍光染色法などにより、試料中の微生物細胞の直接計測も可能である。16S rRNA を標的とした蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法は、様々な系統分類レベルに応じたプローブをフレキシブルに用いることにより識別に利用できるが、これらの手法では株レベルの識別は難しい。一方、特異的な抗体を利用した蛍光染色法では株レベルでの識別も原理的には可能である。

2.3 *in silico* での安全性評価

LBP を構成する個々の細菌株に関して、それぞれの標的あるいはどのような作用を持つのかを確認するとともに、特定の細菌が分子レベルで人体にどのような影響（作用）を及ぼすのかを包括的に理解することが重要である。そのためには、個々の細菌株の完全ゲノム解読（ゲノムアセンブル、遺伝子アノテーション、プラスミドやファージの存在、トランスポゾン（Transposon; Tn）など可動遺伝子同定、毒素遺伝子同定など）、多様な環境条件下におけるトランスクリプトーム解析やメタボローム解析が求められる。さらに、マルチオミクス解析に基づく分子メカニズムの理解が重要となる。特に注意すべき点は、一般に細菌ゲノムの全遺伝子の 30~50% が機能未知遺伝子であることである。これら全ての機能未知遺伝子の機能を明らかにすることは現実的ではないが、これら遺伝子の薬理作用や安全性に対する影響の有無などの検討を考慮すべきであると考えられる。また、使用する菌株の起源に関する情報を明らかにしておくことも重要である。LBP では、基本的に健康ドナーから単離した菌株が用いられると想定されるが、ドナーの感染菌や病歴等の情報について取得しておくことが望ましい。

2.3.1 遺伝子の推定

単離した細菌株のゲノム塩基配列情報を解読することによって、細菌が保有するおおよそ全ての遺伝子を推定することが可能となる。遺伝子推定には、ゲノム配列上の遺伝子転写・翻訳領域の推定と、それら遺伝子の機能の推定が含まれる。遺伝子領域の推定法は、ゲノム科学黎明期から開発が続けられ、特に確率モデルを導入した推定法（GeneMarkS(16)やProdigal(17)など）により、概ね 90~95% の確度で高精度に推定可能とされている。ただし、ゲノム配列の特徴が水平伝播により獲得された他の領域と異なる領域などでは予測精度が低下する傾向にあることに注意が必要である。また用いる解析ソフトウェアの設定によっては、短い遺伝子を検出することができないことを考慮する必要がある。遺伝子機能の推定は、遺伝子配列データベース（GenBank/EMBL/DDBJ(18)やKEGG(19)など）やモチーフデータベース（InterPro(20)やPfam(21)）などに対する配列相同性検索が利用されている。相同性が一般的に 30% を最下限としてアミノ酸配列が相同である場合に、入力した遺伝子とデータベースの遺伝子の機能が同様であると推定することができる。

2.3.2 病原性（毒素関連遺伝子など）の推定

病原性因子の推定においては、病原性細菌や病原性因子の知識及び遺伝子配列を集積し

ているデータベース The virulence factor database (VFDB)(22)を参照データとして相同性検索により推定する方法が一般的である。メタゲノム配列データから VFDB を参照し病原因子を推定するソフトウェアや解析パイプラインも公開されており、これらを参考にすることができる (PathoFact(23)など)。また、主に病原性細菌に関するゲノムやオミックスデータの統合データベースである PATRIC(24)もその病原性の推定に有用である。

2.3.3 薬剤耐性遺伝子の推定

LBPを構成する個別の細菌株においては、薬剤耐性遺伝子 (Antibiotic Resistance Genes; ARGs) の有無も重要な情報である。この ARGs の推定においても、CARD(25)、ARDB(26)、MEGARes(27)など ARGs データベースに対する配列相同性の検索を利用することが主流となっている。昨今の AI 技術の発展により、深層学習により ARGs を予測する DeepARG(with DeepARG-DB)(28)や、統合解析プラットフォーム ARGMiner(29)も開発・公開されており、これらを用いることも可能である。

2.3.4 プラスミドなど可動性遺伝因子

ファージゲノムやプラスミド、Tn など、既知の可動性遺伝因子 (Mobile Genetic Elements; MGEs) を特定することは、LBPの有効性や安全性を評価する際に重要である。MGEs の特定の際には、MGEs の収集と分類が行われているデータベース ACLAME(30)が最もよく利用されている。しかしながら、2021年現在、データが10年以上更新されておらず、最新の情報がほぼ反映されていないことなどに注意が必要である。プラスミドやインサーションエレメント (Insertion elements ; IS)、Tn などの Transposable elements の予測ソフトウェアも多数ある(31)。ファージの予測においてもデータベースに対する配列相同性から予測するもの、また Recurrent Neutral Network/回帰型ニューラルネットワークによる深層学習法を用いて配列パターンから予測するソフトウェアも登場している (PHAST/PHASTER/PHASTEST(17)、VirFinder(32)、VirSorter2(33)、Seeker(34))。それぞれ長所と短所を考慮して、これらを組み合わせることで解析することによって予測精度を上げることが重要である。多様なツールを組み合わせ、メタゲノムデータから MGEs を予測する解析パイプラインも開発・公開されている (eMGE(35)など)。どのような解析手法 (ソフト) を用いて得られた結果であるかを明確にするとともに、得られた結果の確実性についても考慮しておくことが重要である。

2.3.5 ゲノムシーケンス情報からの増殖速度の推定

ショートリード型 NGS を利用したランダムショットガン法で細菌のゲノムを解読すると、環状染色体の複製開始点 (ori) から終結点 (ter) に向けて、ショートリードのカバレッジが連続的に低くなる現象が観察される。これは細菌がいわゆる θ 型複製を行うことに起因している。この特徴を利用して、集団中の個々の細菌の増殖速度を推定する技術が開発されており (PTR(36)、iRep(37)、GRiD-MG(38)など)、対象とする細菌が集団中で増殖しているのか、相対増殖速度はどの程度なのかを推定することが可能である。

2.4 *in vitro* での評価

2.4.1 ヒト腸管モデル

食品や薬剤の腸管への機能的影響や安全性を評価するために、ヒトの腸管及び腸内細菌叢を模した *in vitro* 培養系が開発されている。小腸を再現する系では、主に吸収機能の評価に重点をおいたものが中心で、例えば、ヒト腸管上皮を介した亜鉛の取込みと内腔から上皮への輸送を解析するために、ヒト腸管細胞由来の細胞株 (Culture Cell Line; CCL) である Caco-2 とムチンを分泌する細胞や *in vitro* 消化モデルなどの腸管上皮の他の関連成分を組み合わせた *in vitro* モデルが開発されている(39, 40)。しかしながら、これらのモデルは腸の特定の機能や特徴を再現しているが、小腸の複雑な微小解剖学的構造や腸管腸壁の収縮蠕動運動、不均質な細胞集団 (heterogeneous cell population)、酸素勾配、多様かつ膨大な細菌叢などがモデルに含まれていないことが多い。最近になって、マイクロ流体技術を活用してダイナミックな動きをもつ構造的環境、シグナル伝達、その他小腸の重要な特徴を模した新たな *in vitro* モデルが開発されつつあるが、いずれも再現性を含めて得られるデータは限定的な情報である可能性が高いため注意が必要である。

一方、大腸の再現系では、腸内細菌叢と代謝産物に着目したものが中心であり、歴史的に、胃、小腸、大腸を模した多連式の培養系が開発されてきた (PolyFermS(41)、TIM-2(42)、SHIME(43)、EnteroMix(44)、Lacroix(45)など)。しかし、比較的容易に利用できる腸内細菌起源は糞便であり、大腸の腸内細菌叢は再現できても、いくら多連式であっても小腸を含む上部消化管の菌叢を再現することは、その検証も含めて困難である。最近開発された 1 槽式の培養系 (KUHIMM(46)) は、複数の介入試験が同時実施できることや、ある疾患の患者糞便を用いて疾患特異的な菌叢を再現できること、さらに、そこに治療介入を行うシミュレーションができるなどの長所がある。ただし、これらの大腸モデルでは、ムチン層の存在と影響、腸上皮細胞との共存、長時間の安定性は再現できておらず、得られたデータの外挿性については注意が必要である。

2.4.2 ヒト腸管オルガノイド

LBP を構成する各細胞株の宿主、特に腸管上皮に対する影響を評価するオルガノイドを用いた *in vitro* 評価法が開発されている。オルガノイドとは試験管の中で組織幹細胞から誘導して作製されるミニ臓器であり、幹細胞のもつ自己複製能と分化能を利用して自己組織化させることで 3 次元的な組織様構造として形成される。生体では腸管上皮細胞は全て、その陰窩 (いんか) の底部にある腸管幹細胞より分化し、腸管上皮組織の恒常性を維持している。この腸管幹細胞の自己複製や分化の能力を制御するニッチシグナルの機構解明が進み、細胞外基質の「Matrigel」を用いて腸管上皮細胞を長期間 3 次元で培養することが可能になった。これまでの培養細胞やスフェロイドに比べ、オルガノイドは解剖学的・機能的に生体内の器官に近い特徴を有し、正常組織由来のオルガノイドの構築も可能とされている(47)。従来、薬物や食品成分の腸管における吸収性などの評価に、ヒト大腸癌から分離された Caco2 細胞が広く用いられてきたが、最もよく使われる CCL のひとつである Caco-2 細胞は

癌細胞由来であるため腸管本来の機能の一部しか有していない欠点があった。健康人由来の結腸組織より作製した大腸オルガノイドを用いることにより腸内細菌と正常腸管上皮の相互作用、宿主への影響を評価することが可能になった(48, 49)。

生体内における個々の腸内細菌株と腸管上皮の相互作用をオルガノイドを用いた *in vitro* 系で再現するためには、細菌を3次元オルガノイドの頂端側 (apical) の位置を確認した上で注入する必要があるが、技術的な困難がある。この点を打開するために3次元オルガノイドを単層化した2次元オルガノイドを用いた培養技術が新たに開発された(48)。2次元オルガノイドにおいても頂端側 (apical) 表層にムチン層が存在しており、生体内における大腸上皮構造が再現できることが示されている。健康人の大腸組織より作製した2次元オルガノイドの頂端側 (apical) に一定量の各菌株を曝露し、8時間後に走査電子顕微鏡でオルガノイド頂端側 (apical) を観察すると、腸管出血性大腸菌 O157 や肝臓疾患患者由来 *Klebsiella pneumoniae* 株をはじめとする病原菌により、大腸上皮オルガノイドに穴が開く pore formation 現象が観察された(50)。重要なことにこの *in vitro* 培養系における菌株による pore formation 誘導能は、各菌株を無菌マウスに投与したノトバイオトマウスにおける腸間膜リンパ節へのバクテリアトランスロケーション能と正の相関が認められており、*in vitro* での菌株の宿主への影響の評価に有用な方法として期待されている。

3. 非臨床試験

3.1 薬理試験 (効力を裏付ける試験等)

効力を裏付ける試験は、期待される薬理作用が臨床試験における用法・用量で発現しうることや、臨床試験で検証された有効性を裏付けるために実施され、基本的には承認申請を予定している製品の薬理的性質を定性的・定量的に明らかにする目的で実施される。この試験では、POC を得るために疾患モデル動物を用いて効力を示す場合や、効力そのものではなく薬力学的な指標 (例えば血中 IL-17 量や特定の免疫制御細胞数など) が利用される場合があるが、薬力学的な指標を評価に用いる場合にはその選択理由についても説明できることが必要である。

モデル動物の選択や投与前の前処置 (抗菌薬処理等) の必要性についても臨床適用を考慮して検討する必要がある。LBP 製品の有効性を示す上では、投与後の持続生着性や、臨床試験での前処置・投与間隔設定の適切性を非臨床試験成績で説明することが必要な場合もある。

3.2 薬物動態試験

LBP 製品の開発にあたっては、化学合成医薬品やバイオテクノロジー応用医薬品で求められる薬物動態試験の実施やトキシコキネティクスの評価は不要と考えられる。一方、LBP 製品の腸管内における分布やその生物学的な特性 (増殖性、持続性) は、腸管内の微小環境

により影響を受けると考えられることから、臨床投与経路に準じた非臨床での腸管内分布試験により、それらの情報を得ることが有用と考えられる。なお、投与した菌株（群）の生体内分布を解析するには、投与前から体内に存在していた菌と区別して評価できる菌株レベルでの同定手法（ゲノム情報等）を確立しておくことが有用である。特徴的な薬剤耐性パターンや菌株に特異的な塩基配列などが利用できると考えられるが、多数の菌株を複合した製剤の場合にはすべての菌株の腸管内分布を解析するのは困難な場合も多い。

また、多層式培養デバイスを用いて、患者の腸内を模した条件や異なる組成を持った LBP の生存キネティックや分布を調べることで臨床試験に入る前に最適用量を推定することも可能とされているが、このような *in vitro* 試験の外挿性についてより多くのデータの蓄積が求められる。

3.3 非臨床安全性試験

通常、医薬品開発では、臨床試験を開始するまでに、臨床候補品に関する品質特性及び薬理学的な特性を適切に把握した上で、ヒト初回投与試験及びその後の臨床試験におけるリスクを予測及び管理する目的で、動物等を用いた安全性評価が実施される。しかしながら、LBP 製品の開発では、まず開発する製品の品質及び薬理学的特性を把握した上で、技術的に可能かつ科学的合理性のある範囲で、ヒトに投与した際の安全性を担保することが求められる。

3.3.1 評価戦略

LBP 製品の開発でも、通常の医薬品の開発と同様に、ヒトに投与した際に期待される薬理作用に関連する有害作用（以下、「オンターゲット毒性」）及びそれ以外の有害作用（以下、「オフターゲット毒性」）の観点から、製品の非臨床安全性を評価する必要がある。

（1）オンターゲット毒性の評価

LBP 製品は、ヒトの腸管に存在する腸内細菌を患者に移植することにより薬効を期待するものであることから、薬理作用の延長にあるオンターゲット毒性の懸念は比較的少ないと考えられる。また、通常の医薬品における非臨床安全性評価では、健康な動物を用いた毒性試験が実施されるが、これら毒性試験に供される動物は自身の腸内細菌叢を有しており、ヒトの腸内細菌叢とは構成や代謝活性が大きく異なることが報告されていること(51)、さらに投与されるヒトの腸内細菌叢が動物に定着しない可能性もあることから、LBP 製品の安全性を通常の毒性試験で評価する意義は限定的と考えられる。したがって、LBP 製品では、健康な動物を用いた毒性試験で非臨床安全性を評価するのではなく、製品のヒトにおける効力を裏付ける動物モデル（げっ歯類を含む動物種 1 種）等を用いた薬理試験の中で評価することが考えられる。当該試験における一般状態観察等により主要な生理的機能（例えば、循環器系、呼吸器系、中枢神経系）への影響を評価することが考えられる。なお、LBP 製品はヒト由来であり、さらに毒性試験による評価の限界も考えると、これらの評価が実施さ

れるのであれば、オンターゲット毒性に関する他の非臨床安全性試験（単回投与毒性、反復投与毒性、遺伝毒性、生殖発生毒性、がん原性等）を実施する必要はないと考えられる。

（２） オフターゲット毒性の評価

LBP_s 製品は、通常、ヒトの腸管に存在する細菌株から構成されることから、関連する公表データや製品での薬理試験成績を踏まえて、ヒトでのオフターゲット毒性（意図しない生体反応や望ましくない炎症反応等）に懸念がないことを評価する必要がある。当該評価において、安全性上の懸念が認められた場合には、毒性試験の実施によってリスク評価を追究するのではなく、当該情報を踏まえて、臨床における適切なリスク軽減の方策を講じることが合理的である。

また、LBP_s 製品は多数の菌株からなる複雑な構成を持つことも多いことから、オフターゲット毒性として意図しない微生物の混入や薬剤耐性遺伝子の混入に加え、製品を構成する微生物が潜在的に持っている毒素産生性や腸管侵入性、薬剤耐性遺伝子、LBP_s 製造工程由来の不純物等による懸念も考えられる。これらについては、LBP_s 製品の開発過程においてその構成菌株のプラスミド保有状況やゲノム上に毒素産生性をはじめとする既知の病原因子が存在しないことを確認するとともに、製造過程での意図しない微生物の増殖や不純物（4.3.4 項参照）が混入するリスクを可能な限り低減した上で、品質試験等で得られている試験成績（不純物の限度値等）を踏まえて、ヒトへの安全性を担保する必要がある。当該アプローチによるリスク評価が困難で、ヒトでの安全性に懸念がある場合には、想定しうるオフターゲット毒性に着目した非臨床試験の実施を検討する必要がある。

4. 製法（バンク樹立）・品質特性解析・規格・試験方法

LBP_s の開発において一定の品質特性を持つ製品を恒常的に生産できる製法の確立と製造された製品の品質評価を行う管理体制の確立が求められる。このために目的とする腸内細菌を選択・単離し、バンク化することによって製品ロット間の恒常性を維持することが重要になる。複数の腸内細菌から構成される複合微生物群を製品として開発する場合、樹立した各バンクの特性解析により、種及び系統に関する情報を明らかにするとともに、表現型、遺伝型に加え、病原性、毒素生産能、バイオハザードに関する情報や、ファージ産生に関する情報を明らかにしておく必要がある。製品の品質管理としては、複合微生物群を構成する各細菌の細胞数や構成割合の維持、異種微生物否定試験などを考慮する必要がある。バンクについて、薬理作用の根拠となる遺伝子群が複合微生物群に存在するかなど遺伝的安定性の評価も必要となる。非臨床試験や臨床試験に用いる、複合微生物群を構成する各細菌の評価、さらには宿主の特性に関連するリスク評価を行い、試験に用いた LBP_s 製品の特性を十分に把握しておく必要がある。以降の章では、対象とする LBP_s 製品として、単一もしくは複合の微生物株により構成される製剤で、腸管に作用し、遺伝子組換え体ではないものに限定して議論する。また、製造、特性解析、原薬の試験に関して考慮すべき論点を整理する。

単一微生物あるいは複数の微生物種により構成される LBP 製品では、微生物そのものが製品の本質であり、出発原料である細菌を拡大培養して最終製品を製造することになる。すなわち生きた細菌そのものが出発原材料であり、かつ最終製品となるために、基本的には出発原材料となった細菌の特性（表現型や遺伝型など）が最終製品の特性と同等であることが求められる。そのために製造では、細菌を培養し増殖させる工程が含まれることから、原薬に残存する可能性のある不純物として、製造に使用した培地成分や代謝物、目的外の微生物（異種微生物）やファージなどが混入するリスクがある。このような不純物等は、製造工程中のさまざまな要因によって変動する可能性がある。LBP 製品の品質を確保するためには、生きた細菌という極めて複雑な特性を持つことを考慮しつつ、最終製品の細菌での分子プロファイルを含めた不均一性を含め、目的とする有効性や安全性を有していることを確認できるように適切な品質管理を行う必要がある。その際、「2.新しい技術の動向」で記載の新しい技術や従来技術の特性を理解しつつ、目的とする LBP に適した技術を選択し利用することが必要である。

4.1 原薬製造およびセルバンクに関する考え方

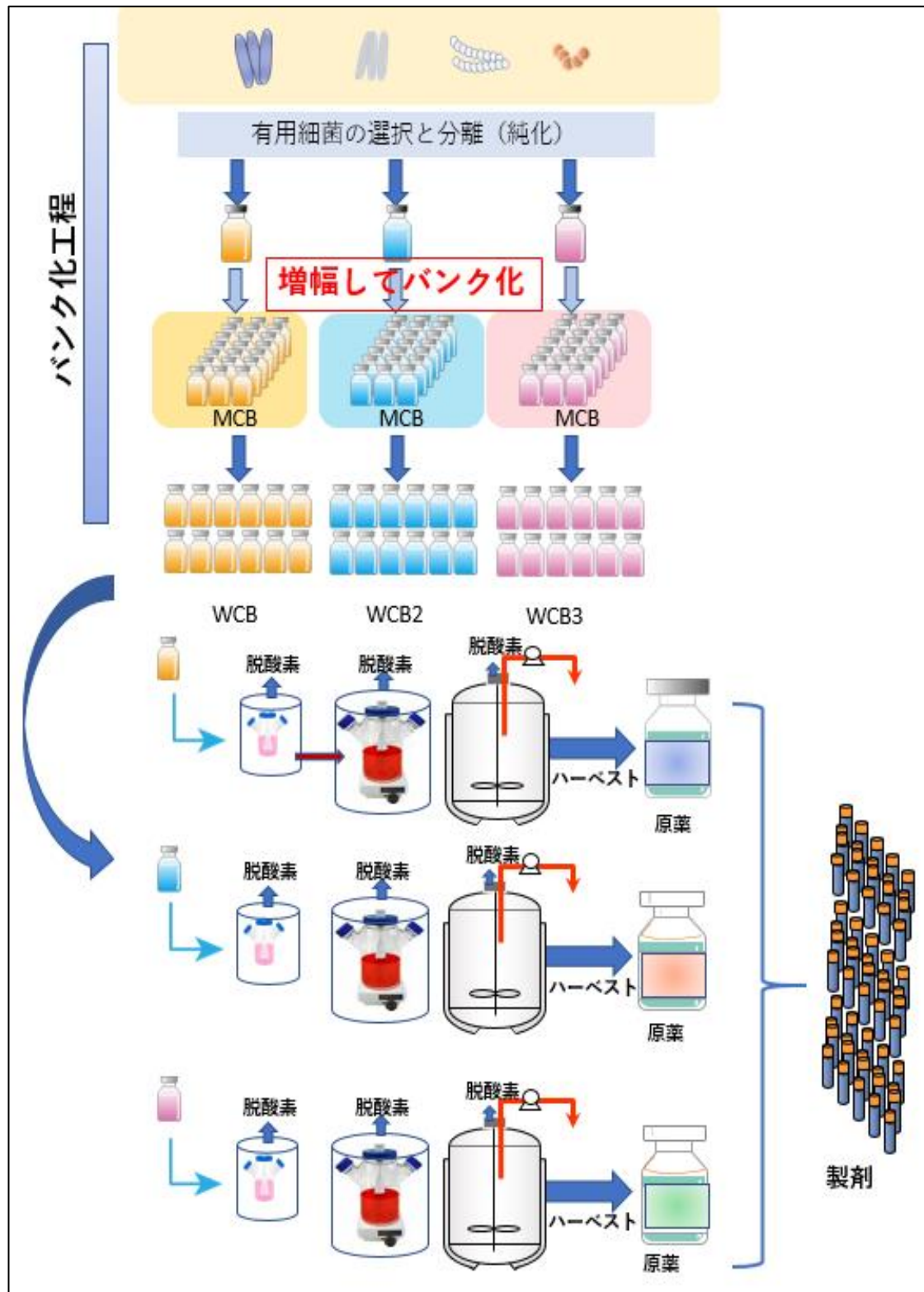
4.1.1 セルバンクシステム（MCB・WCB）の構築と特性解析の考え方

様々な基礎研究を通じてその有効性が期待される LBP 製品の出発原材料となる由来の明確な微生物株（分離等の履歴や実験室での育種履歴等についての情報や微生物保存機関などを明らかにする）から有用な菌株が選別され種細胞株が樹立される。この種細胞株の選別ではその単離・純化や特定の機能を付与することもあると想定される。樹立した種細胞を拡大培養し均一な細胞を大量に調製・分注することによりマスターセルバンク（Master Cell Bank; MCB）が作製され安定な条件で保管される。MCB は LBP 製造の出発原料となる細胞であり、製造管理の出発点となる。このために MCB を対象として多面的にその特性解析を行うことが求められる。例えば細胞形態を顕微鏡で確認する（寒天平板培地上にコロニーを形成する場合はその形態も確認する）とともに、菌種（株）固有の 16S rRNA 遺伝子配列や MALDI-TOF のマススペクトル解析（MALDI-TOF-MS）などを用いて目的株の同定を行いその純度や同一性など遺伝型や表現型の特性解析を行う（表 6）。このような特性解析により適格性が確認された 1 バイアルないしは数バイアルの MCB を培養してワーキングセルバンク（Working Cell Bank; WCB）が作製される。細菌製剤の製造では通常 MCB から作製された WCB を用いて拡大培養する工程が採用されることが多い。医薬品として特定の機能を有した LBP を製造するためには、培養条件（培地成分・培地 pH・培養温度・培養時間・溶存酸素濃度・培養スケールなど）を適切に管理し、目的とする機能を維持することが重要である。最適化された培養条件の下で製造された細菌製剤は、製造終了時の細胞（End of Production Cell; EPC）や製造条件を超えて製造した細胞（Cells at Limit of in vitro age; CAL）を用いて、MCB 及び WCB 作製時と同等の表現型や遺伝型を有していること、また目的とする生物活性を有していることなどを評価することが求められる。このように CAL/EPC で

の増殖能を確認するとともに、培養期間中目的とする品質特性が維持されているかどうかを確認することも重要である。培養スケールによって菌株の生育や状態が変化することを考慮する必要がある。ただし、特定の因子の関与が明らかになっており、品質特性に影響を及ぼさないと考えられる場合は、菌株の生育や状態の変化も許容の範囲とする。特定の物質を産生する（色素産生や菌体外多糖産生など）菌種の場合はその生産能力も特性指標と考えられる。

LBP_s 製品の製造では、確立された再現性の高い製造方法を用いて拡大培養を行い、決められた培養期間の後、集菌・洗浄され適切な緩衝液に懸濁された菌体が原薬の製造に供されることになる想定される。ハーベストされた細菌を洗浄等の操作後、MCB での特性解析結果に基づいて、原薬として求められる試験を実施することになる。基本的には MCB 等との同等性を示す適切な規格試験を設定し、ロットごとの特性及び純度を改めて確認することも必要となる。

図2 有用菌種を発見後、目的とする菌を単離し、菌種ごとにバンク化される。生産工程では各有用菌の最適な条件で拡大培養されハーベストした菌が原液となる。複数の菌から構成される LBP_s 製品では所定の混合比にこれらの菌種が混合され、製剤化される。



4.1.2 WCB の培養の上限設定 (EPC や CAL) の考え方

- バンクシステムは ICH Q5D ガイドラインのセルバンクシステムの考え方が適用できる。LBP_s 製品の製造用に選択した単一あるいは複数の菌種を種細胞株として選択し、その種細胞株を拡大培養して、均一な細胞懸濁液を調製したものを分注して安定な条件で保存することにより MCB を作製することができる。MCB は LBP_s 製品製造の出発原料となる細胞 (菌) であり、樹立した MCB に対しその品質特性として表現型や遺伝的特性を十分に解析することが求められる。また目的外の細菌等の汚染がないことや特定の因子の産生能など多面的に品質特性評価を実施しておく必要がある。さらに MCB の更新や MCB から作成される WCB の作製時に実施すべき試験についても検討しておくことが求められる。
- LBP_s 製品の細胞バンク中の細菌は基本的に人に投与される最終製品の本質 (細菌) と同様の特性を持っている。このために、バンクに用いられる特性解析法は後述する LBP_s 製品の原薬や製剤の試験にも用いられる可能性が高い。バンク作製時にはこの様な観点からの評価も有用である。
- 遺伝的安定性：作製したバンクについて、長期保存での遺伝的安定性と WCB の製造工程への導入から生産培養の終了時までの間の遺伝的安定性を評価する必要がある。作製したバンクの遺伝的安定性については変異の生じる可能性の低い条件 (例えば超低温での保存) で保存しリアルタイムで安定性を評価していくものと考えられる (後述)。細菌製剤では哺乳類細胞よりも培養期間が品質特性に与える影響は少ないとされているが、培養条件などにより遺伝的安定性が影響を受ける可能性がある。そのため、製品の製造時に想定される培養期間を超えて培養を行い、遺伝子配列の変異を解析することが行われる。一方でこの評価において全く遺伝子配列が変化しないことを求めているのではなく、LBP_s 製品としての有効性や安全性に影響がないことを確認することが遺伝的安定性試験の目的である。もし MCB/WCB と比較して何らかの遺伝子変異が認められた場合に、認められた変異が有効性や安全性にどのような影響を及ぼす可能性があるのかを評価することが重要である。

一方、EPC/CAL と MCB/WCB の特性を比較し、その同等性を明らかにすることにより、採用しようとしている培養法 (製法) の妥当性を示すことができる。

4.1.3 長期保存条件の評価

- MCB、WCB の保存安定性について
作製した MCB・WCB は多くの場合、超低温 (例えば -80°C 以下) で凍結して保存される。凍結保護剤としてグリセロールを使用することが多いが、菌種によってはグリセロールよりジメチルスルホキシドの方が保存安定性の良い場合がある。凍結保護剤の種類及び濃度を変化させた上で菌種に対する凍結保護剤の影

響を経時的に検討し、長期保存時にも安定な条件での保存法を設定することが望ましい。一方で菌種によっては、MCB は凍結乾燥法や L-乾燥法による保存が適している場合もある。

4.2 特性解析において留意すべき事項

他の医薬品と同様に、生菌製剤の品質特性解析は重要品質特性（Critical Quality Attributes; CQA）の特定と品質管理戦略の構築のために重要であり、細菌製剤の特性を考慮し多面的な解析を行っておくことが望ましい。そのうえで、出荷時の規格試験と規格値を設定することが必要である。

4.2.1 物理的・化学的性質（株の分類・同定を含む）

複合微生物群を構成する各細菌は株レベルでの同定とその確認が必要とされ、原則として全ゲノム解析などを実施することが望ましい。全ゲノム解析に加えて、以下のような特性解析の実施を考慮すべきである。

- 形態学的特性（顕微鏡下での形態及びグラム染色性）

基本的性状を把握するために、形態学的な情報は必須と考えられる。通常、光学顕微鏡や電子顕微鏡を利用して細胞形態を観察するが、その前処理により形態が変化することには注意が必要である。また、菌種によっては培養条件により細胞形態が変化（桿菌から球桿菌への変化や異常伸長する場合がある）することがある。またグラム染色性が変化する可能性にも注意が必要である。

- 16S rRNA 遺伝子配列等分子系統マーカー遺伝子による分子系統学的同定

対象とする微生物の分類学的位置を推定するため、少なくとも 16S rRNA 遺伝子配列（遺伝子の全長配列）の解読による系統分類の確認は必要でありバンク樹立時の配列との一致を確認する必要がある。近年の 16S rRNA 遺伝子配列の類似度の基準は 98.7%以上で同種とみなされている(52)。ただし、同一のバンクから製造された菌株はバンクの 16S rRNA 遺伝子配列と原則として 100%の類似度が得られることを特性解析で確認する必要がある。ゲノム中の単一コピー遺伝子などをマーカーにしたゲノムレベルでの系統分類推定も確認試験として有用である。バンク樹立時の推定において、近縁種や株にすでに病原性が知られているものが存在する場合、その安全性評価は特に注意が必要になる。

- 化学・生理学的分類指標

細菌株の同定をするために、全タンパク質を対象とした MALDI-TOF-MS のスペクトル解析を実施することも有用である。また、生理学的反応のプロファイルを把握するため、市販の同定キットの使用も有用な場合もある。ただし、MALDI-TOF-MS のスペクトル解析や同定キットは、供試する菌株の培養状態によって結果のバラツキが生じることに注意を要する。またこれらの手法は、製剤の確認試験や製造プロセスでの工程管理確認試験（PAT）としても利用できると考えられ

る。

- 薬剤耐性プロファイル

対象の生菌製剤を投与した際、それが体内で制御不可能な増殖を示すなどのインシデントの発生の可能性を非臨床の段階で評価しておくことが有用な場合がある。2章で記載の、ゲノム情報からの薬剤耐性ポテンシャルの推定を含め、通常臨床等で使用される薬剤に対する耐性の情報を取得することは重要な特性解析となると考えられる。

- アミン生成・薬剤代謝プロファイルなど

ヒト生体に対して食中毒等の毒性を示すアミン類は、アミノ酸などを基質として特定の微生物群により生成される場合がある。生菌製剤の対象微生物株が強い毒性を示すアミン類を代謝産物として生成するリスクを考慮し、解析の必要性を検討すべきである。また、常用される可能性がある薬剤に対する代謝プロファイルの評価や、その代謝物の評価なども同時に考慮すべきである。

- 複合系における課題

複数の微生物種により構成される LBP 製品の場合、上記の考慮すべき項目は菌株毎に評価されるべきである。同時に、製剤化に伴って混合された複合微生物群の状態において薬剤耐性プロファイルやアミン生成、薬剤代謝プロファイルなどの代謝能が変化する可能性を考慮すべきである。また、複合微生物群の状態における評価においては、各菌株の構成比率は常に評価すべきであると考えられる。

4.2.2 生物活性

LBP 製品においても、薬力学的観点から投与する生菌製剤の薬効に関連する生物活性を適切に評価することが必要である。生菌のどのような生物活性を測定するかは、その作用機序によって異なることが想定される。生菌の特定のタンパク質や代謝能など、薬効の作用点が明らかな場合は、その対象であるタンパク質の産生能や機能を測定することが想定される。一方、その作用機序が明確でない場合、微生物細胞量（あるいは生菌細胞量）が生物活性の発現に寄与している可能性があり、投与量の設定などの基盤となる。生菌数の評価には、コロニー形成数 (Colony-Forming unit; CFU) や液体培養での計数 (Most Probable Number; MPN) から特性解析を実施することが想定される。生菌の割合は、顕微鏡下での直接計数法による全菌数の評価と生菌数の評価などから評価することが可能であると考えられる。複数の微生物種により構成される医薬品の場合、上記の特性は、原則個別に培養された単一微生物株に対して解析され、その後所定の比率になるよう混合して製剤化されると想定される。また、複数の微生物種により構成される医薬品の場合、それら微生物株の混合比が重要品質特性の一つになると考えられる。この場合、2章で記載のメタゲノム情報からの増殖速度の推定などが構成細菌株毎の生物活性の測定の代替になる場合もあるかもしれない。このような製品に含まれる微生物構成（微生物群集構造）の解析では、メタゲノム解析や定量 PCR などにより評価できると考えられる。これらの評価では、解析の定量性を担保するため、標準

物質を利用した試験方法の適切な精度管理が不可欠である。

これらの測定基盤に立脚した薬力学的な評価には、以下の観点が重要であると考えられる。

- 力価（投与量）

LBP_s 製品の投与量設定の根拠となる力価を生物活性で規定することは容易ではないと想定される。有用物質の産生がその効能に直接結びついていることが明らかでない場合には、有用物質の産生能を力価として設定することも可能かもしれない。一方、免疫制御など複雑な免疫応答がかかわっている場合など *in vitro* での生物活性試験としての設定が困難な場合も多いと想定される。このような場合にはその有効性を担う生菌数を力価として設定することが有用と考えられる。このような力価設定を想定し、開発初期よりその有効性を担保する生菌数と関連付けられるような解析が求められる。力価に基づいて投与量を設定し、非臨床試験や臨床試験を通じて設定した力価がその有効性を適切に反映していることを検証することが有用である。

- *in vivo* 試験や培養細胞を利用した生物学的試験

対象疾患等に応じた適切なモデル動物やモデル細胞等が利用可能な場合は、薬力学的評価を実施することが求められる。

- 作用機序の解明によりタンパク質の発現などの特定の活性により評価できる生化学的試験

動物等を利用した試験の代替となる薬力学的指標として生化学的試験が設定できる場合は、その構築を検討すべきである。ただし、腸管に働きかける生菌製剤の場合、その投与量と薬効が必ずしも相関しない場合が想定されることは考慮すべきである。例えば、生菌製剤の代謝物が血中に移行しその濃度と薬効が関係する場合、投与した生菌製剤の体内での増殖などの動態や、その代謝能の発現などはそれぞれの体内環境に依存することが想定できる。そのような可能性についても考慮する必要がある。

- 投与経路（経口あるいは経直腸）

経口投与の場合は、胃酸の影響などで生菌製剤の生存率や活性などに影響を与える可能性がある。その意味で、投与経路の違いによる生物活性の評価の妥当性も検証すべきである。

4.3 原薬及び製剤の試験において考慮すべき事項

原薬の規格試験は、品質特性解析で明らかとなった LBP_s 製品の CQA について、必要十分な技術で評価し、適切な品質の範囲であることを確認するものである。

4.3.1 分類・同定

- 形態学的記載：顕微鏡下での形態、グラム染色性
細菌の形態は、細胞観察やグラム染色性などは培養条件等により変化する場合がある。また、原核微生物細胞は形態が単純であり、その形態だけでの確認試験では不十分である。異常な形態の細菌が混入していないことを確認する目的で顕微鏡観察を実施する。あるいは特異的抗体等で蛍光染色した試料を顕微鏡観察することで確認試験とすることができることもある。
- 16S rRNA 遺伝子の部分シーケンシングの確認
培養株の 16S rRNA 遺伝子を PCR で増幅し、その部分シーケンシングを実施し想定される配列が得られるか、あるいは制限酵素断片長多型 (RFLP) パターンを標準物質等と比較し想定のものであるかを確認することで同一性を疑似的に確認することも可能である。
- MALDI-TOF-MS 解析
目的菌株の産生するタンパク質を対象とした MALDI-TOF-MS のスペクトル解析を標準物質との同一性の確認に適用できる可能性がある。この場合、培養条件等でスペクトルが変化することがあり、規格範囲を適切に設定する必要がある。
- 薬効に関連する遺伝子を標的としたシーケンシングなど
薬効の作用機序が明らかであり、その薬効を担う目的遺伝子群などが明らかの場合、その遺伝子配列に基づいて同一性試験に適用できる可能性がある。

4.3.2 生物活性

特性解析で実施した薬効評価を原薬の規格試験の生物活性試験として設定し、ロット毎に実施することは容易ではない場合が多い。その場合、薬力学的指標としてその代替となる生化学的試験が実施できることが望ましい。その設定が困難である場合、製剤中の微生物の生存性(生菌の割合)や生菌数などを評価することで、その代替法とすることも考えられる。その場合、指標として利用するものが薬効と相関することをあらかじめ明らかにしておく必要がある。

4.3.3 純度

LBP 製品の純度は、原薬等の中に存在する微生物のうち、目的微生物株が占める割合を純度とし、目的外の混入微生物を否定する必要がある(異種微生物否定試験)。この場合、上述の顕微鏡観察での混入微生物細胞の検出のほか、様々な培地を用いることにより、目的微生物は増殖しないが他の一般的な混入微生物は増殖するような培地での培養試験を実施することで混入微生物を検出する方法が考えられる。あるいは培養された複数のコロニーを MALDI-TOF-MS などで評価し、想定外のスペクトラムが検出されるかを確認するなどの試験が設定できると考えられる。例えば、偏性嫌気性細菌の多くは種々の血液寒天培地で培養することによって特徴的なコロニー形態を示すので、その特性を利用することも有用である。あるいは、嫌気性細菌の場合は好気培養も同時に行い、好気性細菌の汚染がないことを確認することも考えられる。また、16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析やショットガンメタ

ゲノム解析などで汚染の検出も可能である。同時に、ファージなどの混入が課題になる可能性もあり、その場合それらの混入否定試験の設定を考慮すべきであろう。特に難培養微生物を培養する場合、動物由来の物質を培地成分として利用することがあるが、ウイルス汚染を否定された原材料を用いることが求められる。

4.3.4 不純物

LBP_s 製品の不純物としては、培養工程に用いる培地成分等の工程由来不純物の評価が求められる。これらの物質については、主要な物質についてその許容範囲を設定し、適切に精度管理された分析方法で分析することを考慮する必要がある。また細菌が産生する様々な生理活性物質の中で望ましくない作用をおよぼす可能性がある物質については、その限度値を評価しておく必要がある。

4.3.5 力価

力価は投与量の根拠となる規格であり、通常は薬効に関連する生物活性に基づいて設定されるが、LBP_s 製品を構成する生菌の数といった物質質量で設定することも可能である。あるいはマイクロバイオームが産生する有効成分の産生量で規定できる場合がある。

4.3.6 物質質量

製剤の力価としての物質質量として菌数を計測することが想定される。多くの場合、期待される薬効は生菌によると想定されるが、死菌細胞が有効性に寄与する場合も考えられる。また、薬効の作用機序がどの程度明らかになっているかによっても、その捉え方は変わると考えられる。一般には、生菌での菌数を想定することが多いと考えられ、CFU や MPN など適切な方法で細胞数を評価することが考えられる。複数の微生物株が混合されている場合や、難培養微生物で培養評価に時間がかかる場合、細胞数と相関することが確かめられている分子生物学的方法（リアルタイム定量 PCR、デジタル PCR、アンプリコンシークエンシングなど）や生化学的方法（蛍光法や ATP 発光法）で代用できる可能性がある。

4.3.7 安定性試験に基づく有効期間の設定

原薬、製剤の有効期間を設定するために安定性試験が実施される。LBP_s 製品における安定性試験は、実保存条件、実保存期間に基づいて実施する必要がある。特に、複数の微生物群からなる LBP_s 製品の場合、構成するそれぞれの細菌の安定性を評価することが重要である。一方で加速試験や苛酷試験によってどの菌種がその影響を受けるかを評価することにより有用な情報が得られるが、有効期間の設定に用いることはできない。

複数の生菌から構成されるカクテル製品の力価設定では、生菌数で力価を設定している場合は、構成する生菌数をどのように規格化するかが課題である。混合されている製剤の中の各生菌をどのように測定するか、あるいは特定の生菌数を力価と設定し、安定性を評価することも考えられる。

4.4 製剤化工程開発

細菌製剤を構成する主な菌種は嫌気性細菌であると考えられる。したがって、十分な生存

性を維持して目的とする患者の腸内に送達させるために、緩衝液や安定化剤と共に特殊なカプセル（シームレスカプセルなど）を用いて製剤化することが想定される。さらにLBP_s製品の製剤化開発では、目的とする細菌の安定性のみならず腸への効率的な送達を考慮して製剤化開発が行われる。例えば経口投与であれば、腸への送達を考慮したカプセル化などが考慮される。また製剤化工程が各生菌の安定性にどのような影響を与えるかの評価も必要である。

4.5 分析上の留意事項

特にLBP_s製品の分析では微生物群集構造解析が実施される。図2（ハーベスト）に示すように、異なる株の原薬を混合した製剤を作製した後の混合比率の測定のみならず、非臨床、臨床段階での動態解析において本解析は重要な役割を果たす。前章で述べた通り、本解析ではNGSを利用した計測が実施される。NGSを利用した計測では、一般に、1) 構成する細菌試料の採取、2) 試料の安定な保管、3) 核酸抽出、4) シークエンシングライブラリの調製、5) シークエンシング、6) データ解析、の大きく6つの分析過程を経て結果がえられる。それぞれの過程で計測の結果に影響を及ぼす要因が複数考えられ、データの信頼性確保のために各工程のバリデーションを行う必要がある。医療分野における遺伝子検査の精度管理では、試料の保管までがプレアナリシス段階、核酸抽出以降がアナリシス段階とされている。特にアナリシス段階での妥当性確認（分析法バリデーション）において留意すべき点に焦点を絞り試験の適切性を担保する必要がある。なお、プレアナリシス段階も測定の信頼性確保において重要な要素であることは遺伝子検査の領域で認知されており、LBP_s製品分野においても同様である。

これらのLBP_s製品の特性解析では、施設間差を含めてその分析法バリデーションを実施すべきである。マイクロバイーム計測の妥当性確認に際しては、一連の解析工程の最後から上流に向かい段階毎に実施すべきである。すなわち、各施設においては、はじめにデータ解析の妥当性確認を適切な参照データを利用して実施し、妥当性が確認されたデータ解析方法を元にシークエンシングライブラリの調製とシークエンシング過程を適切なDNA標品を利用して検証する。妥当性が確認されたシークエンシングライブラリ、シークエンシング、データ解析方法により、適切な菌体標品（菌体モック標品、もしくは実試料標品）で核酸抽出過程を検証すべきであると考えられる。上記検証を実施した例が報告されており、それらが参考になる(53)。また、国内においては製品評価技術基盤機構（National Institute of Technology and Evaluation; NITE）が高品質な上記モック標品（菌体、核酸標品）の製造、頒布を検討しており、それらの標品を活用できると考えられる。

4.6 標準物質

初期に製造され十分な特性解析がなされたLBP_sを構成する生菌が一次標準物質として樹立されると考えられる。樹立後最も安定な条件で保存され、特性解析や原薬及び製剤の試

験においてその校正や試験判定の参照に用いられる。作製された標準物質は基本的に LBP_s を構成する生菌毎に単独で保管されると考えられる。構成する複数の生菌を混合して保管される可能性も考えられるが、この場合各生菌の評価試験に用いることが困難になる。一方、各種の LBP_s の試験において純粋分離された公的な標準品（理化学研究所や NITE などが配布している生菌）を用いることも行われる。

5. 臨床試験での考慮事項

LBP_s 製品の臨床開発では、非臨床試験での解析結果に基づいて臨床試験での初回投与量が設定されることになる。また、投与に際しては体内での効率的な生着を担保するために抗菌薬等による前処置が行われることが多いと想定される。抗菌薬を用いる場合には被験者の安全性担保が重要となり、場合によっては抗菌薬に対する患者の感受性等の予備試験が必要となる場合が考えられる。また抗菌薬以外に生着の促進や投与した LBP_s の体内での持続性を担保するために食事療法等が求められる可能性も高い。その場合にはその根拠を十分に説明できることが必要であり、また被験者への適切な指導も重要となる。第 I 相となる開発初期では、ヒトでの安全性を評価するためのヒト初回投与量が非臨床試験等に基づいて設定される。LBP_s では一般的な医薬品開発で求められる薬物動態試験の実施は通常求められないが、目的とした LBP_s の生着を間接的に評価するために、被験者の便の検査などが実施される可能性が高い。

遺伝子組換え LBP_s の臨床開発を行う場合には、治験開始に先立ってカルタヘナ法に基づく第一種使用規程に係る承認を厚生労働大臣に申請する必要がある。申請に当たっては投与された遺伝子組換え LBP_s の体外排出の評価に関する計画を示すと共に、環境に対する影響を評価した結果を示す必要がある。

最適な用法・用量を決定するための検討も考慮すべきである。増量法としてどのような方法が適切かは非臨床試験の結果や他の細菌製剤を用いた臨床データが参考となる。モデル動物での生体内分布データに基づいて治験での投与量が設定されることになるが、その持続性が十分でない場合には反復投与も考慮することになる可能性がある。至適投与量の探索や反復投与の必要性については、被験者の腸内での生着とその持続性を適切に評価する、例えば免疫抑制や抗炎症応答などの薬力学的指標が利用できる場合もある。

有効性を評価するための試験では、LBP_s 製品でも対象疾患の真のエンドポイントでの評価を検討すべきである。適切にデザインされた二重盲検比較試験を設定することが重要と考えられる。

1. LBP 開発が行われている主な疾患領域と現状の表

表 1. CDI を対象とした FMT 及び LBP の開発企業とパイプライン

企業	開発状況	パイプラインの特徴
FMT		
Seres Therapeutics (米国)	第 III 相	SER-109 ; エタノール処理ヒト糞便由来芽胞菌の経口投与製剤 (芽胞)。再発性 rCDI(recurrent CDI)患者を対象とした第 III 相試験において有効性が報告されている。
Rebiotix (米国)	第 III 相	RBX2660 ; 健康成人糞便由来微生物の経腸製剤。
	第 Ib 相	RBX7455 ; 糞便微生物の経口投与製剤。
LBPs		
Vedanta Biosciences (米国)	第 Ia/Ib 相 / 第 II 相	VE303 ; <i>Clostridium difficile</i> に対する感染防御機能を持つ糞便由来の腸内細菌カクテル製剤。Ia/Ib 試験 : 安全性及び健康成人の腸内での生着、バンコマイシン投与後の腸内細菌叢の解析 第 II 相 : II 相試験では rCDI に対する効果の確認が行われた。
Seres Therapeutics (米国)	第 Ib 相	SER-262 ; 糞便サンプルから単離された特定の腸内細菌カクテル製剤
Finch Therapeutics Group (米国)	第 II 相	CPT101 ; 糞便由来の腸内細菌カクテル製剤。良好な成績が得られている。 同社は、その他バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) やカルバペネム耐性腸内細菌科細菌などの多剤耐性菌に対する腸内細菌カクテルの開発も行っている。

表 2. 炎症性腸疾患を対象とした LBP の開発企業とパイプライン

企業	開発状況	対象疾患	パイプラインの特徴
4D Pharma (英国)	第 Ib 相 非臨床 第 II 相	小児クローン病 小児潰瘍性大腸炎 過敏性腸症候群	Thetanix ; <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> の単菌製剤。安全性が確認された。 Rosburix ; 抗炎症作用を持つ <i>Rosebria</i> の単菌製剤。 Blautix ; 腸内の水素ガスを除去する <i>Blautia</i> の単菌製剤。Ib 試験において症状の軽減と呼気中水素濃度の減少が報告されている。
Vedanta Biosciences (米国)	第 I 相	炎症性腸疾患	VE202 ; 制御性 T 細胞を誘導する 17 種類の <i>Clostridium</i> Cluster IV, XIVa の腸内細菌カクテル。安全性と菌の定着を確認したと報告されている。
Seres Therapeutics (米国)	第 II 相	潰瘍性大腸炎	SER-287 ; 特定の腸内細菌からなる生菌カクテル製剤。

表 3.がん免疫療法を目的とした LBP の開発企業とパイプライン

企業	開発状況	対象疾患	パイプラインの特徴
Vedanta Biosciences (米国)	第 I 相 (計画中)	進行性・転移性がん	VE800 ; CD8 ⁺ T 細胞を誘導する 11 種類の腸内細菌カクテル。ニボルマブ (遺伝子組換え) *との併用。
Seres Therapeutics (米国)	第 Ib 相	転移性メラノーマ	SER-401 ; がん免疫療法が有効であったメラノーマ患者の糞便由来の腸内細菌を製剤化。オブジーボ*と併用
Evelo Biosciences (米国)	第 I/II 相、第 IIa 相	MSS 大腸がん、トリプルネガティブ乳がん、メラノーマ	EDP1503 ; <i>Bifidobacterium</i> の単菌製剤。ペムブロリズマブ (遺伝子組換え) **との併用。
Genome & Company (韓国)	第 I/Ib 相 (計画中)		GEN-001 ; <i>Bifidobacterium</i> の単菌製剤。アベルマブ (遺伝子組換え) ***との併用。
4D Pharma (英国)	第 I/II 相	複数のがん	MRx0518 ; <i>Enterococcus gallinarum</i> の単菌製剤。ペムブロリズマブ (遺伝子組換え) **との併用。Merck 社との共同開発

* 抗 PD-1 製剤

** 抗 PD-1 製剤

*** 抗 PD-L1 製剤

表 4. 食物アレルギーを対象とした LBP の開発企業とパイプライン

企業	開発状況	パイプラインの特徴
Consortia Therapeutics (米国)	第 Ib 相 (計画中)	CTX-944 ; 制御性 T 細胞の MyD88/ROR γ t 経路を活性化する <i>Clostridium</i> Cluster IV, XIVa の腸内細菌製剤 (組成は非公開。 <i>Clostridiales</i> と <i>Bacteroidetes</i> 菌群からなるとみられる)。
Vedanta Biosciences (米国)	第 I/II 相 (計画中)	VE416 ; 免疫機能に影響を与える腸内細菌カクテル (組成は非公開)。
ClostraBio (米国)	非臨床	腸管バリア機能を高める <i>Clostridium</i> Cluster IV, XIVa の腸内細菌製剤

表 5. 代謝性疾患を対象とした LBP の開発企業とパイプライン

企業	開発状況	対象疾患	パイプラインの特徴
A-Mansia Biotech (ベルギー)	第 I 相	肥満と糖代謝異常	<i>Akkermansia muciniphila</i> 製剤。 体重減少と糖代謝改善が報告されている。また、死菌の方が有効性が高いことが報告されている。
Caelus Health (オランダ)	第 I/II 相	インスリン抵抗性を持つ人	糖代謝改善作用を持つ酪酸産生菌 <i>Anaerobutyricum soehngenii</i> の腸内細菌製剤。 4 週間の投与で有効性が認められたことが報告されている。 同社は、糖尿病に対しての FMT も実施している。

表 6. MCB/WCB で実施すべき試験の例

特性項目		試験実施の考慮
遺伝型	16S rRNA 配列	菌種（株）固有の 16S rRNA 遺伝子配列：目的株の純度や同一性
	全塩基配列解析	
表現型	タンパク質発現プロファイル	MALDI-TOF MS 解析：目的株の純度や同一性（培地条件により変動する可能性）
	形態	顕微鏡下における観察、コロニー形態
	グラム染色性	
	有用物質産生能	薬効や生物活性に関連する指標
	増殖特性	培地条件により異なる
	薬剤耐性	
純度試験		異種微生物否定試験

1. Qin J, *et al.* (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464(7285):59-65.
2. Rajilić-Stojanović M & de Vos WM (2014) The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS microbiology reviews* 38(5):996-1047.
3. Sender R, Fuchs S, & Milo R (2016) Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS biology* 14(8):e1002533.
4. Vandeputte D, *et al.* (2017) Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load. *Nature* 551(7681):507-511.
5. Kim YG, *et al.* (2017) Neonatal acquisition of Clostridia species protects against colonization by bacterial pathogens. *Science (New York, N.Y.)* 356(6335):315-319.
6. Feehley T, *et al.* (2019) Healthy infants harbor intestinal bacteria that protect against food allergy. *Nature medicine* 25(3):448-453.
7. Abdel-Gadir A, *et al.* (2019) Microbiota therapy acts via a regulatory T cell MyD88/ROR γ t pathway to suppress food allergy. *Nature medicine* 25(7):1164-1174.
8. van Nood E, *et al.* (2013) Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *The New England journal of medicine* 368(5):407-415.
9. Allegretti JR, Mullish BH, Kelly C, & Fischer M (2019) The evolution of the use of faecal microbiota transplantation and emerging therapeutic indications. *Lancet (London, England)* 394(10196):420-431.
10. Kang DW, *et al.* (2019) Long-term benefit of Microbiota Transfer Therapy on autism symptoms and gut microbiota. *Scientific reports* 9(1):5821.
11. Anonymous (U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Fecal Microbiota for Transplantation: Safety Alert - Risk of Serious Adverse Events Likely Due to Transmission of Pathogenic Organisms,(2020). <https://www.fda.gov/safety/medical-product-safety-information/fecal-microbiota-transplantation-safety-alert-risk-serious-adverse-events-likely-due-transmission>.
12. Parks DH, *et al.* (2018) A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nature biotechnology* 36(10):996-1004.
13. Cho JC & Tiedje JM (2001) Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays. *Applied and environmental microbiology* 67(8):3677-3682.
14. Konstantinidis KT & Tiedje JM (2005) Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(7):2567-2572.
15. Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, & Gordon DB (1996) The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nature*

- biotechnology* 14(11):1584-1586.
16. Besemer J, Lomsadze A, & Borodovsky M (2001) GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions. *Nucleic acids research* 29(12):2607-2618.
 17. Arndt D, Marcu A, Liang Y, & Wishart DS (2019) PHAST, PHASTER and PHASTEST: Tools for finding prophage in bacterial genomes. *Briefings in bioinformatics* 20(4):1560-1567.
 18. Arita M, Karsch-Mizrachi I, & Cochrane G (2021) The international nucleotide sequence database collaboration. *Nucleic acids research* 49(D1):D121-d124.
 19. Kanehisa M & Goto S (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research* 28(1):27-30.
 20. Blum M, *et al.* (2021) The InterPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucleic acids research* 49(D1):D344-d354.
 21. Mistry J, *et al.* (2021) Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic acids research* 49(D1):D412-d419.
 22. Liu B, Zheng D, Jin Q, Chen L, & Yang J (2019) VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic acids research* 47(D1):D687-d692.
 23. de Nies L, *et al.* (2021) PathoFact: a pipeline for the prediction of virulence factors and antimicrobial resistance genes in metagenomic data. *Microbiome* 9(1):49.
 24. Davis JJ, *et al.* (2020) The PATRIC Bioinformatics Resource Center: expanding data and analysis capabilities. *Nucleic acids research* 48(D1):D606-d612.
 25. Alcock BP, *et al.* (2020) CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic acids research* 48(D1):D517-d525.
 26. Liu B & Pop M (2009) ARDB--Antibiotic Resistance Genes Database. *Nucleic acids research* 37(Database issue):D443-447.
 27. Doster E, *et al.* (2020) MEGARes 2.0: a database for classification of antimicrobial drug, biocide and metal resistance determinants in metagenomic sequence data. *Nucleic acids research* 48(D1):D561-d569.
 28. Arango-Argoty G, *et al.* (2018) DeepARG: a deep learning approach for predicting antibiotic resistance genes from metagenomic data. *Microbiome* 6(1):23.
 29. Arango-Argoty GA, *et al.* (2020) ARGminer: a web platform for the crowdsourcing-based curation of antibiotic resistance genes. *Bioinformatics (Oxford, England)* 36(9):2966-2973.
 30. Leplae R, Lima-Mendez G, & Toussaint A (2010) ACLAME: a CLAssification of

- Mobile genetic Elements, update 2010. *Nucleic acids research* 38(Database issue):D57-61.
31. Ou S, *et al.* (2019) Benchmarking transposable element annotation methods for creation of a streamlined, comprehensive pipeline. *Genome biology* 20(1):275.
 32. Ren J, Ahlgren NA, Lu YY, Fuhrman JA, & Sun F (2017) VirFinder: a novel k-mer based tool for identifying viral sequences from assembled metagenomic data. *Microbiome* 5(1):69.
 33. Guo J, *et al.* (2021) VirSorter2: a multi-classifier, expert-guided approach to detect diverse DNA and RNA viruses. *Microbiome* 9(1):37.
 34. Auslander N, Gussow AB, Benler S, Wolf YI, & Koonin EV (2020) Seeker: alignment-free identification of bacteriophage genomes by deep learning. *Nucleic acids research* 48(21):e121.
 35. Lai S, *et al.* (2021) mMGE: a database for human metagenomic extrachromosomal mobile genetic elements. *Nucleic acids research* 49(D1):D783-d791.
 36. Korem T, *et al.* (2015) Growth dynamics of gut microbiota in health and disease inferred from single metagenomic samples. *Science (New York, N.Y.)* 349(6252):1101-1106.
 37. Brown CT, Olm MR, Thomas BC, & Banfield JF (2016) Measurement of bacterial replication rates in microbial communities. *Nature biotechnology* 34(12):1256-1263.
 38. Emiola A & Oh J (2018) High throughput in situ metagenomic measurement of bacterial replication at ultra-low sequencing coverage. *Nature communications* 9(1):4956.
 39. Maares M, Duman A, Keil C, Schwerdtle T, & Haase H (2018) The impact of apical and basolateral albumin on intestinal zinc resorption in the Caco-2/HT-29-MTX co-culture model. *Metallomics : integrated biometal science* 10(7):979-991.
 40. Maares M, *et al.* (2018) In Vitro Studies on Zinc Binding and Buffering by Intestinal Mucins. *International journal of molecular sciences* 19(9).
 41. Zihler Berner A, *et al.* (2013) Novel Polyfermentor intestinal model (PolyFermS) for controlled ecological studies: validation and effect of pH. *PloS one* 8(10):e77772.
 42. Venema K (2015) The TNO In Vitro Model of the Colon (TIM-2). *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, eds Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, Requena T, Swiatecka D, & Wichers H (Springer Copyright 2015, The Author(s). Cham (CH)), pp 293-304.
 43. Van den Abbeele P, *et al.* (2010) Microbial community development in a dynamic gut model is reproducible, colon region specific, and selective for Bacteroidetes and Clostridium cluster IX. *Applied and environmental microbiology* 76(15):5237-5246.

44. Mäkivuokko H, Nurmi J, Nurminen P, Stowell J, & Rautonen N (2005) In vitro effects on polydextrose by colonic bacteria and caco-2 cell cyclooxygenase gene expression. *Nutrition and cancer* 52(1):94-104.
45. Cinquin C, Le Blay G, Fliss I, & Lacroix C (2006) New three-stage in vitro model for infant colonic fermentation with immobilized fecal microbiota. *FEMS microbiology ecology* 57(2):324-336.
46. Hoshi N, Inoue J, Sasaki D, & Sasaki K (2021) The Kobe University Human Intestinal Microbiota Model for gut intervention studies. *Applied microbiology and biotechnology* 105(7):2625-2632.
47. Sato T, *et al.* (2009) Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459(7244):262-265.
48. Sasaki N, *et al.* (2020) Development of a Scalable Coculture System for Gut Anaerobes and Human Colon Epithelium. *Gastroenterology* 159(1):388-390.e385.
49. Zhang J, *et al.* (2021) Coculture of primary human colon monolayer with human gut bacteria. *Nature protocols* 16(8):3874-3900.
50. Nakamoto N, *et al.* (2019) Gut pathobionts underlie intestinal barrier dysfunction and liver T helper 17 cell immune response in primary sclerosing cholangitis. *Nature microbiology* 4(3):492-503.
51. Hirayama K (2010) Human Flora-associated Animals as a Model for Studying Probiotics and Prebiotics. *Bioactive Foods in Promoting Health*:531-540.
52. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. Chun *et al.*, *Int J Syst Evol Microbiol* 2018;68:461–466 DOI 10.1099/ijsem.0.002516
53. Tourlousse DM, *et al.* (2021) Validation and standardization of DNA extraction and library construction methods for metagenomics-based human fecal microbiome measurements. *Microbiome* 9(1):95.

マイクロバイオーーム専門部会 委員名簿

- おおの ひろし
大野 博司 理化学研究所 生命医科学研究センター 粘膜システム研究チーム チームリーダー
- かとう はる
加藤 はる 国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター 主任研究官
- かない たかのり
金井 隆典 慶應義塾大学 医学部 内科学(消化器) 教授
- きむ ゆんぎ
金 倫基 慶應義塾大学 薬学部 創薬研究センター 教授
- くろかわ けん
黒川 顕 国立遺伝学研究所 副所長 / ゲノム進化研究室 教授
- さかもと みつお
坂本 光央 理化学研究所 バイオリソース研究センター 微生物材料開発室 専任研究員
- ささかわ ちひろ
笹川 千尋 千葉大学 真菌医学研究センター センター長・特任教授
- せきぐち ゆうじ
関口 勇地 産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 総括研究主幹
- たけだ きよし
竹田 潔 大阪大学大学院 医学系研究科 感染症・免疫学講座 免疫制御学 教授
- ひらやま かずひろ
平山 和宏 東京大学大学院 農学生命科学研究科 獣医公衆衛生学教室 教授
- ◎ やまぐち てるひで
山口 照英 日本薬科大学 客員教授
- やました ともや
山下 智也 神戸大学医学部附属病院 循環器内科 准教授

◎部会長、○副部会長
(五十音順)