

NBRCヒト常在菌菌体カクテル（NBRC Human Microbial Cell Cocktail）

製品名 Cell-Mock-003

ロット番号 230502NC

1. 仕様

- ・ 内容量 500  $\mu$ L /本
- ・ 細胞数  $2.00 \times 10^{10}$  cells/500  $\mu$ L
- ・ 保存溶媒 15% glycerol in PBS (pH7.4)
- ・ 保存形態  $-80^{\circ}\text{C}$
- ・ 構成 本製品は、NBRCが保有する微生物株のうち、18株を使用し、それぞれの細胞数が等量となるよう混合したものです。

表1 Cell-Mock-003の作製に使用した微生物株<sup>※1</sup>の情報

| 学名                                                 | NBRC<br>番号               | グラム<br>染色 | ゲノム<br>サイズ<br>(Mbp) | GC<br>含量(%) | 16S rRNA<br>コピー数 | バイオ<br>セーフティ<br>レベル <sup>※2</sup> |
|----------------------------------------------------|--------------------------|-----------|---------------------|-------------|------------------|-----------------------------------|
| <i>Anaerostipes caccae</i>                         | NBRC 114412              | 陽性        | 3.3                 | 44.5        | 4                | 1                                 |
| <i>Bifidobacterium longum</i>                      | NBRC 114370              | 陽性        | 2.6                 | 60.1        | 5                | 1                                 |
| <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> | NBRC 114494              | 陽性        | 2.5                 | 60.1        | 4                | 1                                 |
| <i>Blautia parvula</i>                             | NBRC 113351 <sup>T</sup> | 陽性        | 6.2                 | 46.7        | 5                | 1*                                |
| <i>Collinsella aerofaciens</i>                     | NBRC 114504              | 陽性        | 2.3                 | 60.3        | 5                | 1*                                |
| <i>Enterocloster clostridioformis</i>              | NBRC 113352              | 陽性        | 5.7                 | 48.9        | 5                | 1*                                |
| <i>Flavonifractor plautii</i>                      | NBRC 113805              | 陽性        | 4.3                 | 60.3        | 3                | 1                                 |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i>                   | NBRC 3202                | 陽性        | 1.9                 | 50.1        | 8                | 1                                 |
| <i>Mediterraneibacter gnavus</i>                   | NBRC 114413              | 陽性        | 3.8                 | 42.5        | 5                | 1                                 |
| <i>Akkermansia muciniphila</i>                     | NBRC 114322              | 陰性        | 2.8                 | 55.7        | 3                | 1                                 |
| <i>Bacteroides uniformis</i>                       | NBRC 113350              | 陰性        | 5.0                 | 46.2        | 4                | 1*                                |
| <i>Escherichia coli</i>                            | NBRC 3301                | 陰性        | 4.8                 | 50.8        | 7                | 1                                 |
| <i>Parabacteroides distasonis</i>                  | NBRC 113806              | 陰性        | 5.2                 | 45.0        | 7                | 1*                                |
| <i>Streptococcus mutans</i>                        | NBRC 13955 <sup>T</sup>  | 陽性        | 2.0                 | 36.9        | 5                | 1*                                |
| <i>Cutibacterium acnes</i> subsp. <i>acnes</i>     | NBRC 113869              | 陽性        | 2.6                 | 60.0        | 3                | 1*                                |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>                  | NBRC 113846              | 陽性        | 2.5                 | 32.1        | 6                | 1*                                |
| <i>Bacillus subtilis</i>                           | NBRC 13719 <sup>T</sup>  | 陽性        | 4.3                 | 43.3        | 10               | 1                                 |
| <i>Pseudomonas putida</i>                          | NBRC 14164 <sup>T</sup>  | 陰性        | 6.2                 | 62.3        | 7                | 1*                                |

※1：本製品に使用した微生物はNBRCにおいて品質確認されたもので、個別に購入できます。  
※2：「\*」付きはBSL1のうち、日和見感染することが報告されているものです。ただし、BSL1\*でないことは日和見感染しないことを意味しているものではありません。

2. 検証結果（ロット番号 230502NC）

2-1. DNA抽出結果

- ・ 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SOPに従い、本ロット内の6サンプルから100 $\mu$ Lを分取し、ビーズ法（ISOSPIN Fecal DNA（ニッポンジーン社））を用いてDNA抽出を行いました。破碎はFastPrep24（MP-Bio社）を用い、6.0 m/s、60秒を3セットで行いました。
- ・ Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit（Thermo Fisher Scientific社）を用いて抽出DNAの濃度を測定しました。

表2 230502NCのDNA抽出量

| DNA抽出量              |                       |
|---------------------|-----------------------|
| 理論DNA量 <sup>※</sup> | ビーズ法                  |
| 16.5 $\mu$ g        | 5.2 $\pm$ 0.2 $\mu$ g |

※：Cell-Mock-003 100  $\mu$ LあたりのDNA含有量の理論値。

2-2. 各株の検出割合

JMBCから公開されているSOPに従い、SMARTer ThruPLEX DNA-Seq Kit（タカラバイオ社）を用いてライブラリー調製を行い、MiSeqシステム（Illumina社）を用いてショットガンシーケンスを行いました。本測定は、本ロットからランダムに3本抽出して行いました。

表3 ショットガンシーケンスを用いた18株の検出割合

| 学名                                                 | NBRC<br>番号               | 理論値<br>(%) | 各株の検出割合<br>(%) <sup>※</sup> |
|----------------------------------------------------|--------------------------|------------|-----------------------------|
| <i>Anaerostipes caccae</i>                         | NBRC 114412              | 5.6        | 6.2 $\pm$ 0.1               |
| <i>Bifidobacterium longum</i>                      | NBRC 114370              | 5.6        | 4.0 $\pm$ 0.1               |
| <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> | NBRC 114494              | 5.6        | 4.5 $\pm$ 0.0               |
| <i>Blautia parvula</i>                             | NBRC 113351 <sup>T</sup> | 5.6        | 5.3 $\pm$ 0.0               |
| <i>Collinsella aerofaciens</i>                     | NBRC 114504              | 5.6        | 4.3 $\pm$ 0.0               |
| <i>Enterocloster clostridioforme</i>               | NBRC 113352              | 5.6        | 6.7 $\pm$ 0.0               |
| <i>Flavonifractor plautii</i>                      | NBRC 113805              | 5.6        | 6.4 $\pm$ 0.1               |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i>                   | NBRC 3202                | 5.6        | 5.0 $\pm$ 0.1               |
| <i>Mediterraneibacter gnavus</i>                   | NBRC 114413              | 5.6        | 5.9 $\pm$ 0.0               |
| <i>Akkermansia muciniphila</i>                     | NBRC 114322              | 5.6        | 6.3 $\pm$ 0.1               |
| <i>Bacteroides uniformis</i>                       | NBRC 113350              | 5.6        | 6.1 $\pm$ 0.0               |
| <i>Escherichia coli</i>                            | NBRC 3301                | 5.6        | 5.7 $\pm$ 0.1               |
| <i>Parabacteroides distasonis</i>                  | NBRC 113806              | 5.6        | 6.1 $\pm$ 0.0               |
| <i>Streptococcus mutans</i>                        | NBRC 13955 <sup>T</sup>  | 5.6        | 4.9 $\pm$ 0.2               |
| <i>Cutibacterium acnes</i> subsp. <i>acnes</i>     | NBRC 113869              | 5.6        | 5.4 $\pm$ 0.1               |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>                  | NBRC 113846              | 5.6        | 5.5 $\pm$ 0.1               |
| <i>Bacillus subtilis</i>                           | NBRC 13719 <sup>T</sup>  | 5.6        | 5.8 $\pm$ 0.0               |
| <i>Pseudomonas putida</i>                          | NBRC 14164 <sup>T</sup>  | 5.6        | 5.8 $\pm$ 0.1               |

※：本値は、ショットガンシーケンスにより測定した各株の検出割合の平均と標準偏差を表したものです。

### 3. 使用例

16S rRNA遺伝子の可変領域であるV1V2領域とV4領域を対象にして、MiSeqシステムを用いてメタ16S解析を実施しました。

表4 16S rRNA遺伝子を対象にしたメタ16S解析

| 学名                                                 | NBRC<br>番号               | 理論値<br>(%) | V1V2領域<br>(%) ※1 | V4領域<br>(%) ※1 |
|----------------------------------------------------|--------------------------|------------|------------------|----------------|
| <i>Anaerostipes caccae</i>                         | NBRC 114412              | 4.2        | 5.3 ± 0.1        | 5.4 ± 0.2      |
| <i>Bifidobacterium longum</i>                      | NBRC 114370              | 9.4 ※2     | 6.5 ± 0.2        | 7.2 ± 0.2      |
| <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> | NBRC 114494              |            |                  |                |
| <i>Blautia parvula</i>                             | NBRC 113351 <sup>T</sup> | 5.2        | 3.9 ± 0.1        | 4.5 ± 0.4      |
| <i>Collinsella aerofaciens</i>                     | NBRC 114504              | 5.2        | 3.1 ± 0.2        | 4.7 ± 0.1      |
| <i>Enterocloster clostridioforme</i>               | NBRC 113352              | 5.2        | 6.0 ± 0.1        | 5.6 ± 0.6      |
| <i>Flavonifractor plautii</i>                      | NBRC 113805              | 3.1        | 3.7 ± 0.1        | 4.5 ± 0.2      |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i>                   | NBRC 3202                | 8.3        | 6.8 ± 0.1        | 5.9 ± 0.6      |
| <i>Mediterraneibacter gnavus</i>                   | NBRC 114413              | 5.2        | 6.0 ± 0.1        | 6.9 ± 0.4      |
| <i>Akkermansia muciniphila</i>                     | NBRC 114322              | 3.1        | 0.4 ± 0.0        | 4.6 ± 0.1      |
| <i>Bacteroides uniformis</i>                       | NBRC 113350              | 4.2        | 5.5 ± 0.2        | 5.6 ± 0.1      |
| <i>Escherichia coli</i>                            | NBRC 3301                | 7.3        | 8.0 ± 0.4        | 8.9 ± 0.3      |
| <i>Parabacteroides distasonis</i>                  | NBRC 113806              | 7.3        | 8.8 ± 0.1        | 1.8 ± 0.3      |
| <i>Streptococcus mutans</i>                        | NBRC 13955 <sup>T</sup>  | 5.2        | 4.1 ± 0.1        | 4.2 ± 0.2      |
| <i>Cutibacterium acnes</i> subsp. <i>acnes</i>     | NBRC 113869              | 3.1        | 3.6 ± 0.2        | 1.4 ± 0.0      |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>                  | NBRC 113846              | 6.3        | 6.8 ± 0.1        | 7.4 ± 0.1      |
| <i>Bacillus subtilis</i>                           | NBRC 13719 <sup>T</sup>  | 10.4       | 12.2 ± 0.8       | 12.4 ± 0.3     |
| <i>Pseudomonas putida</i>                          | NBRC 14164 <sup>T</sup>  | 7.3        | 9.2 ± 0.3        | 8.9 ± 0.5      |

理論値は16S rRNA遺伝子のコピー数の割合を表す。

※1：記号±の数値は、各領域におけるメタ16S解析で測定した検出割合の実験標準偏差 (n = 6) を表す。

※2：*Bifidobacterium*は本メタ16S解析では区別できないため、合算した数値とした。

V1V2領域の解析に使用したプライマー：27Fmod (5'-AGRGTTTGATYMTGGCTCAG -3'),

338R (5'-TGCTGCCTCCCGTAGGAGT -3')

(Kim SW *et al.*, DNA Res., (2013) 20:241-253)

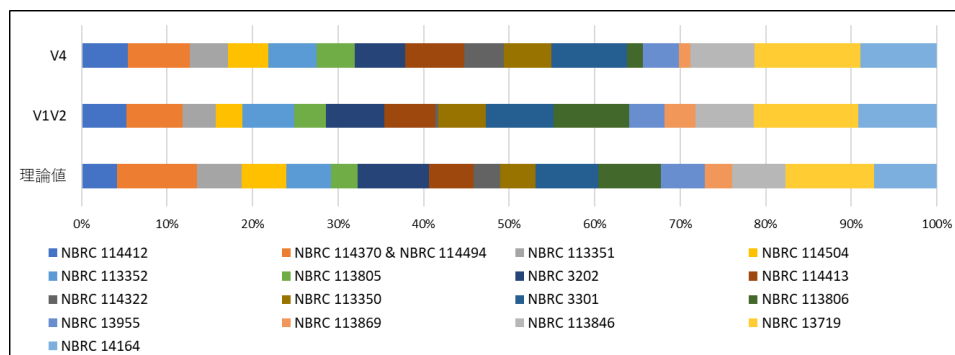
V4領域の解析に使用したプライマー：515Fmod (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA -3'),

806Rmod (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT -3')

(Parada AE *et al.*, Environ. Microbiol., (2016) 18:1403-1414)

(Aprill A *et al.*, Aquat. Microb. Ecol., 75:129-137)

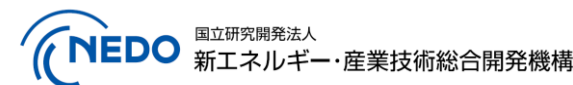
図 メタ16S解析結果



### 4. 取り扱いの注意事項

- ・別紙の、NBRC微生物カクテルの提供と使用に関する同意書（以下同意書）を必ず一読し、同意書に定める利用条件に従い本製品をご使用ください。
- ・利用者は、本製品をヒト（治療、診断、飲食物、その他）に直接使用しないでください。
- ・本製品は、生物又は生体物質であり性質が変化すること、欠陥を持つ可能性や潜在的な危険性があることを認識し、適切な設備のもと知識および技術のある方がお取り扱いください。
- ・本製品から、複製物の作製をしないでください。
- ・本製品を、有償で第三者に提供又は分与をしないでください。また、同意書の利用条件に違反しない限り、本製品を第三者にご利用いただくことができます。この場合、利用者は第三者に同意書の内容を厳守してもらい、責任は利用者にかかります。
- ・利用者は、本製品の利用により得られた成果を公表する場合には、NBRCから本製品の提供を受けた旨を公表データに記載し、公表後にNBRCにその情報をお知らせください。
- ・本製品を同意書等に基づいて、商業的に利用した場合は、実施後NBRCにその情報をお知らせください。（事前にNBRCが認めた場合は除く。）
- ・提供した本製品が雑菌混入などNBRCの責任による不具合の場合は、原則として発送後60日以内に連絡をいただければ、同一NBRC微生物カクテル又はそれに相当するNBRC微生物カクテルを1回に限り無償で利用者に送付いたします。
- ・再凍結をすると菌株が劣化します。その場合の品質の保証はいたしかねます。
- ・本製品を利用した成果を公表する場合は、以下の論文を引用してください。

Tourlousse, D.M., Narita, K., Miura, T. et al. Characterization and demonstration of mock communities as control reagents for accurate human microbiome community measurements. *Microbiology Spectrum*, 10(2): e01915-21.



「NBRCヒト常在菌菌体カクテルは、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の委託業務の成果を（一部）活用しています。」

お問い合わせ先

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）生物資源利用促進課（NBRC微生物カクテル担当）  
〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8  
TEL.0438-20-5763 FAX.0438-52-2329 [mock@nite.go.jp](mailto:mock@nite.go.jp)