

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07119

研究課題名(和文) マクロファージ細胞死に誘導されるサルモネラ腸炎発症機構の解析

研究課題名(英文) The study of Salmonella enteritis induced by macrophage cell death

研究代表者

岡田 信彦 (Okada, Nobuhiko)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号：80194364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：サルモネラは食中毒の原因菌であり、腸炎や敗血症を引き起こす。このようなサルモネラの病原性には2つのIII型分泌機構(T3SS)が関与する。本研究では T3SS-2によるマクロファージ細胞死に焦点をあて、この細胞死誘導に関わるT3SS-2エフェクターを同定した。また、これらエフェクター全ての欠損株ではマウスに腸炎を誘導しなかった。さらに、この細胞死には宿主因子BおよびCが関与することを明らかにした。しかし、これらの因子による細胞死誘導がマウスの腸炎誘導に与える影響を明らかにすることはできなかった。一方で、サルモネラ感染マウスにおいてマクロファージに細胞死が誘導されていることを示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、病原菌によって誘導される細胞死が他の食細胞のeat-meシグナルとなることが報告され、細胞死誘導による宿主生体内での細菌の拡散が新たな感染手段として注目されている。サルモネラと同様に結核菌においてもマクロファージや好中球など食細胞に細胞死を誘導し、菌があらたな増殖の場を確保することが近年明らかになってきている。よって、これらの細胞内寄生細菌の感染に対して、細胞死を阻害することは、感染防御法の新たなターゲットとして期待ができる。

研究成果の概要(英文)：Type III secretion system (T3SS)-2 is the most important virulence factor of Salmonella. In this study, we focused on macrophage cell death induced by T3SS-2 and identified T3SS-2 effectors involved in the induction of this cell death. In addition, the strain deleted all of these effectors did not elicit inflammation in mice. We also found that host factors B and C are involved in this cell death. However, we could not clarify the effect of cell death induction by these factors on the Salmonella virulence in a mouse model of colitis. Finally, we showed that cell death is induced in macrophages in Salmonella-infected mice.

研究分野：細菌感染

キーワード：サルモネラ 腸炎 マクロファージ 細胞死

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内寄生細菌は、上皮細胞に対しては、感染・増殖の場を確保することを目的に、細胞死を抑制し、殺菌能をもつマクロファージに対しては、細胞死を誘導することで、細胞からの離脱を促進する。サルモネラにおいては、マクロファージを増殖の場とすることから、細胞死を抑制する因子と一方で殺菌作用から逃れるために、細胞死を促進する因子が存在するものと予想されるが、これまでにその報告はほとんどない。サルモネラは、マクロファージの食胞内(サルモネラ小胞)で生存するため、膜破壊やミトコンドリアの障害などによる危険シグナルを介した細胞死や炎症誘導は抑制される。すなわち、サルモネラ小胞の形成・維持に関わる III 型エフェクターの一部は、感染マクロファージにおける細胞死抑制に関与すると考えられる。今回研究代表者は、マクロファージに感染後、細胞死を抑制しながらサルモネラ小胞を形成し、小胞内での増殖を可能とするが、その後、細胞死を誘導し、マクロファージから離脱することで、宿主生体内での感染の場を拡げ、その過程でマクロファージの細胞死誘導性炎症がサルモネラ感染による炎症を誘発する 1 つの経路となる、と考えた。

### 2. 研究の目的

サルモネラは、食中毒原因菌として胃腸炎や敗血症(腸チフス)を引き起こす。申請者は、これまでに、サルモネラの腸炎発症には、生体防御反応である炎症応答を制御することが必要であり、炎症制御にはサルモネラ III 型エフェクターが関与することを明らかにしてきた。近年、細胞死も炎症誘導に関わる生体防御反応の 1 つであることが明らかになり、病原細菌による細胞死誘導または制御が発症機構との関連で注目されている。本研究では、サルモネラの増殖の場であるマクロファージに着目し、III 型エフェクターによるマクロファージの細胞死誘導機構を解明することでサルモネラの腸炎発症機構との関連性を明らかにする。そのために、マクロファージ細胞死誘導に関わるサルモネラ III 型エフェクターおよびその標的分子を同定し、細胞死の分子機構を明らかにする。さらに、マウス腸炎モデルを用いて、感染過程における細胞死関連エフェクターの機能を解析・検証した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 菌株および培地

本研究では *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) ATCC 14028 株のナリジクス酸自然耐性株 SH100 を使用し、その T3SS-1 欠損株 (*invA::Cm*, T1) を親株とした。各 T3SS-2 エフェクター欠失株は red recombinase system により作製した(1)。また、これら各 T3SS-2 エフェクター欠失株に、P22 transduction により、T3SS-1 欠失変異 (*invA::Cm*) を導入し、T3SS-1 と T3SS-2 エフェクターの欠失株を作製した。これら細菌の培養には Luria-Bertani 液体培地 (LB broth、ナカライテスク) を用い、菌数算出のための固形培地として使用する際には最終濃度 1.5% となるように寒天末 (Agar powder、ナカライテスク) を添加した。必要に応じて、各種抗生剤を添加した。

#### (2) in vitro 感染実験

本研究ではマクロファージ培養細胞として、マウスマクロファージ様 RAW264.7 (RAW) 細胞を使用した。RAW 細胞の培養には 10 % fetal bovine serum (Bio west) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM、Sigma) を用いて、37 °C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。

##### 1 菌液の調整

各菌株を LB 培地で一晩振盪培養 (37 °C) を行った。各菌液を滅菌 PBS 1 ml で 2 回洗浄し DMEM 2 ml で懸濁した。その後 OD を測定し、目的の濃度となるように滅菌 PBS で段階希釈したものを投与菌液とした。

##### 2 LDH assay

24-well plate に RAW 細胞 ( $4 \times 10^5$  cells/well) を準備し、37 °C、5%CO<sub>2</sub> で一晩培養した。調整した菌液をそれぞれの well に 100  $\mu$ l 投与し 37 °C、5%CO<sub>2</sub> で培養した。投与 1 時間後にすべての well を滅菌 PBS 500  $\mu$ l で 3 回洗浄し、DMEM with 100  $\mu$ g/ml gentamicin 500  $\mu$ l を加え 37 °C、5%CO<sub>2</sub> で培養した。投与 2 時間後に well を滅菌 PBS 500  $\mu$ l で 3 回洗浄し、DMEM with 10  $\mu$ g/ml gentamicin 500  $\mu$ l を加え 37 °C、5%CO<sub>2</sub> で培養した。投与 20 時間後に上清を回収した。また、非感染の well を 2-well 同様に操作し、一方をネガティブコントロールとして用い、もう一方を 20 時間後で 1% TritonX-100 を加えピペティングして、ポジティブコントロールとして用いた。回収した上清を 1000 rpm で遠心して、その上清から CytoTox96 (プロネガ) の protocol に従い、細胞傷害性を測定した。

##### 3 RAW 遺伝子欠損細胞の作製

RAW 由来遺伝子欠損細胞は CRISPR/Cas9 システムを用いて構築した(2)。レンチウイルスパッケージングプラスミド、pMDLg/pRRE(12251)、pMD2.G(12259) および pRSV-Rev(12253) は Addgene から購入した。標的遺伝子に対する gRNA は lentiGuide-Puro プラスミド (52963、Addgene) に

クローニングした。ポリエチレンイミン「マックス」(PEI Max, Polysciences) をトランスフェクション試薬として用いて 4 つのプラスミド (pMDLg/pRRE, pMD2.G, pRSV-Rev, lentiGuide-Puro) をトランスフェクトし、Lentivirus ベクターを HEK293T 細胞で作製した。トランスフェクション後 72 時間後に培養上清を採取した。Lentivirus を含む培養上清を RAW-Cas9 細胞に添加し、24 時間後にピューロマイシン (Sigma) を含む DMEM に培地を交換した。さらに数日後、ピューロマイシン耐性の細胞をカップクローニング法により分離した。RAW-Cas9 細胞は北里大学大村記念研究所の片山和彦博士から分与していただいた(2)。遺伝子欠損は、DNA 配列決定により確認した。

### (3) in vivo 感染実験

#### 1 実験動物

動物実験は北里大学薬学部感染動物舎で行った。C57BL/6J (7 週齢または 8 週齢、日本エスエルシー) を購入し、1 週間から 10 日飼育したものを使用した。マウスの飼育は北里大学における動物実験に関する規定に基づき行った。また *S. Typhimurium* のマウスへの感染実験は北里大学動物実験委員会で承認を受けている (承認番号 J96-1、17-52 および 20-34)。

#### 2 菌液の調整

使用菌株を LB 液体培地に植え、37 °C で一晩培養した。培養した菌液は滅菌 PBS 1 ml で 2 回洗浄した後、滅菌 PBS 1 ml で懸濁した。その後 OD を測定し、 $5 \times 10^9$  cfu/ml となるよう滅菌 PBS で希釈したものを投与菌液とした。

#### 3 腸炎モデルマウスへの感染実験

感染前処理として 0.2 g/ml Streptomycin 100  $\mu$ l を経口投与し、腸炎モデルとした(3)。Streptomycin または菌液を投与する前 4 時間絶食絶水させ、菌液投与後は絶食を 2 時間継続させた。Streptomycin 投与後から 24 時間後にそれぞれの菌液を 100  $\mu$ l 経口投与した。菌液投与から 5 日後に盲腸および脾臓を解剖により回収した。盲腸は 3 等分 (先端部、中部、および末端部) した。先端部は HE 染色のため Mildform 10N (Wako) 500  $\mu$ l 中に、中部および末端部は total RNA 抽出のため Buffer RLT Lysis buffer (QIAGEN) 500  $\mu$ l 中に保存した。腸管内容物および脾臓は滅菌 PBS 1 ml で懸濁させ懸濁液を滅菌 PBS で段階希釈した後、マッコンキー寒天培地 (腸管内容物) または LB 寒天培地 (腸管膜リンパ節および脾臓) に塗布し 37 °C で一晩培養し、菌数を算出した。

盲腸先端の組織は HE 染色したのち、Manja Barthel らの方法(3)に基づき、粘膜下浮腫、多形核白血球数、肺細胞数および上皮の整合性を観察し、それらをもとに炎症スコアを作成した (炎症スコア 0 = 炎症なし、1-2 = 感染性ではない軽度の炎症サイン、3-4 = 軽度の炎症、5-8 = 中度の炎症、9-13 = 重度の炎症)。粘膜下浮腫については 0 = 変化なし、1 = < 0.20 mm 且つ < 50%、2 = 0.21-0.45 mm 且つ 50-80%、3 = > 0.46 mm 且つ > 80%とした。多形核白血球数については、0 = < 50 個、1 = 51-70 個、2 = 71-110 個、3 = 111-150 個、4 = > 150 個とした。杯細胞については 0 = > 28 個、1 = 11-28 個、2 = 1-10 個、3 = < 1 個とした。上皮の整合性についてはダメージの程度によって 0-3 のスコアをつけた。

#### 4 mRNA 発現量の比較

Buffer RLT Lysis buffer 中に保存された盲腸組織から RNeasy Mini kit (Qiagen) の protocol に従い total RNA を抽出した。抽出した RNA から TURBO DNA-free kit (Ambion) の protocol に従い、mRNA を抽出した。RT-PCR は TaqMan Reverse Transcription (Applied Biosystems) のプロトコルに従い行った。合成した cDNA を用いて KAPA SYBR FAST Universal qPCR kit (Kappa Biosystems) を用いて下記の条件で qPCR を行い、mRNA の発現量を求め、結果をもとに  $\Delta\Delta$ CT 法により発現量を比較した。ハウスキーピング遺伝子として GAPDH を選択した。

#### 5 フローサイトメトリー解析

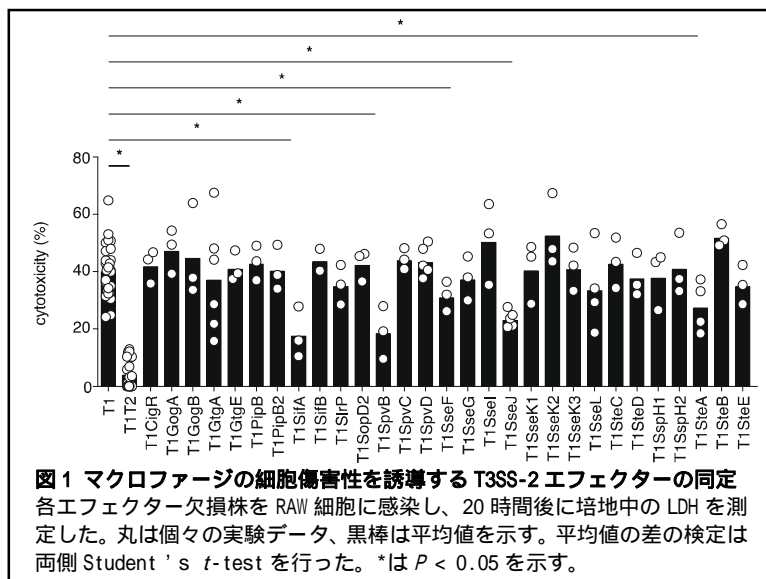
感染 5 日後のマウス脾臓を Collagenase D (Roche) および DNase I (Sigma-Aldrich) で処理した後、PercolI 密度勾配遠心法によりリンパ球を分離した。これらの細胞を抗 CD45-FITC 抗体 (BD)、抗 CD11b-PE-Cy7 抗体 (Biolegend) および Zombie biolect (Biolegend) で染色し、FACSCelesta (BD) で解析した。

## 4 . 研究成果

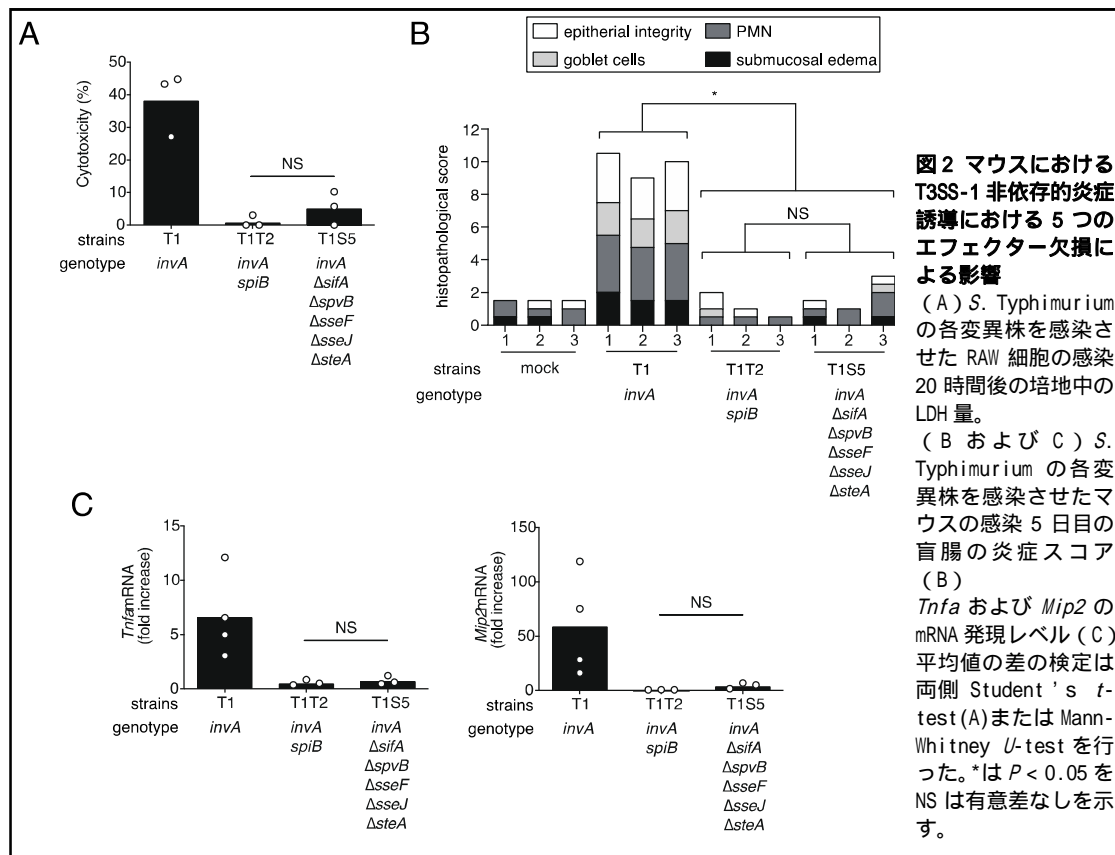
1 SifA、SpvB、SseF、SseJ および SteA は協調的に機能し、*S. Typhimurium* のマクロファージに対する細胞傷害性とマウス腸管における炎症誘導性に対して重要な役割を果たす

これまでに T1 株感染マクロファージにおいて、細胞死が誘導されることが知られている(4, 5)。しかしながら、このような T3SS-1 非依存的細胞死の誘導機構は明らかになっていない。研究代表者らは、T3SS-1 および T3SS-2 二重欠失株 (T1T2) ではマクロファージに細胞死が誘導されないことから、T3SS-2 エフェクターには細胞傷害性に関するエフェクターが存在するという仮

説を立て、細胞傷害性に関わる T3SS-2 エフェクターを網羅的に解析した。T1 株に対してこれまでに T3SS-2 エフェクターとして同定されている 29 コの遺伝子の欠失をそれぞれ導入し、作成した欠失株についてマクロファージの細胞死誘導性を解析した。その結果、T3SS-1 および *sifA* を欠失させた (T1SifA) 株、T3SS-1 および *spvB* を欠失させた (T1SseB) 株、T3SS-1 および *sseF* を欠失させた (T1SseF) 株、T3SS-1 および *sseJ* を欠失させた (T1SseJ) 株、また T3SS-1 および *steA* を欠失させた (T1SteA) 株は T1 株と比較して有意な細胞傷害性の減弱を示した (図 1)。このことから、細胞傷害性に関与する T3SS-2 エフェクターは *SifA*、*SpvB*、*SseF*、*SseJ* および *SteA* であることが示された。



これらのエフェクターは協調的に作用することで、細胞傷害性や炎症誘導性を示すことが予想されたため、次に T1 株に対してこれら 5 つのエフェクター全てを欠失させた六重欠失 (T1S5) 株を作成し、マクロファージに対する細胞傷害性と腸炎モデルマウスへの炎症誘導性を調べたところ、T1S5 株の細胞傷害性と炎症誘導性は、T1T2 株と同程度までの減弱した (図 2)。以上のことより、*S. Typhimurium* の T3SS-2 エフェクター *SifA*、*SpvB*、*SseF*、*SseJ* および *SteA* は協調的機能することで、宿主に対し、細胞死と炎症を誘導していることが示唆された。

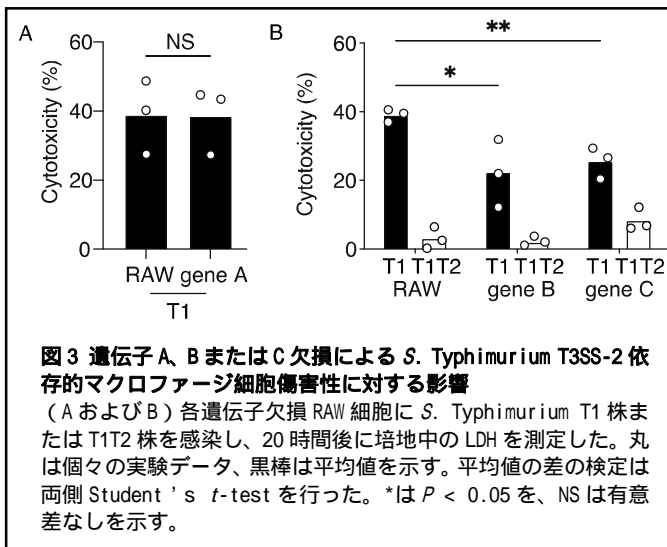


## 2 *S. Typhimurium* によるマクロファージ細胞死誘導には宿主因子 B および C が関与する

マクロファージに対し細胞傷害性を示さない *S. Typhimurium* T3SS-1 および T3SS-2 欠損株 (T1T2 株) は、腸炎モデルマウスに腸炎を誘導しないことから、T1 株または T1T2 株を感染した腸炎モデルマウスの盲腸の遺伝子発現プロファイル (未発表データ) から T1 株において T1T2 株と比較して 2 倍以上発現している遺伝子について詳細に解析した結果、炎症性の細胞死に関わる

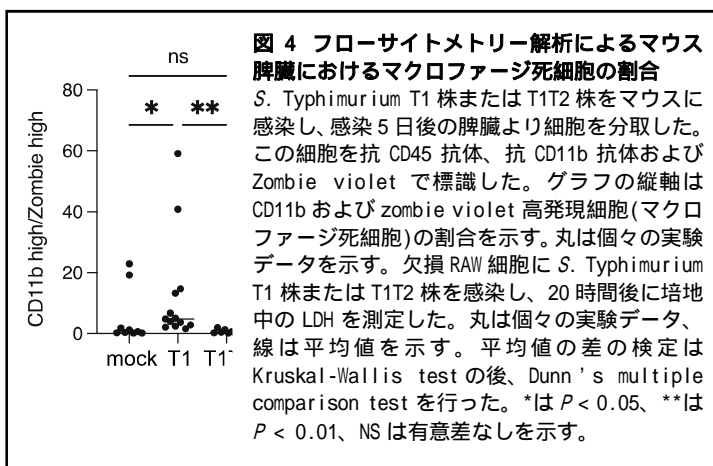
遺伝子 A、B および C を同定した。次に、これら細胞死に関わる遺伝子を CRISPR/Cas9 法によりノックアウトした RAW 細胞を用いて LDH assay を行った結果、T1 株を感染させた RAW 細胞と比較して遺伝子 A ノックアウト細胞では細胞傷害性に有意差は認められなかったが、遺伝子 B ノックアウト細胞および遺伝子 C ノックアウト細胞において細胞傷害性が有意に減少していた (図 3)。

これらの宿主因子 B および C は同一の細胞死誘導カスケードに存在し、本カスケードにおいて宿主因子 C は B より上流で機能することが知られている。そこでマクロファージ細胞死における本カスケードの活性化がマウスの T3SS-2 依存的腸炎誘導に関与するかを明らかにするため、遺伝子 C 欠損マウスに T1 株を感染し、5 日後の盲腸内容物、腸間膜リンパ節および脾臓の菌数、さらに盲腸の炎症を野生型マウス感染時と比較した。その結果、野生型マウスと遺伝子 C 欠損マウスの間に、各臓器・組織中の菌数および盲腸の炎症に違いは認められなかった (データ不記載)。以上のことから、*S. Typhimurium* によるマクロファージに対する T3SS-2 依存的細胞死では、遺伝子 B および遺伝子 C が関与する細胞死誘導カスケードが活性化されるが、このカスケードと独立した経路が存在し、これらが同時に活性化されることで T3SS-2 依存的腸炎が誘導されることが示唆された。



### 3 サルモネラ感染マウスの脾臓でマクロファージの細胞死が誘導される

次に、サルモネラ感染のどの過程においてマクロファージの細胞死が誘導されるのかを明らかにするため、*S. Typhimurium* T3SS-1 欠損株または T3SS-1 および T3SS-2 二重欠損株を腸炎モデルマウスに感染し、感染マウスの盲腸、腸管膜リンパ節、および脾臓から白血球を含む細胞を分取した。それらの細胞を各種蛍光標識抗体により染色後、フローサイトメトリー解析によってどの臓器または組織でマクロファージ細胞死が認められるのかを調べた。その結果、T3SS-1 欠損株では脾臓においてマクロファージ細胞死が顕著に見られたのに対し、T3SS-1 および T3SS-2 二重欠損株では全く認められなかった (図 4)。このことからサルモネラ感染マウスでは、脾臓において T3SS-2 依存的なマクロファージの細胞死が誘導されていることが示された。



## 5. 参考文献

1. K. A. Datsenko, B. L. Wanner, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97, 6640-6645 (2000).
2. K. Haga *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 113, E6248-E6255 (2016).
3. M. Barthel *et al.*, *Infection and Immunity*. 71, 2839-2858 (2003).
4. D. M. Monack, C. S. Detweiler, S. Falkow, *Cellular Microbiology*. 3, 825-837 (2001).
5. A. W. van der Velden, S. W. Lindgren, M. J. Worley, F. Heffron, *Infection and Immunity*. 68, 5702-5709 (2000).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakamura Nao, Hoshino Yusuke, Shiga Takuro, Haneda Takeshi, Okada Nobuhiko, Miki Tsuyoshi	4. 巻 88
2. 論文標題 A Peptidoglycan Amidase Activator Impacts Salmonella enterica Serovar Typhimurium Gut Infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 e00187-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/IAI.00187-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishiyama Keita, Takaki Takashi, Sugiyama Makoto, Fukuda Itsuko, Aiso Maho, Mukai Takao, Odamaki Toshitaka, Xiao Jin-zhong, Osawa Ro, Okada Nobuhiko	4. 巻 86
2. 論文標題 Extracellular Vesicles Produced by Bifidobacterium longum Export Mucin-Binding Proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e01464-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AEM.01464-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takemura Momo, Haneda Takeshi, Idei Hikari, Miki Tsuyoshi, Okada Nobuhiko	4. 巻 16
2. 論文標題 A Salmonella type III effector, PipA, works in a different manner than the PipA family effectors GogA and GtgA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0248975
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0248975	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 西山啓太 岡田信彦	4. 巻 58
2. 論文標題 腸内細菌と宿主との相互作用にかかわる分子機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生物と化学	6. 最初と最後の頁 614-620
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuda Shigeki, Haneda Takeshi, Saito Hiyori, Miki Tsuyoshi, Okada Nobuhiko	4. 巻 87
2. 論文標題 Salmonella enterica Effectors SifA, SpvB, SseF, SseJ, and SteA Contribute to Type III Secretion System 1-Independent Inflammation in a Streptomycin-Pretreated Mouse Model of Colitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 e00872-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/IAI.00872-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Otake Tsuyoshi, Fujimoto Mayuka, Hoshino Yusuke, Ishihara Tomomi, Haneda Takeshi, Okada Nobuhiko, Miki Tsuyoshi	4. 巻 88
2. 論文標題 Twin-Arginine Translocation System Is Involved in Citrobacter rodentium Fitness in the Intestinal Tract	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 e00892-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/IAI.00892-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 伊藤雅洋、岡田信彦
2. 発表標題 乳酸桿菌Lactobacillus casei ATCC27139の胆汁酸耐性メカニズムの解明
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須藤直樹、佐々木万里香、今福拓也、伊豫田淳、岡田信彦
2. 発表標題 志賀毒素変換ファージにコードされる低分子RNAの機能解析
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名	嶋田真帆、加藤真友子、佐藤史歩、石井美妃、兒玉侑樹、伊藤雅洋、Adam J. Ratner、岡田信彦、Melissa M. Herbst-Kralovetz
2. 発表標題	腔常在乳酸桿菌 <i>Lactobacillus iners</i> が腔粘膜バリア機構に与える影響の解析
3. 学会等名	第94回日本細菌学会総会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	松田茂樹、羽田健、岡田信彦
2. 発表標題	サルモネラのT3SS-2依存的炎症に必要なエフェクターの同定
3. 学会等名	第92回日本細菌学会総会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Takeshi Haneda, Shigeki Matsuda, Hiyori Saito, Nobuhiko Okada
2. 発表標題	Identification of Salmonella effectors required for T3SS-1-independent inflammation
3. 学会等名	Gordon Research Conference-Salmonella Biology and Pathogenesis (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	大竹剛史、藤本真由佳、羽田健、三木剛志、岡田信彦
2. 発表標題	Role of twin-arginine translocation system in <i>Citrobacter rodentium</i> fitness in the intestinal tract
3. 学会等名	第93回日本細菌学会総会
4. 発表年	2020年



1. 発表者名 伊藤雅洋、Adam J. Ratner、岡田信彦、Melissa M. Herbst-Kralovetz
2. 発表標題 腔常在乳酸菌Lactobacillus inersが腔上皮細胞の細胞間接着結合に与える影響の解析
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 岡田信彦（分担）	4. 発行年 2020年
2. 出版社 情報機構	5. 総ページ数 200
3. 書名 腸内細菌叢の基礎知識と研究開発における留意点	

1. 著者名 岡田信彦（分担執筆）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 690
3. 書名 標準微生物学 第14版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	羽田 健  (Haneda Takeshi)	北里大学	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------