

論文の内容の要旨

論文題目 納豆菌 *Bacillus subtilis* (*natto*) が
腸内菌叢と腸管細胞機能に及ぼす作用

氏名 細井知弘

腸管は、外来物質による侵襲・傷害作用から生体を保護するとともに、必要な栄養物を吸収するという高度なバリアー機能を有しており、生体の恒常性維持に欠かせない。これらの機能に、多種多様な腸内菌と腸管免疫機構が大きな役割を果たしている。腸内菌の菌体成分や代謝物質等は、宿主に様々な影響を及ぼし、菌種によりその影響は異なる。一方、腸管免疫機構は、パイエル板や腸管上皮細胞付近等に存在する多くの免疫担当細胞により維持されている。腸管上皮細胞は、抗体分泌、抗原認識及び免疫応答の誘導・制御を担っており、外来物質との接触により様々なサイトカインを産生し、物質排除や損傷細胞の修復を進める。近年、これらの腸管機能の向上を目的として摂取するプロバイオティクス (probiotics, 宿主にとって有益な作用を及ぼす生きた微生物) が注目されている。その作用として、腸内菌叢改善、消化管発癌予防、感染防御能向上、免疫機能向上などが挙げられる。プロバイオティクスには乳酸菌が多用されるが、グラム陽性好気性孢子形成細菌のバチルス属細菌 *Bacillus* spp. も利用されている。孢子は、酸や活性酸素、熱等に対する耐性が高く、プロバイオティクスとして優れた性質を有する。納豆製造に用いられる納豆菌 *B. subtilis* (*natto*) は、分類上、枯草菌 *B. subtilis* に含まれるバチルス属細菌の1つであり、プロバイオティクスとしての利用が期待されている。これまで、枯草菌 *B. subtilis* の効

果として、孢子生菌の経口摂取により、腸内菌叢改善、下痢改善、飼養効率向上等が報告されている。しかしながら、腸内菌叢の変化は、常に一定した効果が認められるものではなく、その作用に他物質の関与が予想された。また一般に、乳酸菌を用いたプロバイオティクスの腸内菌叢に対する作用は pH 低下等によるものと考えられているが、納豆菌では pH 低下という作用機序は想定しがたく、その解明が求められていた。さらにその他の作用として、納豆菌自体に腸管免疫機構に対する作用が存在するかどうかの詳細な解析はなされていなかった。そこで、本研究では、納豆菌のプロバイオティクスとしての作用を複合的に解析することを目的として、納豆菌摂取による腸内菌叢変化に対する食事成分の影響、乳酸桿菌に対する増殖促進活性の作用機序及び腸管上皮様細胞に対する免疫学的作用について検討した。

納豆菌経口摂取による糞便菌叢変化に対する食事成分の影響

枯草菌経口摂取による腸内菌叢変化が一定しない原因を明らかにするため、マウスに異なる 3 種類の飼料をそれぞれ自由摂取させ、納豆菌孢子摂取による糞便菌叢変化を比較・検討した。各飼料群のマウスに対し、非滅菌納豆菌孢子懸濁液あるいは滅菌蒸留水を 8 日間連続経口投与し、投与前後の糞便菌叢（乳酸桿菌、バクテロイデス科細菌、腸内細菌科細菌、腸球菌）の変化を個体別に調べた。その結果、精製飼料の卵白食摂取群では、蒸留水投与群で乳酸桿菌が減少したが、納豆菌投与群でその減少が抑制された。カゼイン食摂取群では、バクテロイデス科細菌に関して、蒸留水と納豆菌投与の効果に有意な差が認められた。またカゼイン食摂取群のバクテロイデス科細菌は、卵白食摂取群に比べ 10 分の 1 程度に減少した。したがって、自由摂取飼料中のタンパク質の違いのみで、納豆菌投与による糞便菌叢の変化様式が異なることが判明した。市販 MF 食を自由摂取させたマウスでは、納豆菌投与群で乳酸桿菌が減少した。バクテロイデス科細菌は、予備飼育を行ったにもかかわらず蒸留水投与群で増加したが、納豆菌孢子群ではその増加が抑制された。すべての飼料群において、納豆菌投与による腸内細菌科細菌及び腸球菌の有意な変化は認められなかった。また高圧蒸気滅菌処理した納豆菌孢子の経口投与では、糞便菌叢が変化しなかった。飼料の種類により菌叢変化に差が生じた原因を検討する目的で、動物実験で用いた卵白あるいはカゼインを含む精製飼料の成分を酸とペプシンで処理してモデル消化物を作製し、これを培地として糞便より分離した乳酸桿菌と

納豆菌の混合培養を *in vitro* で好氣的に行った。しかしながら、動物実験とは異なり、どちらの培地においても、非滅菌納豆菌胞子の添加により乳酸桿菌の増殖促進が認められた。また、納豆菌胞子添加による乳酸桿菌の増殖促進は、少糖類存在下で認められた。以上の結果から、経口投与した非滅菌納豆菌胞子が腸内で発芽・増殖し、何らかの代謝物が常在の腸内細菌に影響を及ぼすとともに、飼料の種類により腸内環境に何らかの差が生じ、納豆菌胞子経口投与の効果が変化することが示唆された。本結果は、プロバイオティクスの効果をより確実に高める、あるいは反対に抑制する食事成分の存在を示唆している。また、プロバイオティクスの効果を検討する際に、プロバイオティクス以外に摂取する食事成分も十分に考慮する必要を生じさせるとともに、より厳密なプロバイオティクス効果の評価法確立につながるものとする。

納豆菌、カタラーゼ、ズブチリシンによる乳酸桿菌の増殖促進及び生残性向上

納豆菌 probiotic の腸内菌叢に対する作用の機序として、酸産生による pH 低下は想定しがたく、その解明が求められていた。本研究では、納豆菌と乳酸桿菌を *in vitro* で好氣的に混合培養し、乳酸桿菌の生育に対する納豆菌の作用とその作用機序を検討した。その結果、納豆菌添加は培養初期の乳酸桿菌の増殖を促進し、定常期到達後の生残性を向上させた。乳酸桿菌の生菌数減少は、活性酸素により生じることが知られることから、納豆菌、納豆菌培養上清、カタラーゼ、あるいはスーパーオキシドディスムターゼを培地に添加し影響を検討したところ、納豆菌、納豆菌培養上清及びカタラーゼが増殖促進・生残性向上効果を示し、乳酸桿菌の菌株により効果を示す作用物質は異なった。また、乳酸桿菌の生育は培地中のタンパク質加水分解物に影響されることから、タンパク質分解酵素ズブチリシンの影響を検討した。その結果、ズブチリシンの添加は、納豆菌の添加と同様に、増殖促進及び生残性向上効果を示した。バチルス属細菌はカタラーゼ及びズブチリシンを産生することから、納豆菌の乳酸桿菌に対する増殖促進及び生残性向上活性には、納豆菌が産生するカタラーゼとズブチリシンが関与することが示唆された。乳酸菌と性質の異なる納豆菌単独の probiotic のみならず、乳酸菌の性質を補強・増強する目的で納豆菌と乳酸菌を混合した複合菌 probiotic など、従来の乳酸菌単独のものとは異なる新たなプロバイオティクスの開発も期待される。

納豆菌に対する腸管上皮様 Caco-2 細胞のサイトカイン応答

病原菌及び乳酸菌に対する免疫応答に関して、これまで多くの解析がなされてきたが、納豆菌に対する腸管免疫機構の応答については、詳細は不明であった。また腸管免疫機構において、腸管上皮細胞は、免疫担当器官としてその重要性が再認識されている。そこで本研究では、納豆菌経口摂取時の腸管上皮細胞に対する作用解明を目的として、腸管上皮様細胞に分化するとされる Caco-2 細胞を納豆菌あるいはサルモネラ等の細菌と共培養し、Caco-2 細胞のサイトカイン応答を検討した。その結果、納豆菌は、サルモネラや大腸菌、緑膿菌と同様に、Caco-2 細胞のサイトカイン IL-6 及び IL-8 の産生を誘導し、IL-7, IL-15 及び TNF- α の産生を誘導しなかった。しかしながら、電子顕微鏡観察や経上皮電気抵抗 (TER) の測定により、納豆菌の細胞傷害性は、他のサルモネラ、大腸菌あるいは緑膿菌と比較して低いことが示唆された。また納豆菌のサイトカイン産生誘導活性は、チロシンキナーゼ阻害剤存在下で減少したことから、Caco-2 細胞内のシグナル伝達経路を介するものと考えられた。さらに塩酸処理した死菌体は、intact な生菌よりもサイトカイン産生誘導活性が高かった。本結果は、経口摂取した納豆菌が腸管上皮細胞の免疫応答を誘導し、腸管免疫機構に影響を及ぼすことを示唆するものである。また、病原性細菌や腸管常在細菌、その他経口摂取する細菌の免疫学的刺激の差異について、各種免疫担当細胞単独のあるいはそれらの総合的な応答解析の必要性を示す結果といえる。腸管免疫機構が様々な微生物に対しどのような応答を示すのかという大きな課題の解明に寄与する結果と考える。

近年、良好な食生活による疾病予防の重要性が大きく叫ばれ、機能性食品・特定保健用食品の開発が盛んとなっている。それらのなかで、プロバイオティクスは重要な位置を占め、消費額も伸びている。しかしながら、今後のプロバイオティクスのさらなる発展・普及には、その有用性・安全性の科学的解析が不可欠である。乳酸菌を利用したプロバイオティクスと比較して、納豆菌等のバチルス属細菌を利用したプロバイオティクスに関する研究は、まだ始まったばかりの状況にあるといえる。本研究はその一端を担うものであると確信しており、この分野に関する研究がさらに発展することが望まれる。