

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 細井 知弘

---

本論文は、納豆菌のプロバイオティクスとしての作用解析に関するものであり、5章より構成されている。プロバイオティクスとは、宿主にとって有益な作用を及ぼす生きた微生物またはそれを含む食品のことであり、最近の研究から、腸内菌叢改善、免疫機能向上、アレルギー疾患抑制などの作用が示唆され、その利用が注目されている。申請者は、プロバイオティクスの菌種として、多用されている乳酸菌ではなく、バチルス属細菌のひとつ納豆菌 *Bacillus subtilis* (*natto*) に着目し、納豆菌による腸内菌叢変化とその作用機序、納豆菌に対する腸管細胞の免疫応答を解明することを目的として、以下の研究を実施した。

第1章で研究の背景と意義について概説し、第2章では納豆菌摂取による腸内菌叢変化（乳酸菌増加効果）とその効果に対する食事成分（タンパク質と糖質）の影響について述べている。マウスに異なる飼料をそれぞれ自由摂取させ、納豆菌胞子経口摂取による糞便菌叢変化を比較・検討した。その結果、卵白を含む精製飼料摂取群では、対照の蒸留水投与群で糞便中の宿主にとって有益とされる乳酸桿菌が減少したが、納豆菌投与群ではその減少が抑制された。またバクテロイデス科細菌、腸内細菌科細菌及び腸球菌数に関しては、有意な変化を及ぼさなかった。しかしながら、含有タンパク質が異なる飼料を摂取させたマウスでは、納豆菌投与効果が卵白食摂取群と異なった。さらに、納豆菌と糞便より分離した乳酸桿菌の混合培養を好氣的に行ったところ、乳酸桿菌の増殖促進が観察されたが、培地中の飼料由来タンパク質の差は影響を与えず、少糖類の添加が納豆菌の乳酸菌増殖促進効果に有効であった。以上の結果から、経口投与した納豆菌胞子が腸内で発芽・増殖し腸内菌叢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て納豆菌胞子投与の効果が変化することが示唆された。

第3章では、納豆菌の乳酸桿菌に対する増殖促進及び生残性向上効果の作用機序を検討している。納豆菌と乳酸桿菌3株を *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、すべての乳酸桿菌に対して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。この効果は、既報のカタラーゼの効果に類似していたため、納豆菌、ウシ肝臓由来カタラーゼをそれぞれ過酸化水素含有培地に添加したところ、一部の乳酸桿菌の増殖促進・生残性向上効果を示した。続いて、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、乳酸桿菌の生育に対する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、*B. licheniformis* 由来ズブチリシンの添加は、乳酸桿菌の増殖促進及び生残性向上効果を示した。納豆菌も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と考えられた。

第4章では、腸管上皮様細胞を用いて、納豆菌に対するサイトカイン応答を解析し、非病原性大腸菌や病原性サルモネラ等に対する応答との比較を行なっている。病原性細菌及び乳酸菌と比較して、納豆菌及び枯草菌に対する腸管免疫機構の応答については、これまで詳細は不明であった。腸管上皮様 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産生を検討した。納豆菌は、サルモネラや大腸菌、緑膿菌と同様に、インターロイキン (IL) 6 及び IL-8 の産生を誘導した。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。またサイトカイン産生誘導活性が、Caco-2 細胞内のシグナル伝達経路の活性化を介することを示唆する結果を得た。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が、オートクレーブ滅菌処理した菌体では活性が失われた。本結果は、経口摂取した納豆菌が病原性を示さない範囲で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。第5章は総合討論である。

以上本論文は、新たにバチルス属細菌を利用したプロバイオティクスが欧米諸国でも注目されている状況のなか、日本で古くから利用されている納豆菌のプロバイオティクスとしての作用に関する先駆的な知見を与えるものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。