

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660097

研究課題名(和文) ヒト腸管非吸着性乳酸菌の選抜と食事性セシウム137除去ヨーグルトの構築

研究課題名(英文) Construction of decontamination yogurt of dietary Cesium 137 using lactic acid bacteria with no adhesion activity to human intestine

研究代表者

齋藤 忠夫 (Saito, Tadao)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00118358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物起源乳酸菌100株よりセシウムイオン(Cs)吸着試験を行い、高付着性30株を選抜しさらにヒト腸管低付着性7菌株が得られた。とくに高Cs吸着性ヒト腸管低付着性乳酸菌としてPediococcus pentosaceus MYU759株を選抜できた。本菌は弱塩基性領域で安定してCsを保持し、ヒト腸管内での有用性が示唆された。競合イオン存在下でもCs吸着性が菌体ペプチドグリカン層に認められ、菌体内には取り込んでいなかった。Csの存在形態評価から、微量であるが強固に菌体表面層にCsを吸着固定する「フレイド・エッジ様構造」の存在が示唆された。本菌によるCs体内除染用ヨーグルトはほぼ実現できた。

研究成果の概要(英文)：Removal of Cesium 137 (Cs137) was proposed using adsorbent such as ion-exchange resin or Zeorite. However, no method has been suggested for the removal of Cs137 after human intake of polluted food, or a practical method of "body decontamination". I screened for new lactic acid bacteria (LAB) which strongly combine Cs137 on peptide glycan of cell surface, and about 30 strains were selected from 100 strains which were primarily isolated from plant and fermented vegetables. We then selected strains that do not bind human colon mucin on the surface of intestine. Further to examine the mechanism we found a frayed edge site (FES) like structure in the peptide glycan layer of *Pediococcus pentosaceus* MYU759 that traps Cs using negative charge having the exact size of the atom. The functional yogurts using these strains are expected to remove Cs137 from the body through feces continuously.

研究分野：畜産物利用学

キーワード：セシウム137 体内除染 プロバイオティクス フレイド・エッジ構造 Biacore1000 ヒト腸管付着性 植物性乳酸菌 表面吸着

## 1. 研究開始当初の背景

平成23年3月11日の東日本大震災では、広島型原子爆弾の約168個分に相当する90万テラベクレルの放射性物質が水や土壌などを含む自然界に放出された。現在、食品汚染の可能性として深刻なのはセシウム137 (Cs137) であり、その半減期は30年と長く、1000分の1に減少するには実に300年が必要である。すなわち、30年経過しても、いまだ半分量のセシウムは残留することになる。

セシウムが体外にある場合には、現在も実施されているように、イオン交換樹脂やゼオライトやカーボンナノチューブなどにより物理的に吸着除去し、安全な場所に保管することである程度の解決が得られる。しかしながら、食事と一緒に摂取するセシウムの人体への危険性は今後もずっと継続するだけでなく、有効な手段は全くと言って良いほど、開発はされていない。これらの課題を解決することは、国家としての喫緊の事態と考えることができる。

本研究は、このような社会的な背景と要求のもとに実施されたものである。

## 2. 研究の目的

米や野菜や魚などの食材におけるCs137の汚染の可能性は今後も否定できず、食事からのセシウムの完全阻止は残念ながら不可能に近く、何らかの対策が急務であると考えられる。我々は、これまで10年以上前よりヒト腸管付着性乳酸菌やビフィズス菌などのプロバイオティクスの探索、選抜、そして高度利用を目指してきた。我々は、その為にヒト腸管付着性を評価するバイオセンサー Biacore1000を用いた新しい手法を世界に先駆けて開発した。本研究は、この手法を用いるが、これまでの考え方を全く逆手に取って、「Cs137を強く細胞表層に吸着し、かつヒト腸管付着性の全く無い乳酸菌」を選抜することを目的とした。最終的には、ヒトに安全な乳酸菌を用いてのセシウムの「体内除染」とい

う全く新しい視点での高度利用を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 植物起源の乳酸菌ライブラリーの構築：我々は、これまで常にヒト腸管付着性を年頭において研究室の菌株ライブラリーはヒト糞便由来菌に対して構築して来た。予備実験では、ほぼ全ての菌が少なからず腸管付着性を示した。そこで本研究では、ヒト腸管付着性の低いまたは無い乳酸菌を選択するのであるから、起源は植物性に求めた。各種国産の糠漬けやキムチ、サワークラウト、米などに対象を広げ、乳酸菌菌体の単離を行った。培地は、乳酸桿菌用にMRS broth、乳酸球菌用としてM-17およびトマトジュース寒天培地を用いた。菌種の分類と同定は、16sRNA解析およびAPI50CHにより行った。

(2) ヒト大腸組織から低結合性乳酸菌の単離：東北大学病院より分譲されたヒト大腸標本正常部位よりムチン層を採取した。腸ムチンはProK処理で可溶化し、ゲル濾過精製を行った。ヒト大腸ムチン(HCM)および血液型糖鎖抗原を用いて、プラズモン共鳴(SPR)を利用したバイオセンサーBiacore1000によりムチン糖鎖と親和性の無い乳酸菌をマスキングした。本装置は、表面プラズモン共鳴現象を利用して生体分子間での相互作用を非標識下で分析可能な極めて優れた装置であり、腸管内での付着性機構をシミュレート可能である。また、我々が初めてBiacoreを用いて開発したスクリーニング手法 (Uchida *et al.*, *Res. Microbiol.*, **157**, 659-665, 2006)を用いて実施した。

(3) 各種ミネラルの菌体吸着性の評価：各種ミネラル(カルシウム、マグネシウム、カドミウム、鉛、ヒ素、水銀、に加えてヨード131を想定してヨウ素、セシウム137を想定してセシウム)の各化合物を10mMクエン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)に溶解して1ppm溶液を調製した。各培養乳酸菌の培養液(1.0x10<sup>8</sup> cells/ml)に各種金属イオンを添加し、37 で

18時間反応させた。その後菌体を除去し、ろ液中の金属イオン濃度を原子吸光分析装置で測定した。

(4) ヒト腸管非付着性およびセシウム高付着性乳酸菌を用いての機能性ヨーグルトの作成：セシウムの菌体結合性が高く、かつヒト腸ムチンへの結合活性が最も低かった乳酸菌を選抜し、ヨーグルト製造に汎用される *Streptococcus thermophilus* (サーモフィルス菌) および *Lactobacillus bulgaricus* (ブルガリア菌) を脱脂乳培地に 2% 接種し、37 ~ 42 で 6 時間培養して、菌を単独または組み合わせさせた機能性ヨーグルトを各種試作した。

#### 4. 研究成果

本研究では、日々の食事において放射線被爆によるセシウム 137 (Cs) 汚染食品を摂取することによる危害を、乳酸菌を高度利用することで「体内除染」を試みることを目指して、優れた乳酸菌の選抜利用を行った。

(1) 植物および植物性の発酵食品より広くスクリーニングを実施し、100 株の植物性乳酸菌を得ることができた。また、その選抜菌株中から Biacore 試験によりセシウム吸着性の選抜試験を行った。その結果、ヒト腸管「低」付着性乳酸菌 7 菌株が得られた。全ての菌株で、菌体に Cs の吸着性が認められたが、その能力には菌株ごとに多様性が見られた。高 Cs 吸着性でかつヒト腸管低付着性の理想的な乳酸菌として *Pediococcus pentosaceus* MYU759 を選抜することが出来た。

(2) 選抜菌 MYU759 では、細胞表層に結合する Cs が蒸留水によって容易に溶出する弱い結合性のもの、および蒸留水レベルでは容易に溶出しない比較的強固な結合性のもの、の 2 種類の結合モードにて吸着していることが分かった。

(3) MYU759 は、外部環境が酸性領域では菌体吸着 Cs はほとんどが溶出するが、中性か

ら弱塩基性領域では比較的安定して保持されていた。ヒト腸管内 pH は弱アルカリ性であるために、MYU759 は腸管内でも Cs を吸着し保持できる可能性が示唆された。

(4) MYU759 は、リチウム、ナトリウム、ルビジウム等の競合イオンの存在によって菌体表層への Cs 除去量は減少するが、Cs 吸着量には大きな影響が認められず、競合イオン存在下での強い Cs 吸着性が認められた。

(5) MYU759 菌体は Cs を主に菌体表層のペプチドグリカン(PEG)層に吸着しており、菌体内には取り込んでいないことが初めて明らかとなった。

(6) MYU759 における Cs の存在形態評価から、菌体に吸着された Cs のほとんどが pH 依存性負電荷への結合であること、また微量ではあるが強固に吸着された Cs も存在しており、菌体表層のペプチドグリカン層内に「フレイド・エッジ様構造」があり、極めて強く 1 M 以上の高い中性塩溶液でも溶出しない特異的な吸着機構に密接に関与していることが示唆された。

(7) MYU759 菌株およびヨーグルト菌を使用して作成した新機能性 Cs 除染用ヨーグルトを試作した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 3 件)

Tadao SAITO

Frayed edge-like structure (FES) found in lactic acid bacteria (LAB) used for decontamination of cesium 137 from the human intestine.

The 2<sup>nd</sup> International Conference of Personalized Medicine and Global Health.

(May 13, 2015, Nasarbayev University,

Kazakhstan)

松崎郷子、江上昌弘、木下英樹、北澤春樹、齋藤忠夫：ヒト腸管非付着性乳酸菌の選抜と食事性セシウムの体内除染、第120回日本畜産学会大会

(2015年9月11日、酪農学園大学)

松崎郷子、江上昌弘、木下英樹、北澤春樹、齋藤忠夫：プロバイオテイクスを用いたセシウム体内除染用の新機能性ヨーグルトの構築と利用、酪農科学シンポジウム(日本酪農科学科意主催)

(2015年9月25日、帯広十勝プラザ)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齋藤 忠夫 (SAITO Tadao)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：00118358

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：