

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：33906

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05910

研究課題名（和文）納豆菌を用いた鶏腸内に生息するカンピロバクター駆逐と腸内フローラへの影響

研究課題名（英文）Removal of *Campylobacter* spp. from chicken intestine using *Bacillus natto* and its effect on intestinal bacterial flora

研究代表者

門屋 亨介（Kadoya, Ryosuke）

椋山女学園大学・生活科学部・准教授

研究者番号：10624942

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、納豆菌が持つカンピロバクターに対する抗菌効果は株により効果が異なることを明らかにした。抗菌効果は強度と安定性の2点で判定を行ったが、株により効果は異なっていた。この結果は、抗菌物質（効果）が納豆菌株により異なっていると考えられた。さらに、抗菌効果の高い納豆菌株をマウスに与えたところ、腸内のカンピロバクターに対する抗菌効果が確認された。また、納豆菌摂食前と後では、腸内細菌叢は大きく変化していた。しかし、マウス健康に影響は無かった。これらの結果は、納豆菌の中には腸内カンピロバクターに対し効果的な抗菌効果を示す株が存在する可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトに対する健康食品として広く知られている納豆菌と畜産業界で長年用いてきた生菌剤に対して、新しい知見・技術開発を提示した。これまでに生菌剤として納豆菌を用いた研究は幾つかあるが、増殖抑制効果の高い納豆菌種の選別や増殖抑制効果の比較、腸内での効果、投与/非投与状態での腸内フローラを明示した例はなかった。

本研究では、カンピロバクター属菌に対して効果の高い納豆菌の選抜だけでなく、腸内での抗菌効果や投与による腸内細菌叢への影響を調べた。その結果、ある種の納豆菌は腸内のカンピロバクター属菌の増殖を特異的に抑制するが、実験動物健康へは影響しないことを示した。

研究成果の概要（英文）：In this study, it was found that the antibacterial effect of *Bacillus natto* against *Campylobacter* spp. differed in effectiveness depending on the strain. Antimicrobial efficacy was judged in two ways: intensity and stability, but the efficacy differed depending on the strain. This result suggested that antimicrobial materials differed among strains. Furthermore, the *B. natto* strain with high antimicrobial efficacy was fed to mice and its antimicrobial effect on *Campylobacter* spp. in the intestine was observed. In addition, the intestinal bacterial flora changed significantly before and after the *B. natto* feeding. However, there was no effect on mouse health. These results suggest that some strains of *B. natto* may have significant antibacterial activity against intestinal *Campylobacter* spp.

研究分野：応用微生物学

キーワード：カンピロバクター 納豆菌 抗菌活性 腸内細菌叢 プロバイオティクス

1. 研究開始当初の背景

カンピロバクター食中毒は世界各国で発生している主要な食中毒であり、下痢や嘔吐などを引き起こす。食卓の安全を確保するうえで本菌の汚染防止は緊急の課題である。主な原因菌は *Campylobacter jejuni* であり、市販鶏肉が高率に汚染していることから、調理段階での加熱処理しか有効な防御策はない。本菌は鶏の腸管内には無症候的に定着し、養鶏場での飼育段階で感染することが多くの調査により明らかにされている。

畜産領域において、幼若期における飼料への抗菌性物質の添加が日常化している。これは生後間もない時期の感染症を予防することにより家畜の健全化を図り、安全な食肉を提供することを目的としている。しかしながら、抗生物質はある菌に対しては有効でも、他の菌には効かないといった効果に特性がある。しかも使い続けることで、その物質に対する耐性菌を生み出す副作用も持っている。その耐性化した病原微生物がヒトにも水平伝播することが懸念されている。

そのため、鶏腸内での *C. jejuni* の定着を阻止するために微生物を利用した生菌剤は古くから利用されてきた。納豆菌には、チフス菌、ブドウ球菌、赤痢菌など多くの病原微生物に対して強い増殖抑制活性をもつことが知られている。また、近年の研究では納豆菌の近縁種枯草菌には、カンピロバクター、サルモネラ、豚レンサ球菌に対する増殖抑制効果があることが明らかにされた。納豆菌の利用は抗生物質と比較し、多くの病原微生物に対して強い増殖抑制効果をもち、耐性菌の発生もなく、ヒトや動物に対する病原性がない安心・安全な菌である等といったメリットがある。また、近年ヒトで注目されているように、腸内フローラは生体の健康状態にとって非常に重要な役割を担っている。ヒト腸内フローラ研究では、納豆菌の恒常的な摂取は腸内の病原微生物撲滅だけでなく、腸内フローラを整え健康に寄与しているという報告もある。しかしながら、生菌剤の利用はさほど普及していない。これは、増殖抑制効果の高い納豆菌種の選別や増殖抑制効果の比較、腸内での効果、生菌剤投与状態における腸内フローラの明示などを多角的に示した研究が少ないためである。

2. 研究の目的

本研究課題では、微生物を含んだ生菌剤に着目し、カンピロバクター食中毒の拡大を防止することを考えた。腸内フローラの調整と病原微生物に対する抑制効果として納豆菌が利用されている。納豆菌の利用は抗生物質と比較し、多くの病原微生物に対して強い増殖抑制効果をもち、耐性菌の発生もなく、ヒトや動物に対する病原性がない安心・安全な菌である等といったメリットがある。また、近年ヒトで注目されているように、腸内フローラは生体の健康状態にとって非常に重要な役割を担っている。そこで、以下の課題に取り組むことにより鶏肉フードチェーン内からカンピロバクター食中毒を撲滅し、食の安全を目指す。1) 数多く存在する納豆菌の中から *C. jejuni* に対して高い増殖抑制効果をもつ菌株を探索する。高い増殖抑制効果を持つ菌の要因を明らかにする。2) 納豆菌の投与が、鶏腸管内で *C. jejuni* に対して効果的か検討する。3) 増殖抑制効果の高い納豆菌を鶏に添加したときの腸内フローラの変化を経時的に観察し、腸内フローラ構造の変化と鶏生体への影響を測定する。

3. 研究の方法

[1] *C. jejuni* に対して最も増殖抑制効果を持つ納豆菌のスクリーニング

これまでに発見された納豆菌種を用い、*C. jejuni* 生育抑制効果を確認する。納豆菌は独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) にストックされている納豆菌を用いる。納豆菌の選抜には、ポルトン平板培地上での Well diffusion assay を用いる。それに加え、試験管で *C. jejuni* と納豆菌をポルトン液体培地で 48 時間共培養し、*C. jejuni* 生菌数を経時的に計測する。

[2] マウス腸内での *C. jejuni* 増殖抑制効果の確認

[1]にて *C. jejuni* 増殖抑制効果が得られた納豆菌株をマウスに経口投与し、腸内での増殖抑制効果の有無を確認する。*C. jejuni* 投与マウスを飼育し、一定間隔で納豆菌を経口投与する。その後、各個体から糞便を回収し、*C. jejuni* および納豆菌の単離増殖培養と生菌数測定を行ない腸管内での経時的な増殖プロファイルを作成する。

[3] 納豆菌投与/非投与での腸内細菌叢 16S rRNA メタ解析

[2]の実験で回収したマウス糞便から全ゲノムを抽出し、16S rRNA メタ解析で腸内フローラを決定し、納豆菌の経口投与が腸内細菌全体にどのような影響を及ぼすか観察する。同時に、腸内フローラの機能的側面としてマウス生体の体重変化を測定し、両者間の相関を調べる。これにより、*C. jejuni* と他の腸内細菌との関連性、投与された納豆菌と腸内フローラ形成との関連性、投与された納豆菌と鶏の成長の関連性を探る。

[4] 納豆菌抗菌活性物質の精製及び機能測定

[1]にて *C. jejuni* 増殖抑制効果が得られた納豆菌株の培養上清から抗菌活性物質を凍結乾燥法及び限外濾過法にて精製した。さらに 100 、 5 分間反応による耐熱性試験及び Proteinase K で 37 、 3 時間処理したタンパク質分解酵素耐性試験を行った。

4 . 研究成果

(1) 純粋培養評価系を用いた抗菌活性効果測定

NITE から分与された納豆菌株 10 株、抗菌活性が無いことが報告されている枯草菌 168 株、抗菌活性があることが報告されている ATCC6633 株を用い、*C. jejuni* に対する増殖抑制効果を検討した。各株の抗菌効果は、LB 培地で培養した納豆菌を *C. jejuni* を塗布したボルトン平板培地に滴下した Well diffusion assay 法にて検討した。抗菌効果の検討は、増殖抑制を示すハ口の大きさ測定(抗菌強度)と同様の実験を複数回繰り返しハ口形成の再現性測定(抗菌安定性)の 2 点で行った。その結果、今回検討した 10 株には、*C. jejuni* に対する抗菌効果に強度及び安定性にばらつきがあることが示された。納豆菌でも株により *C. jejuni* に対する抗菌効果が異なる。特に強い抗菌活性を持つ 2 株を用いて液体培養条件下での抗菌効果を測定した(NBRC3936 株及び NBRC16449 株)。各納豆菌と *C. jejuni* をボルトン液体培地・微好気条件下で共培養した結果、*C. jejuni* 生菌数は大幅に減少しており、液体培養条件下でも抗菌効果を発揮することが示された(図 1)。

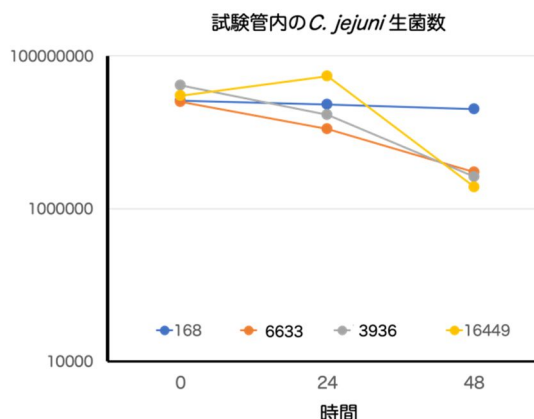


図 1 納豆菌と *C. jejuni* の試験管共培養時の *C. jejuni* 生菌数

(2) 抗菌活性効果を示す納豆菌投与時の腸内細菌叢変化

納豆菌株が生体腸内で *C. jejuni* に対して抗菌効果を発揮することが可能であるか、また、納豆菌自体が腸内細菌叢にもたらす効果をマウスで観察した。マウス腸内には、納豆菌は定着せず、*C. jejuni* は定着することを確認した。腸内に *C. jejuni* が定着したマウスに高い抗菌効果を示した納豆菌(NBRC16449 株)を投与した結果、*C. jejuni* の消失が確認された。したがって、納豆菌の *C. jejuni* への抗菌効果はマウス腸内でも有効であることが示された。

納豆菌投与時における腸内細菌叢多様性への影響についてメタゲノム解析データを用いて α 及び β 多様性に基づいて統計的に検討した。Chao1 で示された α 多様性は抗菌効果の有無に関わらず納豆菌の摂取により有意に増加した(168 株、NBRC3936 株、NBRC16449 株)。PCoA により示された β 多様性解析(unweight UniFrac)では、抗菌効果を持つ納豆菌投与時には細菌群衆はクラスターを形成していた(NBRC3936 株、NBRC16449 株)。このクラスターには抗菌効果が無い納豆菌(168 株)を摂取した細菌群衆が含まれていなかった(図 2)。

腸内細菌メタゲノム解析で存在率 1%以上の細菌属で納豆菌の投与前後で変化があったものを見出したところ、抗菌活性を有する納豆菌の投与により 3 属の存在率が増加し、7 属の存在率が減少した。腸内細菌で善玉菌として有名な *Lactobacillus* 属の存在率は増加(46%から 61%)していた。

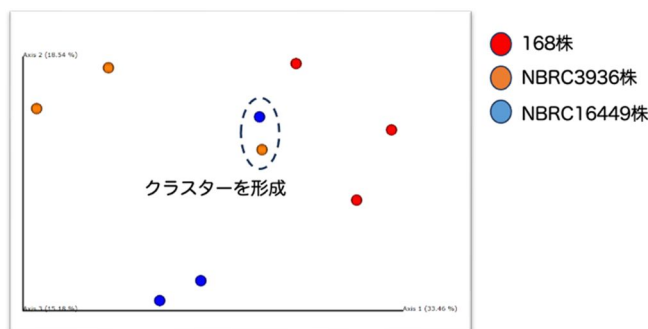


図 2 納豆菌投与時のマウス腸内細菌叢の β 多様性解析

(3) 納豆菌が産生する抗菌活性物質の探索

納豆菌が産生する抗菌物質特定を行った。生菌を用いた抗菌活性測定実験では、株により抗菌効果が異なることから、納豆菌株により抗菌物質が異なる可能性が考えられた。培地上清の抗菌活性を測定した結果、3 株の培地上清に強い抗菌活性があることが示された(NBRC3936 株、NBRC3013 株、NBRC16449 株)。これら 3 株の培地上清を限外濾過法にて分子量に依存した分離精製を行った結果、NBRC3936 株では 10kDa から 3kDa に、NBRC3013 株では 10kDa 以上と 3kDa 以下に、NBRC16449 株では 3kDa 以下に高い抗菌活性が確認された。また、耐熱性試験では 3936 株で強い熱感受性が観察され(抗菌活性が 70%減少)。

Proteinase K 反応ではすべての株で抗菌活性が 30%減少した。

以上の結果から、納豆菌の *C. jejuni* に対する抗菌活性は株により違いがあるが、抗菌活性を示す株はマウス腸内でも有効であることが示された。したがって、納豆菌を選抜し生菌剤に応用することで *C. jejuni* 食中毒予防につながることを期待される。抗菌活性物質特定までには至らなかったが、さらに研究を進めることで、サプリメント等への応用も期待することが可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 門屋 亨介、加藤 芹奈、杉本 奈菜子
2. 発表標題 納豆菌を用いたCampylobacter属菌の増殖抑制効果の検討
3. 学会等名 第95回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 門屋 亨介、池谷 美有、金田 理穂
2. 発表標題 納豆菌を用いたCampylobacter jejuni増殖抑制効果の検討
3. 学会等名 2020 年度グラム陽性細菌ゲノム機能会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 門屋 亨介、池谷 美有、金田 里穂
2. 発表標題 納豆菌を用いたカンピロバクター属菌の増殖抑制効果の検討
3. 学会等名 第94回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------