

天然のドラッグデリバリーシステム機能を併せ持つ
腸管自然免疫系を増強する納豆菌の調査研究

茨城県産業技術イノベーションセンター

飛田 啓輔

納豆は、江戸時代の医学書「本朝食鑑」に「腹中を整え、食を進め、毒を解す」と示されるなど、古くから整腸効果を中心に健康維持機能が経験的に知られてきた¹⁾。納豆は、茨城県の特産品の一つであり、蒸した大豆を納豆菌によって発酵させた伝統的発酵食品であることは周知のとおりである。納豆菌は、*Bacillus subtilis* に帰属し、 γ -ポリグルタミン酸の生産能力が高く、大豆煮豆を納豆に変えるのに適した枯草菌の一種と定義され、生育条件によって芽胞細胞になることでも知られる²⁾。すなわち、栄養状態や温度条件など生育環境が悪化すると、栄養細胞状態から細胞内部に孢子を形成し、耐熱性や耐酸性を示すというものである。過酷な環境下でも生存が可能となる芽胞細胞状態の納豆菌は、胃酸に対して耐性を示し、いわば天然のドラッグデリバリーシステム機能を併せ持つプロバイオティクスとして期待できると考えられる。

これまでに、著者はいくつかの栄養細胞状態の納豆菌が、ヒト腸管上皮細胞に対して抗菌ペプチドである β ディフェンシン2 (BD2) 遺伝子の発現を促進することや、マクロファージにおける IL-12p40 遺伝子発現を促進することを確認している (未発表データ)。このように、栄養細胞状態の納豆菌にはプロバイオティクスとしての役割や自然免疫系を増強する作用を有することを明らかにしている。しかし、芽胞細胞の納豆菌については検討がなされていない。本研究では、納豆菌の芽胞細胞によるプロバイオティクスとしての機能評価と腸管自然免疫系に及ぼす影響を調べるとともに、そのメカニズムの解明を試みたので、その結果を以下に述べる。

実験方法

1. 納豆菌と乳酸菌の培養

納豆菌は、茨城県産業技術イノベーションセンターにおいて継代培養されているものを試験に供した。納豆菌として、市販納豆製造用納豆菌には成瀬株 (N 株) と宮城野株 (M 株)、茨城県産業技術イノベーションセンター分離納豆菌には A 株と B 株を用いた。栄養細胞は LB 液体培地 (Becton Dickinson) で、37°C、24 時間振とう培養したものを用いた。さらに、芽胞形成培地 (Schaeffer's sporulation medium) に継代して 37°C、48 時間振とう培養したものを芽胞細胞として試験に供した。プロバイオティクス乳酸菌として知られている *Lactobacillus rhamnosus* GG 株 (LGG 株)³⁾は、市販 MRS 液体培地 (Becton Dickinson) で 37°C、24 時間静置培養し、対照として試験に用いた。なお、芽胞形成培地で培養した納豆菌については、位相差顕微鏡 ECLIPSE 80i (Nikon) の観察において芽胞細胞が 99%以上であることを確認した。

2. 人工胃液での生存性試験

人工胃液は、日本薬局方崩壊試験法に記載の第 1 液を改変したものを用いた⁴⁾。すなわち、濃塩酸で pH1.3 または pH3.0 になるように調整した 0.2%塩化ナトリウム水溶液に対して、最終濃度 0.04%になるようにブタ由来ペプシン (富士フィルム和光純薬) を添加してフィルター滅菌処理したものを人工胃液とした。暴露試験は、人工胃液 10 mL に対して 10^6 CFU/mL に調整した納豆菌または LGG 株培養液 100 μ L を添加し、37°C で 3 時間暴露した。生存性として、標準寒天培地 (日水製薬) または MRS 寒天培地 (Becton Dickinson) を用いて暴露開始から 1.5 時間後および 3 時間後の生菌数を求めた。

3. 腸管上皮細胞への付着性試験

腸管上皮細胞への付着性試験は既報⁵⁾を参考にした。ヒト由来腸管上皮細胞である HT-29 細胞は 10%ウシ胎児血清 (FBS、Thermo Fisher Scientific) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM 培地、GE ヘルスケアライフサイエンス) に懸濁し、 1×10^5 個/mL 濃度になるように細胞浮遊液を調製した。さらに、48 ウェル平底マイクロプレートに細胞浮遊液を播種して、37°C、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養し、細胞をマイクロプレート底面に接着させた。その後、 10^4 CFU/mL 濃度の納豆菌または LGG 株を含む DMEM 培地 1 mL に置換し、37°C、5% CO₂ 条件下で 2 時間反応させた。さらに、0.01 M リン酸緩衝液 (PBS、pH7.2) で 2 回洗浄した後、PBS 1 mL を加えセルスクレーパーを用いて細胞を丁寧に剥離した。納豆菌には標準寒天培地、LGG 株には MRS 寒天培地を用いて、添加した納豆菌または LGG 株の生菌数に対する細胞に付着した各生菌数の比率から付着性を調べた。

4. 人工腸液中での芽胞細胞と栄養細胞の挙動

人工腸液として、日本薬局方の崩壊試験第 2 液を参考に⁴⁾、pH6.8 に調整した LB 培地に最終濃度 0.5% になるようにブタ膵臓由来トリプシン (富士フィルム和光純薬) を添加してフィルター滅菌処理したものを試験に供した。芽胞形成培地で培養した納豆菌培養液は 100°C で 5 分間の煮沸処理を行った後、人工腸液 10 mL に対して納豆菌培養液 100 μ L を添加し、37°C で 20 時間振とう培養した。その後、培養液の全生菌数 (栄養細胞数+芽胞細胞数) に対して、100°C、5 分間の煮沸処理を行った培養液の生菌数 (芽胞細胞数) を差し引くことで、人工腸液暴露後の芽胞細胞と栄養細胞の比率を求めた。

5. 納豆菌粉末試料の調製

栄養細胞は、LB 液体培地で 37°C、24 時間振とう培養し、純水で 3 回遠心洗浄した後、凍結乾燥したものを栄養細胞試料とした。芽胞細胞は、LB 液体培地で 37°C、24 時間振とう培養した後、芽胞形成寒天培地に塗抹して 37°C、48 時間培養した。回収した菌体は純水で 3 回遠心洗浄し、凍結乾燥したものを芽胞細胞試料とした。

6. 腸管上皮細胞とマクロファージの培養

腸管上皮細胞は 10%FBS を含む 1%ペニシリン・ストレプトマイシン溶液 (富士フィルム和光純薬) 添加 DMEM 培地に、マウス由来マクロファージである J774.1 細胞は 10%FBS を含む 1%ペニシリン・ストレプトマイシン溶液添加 RPMI-1640 培地 (Thermo Fisher Scientific) に、各々を懸濁し細胞浮遊液を調製した。平底マイクロプレートに PBS に懸濁した納豆菌粉末試料および細胞浮遊液を播種して、37°C、5% CO₂ 条件下で 3 時間または 48 時間培養した後、細胞または培養上清を回収した。なお、IL-12 産生機序の解明には NF- κ B 阻害ペプチド、または MyD88 阻害ペプチドとの共培養により評価した。

7. 遺伝子発現の解析

遺伝子発現の解析方法は既報⁶⁾を参考にした。回収した細胞における遺伝子発現解析は、リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (リアルタイム RT-PCR) により調べた。まず、

総 RNA は TRIzol Reagent kit (Thermo Fisher Scientific) が定める方法に準じて細胞から抽出し、PrimeScrip RT Reagent kit with gDNA Eraser (タカラバイオ) を用いて RNA からのゲノム DNA 除去と cDNA 合成を行った。遺伝子発現解析では、cDNA から PowerUP SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて PCR 反応を行い、SYBR Green による増幅産物のモニタリングを QuantStudio 3 リアルタイム PCR 解析装置 (Thermo Fisher Scientific) を用いて連続的に行なった。各遺伝子に対するプライマーは表 1 に示したものをを用いた。補正リファレンス遺伝子をグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) として、各遺伝子の相対発現レベルを $\Delta\Delta C_t$ 法により求めた。なお、プライマー作成は北海道システムサイエンス株式会社に委託した。結果は平均値と標準偏差で示した。

表 1. プライマー一覧

プライマー名	配列
マウス IL12p40 (F)	5'-TGG GAG TAC CCT GAC TCC TG-3'
マウス IL12p40 (R)	5'-CTA CGA GGA ACG CAC CTT TC-3'
マウス GAPDH (F)	5'-TGC GAC TTC AAC AGC AAC TC-3'
マウス GAPDH (R)	5'-ATG TAG GCC ATG AGG TCC AC-3'
ヒト BD2 (F)	5'-TTC CTG ATG CCT CTT CCA-3'
ヒト BD2 (R)	5'-ATG TCG CAC GTC TCT GA-3'
ヒト GAPDH(F)	5'-AAC GGA TTT GGT CGT ATT GG-3'
ヒト GAPDH(R)	5'-AAT GAA GGG GTC ATT GAT GG-3'

8. サイトカイン IL-12 濃度の測定

サイトカイン IL-12 濃度の測定方法は既報⁷⁾を参考にした。細胞培養上清中の IL-12 濃度は、マウス IL-12/IL-23 (p40) 測定用 ELISA キット (Biolegend) を用いて、キットの定める方法に準じて反応を行った。反応後、450 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (BioRad Laboratory) によって測定した。結果は平均値と標準偏差で示した。

9. 統計解析

ステューデントの *t* 検定により、危険率 5%未満を統計的有意差ありと判定した。

結果と考察

1. 人工胃液に対する納豆菌の生存性の検討

空腹時の胃の内容物は胃液によって pH1~2 と強酸性状態に保たれるとともに、胃の内容物が完全に十二指腸へ移送されるには 2 時間以上かかることが報告されている⁸⁾。本研究では、pH1.2 または pH3.0 に調整した人工胃液に対して納豆菌の芽胞細胞と栄養細胞、または LGG 株を暴露し、1.5 時間後または 3 時間後の各生菌数を調べた。図 1 に示したとおり、初発 (反応 0 時間) と比較して反応開始 1.5 時間後および 3 時間後の生菌数において、芽胞細胞では顕著な差はみられなかったが、栄養細胞では顕著に減少した。一方、LGG 株の場合では、pH1.2 に調整した人工胃液において初発と比較して反応 1.5 時間後および 3 時間後の生菌数に著しい減少がみられた。このように、芽胞細胞は胃液による暴露におい

でも生存性を示すことがわかった。

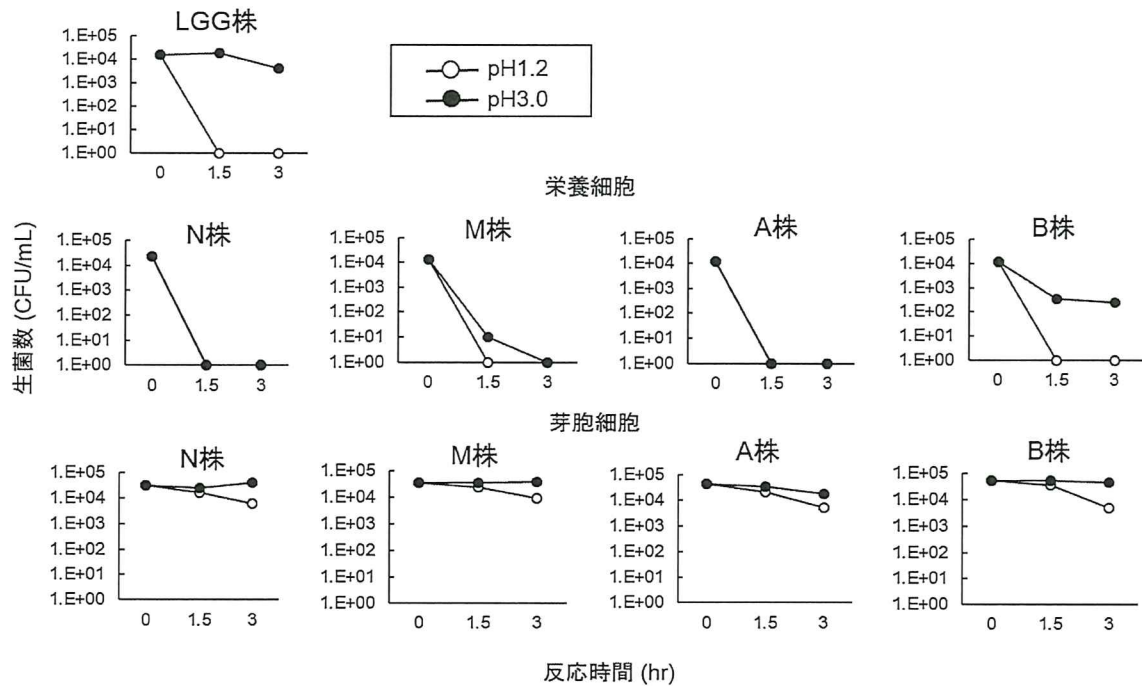


図1 人工胃液に対する納豆菌の生存性

2. 納豆菌の腸管上皮細胞への付着性の検討

プロバイオティクスにおける腸管細胞への付着性は、腸管における一定期間の定着性を示すものと考えられる⁹⁾。本研究では、腸管上皮細胞に納豆菌またはLGG株を添加して培養後、それらの腸管上皮細胞に対する付着率を調べた。その結果、添加した納豆菌の生菌数を100%とした時、2時間後には栄養細胞ではN株で $0.8 \pm 0.2\%$ 、M株で $4.9 \pm 0.3\%$ 、A株で $2.1 \pm 0.9\%$ 、B株で $0.1 \pm 0.0\%$ 、芽胞細胞ではN株で $0.9 \pm 0.2\%$ 、M株で $4.9 \pm 0.3\%$ 、A株で $1.9 \pm 0.1\%$ 、B株で $2.9 \pm 1.1\%$ が腸管上皮細胞に付着した。一方、添加したLGG株の生菌数を100%とした時、2時間後には43.5%が腸管上皮細胞に付着した。このように、芽胞細胞の付着率はLGG株と比較して低いものの、腸管細胞への付着性を有することがわかった。

3. 人工腸液の暴露による納豆菌の芽胞細胞と栄養細胞の挙動

腸液は、プロテアーゼなど様々な酵素や分泌液を含むpH7.0付近の中性域の消化液であり、食物は腸管において数時間から数十時間かけて消化される。先述のとおり、芽胞細胞は温度、栄養状態など増殖のための適正な環境になると、発芽して栄養細胞へと変化する。図2に示したとおり、納豆菌の芽胞細胞は人工腸液に20時間反応させることで、添加前の生菌数と比較して減少する傾向を示したが、一定の生存性を示すことがわかった(図2A)。ところで、反応20時間後の納豆菌の栄養細胞と芽胞細胞の比率を調べたところ、いずれの納豆菌においても栄養細胞の占有率は98%以上であった(図2B)。これらの結果から、摂取した納豆菌の芽胞細胞は腸管内で発芽し、栄養細胞へと変換することが示唆される。

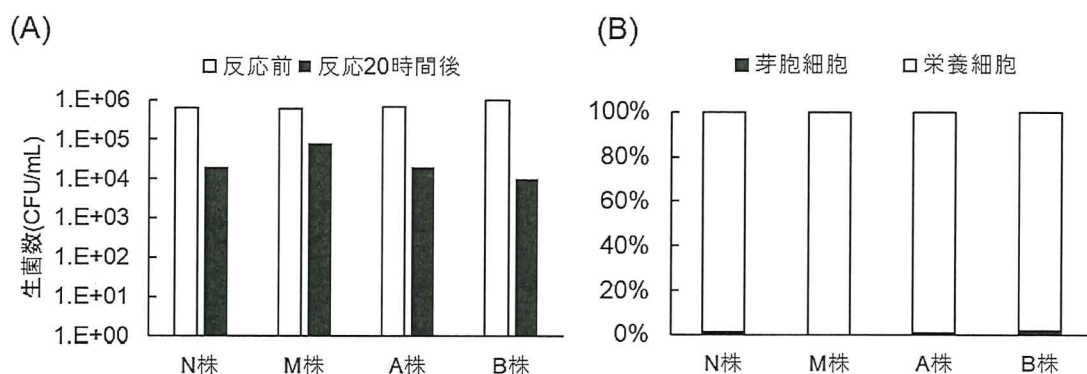


図2 人工腸液中の納豆菌の生菌数 (A) と反応 20 時間後の栄養細胞と芽胞細胞の比率 (B)

4. 納豆菌が腸管上皮細胞における BD2 遺伝子発現に及ぼす影響

ヒト BD2 は、システインリッチのカチオン性低分子抗菌ペプチドであり、主に上皮細胞から産生される¹⁰⁾。とりわけ、腸管においては病原体の排除と常在菌との共生により腸管自然免疫を担っていると考えられている。図3に示したとおり、腸管上皮細胞における BD2 mRNA の相対発現率は、納豆菌無添加の場合を 100%とした場合、M 株、A 株、B 株の芽胞細胞を添加した場合において上昇傾向を示した。また、N 株や A 株の栄養細胞を添加した場合には、それらの芽胞細胞を添加

した場合と比較して、BD2 mRNA の相対発現率は上昇する傾向であった。先述のとおり、芽胞細胞は腸管滞留期間において栄養細胞へと変化することが推察されている。すなわち、経口摂取した納豆菌の芽胞細胞は、腸管で栄養細胞へと変化し、上皮細胞に対して BD2 遺伝子発現を強く亢進することで、腸管自然免疫系を誘導するのかもしれない。

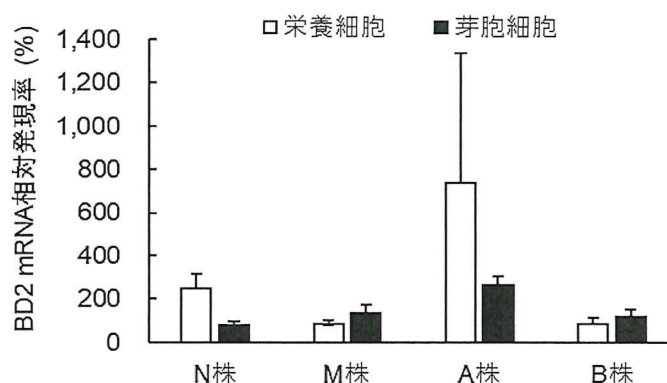


図3 腸管上皮細胞における BD2 遺伝子発現

5. 納豆菌がマクロファージの IL-12 の遺伝子発現とタンパク質産生に及ぼす影響

マクロファージから産生される IL-12 は、Th1 細胞分化を促し、NK 細胞や T 細胞による細胞傷害性やインターフェロン γ 産生を誘導することが知られている¹¹⁾。図4Aに示したとおり、マクロファージにおける IL-12p40 mRNA の相対発現率は、納豆菌無添加の場合を 100%とした時、いずれの栄養細胞を添加した場合において顕著に上昇した。さらに、M 株と B 株では栄養細胞を添加した場合と比較して、芽胞細胞を添加した場合には顕著に高くなった ($P < 0.05$)。一方、図4Bに示したとおりマクロファージにおける IL-12 産生量は、納豆菌無添加の場合と比較して、いずれの栄養細胞を添加した場合において増加した。加えて、いずれの栄養細胞を添加した場合と比較して、芽胞細胞を添加した場合には顕著に増加することがわかった ($P < 0.05$)。このように、納豆菌の芽胞細胞はマクロファージに

よる IL-12 産生を強く誘導することがわかった。なお、同一の納豆菌株において IL-12 の遺伝子発現とタンパク質産生との間で差異が観察された。本検討では 3 時間培養後による IL-12 遺伝子発現を観察したものであり、今後は経時的に遺伝子発現の観察を行う余地がある。

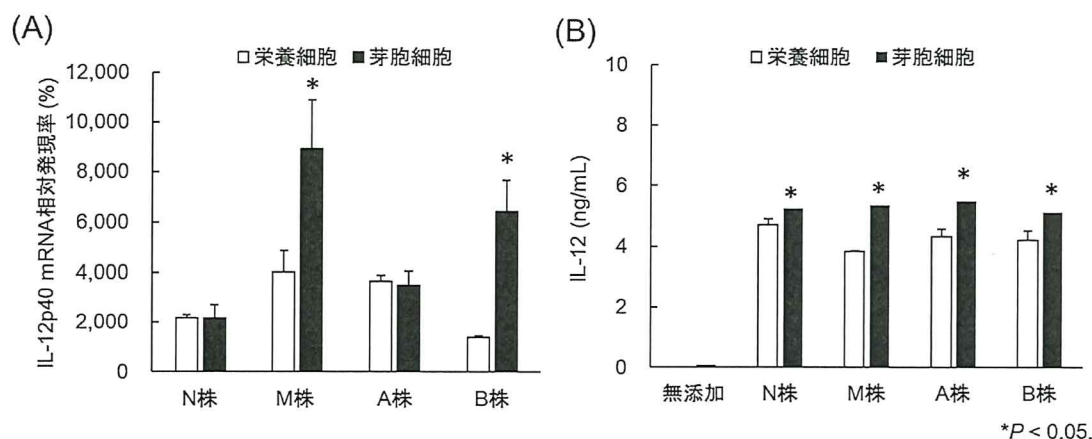


図 4 マクロファージにおける IL-12 の遺伝子発現 (A)とタンパク質産生 (B)

6. 納豆菌による IL-12 産生機序の解明

Toll 様受容体 (TLR) は細菌やウイルス特有の構造パターンを認識して生体防御を担う。細菌やウイルスに由来する成分が結合すると、MyD88 などの細胞内シグナル伝達経路を介して転写因子 NF- κ B などが活性化され、IL-12 などのサイトカイン産生が誘導される¹²⁾。図には示していないが、本検討において納豆菌の栄養細胞によるマクロファージへの IL-12 産生促進作用は、MyD88 や NF- κ B に対するシグナル伝達阻害ペプチドによって抑制されたが、芽胞細胞による IL-12 産生促進作用はそれらのペプチドによって顕著に抑制される菌株とほとんど影響を受けない菌株に分かれた。これらの結果から、栄養細胞と芽胞細胞、あるいは菌株によって IL-12 産生促進作用の機序が異なることが示唆される。今後は、TLR ノックアウト細胞培養系を用いて作用機序の詳細な検討を行うことが望ましい。

要約

本研究では、芽胞細胞の納豆菌によるプロバイオティクスとしての機能評価と腸管自然免疫系に及ぼす影響を調べるとともに、その作用機序の解明を試みた。納豆菌の芽胞細胞は、胃液中での生存性を示すとともに、腸管上皮細胞へ付着することが分かった。さらに、腸液中では芽胞細胞から栄養細胞へ変化することで、芽胞細胞と比較して同等以上に BD2 遺伝子発現を亢進した。このことから、摂取した納豆菌が芽胞細胞として胃を通過した後、腸管内で栄養細胞へと変化することで、腸管自然免疫系の増強に強く導くことが推察された。一方、マクロファージに対して芽胞細胞は栄養細胞よりも遺伝子およびタンパク質レベルで IL-12 産生を高める傾向であったが、その作用機序は栄養細胞と芽胞細胞では異なることが示唆された。これらの結果は、伝承的に知られてきた納豆の保健機能の一端を明らかにできるだけでなく、納豆菌に関する科学的知見の一助に貢献できると考えられる。

謝辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人タカノ農芸化学研究助成財団に心から御礼申し上げます。また、納豆菌株の提供ならび培養方法の助言を頂いた産業技術イノベーションセンター 久保 雄司 農学博士、試験解析の一部を行った小田木 美保 技師に謝意を表します。最後に、産業技術イノベーションセンターの各位には研究遂行にあたり日頃より有益なご討論ご助言を頂いたことに感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 須見洋行. 納豆の機能性. 日本醸造協会誌, 85 (8), 518-524 (1990).
- 2) 竹村浩. 納豆菌の育種による納豆の差別化と品質向上. 化学と生物, 53 (11), 787-791 (2015).
- 3) Segers ME, Lebeer S. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG-host interactions. Microb Cell Fact., 13, S7 (2014).
- 4) 第十七改正日本薬局方 ; 「平成 28 年 3 月 7 日 厚生労働省告示第 64 号」.
- 5) Tobita K, Watanabe I, Saito M. Specific vaginal lactobacilli suppress the inflammation induced by lipopolysaccharide stimulation through downregulation of toll-like receptor 4 expression in human embryonic intestinal epithelial cells. Biosci Microbiota Food Health., 36 (1), 39-44 (2017).
- 6) Tobita K, Yanaka H, Otani H. Heat-treated *Lactobacillus crispatus* KT strains reduce allergic symptoms in mice. J Agri Food Chem, 57 (12), 5586-5590 (2009).
- 7) Tobita K, Hoshi F, Ohki T, Watanabe I. Protein denature extracts of *Lactobacillus crispatus* KT-11 strain promote interleukin 12p40 production via Toll-like receptor 2 in J774.1 cell culture. J Food Biochem., 45 (2), e135992021 (2021).
- 8) 武藤 泰敏. 新版 消化・吸収—消化管機能の調節と適応, 第一出版, 東京 (1988).
- 9) 木下 英樹, 齋藤 忠夫. 乳酸菌の細胞付着性機構とヒト腸管定住性の獲得. 日本乳酸菌学会誌, 17 (1), 3-11 (2006).
- 10) Schröder JM, Harder J. Human beta-defensin-2. Int J Biochem Cell Biol., 31 (6), 645-651 (1999).
- 11) 飛田 啓輔, 小田木 美保, 岩佐 悟, 武田 文宣. 小川酵母は Toll 様受容体および Dectin-1 を介して IL-12 産生を誘導する. 日本醸造学会誌, 115 (11), 1-7 (2020).
- 12) Toubi E, Shoenfeld Y. Toll-like receptors and their role in the development of autoimmune diseases. Autoimmunity, 37 (3), 183-188 (2004).