

納豆菌ファージに感染耐性を示す納豆菌の生理特性解明

(第 1 報)

久保 雄司* 武田 文宣*

1. はじめに

茨城県は、納豆の産地として全国的に有名であり、総務省が実施している家計調査において水戸市の納豆購入金額は毎年上位に名を連ねている。

消費だけでなく製造も盛んであるが、製造現場においては以前より指摘されてきた問題がいくつかある。その一つに納豆菌ファージ（以降、ファージと記載）の問題がある。ファージは、人間への害は報告されていないが納豆菌に感染し、納豆菌を死滅させてしまう。更に、納豆の粘り成分であるポリガンマグルタミン酸（ γ -PGA）を分解する酵素を生産するため糸引きがなくなり¹⁾、クレームの原因になる等、メーカーにとっては重大な問題となる。ファージ対策としては清掃以外の根本的な対処法が確立されておらず、当センターにも茨城県内外の納豆メーカーから納豆菌ファージ汚染に関する相談が毎年寄せられている。

当センターでは過去に、納豆菌ファージに対して感染耐性を示す納豆菌株の育種に成功している²⁾。この菌株を実用化するためには、毒性試験などの安全性試験を実施することが望ましいが、これまでそうした試験を実施していなかった。

そこで、本研究事業では、育種した菌株の安全性に関わる試験を実施した。

2. 目的

平成 24 年度から平成 27 年度に特別電源所在県科学技術振興事業で取り組んだ「納豆菌ファージ感染防御やチロシン析出抑制に効果を発揮する納豆菌に関する試験研究事業」において育種した、納豆菌ファージに対して感染耐性を示す納豆菌株(*B. subtilis* Phr-4)^{1,2)}の実用化に向けて、安全性評価と遺伝子解析を実施することとした。本報告では、安全性試験の結果について記載する。

試験項目は、食品添加物のガイドラインを参考に、生きた菌を含む食品で実施可能な内容に一部変更して行う。具体的には、育種した菌で納豆を試作し、ラットを使用して単回投与毒性試験、遺伝毒性試験及び反復投与毒性試験により菌の安全性の確認を行う。試験は 2 カ年で実施予定であり、1 年目の今年は、単回投与毒性試験と遺伝毒性試験を行った。遺伝毒性試験としては、納豆菌を含むサンプルでも試験可能である、末梢血小核試験と、pig-a アッセイの併合試験を採用した。

3. 研究内容

3.1 ラットを使用した安全性試験

Bacillus subtilis Namegata-2-2¹⁾をベースとした *B. subtilis* Phr-4¹⁾を使用して納豆を試作し、その安

全性評価を実施した。試作した納豆は、凍結乾燥後ミキサーで粉末化して試験サンプルとした。

納豆サンプルの調製、安定性及びサンプルを注射用水に懸濁した投与用被験液の濃度測定は当センターにて実施し、ラットへの投与、その後の経過観察及び評価等は株式会社ボゾリサーチセンターに委託して試験を進めた。

3.1.1 単回投与毒性試験

3.1.1.1 使用動物

試験に使用したラット（SPF）は以下のとおり。

系統	: Sprague-Dawley [Cr1:CD(SD)]
供給源	: 日本チャールス・リバー株式会社
入荷時週齢	: 5 週齢
購入匹数	: 雌雄各 18 匹
検疫・馴化期間	: 7 日間
投与時週齢	: 6 週齢
供試動物数	: 雌雄各 15 匹

検疫・馴化期間中の飼育観察は、体重測定、一般状態観察（1 回/日）を実施し、健康と考えられる動物を選択した。

3.1.1.2 投与方法

投与方法は、げっ歯類の経口投与に際して一般的な強制経口投与とした。

投与容量は 40mL/kg 体重とし、投与前一夜（約 16 時間）絶食させたラットにフレキシブル胃ゾンデを用いて、単回強制経口投与した。媒体対照群には媒体（注射用水（大塚製薬））を同様に投与した。給餌は投与 4 時間後の一般状態観察後に行った。

3.1.1.3 投与量、投与液の調製及び群構成

試験サンプルは医薬品ではなく、食品であるため、試験において出来る限り大量に投与したいと考えた。しかし、溶液の調製が可能であっても、粘性が高いため、一定濃度以上では投与不可能となることが予想された。そこで、予めフレキシブル胃ゾンデによる強制経口投与可能な濃度を検討した結果、調製可能最高濃度を 150mg/mL と確認し、高容量群を 150mg/mL、低用量群を 75mg/mL と設定して溶液を調整した。また、投与量の過多により、下痢などの影響が出ない 40mL を投与量として設定した。

その結果、投与量を 6,000 及び 3,000 mg/kg の 2 用量とした。濃度ごとに必要量のサンプルを秤量し、媒体（注射用水）を徐々に加えながら攪拌し、所定濃度にメスアップした。調製した被験液は褐色ガラス瓶に入れ冷凍保存し、調製後 9 日以内に使用した。

群構成は、媒体対照群を加え 3 群構成とし、1 群当

*フード・ケミカルグループ

たりの動物は雌雄各5匹とした。群構成表を表1に示した。

表1 単回投与試験の構成群

試験群	投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/ml)	投与容量 (ml/kg)	性	動物数
媒体対照群	0	0	40	雄	5
				雌	5
低用量群	3,000	75	40	雄	5
				雌	5
高用量群	6,000	150	40	雄	5
				雌	5

3.1.1.4 観察及び検査の方法

全動物について、投与0日は投与前、投与直後～投与5分後、15及び30分後、1, 2, 4及び6時間後に、その後は1日1回14日間、一般状態を観察した。体重は、全動物について、投与0日（投与前）、投与1, 2, 3, 7, 10及び14日後の午前中に測定した。

3.1.2 末梢血小核試験

染色体異常誘発能を調べるために、ラットを用いた末梢血小核試験を実施した。

3.1.2.1 使用動物

試験に使用したラット（SPF）は以下のとおり。
 系統：Sprague-Dawley [Cr1:CD(SD)]
 供給源：日本チャールス・リバー株式会社
 入荷時週齢：6週齢
 購入匹数：雄30匹
 検疫・馴化期間：14日間
 投与時週齢：8週齢
 供試動物数：雄27匹

検疫・馴化期間中の観察は、全動物について、体重測定及び一般状態観察（1回/日）を実施した。また、投与6日前にPig-aアッセイも実施した。

観察・検査結果を基に健康と考えられる動物を選択した。

3.1.2.2 陽性対照群液の調製

陽性対照群にはN-Nitroso-N-ethylurea-ISOPAC (ENU)を用いた。ENUに、37℃程度に加温した、リン酸緩衝生理食塩水(PBS, 組織洗浄用)を添加し、8mg/mL液を調製した。陽性対照群液は使用時に調製した。

3.1.2.3 投与経路、投与方法、投与期間及び投与回数

投与方法はげっ歯類の経口投与に際して一般的な強制経口投与とした。投与容量は10mL/kg体重とし、フレキシブル胃ゾンデを用いて、単回強制経口投与した。媒体対照群には媒体を同様に投与し、陽性対照群にはENU 8mg/mL液を5mL/kgの投与容量で単回強制経口投与した。観察期間は4週間とし、動物ごとの投与液量（表示単位：0.1mL）は投与日の体重を基準に算出した。

3.1.2.4 投与液の調製、投与量及び群構成

後述のとおり、単回投与毒性試験(3.1.1)において、雌雄いずれの投与群にも死亡動物はみられず、被験物質投与によると考えられる毒性変化もみられなかった。

したがって、投与可能最大量である6,000 mg/kgを高用量として設定し、3,000及び1,500 mg/kgをそれぞれ中及び低用量群に設定した。これらの3用量に、媒体対照群及び陽性対照群を加え5群構成とし、1群当たりの動物は雄6匹（陽性対照群は3匹）とした。

表2 pig-a及び末梢血小核試験の構成群

試験群	投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/ml)	投与容量 (ml/kg)	性	動物数
媒体対照群	0	0	40	雄	6
低用量群	1,500	37.5	40	雄	6
中用量群	3,000	75	40	雄	6
高用量群	6,000	150	40	雄	6
陽性対照群(ENU)	40	8	5	雄	3

3.1.2.5 観察及び検査の方法

全動物について、投与日は投与前及び投与直後、投与1日後以降は1日1回、生死を観察した。全動物について、投与日（投与前）並びに投与7, 14, 21及び28日後に体重を測定した。

3.1.2.6 末梢血塗抹標本の作製時期及び対象動物

本試験群の全動物について投与の約48時間後に尾静脈から採血した。1個体当たり2枚の末梢血液塗抹標本を作製し、そのうちの1枚を観察した。

動物番号順に動物を保定し、尾の両側にある静脈をアルコール綿で拭き静脈を怒張させ、アルコールを十分に乾燥させた後、25Gの注射針で刺し、血液を20μL採取した。予め、牛胎児血清（Thermo Fisher Scientific）を40μL分注した容器に、採取した血液を加え良く攪拌した。次に、スライドグラスに塗抹した。塗抹した標本は風乾させ、メタノールで約3分間固定した後、再び風乾した。

3.1.2.7 標本の観察

一個体当たり2枚作製したスライドのうち、塗抹状態の良好な試料番号のスライド1枚を選択してアクリジンオレンジで染色し、蛍光顕微鏡を用いて総合倍率600倍で観察した。

各動物について、全赤血球（reticulocyte + normochromatic erythrocyte [NCE]）12,000個中の網状赤血球（reticulocyte: RET）の数（出現頻度）と24,000個のRET中の小核を有する網状赤血球（micronucleated reticulocyte: MNRET）数（出現頻度）を計数し、それぞれの割合（%）を算出した。

3.1.2.8 観察結果の解析

群ごとにRET24,000個中のMNRETの出現頻度とその割合、全赤血球12,000個中のRETの出現頻度とその割合について平均値と標準偏差を算出した。

MNRETの出現頻度について、陽性対照群と媒体対照群の間、各被験物質投与群と媒体対照群の間でFisherの直接確率計算法（有意水準：0.05、片側）を用いて対比較した。

RETの割合については、まず、媒体対照群及び被験物質投与群における分散性をBartlett法（有意水準：0.01）により調べ、分散が均一な場合はDunnnettの検定を、分散が均一でない場合はSteelの検定を用いて媒体

対照群と各被験物質投与群との間で対比較することとした（有意水準：0.05及び0.01，両側）。

解析にはSAS Release 9.1.3（SAS Institute Inc.）及びEXSUS Version 7.6（CAC Croit Corporation）を使用した。

3.1.3 Pig-aアッセイ

遺伝子突然変異誘発性を評価するために、ラットを用いたPig-aアッセイを実施した。

3.1.3.1 血液試料の採取時期及び対象動物

投与前並びに投与14及び28日後に試験群の全動物について採血した。

100mg/mL EDTA-2K溶液（5μL/注射筒）で処理した注射筒を用いて、無麻酔でラット頸静脈から約0.1mL採血した。血液は使用するまで氷上で保存した。血液の処理及び測定は採血当日中に実施した。

3.1.3.2 Pig-a測定試料の調製

各血液サンプルについて、以下の処理を行った。200μLのPBSを分注したフローサイトメーター用チューブに血液を3μL添加し、十分に攪拌した。次に、HIS49 APC抗体（Becton, Dickinson）はPBSで1/3の濃度に希釈し、CD59 FITC抗体（Becton, Dickinson）と1:1の割合で混合した（マスターミックス）。PBSに溶解した血液試料に抗体マスターミックスを4μLずつ添加し、ボルテックスミキサーで数秒間攪拌後、遮光、室温で1時間インキュベーションした。尚、HIS49 APC及びCD59 FITCのそれぞれに対する染色用サンプルも用意した。ボルテックスミキサーで数秒間攪拌後、室温、約1,600×g、5分間の条件で遠心分離した。上清を廃棄し、ペレットに1mLのPBSを添加し均一に混合し測定試料とした。

3.1.3.3 結果の算出

各試料について、全赤血球の集団を対象とし、100万個の細胞をカウントした（BD FACS Cantoフローサイトメトリーシステム，Becton, Dickinson）。

下記の計算式を用いて試料ごとのPig-a変異頻度を算出し、群ごとの平均値と標準偏差を求めた。

【Pig-a変異頻度の計算式】

$$\text{Pig-a 変異頻度 (10}^{-6}\text{)} = \frac{\text{CD59 陰性赤血球数 (HIS49+CD59-)}}{\text{全赤血球数 (HIS49+)}} \times 10^6$$

媒体対照群と各被験物質投与群との間でBartlettの検定を行い等分散性（有意水準：両側1%）を調べた。その結果、Pig-a変異頻度は分散が均一な場合はDunnettの検定を、分散が均一でない場合はSteelの検定を行った（有意水準：両側1及び5%）。解析にはSAS Release 9.1.3（SAS Institute Inc.）を使用した。結果の判定は被験物質投与群におけるPig-a変異頻度が媒体対照群に対して統計学的に有意に増加し、この増加に用量相関性が認められた場合に陽性と判定した。

4. 研究結果と考察

4.1 単回投与毒性試験

4.1.1 投与液の調製

各被験液の表示値に対する割合は87.5%～97.0%（許

容範囲：100%±20%），均一性（CV）は0.1%～1.0%（許容範囲：CV10%以下）であり、濃度及び均一性ともに許容範囲内であった。

4.1.2 使用動物

観察・検査結果を基に健康と考えられる動物を選択した。いずれの動物にも一般状態及び体重に異常はみられなかった。

体重増加（検疫初回の体重～群分け時の体重）が順調な動物を群分け当日（投与開始の2日前）の体重に基づいて、各群の平均体重ができるだけ均等となるように群分けを行った。

4.1.3 投与結果

4.1.3.1 一般状態，体重，剖検，死亡状況

一般状態について、いずれの動物にも異常は認められなかった。体重変化を図1に示した。雄雌とも観察期間を通じて対照群と同様に推移した。また、いずれの動物にも、肉眼的な異常は認められず、死亡動物もみられなかった。したがって、最小致死量は雌雄とも6,000 mg/kgを上回るものと推定された。

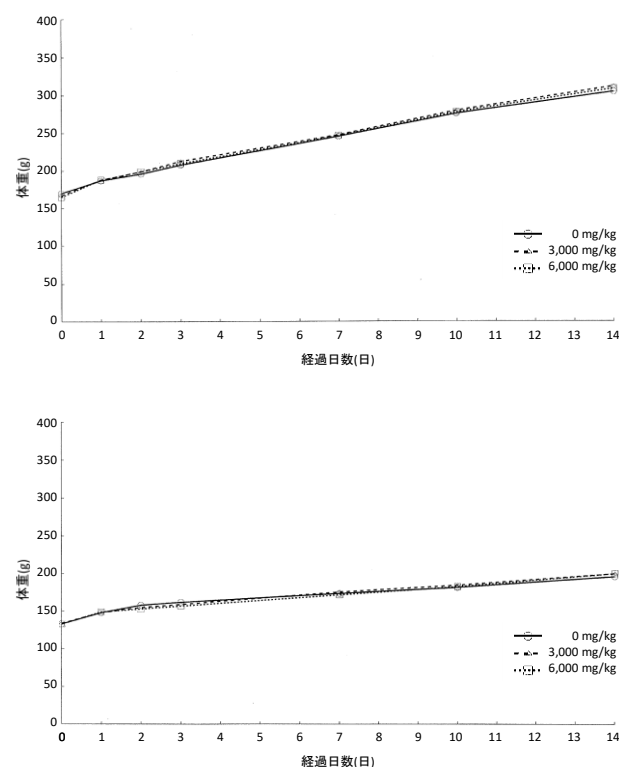


図1 単回投与マウスの体重変化(上:雄，下:雌)

4.2 末梢血小核試験

4.2.1 末梢血塗抹標本の観察結果

分散が均一であったためDunnettの検定を用いて媒体対照群と各被験物質投与群との間で対比較した。結果を表3に示した。陽性対照群のMNRETの出現頻度（72±13）は、媒体対照群の値（6±3）と比較して統計学的に有意（p<0.05）な増加を示した。RET 4,000個中に占めるMNRETの出現頻度は、1,500，3,000及び6,000 mg/kg投与群で、それぞれ6±3，7±2及び5±1であった。これらの値は媒体対照群との間で統計学的に有意

な増加を示さなかった。また、各被験物質投与群の全赤血球2,000個中に占めるRETの割合は、1,500、3,000及び6,000 mg/kg投与群で、それぞれ8.4%±1.0%、9.0%±1.0%及び8.6%±0.9%であった。これらの値は媒体対照群の値（7.9%±1.1%）と比較して統計学的に有意な変化を示さなかった。

表3 末梢血小核試験の結果

群	投与量 (mg/kg)		MNRET数/4,000RET	MNRET(%)	RET数/2,000赤血球	RET(%)
媒体対照群	0	n	6	6	6	6
		平均±標準偏差	6±3	0.15±0.08	157±22	7.9±1.1
		最小/最大	2/11	0.05/0.28	130/190	6.5/9.5
低用量	1,500	n	6	6	6	6
		平均±標準偏差	6±3	0.15±0.08	167±21	8.4±1.0
		最小/最大	3/10	0.08/0.25	137/194	6.9/9.7
中用量	3,000	n	6	6	6	6
		平均±標準偏差	7±2	0.19±0.06	180±20	9.0±1.0
		最小/最大	4/10	0.10/0.25	151/210	7.6/10.5
高用量	6,000	n	6	6	6	6
		平均±標準偏差	5±1	0.13±0.04	171±17	8.6±0.9
		最小/最大	3/7	0.08/0.18	146/189	7.3/9.5
陽性対照群 (ENU)	2	n	3	3	3	3
		平均±標準偏差	72±13	1.81±0.33	117±24	5.9±1.2
		最小/最大	57/82	1.43/2.05	95/142	4.8/7.1

4.3 Pig-aアッセイ

4.3.1 Pig-aアッセイの結果

結果を表4に示した。媒体対照群の投与14及び28日後のPig-a変異出現頻度は、それぞれ2.33±1.97 (×10⁻⁶)及び2.17±2.40 (×10⁻⁶)であった。各被験物質投与群のPig-a変異出現頻度は、1,500、3,000及び6,000 mg/kg投与群で、投与14日後は2.33±2.58(×10⁻⁶)、1.50±1.05(×10⁻⁶)及び0.50±0.84(×10⁻⁶)、投与28日後は1.17±0.41(×10⁻⁶)、1.50±1.05(×10⁻⁶)及び1.00±0.63(×10⁻⁶)であり、投与14及び28日後の値はほぼ同等であった。これらの値は媒体対照群の値と比較して統計学的に有意な変化を示さなかった。

一方、陽性対照群における投与14及び28日後のPig-a変異出現頻度58.33±18.77(×10⁻⁶)及び97.67±9.45(×10⁻⁶)であり、媒体対照群の値より明らかな高値を示した。

表4 Pig-aアッセイの結果

群	投与量 (mg/kg)		試験開始前	14日	28日
			(×10 ⁻⁶)		
媒体対照群	0	n	6	6	6
		平均±標準偏差	2.67±2.25	2.33±1.97	2.17±2.40
低用量	1,500	n	6	6	6
		平均±標準偏差	2.17±1.33	2.33±2.58	1.17±0.41
中用量	3,000	n	6	6	6
		平均±標準偏差	4.17±2.32	1.50±1.05	1.50±1.05
高用量	6,000	n	6	6	6
		平均±標準偏差	0.83±0.98	0.50±0.84	1.00±0.63
陽性対照群 (ENU)	40	n	3	3	3
		平均±標準偏差	2.67±3.06	58.33±18.77	97.67±9.45

5. まとめ

5.1 単回経口投与毒性試験

納豆 (*B. subtilis* Phr-4株使用) の単回経口投与による毒性を、雌雄のSprague-Dawley系ラット (Cr1:CD(SD)) を用いて検討した。

雌雄いずれにも死亡は認められず、一般状態、体重推移及び剖検においても異常は認められなかった。

以上の結果から、納豆 (*B. subtilis* Phr-4株使用) をラットに単回経口投与した時の最小致死量及び急性毒性発現量は、雌雄ともに6,000 mg/kgを上回ることが示された。

ラットへの投与結果を単純にヒトに置き換えることはできないが、仮にそう考えると、体重60kgのヒトは

360gまでの摂取において異常が見られないことを示す。納豆1パックは一般的に50g以下であるので、3食1パックずつ食べても異常は見られないということになる。

5.2 Pig-aアッセイ及び末梢血小核試験により評価

いずれの被験物質投与群にも死亡はみられず、体重も媒体対照群と同様に推移した。

小核試験では、各被験物質投与群の網状赤血球 (RET) 4,000個中に占める小核を有する網状赤血球 (MNRET) の出現頻度は、媒体対照群と比較して統計学的に有意な増加を示さなかった。また、各被験物質投与群における全赤血球2,000個中に占めるRETの割合も、媒体対照群と比較して、統計学的に有意な変化を示さなかった。

Pig-aアッセイでは、投与14及び28日後のいずれの時点においてもPig-a変異頻度は統計学的に有意な変化を示さなかった。

陽性対照群におけるMNRETの出現頻度は媒体対照群と比較して有意な増加を示し、また、Pig-a変異頻度も媒体対照群と比較して明らかな増加を示したことから、試験は適切に実施されたことが示された。

以上の結果から、納豆 (*B. subtilis* Phr-4株使用) の遺伝子突然変異及び染色体異常誘発能は、本試験条件下では陰性と判断した。

つまり、本年度実施した単回投与、Pig-aアッセイ及び末梢血小核試験結果は、全て異常なしということになり、現在のところ*B. subtilis* Phr-4株の安全性を示す結果が得られたことになる。

6. 今後の課題

次年度に実施する反復投与毒性試験の結果に問題がなければ、県内納豆メーカーへの普及を進める。

7. 参考文献

- 1) Kubo, Y., Sriyam, S., Nakagawa, R. and Kimura, K., A Survey of Phage Contamination in Natto-producing Factories and Development of Phage-resistant *Bacillus subtilis* (natto) Strains. *Food Sci. and Tech. Res.*, **24**, 485-492(2018)
- 2) 久保雄司, 中川力夫, 納豆菌ファージに感染耐性を有する納豆菌及びチロシン結晶の析出低減化納豆菌に関する研究, 茨城県工業技術センター平成25年度研究報告, **42**, 21-24(2014)