

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 2 報)

吉浦 貴紀* 久保 雄司** 武田 文宣*

1. はじめに

本県（茨城県）は「水戸納豆」に代表される様に、納豆の産地として全国的にも知られており、総務省が実施している家計調査報告においても県庁所在地である水戸市の納豆購入金額は毎年上位に名を連ねている。

納豆メーカー数も全国で最も多く¹⁾、消費だけでなく製造も盛んな本県であるが、メーカーの製造現場においては以前より課題とされてきた問題がいくつかある。その中の一つが製造工程において納豆菌に感染し、死滅させ、発酵不良や糸引き不良を引き起こす「納豆菌ファージ」に関する問題である。

ファージによる人間への健康被害等は報告されていないが、納豆菌にとってファージは天敵とも言える存在であり、感染してしまった納豆菌はファージが産出するポリガンマグルタミン酸(γ-PGA)を分解する酵素の作用を受け、納豆の最大の特徴とも言える糸がほとんど消失してしまう²⁾。そのため納豆の風味や食感といった本来の品質を損なうこととなってしまう、メーカーにとっては非常に重大な問題となっている。

現状においてファージへの有効な対策は「製造現場の清掃」以外に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。

当センターではこのような問題に対する一つの解決策として、過去にファージに対して感染耐性を示す納豆菌株の育種に取り組み、成功している^{2,3)}。この菌株を生産現場で実際に使用してもらうためには、毒性試験などの安全性に関する試験等を実施することが望ましいが、これまでそのような試験が実施できていなかった。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ので報告する。

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)^{2,3)}の実用化に向けて、安全性の評価と遺伝子解析を実施することとした。本報告では、安全性の評価試験の結果について記載する。

試験項目は、国が作成した食品添加物の健康影響評価に関する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った。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安全性の確認を行うことにした。試験は 2 ケ年の

実施計画として、1 年目の昨年度は単回投与毒性試験、染色体異常試験及び遺伝子突然変異試験を行った⁴⁾。2 年目の本年度は最後の安全性評価試験として反復投与による毒性試験を行った。

3. 研究内容

納豆菌 *B. subtilis* Namegata-2-2²⁾をベースとして育種した *B. subtilis* Phr-4²⁾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)ボゾリサーチセンターに委託して試験を進めた。

3.1 反復投与毒性試験

3.1.1 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)
入荷時週齢	: 5 週齢
購入匹数	: 雌雄各 24 匹
検疫・馴化期間	: 8 日間
投与時週齢	: 6 週齢
供試動物数	: 雌雄各 20 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。

3.1.2 投与方法

ヒトでの摂取経路は経口であることから、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を選択し、投与期間は 4 週間とした。投与回数は反復投与試験で一般的に行われている 1 日 1 回 (7 日/週) とした。

投与用量は 10mL/kg とし、フレキシブル胃ゾンデを用いて被験液を胃内に強制経口投与した (概ね午前中)。

媒体対照群には媒体 (注射用水)、比較対照群には比較対照液 [納豆 (*B. subtilis* Namegata 2-2 株使用)] を同様に投与した。動物ごとの投与用量 (単位: 0.1mL) は直近の体重を基準に算出した。

3.1.3 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、試験においては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、高用量群を 150mg/mL、低用量群を 75mg/mL と設定して溶液を調整した。

また、投与用量の過多によって下痢などの影響が出ないように、昨年度は 40mL/kg を投与用量として設定したが、今年度は反復投与ということで投与用量は 10mL/kg に設定した。

投与量は 750 及び 1,500mg/kg の 2 用量とし、媒体対照群及び比較対照群を加え 4 群構成とした。1 群当たりの動物は雌雄各 5 匹とした。群構成を表 1 に示す。

表 1 反復投与試験の群構成

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 ^{a)}	0	0	10	雄	5
				雌	5
比較 対照群 ^{b)}	1,500	150	10	雄	5
				雌	5
低用量群	750	75	10	雄	5
				雌	5
高用量群	1,500	150	10	雄	5
				雌	5

a)：媒体（注射用水）を投与

b)：比較対照 [納豆 (*B. subtilis* Namegata 2-2 株使用)] を投与

本被験物質の投与可能最大量である 1,500mg/kg（調製可能最高濃度 150mg/mL 及びラットへの反復投与可能な最大用量 10mL/kg）を高用量群に設定し、低用量群は高用量群の中間量となる 750mg/kg とした。また、比較対照群の投与量は高用量群の投与量と同じ 1,500mg/kg を設定した。

被験液は濃度ごとに必要量の被験物質を秤取し、媒体を徐々に加えながらスパーテル等を用いてなじませ、所定濃度にメスアップした。各被験液は投与用に 1 日必要分ずつ褐色ガラス瓶に分注した。調製頻度は最大 7 日分を一括して調製し、調製後 10 日以内に使用した。保存は冷凍（-25℃以下）として、解凍後 4 時間以内に投与に用いた。また、投与 1 日及び投与 4 週に用いる各濃度の被験液、比較対照液の一部はセンターで濃度分析を行って計画通りの濃度が守られているかを確認した。

3.1.4 検査及び方法

試験群の全動物について検査を実施した。試験日の起算に関しては以下の通りとした。

投与 1 日 (Day 1 of dosing)：投与開始日

投与 1 週 (Week 1 of dosing)：投与 1 日～投与 7 日

3.1.5 一般状態の観察

全動物について、生死及び体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物の異常などの一般状態を観察した。

観察は、投与期間中は 1 日 3 回、投与前、投与直後

及び投与 1～3 時間後の間（ただし、土曜日及び休日は投与前と投与直後の 2 回）行った。また計画剖検日にも観察を行った。

3.1.6 体重測定

全動物について、投与期間中は投与 1 日及び 7 日、以降は 7 日間隔で週 1 回の頻度で投与前に測定した。

計画剖検日には相対器官重量算出のため、前日から約 16 時間絶食させた後の体重を測定した。

3.1.7 摂餌量測定

ケージ毎に 1 日当たりの摂餌量を投与期間中は投与 1 日及び 7 日、以降は 7 日間隔で週 1 回、給餌量と残餌量の差から算出した。測定は投与前に行った。なお、投与 1 日は前日からの 1 日量を、その他の時点は 6 又は 7 日間の累積量から 1 匹 1 日量（ケージごと）を求めた。

3.1.8 眼科学検査

全動物について投与 4 週（投与 24 日）に検査した。両眼にミドリン P 点眼液（参天製薬㈱）を点眼して散瞳させたのち、双眼倒像鏡（オメガ 200、HEINE Optotechnik GmbH & Co. KG）を用いて前眼部（角膜、眼房、虹彩）、中間透光体（水晶体、硝子体）及び眼底などを観察した。

3.1.9 臨床検査

3.1.9.1 尿検査

全動物について投与 4 週（投与 23 日）に検査した。検査当日の投与後に、採尿器をセットしたケージに動物を個別に収容し、絶食・自由摂水下で 4 時間尿を、次いで自由摂食・自由摂水下でその後の 20 時間の蓄尿を採取し種々の項目を検査した。なお、給水には給水瓶を用いた。

3.1.9.2 血液学検査

計画剖検時に、採血針を用いて血液ならびに血漿を採血した。採血は全ての計画剖検動物から行った。得られた血液については表 2 に記載した項目を検査した。

表 2 血液学検査項目

赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度、網赤血球数、血小板数、白血球数、白血球分類

3.1.9.3 凝固系検査

得られた血漿については表 3 に記載した項目を検査した。

表 3 凝固系検査項目

プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、フィブリノゲン量

3.1.9.4 血液化学検査

得られた血漿については表 4 に記載した項目を検査した。

表 4 血液化学検査項目

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、アルカリホスファターゼ、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ、クレアチンホスホキナーゼ、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、総ビリルビン、グルコース、尿素窒素、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リン、総タンパク質、アルブミン、A/G 比

3.1.10 病理学検査

3.1.10.1 解剖

全ての計画剖検動物について、臨床検査のための採血後に腹大動脈からの放血により安楽死させ、外表及び全ての内部器官/組織を詳細に観察した。

3.1.10.2 器官重量測定

全ての動物について、表 5 に示す器官の重量（絶対重量）を測定するとともに、絶対重量と剖検時の体重から体重 100 g 当たりの相対重量を算出した。*を付した両側性の器官（精嚢を除く）については左右別々に測定し、その合計値で評価した。

表 5 器官重量検査項目

脳、下垂体、甲状腺*（上皮小体を含む）、副腎*、胸腺、脾臓、心臓、肺（気管支を含む）、唾液腺*（顎下腺+舌下腺）、肝臓、腎臓*、精巣*、前立腺、精嚢（凝固腺を含む）、卵巣*、子宮

3.1.10.3 病理組織学検査

全ての動物について、表 6 に示す全器官/組織をリン酸緩衝 10%ホルマリン液等で固定して全器官/組織をパラフィンに包埋した。このうち、媒体対照群、比較対照群及び高用量群の全ての動物について、薄切後ヘマトキシリン・エオジン染色（HE）標本を作製して鏡検した。両側性器官のうち*を付した器官については片側を鏡検したがその他は両側を鏡検した。

表 6 病理組織検査項目

脳（大脳、小脳）、延髄、脊髄（胸部）、坐骨神経*、視神経、眼球、ハーダー腺、下垂体、甲状腺、上皮小体*、副腎、胸腺、脾臓、顎下リンパ節*、腸間膜リンパ節、パイエル板（回腸）、心臓、胸大動脈、気管、肺（気管支を含む）、舌、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、顎下腺、舌下腺、肝臓、膵臓、腎臓、膀胱、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢（凝固腺を含む）、卵巣、子宮、陰、乳腺（鼠径部）*、胸骨大腿骨*、膝関節*、胸骨、骨髄、大腿骨骨髄*、大腿四頭筋*、皮膚（鼠径部）*、肉眼的異常部位、喉頭、鼻腔及び個体識別部位（耳標を装着した耳介）

3.1.11 統計解析

計量データ（体重、摂餌量、尿検査の定量的項目、

血液学検査、凝固系検査、血液化学検査及び器官重量）については統計解析を行った。なお、相対器官重量算出のためのみに行った剖検日の体重は統計解析の対象としなかった。解析には SAS Release 9.1.3（SAS Institute Inc.）を使用した。まず Bartlett 検定により分散の均一性を検定した（有意水準：0.01）。分散が均一であった場合は Dunnett 法により媒体対照群と各被験物質投与群あるいは比較対照群と各被験物質投与群の間で平均値の差の検定を行った（有意水準：0.05 及び 0.01、両側）。分散が均一でなかった場合は Steel 検定により媒体対照群と各被験物質投与群あるいは比較対照群と各被験物質投与群の間で平均順位の差の検定を行った（有意水準：0.05 及び 0.01、両側）。

4. 研究結果と考察

4.1 反復投与毒性試験

4.1.1 投与液の調製

比較対照液、および各被験液の表示値に対する割合は 96.5%～108.5%（許容範囲：100%±20%）、均一性（CV）は 1.5%以下（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。（データ非掲載）

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が、成績評価に悪影響を及ぼす可能性のある瞳孔膜遺残、水晶体血管膜遺残、網膜ひだ又は眼底反射性亢進を示した雄 2 例と雌 2 例は群構成から除外した。

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。動物の体重は雄で 167g～195g（平均 180g）、雌で 123g～149g（平均 139g）であり、各動物の体重は平均値±20%以内であった。（データ非掲載）

4.1.3 投与結果

4.1.3.1 死亡状況及び一般状態

投与期間を通じて死亡動物はみられず、いずれの動物にも一般状態の異常はみられなかった。

4.1.3.2 体重

雌雄ともに納豆（*B. subtilis* Phr-4株使用）投与による体重への影響はみられなかった。

4.1.3.3 摂餌量

雌雄ともに納豆（*B. subtilis* Phr-4株使用）投与による摂餌量への影響はみられなかった。

4.1.3.4 眼科学検査

雌雄ともに納豆（*B. subtilis* Phr-4株使用）投与による所見はみられなかった。

なお、一部でこの種の系統のラットに自然発生的な症状がみられたが、用量の増加に伴う出現頻度の偏り

もみられないことから、納豆 (*B. subtilis* Phr-4株使用) とは関連しないものと判断した。

4.1.4 臨床検査

4.1.4.1 尿検査

雌雄ともに納豆 (*B. subtilis* Phr-4株使用) 投与による影響はみられなかった。(データ非掲載)

4.1.4.2 血液学, 凝固系, 血液化学検査

雌雄ともに納豆 (*B. subtilis* Phr-4株使用) 投与による影響はみられなかった。(データ非掲載)

なお、一部の項目については媒体対照群あるいは比較対象群と比べて統計学的に有意な変化がみられたが、これらの群における個体別値は背景値に収まることから、生理的変動であり、納豆 (*B. subtilis* Phr-4株使用) 投与による変化ではないと判断した。

4.1.5 病理学検査

4.1.5.1 剖検所見

雌雄ともに納豆 (*B. subtilis* Phr-4株使用) 投与による所見はみられなかった。(データ非掲載)

4.1.5.2 器官重量測定

雌雄ともに納豆 (*B. subtilis* Phr-4株使用) 投与による影響はみられなかった。(データ非掲載)

なお、比較対照群と比べて統計学的に有意な変化が雄の1,500mg/kg投与群の肺(相対重量)にみられた。しかし、この群における個体別値は背景値に収まることから、生理的変動であり、納豆 (*B. subtilis* Phr-4株使用) 投与による変化ではないと判断した。また、比較対照群と比べて統計学的に有意な変化が雄の750mg/kg投与群の脳及び精巣(相対重量)にみられたが、用量との関連性がないことから被験物質投与との関連性はないと判断した。

4.1.5.3 病理組織学検査

雌雄ともに納豆 (*B. subtilis* Phr-4株使用) 投与による所見はみられなかった。(データ非掲載)

なお、一部でこの種の系統のラットに自然発生的な症状がみられたが、用量の増加に伴う出現頻度の偏りがみられないことから、納豆 (*B. subtilis* Phr-4株使用) とは関連しないものと判断した。

5. 考察及び結論

投与期間を通じて死亡はみられず、いずれの検査でも納豆 (*B. subtilis* Phr-4株使用) に起因すると考えられる変化はみられなかった。

以上のことから、本試験における納豆 (*B. subtilis* Phr-4株使用) の無毒性量 (NOAEL) は、雌雄ともに今回の試験で設定できた最大投与量である1,500mg/kgと結論した。

6. まとめ

2年間に渡って納豆 (*B. subtilis* Phr-4株使用) の安全性評価を実施してきたが、昨年度実施した単回投与毒性試験と染色体異常試験及び遺伝子突然変異試験、また今年度実施した反復投与毒性試験によって安全性

に関する一定のデータを得ることができた。

ラットにおける結果を単純に人に置き換えることは難しいが、体重60kgの人を想定すると、単回投与試験の結果から、少なくとも一度に360gまでの納豆 (*B. subtilis* Phr-4株使用) 摂取では健康上の不都合は起こらないと考えられる。納豆の360gは約7~8パックにも相当する膨大な量である。

また、反復投与試験の結果から、一日に約2パックに相当する90gの納豆 (*B. subtilis* Phr-4株使用) を4週間毎日摂取したとしても健康上の不都合は起こらないと考えられる。これらの結果から、通常の摂取レベルを想定すると何ら問題となることはない結論づけることができるであろう。

7. 今後の予定

今後は、ラットにおける安全性試験の結果も紹介しながら納豆メーカーへ納豆菌株 (*B. subtilis* Phr-4) の周知を進めていく予定である。

納豆菌株 (*B. subtilis* Phr-4) は製造現場におけるファージ汚染という有事の際の緊急避難措置的な使用を想定している面があるので、恒常的な使用を推奨しているわけではないが、納豆が重要な特産品である本県の公的支援機関において、安全かつ安心して使用できる、このようなファージ耐性納豆菌を保有することは非常に意義のあることと思われる。

8. 参考文献

1) 全国納豆協同組合連合会HP 納豆連名簿

<http://www.natto.or.jp/about/member/index.html>

2) 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)

3) 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)

4) 久保 雄司, 武田 文宣, 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, 茨城県産業技術イノベーションセンター研究報告, **48**, 25-28 (2020)