

免疫機能を高める納豆菌の高度利用技術の開発に関する試験研究事業（第2報）

飛田 啓輔* 澤畠 真名美* 野口 友嗣* 行武 栄太郎**

1. はじめに

近年、ウイルス感染症は世界的に拡大と収束を繰り返し、依然として公衆衛生上の重要課題となっている。特に乳児、高齢者、基礎疾患を有する患者では重症化のリスクが高く、社会全体での継続的な対策が求められている。2019年に報告された新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は、世界的なパンデミックを引き起こし、世界保健機関（以下、WHO）が「国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態」を宣言してから終息宣言までに、3年以上を要した。2025年においても、WHOは複数の監視対象変異株の存在を報告しており¹⁾、引き続き注意深い監視が必要とされている。こうした状況を踏まえると、ウイルス感染症の予防・改善に資する技術開発は、今後も重要な政策課題である。

当センターでは、文部科学省特別電源所在県科学技術振興事業「機能性食品開発に資する発酵食品由来微生物に関する調査（令和3～4年度）」において、抗ウイルス作用を細胞レベルで容易に調査できる“ウイルス感染評価モデル”を開発した。このモデルによって、当センターが保有する納豆菌ストックからXF36株が細胞レベルで抗ウイルス因子を誘導することを確認した²⁾³⁾（図1）。

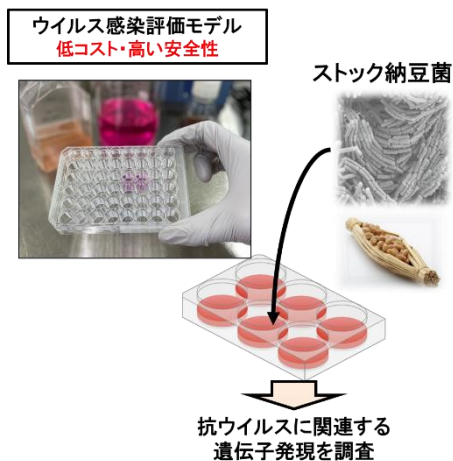


図1 抗ウイルス因子の発現に及ぼす納豆菌の調査

さらに、令和6年度から10年度までの5年間、文部科学省特別電源所在県科学技術振興事業「免疫機能を高める納豆菌の高度利用技術の開発に関する試験研究事業」の一環として、免疫賦活作用を目的としたヘルスケア製品に活用できる納豆菌製剤の開発に取り組んでいる。本県が有する地域資源である納豆菌を活用した研究開発は、感染症予防に資する新たな機能性食品の創出につながる可能性があり、今後も産学官が連携して研究と産業化の推進を図り、健康づくりと地域産業の発展に寄与することが期待される。

納豆菌を含む機能性成分の安全性試験は、健康志向

の高まりとともに広がる機能性食品市場において、安心して摂取できる製品づくりを支える大切な取り組みである。近年は、機能性表示食品の需要の高まりとともに、従来の知見だけでは安全性を十分に判断できない場面も多い。そのため、急性毒性や長期的な摂取による毒性、他成分との相互作用などを丁寧に確認する安全性試験が重要である。

2. 目的

当センターが保有する納豆菌XF36が試験管レベルで抗ウイルス効果を高めることを発見した。感染症の予防を目的として当該納豆菌を利用するためには、納豆菌XF36の機能性や安全性に関する評価が必要である。

そこで、納豆菌XF36における安全性の確認を目的として、細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames試験）、マウスへの単回経口投与毒性試験および4週間の反復経口投与試験を実施した。

3. 研究内容

3.1 復帰突然変異試験（Ames試験）

復帰突然変異試験（以下、Ames試験）とは、化学物質が遺伝子に変異を引き起こす性質（変異原性）を有するかどうかを、細菌を用いて評価する方法であり、化学物質の安全性評価において国際的に広く用いられている。Ames試験では、ヒスチジンを合成できないよう遺伝子改変されたサルモネラ菌（*Salmonella typhimurium*）などを使用する。これらの細菌は、通常はヒスチジンが存在しない環境では増殖できないが、DNAに変異が生じると、ヒスチジン非存在下でも増殖可能な「復帰変異株」としてコロニーを形成する。この性質を利用し、試験物質を細菌に暴露した際に生じる復帰変異株の数を測定することで、変異原性の有無を判定する。

また、化学物質の中には、体内で代謝されることで初めて変異原性を示すものがある。このため、Ames試験では、ラット肝臓抽出物（S9 mix）を加えた条件と加えない条件の両方で試験を行い、代謝前後の変異原性を評価することが一般的である。このように、Ames試験は、短期間で実施でき、感度が高く、国際的なガイドライン（OECD Test Guideline 471）に基づく標準化された方法であることから、医薬品、食品添加物、農薬、化学物質など幅広い分野で初期の安全性のスクリーニングとして活用されている。

*フード・ケミカルグループ **研究推進グループ

3.1.1 試験方法

細菌を用いたプレインキュベーション法を採用した Ames 試験により、納豆菌 XF36 の遺伝子突然変異誘発能を検討した。また、本試験は非 GLP 試験ではあるが、GLP 試験基準を参考に実施した。参考としたガイドラインは下記のとおりである。

- ・「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンスについて」（薬食審査発 0920 第2号：平成24年9月20日付厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知）
- ・「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について」（衛化第29号：平成8年3月22日付厚生省生活衛生局長通知）

Ames 試験の試験方法を図2に示す。

納豆菌 XF36 の遺伝子突然変異誘発能の有無を明らかにするため、ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurim* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および大腸菌 *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用いて、代謝活性化する場合および代謝活性化しない場合の条件下で、プレインキュベーション法により実施した。

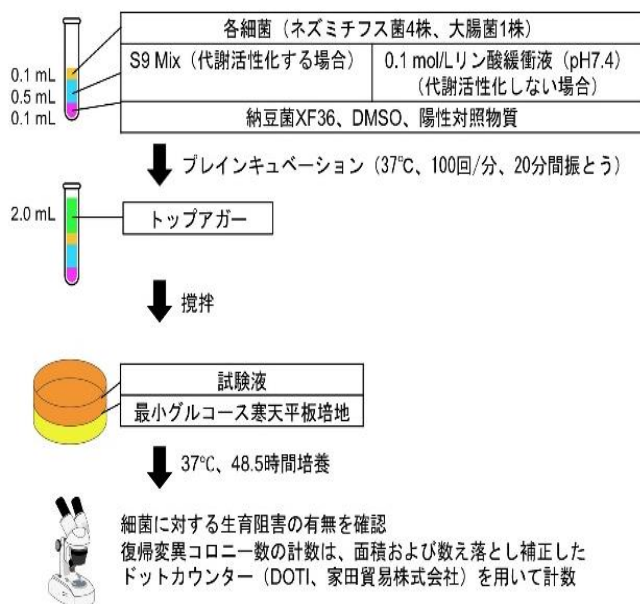


図2 Ames 試験の試験方法

Ames 試験を実施する前に、試験用量を設定するための用量設定試験を実施した。通常、用量設定試験において細菌の生育阻害が認められた濃度を、Ames 試験における最高用量に設定する。しかし、納豆菌 XF36 では、復帰変異コロニー数の増加、生育阻害が認められないため、5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ を最高用量とした。

代謝活性化の有無にかかわらず、すべての細菌について、納豆菌 XF36 が 5000、2500、1250、625、313 $\mu\text{g}/\text{plate}$ となるよう Ames 試験を実施した。試験の陰性対照物質には、DMSO を用いた。陽性対照物質に用いた変異原物質は下記のとおりである（末尾カッコ内は略称）。なお、陽性対照物質は、代謝活性化する場合には 20～100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に、代謝活性化しない場合には、0.1～10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製した。

- ・2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2furyl)acrylamide (AF-2)

- ・Sodium azide (SAZ)
- ・2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)aminopropylamino]acridine-2HCl (ICR-191)
- ・2-Aminoanthracene (2AA)
- ・Benzo[α]pyrene (B[α]P)

図3は微生物組成解析システムにおける高速液体クロマトグラフを用いた納豆菌の培養液におけるアミノ酸組成の解析例である。アミノ酸であるヒスチジンやトリプトファンを多量に含む被験物質は、Ames 試験において、擬陽性の結果を招くことがある。そのため、本試験では高速液体クロマトグラフを用いて、試料に含まれるヒスチジンおよびトリプトファンの分析を事前に実施した。

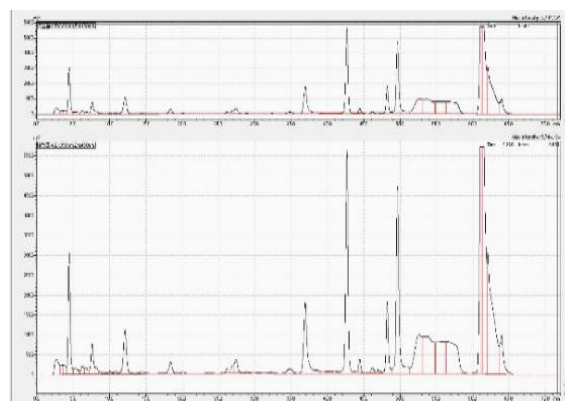


図3 納豆菌の培養液におけるアミノ酸組成の解析例

3.1.2 試験結果

納豆菌 XF36 試料に含まれるヒスチジンおよびトリプトファンは、それぞれ 2.0% (w/w)、0.86% (w/w) であり、試験に影響しない含有量であった。したがって、納豆菌試料を Ames 試験に供した場合においても、擬陽性になる可能性は低いと判断した。

細菌に対する生育阻害は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても認められない。また、用量設定試験および Ames 試験ともに代謝活性化の有無にかかわらず、試験を実施した全ての菌株においても陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められない。

以上の結果より、本試験条件下において納豆菌 XF36 は細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有しない（陰性）と判断された。

3.2 単回経口投与毒性試験

単回経口投与毒性試験は、化学物質が経口摂取された場合に、どの程度の急性毒性を示すかを評価する最も基本的な毒性試験の一つであり、化学物質の分類・表示、リスクアセスメント、規制対応に広く利用されている。本試験の目的は、被験物質をマウスに単回経口投与した際に生じる急性毒性の程度を把握し、ヒトへの健康影響評価や後続の毒性試験における用量設定に必要な基礎情報を得ることである。

試験の原理は、被験物質をマウスに一度だけ経口投与し、その後一定期間にわたり一般状態、行動、体重、

死亡の有無などを観察することで、急性毒性の発現状況を把握する。観察期間終了後には剖検を行い、主要臓器の肉眼的異常を確認することで、毒性の標的臓器や影響の特徴を推定することが可能となる。

本試験は、国際的に広く採用されている OECD テストガイドライン (TG 420、423、425 など) に基づき実施されることが一般的であり、動物数の削減や倫理的配慮を踏まえた試験設計が特徴である。

3.2.1 試験方法

Slc:ICR (ICR 系) の雄マウスは、日本エスエルシー株式会社より購入した。動物入手日から投与前日まで 6 日間を馴化期間とし、一般状態を 1 日 1 回観察した。コンピュータのプログラムを用いて、群分け日の体重をもとに、3 群、各 5 匹になるようにランダムに割り付けた。割付後の体重については、各群間に有意な差がないことを確認した。

雄のマウスに対して、体重 1 kg あたり 1000 または 2000 mg の納豆菌 XF36 試料を各マウスに単回経口投与し、その毒性を検討した。投与量の 2000 mg/kg は、OECD TG420 急性経口毒性試験 (固定用量法) において、投与用量の上限として例示されている用量である。非投与群には媒体である日本薬局方注射用水を同様の方法で投与し、観察期間は、投与後 14 日間、観察項目は表 1 に示すとおりである。

なお、単回経口投与毒性試験は「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(環境省告示)、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学術会議)、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」(厚生労働省通知)、「農林水産省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」(農林水産省通知)、および試験施設の動物実験指針を遵守し、試験施設の動物実験審査委員会による審査を受けた試験計画書に従って実施された。

表 1 観察項目とその頻度

観察項目	観察・測定頻度
一般状態	毎日
体重	投与 1、2、3、7、14 日目
1 週間あたりの摂餌量	投与 7、14 日後

3.2.2 試験結果

図 4 に各群における観察期間中の平均体重の推移を示す。平均体重はいずれの群間に有意な差は認められなかった。また、観察期間を通じて、全ての群で死亡例は認められなかった。さらに、一般状態、摂餌量、および剖検において、被験物質投与の影響は認められない。以上のことから、納豆菌 XF36 の本試験における無毒性量は雌雄ともに 2000 mg/kg 以上と判断された。

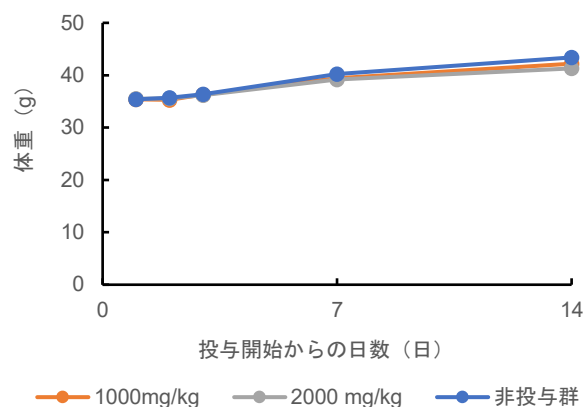


図 4 各群における観察期間中の平均体重の推移

3.3.4 週間反復経口投与試験

4 週間反復経口投与試験の目的は、被験物質を 4 週間にわたり連日経口投与した際に生じる毒性影響を明らかにし、標的臓器、毒性の種類、用量反応関係を把握することである。短期的な反復曝露により生じる生理学的・病理学的変化を評価することで、化学物質の安全性評価や許容暴露量設定に必要な基礎情報を提供する試験である。

本試験の原理は、被験物質を一定の用量で 4 週間連続して動物に投与し、その期間中に生じる一般状態の変化、体重推移、摂餌量、血液検査値の変動などを観察・測定することで、反復曝露による影響を体系的に評価する点にある。試験終了後には臓器重量測定や病理組織学的検査を行い、毒性の発現部位や影響の程度を詳細に把握することが可能となる。

4 週間反復経口投与試験は、OECD テストガイドライン 407 に基づき実施される、国際的に標準化された試験である。複数の用量群を設定することで、用量反応関係を明確にし、無毒性量 (NOEL) の推定に寄与する。また、血液検査、器官重量、病理学的評価を組み合わせることで、毒性のメカニズムや標的臓器の特定に役立つ包括的な情報が得られる。

3.3.1 試験方法

BALB/cCrSlc (BALB/c 系) の雄マウスは、日本エスエルシー株式会社より購入した。動物入手日から投与前日まで 6 日間を馴化期間とし、一般状態を 1 日 1 回観察した。コンピュータのプログラムを用いて、群分け日の体重をもとに 2 群、各 12 匹になるようにランダムに割り付けた。割付後の体重については、各群間に有意な差がないことを確認した。納豆菌 XF36 試料を、1 日あたり体重 1kg に対して 1mg を、マウスに 4 週間連日経口投与し、その毒性を評価した。非投与群には、媒体である日本薬局方注射用水を同様の方法で投与することで比較した。

投与期間中の観察項目とその頻度は、表 2 に示すとおりである。

表2 観察項目とその頻度

観察項目	観察・測定頻度
一般状態	毎日
体重	投与前、1週間後、2週間後、 3週間後、4週間後
1週間あたりの 摂餌量	1週間後、2週間後、3週間後、 4週間後

投与4週間後に、納豆菌 XF36 投与群および非投与群の各個体から採血し、血液検査を実施した。検査項目と測定方法は表3に示すとおりである。

表3 検査項目と測定方法

項目	略語	測定方法
全血球計算		
赤血球数	RBC	シーフロー-DC検出法
ヘモグロビン濃度	HGB	SLS-ヘモグロビン法
ヘマトクリット値	HCT	赤血球パルス波高値検出法
平均赤血球容積	MCV	HCT/RBC($\times 10^4/\mu\text{L}$) $\times 1000$
平均赤血球色素量	MCH	HGB/RBC($\times 10^4/\mu\text{L}$) $\times 1000$
平均赤血球色素濃度	MCHC	HGB/HCT $\times 100$
網赤血球 百分率	RET %	フローサイトメトリー法
血小板数	PLT	フローサイトメトリー法
白血球数	WBC	フローサイトメトリー法
白血球分類		
好中球	Neut	フローサイトメトリー法
リンパ球	Lymph	フローサイトメトリー法
単球	Mono	フローサイトメトリー法
好酸球	Eos	フローサイトメトリー法
好塩基球	Baso	フローサイトメトリー法

なお、4週間反復経口投与試験は「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（環境省告示）、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」（日本学術会議）、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」（厚生労働省通知）、「農林水産省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」（農林水産省通知）、および試験施設の動物実験指針を遵守し、試験施設の動物実験審査委員会による審査を受けた試験計画書に従って実施された。

3.3.2 試験結果

各群における観察期間中の平均体重の推移を図5に示す。両群間において平均体重に有意な差は認められない。

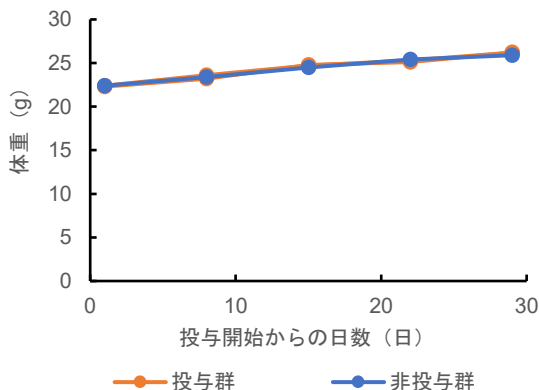


図5 各群における観察期間中の平均体重の推移

表4 血液検査の結果

項目	投与群	非投与群
RBC($10^6/\mu\text{L}$)	10.28	10.29
HGB(g/dL)	15.7	15.4
HCT(%)	45.0	44.3
MCV(fL)	43.8	43.1
MCH(pg)	15.3	15.0
MCHC(g/dL)	34.9	34.7
RET%	3.39	3.40
PLT($10^3/\mu\text{L}$)	1310	1256
WBC($10^3/\mu\text{L}$)	6.59	7.04
Neut(%)	15.3	16.2
Lymph(%)	81.2	80.3
Mono(%)	1.3	1.5
Eos(%)	2.1	1.9
Baso(%)	0.1	0.1

観察期間を通じて、全てのマウスで死亡例は認められず、一般状態、摂餌量、血液検査においては、いずれにも納豆菌 XF36 の投与による影響は認められない(表4)。

以上のことから、本試験条件下において、納豆菌 XF36 の反復投与による毒性は認められない。

4. まとめと今後の課題

納豆菌 XF36 について実施した Ames 試験、単回経口投与毒性試験、4週間反復経口投与試験では、いずれの試験においても明らかな毒性は認められない。これらの結果から、納豆菌 XF36 株は遺伝毒性や急性・亜急性毒性の面で、安全性に大きな問題はないと考えられる。今回得られた結果より、納豆菌 XF36 の安全性を確認できたことから、健康食品やサプリメント、飼料をはじめとする製品へ安心して使用できると考えられる。

今後は、納豆菌 XF36 が免疫機能に及ぼす影響について調査を進めていく。先述のとおり、納豆菌 XF36 株はウイルス感染細胞モデルにおいて、炎症を抑制することが確認されていることから、免疫担当細胞に対してどのようなアプローチで炎症を抑制しているかメカニズムを解明するとともに、納豆菌 XF36 株の有効成分について分析を進める予定である。

5. 参考文献等

- World Health Organization. (2025). WHO TAG-VE risk evaluation for SARS-CoV-2 variant under monitoring: XFG (Initial risk evaluation of XFG, 25 June 2025).
- Fujii K, Kubo Y, Noguchi T, Tobita K. Effects of *Bacillus subtilis* Natto Strain on Antiviral Responses in Resiquimod-Stimulated Human M1-Phenotype Macrophages. *Foods*. 12(2), 313(2023).
- 藤井恵輔、久保雄司、野口友嗣、飛田啓輔. CXCL10 発現を指標としたウイルス感染モデルの開発と納豆菌体による抗ウイルス作用. SAT テクノロジーショーケース, 2023.