

研究室紹介

「農場から腸内まで」の細菌学

大澤 朗

神戸大学大学院農学研究科
資源生命科学専攻応用動物学講座動物多様性利用科学「食領域」

Bacteriology “from Farm to Gut”

Ro OSAWA

Applied Bioscience of Faunal Diversity, Department of Bioresource Science,
Graduate School of Agricultural Science, Kobe University

はじめに

我が国は食の供給を海外に強く依存しており、それゆえに私たちの食卓に届けられる食品・農畜水産物の安全性・安定供給について不安が増大している。食の安全性に対する不安要因としては食品・農畜水産物が食中毒起因細菌によって汚染されること、また食品・農畜水産物の規格が偽装表示されて汚染源・経路がなかなか特定できないこと等が挙げられる。他方、我が国では栄養以上の健康効果（肥満・ガン・老化・感染予防等）を与えてくれる食品成分の機能についての関心が増大し、今や巷では沢山の健康食品・サプリメントが「氾濫」している。しかしながら、これらの中には有益であると唱われながらも実際のヒトの腸内環境で無効となるばかりか、有害となる成分を含むことが近年明らかにされるようになり、このことが「食」に対する新たな不安の火種となっている。資源生命科学専攻応用動物学講座動物多様性利用科学「食領域」（通称「黒髭塾」：<http://www.research.kobe-u.ac.jp/ans-koala/main>）は「細菌は面白い！」この気持ち一筋にもう10年以上前から神戸大学で研究を続けている教室である。研究対象の細菌には大腸菌 O157 のような人の健康に有害なものからヨーグルトや漬物といった発酵食品を作る乳酸菌のような有益なものまで、またその宿主はアカネズミから人間までとかなり広範である。本教室では食の安全・機能に関する上記社会背景に鑑み、「農場から食卓、食卓から腸内」までを網羅する研究に取り組んできた。本稿では本教室に「入塾」してくれた「塾生達」の研究業績（60余報）か

ら本教室研究分野を特徴づけるよう幾つかを選択し、その概要を記載することにする。

1. 「農場から食卓まで」の細菌学

細菌性食中毒の発生を未然に、あるいは最小限に食い止めるもっとも有効な方策は Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP: 危害分析重要管理点) システムであると思われる。細菌性食中毒の対策として筆者なりに要約すると下記のごとくとなる。

- ①まず農場から食卓までの Food Chain の経路を把握し、その経路上の途中で原料の農畜水産物あるいは食品等がどのような取扱い（加熱処理、冷凍・冷蔵保存、粉碎・切断等々）をされているのかを把握する。
- ②上記取扱い項目の中から食中毒予防の3原則に照らすと不十分な殺菌処理、細菌付着や増殖の危険性のある項目を洗い出す。
- ③洗い出された高リスク項目について最も有効な管理基準・監視方法をもって管理、監視し、基準値を超えた場合の対処法なども事前に決定しておく。

3つのステップで特に③において食品等の食品中の細菌の有無、あるいは菌数などを正確かつ迅速に結果が得られる細菌学検査法でモニタリングすることが必要となってくる。多くの検査室ではこのモニタリングをいわゆる「公定法」を採用することで行っている。ところが、この「公定法」の中にはその精度や迅速性に問題ありとされるものも含まれる。本教室ではそれらの問題を実験的に明らかにした上でそれを解消する新規の検査法を開発している。

1-1. O157 汚染検査法

各種食品検体からの O157 の検出の基本的流れは、他の食中毒起因菌を対象とした検査と同様に、ステップ①検体を適当な液体培地に接種して菌を相当数増やし [増菌]、ステップ②それを適当なる分離用の寒天培地に接種・培養し、ステップ③培養後、培地上に形成された疑いのある集落を選定し、ステップ④選定された菌株の生理・生化学性状、血清型、毒素産生の有無等を確認する、といった4つのステップで構成される。現在、日本の大半の検査室では、厚生労働省が推奨する検査指針に従い、その第一ステップ、すなわち「増菌培養」のステップで選択剤（抗生物質、胆汁酸等）を添加した増菌培地を用いて培養している。しかしながら、もう20年以上も前から多くの研究者らによって凍結、加熱あるいは貧栄養等のストレスによって細菌の細胞壁が損傷し、抗生物質、重金属等に対する感受性が高まり増殖しないことが報告されている（図1）。当然のことながら「損傷状態 O157 菌細胞が付着・混入した食品検体から厚生労働省が推奨する方法で O157 は検出できるのか？」という疑問が生じてくる。この答えを得るべく、我々は過去に一つの実験を行ってみた。人の糞便、牛の糞便、食品から分離された O157 株をフィルター滅菌した河川水に接種し、室温にて6週間放置した。そして放置後この水の一部を採りだして、上記した選択性の強い増菌培養法で培養した。比較のため一晩培養した同じ O157 株を上記培養法にて培養した。その結果、一晩培養した細胞は培養 24 時間で 10^8 CFU/ml まで増殖したが、河川水の長期間放置で「飢餓状態」となった O157 は選択増菌培養法ではほとんど増殖しないことが明らかとなった。この所見を踏まえ、我々は飢餓状態にある O157 でも増殖

するだけでなく、O157 と酷似したコロニーを分離平板上に形成する細菌の夾雑を軽減する非選択増菌培養法を開発した（図1）。この方法によって水耕栽培野菜における O157 汚染を正確かつ効率的に検知することが可能となった。

1-2. 腸炎ビブリオ汚染検査法

腸炎ビブリオは沿海岸水域、河川水が海に流れ込む水域（いわゆる汽水域）、またそれらの水域に生息する魚介類やプランクトン等に分布している。我が国における腸炎ビブリオ食中毒の原因食品は、その食文化を反映して刺し身やすし等の生食用魚介類によるものが大半を占めている。多くの患者由来株は耐熱性溶血毒（TDH）あるいは TDH 類縁毒素産生（TRH）する株である。自然界由来の腸炎ビブリオの大多数はこれらの毒素を生産しない。現在、我が国における食品中の腸炎ビブリオの検査法の基準となっている公定法は TDH や TRH を産生しない株も含めた腸炎ビブリオの菌数濃度を算定する最確数（Most Probable Number Method：MPN）法を採用している。しかしながらこの「公定法」は検査開始から結果が出るまでに4日間もかかり、その検査工程も煩雑であるため、この検査法で大量に我が国で流通する魚介類・その二次製品の安全性をタイムリー、広範、安価に確認することは非常に難しい。加えて、近年の研究では魚介類食品の腸炎ビブリオの全菌数が必ずしも TDH 産生株の数と比例しないこと、すなわち MPN 値が基準以上で食品衛生上「不適」と判定された魚介類でもまったく TDH 産生株に汚染されていない場合や、逆に腸炎ビブリオの MPN 値が基準以下で「適合」と判定された魚介類が TDH 産生株に汚染されている場合が

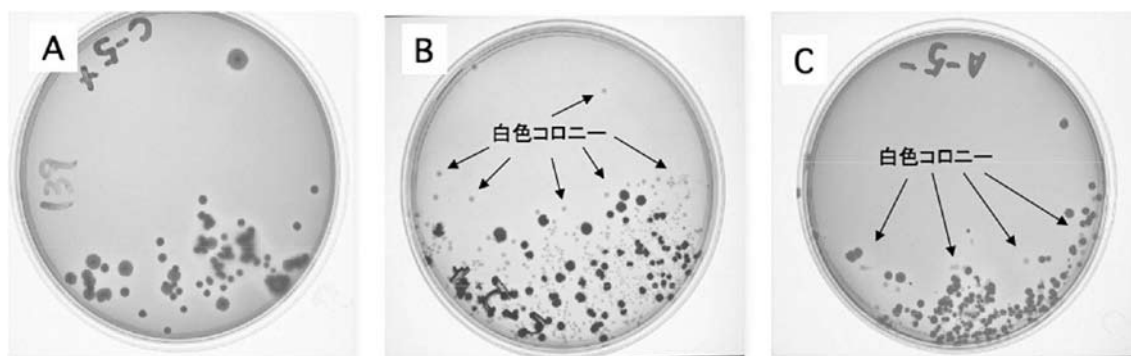


図1 異なる増菌培地での培養液を画線塗抹した分離平板培地上のコロニー形成の比較

A：選択増菌培養した培養液を塗抹した平板。O157と思われる白色のコロニーの形成が全く認められない。B：非選択増菌した培養液を塗抹した平板。O157と思われる白色のコロニーが多数形成された。C：本教室開発の増菌培地で培養した培養液を塗抹した平板。O157に類似した白色コロニー数が激減しO157の検出率が向上（Sata et al. Appl Environ Microbiol. 2003; 69: 1858-1860）。

あることが報告されている。そこで我々は運動性を保有する腸炎ビブリオの生菌のみが軟寒天でコーティングされたろ紙を通過できることを利用して新規検出法を開発した（図2）。この方法は生菌のみを選択的に培養し、最終的に TDH, TRH 遺伝子を標的とした PCR で確認するので、生菌で病原性のある腸炎ビブリオの魚介類検体汚染を、従来の公定法よりも2日も早く確認することが可能となった。本法は運動性を保有していれば、他の食中毒を起こす細菌種（例えばカンピロバクター、サルモネラ等）の食品検体からの検出においても応用可能な手法である。

2. 「食卓から腸内まで」の細菌学

培養細胞を用いた *in vitro* 系の実験に基づく学術論文、口頭発表、ポスター等の中には、よくよく考えてみるとヒトへ経口投与可能な濃度を、あるいは腸管からの吸収率を度外視した濃度で食品成分の機能性を評価している場合がある。また、実験動物の遺伝的背景やその生理、腸内内容物の腸内滞留時間から腸内細菌叢構成等までも含むパラメータはヒトのそれと相当異なるので、実験動物を使用して得られた所見がそのままヒトの腸内で再現されない場合もある。すなわち *in vitro* 実験、動物実験で評価された機能性がそのままヒトに発揮される保証はない。だからと言ってヒト介入試験をしようにも、その実施に係る安全面、倫理的配慮へのハードルが高すぎるのでなかなかできない。我々はこのジレンマを解消すべく、下記のごとく複数の *in vitro* 試験系に「小分け」することで腸内環境を模した、いわゆる「腸管モデル」システムを構築した。

2-1. 免疫系腸管モデル

腸管関連リンパ組織を模した系、すなわち上層は Caco-2 細胞を単層培養して腸管上皮様にして、下層にはマクロファージ様に分化させた細胞を培養して腸管関連リンパ組織を模したモデルである。これを用いて機能性食品素材あるいはその代謝産物等が直接あるいは腸管上皮細胞を介して免疫担当細胞にどのような免疫学的影響をもたらすのかを評価している。例えば乳酸菌が産生する菌体外多糖（Extra-poly-saccharide：EPS）の免疫賦与性が近年注目されているが、一般的に EPS は 1Mda 以上の分子量のものが多く、このような高分子体が通常の胃腸の上皮を通過するとは考え難い。すなわちこれまでの多くの *in vitro* 実験において相当な濃度の EPS をマクロファージに直接作用させてその免疫賦与性が評価されてきたが、本当にそのようなことがヒトの腸管免疫系で起こっているのか疑問である。そこで、筆者らは上記の免疫系腸管モデルを使って「ブルガリア乳酸菌」と一般呼称されている *Lactobacillus delbrueckii* の複数菌株から EPS を分離精製し、その免疫賦与性の差を検証した。その結果、特定の1株由来の EPS は Caco-1 細胞（おそらくその表層に具備されたパターン認識受容体）を介して下層のマクロファージ様細胞を刺激して NK 細胞を活性化させる Th1 型サイトカイン（細胞性免疫賦活）の産生を促す一方で、他の3株由来の EPS では上記サイトカインの産生を抑え、逆に Th2 型サイトカイン（液性免疫賦活）の産生を促す働きがあることが判明した。

細菌体や高分子難消化性の多糖類等の免疫賦与性については腸管上皮細胞の間隙から樹状突起を管腔内に延ば

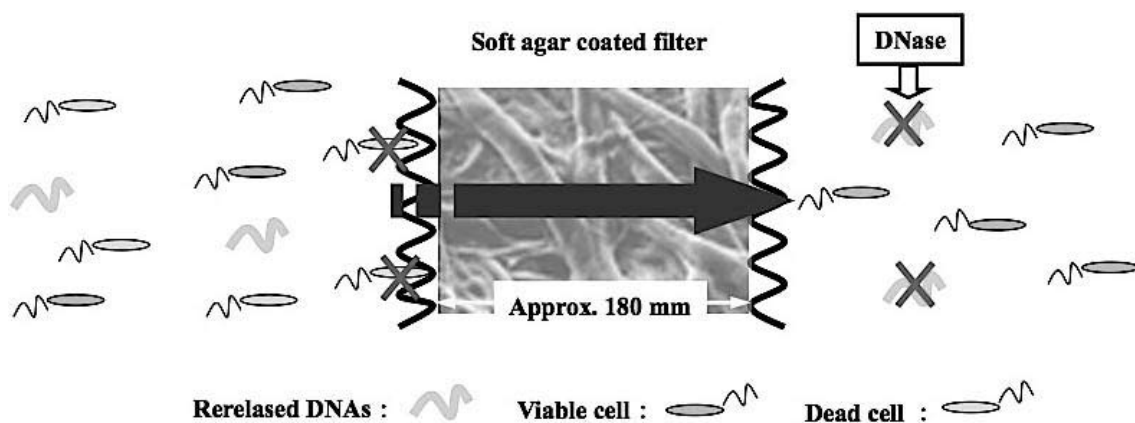


図2 軟寒天フィルター法の原理

運動性を保有する生菌は軟寒天で包埋されたろ紙の繊維間隙を通過するが、運動性を保有しない死菌は軟寒天フィルターを通過できないので、生菌のみを選択的に培養することができる。軟寒天フィルターを通過した死菌遊離 DNA は DNase 処理によって分解する（Hayashi et al. Appl Environ Microbiol. 2006; 72: 4576-4582）。

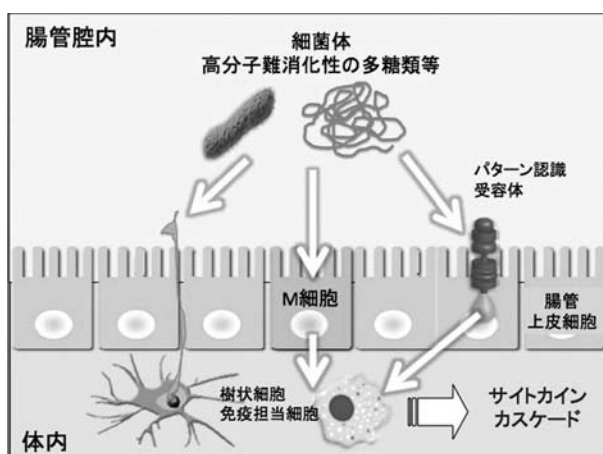


図3 細菌体・高分子難消化性の多糖類等の免疫賦与メカニズム

左から、樹状細胞が接触することで免疫賦与する場合、M細胞に取り込まれることで免疫賦与する場合、パターン認識受容体を介して免疫賦与する場合。

すとされる樹状細胞や小腸下部に点在するパイエル板に配備されたM細胞を介したメカニズムをもって専ら論じられてきた。しかしながら、小腸内壁の表面積がテニスコート1面分あることを考えると、免疫賦与性を有する成分が腸管上皮細胞と接触する頻度とM細胞や樹状細胞と接触する頻度を比べると前者が遥かに高いことは容易に想像できる(図3)。この点で免疫系腸管モデルを用いた食品成分の免疫賦与性評価は今後ますます重要視されるものと考えられる。

2-2. ヒト大腸マイクロビオータモデル

複数個々人由来の腸内細菌叢環境を再現したモデルで、その中に投与された当該機能性食品素材の経時的な代謝変換、腸内細菌叢構成、代謝産物等を解析する。具体的には個々人の糞便の細菌叢の構成を維持した凍結乾燥物や凍結培養スターターを少量培養槽に添加し、培養槽を嫌気的な大腸を模した環境にして、一定時間培養し、経時的に内容物を少量取り出して、LC/MS, HPLCによる対象物質の分解、変換等のメタボロミクス解析、qPCR、次世代シーケンサーによる細菌叢変化の検知、メタゲノム解析を行っている。国外には培養系ヒト腸管モデルとして、既にSHIME(ベルギー・ゲント大学)およびTIM(オランダ・TNO)といったシステムが提案されているが、いずれも機構的にヒト消化管を疑似しているものの細菌叢の再現には至っていない。これに対して、筆者らのモデルでは個々人の大腸内細菌叢の全菌数およびその門、属レベルでの構成、いわゆる難培養細菌も含めた菌種レベルでの多様性と産生される短鎖脂肪

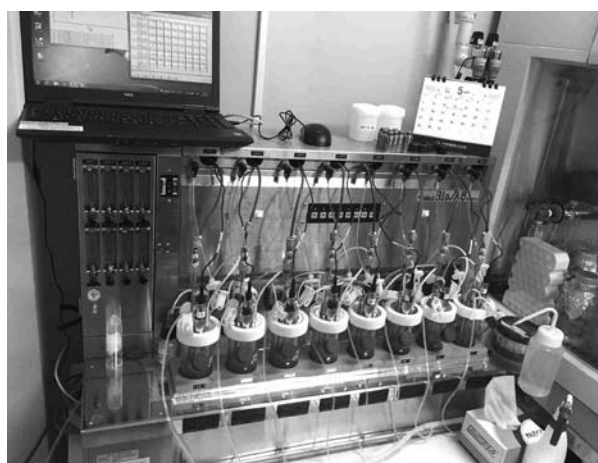


図4 培養系大腸モデル

8つの小嫌気培養槽(100 ml培養液)を装備しているので1度に多項的な試験が可能。(エイブル・バイオット社製, BJR-25NA1S-8M)

<http://www.able-biott.co.jp/product/baiyou/bio-jr8-100ml.html>

酸の構成パターン等を概ね再現している。さらに糞便培養液を複数の凍結(乾燥)アンプルとしてストックしているので何度でも同様の試験が再現できること、さらには小型かつ複数の培養槽を備えた培養槽システムで一度に多項目の試験ができることで利便性をさらに持たせている(図4)。このモデルを使って本教室では現在下記のような取り組みを行っている。

- 単体あるいは複数の機能性成分候補を添加してヒト腸内の経時的な細菌叢の構成の変化、代謝産物(主に有機酸等)および添加した成分の量・質的变化の予測
- 分子量が1万以下で経口摂取した場合は通常胃、小腸にて速やかに吸収され体内に入る機能性成分、すなわちヒト大腸内までは到達しないとされる機能性成分が大腸内に流入した場合、あるいは腸溶性カプセル等を用いて意図的に大腸に流入させた場合に起こり得る腸内細菌叢の細菌叢代謝産物(主に有機酸等)の構成および添加した成分そのものの量・質的变化の予測
- ある食品成分がある特定個人の糞便サンプル内の細菌の働きによってヒトの健康維持や疾病予防等に資する成分活性物質となることがわかった場合は、当該の作用する細菌株を特定・分離してこの菌株をプロバイオティクスとしてあるいは当該活性物質を効率よく生産する「種菌」としての利用

おわりに

添付の写真(図5)の筆者の横のスクリーンに映写さ



図5

れているのはひと昔以上も前の Windows のデスクトップピクチャーである。あまりにもきれいな風景なのでCGで創作した架空の風景かと思いきや、これはアメリカのカリフォルニア州の内陸部にあるソノマバレー（ワインの生産地で有名）というところの実際の風景だそうである。本研究室に所属したばかりの学生さんに筆者は今でもこの画像を見せてこんな話をしている。

「綺麗な丘が実際にあるんだね。そんなに標高も高くもないし、すぐに登れそうだね。さて、もしこの丘が未だかつて人類誰独りとして登ったことがない丘だったら、君はこの丘に登ってみようと思わないだろうか？誰も登ったことがないのだから、頂上から望むその風景を眺めるのは君が人類で初ということになる。そしたら『こんな風景がここから見えます』『この丘の反対側の景色はもっとすごいです』なんて、麓にいる私たちに伝えてみたいと思わないだろうか？何故ならこんな行為を『うれしい』、『楽しい』と感じるのはこの地上では人間だけなのだから。この教室でその醍醐味を味わってみようじゃないか？君がこれから取り組む研究課題はこの丘のようなものだから」

こんな話をきっかけにこの「丘」に登り、人間であることを体感した「塾生」が有り難いことに何人もいた。しかしここ4、5年のことであるが、この「丘」に登ろうとする学生さんがどんどん少なくなってきた。このことは他の大学の研究室も同じようで、就活のため半年以上も不登校だったり、実験と就活のやり繰りが難しいと

LINEで噂される教室（別称「しんどい教室」）への「ゼミ入り」を敬遠したり、中には「就職するための卒業」がしたいがために程度の差はあれデータの改ざん・捏造等をしてしまっているようなことも風の噂に聞く。当然、学生さん本人が学会発表できる演題数、学会誌に掲載できる論文数も減ってきて、ましてや博士（後期）課程への進学や海外留学する学生に至ってはほぼ皆無である。日本の大学は今、概ねこんな感じではないだろうか。就職先では本人も会社も大丈夫なのだろうか？20年後は大学で誰が論文指導しているのだろうか？特許はほとんど海外？と様々な憂いが沸々と浮かんでくるのである。

物質的資源の乏しい我が国が諸外国から一目置かれるような「Japan」としてやってこられたのは、探究心旺盛なキラリと光る宝石のような人材資源があったからである。そんなキラリと光る学生とまた出会えることを信じ、そして彼らが「先生！農場から腸内までの細菌学は本当に面白いですね！」と麓の我々に伝えてくれる、そんな最高に嬉しい日がまた来るのを筆者は心待ちにしている。

末筆ながら、今からもう30年以上も前、そもそも「丘」に登ることを当時の筆者に勧めて下さった光岡知足博士（東京大学名誉教授）に深甚なる感謝の意を表す。

PROFILE

大澤 朗（おおさわ ろう）

神戸大学大学院農学研究科資源生命科学専攻応用動物学講座動物多様性利用科学教授。1979年北海道大学獣医学部獣医学科卒業。1987年クイーズランド州立大学大学院博士課程修了（Ph.D）。1986年ローンパインコアラ保護園主任研究員。1993年徳島大学医学部助手。1995年東北大学博士（農学）の学位取得。同年神奈川県衛生研究所主任研究員。1999年神戸大学大学院自然科学研究科生命科学専攻助教授。2005年農学研究科資源生命科学専攻教授。2007年神戸大学自然科学系先端融合研究環重点研究チーム教授（兼務）。2008年神戸大学医学研究科医科学専攻教授（2015年まで兼務）。2009年神戸大学農学研究科食の安全安心科学センター長（兼務）。現在に至る

e-mail: tamie@opal.kobe-u.ac.jp

