

研究助成 研究成果報告書（HP掲載用）

研究課題名：食物がもたらす健康との関連—有用性放線菌の腸内における役割—

北里大学・医学部

武 晃

【研究要旨】

一般の食物にて存在する放線菌を調べ、腸内放線菌の由来を明らかにするため、11 種類の食物および健常者の糞便より放線菌の分離を行った結果、計 21 属 92 種 509 株の放線菌を取得した。また、食物と糞便で共通していた分離株は 5 属 7 種存在していた。その分離放線菌の 9 割が人工消化液に耐性であり、2 割弱が抗菌活性物質生産能を有していた。したがって、食物を摂取することにより、腸内へ放線菌が届き、物質生産により感染症の予防に寄与している可能性が考えられる。

【研究目的】

私たちの健康や疾患には腸内微生物叢が深く関与しており、腸内微生物叢の乱れと疾患の関連を示唆するデータが多く報告されている。その明確な疾患として、クロストリディオイデス・ディフィシル感染症（CDI）が挙げられる。CDI は、ディフィシル菌が原因で起こる再発性の高い難治性下痢症・腸炎である。我々は、健常人および CDI 患者の糞便微生物解析を行ったところ、健常人の糞便にのみ特定の放線菌が検出された。放線菌は、自然環境中（土壌、植物）で多く生息している。また、抗生物質の生産能を有する本菌は、医薬品などに応用されている。本背景により我々は、食物を介して放線菌を私達が摂取することによって腸内に放線菌が届き、物質生産をすることで人の健康に寄与していると考えた。そこで、一般の食物にて存在する放線菌を調べ、腸内放線菌の由来を明らかにすることとした。

【研究方法】

11 種類の野菜（ピーマン、ミニトマト、レンコン、白菜、長芋、大根、聖護院大根、カブ、ターサイ、カツオ菜、小松菜）および健常者の糞便を分離源とした。各野菜はすり潰し、糞便は生理食塩水に懸濁して放線菌用の寒天培地に混釈、培養後、生育したコロニーを釣菌した。分離放線菌から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子プライマーにて PCR を行い、増幅した DNA をシーケンス解析することで分離株を簡易的に同定した。分離株を各種放線菌用培地に植菌し、孢子化する培地を選定した。各放線菌の孢子をかきとり、人工胃液に懸濁して 37℃で 1 時間培養し、さらに人工腸液に懸濁して 37℃で 4 時間培養後、遠心して菌体を回収した。処理した菌体は、各分離株に適した寒天培地にて培養し生育の有無を確認した。孢子化状態の放線菌を物質生産培地に懸濁し、培養した液をエタノールにて抽出し、遠心上清ペーパーディスク法によりディフィシル菌の活性を測定した。活性が認め

られた培養液は、LC/MS にて分析し、検出された物質の特徴から化合物を推定した。

【研究結果】

ピーマンから 1 属 1 種 1 株、レンコンから 3 属 7 種 17 株、白菜から 4 属 4 種 10 株、長芋から 7 属 30 種 143 株、大根から 8 属 32 種 162 株、聖護院大根から 10 属 18 種 46 株、カブから 8 属 21 種 97 株、ターサイから 6 属 6 種 12 株、カツオ菜から 3 属 4 種 4 株、糞便から 6 属 12 種 17 株、計 21 属 92 種 509 株の放線菌を分離した。そのうち 5 種は新種の可能性が高い。なお、ミニトマトおよび小松菜からは放線菌は得られなかった。また、食物と糞便で共通していた分離株は 5 属 7 種存在していた。これら分離放線菌 68 種を放線菌用培地に接種したところ、54 種が孢子を着生した。人工消化液にて曝露した 68 種の放線菌を各最適条件寒天培地に接種したところ、63 種の放線菌が生育した。なお、人工消化液に曝露後に生育しなかった放線菌 5 種は、全て孢子を形成しなかった種であった。放線菌 68 種のディフィシル菌に対する抗菌活性試験の結果、12 種で活性が認められた。各培養液を LC/MS にて分析したところ、deferoxamine, nocardamine, methymycin, picromycin および leptofuramin C が検出された。さらに食物および糞便分離株からは、未知の活性物質が見られた。

【考察】

放線菌は土壌に多く生息している微生物であるため、根菜である長芋、大根、聖護院大根およびカブからは多くの放線菌が分離されたと考えられる。また、糞便から放線菌が 17 株しか得られなかったのは、腸内における放線菌の存在比が相対的に少ないことが考えられるため、より多くの放線菌を得るためには分離源の濃縮および強い選択分離法が必要である。糞便分離株 12 種のうち 7 種 (58%) の放線菌が食物分離株でも分離され、種の共通性が見られている。これは、食物を摂取することにより、腸内へ放線菌が届いている可能性を示唆していると考えられる。事実、これら分離株の大半が、人工消化液という pH の高い胃酸や反応性の高い分解酵素中であっても、孢子形態になることで耐えていた。さらに、これら放線菌の多くが活性物質生産能を有しており、本研究にて検出された picromycin, methymycin, および leptofuramin は、グラム陽性菌に対して活性を有する化合物であり、deferoxamine および nocardamine は鉄イオンを吸収することで活性を有する物質である。これらはデンプンとアミノ酸で構成される培地で生産されたため、食事を行うことで代謝されるのではないかと推論できる。その一方で、食物および糞便分離株から未知のディフィシル菌活性物質が検出されている。この物質を単離・構造解析することで、放線菌の腸内における役割をさらに検証することができると考える。

【結論】

放線菌が多く含まれる食物は根菜であり、新種の放線菌を含んだ豊富な多様性を有していた。それら放線菌の大半は消化液耐性であることから、根菜を摂取することで腸内に届くと考えられる。さらに、食事によりデンプンやアミノ酸を摂ることで、腸内にいる放線菌が活性物質を生産できると推察する。それらは結果的に、CDI などの感染症から予防できる可能性が考えられる。