

伊豆赤沢海洋深層水から分離した微生物が生産する 細胞賦活物質の研究

Studies of cell activators produced by a microbe isolated
from the deep-seawater in Izu-Akazawa, Japan

柴田雄次¹・齋藤美恵¹・山田勝久²・寺原 猛¹・小林武志¹・今田千秋¹

Yuji SIBATA, Mie SAITO, Katsuhisa YAMADA, Takeshi TERAHARA, Takeshi KOBAYASHI and Chiaki IMADA

Abstract

In this study, microbes producing cell activators were isolated from bag filters used for removing detritus from the deep-seawater of Izu-Akazawa, Shizuoka Prefecture, Japan, using normal human dermal fibroblasts. Consequently, 614 strains were isolated from the filters. Among them, three strains showed a cell-activating effect. The strain No. 265 had the highest effect and was selected for future studies. The strain No. 265 was analyzed for the 16S rRNA fragment sequence analysis. The strain showed the homology matched *Vibrio gallaecicus* CECT7244^T at 98.74%. However, there were some differences in the biochemical and physiological characteristics between the strain No. 265 and the type strain. The cell activators produced by the strain were extracted by an ammonium sulfate precipitation from the cultivation supernatant and isolated by molecular weight fractionation. As a result, over 3 kDa of molecular weight fractionations showed a cell-activating effect. Furthermore, in examining homology of protein between over 3 kDa fractionation and human basic fibroblast growth factor (human bFGF) as the main cell growth factor using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), it was found that this fractionation showed no antigen-antibody reaction with human bFGF. As a result, it was suggested that the strain No. 265 produced cell activators different from human bFGF.

Key Words: Deep-seawater, Cell activators, Fibroblast, *Vibrio gallaecicus*

要 旨

本研究では伊豆赤沢海洋深層水取水設備の深層水の懸濁物の除去に用いるバッグ状フィルターから正常ヒト皮膚由来線維芽細胞を用いて細胞賦活物質を生産する微生物の分離を試みた。分離された614株のうち3株に細胞賦活効果が確認された。これら3株の分離株の中で最も高い細胞賦活効果を示した株(No. 265株と命名)について、16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析により種の同定を行ったところ、*Vibrio gallaecicus* CECT7244^Tと98.74%の相同性が得られた。しかしNo. 265株はこの標準菌株と生理・生化学的性状にいくつかの点で相違がみられた。No. 265株の生産する細胞賦活物質を培養上清から、硫酸アンモニウムによる塩析と限外濾過処理で分画した。その結果、3 kDa以上の画分に活性が見られた。そこで、3 kDa以上の画分と主要な細胞増殖因子であるヒト塩基性線維芽細胞増殖因子(以後、human bFGF)とのタンパク質レベルの相同性を酵素結合免疫吸着検定法(ELISA法)で調べたところ、human bFGFと抗原抗体反応を示さないことがわかった。以上の結果から、No. 265株はhuman bFGFとは異なる細胞賦活物質を生産していることが示唆された。

キーワード: 海洋深層水, 細胞賦活効果, 線維芽細胞, *Vibrio gallaecicus*

¹ 東京海洋大学 (〒108-8477 東京都港区港南4-5-7)

² 株式会社ディーエイチシー (〒106-0477 東京都港区南麻布2-8-21)

1. 緒 言

近年、ヒトの健康と微生物との関わりについて数多くの新しい知見が得られている。例えば腸内細菌叢と癌や精神疾患 (Yoshimoto *et al.*, 2013; Hsiao *et al.*, 2013) などの疾病との関係をはじめ、今や現代病となっているメタボリックシンドロームの元凶である肥満との関係 (Kadooka *et al.*, 2010) に至るまで、腸内細菌叢が我々の健康に深く関与していることが最近の研究から明らかになりつつある。さらに、こうした細菌叢の構成には個人差があり、健康な人同士でも腸内や皮膚などに棲息する常在菌の多様性や存在比が大きく異なっていることも知られている (Human Microbiome Consortium, 2012)。以前から腸内や皮膚に常在する細菌叢についてはよく知られていたが、上述の研究報告などからこれらの細菌叢がヒトの健康に広く深く関わっていることが明らかになるに伴い、微生物とヒトの健康との関係について学問的な興味にとどまらず、医療分野でも大きな関心が寄せられつつある。古来より人間の普遍的な願望である健康長寿は、特に少子高齢化が進みつつある昨今において保健医療の面からも重要な社会問題となり、それに関わる広い分野での研究が必要となってきた。こうした背景から我々はヒトの健康に寄与する微生物の探索を進めてきた。本研究ではこのヒトの健康に寄与する微生物の探索源として海洋深層水 (以後、DSW) に着目した。DSWは今日に至るまで様々な分野への応用が試みられてきたが、そのほとんどが低温や清浄性といったDSWの物理・化学的特性に注目したものであった (大内ら, 2012; 山内ら, 2014)。ヒトの健康に関しても含有ミネラルに注目したものととどまり (山田ら, 2015)、そこに棲息する微生物がヒトの健康に及ぼす影響についてはこれまでほとんど検討されてこなかった。この理由として、DSWの清浄性が考えられるが、今日ではDSW中に既知や未知の多種多様の細菌叢が存在し (矢田ら, 2003)、表層水とは異なる細菌叢が形成されていることが明らかとなってきた (寺原ら, 2013)。これらの知見から、DSW中には他の環境では見られない微生物が棲息していることは明ら

かであり、また、そのような微生物の中にはDSWの環境に適応し、新規な生理活性物質を生産している可能性も考えられる。特に、ヒトの健康に寄与する微生物として我々が注目している細胞賦活物質を生産する微生物の報告は極めて少ないだけでなく、低分子物質しか知られておらず (Matsumoto and Seto, 1991)、数千kDaに及ぶタンパク質やペプチドのような高分子物質の報告はこれまで見られていない。そのため、高分子の細胞賦活物質は新規性が高いことが期待される。このようなことから、未探索な環境であるDSWならば高分子細胞賦活物質を生産する微生物の発見が大いに期待できるため、我々はDSWを微生物分離源として着目することにした。

細胞はヒトの体を構成する最小単位であり、これを活性化することは即ち、体全体の健康を増進することへと繋がり、最終的にはヒトのQuality of Lifeの向上にも結びつくと期待される。したがって細胞を活性化する細胞賦活物質には、健康増進への活用が期待できると考えられる。そこで本研究では、伊豆赤沢DSWより全身に普遍的に存在する正常ヒト皮膚由来線維芽細胞 (以後、NB1細胞) を用いて細胞賦活物質の探索を行うことを目的とした。その結果、NB1細胞に対する細胞賦活物質を生産する微生物が分離されたので、ここに報告する。

2. 材料と方法

2.1 細胞賦活物質生産微生物の分離

本研究では株式会社ディーエイチシーの伊豆赤沢DSW取水施設より2010年2月から2012年5月まで毎月供与されたDSW中の懸濁物除去に用いられるバック状フィルター (以後、BF) を微生物の分離源として用いた。このBFの底部を無菌的に2×2 cm角に切り取り、そのまま滅菌DSW 20 mL中に懸濁した。得られた懸濁液0.1 mLを種々の分離培地 (Shibata *et al.*, 2015) に塗抹した後、静置培養 (5, 15, 20°C, 7日間) した。培養後、培地上に出現したコロニーを釣菌し、15%グリセロール保存液に分散した後、-80°Cで保存した。

2.2 評価試料の調製

グルコース・バクトペプトン培地 (Shibata *et al.*, 2015) を24穴プレート (コーニング) に1.5 mL /穴ずつ分注した後, 保存株を一白金耳植菌し, 回転振とう培養 (160 rpm, 5, 15, 20°C, 7日間) を行った. 培養後, 遠心分離 (16,770×g, 4°C, 10分間) して上清を回収した後, さらに除菌濾過 (0.2 μm, アドバンテック) を行った. 得られた濾液100 μLを5%牛胎子血清 (以後, FBS; バイオロジカルインダストリーズ) 含有イーグルMEM培地 (ニッスイ) 900 μLと混合して評価試料とした.

2.3 培養上清の細胞賦活効果の評価

正常ヒト皮膚由来線維芽細胞 (以後, NB1細胞; 理研バイオリソースセンター) を96穴マイクロプレート (イワキ) に 2.0×10^4 個/穴になるように播種した後, 10%FBS含有イーグルMEM培地で前培養 (5%CO₂, 37°C, 1日間) を行った. 前培養後, 培地を5%FBS含有イーグルMEM培地に交換 (100 μL/穴) し, これに2.2で調製した評価試料を添加 (100 μL/穴) して本培養 (5%CO₂, 37°C, 2日間) を行った. 本培養後, 山田ら (2007) の方法に従ってMTT還元法による細胞活性を測定した. なお, 菌体未接種のグルコース・バクトペプトン培地をネガティブコントロール (以後, NC), またヒト塩基性線維芽細胞増殖因子 (以後, human bFGF; MW = 17.2 kDa, ワコー) をポジティブコントロール (以後, PC) とし, NCに対する各評価試料の相対活性を次式より求めて細胞賦活効果とした. 得られたデータは平均値±標準偏差で表した. なお, 多重比較の有意差はTukey法により検定し, NCとの間で有意差が得られた株を細胞賦活物質生産株とした.

$$\text{細胞賦活効果} = \frac{\text{評価試料の細胞活性}}{\text{NCの細胞活性}}$$

2.4 16S rRNA遺伝子解析による細胞賦活物質生産株の同定

今田ら (2014) の方法に従って, 2.3で選択した細胞賦活物質生産株からDNAを抽出した後, 常法に

より精製を行い, これをPCR増幅した. 得られたPCR産物はNCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) で相同性検索を行い, 近縁種を特定した. また, MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013; <http://www.megasoftware.net/>) を用いて進化系統樹を作製し, 近縁種との遺伝子的距離を調べた.

2.5 細胞賦活物質生産株の生理・生化学的性状試験

細胞賦活効果が最も高かった株に関する2.4の結果より, その最近縁種と同定された種と生理・生化学的性状の比較を行った. なお, 性状試験の方法や培地の調製は「増補改訂版 海洋環境アセスメントのための微生物実験法」(藤井, 2006; 坂田・吉川, 2006) および「Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria」(MacFaddin, 1985) を参考に行った. また, 特に指定しない限り, すべての培地は人工海水 (藤井, 2006) を用いて調製した.

2.6 細胞賦活物質生産株の増殖と細胞賦活効果の経時変化

500 mL容バツフル付三角フラスコに100 mLのグルコース・バクトペプトン培地を分注後, 2.3で得られた細胞賦活物質生産株を一白金耳植菌し, 回転振とう培養 (160 rpm, 20°C, 36時間) を行った. 培養2時間ごとに培養液100 μLずつを分取し, マイクロプレートリーダーにて濁度 ($\lambda = 630$ nm) を測定して, 供試菌株の増殖量とした. また, 対数増殖期に入った培養12時間目から4時間ごとに培養液1 mLを分取し, 遠心分離 (16,770×g, 4°C, 10分間) して得られた上清を2.2の方法に準じて試料を調製した後, 2.3の方法により細胞賦活効果を評価した.

2.7 細胞賦活物質の特定

2.7.1 細胞賦活物質の分子量

次に定常期 (培養20時間後) の培養液を遠心分離 (16,770×g, 4°C, 10分間) して得られた上清550 mLに, 90%飽和になるように硫酸アンモニウムを加えて攪拌 (5°C, 24時間) し, 遠心分離 (10,730×g, 4°C,

40分間)した。得られた沈殿物を10 mMトリス-塩酸バッファー (pH 7.0) 150 mLに溶解し、この溶液を透析膜 (UC 36-32-100; エーディア)に移した後、10 mMトリス-塩酸バッファー (pH 7.0) に対して透析 (5°C, 24時間)を行った。この透析内液をさらに限外濾過 (分画分子量3 kDa, メルクミリポア)により分画し、得られた限外濾過の両画分について、2.2の方法に準じて試料を調製し、2.3の方法で細胞賦活効果を確認した。さらに賦活効果が見られた画分については、2.2の方法に準じて5%FBS含有イーグルMEM培地中の試料の濃度 (終濃度0.3125%, 0.625%, 1.25%, 2.5%, 5%)を調製し、2.3の方法で細胞賦活効果の濃度依存性を調べた。なお、有意差の検定はt検定で行うこととした。また、同画分の10 μ LをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動用調製バッファー (Ez apply; アトー) 10 μ Lと混合した後、濃度勾配10-20%のゲル (E-T1020 L; アトー)に全量をアプライして電気泳動を行った。泳動後、ゲルをクマシーブリリアントブルー (アトー)で染色し、出現したバンドを分子量マーカー (RPN755E low-range; GEヘルスケア)の泳動位置による比較より細胞賦活物質の分子量を推定した。

2.7.2 細胞賦活物質とhuman bFGFとの同定性

2.7.1で細胞賦活効果が確認された分画物について、human bFGF ELISAキット (レイバイオテック)に供し、免疫化学的手法によりhuman bFGFとの同定性を調べた。

3. 結 果

3.1 BFからの細胞賦活物質生産株のスクリーニング

2010年2月, 11月, 2011年2月および5月から12月のBFと2012年2月から5月の伊豆赤沢DSWのBFより、合計614株の微生物を分離した。これらの分離株の培養上清を2.3に記す方法で細胞賦活効果を調べた結果、3株に賦活効果が見られた (表1)。図1に示すように、賦活効果を示した3株の中で最も高い効果を示した株であるNo. 265株は、PCのhuman bFGFとして50-100 ng/mLに相当する活性が確認さ

表1 伊豆赤沢DSWのBFからの単離コロニー数と細胞賦活物質生産株数

培養温度 (°C)	単離コロニー数	細胞賦活物質生産株数	出現率 (%)
5	115	1	0.9*
15	243	2	0.8
20	256	0	0
Total	614	3	0.5

* (細胞賦活物質生産株/単離コロニー数) \times 100 (%)

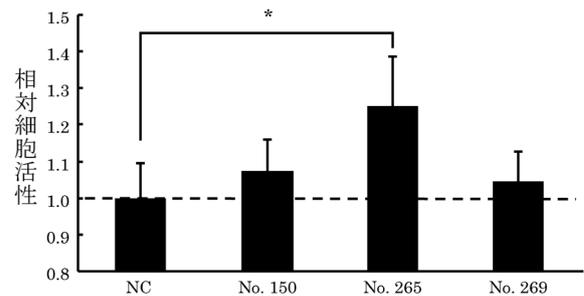


図1 菌体未接種のグルコース・バクトペプトン培地 (NC) に対する細胞賦活物質生産株の相対細胞活性。細胞活性はMTT還元法で測定 ($n=6$, 平均値 \pm 標準偏差, * $p<0.05$)

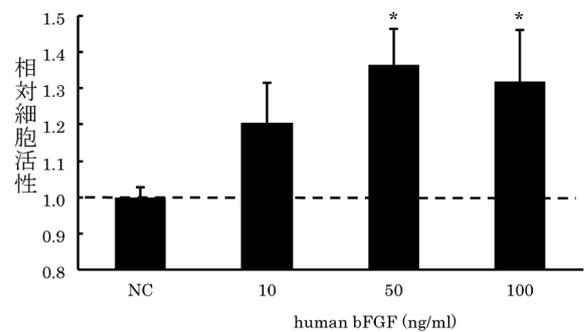


図2 菌体未接種のグルコース・バクトペプトン培地 (NC) に対するヒト塩基性線維芽細胞増殖因子 (human bFGF) の相対細胞活性。細胞活性はMTT還元法で測定 ($n=6$, 平均値 \pm 標準偏差, * $p<0.05$)

れた (図2)。そこでこの株について種の同定と生理・生化学的性状試験を行うとともにその生産物質を特定するため、以後の試験に供することにした。

3.2 細胞賦活物質生産株の同定

本研究において最も高い細胞賦活効果を示したNo. 265株について、種の同定を2.4の方法に基づいて行った。その結果、本株は *Vibrio gallaecicus* CECT7244^T と98.74% (1,468塩基/1,487塩基)の同定性を示し

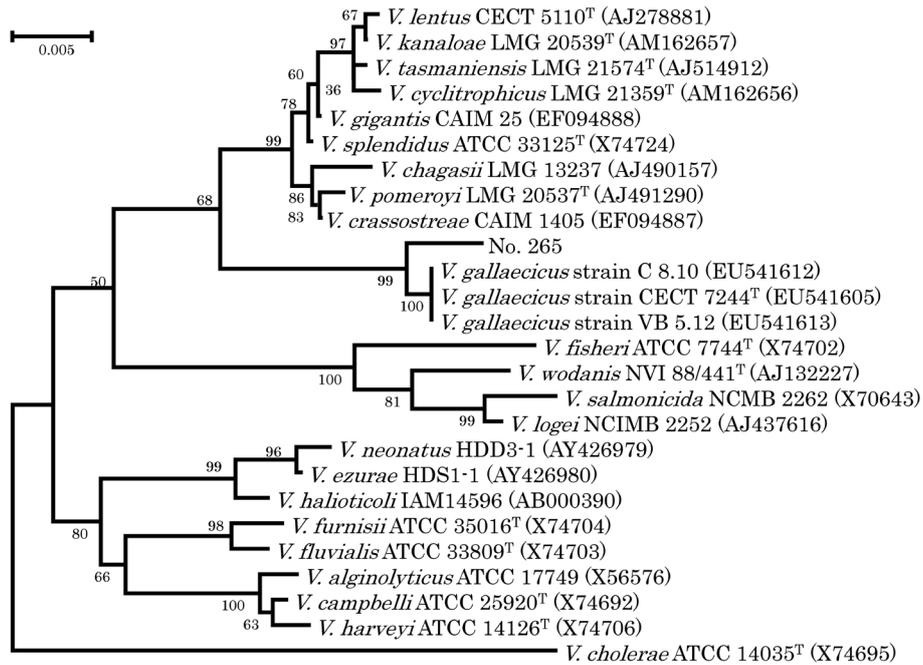


図3 No. 265株とその近縁種の分子系統樹

た。さらに進化系統樹から、近縁種との遺伝子的距離を調べたところ、*V. gallaecicus* CECT7244^TがNo. 265株の最近縁種であることが判明した(図3)。

3.3 細胞賦活物質生産株と標準菌株との生理・生化学的諸性状の比較

No. 265株が*V. gallaecicus*種(以後、標準菌株)と推定された。*V. gallaecicus*の新種登録の論文(Beaz-Hidalgo *et al.*, 2009)を参照して文献上においてNo. 265株と生理・生化学的性状の比較の結果、標準菌株の増殖NaCl濃度は0.5-3%の範囲であるのに対し、No. 265株は1-6%であり、広い濃度範囲で増殖することがわかった。またNo. 265株はインドール試験、ゼラチン加水分解、デンプン分解およびDNA分解が陰性であり、標準菌株の性状とは異なっていた(表2)。したがって、両株は異なる種であることが示された。

3.4 No. 265株の増殖と細胞賦活効果の経時変化

No. 265株の増殖と培養上清の細胞賦活効果の経時変化の影響を調べた。その結果、本株は培養開始から4時間後に対数増殖期に入り、16時間後に定常期に到達した後、24時間後に死滅期を迎えた。一方、培養上清の細胞賦活効果は培養20時間後に最

表2 No. 265株と*Vibrio gallaecicus* CECT 7244^T株(標準菌株)との生理・生化学的性状試験

性状試験項目	No. 265株	標準菌株
増殖NaCl濃度(%)	1-6	0.5-3
インドール試験	-*	+
ゼラチン分解	-	+
デンプン分解	-	+
DNA分解	-	+
スクロースの資化性	+	-

*-, 陰性; +, 陽性

高値を示したが、24時間後には顕著に効果が減少した(図4)。

3.5 No. 265株の細胞賦活物質の特定

2.7.1に示した方法で調べた結果、3 kDa以上の画分と3 kDa未満の画分の双方に細胞賦活効果が認められたが(図5)、本研究では高分子物質の細胞賦活物質の探索を目的としているため、3 kDa以上の画分に含まれる細胞賦活物質を追究することにした。まずこの細胞賦活物質の活性の濃度依存性を調べた結果、終濃度2.5%以下では細胞賦活効果が見られないことがわかった(図6)。次に、NB1細胞の増殖因子として周知である高分子物質のhuman bFGFを対照としてSDS-ポリアクリルアミド電気泳動法を

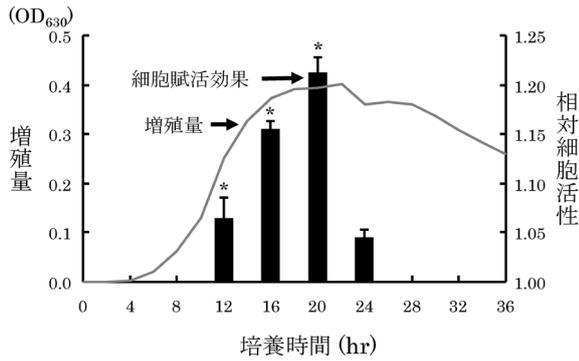


図4 No. 265株の増殖および培養上清の細胞賦活効果の経時変化。細胞活性はMTT還元法で測定 ($n=3$, 平均値±標準偏差, $*p<0.05$)

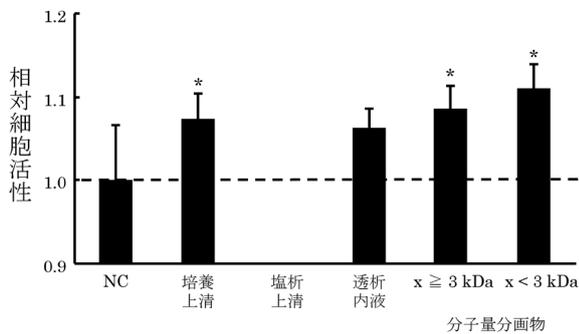


図5 NCに対するNo. 265株の分画物の相対細胞活性。細胞活性はMTT還元法で測定 ($n=6$, 平均値±標準偏差, $*p<0.05$)。なお、ここではNo. 265株の培養上清と塩析上清のNCを菌体未接種のグルコース・バクトペプトン培地、透析内液と分子量分画物のNCを10 mM トリス-塩酸バッファー (pH 7.0) とした

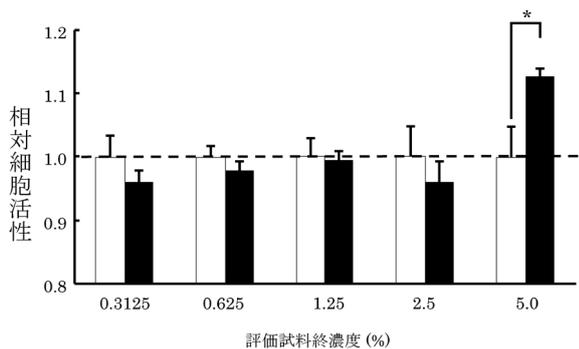


図6 10 mM トリス-塩酸バッファー (NC) に対するNo. 265株の分画物 (分子量3 kDa以上) の相対細胞活性の濃度依存性。細胞活性はMTT還元法で測定 ($n=6$, 平均値±標準偏差, $*p<0.05$)。□, NC; ■, 分子量3 kDa以上

行ったところ、3 kDa以上の画分から、分子量3.5 kDa, 8.5 kDaおよび38 kDa付近に主要なバンドが出現したが、比較対象としてのhuman bFGFの出現

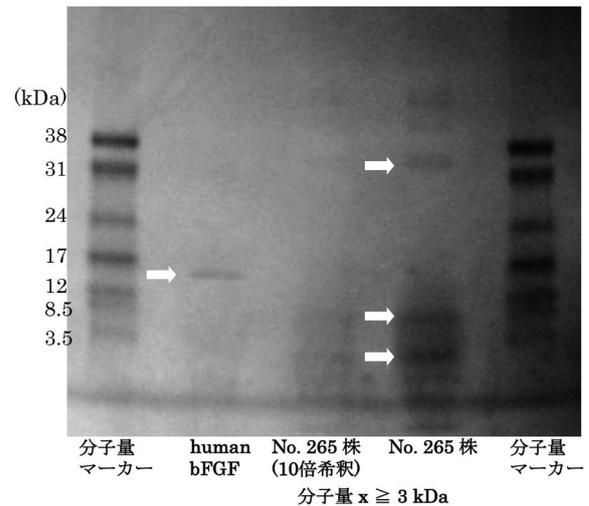


図7 SDS-PAGEによるNo. 265株の分画物 (分子量3 kDa以上) とhuman bFGFの分子量の比較

位置である分子量14-18 kDa付近にはバンドが観察されなかった (図7)。

3.6 No. 265株の細胞賦活物質とhuman bFGFとの同源性

2.7.2の方法に準じてNo. 265株が生産する細胞賦活物質とhuman bFGFとのタンパク質レベルで同源性を調べた。その結果、human bFGFと抗原抗体反応を示さないことがわかった。

4. 考 察

伊豆赤沢DSWより分離した614株の微生物の中で最も高い細胞賦活効果を示したNo. 265株は、*Vibrio gallaecicus* CECT7244^T (以後、標準菌株) と98.74%の同源性が得られたが、この標準菌株と文献上で生理・生化学的性状を比較した結果、いくつかの点で相違することが判明した (表2)。特に増殖NaCl濃度の範囲が異なっていることは、No. 265株が棲息していた環境を反映しているように思われた。標準菌株はスペイン沿岸の養殖アサリ*Ruditapes philippinarum*から分離され、2009年に新種登録された株である (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2009)。一般的に沿岸海域の表層海水は雨風や河川などの流入によって希釈されるため、塩分濃度が変動しやすいことが知られている (Lalli and Parsons, 2005)。一方、No. 265株が

棲息していた伊豆赤沢DSWの塩分濃度は約3.4% (株式会社ディーエイチシー調べ) であり, さらにDSWは一年を通して環境が安定しているため, 塩分濃度が大きく変動することはほとんどない。したがってNo. 265株は標準菌株よりも常に塩分濃度が高い環境に曝されており, その環境に適応した結果, 増殖NaCl濃度が高くなったと推察された。次に, No. 265株の増殖と培養上清の細胞賦活効果の経時変化について調べたところ, 増殖は培養後16時間で定常期に入り, 細胞賦活効果は培養20時間で最高値を示すことがわかり, No. 265株の増殖と細胞賦活効果の間に密接な相関関係が存在していることが示唆された。一般に微生物は対数増殖期に代謝活性が活発になることが知られており (扇元, 2002), No. 265株による細胞賦活効果物質の生産も同様に, 対数増殖期に菌株の増殖とともに代謝活性が活発になった後, 定常期にピークを迎えたものと推察された。

No. 265株が生産する細胞賦活物質は, 図5に示すように3 kDa以上の画分と3 kDa未満の両画分に存在することがわかった。これらの細胞賦活物質の中で, 3 kDa以上の物質についてはNB1細胞の増殖因子として周知のhuman bFGFである可能性が高いため, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (以後, SDS-PAGE) および酵素結合免疫吸着検定法 (以後, ELISA法) を用いて相同性を調べた。その結果, SDS-PAGEでは, 図7に示すように3つの主要なバンドが確認されたが, human bFGFの分子量である14-18 kDa付近にはバンドは確認されなかった。さらにELISA法によるタンパク質レベルでの検討においても, No. 265株が生産する細胞賦活物質はhuman bFGFと抗原抗体反応を示さなかった。これらのことから, No. 265株が生産する細胞賦活物質はhuman bFGFとは異なる物質である可能性が示唆された。なお, 数千kDa以上に及ぶ微生物由来の高分子細胞賦活物質に関する報告は未だ見られないため, 3 kDa以上の画分中に存在する物質は, 新規物質の可能性が考えられる。一方, 3 kDa未満の低分子画分にも細胞賦活効果が見られたことから, No. 265株は低分子の細胞賦活物質を生産している可能性も考えられ

る。微生物が生産する低分子の細胞賦活物質 (分子量332 Da) に関しては, すでにMatsumotoら (1991) が報告しているが, この物質が細胞賦活効果を示したのは癌細胞のHeLa細胞であり, 正常細胞のNB1細胞に対する効果は知られていない。このため, 正常細胞に対する細胞賦活効果を示したNo. 265株の低分子細胞賦活物質も新規物質の可能性があり, 今後の研究として大いに期待される。

本研究は微生物由来の報告が極めて少ない細胞賦活物質を生産するDSW由来の微生物について報告したものである。ヒトの体を構成する最小単位である細胞を活性化させることは, 即ち体全体の健康増進に繋がると考えられ, 健康長寿が重要な問題となっている昨今において, 本研究で報告した細胞賦活物質の応用は大いに期待される場所である。今後も引続きNo. 265株からの有効物質の単離・精製を続行し, 得られた精製物質についてアミノ酸配列を解析して既存物質との比較を行い, 有効物質を特定する予定である。また, No. 265株の生産物質がNB1細胞以外の細胞にも賦活作用を及ぼすかを調べることも今後の研究課題と考えられる。

参考文献

- Beaz-Hidalgo, R., A. Doce, J. Pascual, A. E. Toranzo and J. L. Romalde (2009) *Vibrio gallaecicus* sp. nov. isolated from cultured clams in north-western Spain. *Syst. Appl. Microbiol.*, 32, 111-117.
- 藤井建夫 (2006) 微生物の生理学的性質. 増補改訂版 海洋環境アセスメントのための微生物実験法 (石田祐三郎・杉田治男編集), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 63-72.
- Hsiao, E. Y., S. W. McBride, S. Hsien, G. Sharon, E. R. Hyde, T. McCue, J. A. Codelli, J. Chow, S. E. Reisman, J. F. Petrosino, P. H. Patterson and S. K. Mazmanian (2013) Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*, 155, 1451-1463.
- Human Microbiome Project Consortium (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486, 207-214.
- 今田千秋・小野寺かおる・寺原 猛・小林武志・山田勝久 (2014) 海洋環境からのコレステロールエステラーゼ生産放線菌の分離と諸性状. 海洋

- 深層水研究, 14, 167–176.
- Kadooka, Y., M. Sato, K. Imaizumi, A. Ogawa, K. Ikuyama, Y. Akai, M. Okano, M. Kagoshima and T. Tsuchida (2010) Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 64, 636–643.
- Lalli, C. M. and T. R. Parsons (2005) 塩分. 生物海洋学入門 第2版(關文威・長沼毅訳), 講談社, 東京, pp. 19–22.
- MacFaddin, J. F. (1985) Media for isolation–cultivation–identification–maintenance of medical bacteria. Williams & Wilkins, U.S.A., p. 275.
- Matsumoto, M. and H. Seto (1991) Stimulation of mammalian cell proliferation by lavanducyanin. *J. Antibiotics*, 44, 1471–1473.
- 大内一之・實原定幸・渡辺敬之 (2012) 離島インフラ生産のための海洋深層水複合利用洋上浮体施設. *海洋深層水研究*, 13, 17–24.
- 扇元敬司 (2002) バクテリアの増殖. *バイオのための基礎微生物学*. 講談社, 東京, pp. 86–87.
- 坂田泰造・吉川 毅 (2006) 高分子分解細菌. 増補改訂版 海洋環境アセスメントのための微生物実験法 (石田裕三郎・杉田治男編集), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 98–102.
- Shibata, Y., K. Yamada, C. Imada, T. Kobayashi and T. Terahara (2015) Phenotypic characterization of a microbe producing substances for oxidative stress resistance isolated from the deep seawater in Izu-Akazawa, Japan. *Deep Ocean Water Res.*, 15, 117–124.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30, 2725–2729.
- 寺原 猛・加藤 朋・山田勝久・小林武志・今田千秋 (2013) DGGE法による海洋深層水中の放線菌の群集組成解析. *海洋深層水研究*, 14, 11–18.
- 矢田修一・大場雅行・榎本恵一 (2003) 「室戸海洋深層水」中の細菌種の分析. *海洋深層水研究*, 4, 47–56.
- 山田勝久・今田千秋・土屋孝弘・宮元勝城・辻坊裕・小林武志・濱田(佐藤)奈保子 (2007) 海洋環境より分離された糸状菌培養液の美白素材への応用研究. *日本化粧品技術者会誌*, 41, 254–261.
- 山田勝久・鈴木正宏・野村道康・柴田雄次・今田千秋 (2015) 種々のカルシウム／マグネシウム比で培養したヒト線維芽細胞の活性と海洋深層水添加効果. *海洋深層水研究*, 15, 99–106.
- 山内繁樹・長野 章・山下和則・筒井浩之・高橋正征 (2014) 海産水産物の洗浄処理水としての海洋深層水の優位性. *海洋深層水研究*, 15, 19–26.
- Yoshimoto, S., T. M. Loo, K. Atarashi, H. Kanda, S. Sato, S. Oyadomari, Y. Iwakura, K. Oshima, H. Morita, M. Hatori, K. Honda, Y. Ishikawa, E. Hara and N. Ohtani (2013) Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature*, 499, 97–101.

(2016年2月26日受付；2016年8月29日受理)