

動物由来感染症の対応に関する研究

分担研究課題：動物由来細菌性腸管感染症の再興に向けた感染制御に関する研究

研究分担者：山田章雄（東京大学大学院農学生命科学研究科教授）

研究要旨：動物園で飼養されている哺乳類 106 種から分離した菌株 1184 株を対象にし、*Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157、*Bacillus coagulans* JCM 2257、*Staphylococcus aureus* JCM 2413、*Escherichia coli* JCM 5491 に対して抗菌活性を示す菌株を探索したところ、*L. lactis* subsp. *cremoris*、*L. lactis* subsp. *lactis*、*Enterococcus faecalis*、*E. hirae* の 4 菌種に属する 21 菌株を得ることができた。これらの菌株は培養上清を用いた試験においても抗菌活性を示したことから、新規バクテリオシンである可能性が高い。中には *Listeria monocytogenes* に対して抗菌活性を有する菌株が存在していたことから、動物由来の腸管感染症の起因菌に対する新たな制御法の開発につながる可能性がある。

研究協力者：平山和宏（東京大学大学院農学生命科学研究科准教授）、日高由貴（東京大学農学部）

A．研究目的：

腸管出血性大腸菌、リステリア菌、カンピロバクターなどによる腸管感染症を制御するには、ヒトでの感染対策はもとより、本来の宿主である家畜を含む動物におけるこれらの菌の制御が極めて重要である。抗菌薬の動物での使用は薬剤耐性菌の出現を促す危険性があるため他の方策が求められており、家畜へのワクチン接種が公衆衛生的見地から試みられているものの、いまだその効果は不明である。ヒトにおいても抗

菌薬投与による発症後の治療が主体であり、予防的手段は生産段階あるいは消費段階での衛生管理に依存するところが大きい。本研究では健康なヒト及び動物の腸内細菌叢を構成する菌種から、これらの腸管病原性を有する病原体に対して抑制的に働く菌種を選択し、その抑制機構の解明と、これらの菌を応用した家畜腸内からの菌排除を含む予防法の開発を行うことを目的とする。

乳酸菌（lactic acid bacteria; LAB）は代謝産物として乳酸を産生する菌の総称であるが、チーズやヨーグルト、漬物などの発酵食品や乳酸菌飲料の生産に利用されるほか、動物や人の腸管内に常在菌として多数存在している。LAB は乳酸のほかにも酢酸やブ

ロピオン酸といった短鎖脂肪酸や嫌気条件下における H₂O₂ など様々な物質を産生することが知られているが、バクテリオシン産生菌としても数多くの報告がある。バクテリオシンは、様々な細菌が産生するタンパク質またはペプチドで、抗菌活性を示す物質である。バクテリオシンの作用スペクトルは比較的狭く、主に近縁の細菌に対して殺菌作用を示すとされているが、中には広範囲の細菌にその作用を示すものもあり、抗菌物質としての実用化が期待されている。LAB は食品生産に利用されていることから極めて安全性が高く、LAB が産生するバクテリオシンは特に有用性が高いと考えられるが、現時点で安全性が確かめられ実用化されているバクテリオシンはナイシンのみである。

今年度は増加し続ける薬剤耐性菌への対抗策の一つとして新奇のバクテリオシンの探索を試みることにし、動物園で飼養される多彩な動物に由来する LAB からのバクテリオシン分離を試みた。

B. 研究方法：

上野動物園で飼養されている哺乳類 106 種から分離した菌株 1184 株を対象にした。一次スクリーニングは *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157、*Bacillus coagulans* JCM 2257、*Staphylococcus aureus* JCM 2413、*Escherichia coli* JCM 5491 を指標菌とした Direct 法を用い、阻止円 (Inhibition zone; IZ) の形成とその形状からバクテリオシン産生

性と思われる菌株 83 株を得た。このうちの 33 株について Spot-on-lawn 法を用いた二次スクリーニング実施し、培養上清による指標菌の発育阻害活性から、バクテリオシンの産生を確認した。二次スクリーニングで爆てりおしん賛成が確認できた菌株について、16SrDNA 塩基配列に基づく菌種の同定を行った。これらの菌株の作用スペクトルは、様々な腸内常在菌や病原菌を含む 17 菌種、32 株を指標菌として測定した。

C. 研究成果：

一次スクリーニングの結果、1184 株のうち 83 株をバクテリオシン産生性と判定した。動物種では、106 種中 47 種から分離された菌株がバクテリオシン産生性であった。そのうち、陽性コントロールとして用いたナイシン A 産生性の *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCD 0497 と同程度またはそれ以上の IZ を形成する菌株は 24 株であった。

二次スクリーニングでは上記 24 株を含む 33 株の培養上清の抗菌性を試験し、そのうち 21 株が IZ を形成することを確認した。これらの菌株は 11 の動物種から分離された。これらはすべて一次スクリーニングで直径 6.5mm を上回る IZ を形成した株であり、IZ 幅が 6.5mm 以下の菌株においては、二次スクリーニングに用いた Spot-on-lawn 法では IZ の形成は認められなかった。これら 21 菌株の菌種の同定を 16SrDNA の塩基配列を解読して行ったところ、*L. lactis* subsp. *cremoris*、*L. lactis* subsp. *lactis*、

Enterococcus faecalis、*E. hirae* の 4 種の菌種が同定できた。

さらに、抗菌スペクトルの測定を行ったところ、特に広い抗菌スペクトルを示す菌株は見つからなかったが、食品衛生上重要な *Listeria monocytogenes* に対して抗菌活性を有する菌株がキリンから分離された。

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

D. 考察：

今回見出された菌株の産生するバクテリオシンが既知のものとは異なることを明らかにするためには、これらの菌の性状や抗菌スペクトルをさらに詳細に検討することにより、新たなバクテリオシンの発見につながる可能性が期待される。

E. 結論

多様な動物の常在菌の中に、新奇のバクテリオシンを産生する菌株が存在することが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 論文発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

