

乳酸菌バクテオリシンを用いた  
多剤耐性菌の低減と食産業への応用

---

石川潤一

# — 目 次 —

第 1 章	序論	- 3 -
第 1 節	薬剤耐性菌	- 4 -
第 2 節	乳酸菌	- 9 -
第 3 節	本研究の目的	- 15 -
第 4 節	本論文の構成	- 16 -
第 5 節	略語	- 17 -
第 2 章	多剤耐性菌の分布調査による食品の潜在的なリスク評価	- 19 -
第 1 節	緒言	- 20 -
第 2 節	材料および方法	- 21 -
第 3 節	結果	- 25 -
第 4 節	考察	- 34 -
第 3 章	ブタ糞便における 薬剤耐性菌調査	- 38 -
第 1 節	緒言	- 39 -
第 2 節	材料と方法	- 40 -
第 3 節	結果と考察	- 42 -
第 4 章	乳酸菌を用いた多剤耐性菌の殺菌効果の検討	- 46 -
第 1 節	緒言	- 47 -
第 2 節	実験材料と方法	- 48 -
第 3 節	結果と考察	- 53 -

第 5 章	プロテアーゼ耐性バクテリオシン Bac916 および その産生株 <i>Lc. lactis</i> MBR916 株の評価 _____	- 67 -
第 1 節	緒言 .....	- 68 -
第 2 節	材料と方法 .....	- 69 -
第 3 節	結果と考察 .....	- 73 -
第 6 章	新奇バクテリオシン Bac916 の食産業への応用 _____	- 82 -
第 1 節	諸言 .....	- 83 -
第 2 節	材料と方法 .....	- 84 -
第 3 節	結果と考察 .....	- 86 -
第 7 章	総括 _____	- 92 -
第 1 節	総括 .....	- 93 -
第 2 節	文献 .....	- 95 -
第 3 節	謝辞 .....	- 106 -

# 第1章 序論

---

## 第1節 薬剤耐性菌

抗菌剤は、人や家畜動物等の病気の治療を目的に投与され、細菌類に対して殺菌効果を示す物質である。抗菌剤の中で、微生物によって産生され、他の微生物など生体細胞の増殖や機能を阻害する物質を抗生物質という。1910年にドイツのパウル・エールリヒと日本の秦佐八郎が合成した有機ヒ素化合物「サルバルサン」が合成抗菌剤の最初とされている。また、1928年にイギリスのフレミングがアオカビ (*Penicillium notatum*) からペニシリンを発見したのが抗生物質の最初の発見である<sup>1)</sup>。1940年には、フローリーとチェーンによりペニシリンの精製方法と製造方法が発見され、1942年にベンジルペニシリンが生産および実用化されている<sup>2)</sup>。抗菌剤および抗生物質は、発見当時、結核や梅毒等の治療が困難であった感染症の治療、戦争による負傷兵の感染症防止に劇的な効果を示した。さらにペニシリンの作用機序は、細胞壁合成阻害であるため、動物細胞に対する細胞毒性が低い(後述)。ゆえに、アレルギー以外の副作用が少ないとされており、合成抗菌剤よりも確実に治療の成果が表れたと推察できる。これが大きな成果となり、フレミング、フローリー、チェーンは、1945年にノーベル医学生理学賞を受賞している。このように、抗生物質の発見は、患者に投与することで細菌に対する殺菌効果を示し、これまでは不可能であった感染症も治療が可能となるというパラダイムシフトを引き起こした。

しかしながら、細菌は、遺伝子の変異により抗菌剤及び抗生物質に対して耐性を獲得することが知られている。Barberらは、ロンドンの病院において、分離されたブドウ球菌を調査し、ペニシリンの実用化から4年後の1946年に14%、5年後の1947年は38%、6年後の1948年には58%ものブドウ球菌がペニシリンに対して耐性を示したと報告している<sup>3)</sup>。つまり、抗生物質であるペニシリンを使用し始めてからわずか数年で、ペニシリン耐性ブドウ球菌は院内に蔓延したことが示唆されている。

ペニシリンが抗菌効果を発揮するための作用機序は、抗菌対象となる細菌の細胞壁合成を阻害することによる。細菌の細胞壁を構成しているペプチドグリカン(PG)はペニシリン結合たんぱく質(PBP)を持つ酵素によって合成される<sup>4),5)</sup>。このPBPはD-アラニル-D-アラニン(D-Ala-D-Ala)と結合することでPGを形成するが、ペニシリン存在下では、PBPがペニシリンと結合することでPGの合成が阻害される<sup>6)</sup>。PGの合成が阻害されると、細胞壁は菌体形成機能を失い、浸透圧に耐えられ

なくなった菌体が破裂すると考えられている。ペニシリンは細胞壁合成のみを阻害するため、細胞壁をもたない動物細胞やマイコプラズマなどには無効であるという特徴がある。PBP がペニシリンと結合する理由は、ペニシリンの持つ  $\beta$ -ラクタム環を D-Ala-D-Ala と誤認して結合することによる<sup>7)</sup>。ペニシリンに耐性を示す細菌は、この  $\beta$ -ラクタム環を開裂させる  $\beta$ -ラクタマーゼを産生することで、ペニシリンを無効化し、その抗菌作用から逃れると考えられている<sup>8)</sup>。

ペニシリンの耐性菌の増加により、 $\beta$ -ラクタマーゼの作用を受けない抗生物質の開発が行われた。1960年代になると、合成ペニシリンであるメチシリンやセフェム系第一世代のセファロスポリン<sup>9)</sup>など、細菌の持つ  $\beta$ -ラクタマーゼの作用を受けにくくするために新奇な抗生物質が次々に開発されてきた。ところが、 $\beta$ -ラクタマーゼの基質特異性を変化させ、これらの抗生物質にも耐性を獲得した細菌が出現している。 $\beta$ -ラクタマーゼには、基質特異性やアミノ酸配列に基づいた分類がいくつかある<sup>10)</sup>。アミノ酸配列に基づいた Ambler 分類<sup>11)</sup>で A, B, C, D の 4 種類のクラスがあり、クラス B は、メタロ・ $\beta$ -ラクタマーゼ (MBL) である。MBL 以外の  $\beta$ -ラクタマーゼは、酵素活性の中心にセリン残基をもつものに対して、MBL は金属イオンである  $Zn^{2+}$  を必要とする。MBL を有する細菌は、 $\beta$ -ラクタム環を持つ抗生物質 (ペニシリン系, セフェム系, カルバペネム系など) のほとんどすべてに耐性を示し、細菌感染症における抗生物質による治療を困難にする重大な脅威といえる。また、Kumarasamy らは、2010 年にイギリスとインドにおけるニューデリー・メタロ・ $\beta$ -ラクタマーゼ (NDM-1) を持つ肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) や大腸菌 (*Escherichia coli*) の蔓延について報告している<sup>12)</sup>。NDM-1 を持つ細菌は、 $\beta$ -ラクタム系抗生物質に耐性があるばかりでなく、作用機序の異なるフルオロキノロン系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質などにも耐性を示すことが報告されている。さらに、一般的な MBL の遺伝子が染色体上にコードされているのに対し、NDM-1 の遺伝子は、プラスミド上にコードされているという特徴があり、プラスミドの水平伝播により、ほかの種類に耐性遺伝子が伝播される可能性が指摘されている<sup>13),14)</sup>。

このように、複数の抗生物質に耐性を示す細菌を多剤耐性菌という。多剤耐性菌は、その耐性遺伝子の多くをプラスミド上に保有し、細菌自身が抗生物質に耐性を示すにとどまらず、耐性遺伝子をコードしたプラスミドを放出することで、他の菌種に耐性遺伝子を獲得させる可能性を有している。前述の NDM-1 の例に加え、近

年問題になっている多剤耐性菌としてメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）、バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）などが挙げられる。MRSAは遺伝子の突然変異によりメチシリン耐性を獲得したと考えられ、セフェム系抗生物質が無効であるブドウ球菌として知られている。また、VREはバンコマイシン（VCM）耐性を獲得した腸球菌であり、代表的な菌種として *Enterococcus faecalis*, *Ec. faecium* が挙げられる。これらの菌種自体は、ブタ、ウシ、トリ等の腸管、糞便はもとより、ヒトの口腔、腸管、糞便、そして環境中にも広く分布している。また、セフェム系抗生物質に対して自然耐性を示すことから、抗生物質の投与と合わせて整腸剤として投与される乳酸菌の一種でもある。この腸球菌は、家畜飼育環境において使用されてきた抗生物質アポパルシン（AVP）の作用により耐性を獲得し、グリコペプチド系の抗生物質 AVP とよく似た構造を持つ同系統の VCM にも耐性を示す結果になったと考えられている<sup>15)</sup>。ヒトへの感染経路として、院内感染、家畜飼育環境中で増殖した VRE による畜産物からの感染、さらには、堆肥から農作を通しての感染などが考えられる。MRSA、VRE は、両者とも感染したとしても健常人であれば免疫により発病することは少ないが、病中や手術後に感染すると患者の免疫では対処できずに発病し、重篤化して死に至る可能性がある病原菌である。MRSA の出現により、治療薬として VCM が有効であるとされてきたが、使用後まもなく VCM に耐性を示す MRSA、すなわち、VRSA の報告がされるようになった<sup>16)</sup>。これは、MRSA が VCM 耐性遺伝子を獲得したことによるものと考えられている。すなわち、VRE 保菌者が MRSA に感染し、感染者の口腔や腸管に生育していた VRE から VCM 耐性遺伝子を水平伝播により獲得し、さらに院内感染によって医療機関に広がったのち、環境中に放出された可能性が考えられる。このように、抗菌剤および抗生物質の発見以降、細菌は抗生物質から逃れるためにその耐性を獲得して、また新たな抗生物質が開発されるという細菌と抗生物質の「いたちごっこ」が続いている。

現在において、畜産、水産の分野では依然として抗生物質の使用が続いている。2005 年から 2014 年にかけての農林水産省の統計による動物種別抗菌薬の推定販売量を Fig. 1 に示した。推定販売抗菌薬量は抗生物質と合成抗菌剤の合算量であり、2005 年から 2014 年にかけて、各動物では減少傾向にある。しかしながら、海水魚用、豚用の抗菌薬は、推定販売量がそれぞれおよそ 100 t/年、500 t/年に及び、豚用の抗菌薬販売数量は全体の 60 % 以上を占めている。多くの抗生物質が使用され

る飼育環境において、抗生物質の適正使用が図られなければ、薬剤耐性菌を生み出すリスクは高くなる。厚生労働省は薬剤耐性対策のため、アクションプランを作成し、抗生物質の適正使用を呼び掛けているところである<sup>17)</sup>。今後、このアクションプランに薬剤耐性菌のリスクと抗生物質の適正な使用について、畜産業、養殖業はもとより、国民に広く啓蒙できるかが重要である。



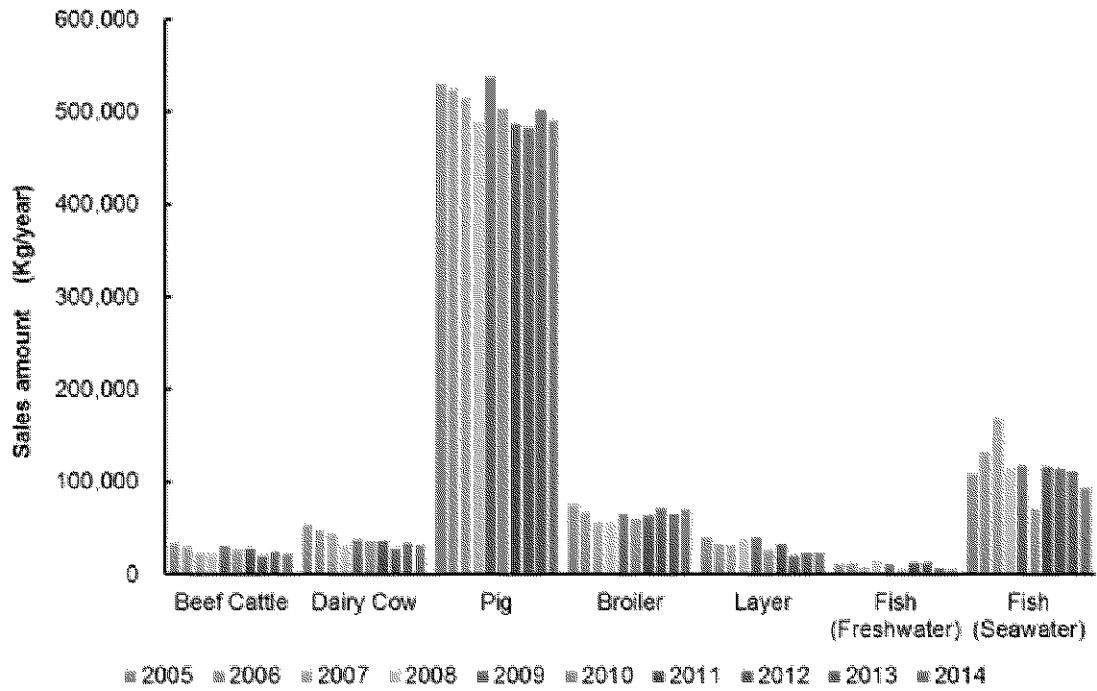


Fig.1-1 Estimates of the antimicrobial sales volume (kg/year) by the statistics of the National Veterinary Assay Laboratory (Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries). The bar graph in each item from left to right, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014.

## 第2節 乳酸菌

乳酸菌は、近代微生物学の祖と称されるフランスのルイ・パスツールによって1857年に発見された。パスツールはこの乳酸発酵の原因が乳酸菌と酵母によるものであると述べている。乳酸菌を初めて単離したのは、オランダのジョセフ・リスターであり、彼は乳酸を希釈する方法で乳酸菌を単離し、その単離した乳酸菌は *Lactococcus lactis* であると言われている。乳酸菌の発見は、現在から140年前という比較的新しいものであるが、古来より人類は、乳が酸っぱくなる現象は知っており、それを利用した発酵食品とともに長い歴史を持っている。乳酸菌を利用した発酵食品としてチーズやヨーグルトなどの乳製品を筆頭に、漬物類、酒類など、多くの発酵食品が挙げられる。発酵食品は、発酵による風味や形態の変化により、人類に好まれてきたことはもちろんだが、発酵による乳酸菌や酵母などの有用微生物の代謝物により、有害な微生物が生育できない環境を醸成し、保存食品として重宝されてきた側面がある。

「乳酸菌」という言葉は、分類学上の特定の菌種を指す言葉ではなく、次に示すような性質を持つ「微生物群」を指して「乳酸菌」と定義している<sup>18)</sup>。

1. グラム陽性の桿菌または球菌
2. カタラーゼ陰性
3. 内性胞子を形成しない
4. 運動性を持たない（稀に若い細胞で示すものもある）
5. 消費したブドウ糖に対して50%以上の乳酸を産生する
6. ビタミンB群のうち、ナイアシンを要求する

現在、微生物学の分類上、主な乳酸菌は乳酸桿菌目（order *Lactobacillales*）に属する6科（*Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae*, *Streptococcaceae*）で構成されている。しかし、乳酸桿菌目に含まれない *Bacillus* 属などにも乳酸菌の定義に合致する菌種があり、例えば、*Bacillus coagulans* 等は嫌気条件下で多量の乳酸を産生することで知られる。また、*Bifidobacterium* 属は、産生する乳酸の量が消費するブドウ糖の50%に満たないが、その健康イメージや安全性から乳酸菌と同義として取り扱うことがある。岡田は、前述した乳酸菌の定義に加えて、病原性がないことが重要であると述べており<sup>18)</sup>、それについて異論を唱える声は聞こえてこない。つまり、乳酸菌の定義には含まれ

るが、齲歯の原因となる *Streptococcus mutans*, 溶結性連鎖球菌症の原因となる *Stc. pyogenes* などは、乳酸菌として取り扱うべきではないと解釈できる。本報でも上述した、院内感染の原因となり、多剤耐性遺伝子を媒介する VRE は、乳酸菌として取り扱われる *Enterococcus* 属ではあるが、本論文においては、乳酸菌に含めないものとする。

微生物学的に乳酸菌研究が進んだ現在において、乳酸菌の機能性に注目が集まっている。乳酸菌の最も基礎的な機能性としてプロバイオティクスが挙げられる。ロシアのイリア・メチニコフは、コーカサス地方の住人に長寿者が多いことに着目し、乳酸菌の多量に入ったヨーグルトを喫食しているおかげで寿命が長いと考え、ヨーグルトによる不老長寿説を提唱した<sup>19),20)</sup>。これがプロバイオティクス乳酸菌による健康機能が研究される契機となった。乳酸菌は、動物の消化管、特に、口腔や腸管内に多く生育していることが知られている。腸管に生育している乳酸菌は、腸管内容物を栄養源に生命活動を行い、乳酸などの代謝物を排出する。乳酸菌により産生された乳酸は、腸管内の pH を低下させ、大腸菌や *Clostridium* 属等の細菌は、抗菌あるいは静菌される。乳酸に耐性を持つ細菌以外は、乳酸または乳酸イオンの取り込みにより菌体内の pH が低下することにより抗菌されると考えられている。排出された乳酸は、他の腸内細菌の作用を受けることでプロピオン酸に変換されることが知られており、抗菌力の高いプロピオン酸により耐性のない細菌が抗菌されると考えられる。また、乳酸菌は腸管内において、腸管上皮やムチン層に付着していることが知られている。例えば、ヒト腸管上皮の場合、腸管上皮を覆うムチン層には血液型に応じた糖鎖構造が存在する。一部の乳酸菌は、その糖鎖に結合する菌体表層タンパク質を持つことで、血液型抗原に結合して長期にわたり腸管内にとどまり、宿主であるヒトの腸内環境の安定に貢献していると言われている。

乳酸菌は生命活動のため、ブドウ糖を乳酸に変換してエネルギーを得ているが、同時に種々の物質を産生する。産生する物質のうち、いくつかは宿主の動物にとって好ましい生理活性を持つことが報告されている。例えば、一部の乳酸菌は、糖を主体とし、タンパク質や脂質などの複合体からなる菌体外多糖 (EPS) を生成することが知られてる。EPS の糖鎖構造は菌株特異的であり、宿主の免疫賦活効果が確認され、商品として実用化されているものも存在する<sup>21)</sup>。

一部の乳酸菌は、抗菌性のペプチドを産生することで知られる。この抗菌性ペプチドはバクテリオシンと呼ばれ、主にグラム陽性菌に対して抗菌効果を発揮し、分

類学上、類縁の菌種に対して優れた効果を発揮するとされている。バクテリオシンは、分子量が 10,000 以下で、耐熱性を有する抗菌ペプチドと定義される<sup>22),23)</sup>。バクテリオシン産生菌の多くは、プラスミド上に合成にかかわる遺伝子クラスターを有し、抗生物質とは異なり、通常のタンパク質合成と同様にリボソーム上で、その前駆体を合成する<sup>24)</sup>。乳酸菌により産生されるバクテリオシンは、伝統的な乳酸菌の食文化により醸成された高い安全性イメージから、食品保存料としての応用が期待されている。特に、*Lc. lactis*により産生されるナイシンは、グラム陽性菌に対して広い抗菌スペクトルを有し、耐熱性、中性から酸性領域に至るまで高い安定性を示すことから、利用価値が極めて高く、世界の多くの国で保存料としての利用が認められ、日本においても 2009 年 3 月 2 日付で使用が認可されている。

ナイシンには類縁体が存在し、前述の食品添加物として認可されたナイシンはナイシン A に限られる。構造が決定されているナイシンには、ナイシン A と同様に 34 残基のアミノ酸で構成されるナイシン Z<sup>25)</sup>、ナイシン Q<sup>26)</sup>、ナイシン F<sup>27)</sup>、ナイシン H<sup>28)</sup>がある。ナイシン A を含むこれら 5 種類のナイシンは、各々の配列に極めて相同性が高く、1~3 アミノ残基が異なるのみであり、抗菌スペクトル、生化学的諸性質、酸性機構が類似している。また、*Stc. salivarius* により産生されるサリバリシン D も前述のナイシン同様に 34 アミノ残基で構成され、配列も相同性が高い。同様に、*Stc. uberis* により産生されるナイシン U<sup>29)</sup>、*Stc. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* と *Stc. suis* により産生されるナイシン P<sup>30),31)</sup>がある。ナイシン P は、ナイシン A より 4 アミノ残基少ない 30 アミノ残基により構成されるが、配列はナイシン A などと相同性が高い。

乳酸菌のバクテリオシンには、ナイシン以外にも様々なものがあり、その構造によって分類が提唱されている。Table 1 に Cotter ら<sup>22)</sup>、園元ら<sup>23)</sup>が提唱するバクテリオシンの分類と、代表的なバクテリオシンを示した。この分類によれば、ナイシンは、Class I バクテリオシンの Class I ランチビオテックに含まれ、異常アミノ酸としてデヒドロアラニン、デヒドロブチリン、ランチオニン、3-メチルランチオニンを含むことが知られている。これらの異常アミノ酸は、ペプチドの構造が翻訳されたのち、LanB や LanC によって修飾されることで導入される。一方、Class II バクテリオシンの Class II ランチビオテックに含まれる、ラクチシン 481 や、ヌカシン ISK-1 の異常アミノ酸は、LanM によって導入される。

ランチオニンを含まず、ランチビオテックに含まれないバクテリオシンは、

Class II バクテリオシンと呼ばれ、Class II バクテリオシンは 4つのサブクラス (a～d) に分けられる。Class IIa バクテリオシンは *Listeria* 属に抗菌活性を示し、ペプチドの N 末端側にコンセンサス配列 (-Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys-; YGNGVXC) を有する特徴がある。Class IIb バクテリオシンは、ペプチド 2 分子が複合体を形成することで強い抗菌効果を示す。Class IIc バクテリオシンは、ペプチドの N 末端と C 末端が結合した環状構造を有するバクテリオシンである。Class IId バクテリオシンは、IIa～IIc 以外のバクテリオシンで、sec 経路 (General secretion pathway) により分泌される。近年まで、高分子量 (分子量 10,000 以上のもの) の抗菌性ペプチドや、熱不安定なもの、糖質や脂質との複合体であるものもバクテリオシンに含めてきたが、Cotter らは、それらをバクテリオリシンと分類している<sup>22)</sup>。

ナイシンは、翻訳後に異常アミノ酸が導入されて合成されるが、その合成経路を支配する遺伝子クラスターが存在する。これらの遺伝子クラスターには構造遺伝子である *nisA*, 脱水や-S-結合による環化 (翻訳後修飾) を行う *nisB* と *nisC*, 菌体外への排出を行う *nisT*, 細胞膜上でリーダーペプチドを切断して抗菌活性を発現させる *nisP* が存在する。また、同クラスターには、生産したナイシンから自身を守るための自己耐性タンパク質の遺伝子 *nisI*, *nisF*, *nisE*, *nisG* も含まれている<sup>32)</sup>。多くのバクテリオシン産生菌では、自身が生産したバクテリオシンがクオラムセンシングにおけるオートインデューサーとして働くとされている。ナイシンの産生においても、ナイシンは同様の作用することが知られており、ナイシンの刺激を細胞に伝えるための *nisR*, *nisK* も同一クラスターに含まれていることが報告されている<sup>33)</sup>。

バクテリオシンは、他の細菌の細胞を殺菌的に抗菌し、多くのバクテリオシンにおいて、その作用機序は孔形成による低分子量画分の流出によるものと考えられているが、ナイシン以外ではその作用機序の深部までは解明されていない。ナイシンは、nM オーダーのごく低濃度でも抗菌活性を示すことが知られており、その主たる作用機序は、ナイシンが細胞膜に孔を形成することによる低分子量画分の流出である<sup>34)</sup>。細菌の細胞膜は、脂質二重膜構造にペプチドグリカンの前駆体である Lipid II が存在している。ナイシンは、この Lipid II のピロリン酸基を認識して結合し、C 末端側を細胞膜内部に穿刺する様に配座すると考えられている。ナイシンの細胞膜への穿刺には 8 分子のナイシンと 4 分子の Lipid II が必要であり、形成される孔径は 2.5 nm 程度と考えられており、ATP やイオンなどの低分子量画分が細胞外へ流出することで抗菌作用を示す。また、ナイシンによる抗菌作用機序には前述の孔形

成の他に、Lipid II への結合による細胞壁合成阻害と Lipid II の隔離による細胞分裂阻害が報告されている<sup>35)</sup>。Lipid II は、ペプチドグリカンの前駆体であるため、ナイシンと結合することでペプチドグリカンの合成が阻害され、細胞壁が形成できなくなると考えられている。さらに、細菌が細胞分裂を行う際、細胞の境界部分に隔壁を形成するが、Lipid II はこの隔壁に多く存在する。系中にナイシンが存在すると隔壁以外でも Lipid II の凝集が起こり、正常な細胞分裂を阻害すると考えられている<sup>35)</sup>。

乳酸菌のバクテリオシンについては、乳酸菌が伝統的に発酵食品に用いられてきたことに裏打ちされた安全性から、食品への応用に期待が高まっている。現在、ナイシン A 以外のバクテリオシンを食品添加物（保存料）として使用することは認められていないが、バクテリオシン産生性乳酸菌を食品に用いることに法律的な制限はない。ゆえに、バクテリオシン産生菌を食品やその周辺に応用していくことで、ナイシン A 以外のバクテリオシンにも研究の幅を広げていくことが重要であると考えられる。

Table 1-1 Classification and representative bacteriocins<sup>22), 23)</sup>

Classification	Remarks	Examples
<b>Class I (lantibiotics) Lanthionine-containing bacteriocins (&lt; 5 kDa)</b>		
Class I lantibiotics	Unusual amino acids introduced by LanB and LanC	Nisin (A, Z, Q), Subtillin, Epidermin, Pep5
Class II lantibiotics	Unusual amino acids introduced by LanM	Lacticin (481, 3147), NukacinISK-1, Mersacidin
<b>Class II Non-lanthionine-containing bacteriocins (&lt; 10 kDa)</b>		
Class IIa	Pediocin like bacteriocins Specific against <i>Listeria monocitogenes</i> Containing N-terminal consensus sequence; YGNGVXC	Pediocin PA-1/AcH, sakacin (A, P), Leucocin A
Class IIb	Two peptide bacteriocins	Lactococcin (G, M, Q), Lactacin F, Plantaricin EF, Gassericin T/X
Class IIc	Cyclic bacteriocins	Enterocin AS-48, Gassericin A, Lactocyclicin Q
Class IId	Single-peptide non-pediocin-like linear bacteriocins	Lactococcin A, Lacticin Q

### 第3節 本研究の目的

現在、畜産業・水産業の現場では、飼育動物の病気の治療・予防、現在、病院における抗菌薬の過度の処方及び家畜飼への日常的な使用により、抗菌薬に耐性を示す菌が出現している。特に、水産、畜産の分野では、病気治療を目的とした動物用医薬及び病気予防や成長促進を目的とした抗生物質混合飼料の使用により、抗生物質に耐性を示す薬剤耐性菌が出現している。薬剤耐性菌は、抗生物質が使用される環境において、突然変異や耐性遺伝子の獲得によって発生するとされており、人や動物にとっての病原菌が耐性遺伝子を獲得すると、抗生物質による治療が困難になり、重篤な症状や経済的損失を及ぼすリスクとなる。また、病原菌でなくとも獲得した耐性遺伝子を放出することで、他の細菌に耐性遺伝子を伝播するリスクもある。

一方、乳酸菌には様々な機能が知られており、その一つに抗菌物質であるバクテリオシンの産生が挙げられる。バクテリオシンは、細菌によって産生され、同種または近縁種の細菌を抗菌する抗菌性ペプチドと定義される。バクテリオシン及びその生産菌は、家畜の病原菌感染予防のための抗生物質の代替品としての利用が検討されている。しかしながら、この試みは一定の効果は見られるものの、試験的な試みであり、まだまだ子豚等の幼若動物については抗菌薬に頼らざるを得ないのが現状である。バクテリオシンは基本的に細胞膜に孔を形成することによって殺菌的に働くため、耐性菌が出現しづらいという特徴がある。しかしながら、バクテリオシンの多剤耐性菌に対する抗菌効果の検証はまだ十分ではないのが現状である。

そこで本研究では、まず、耐性菌の分布調査を行い、加熱処理を行わずに食する生野菜や漬物などから菌を単離し、食品の潜在的なリスクについて検証を行った。次に、900 菌株以上の乳酸菌からバクテリオシン産生株をスクリーニングし、前述の調査で分離した薬剤耐性菌に対しての抗菌効果を検証した。さらに、新奇性が期待されるバクテリオシンについての特徴付けと、その応用として、食品への添加により食品の日持ち向上効果の検証及びブタ糞便に当該バクテリオシンとその産生性乳酸菌を添加して薬剤耐性菌に対する抗菌効果の検証を行った。



## 第4節 本論文の構成

本論文は、序論を含めて以下の7章から構成されている。

第1章	序論
第2章	多剤耐性菌の分布調査による食品の潜在的なリスク評価
第3章	ブタ糞便における薬剤耐性菌調査
第4章	乳酸菌を用いた多剤耐性菌の殺菌効果の検討
第5章	プロテアーゼ耐性バクテリオシン Bac916 およびその産生株 <i>Lc. lactis</i> MBR916 株の評価
第6章	新奇バクテリオシン Bac916 の食産業への応用
第7章	総括

第1章では、本研究の背景にかかわる薬剤耐性菌と乳酸菌についての概説と本研究の目的、本報の構成を示した。

第2章では、加熱せずに喫食する可能性のある食品における耐性菌の分布調査を行い、食品の潜在的なリスクについて検証を行った。

第3章では、ブタの糞便をサンプルとし、抗生物質スクリーニング培地を用いた薬剤耐性菌調査を行い、抗生物質耐性菌の菌数調査と分離を行った。

第4章では、乳酸菌からバクテリオシン産生株をスクリーニングし、第2章の調査で分離した薬剤耐性菌に対しての抗菌効果を検証した。

第5章では、第4章で分離した *Lc. lactis* MBR916 株の特徴付けと MBR916 株が産生するバクテリオシン Bac916 の特徴付けを行った。

第6章では、*Lc. lactis* MBR916 株およびそのバクテリオシン Bac916 の応用として、食品への添加により食品の日持ち向上効果の検証及びブタ糞便に当該バクテリオシンとその産生性乳酸菌を添加して薬剤耐性菌に対する抗菌効果の検証を行った。

第7章では、本論文の総括と、今後の研究の課題と展望について述べた。

## 第5節 略語

本論文で用いる略語を以下に示す。

ABPC	アンピシリン
AMK	アミカシン
AVP	アボパルシン
AZT	アズトレオナム
BC	バシトラシン
BP	brake point, ブレークポイント
CP	クロラムフェニコール
CPFX	シプロフロキサシン
CRE	carbapenem-resistant <i>enterobacteriaceae</i> , カルバペネム耐性腸内細菌科細菌
CTX	セフトキシム
EM	エリスロマイシン
EPS	extracellular polysaccharide, 菌体外多糖
GM	ゲンタマイシン
IPM	イミペネム
KM	カナマイシン
MBL	metallo-beta-lactamase, メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ
MDRP	multidrug-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , 多剤耐性緑膿菌
MRSA	methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> , メチシリン耐性黄色ブドウ球菌
MWCO	molecular weight cut-off, 分画分子量
NDM-1	New Delhi metallo-beta-lactamase, ニューデリー・メタロ・ $\beta$ -ラクタマーゼ
PBP	penicillin-binding protein, ペニシリン結合たんぱく質
PG	peptidoglycan, ペプチドグリカン
PRSP	penicillin-resistant <i>Streptococcus pneumoniae</i> , ペニシリン耐性肺炎球菌
RFP	リファンピシン

SXT	ST 合剤 (Sulfamethoxazole / Trimethoprim)
TC	テトラサイクリン
VCM	バンコマイシン
VRE	vancomycin-resistant <i>Enterococcaceae</i> , バンコマイシン耐性腸球菌
VRSA	vancomycin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> , バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌

菌種名の略語を以下に示す。なお、本文中における最初の記載は完全綴りで表記する。2回目以降、同一の属を省略する場合、例えば *Lactobacillus* 属ならば *L.* というように、属名の頭文字にピリオドを付けて表記するのが一般的であるが、本論文においては省略による混乱を避けるために以下のように表記する。

<i>Carno.</i>	<i>Carnobacterium</i>
<i>Ec.</i>	<i>Enterococcus</i>
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lc.</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Staph.</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Stc.</i>	<i>Streptococcus</i>

## 第2章 多剤耐性菌の分布調査による食品の潜在的なリスク評価

---

## 第1節 緒言

現在、病院での抗菌薬の過度の処方および家畜への餌の日常的な使用により、抗菌薬に耐性を示す菌が多く出現している。中でも複数の抗菌薬に耐性を示す多剤耐性菌は、人への感染とその拡大が危惧されている。代表的なものとして、MDRP, VCM, PRSP, MRSAなどが挙げられる<sup>36)</sup>。MRSAは院内感染症起炎菌となっており死亡率も非常に高いため問題となっている<sup>37)</sup>。また、PRSPは乳幼児の化膿性髄膜炎や中耳炎、肺炎、高齢者の肺炎などの起炎菌であり、低侵襲性感染症を惹起し、重篤な後遺症を残すことがある<sup>38),39)</sup>。VCMは、MRSAに対する特効薬だが、VREに対しては、VCMのみならず、現在臨床で細菌感染症の治療に用いられているほぼすべての種類の抗菌薬が無効の場合が多く、その治療に重大な支障をきたす事態が起こっている。VREの感染症患者は、現在のところ年に数例の報告にとどまっているが、耐性遺伝子 *vanA*, *vanB* がプラスミド上にあり、他の菌に耐性遺伝子が水平伝播する可能性があるために十分な警戒が必要である<sup>40)</sup>。VREはしばしば食肉やチーズなどの食品から分離されており、食の安全性におけるリスク要因の1つとなっている<sup>41)</sup>。

細菌は、突然変異あるいは、他の細菌から耐性遺伝子の水平伝播により耐性を獲得する可能性がある。そのため、食中毒細菌の抗菌薬耐性能だけでなく、ヒトに健康の被害を与えるリスクがあるという点で、食品中に分布する多剤耐性菌を検証する必要があると考えた。そこで、本研究では非加熱処理の食品のうち、加熱処理を行わずに食する生野菜や漬物などの食品から菌を単離し、多剤耐性菌の分布調査を行うことで食品の潜在的なリスクについて検証を行った。

## 第2節 材料と方法

### 2-2-1. 菌の単離および培養条件

本試験では、加熱調理せずに食べることが多い、野菜（5 サンプル）、漬物（4 サンプル）、キムチ（1 サンプル）、生ハム（1 サンプル）の計 11 サンプルを用いた。それぞれのサンプルを細かく刻み、滅菌生理食塩水（0.85% NaCl）に希釈し、懸濁液を変法 GAM 寒天培地（日水製薬株式会社，東京）に塗沫して 37°C で 48 時間嫌気培養した。コロニーの釣菌は、1 サンプルにつき 5~10 コロニー程度とし、可能な限り、形、大きさ、色などの違うコロニーを選んだ。単離菌は、使用するまで -80°C で凍結保存した。

本培養前に凍結保存菌を GAM 液体培地（日水製薬株式会社，東京）に植菌し、37°C で 24 時間培養した。同条件で継代培養した後、18 時間の本培養を行った。

### 2-2-2. グラム染色およびカタラーゼ試験

培養菌液を遠心分離（8,000 rpm, 5 分間, 室温）で回収し、遠心洗浄（8,000 rpm, 5 分間, 室温）を行った後、菌体をフェイバー G（日水製薬株式会社，東京）にてグラム染色し、顕微鏡観察を行った。また、菌体に 30% 過酸化水素水（三徳化学工業株式会社，東京）を添加し、気泡（酸素）の発生の有無を確認した（カタラーゼ試験）。

### 2-2-3. 塩化ベンジル法による DNA 抽出

遠心洗浄（3,000 rpm, 5 分間, 室温）後のペレットに抽出バッファー（100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 40 mM EDTA と 10% SDS を 1:5 で混合した溶液）および塩化ベンジル（関東化学株式会社，東京）を 2:1 の割合で加え、50°C で 30 分間保温することで菌体を溶解した。溶解後、エタノール沈殿により DNA を精製し、TE 緩衝液（pH 8.0）に溶解したものを DNA 溶液とした。

### 2-2-4. RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-PCR) 法による同一菌株の排除

PCR は、KAPA Taq Extra PCR kit (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA) を用いて総量 50µL の系にて行った。DNA 量は 50 ng とし、プライマーは 1254 プ

ライマー (5'-CCGCACCAA-3')<sup>42)</sup>を用いた。PCR 反応は、2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) を用いて、94°Cで2分間の後、94°Cで2分間、36°Cで5分間、72°Cで1分間を5回繰り返し、さらに94°Cで1分間、36°Cで1分間、72°Cで1分間を30回繰り返すことで行った<sup>42)</sup>。PCR 後、1.5%アガロースゲルを用いて100Vで40分間電気泳動した。ゲルは、臭化エチジウム溶液 (ナカライテスク, 京都) に10分間浸漬させ、トランスイルミネーター (BM Equipment, Upland, CA, USA) でバンドを確認した。同一サンプルから単離した菌で同じ泳動パターンを示したものを同一菌株と見なし、重複を排除した。

#### 2-2-5. ディスク拡散法による薬剤感受性試験

指標菌の培養菌液を滅菌綿棒 (Biomerieux, Lyon, France) により GAM 寒天培地に塗抹し、24時間培養した。次に、2~3コロニーを滅菌綿棒で滅菌生理食塩水に懸濁し、標準比濁液 (Biomerieux, Lyon, France) を参考にしてマクファーランド No.0.5 となるように調製した。滅菌綿棒を用いて菌液を感性ディスク用培地 (日本製薬株式会社, 東京) に4方向から均等に塗布し、3~5分間静置した。菌を接種した寒天培地に間隔を24mm以上離して14種のBD センシディスク™ (6mm) (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社, 東京) を置き、35°Cで24時間培養した。培養後、ディスク周辺に形成された阻止円直径を測定した。使用した抗菌薬ディスクと作用機序は Table 2-1 に示した。耐性の有無は、検査の標準法を作成しているアメリカ臨床・検査標準協会 (CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute) の判定基準値に基づき判断した<sup>43)</sup>。菌種により阻止円の大きさが異なる薬剤については、記載されている中で最も厳しい評価のもの (阻止円が小さいもの) をブレイクポイント (BP) として採用し、「耐性あり」と判断した。具体的には、シプロフロキサシン (CPFX)、エリスロマイシン (EM)、アミカシン (AMK)、ST 合剤 (SXT)、イミペネム (IPM)、バンコマイシン (VCM) は、阻止円直径6mmの場合を「耐性あり」とした。同様に、テトラサイクリン (TC) は11mm以下、クロラムフェニコール (CP)、ゲンタマイシン (GM) は12mm以下、カナマイシン (KM)、アンピシリン (ABPC) は13mm以下、セフォタキシム (CTX) は14mm以下、アズトレオナム (AZT) は15mm以下、リファンピシン (RFP) は16mm以下のものを「耐性あり」と判断した。

#### 2-2-6. 多剤耐性菌の簡易同定

分離したすべての菌株について、16S rDNA の相同性解析を行い、属レベルの簡易同定を行った。また、多剤耐性菌は、グラム染色による顕微鏡観察、カタラーゼ試験、16S rDNA 相同性解析の結果から総合的に判断し同定した。16S rDNA 配列解析では、63f プライマー(5'-CAGGCCTAACACATGCAAGT-3')<sup>44)</sup>および 1525r プライマー(5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC-3')<sup>45)</sup>を用いて 16S rDNA の全長配列を増幅し、ダイターミネーター法を用い 3130 Genetic Analyzer (Applied Bio systems, Carlsbad, CA, USA)にて配列解析を行った。配列解析の結果から得られた 16S rDNA の塩基配列について、NCBI (National Center for Biotechnology Information) の BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) プログラムにより相同性検索にて菌種同定を行った。また、腸内細菌科の同定は、SIM 培地 (Oxoid, Hampshire, England) で運動性、インドールピルビン酸 (IPA) 生産性、インドール生産性を、TSI 寒天培地 (Oxoid, Hampshire, England) で糖分解能 (ブドウ糖, 乳糖, 白糖), ガス発生, 硫化水素生産性を、シモンズクエン酸寒天培地 (Oxoid, Hampshire, England) でクエン酸塩の利用性を判別することで行った。



**Table 2-1 List of antibiotic discs and mechanisms**

Antibiotics (code)	Concentration ( $\mu\text{g}$ / disc)	Mechanisms (inhibit synthesis)	Family
Ciprofloxacin (CPFX)	5	Mitochondrial DNA	New quinolone
Rifampicin (RFP)	5	RNA	Rifamycins
Erythromycin (EM)	15	Protein (binding to 50S subunit)	Macrolide
Chloramphenicol (CP)	30	Protein (binding to 50S subunit)	Chloramphenicol
Tetracycline (TC)	30	Protein (binding to 30S subunit)	Tetracycline
Gentamicin (GM)	10	Protein (binding to 30S subunit)	Aminoglycoside
Amikacin (AMK)	30	Protein (binding to 30S subunit)	Aminoglycoside
Kanamycin (KM)	30	Protein (binding to 30S subunit)	Aminoglycoside
Sulfamethoxazole /Trimethoprim (SXT)	23.75/1.25	Tetrahydrofolic acid	Sulfonamide
Ampicillin (ABPC)	10	Cell wall	$\beta$ -lactam
Cefotaxime (CTX)	30	Cell wall	$\beta$ -lactam
Aztreonam (AZT)	30	Cell wall	$\beta$ -lactam
Imipenem (IPM)	10	Cell wall	Carbapenem
Vancomycin (VCM)	30	Cell wall	Glycopeptide

## 第3節 結果

### 2-3-1. 菌の単離と同一菌株の重複排除

漬物、野菜、生ハムなど11サンプルから合計74菌株を単離した。同一菌株をグラム染色、カタラーゼ試験およびRAPD-PCRによって重複の排除を行った。グラム染色およびカタラーゼ試験の結果は、サンプルごとに同じ、あるいは類似した傾向が見られた。Fig. 2-1には、RAPD-PCRにおける代表的な泳動パターンを示した。Fig. 2-1の例のように同じ泳動パターンを示した菌株は同一菌株と見なし、同一菌株の重複排除を行った結果、最終的に30種の菌株を得た。1サンプルにつき平均2~3種類の菌株が得られた。漬物や生ハムなどの加工食品と野菜の非加工食品から得られる菌株にグラム染色や形態観察の傾向の違いは見られなかった。

### 2-3-2. 抗菌薬感受性試験

重複排除により得られた30菌株の抗菌薬感受性試験を行った結果をTable 2-2に示した。30菌株中すべての菌株において何らかの抗菌薬に対する耐性が見られた。抗菌薬別にみると、AZT耐性菌が最も多く22菌株で、次いで、RFP, EM, GM, KM, VCM耐性菌がそれぞれ12菌株だった。IPM耐性菌はいずれの菌株からも検出されなかった (Fig. 2-2)。菌株ごとに見ると、MYU 687株 (単離源: キュウリ) はRFP, EM, CP, TC, GM, KM, CTX, ABPC, AZT, VCMの10種類の抗菌薬に耐性を示し、単離した菌株の中でも最も多くの耐性がみられた。次に多くの抗菌薬に対して耐性を示した菌株はMYU 599株で9種類の抗菌薬に耐性を示した。また、7種類の抗菌薬に耐性を示したのは2菌株、6種類の抗菌薬に耐性を示したのは3菌株、5種類の抗菌薬に耐性を示したのは4菌株、4種類、3種類の抗菌薬に耐性を示したのはそれぞれ2菌株、1種類の抗菌薬に耐性を示したのは15菌株だった (Fig. 2-3)。Table 2-3には、各抗菌薬における多剤耐性数を示した。1種類の抗菌薬に耐性を示した菌株は、すべてAZT耐性であった。6種類以上の抗菌薬に耐性を示したすべての菌株は、EM, GM, KM, ABPCおよびVCM耐性を有していた。RFPおよびEM耐性菌は、5種類前後の抗菌薬に耐性を示すものが多かった。

### 2-3-3. 多剤耐性菌の簡易同定

16S rDNAの相同性解析による属レベルの同定結果をTable 2-4に示した。また、

7種類以上の抗菌薬に耐性を示した4菌株を選抜し、グラム染色、カタラーゼ試験、各種培地での試験結果を総合的に判断し、同定した結果を Table 2-5 に示した。選抜株の内訳は、*Bacillus* 属が1菌株、腸内細菌科（*Leclercia* 属/*Enterobacter* 属/*Klebsiella* 属）が3菌株であった。

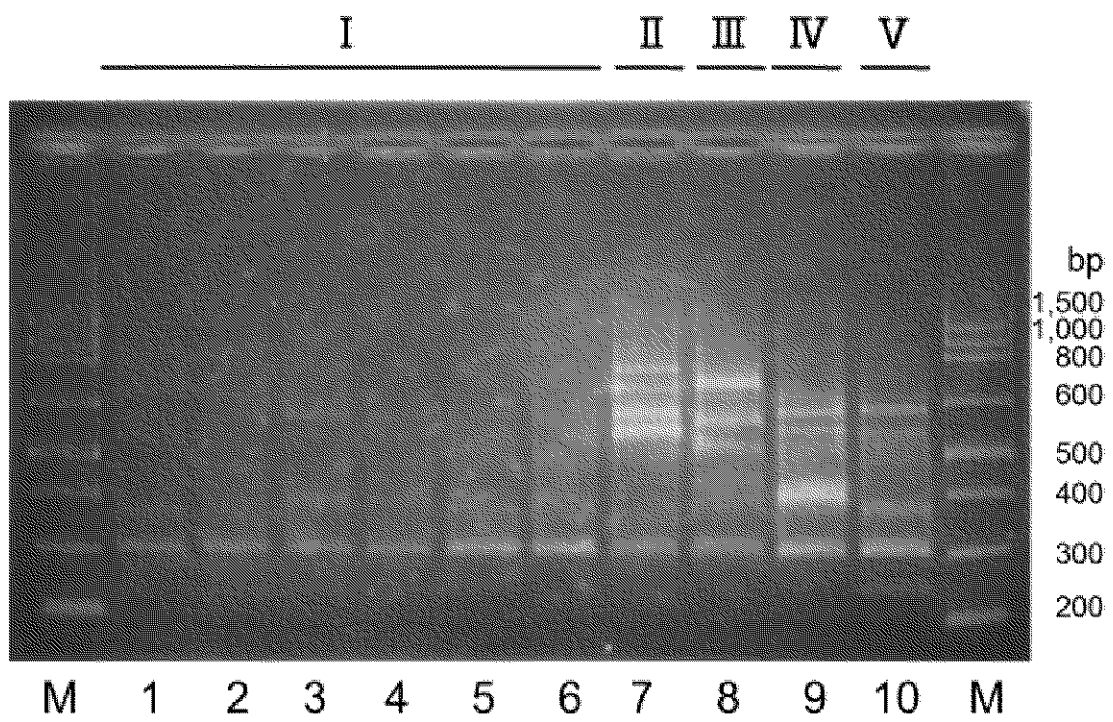


Fig. 2-1 A representative RAPD-PCR pattern. M: Marker, 1~10: samples, I~V: Grouping based on migration patterns.

**Table 2-2 The results of drug resistant test**

Strain	Source	Diameter, inhibition ring (mm)															
		CPPX	RFP	EM	CP	TC	AMK	GM	KM	SXT	CTX	IPM	ABPC	AZT	VCM		
MYU 562	Pickled cucumber in mustard sauce	30	36	20	20	20	10	12	10	14	30	36	12	6	20		
MYU 564	Pickled cucumber in mustard sauce	10	30	30	30	20	12	20	24	6	20	24	24	6	6		
MYU 572	Pickled Japanese horseradish	14	9	9	17	22	6	6	6	15	14	17	24	6	16		
MYU 596	White Kimchi	31	34	20	26	29	23	21	20	24	31	36	38	7	19		
MYU 598	White Kimchi	30	38	28	28	34	27	29	26	30	38	56	44	9	20		
MYU 599	White Kimchi	6	6	6	6	6	6	6	6	6	24	34	24	16	20		
MYU 635	Lettuce	30	34	26	29	30	25	27	23	26	42	50	44	12	20		
MYU 636	Lettuce	22	27	24	22	32	19	25	22	38	32	40	32	8	18		
MYU 638	Lettuce	29	34	25	29	32	21	29	22	30	35	46	22	6	22		
MYU 639	Lettuce	20	30	6	6	20	10	8	10	21	22	25	12	6	6		
MYU 641	Uncured ham	23	36	23	24	38	22	24	22	29	30	42	38	6	20		
MYU 644	Cabbage	38	30	25	29	26	29	26	24	22	31	44	38	7	20		
MYU 645	Cabbage	32	34	28	34	38	26	27	26	32	34	44	24	6	20		
MYU 669	Pickled white radish	25	30	26	26	28	26	26	23	28	30	50	40	6	21		
MYU 673	Pickled white radish	32	36	24	26	30	24	23	22	22	34	44	42	10	19		
MYU 676	Pickled white radish	21	27	24	26	26	24	24	21	24	29	26	36	6	20		
MYU 677	Tomato	30	32	8	30	30	24	38	23	12	32	28	19	9	19		
MYU 678	Tomato	30	40	28	30	34	24	26	25	30	32	26	42	12	21		
MYU 679	Tomato	24	28	26	27	27	24	25	24	22	31	26	38	6	21		
MYU 684	Tomato	24	38	22	24	36	24	25	22	22	30	40	39	6	20		
MYU 687	Cucumber	16	6	6	6	6	11	11	11	18	6	13	6	6	6		
MYU 697	Lettuce	26	10	6	28	26	12	11	6	27	40	24	8	19	6		
MYU 698	Lettuce	24	10	6	29	25	11	12	12	25	32	24	6	18	6		
MYU 700	Lettuce	19	10	6	27	26	13	13	14	24	29	20	6	17	6		
MYU 703	Lettuce	24	10	6	27	25	10	11	11	20	30	22	10	15	6		
MYU 704	Lettuce	22	12	6	28	25	11	11	11	21	34	25	10	20	6		
MYU 728	Pickled white radish in soy sauce	23	8	6	26	25	13	10	12	25	28	18	22	16	6		
MYU 729	Pickled white radish in soy sauce	22	14	6	25	22	12	14	12	21	23	20	24	19	6		
MYU 731	Pickled white radish in soy sauce	24	11	6	27	22	10	12	13	25	30	20	22	19	6		
MYU 732	Pickled white radish in soy sauce	16	12	6	28	21	14	12	14	24	20	25	15	14	6		
	Break point	6	16	6	12	11	6	12	13	6	13	6	13	15	6		

in bold number is drug resistant

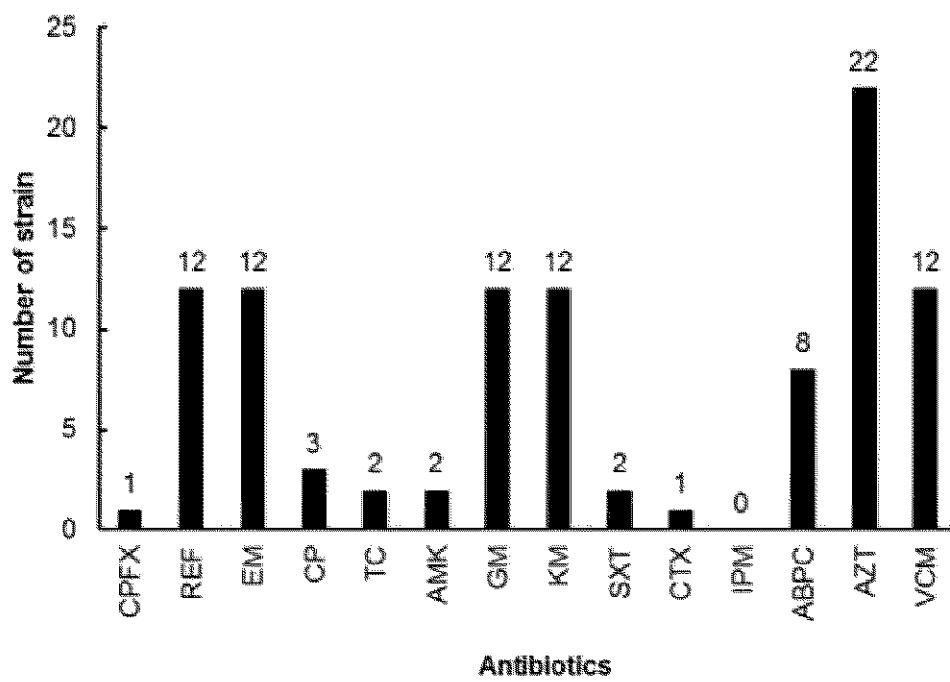


Fig. 2-2 The number of drug-resistant bacteria for each antibiotics.

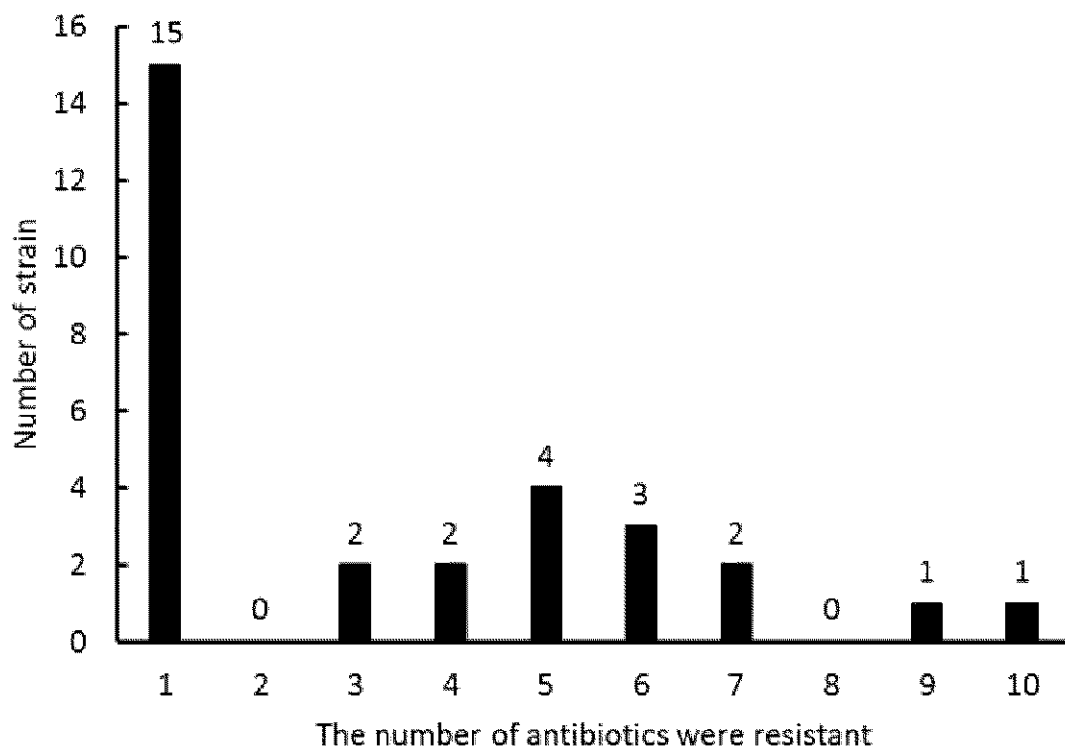


Fig. 2-3 The number of antibiotics were resistant to bacteria.

**Table 2-3 The number of strains had resistance for antibiotics**

	CPFX	RFP	EM	CP	T/C	AMK	GM	KM	SXT	CTX	IPM	ABPC	AZT	VCM
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	2
4	0	1	1	0	0	0	1	2	0	0	0	1	1	1
5	0	4	3	0	0	1	4	3	0	0	0	0	2	3
6	0	3	3	0	0	0	3	3	0	0	0	3	0	3
7	0	1	2	1	0	0	2	2	0	0	0	2	2	2
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
10	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1

※ The matrix indicate what was resistant to several types of antibiotic to another, including itself every antibiotic. For example, in CP resistant, indicated that respectively 1 strain had resistance by 7, 9, 10 types of antibiotics, including CP.



Table 2-4 The simple identification by 16S rDNA homology analysis

Strain	Species name
MYU562	Not Identified
MYU564	<i>Lactobacillus sp.</i>
MYU572	<i>Enterococcus faecalis</i>
MYU596	<i>Staphylococcus warneri</i>
MYU598	<i>Staphylococcus warneri</i>
MYU635	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
MYU636	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
MYU638	<i>Staphylococcus warneri</i>
MYU641	<i>Staphylococcus warneri</i>
MYU644	<i>Staphylococcus warneri</i>
MYU645	<i>Staphylococcus equorum</i>
MYU669	<i>Staphylococcus gallinarum</i>
MYU673	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
MYU676	<i>Staphylococcus warneri</i>
MYU677	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
MYU678	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
MYU679	<i>Staphylococcus warneri</i>
MYU684	<i>Staphylococcus warneri</i>
MYU697	<i>Citrobacter sp. / Klebsiella sp.</i>
MYU698	<i>Enterobacter sp. / Raoultella sp.</i>
MYU700	<i>Enterobacter sp. / Raoultella sp. / Serratia sp.</i>
MYU704	<i>Klebsiella sp. / Citrobacter sp.</i>
MYU728	<i>Enterobacter sp. / Raoultella sp. / Serratia sp.</i>
MYU729	<i>Pantoea sp. / Kluyvera sp. / Cedecea sp.</i>
MYU731	<i>Enterobacter sp. / Raoultella sp. / Serratia sp.</i>
MYU732	<i>Enterobacter sp. / Leclercia sp. / Pantoea sp.</i>

*Enterobacteriaceae*

**Table 2-5 Identification of multidrug-resistant bacteria and antibiotic resistance**

Strain	Species	antibiotic resistance	Number of resistance
MYU 599	<i>Bacillus</i> sp.	CPFX, RFP, EM, CP, TC, AMK, GM, KM, SXT	9
MYU 639	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	EM, CP, GM, KM, ABPC, AZT, VCM	7
MYU 687	<i>Enterobacter endosymbiont</i>	RFP, EM, CP, TC, GM, KM, CTX, ABPC, AZT, VCM	10
MYU 703	<i>Klebsiella oxytoca</i>	RFP, EM, GM, KM, ABPC, AZT, VCM	7

## 第4節 考察

本研究では、多剤耐性菌の分布調査により、食品摂取における潜在的な多剤耐性菌の感染リスクを検討した。同じサンプルから単離した菌は、同一菌株である可能性も高く、耐性菌数が見かけ上、多くなる可能性があったため、RAPD-PCRにより同一菌株を排除した。また、本試験では食品として摂取した際のリスクを評価するため、腸内での環境を考慮し、嫌気性細菌のみにターゲットを絞った。薬剤感受性試験の結果において、すべての菌株において何らかの抗菌薬に耐性を示したが、半数の15菌株は1種類の抗生物質にのみ耐性を示したため、多剤耐性菌はそれほど多くないように思える。しかしながら、それ以外の菌株では、3種類以上、多いもので10種類もの抗生物質に耐性を示した菌株があったことから、市場に出回っている食品に抗菌薬に耐性を示す菌が存在することが示唆された (Table 2-2)。抗菌薬別に見ると、AZT耐性菌株が22菌株と最も多く、そのうち15菌株が *Staphylococcus* 属であった。次いで、RFP, EM, GM, KM, VCM耐性菌がそれぞれ12菌株と単離菌の多くがこれらの抗菌薬に耐性を示した。AZTは、主に臨床的に使用される抗菌薬であり、グラム陰性菌に対して有効な抗生物質であるが、グラム陽性菌はAZT自然耐性である<sup>46)</sup>。グラム染色の結果から、AZTに耐性を示した22菌株の内18菌株はグラム陽性菌であり、また、嫌気性菌に自然耐性が多いことから<sup>46)</sup>、今回分離した多くの菌株で耐性を示したと考えられた。しかしながら、AZTに耐性を示したMYU 639株, MYU 687株, MYU 703株, MYU 732株の4菌株は、グラム陰性菌であることから後天的に耐性を獲得した可能性があると考えられた。KMは、好気性細菌が有するチャンネルにより菌体内に取り込まれるため、嫌気性細菌に効きにくいという特徴があり<sup>47)</sup>、本試験では嫌気培養により菌の単離を行ったため、耐性を示す菌株が多く検出されたと考えられた。同様に、GMも嫌気性細菌が抗菌スペクトルの範囲外であるため、耐性菌株が多く見られたと考えられた。しかし、KM, GMは共にヒトの医療現場だけではなく動物用医薬品としても使用されており、同定した4菌株のすべてもこれらの抗菌薬に耐性を示したことから、耐性を後天的に獲得した菌株が含まれている可能性が高いと考えられた。RFPはグラム陽性菌には有効であるが、耐性遺伝子の *rpoB* が *Staphylococcus* 属に見出されている<sup>48)</sup>、データには示さないが、抗菌薬の耐性試験中、MYU644株がRFP耐性

を発現し、抗菌ディスク試験において、サテライトコロニーが散見された。このサテライトコロニーを釣菌し、同様に抗菌ディスク試験に供したところ、RFP耐性が確認された。*Staphylococcus warneri* と同定された MYU644 株は、この耐性遺伝子 *rpoB* を保有している可能性が示唆された。他に、EM はグラム陰性桿菌には無効、SXT はグラム陽性球菌およびグラム陰性桿菌に有効、VCM はグラム陽性菌に有効という抗菌薬の特徴から、今回の試験結果には先天的に耐性を持っていると考えられる細菌が含まれていることが考えられた。また、本研究では ABPC 耐性菌も多く見られた。ABPC 耐性菌は畜産排水から分離した菌株に多いことが報告されており<sup>46)</sup>、耐性菌が多く見られた原因としては、GM や KM と同様にヒト用医薬品としてだけでなく、動物用医薬品としても使用されているためだと考えられた。今回の試験でヒト用および動物用医薬品としても使用されている抗菌薬は、EM、GM、KM、ABPC の 4 種類であり、これらはいずれも耐性菌が多く検出されたことから、抗菌薬の使用量との関連性が強く示唆された。また、IPM は単離菌から耐性菌が見られなかった。IPM はスペクトルがグラム陽性菌、グラム陰性菌、緑膿菌と広く、そのスペクトルの広さから、医療現場において第一選択薬としてはあまり使用されていないことが<sup>46)</sup>、今回耐性菌がみられなかった要因の一つだと考えられた。しかし、国内においてはカルバペネム系抗菌薬の使用頻度が高い<sup>49)</sup>。カルバペネム耐性の腸内細菌は、これまでの  $\beta$ -ラクタマーゼ耐性菌に対して有効とされてきたカルバペネムに耐性を示し、ひいては、あらゆる抗生物質に耐性を示すことから「悪夢の耐性菌<sup>50)</sup>」と言われている<sup>51)</sup>。カルバペネム系抗菌薬の長期間の投与が CRE 等の MDRP 感染の重要なリスクとなっている可能性があり<sup>52),53)</sup>、カルバペネム系抗菌薬である IPM の使用は、今後も十分な注意が必要である。

耐性菌株の多剤耐性を調べたところ、最も多い耐性を示した MYU 687 株は RFP、EM、CP、TC、GM、KM、CTX、ABPC、AZT、VCM の 10 種類の抗菌薬に対して耐性を示した (Table 2-2)。この株は、葉酸合成阻害以外のすべての作用機序に対して耐性を示しており、多種の抗菌薬が効きにくいことが考えられ、感染による潜在的なリスクが示唆された。菌種同定の結果、MYU 687 株は *Enterobacter endosymbiont* と同定された。本菌種は、病原性という観点においてさほどの危険性はないが、複数の作用機序の抗菌薬に対して耐性を示していることから、水平伝播によるその他の病原性細菌への耐性の付与など潜在的な

危険性が示唆された。また、本菌種は、黄砂における地上 10 メートルのバイオエアロゾルに見出されており、食品以外でも本菌種が伝播していく可能性が考えられる<sup>54)</sup>。次に多くの耐性を示した MYU 599 株は、9 種類の抗菌薬に対して耐性を示したが、感受性を示した 5 種の抗菌薬は、CTX, IPM, ABPC, AZT, VCM であり、これらの 5 種の作用機序はいずれも細胞壁合成阻害であった。このことから、本菌株は、細胞壁合成阻害に対して、耐性の獲得に作用機序も関連している可能性が示唆された。

分離した菌株の多剤耐性を調べたところ、RFP, EM, GM, KM に耐性を示した菌株の多くが 6 種類以上の抗菌薬に耐性を示した。RFP は家畜への投与は認められていないが<sup>21)</sup>、 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-7}$  の割合で自然耐性菌が存在しているという報告があり、RFP 耐性菌が多く検出された原因の一つだと考えられた<sup>55)</sup>。また、EM は畜産現場において動物用抗菌性物質としてウシ、ウマ、ブタに注射剤として使用されているため、家畜糞便を経由して市場の食品に多く検出されたと考えられた<sup>56)</sup>。多数の薬剤耐性遺伝子がゲノム上の抗菌薬耐性ゲノミックアイランドに集中的にコードされているため、遺伝子転移の際、隣の抗菌薬耐性遺伝子までもが一緒に転移していることが多剤耐性化の原因ともいわれている<sup>57)</sup>。本試験で抗菌薬の使用量と多剤耐性数の関連が示唆されたため、長期的に使用する抗菌薬はその使用量や使用回数には十分な配慮が必要であると考えられた。また、グラム陰性菌で、AZT に耐性を示した MYU 639 株、MYU 687 株、MYU 703 株の 3 菌株は、AZT 耐性を後天的に獲得したほか、EM, GM, VCM 等の自然耐性を除く複数の抗菌薬に対して耐性を示したため多剤耐性菌であることが示唆された。

菌種同定の結果、本試験では急性毒性を示すような食中毒細菌は検出されなかった (Table 2-4)。しかし、7 種類の抗菌薬に耐性を示した MYU 703 株が同定された *Klebsiella oxytoca* は、感染抵抗力の低下した入院患者に敗血症、肺炎、腹膜炎、胆道感染、尿路感染などを起こし、日和見感染の原因菌としては比較的病原性が高いと考えられる<sup>58)</sup>。さらに、Hoffmann らは、cytotoxin 産生性の *Klebsiella oxytoca* が小児における抗生物質起因性急性出血性大腸炎 (Antibiotic-associated hemorrhagic colitis: AAHC) を引き起こす原因菌であると報告しており<sup>59)</sup>、警戒すべきである。また、MYU 599 株は *Bacillus* 属と同定されたが、*Bacillus* 属細菌は好気性の芽胞形成細菌であり、多くが土壌由来とされているが<sup>60)</sup>、腸内細菌叢に

も存在が見出され<sup>61)</sup>、嫌気条件でも芽胞の発芽が確認されることから、家畜糞便山米である可能性が高いと考えられた。

本研究により、市場に出回っている食品にも多剤耐性菌が存在していることが確認された。本試験では、殺菌せずに食す機会が多いものをサンプルとして選択しており、我々は常日頃から潜在的に多剤耐性菌感染のリスクに晒されていることが明らかとなった。本研究により、食品の潜在的なリスクが明らかとなったことから、抗菌薬の使用頻度や使用量には十分配慮する必要があると考えられる。また、畜産現場や医療現場だけではなく、食品を管理する現場においても、多剤耐性菌のリスクについて何らかの対策が検討される必要があるだろう。

## 第3章 ブタ糞便における

### 薬剤耐性菌調査

---

## 第1節 緒言

現在、畜産の分野では家畜動物の病気の治療・予防，成長促進のために，抗生物質の使用が続いている。多くの抗生物質が使用される飼育環境は，抗生物質耐性菌を生み出す選択圧を高め，薬剤耐性菌ひいては，多剤耐性菌を生み出すリスクと考えられる。例えば，VRE にみられる VCM 耐性遺伝子は，かつて，家畜への給餌の際に，成長促進のために使用された AVP の乱用によって *Enterococcus* 属が耐性を獲得したと推察された<sup>15)</sup>。そのため，AVP 耐性腸球菌は，AVP と同じグリコペプチド系の抗生物質で，同じ作用機序もつ VCM にも耐性を示す結果になったと考えられている<sup>62)</sup>。家畜の飼育環境において蔓延した AVP 耐性遺伝子，つまりは VCM 耐性遺伝子が畜産物を介して，あるいは，堆肥から農作物を経由して人に感染し，現在のように蔓延したと考えられた。2010 年に WHO が各国政府に対し多剤耐性菌の対策推進を呼びかけたこともあり，我が国においても使用する抗菌薬の種類を減らすなど，家畜への抗菌薬使用について見直しが進められている。一方，乳酸菌には様々な健康保健効果が知られており，一部，抗生物質の代替品としての利用が検討されている<sup>63)</sup>。しかしながら，これらの試みは一定の効果は見られるものの，試験的な試みであり，まだまだ子豚等の幼若動物については抗菌薬に頼らざるを得ないのが現状である。そこで本章ではブタ糞使用中における多剤耐性菌の分布調査を行うことで多剤耐性菌の潜在的リスク評価を行うことを目的とした。



## 第2節 材料と方法

### 3-2-1. ブタ糞便からの薬剤耐性菌の分離と菌数測定

薬剤耐性菌の分離と分布調査の目的で、宮城県内の A 農場から 6 検体（抗生物質投与無し 3 検体、有り 3 検体）、B 農場から 2 検体（抗生物質投与有り）のブタ糞便を採取し、試験まで $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。凍結保存した試料を溶解後、ペプトン水にて段階希釈し、3 種類の抗生物質（AMK  $12\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、IPM  $12\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、CPFX  $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ）をそれぞれ単独、または混合した変法 GAM 寒天培地（口永製薬株式会社、東京）および SCD 寒天培地（日水製薬株式会社、東京）に混釈して、 $40^{\circ}\text{C}$ で 48 および 120 時間培養してコロニーを生育させ、各培地における菌数をカウントした。変法 GAM 寒天培地は嫌気条件下で、SCD 寒天培地は好気条件下でそれぞれ培養した。3 種混合培地で生育した菌については釣菌し、ブタ糞便における薬剤耐性菌を得た。

### 3-2-2. グラム染色およびカタラーゼ試験

培養菌液を遠心分離（ $8,000\ \text{rpm}$ 、5 分間、室温）で回収し、遠心洗浄（ $8,000\ \text{rpm}$ 、5 分間、室温）を行った後、菌体をフェイバー G（日水製薬株式会社、東京）にてグラム染色し、顕微鏡観察を行った。また、菌体に 30%過酸化水素水（三徳化学工業株式会社、東京）を添加し、気泡（酸素）の発生の有無を確認した（カタラーゼ試験）。

### 3-2-3. 塩化ベンジル法による DNA 抽出

遠心洗浄（ $3,000\ \text{rpm}$ 、5 分間、室温）後のペレットに抽出バッファー（ $100\ \text{mM}$  Tris-HCl, pH 9.0,  $40\ \text{mM}$  EDTA と 10% SDS を 1:5 で混合した溶液）および塩化ベンジル（関東化学株式会社、東京）を 2:1 の割合で加え、 $50^{\circ}\text{C}$ で 30 分間保温することで菌体を溶解した。溶解後、エタノール沈殿により DNA を精製し、TE 緩衝液（pH 8.0）に溶解したものを DNA 溶液とした。

### 3-2-4. RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-PCR) 法による同一菌株の排除

PCR は、KAPA Taq Extra PCR kit (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA) を用いて総量  $50\ \mu\text{L}$  の系にて行った。DNA 量は  $50\ \text{ng}$  とし、プライマーは 1254 プ

ライマー (5'-CCGCACCAA-3')<sup>42)</sup>を用いた。PCR 反応は、2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) を用いて、94°Cで2分間の後、94°Cで2分間、36°Cで5分間、72°Cで1分間を5回繰り返すことを行って、さらに94°Cで1分間、36°Cで1分間、72°Cで1分間を30回繰り返すことを行って<sup>42)</sup>。PCR 後、1.5%アガロースゲルを用いて100Vで40分間電気泳動した。ゲルは、臭化エチジウム溶液 (ナカライテスク, 京都) に10分間浸漬させ、トランスイルミネーター (BM Equipment, Upland, CA, USA) でバンドを確認した。同一サンプルから単離した菌で同じ泳動パターンを示したものを同一菌株と見なし、重複を排除した。

#### 3-2-4. 多剤耐性菌の簡易同定

3種類の抗生物質を添加した培地に生育した菌株について、16S rDNAの相同性解析を行い、属レベルの簡易同定を行った。また、多剤耐性菌は、グラム染色による顕微鏡観察、カタラーゼ試験、16S rDNA相同性解析の結果から総合的に判断し同定した。16S rDNA配列解析では、63fプライマー (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGT-3')<sup>44)</sup> および 1525rプライマー (5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC-3')<sup>45)</sup>を用いて16S rDNAの全長配列を増幅し、ダイターミネーター法を用い3130 Genetic Analyzer (Applied Bio systems, Carlsbad, CA, USA)にて配列解析を行った。配列解析の結果から得られた16S rDNAの塩基配列について、NCBI (National Center for Biotechnology Information) のBLAST (Basic Local Alignment Search Tool) プログラムにより相同性検索にて菌種同定を行った。

### 第3節 結果と考察

各培地におけるブタ糞便 1g 当たりの耐性菌数を Fig. 3-1 に示した。AMK, IPM, CPFX 3 種類の抗生物質を混合した培地はそれぞれ作用機序が異なるが、いずれの抗生物質も幅広い抗菌スペクトルを持つ広域抗菌薬であり、殺菌的に作用するという共通の特徴がある。本試験の結果、抗生物質の投与の有無、培養条件の違いに関わらず、AMK および CPFX に耐性を示す菌が多く、IPM 耐性菌は比較的少なかった。抗生物質投与区における嫌気性菌では、AMK および CPFX に対する耐性菌は抗生物質を含まないコントロールとほとんど変わらないか 1 桁低い程度であったが、抗生物質非投与区（代わりに乳酸菌を投与）では 2 桁低い結果となった。しかしながら、好気性菌ではその傾向は見られなかった。抗生物質非投与区では全体の菌数が少なかった。これは乳酸菌の産生する乳酸やバクテリオシンなどの抗菌物質によって菌の生育が抑えられていた可能性が考えられた。また、興味深いことに抗生物質非投与区の糞便からは 3 種混合培地で生育した菌は見られなかったのに対し、抗生物質投与区においては耐性菌が検出された。アミノグリコシド系抗生物質は飼料添加剤や動物用医薬品として頻用されており<sup>64)</sup>、フルオロキノロン系抗生物質も動物用医薬品として使われていることから<sup>65)</sup>、同様の作用機序を持つ AMK と CPFX に対し耐性を示す菌が多かったと考えられた。一方、カルバペネム系抗生物質は飼料や動物用医薬品としての使用は認められていないため、IPM 耐性菌は少なかったと考えられた。宮崎らはカルバペネム薬の使用量の削減と使用期間の制限により、IPM 耐性緑膿菌と多剤耐性緑膿菌の検出率が有意に低下した報告しており、抗生物質使用量と耐性菌の出現は密接に関連していることが示されている<sup>66)</sup>。さらに、第 2 章で行った食品における耐性菌分布調査においても飼料添加剤や動物用医薬品として使用されている抗菌物質に対する耐性菌が検出され、本結果とも一致する。

3 種混合培地で生育した耐性菌を 30 コロニー釣菌し、RAPD-PCR 法による重複排除の結果、24 株を分離した (Table 3-1)。これらの菌について簡易同定を試みたところ、*Cellulosimicrobium* sp. が 10 菌株、*Bacillus* sp. が 1 菌株、*Lc. lactis* が 1 菌株となった。残り 12 菌株は未同定のままであり今後同定を行っていく予定である。*Cellulosimicrobium* 属は、放線菌の一種であり堆肥などからよく分離される菌である<sup>67)</sup>。また、心内膜炎患者の血液から分離されるなどヒトへの日和見感染も見られ

る菌であり，AMK および CFX に耐性を示し，IPM についても耐性を示す菌がいることが報告されている<sup>68)</sup>。本章では，ブタの糞便から多剤耐性菌スクリーニング培地で多数の耐性菌が分離されたことから，ブタの飼育環境，特に糞便とそれを用いた堆肥化のプロセスに多剤耐性菌が存在し，ヒトに感染するリスクが危惧される。第4章ではこれらの耐性菌に対する乳酸菌の培養上清の抗菌効果について検討する。

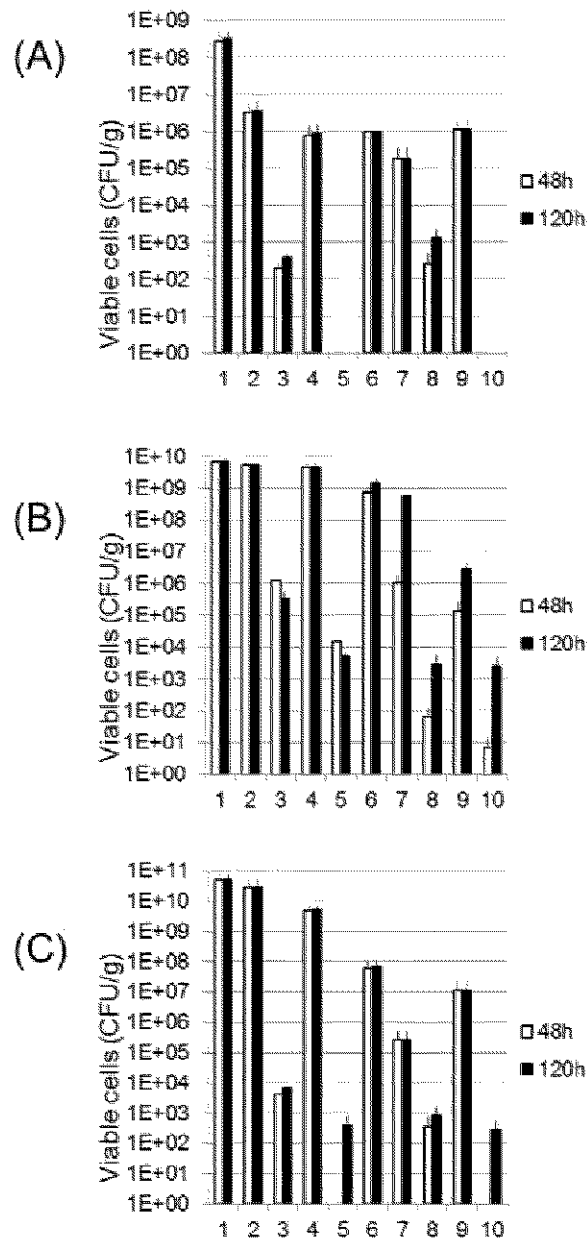


Fig. 3-1 Viable cell count of antimicrobial resistant bacteria using each growth agar containing three antibacterial drugs. Porcine feces were diluted and spread on each growth agar containing non-antibacterial drug (1 and 6), 12 mg/ml of amikacin (2 and 7), 12 mg/ml of imipenem (3 and 9), 1 mg/ml of ciprofloxacin (4 and 8), and three mix (5 and 10). The plates were incubated for 48 or 120 h at 40°C under anaerobic condition (1 - 5) or aerobic condition (6 - 10). Samples were used in (A) without antimicrobial drug administration (n=3), (B) with antimicrobial drug administration (n=3), and (C) with antimicrobial drug administration (n=2).

Table 3-1 MDROs isolated from three-mixed agar

Strain	Species	Growth agar
R01	Not identified	mGAM
R02	Not identified	mGAM
R03	Not identified	mGAM
R04	Not identified	mGAM
R05	Not identified	mGAM
R06	Not identified	SCD
R07	Not identified	mGAM
R08	<i>Cellulosimicrobium</i> sp.	mGAM
R09	<i>Cellulosimicrobium</i> sp.	mGAM
R10	Not identified	mGAM
R11	<i>Bacillus</i> sp.	mGAM
R12	<i>Cellulosimicrobium</i> sp.	mGAM
R13	<i>Cellulosimicrobium</i> sp.	mGAM
R14	<i>Cellulosimicrobium</i> sp.	mGAM
R15	<i>Cellulosimicrobium</i> sp.	mGAM
R16	<i>Cellulosimicrobium</i> sp.	mGAM
R17	Not identified	SCD
R18	<i>Lactococcus lactis</i>	SCD
R19	<i>Cellulosimicrobium</i> sp.	SCD
R20	<i>Cellulosimicrobium</i> sp.	SCD
R21	<i>Cellulosimicrobium</i> sp.	SCD
R22	Not identified	SCD
R23	Not identified	SCD
R24	Not identified	SCD

mGAM: modified GAM agar

# 第4章 乳酸菌を用いた多剤耐性 菌の殺菌効果の検討

---

## 第1節 諸言

乳酸菌には様々な機能が知られており，その一つに抗菌物質であるバクテリオシンの産生が挙げられる。バクテリオシンは，細菌によって産生され，同種または近縁種の細菌を抗菌する抗菌性ペプチドと定義される<sup>22)</sup>。バクテリオシンの一種であるナイシン A は，グラム陽性菌に対して幅広い抗菌スペクトルを持ち，優れた耐熱性，酸性から中性領域における安定性から口持ち向上剤として食品加工に応用されるなど，利用の広がりを見せている。また，他のバクテリオシン及びその生産菌は，家畜の病原菌感染予防のための抗生物質の代替品としての利用が検討されている<sup>63)</sup>。しかしながら，これらの試みは一定の効果は見られるものの，試験的な試みであり，まだまだ子豚等の幼若動物については抗菌薬に頼らざるを得ないのが現状である。バクテリオシンは基本的に細胞膜に孔を形成することによって殺菌的に働くため，耐性菌が出現しづらいという特徴がある。Severina らは，多剤耐性をもつ *Stc. pneumoniae*, *Ec. faecium*, *Ec. faecalis* にナイシンを作用させ，効果的に抗菌できたと述べている<sup>69)</sup>。しかしながら，他菌種や他のバクテリオシンにおける検証はまだ十分ではないのが現状である。そこで本研究では，900 菌株以上の乳酸菌からバクテリオシン産生株をスクリーニングし，食品やブタ腸管から分離した薬剤耐性菌に対しての抗菌効果を検証するとともに，新奇性が期待されるバクテリオシンについての特徴付けを行った。



## 第2節 材料と方法

4-2-1. 使用菌株と培養条件 バクテリオシン産生株のスクリーニングは、宮城県産業技術総合センター保有の乳酸菌 908 菌株を用いた。コントロールとしてナイシン A 産生株である *Lc. lactis* subsp. *lactis* NBRC12007 (以下 NBRC12007 株)、ナイシン Z 産生株である *Lc. lactis* subsp. *lactis* JCM7638 (以下、JCM7638 株)<sup>25)</sup>、ガセリシン A 産生株である *Lactobacillus gasseri* JCM11657(LA39)(以下 JCM11657 株)<sup>70)</sup>を用いた。

指標菌には、乳業用乳酸菌である *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002 (以下 JCM1002 株)、宮城県産業技術総合センター (以下、宮城産技セ) で笹かまぼこより分離した *Bacillus* sp. C107 株 (以下、C107 株) および分離した薬剤耐性菌を含む 13 菌株を用いた。

JCM1002 株および乳酸菌は MRS broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) を用い、30°C または 37°C で 24 時間、静置培養した。C107 株および分離した指標菌は、SCD 培地 (日水製薬株式会社、東京) を用い、37°C で 18 時間静置培養した。

### 4-2-2. 乳酸菌株の分離

乳酸菌は、平成 16 年から平成 27 年にかけて宮城産技セが宮城県内の伝統的な発酵食品、食材、植物などから分離した 908 菌株を使用した。主な分離方法は、分離源に 10 倍重量程度の滅菌生理食塩水 (0.85% NaCl) を加え、BagMixer® 400 W (inter science, Saint Nom, France) を使用して均質化し、滅菌生理食塩水に段階希釈し、懸濁液を 10 mg/L シクロヘキシミド (和光純薬工業株式会社、大阪) および 0.06% ブロモクレゾールパープル (BCP; 和光純薬工業株式会社) を加えた MRS 寒天培地に混釈して 25°C~37°C で 18~48 時間程度嫌気培養した。コロニーの釣菌は、酸生成による BCP の黄変が確認できたコロニーについて、1 サンプルにつき 8 コロニー程度とし、可能な限り、形、大きさ、色などの違うコロニーを選び、MRS broth にて 18~48 時間程度静置培養した。同一の分離源から分離されたコロニーについては、静置状態で培養液の濁り具合を見て大まかに菌株のグルーピングを判別後、塩

化ベンジル法<sup>71)</sup>にて DNA を抽出し、RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-PCR) 法<sup>72)</sup>により、増幅 DNA の泳動パターンを比較することで同一菌株を排除した。

#### 4-2-3. バクテリオシン産生株のスクリーニング

バクテリオシン産生株のスクリーニングは、JCM1002 株を指標菌とした測定にはペニシリンカップ法<sup>73)</sup>を、C107 株を指標菌とした測定には WST 法<sup>74)</sup>を用いて行った。ペニシリンカップ法では、指標菌を 0.25% となるよう接種した 0.75% MRS agar を作製し、その上にペニシリンカップ (外径 8 mm, 内径 6 mm) を静置した。次にペニシリンカップの中に培養上清 100  $\mu$ L を添加し、37°C で一晩培養後、阻止円の直径 (mm) を測定した。活性値は、抗菌活性を示さなかったものを「0」、ペニシリンカップ内のみ指標菌の生育が抑えられているものを「1」、阻止円の直径が 8 mm 以上、12 mm 未満のものを「2」、阻止円の直径が 12 mm 以上、18 mm 未満のものを「3」、18 mm 以上のものを「4」とし、5 段階で評価した。WST 法では、Microbial Viability Assay Kit-WST (株式会社同仁化学研究所, 熊本) を用いて添付のマニュアルに従い試験した。活性の有無は比色法により判定し、指標菌である C107 株の生育を示す赤褐色の発色を観察することで行った。すなわち、96 well マイクロプレートの各 well に、SCD 培地、サンプル上清およびマクファーランド No. 0.5 に調製した C107 株を加えて、37°C で 6 時間培養した。培養後、WST-8 ホルマザンを含む反応液を添加し、発色の様子を目視にて観察後、マイクロプレートリーダーにて 450 nm における吸光度を測定した。活性値は、吸光度が 2.0 以上のものを「0」、1.0 以上、2.0 未満のものを「1」、1.0 未満のものを「2」とし、3 段階で評価した。

#### 4-2-4. 分離菌株の同定

スクリーニングにより得られた菌株について、16S rDNA の相同性解析を行い、簡易同定を行った。また、多剤耐性菌は、グラム染色による顕微鏡観察、カタラーゼ試験、16S rDNA 相同性解析の結果から総合的に判断し同定した。16S rDNA 配列解析では、63f プライマー (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGT-3')<sup>44)</sup> および 1525r プライマー (5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC-3')<sup>45)</sup> を用いて 16S rDNA の全長配列を増幅し、ダイターミネーター法を用い 3130 Genetic Analyzer (Applied Bio systems, Carlsbad, CA, USA) にて配列解析を行った。配列解析の結果から得られた 16S rDNA

の塩基配列について、NCBI (National Center for Biotechnology Information) の BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) プログラムにより相同性検索にて菌種同定を行った。

#### 4-2-5. 抗菌活性試験

抗菌活性試験は、バクテリオシン産生株のスクリーニングと同様にペニシリンカップ法により行った。指標菌培養液を 0.25 % となるよう接種した 0.75 % MRS agar を作製し、その上にペニシリンカップを静置し、ペニシリンカップの中に培養上清 100  $\mu$ L を添加し、至適温度で一晩培養後、阻止円の直径 (mm) を測定した。また、コントロールとしてナイシン (100 U; Sigma-Aldorich, St. Louis, MO, USA) も同様に試験した。阻止円形状の比較は、Agar well diffusion 法<sup>75)</sup>により行った。抗菌活性試験と同様に 0.75 % MRS agar を作製し、ガラスピペットの上方末端を使用して寒天平板に直径 8 mm の well をあけ、well に 65  $\mu$ L の培養上清を添加し、37°C で一晩培養後、阻止円の形状を観察した。抗菌活性値測定は、抗菌活性試験同様、ペニシリンカップ法により行った 2<sup>n</sup> 倍ずつ希釈した培養上清 100  $\mu$ L をペニシリンカップに添加し、同様の条件で培養後、阻止円の形成の有無を観察した。阻止円が形成される最大希釈倍率を上清 100  $\mu$ L 当たりの抗菌活性値 (A.U./100  $\mu$ L) とした。

#### 4-2-6. バクテリオシンの特徴付け

バクテリオシンの特徴付けは、JCM1002 株を指標菌にして行った。培養上清を下記のとおり処理した後、抗菌活性試験を行った。中性化処理では NaOH を用いて pH を 6.2 に調整した。プロテアーゼ処理では、10 mM CaCl<sub>2</sub> 含有 20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) に培養上清と等量混合した場合のアクチナーゼ E (科研製薬株式会社、東京) の終濃度が 1 mg/mL になるように溶解して 37°C で 18 時間作用させた。また、プロテアーゼに耐性を示したサンプルについて、同緩衝液を用い、培養上清と等量混合した場合のアクチナーゼ E の終濃度が 0 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 4 mg/mL, 8 mg/mL, 16 mg/mL になるようにそれぞれ溶解し、37°C で 18 時間作用させ、抗菌活性値を測定した。さらに、活性が残ったサンプルについては、1 週間、37°C を維持し、抗菌活性値を測定した。また、熱処理では 121°C, 15 分間のオートクレーブ処理を行った。結果は阻止円の直径 (mm) で示した。

#### 4-2-7. ヒートマップ・デンドログラムの作成

乳酸菌上清の抗菌活性について、群間比較を行う目的でクラスタリング解析に供した。JCM1002株は、未処理での結果に加え、熱処理、pH処理、プロテアーゼ処理した培養上清での結果も使用した。解析プログラムは、R (Ver.3.1.2) を使用した。抗菌活性試験によって得られた阻止円直径を  $r$ 、乳酸菌上清ごとの阻止円直径の平均値  $\mu_{sup}$ 、乳酸菌上清ごとの阻止円直径の標準偏差を  $\sigma_{sup}$  とし、各乳酸菌上清について  $(r - \mu_{sup}) / \sigma_{sup}$  を求め、得られた値についてウォード法によるクラスタリング解析を行い、乳酸菌上清と指標菌のヒートマップ・デンドログラムを作成した。

#### 4-2-8. バクテリオシンの部分精製

バクテリオシンの部分精製は下記の通りに行った。まず、余計な培地成分を除くために SCD 培地を分画分子量 (MWCO) 3,500 の透析膜で透析し、透析外液を用いて菌の培養を行った。培養液を遠心分離 (3,000 rpm, 15 min) した後、得られた上清を MWCO 6,000-8,000 の透析膜を用いて一晚透析し、透析膜内液を逆相カラムクロマトグラフィーに供した。カラムは、Bond Elut C18 (C18; Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA) および Oasis HLB (HLB; Waters, Milford, MA, USA) を使用した。まず、上清を C18 カラムに通過させた後、蒸留水および 30% イソプロピルアルコール (IPA; 和光純薬工業株式会社) で洗浄後、40%、50% および 60% IPA で溶出した。溶出液を遠心真空乾燥機で乾燥させ、10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.4) に再溶解し、HLB カラムに供した。次いで、蒸留水、IPA、アセトニトリル (AcCN; 和光純薬工業株式会社) を用いて 10% ずつの濃度勾配 (10%~90%) でステップワイズ溶出した。活性が確認できたものについて、SDS-PAGE および *in situ* 抗菌活性試験を行った。

#### 4-2-9. SDS-PAGE および *in situ* 抗菌活性試験によるバクテリオシン分子量の推定

部分精製により得られた抽出物のうち、抗菌活性が認められたサンプル 10 mL を乾燥し、50  $\mu$ L の SDS 化試薬で処理後、トリシンを使用した SDS-PAGE に供した。各サンプルは 10  $\mu$ L ずつウェルに添加し (ナイシンは 5  $\mu$ L)、2 枚のゲルに対して 40 mA 通電し、280 分間電気泳動した。マーカーは、Amersham ECL Rainbow

Molecular Weight Markers (GE Healthcare, Little Chalfont, England) を使用した。泳動終了後、2枚のうち1枚のゲルはCBB染色し、もう1枚は、JCM1002株を添加した軟寒天培地上に静置し、37°Cで一晩培養した (*in situ* 抗菌活性試験)。培養後、阻止帯から選抜株のバクテリオシンの分子量を推定した。

### 第3節 結果と考察

Table 4-1には、第2章及び第3章で分離された抗生物質耐性菌のうち、バクテリオシンの抗菌スペクトルの範囲を考慮して、中心に食品から10菌株、ブタ糞便から3菌株の計13菌株を選抜した。第2章で選抜し、抗生物質に耐性を示さなかった *Staph. epidermidis* MYU636株と *Staph. warneri* MYU644A株は、*Staphylococcus*属におけるコントロール株として使用した。*Staph. warneri* MYU644B株は、MYU644A株のRFP耐性試験中に、サテライトコロニーから分離された。本菌株は、RFP耐性を示したことから試験中に耐性を獲得したと考えられた。今回スクリーニングした細菌には、VREやMRSAなど、感染により重篤な症状を引き起こすリスクになる菌種は確認できなかった。しかしながら、アミノグリコシド系抗生物質（AMK, GM, KM）に耐性を持つ *Ec. faecalis* MYU572株や、試験に供した14種類の抗生物質中9種類に耐性を示した *Bacillus* sp. MYU599A株やMYU599B株が分離されており、多剤耐性菌が非加熱で喫食する食品中に存在することが示唆された。

乳酸菌（908菌株）の培養上清を用いた抗菌活性試験の結果をTable 4-2にまとめた。JCM1002株に対して抗菌活性を示した菌は373株で、41.1%であった。8 mm以上の阻止円（活性レベル「2」以上）が見られた菌株は125株（13.8%）であった。また、C107株に対して抗菌活性を示した菌は461株（50.8%）であり、その内、317菌株（34.9%）は高い抗菌活性を示した。本試験結果より、JCM1002株に対して高い抗菌活性（活性レベル「3」以上）を示し、かつ、C107株に対してもレベル「2」以上の抗菌活性を示した株を中心に、27菌株を選抜した（Table 3）。これらの菌株のうち、MBR648株、MBR652株、MBR653株、MBR655株、MBR656株、MBR707株、MBR708株、MBR709株、MBR710株、MBR711株、MBR736株、MBR738株、MBR739株は宮城県栗原市栗駒山にある世界谷地原生花園のコバギボウシ（*Hosta sieboldi*）およびエゾオヤマリンドウ（*Gentiana triflora*）から特別に許可を得て分離された菌株であり、菌種同定を行った結果、同定できなかったMBR736株を除いて、いずれも *Lc. lactis*であった。*Lc. lactis*は数多くの菌株でバクテリオシンの報告がなされており、世界50カ国以上で食品保存料として使用されているナイシンAも *Lc. lactis*が生産するバクテリオシンである。また、それ以外の分離源から分離した乳酸菌株の多くが *Lc. lactis*であった。今後詳細な解析が必要ではあるが、世界谷地の植物から分離した *Lc. lactis*はバクテリオシンを産生している可能性が高く、分離

源の特殊性から新奇バクテリオシンの可能性も示唆された。

Table 4-3には、様々な条件で乳酸菌培養上清を処理した後のJCM1002株に対する生育阻止円の直径を示した。培養上清は、中性化処理で活性が減少しなかったグループと活性が激減したグループに大別された。活性が減少しなかったグループ（MBR21株, MBR286株, MBR648株, MBR652株, MBR653株, MBR655株, MBR656株, MBR738株, MBR739株, MBR826株, MBR832株, MBR837株）は、プロテアーゼで活性が消失し、121°C、15分間の加熱処理でも強い活性を維持するという共通点が見られた。これはナイシンA産生株であるNBRC12007株の培養上清と同じ挙動であった。本グループは、ほとんどの株が*Lc. lactis*であることから、ナイシン様抗菌物質を産生していることが強く示唆された。一方、中性化により活性の消失が認められたグループは、さらに耐熱性のペプチド性グループ（MBR479株, MBR514株, MBR707株, MBR708株, MBR711株, MBR736株, MBR921株）、熱感受性のペプチド性グループ（MBR325株, MBR709株, MBR710株）、その他（MBR756株, MBR919株, MBR920株, MBR922株）に分けられた。興味深いことにMBR916株は、どのグループにも属さず、すべての処理（pH、プロテアーゼ、熱）の影響を受けなかった。同様の特徴を示したサンプルは、コントロールとして用いた市販の精製ナイシンとガセリシンA産生株（JCM11657株）の培養上清のみであった。市販のナイシンを用いてナイシンの標準溶液（1,000 U/mL）をナイシン試験法<sup>76)</sup>の「ナイシン標準液の調製」に準じて調製すると、室温で十分に攪拌しているにもかかわらず、不溶化したとみられる粒子が溶液中に分散していることが確認された。また、ナイシンA産生株のNBRC12007株の上清はプロテアーゼ処理で活性が完全に消失したことから、市販の精製されたナイシンは、一部不溶化してプロテアーゼが作用しにくくなっている可能性が示唆された。一方、MBR916株の培養上清は、不溶化も見られず、環状バクテリオシンであるガセリシンAを含むJCM11657株の培養上清と同様にプロテアーゼを作用させた後も作用前と同等の活性を保持していたことから、環状化などによりプロテアーゼの作用を受けにくい構造を有している可能性が示唆された。Fig. 4-1に、ナイシン標準液、JCM11657株上清、MBR916株上清について、プロテアーゼに対する耐性を評価するために、終濃度16 mg/mLまでのアクチナーゼEを同様に作用させ、抗菌活性値を測定した結果を示した。ナイシン標準液とJCM11657上清は、アクチナーゼE濃度がそれぞれ1 mg/mL、2 mg/mLまで高い活性を維持したが、それ以上のアクチナーゼE濃度で失活した。一方、MBR916株上清は、

アクチナーゼ濃度に依存して活性の低下傾向が示されたものの、アクチナーゼE濃度を16 mg/mLで作用させた場合においても高い活性を維持し、1週間の作用期間を経ても微弱な活性が残存した。MBR916株により産生される抗菌物質は、プロテアーゼの作用により活性が低下したことから、ペプチド性の抗菌物質、つまり、バクテリオシンであると示唆された。さらに、ナイシン標準液、JCM11657株上清との比較から、MBR916株のバクテリオシンは、アクチナーゼEに対して高い耐性を有することが示唆された。Fig. 4-2にMBR916株、NBRC12007株、JCM7638株、JCM11657株の各上清により得られた生育阻止円の写真を示した。生育阻止円の形状を比較すると、NBRC12007株およびJCM7638株の培養上清の阻止円は境界部がはっきりしているのに対し、MBR916株、JCM11657株では境界部が不鮮明であるという特徴の違いが見られた。Fig. 3には上清100  $\mu$ Lの活性値を測定した結果を示した。MBR916株の上清は、NBRC12007株、JCM7638株の上清とほぼ同値の活性値を有していることが示唆された。これにより、阻止円境界部分の不鮮明さは、バクテリオシンの活性値の差異によらず、バクテリオシンの生化学的性状によるものであると考えられた。

Table 4-4には、乳酸菌培養上清の耐性菌群への抗菌効果について示した。コントロールとして用いたナイシンはグラム陽性菌には有効であるが、*Ec. faecalis* MYU572A株や*Bacillus* sp. R11株のようにほとんど効かない菌もあった。*Cellulosimicrobium* sp. R08株は、選抜乳酸菌の培養上清で生育が強く阻害された。特徴的なものとしてMBR738株の培養上清は、他の培養上清と比較して、*Lc. lactis* R18株に対する抗菌活性が著しく高かった。それ以外にも、ナイシンと比較して抗菌活性が高い培養上清が多く見られた(MBR656株、MBR711株、MBR921株など)。また、MBR325株のバクテリオシンは、活性自体は微弱であったが供試したすべての耐性菌に有効であった。これらの結果からMBR325株、MBR916株、MBR921株など複数の培養上清を組み合わせることで幅広い多剤耐性菌の殺菌に有効である可能性が示された。

Fig. 4-4には、阻止円の直径により作成したヒートマップ・デンドログラムを示した。デンドログラムにより、乳酸菌の培養上清は2つの大きなクラスターに分けられ、ナイシン様バクテリオシンを産生していると思われる上清が同じクラスターを形成した。本クラスターは、乳酸菌群への抗菌活性が強い傾向にあることが示唆され、MBR916株も本クラスターに分類された。一方、中性化により抗菌活性が低



下した上清のクラスターは、*Bacillus* 属や *Staphylococcus* 属への抗菌活性が高い傾向が見られ、これらの乳酸菌により産生される抗菌物質は、ナイシン様抗菌物質とは異なることが示唆された。一方、ナイシン様抗菌物質のクラスターは、乳酸菌に対して比較的高い抗菌性を示しているが、*Bacillus* 属や *Staphylococcus* 属に対して抗菌性が低い傾向にある。よって、これらの微生物を抗菌するためには、中性化により活性が低下したクラスターに属する乳酸菌の抗菌物質が有効であると考えられた。このクラスターの乳酸菌は、属種が未同定であるが、顕微鏡により形状を観察すると、双状に連結した球菌であったため、*Lactococcus* 属、*Leuconostoc* 属、*Enterococcus* 属、*Streptococcus* 属、*Pediococcus* 属などの乳酸球菌であると考えられた。*Leuconostoc gelidum* UAL 187 株により産生されるバクテリオシンの leucocin A は、pH 2~5 の酸性条件下での活性を有し、*Listeria* 属に抗菌効果を示すが、pH 5 以上では失活することが報告されている<sup>77)</sup>。他にも、pediocin AcH および pediocin 様バクテリオシンは、酸性条件下においてバクテリオシンと指標菌の細胞膜にある酸性リン脂質の相互作用により抗菌効果を示すことが知られている<sup>78), 79)</sup>。今後、未同定の菌株の同定を行い、バクテリオシンの新奇性の検討を含めた詳細な解析を進めていきたい。

MBR916 株のバクテリオシンは、クラスター解析ではナイシン様バクテリオシンに分類された。しかしながら、前述したように阻止円の特徴が異なること、プロテアーゼに対して高い活性を示すなど非常にユニークな特徴を示したことから新奇バクテリオシンである可能性が示唆された。そのため、本バクテリオシンを部分精製し SDS-PAGE および *in situ* 抗菌活性試験にて分子量の推定を試みた (Fig. 5)。その結果、70-90% IPA 抽出物において生育阻止帯が観察された (Fig. 5B)。MBR916 株のバクテリオシンは、ナイシン A (分子量 3354) より分子量が大きく、4,200 を示した。しかしながら、これはあくまでも泳動度から計算した推定値である。Kawai らは、環状バクテリオシンであるガセリシン A の実際の分子量は 5,652 であるにも関わらず、SDS-PAGE で分子量 3,800 付近に泳動されたと報告している<sup>70)</sup>。これは、環状構造ゆえに、SDS が作用しても他の直鎖のペプチドのような分子の伸展が起こらず、SDS-PAGE における見かけの分子量が低下したと考えられた。本試験ではバクテリオシンの精製初期に MWCO 6,000-8,000 の透析膜で透析を行った。透析外液には、内液とほぼ同量の蒸留水を用いたが、透析外液にバクテリオシンの活性は確認できなかった。つまり、MBR916 株のバクテリオシンは、MWCO 6,000-

8,000 の透析膜を通過できないと考えられた。このことから、MBR916 株のバクテリオシンは、透析膜に付着しやすいか、他の分子と結合あるいは自己凝集により、分子量 8,000 以上の分子構造になっている可能性が考えられた。しかしながら、バクテリオシンの分子単体では、SDS-PAGE において分子量 4,200 と示されたため、今後、正確な質量を TOF-MS 解析で決定していく予定である。また、本バクテリオシンの阻止孔の大きさはナイシン (10 mg/mL, 2  $\mu$ L 添加) より大きかったが、SDS-PAGE において明確なバンドを得ることができなかった (Fig. 4-5A)。これはナイシン A に比べて活性値が非常に大きいのか、芳香族アミノ酸が少なく CBB では染色されにくいことが考えられたが、銀染色でも染色されなかったことから、非常に少量で強い活性を示す可能性が高いと考えられた。

*Lc. lactis* が産生するバクテリオシンはナイシン A、ナイシン Z のほか、ナイシン Q、ラクチシン 481、ラクトサイクリシン Q、ラクトコッシン Q など様々なものが報告されている<sup>80),81)</sup>。MBR916 株について、既知のバクテリオシン構造遺伝子<sup>82)</sup> (ナイシン、ラクチシン 3147、ラクチシン 481、ラクチシン Q<sup>83)</sup>、ラクトコッシン 972、ラクトコッシン A、ラクトコッシン B、ラクトコッシン M、ラクトコッシン G、ラクトコッシン Q、ラクトサイクリシン Q<sup>84)</sup>、バクテリオシン J46<sup>85)</sup>) を増幅できる 12 種類のプライマーペアにて遺伝子の検出を試みたがいずれのプライマーペアでも増幅は確認できなかった (データ示さず)。これらのことから MBR916 株のバクテリオシンは新奇バクテリオシンである可能性が示唆された。現在、本バクテリオシンの完全精製を試みており、アミノ酸の一次構造等を決定し、バクテリオシンの同定を行う予定である。

本研究では、多剤耐性菌を乳酸菌バクテリオシンにより殺菌できる可能性が示された。特に MBR916 株のバクテリオシンは、抗菌スペクトルが広く、pH、プロテアーゼ、熱安定性も非常に高いため、多剤耐性菌の発生を抑える機能性家畜飼料の開発へと繋がる有用なバクテリオシンである可能性が示された。現在、菌叢解析により、実際にバクテリオシンがブタ糞便中で多剤耐性菌を効果的に抑えることが可能かを検証している。

Table 4-1 The indicator bacteria for bacteriocin assay used in this study

Strain	Species	Source	Antibiotic resistance
JCM1002	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bluganicus</i>	Milk	-
C107	<i>Bacillus</i> sp.	Surimi (Fish Cake)	-
MYU562	Not identified (Staphylococci)	Cucumber Karashizuke	GM, KM, ABP C
MYU564	<i>Lactobacillus sakei</i>	Cucumber Karashizuke	SXT, VCM
MYU572A	<i>Enterococcus faecalis</i>	Wasabizuke	RFP, AMK, GM, KM,
MYU598	<i>Staphylococcus warneri</i>	Kimchi	KM
MYU599B	<i>Bacillus</i> sp.	Kimchi	CPFX, RFP, EM, CP, TC, AMK, GM, KM, SXT
MYU599C	<i>Bacillus</i> sp.	Kimchi	CPFX, RFP, EM, CP, TC, AMK, GM, KM, SXT
MYU636	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Lettuce	Undefined
MYU644A	<i>Staphylococcus warneri</i>	Cabbage	Undefined
MYU644B	<i>Staphylococcus warneri</i>	Cabbage	RFP (induction)
MYU677	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Tomato	EM, SXT
R08	<i>Cellulomonas</i> sp.	Feces (swine)	CPFX, AMK, IPM (Screened by antibiotic medium)
R11	<i>Bacillus</i> sp.	Feces (swine)	CPFX, AMK, IPM (Screened by antibiotic medium)
R18	<i>Lactococcus lactis</i>	Feces (swine)	CPFX, AMK, IPM (Screened by antibiotic medium)

GM: gentamicin, KM: kanamycin, ABP C: ampicillin, SXT: trimethoprim/sulfamethoxazole, VCM: vancomycin, RFP: rifampicin  
 AMK: amikacin, CPFX: ciprofloxacin, EM: erythromycin, CP: chloramphenicol, TC: tetracycline, IPM: imipenem

Table 4-2 The result of antibacterial test using LAB culture supernatants

Activity levels	Number of strains (%)	
	Penicillin cup (PC) method Against <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>blagaricus</i> [CM1.002]	WST-8 formula colorimetric (WST) method Against <i>Bacillus</i> sp. C1.07
0	535 (58.9)	447 (49.2)
1	248 (27.3)	144 (15.9)
2	96 (10.6)	317 (34.9)
3	19 (2.1)	—
4	10 (1.1)	—
Total	908 (100)	908 (100)

Level 0 : In PC method, no inhibition circle. In WST method, absorbance at 450 nm was greater than or equal to 2.0.

Level 1 : In PC method, inhibit only in the penicillin cup, In WST method, absorbance at 450 nm was greater than or equal to 1.0 less than 2.0.

Level 2 : In PC method, diameter of inhibition circle greater than or equal to 8 mm less than 12 mm, In WST method, absorbance at 450 nm was under 1.0.

Level 3 : In PC method, diameter of inhibition circle greater than or equal to 12 mm less than 18 mm.

Level 4 : In PC method, diameter of inhibition circle greater than or equal to 18 mm.

Table 4-3 The inhibition arde diameter measured from a nitro-bacterial assay for culture supernatants of selected LAB against *Lb. delbrueckii* subspecies *bulgarius* JCM 002 after pH-, protease- and heat-treatments (unit:mm).

Sample	Species	Substrate	Non-fermentant (acidic condition)	pH adjusted at 6.2	Non-protease treatment	Protease treatment (Ac binase E)	Heat treatment (121°C, 15 min)
Nisin A (100 U)	-	-	28	28	22	21.5	26
M BR12007	<i>Lactococcus lactis</i> (Nisin A producer)	-	25	25.5	19.5	0	22.5
CM11657	<i>Lactobacillus sakei</i> (Glucosylase A producer)	-	18	18	14	13	18
M BR21	<i>Lactococcus lactis</i>	cutting apple	21	23	23	0	20.5
M BR236	<i>Lactococcus lactis</i>	sake brewery	24	22	23	0	20.5
M BR235	not identified (cocciid lactic acid bacteria)	meat processing plant	14	0	19	0	0
M BR279	not identified (cocciid lactic acid bacteria)	eggplant (raw)	22	22	13	0	13
M BR314	<i>Lactococcus lactis</i>	misuzake	17	12.5	8	0	8
M BR648	<i>Lactococcus lactis</i>	flower (Hosta sieboldii)	25	24	24	6	22
M BR652	<i>Lactococcus lactis</i>	flower (Hosta sieboldii)	25	23.5	23	0	21.5
M BR653	<i>Lactococcus lactis</i>	flower (Hosta sieboldii)	23.5	19.5	23	8	22
M BR655	<i>Lactococcus lactis</i>	flower (Hosta sieboldii)	25.5	22	24	8	22
M BR656	<i>Lactococcus lactis</i>	flower (Hosta sieboldii)	25.5	22.5	24	6	22
M BR707	not identified (cocciid lactic acid bacteria)	spring water	22	11.5	17	0	14.5
M BR708	not identified (cocciid lactic acid bacteria)	spring water	20.5	9	12	0	9.5
M BR709	<i>Leuconostoc lactis</i>	seawater	18	0	8	0	0
M BR710	<i>Leuconostoc</i> sp.	seawater	18	0	8	0	0
M BR711	not identified (cocciid lactic acid bacteria)	seawater	18	0	8	0	10
M BR736	not identified (cocciid lactic acid bacteria)	flower (Gentiana triflora)	16.5	6	8	0	6
M BR738	<i>Lactococcus lactis</i>	flower (Gentiana triflora)	24.5	23	24	0	22.5
M BR739	<i>Lactococcus lactis</i>	flower (Gentiana triflora)	23.5	21.5	24	0	23
M BR826	<i>Lactococcus lactis</i>	raw milk	24	22.5	23	0	23
M BR832	<i>Lactococcus lactis</i>	raw milk	25	22.5	28	0	24
M BR837	<i>Lactococcus lactis</i>	raw milk	24	21	24	0	27
M BR916	<i>Lactococcus lactis</i>	huckleberry	23.5	21.5	22	20	29
M BR919	not identified (cocciid lactic acid bacteria)	seawater	23	9.5	0	0	0
M BR920	not identified (cocciid lactic acid bacteria)	seawater	22.5	8	0	0	0
M BR921	not identified (cocciid lactic acid bacteria)	seawater	21	0	6	0	10.5
M BR922	not identified (cocciid lactic acid bacteria)	seawater	20	11	0	0	6
M BR756	<i>Lactobacillus zeae</i>	raw milk	8	0	0	0	13

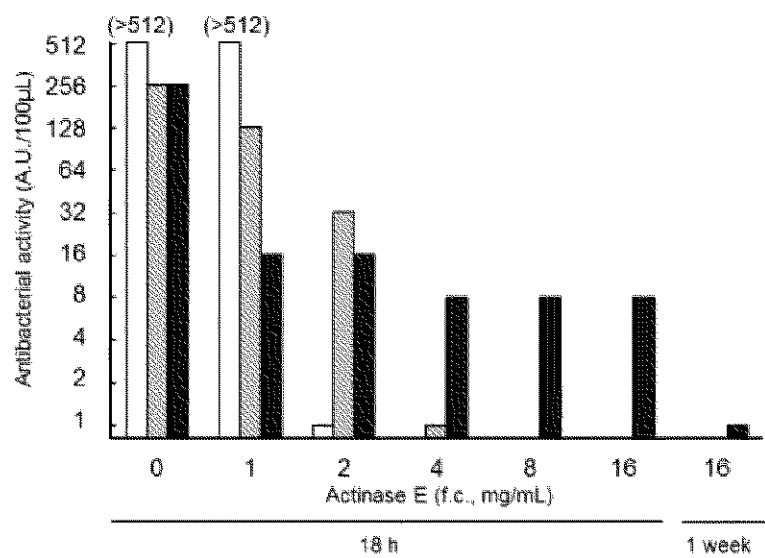


Fig.4-1 Comparison of the antibacterial activities (A.U./100 µ L) after protense (Actinase E) treatment (37°C, 18h).  
 Bar; □: Nisin standard solution (1000 U/mL), ▨: JCM11657 supernatant, ■: MBR916 supernatant

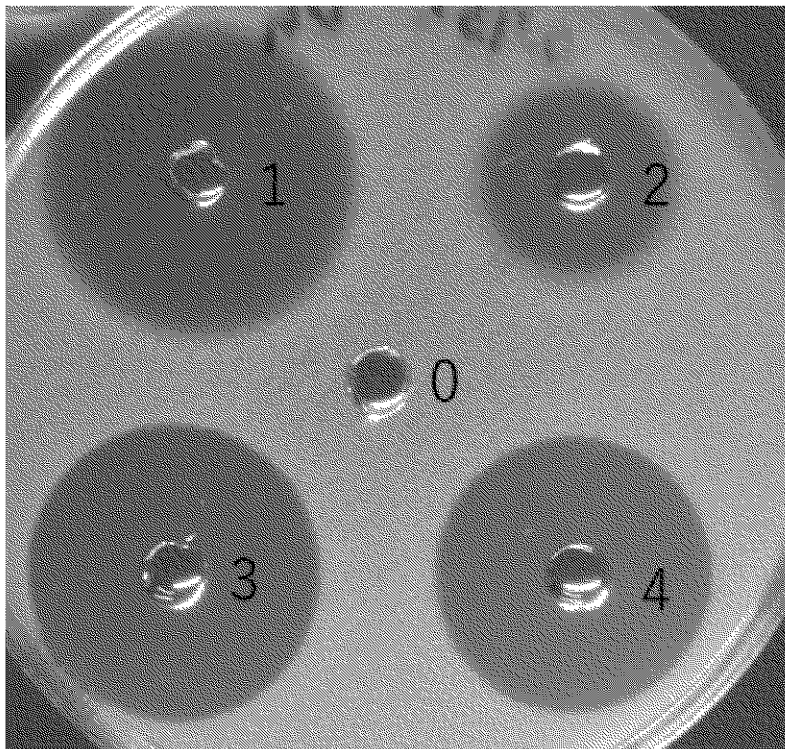


Fig. 4-2 Comparison of the growth inhibition ring boundaries obtained by the agar well diffusion method.  
0: Negative-Control (SCD broth), 1: MBR916, 2: JCM11657 (gassericin A), 3: NBRC12007 (nisin A), 4: JCM7638 (nisin Z).

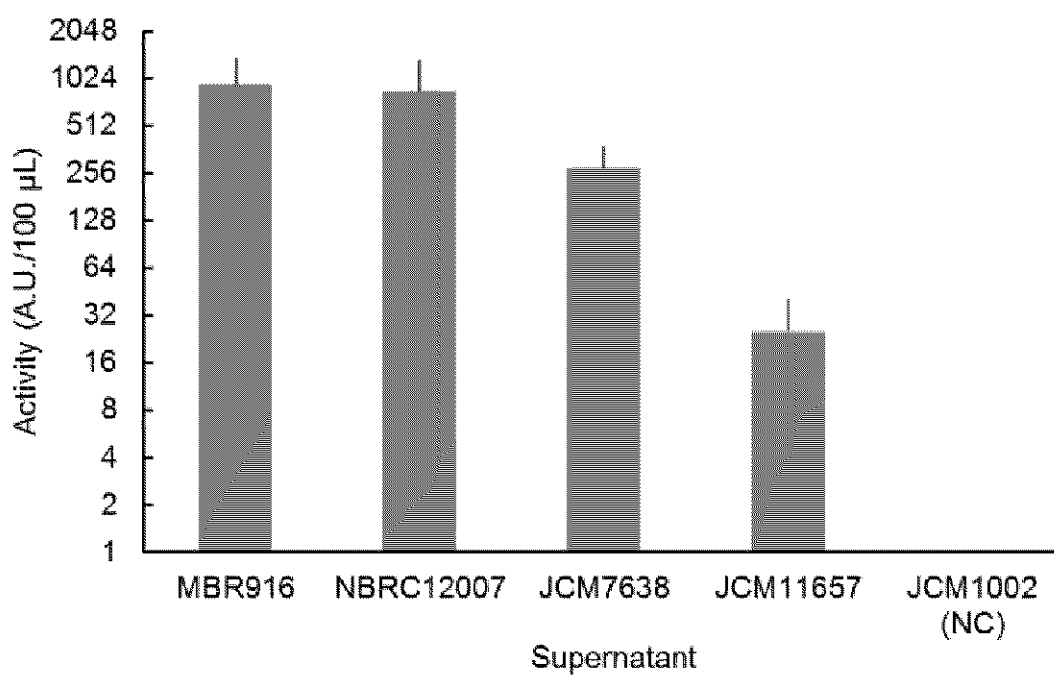


Fig. 4-3 Antibacterial activities (A.U./100  $\mu$ L) of the culture supernatants measured by the stepwise dilution (2n) method. A.U. is an arbitrarily unit. NC is the supernatant of JCM1002 (indicator).



Table 4-4 The inhibition circle diameter measured from anti-bacterial assay for culture supernatants of selected LAB against the drug-resistance bacteria (unit: mm).

Sample	Serain No. of the indicator bacteria																R08	R11	R18
	MYU562	MYU564	MYU572A	MYU598	MYU599B	MYU599C	MYU636	MYU644A	MYU644B	MYU677A									
Minin A (1000)	8	6	0	8	6	6	6	8	8	8	9	9.5	16.5	17	NT	8			
ICM1657	NT	8	8	NT	NT	9.5	9	10	10.5	10.5	10.5	17	NT	10.5					
MBR21	10.5	6	10.5	8	6	6	11	6	0	9	21	0	14						
MBR286	10	6	9.5	8	6	6	11	6	0	8.5	20	0	13.5						
MBR325	9.5	6	8	6	6	6	8	6	6	6	6	6	6	6	6	6			
MBR479	10.5	6	0	8	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6			
MBR514	9	6	0	6	6	6	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8			
MBR648	10	10	10	8	6	6	8	8	8	8	9	9	23	0	14				
MBR652	11	9	10.5	8	6	6	12	6	6	6	10	21.5	0	13.5					
MBR653	10	6	9.5	8	6	6	12	8	8	8	9	22	0	14.5					
MBR655	10	6	9.5	8	6	6	12	8	8	8	9	21	0	13.5					
MBR656	10	8	9.5	8	6	6	12	8	6	6	10	21.5	0	14					
MBR707	9	0	9.5	6	6	6	9	6	6	6	14	0	14						
MBR708	9	0	0	0	0	0	8	0	0	0	15	8							
MBR709	6	6	0	6	6	6	8	8	8	8	13	0	8						
MBR710	9	6	0	6	6	6	8	8	8	8	13	0	8						
MBR711	12	8	0	8	6	10	11	9.5	10	9	18.5	8							
MBR736	10.5	0	0	6	6	6	8	8	6	6	13	0	6						
MBR738	11	9.5	9.5	8	6	6	11.5	6	6	6	10	21.5	0	24					
MBR739	10	8	9	8	6	6	10.5	6	6	6	21	0	14						
MBR826	10	8	10	8	6	6	10	6	6	6	19	0	9						
MBR832	9	8	9	8	8	8	10	6	6	6	19	0	9						
MBR837	9	10	9.5	8	6	6	10	6	6	6	19	0	8.5						
MBR916	10	6	10	8	6	6	10.5	8	8	8	22.5	0	13						
MBR919	10	0	0	7	6	6	6	6	8	7	11	0	8						
MBR920	10	0	0	6	6	6	6	6	6	6	11	0	8						
MBR921	13	8	0	8	9	11.5	9.5	11	10.5	10	21.5	0	8						
MBR922	10.5	0	0	8	6	6	0	8	6	6	12	0	8						
MBR956	NT	NT	0	NT	NT	10	NT	NT	NT	NT	19	0	8						

NT: not tested

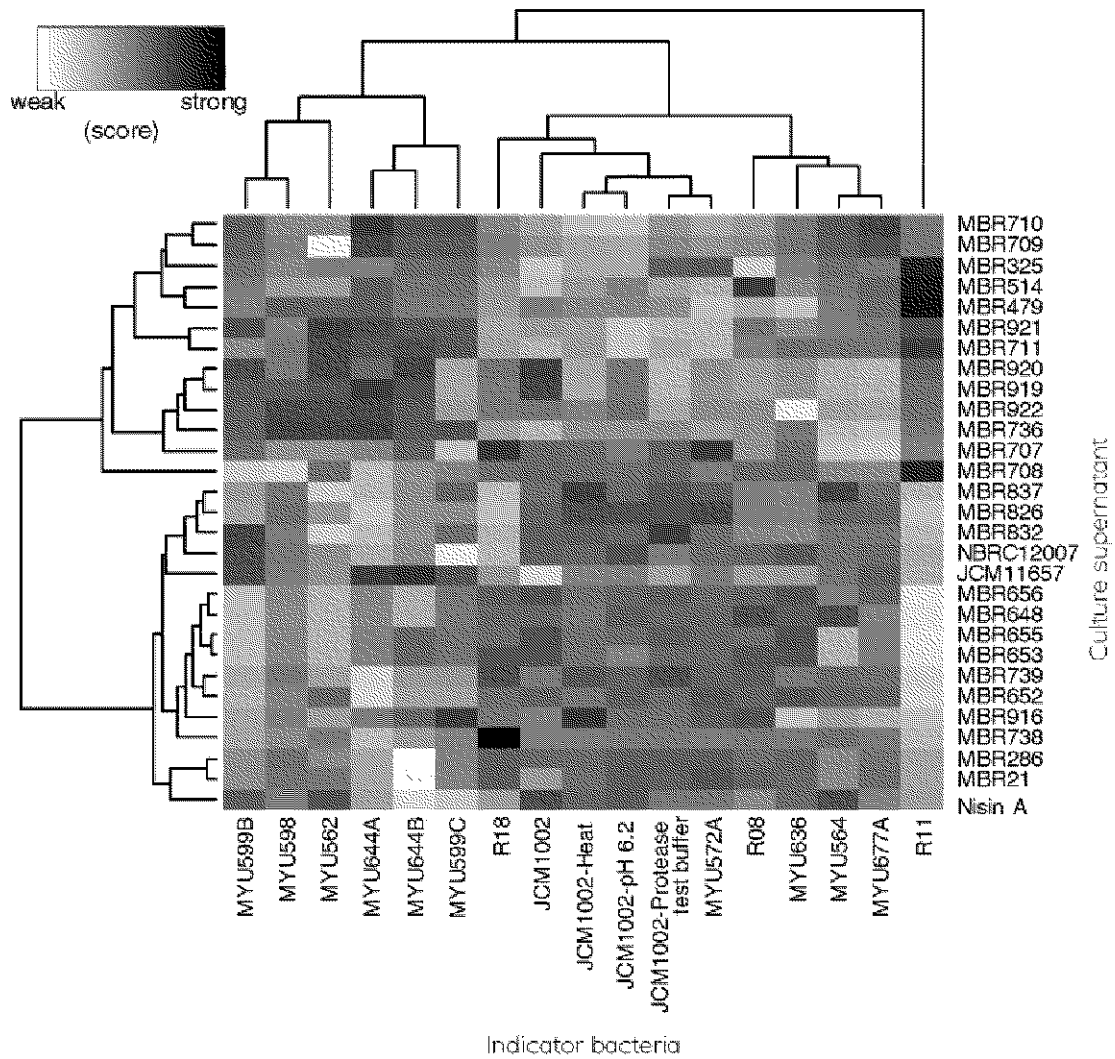


Fig4-4 Heat-map dendrogram in the antibacterial assay against drug-resistance bacteria. JCM1002: using an untreated sample, JCM1002-Heat, pH 6.2 or Protease test buffer: using a heat-, pH 6.2- or non-protease treated sample, respectively.

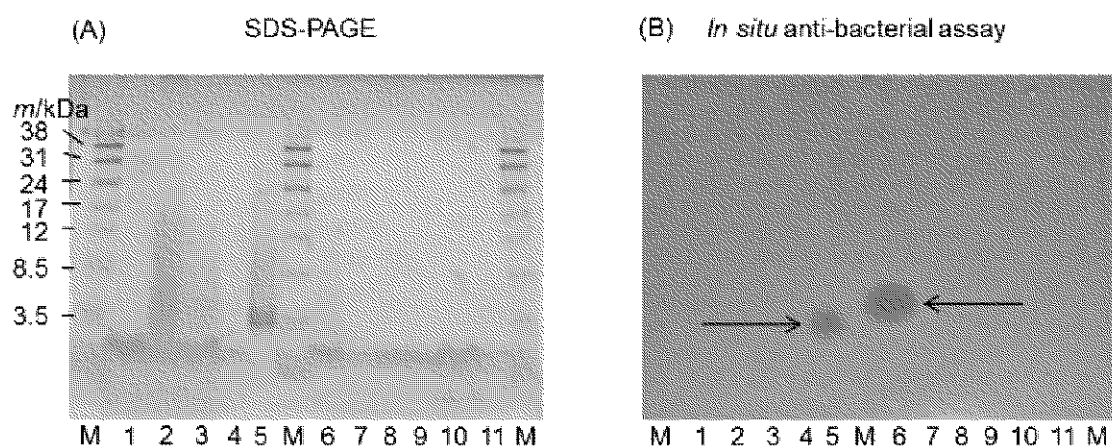


Fig.4-5 SDS-PAGE (A) and in situ antibacterial assay (B) after column chromatography.

M: molecular weight markers, 1: the permeate of HLB column, 2: water and 10-20% IPA extract, 3: 30% IPA extract, 4: 40-60% IPA extract, 5: nisin A standard (10 mg/ml), 6: 70-90% IPA extract, 7: 30% AcCN extract, 8: 60% AcCN extract, 9: 90% AcCN extract, 10: MeOH extract, 11: 40-60% IPA extract after reverse-phase chromatography. The arrows indicate clear zones.

第5章 プロテアーゼ耐性バクテ  
リオシン Bac916 およびその産生  
株 *Lc. lactis* MBR916 株の評価

---

## 第1節 緒言

乳酸菌は、抗菌性のペプチド「バクテリオシン」を産生することで知られる。バクテリオシンは、産生菌類縁のグラム陽性菌に対して抗菌効果を発揮し、分子量が10,000以下で、耐熱性を有する抗菌ペプチドと定義される<sup>22),23)</sup>。バクテリオシン産生菌の多くは、プラスミド上に合成にかかわる遺伝子クラスターを有し、リボソーム上でその前駆体を合成する。乳酸菌により産生されるバクテリオシンは、伝統的な乳酸菌の食文化により醸成された高い安全性イメージや、ペプチドゆえに、消化管内の消化酵素により容易に失活することから、食品保存料としての応用が期待されている。特に、*Lc. lactis*により産生されるナイシン A は、グラム陽性菌に対する広い抗菌スペクトル、耐熱性、高い pH 安定性を示すことから、利用価値が極めて高く、日本を含む世界各国で保存料として使用されている。

ナイシンには類縁体が存在し、日本において保存料として使用されているナイシン A の他にナイシン Z、ナイシン Q、ナイシン F、ナイシン H がある。これら 5 種類のナイシンは、各々の配列に極めて相同性が高く、1~3 アミノ残基が異なるのみであり、抗菌スペクトル、生化学的諸性質、産生機構が類似している。

乳酸菌のバクテリオシンについては、乳酸菌が伝統的に発酵食品に用いられてきた安全性のイメージから、食品への応用に期待が高まっている。現在、ナイシン A 以外のバクテリオシンを食品添加物（保存料）として使用することは認められていないが、食品やその周辺的安全性や抗菌技術の必要性から、ナイシン A 以外のバクテリオシンにも研究の幅を広げていくことが重要であると考えられる。

本論文の第 5 章でバクテリオシンを産生する *Lc. lactis* MBR916 株を選抜した。この株の培養上清は、バクテリオシン活性と顕著なプロテアーゼ耐性、ナイシンとは異なる阻止円形状、薬剤耐性菌に対する広範囲な抗菌スペクトルを示したことから、ナイシンとは異なる新奇なバクテリオシンであると推察された。本章においてはこのバクテリオシンを Bac916 と命名し、その評価と構造決定を試みた。

## 第2節 材料と方法

5-2-1. 培地の調製と粗精製バクテリオシンおよび凍結乾燥粉末の取得精製を阻害する脂肪酸を除くために MRS 培地から肉エキスと Tween80, そして, グルコースを除いた MRS-BT 溶液を調製した。次に, 培地の高分子画分を除くために MRS-BT 溶液を MWCO 3,500 の透析膜(日本ジェネティクス株式会社, 東京)で透析し, 透析外液を取得した。この透析外液に終濃度 2%になるようにグルコースを添加して MRS-BT(U3500)培地とした。MRS-BT(U3500)を 0.2 $\mu$ m のフィルター (Sigma-Aldorich, St. Louis, MO, USA) を用いて用いてろ過滅菌し, 継代培養した MBR916 株を植菌し, 30 $^{\circ}$ C, 18 時間培養した。培養液を遠心分離 (3,000 rpm, 15 min) した後, 得られた上清を MWCO 14,000 の透析膜 (日本ジェネティクス株式会社) を用いて一晩透析し, 透析内液を 0.2 $\mu$ m のフィルターを用いて用いてろ過滅菌して粗精製 Bac916 溶液を取得した。また, 粗精製バクテリオシン溶液の一部を -40 $^{\circ}$ C にて 8h 凍結し, 凍結乾燥機 FD-550 (東京理化学器械株式会社, 東京) に供し, 棚温度 30 $^{\circ}$ C, 24h 凍結乾燥して粗精製 Bac916 凍結乾燥粉末 (Bac916FD) を取得した。

### 5-2-2. 抗菌活性値測定, 生育阻止円形状の比較

抗菌活性値の測定は, Spot on Lawn 法<sup>86)</sup>により行った。JCM1002 株を指標菌とし, その MRS 培養液を 0.25 % となるよう接種した 0.75 % MRS agar を作製した。冷却して固化した寒天平板上に測定対象となるサンプルを 3  $\mu$ L を滴下し, 37 $^{\circ}$ C, 24 h 程度培養後, 生育阻止円形成の有無を観察した。なお, 予備実験により Spot on Lawn 法は, ペニシリンカップ法<sup>73)</sup>で 100 $\mu$ L のサンプルの抗菌活性値を測定した場合とほぼ同等の結果が得られたため, 生育阻止円が形成される最大希釈倍率を上清 100  $\mu$ L 当たりの抗菌活性値 (A.U./100  $\mu$ L) とした。プロテアーゼ耐性試験の抗菌活性値は, マイクロプレート法により抗菌活性の有無を判断した。すなわち, Spot on Lawn 法と同様に調製した 0.75 % MRS agar を 120 $\mu$ L ずつ 96 ウェルマイクロプレート (Sigma-Aldorich, St. Louis, MO, USA) に分注し, 固化した後に評価対象サンプルを 20 $\mu$ L ずつ上層して 37 $^{\circ}$ C, 24 h 程度培養後, ウェル内寒天指標菌の生育状況を観察した。バクテリオシン産生株のクロステストでは, ペニシリンカップ法により生育阻止円半径を測定した。指標菌培養液を 0.25 % となるよう接種した 0.75 % MRS agar を作製し, その上にペニシリンカップを静置し, ペニシリンカップの中に

培養上清 100  $\mu$ L を添加し、至適温度で一晩培養後、阻止円の直径 (mm) を測定した。

#### 5-2-3. Bac916 の pH 特性と耐熱性の評価

純水に 1mg/mL Bac916FD を溶解させ、それぞれ 10 mL 程度分注後、3N 塩酸または 10N 水酸化ナトリウム水溶液にて pH を 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 6.8, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0 に調整し、室温で 1 時間程度放置した後、Spot on Lawn 法で抗菌活性の有無を判定した。また、pH 調整後のサンプルをオートクレーブにて 121  $^{\circ}$ C, 15 min 加熱し、同様に抗菌活性の有無を調査した。

#### 5-2-4. Bac916 のプロテアーゼ耐性の再評価

純水に 1 mg/mL となるように Bac916FD を溶解させたサンプル、そして対照として 1 mg/mL のナイシン A (Sigma-Aldorich, St. Louis, MO, USA), JCM11657 株の培養上清 (Gassericin A) をそれぞれ 1 mL 分注し、Proteinase K (和光純薬工業株式会社, 大阪), トリプシン (和光純薬工業株式会社, 大阪), アクチナーゼ E (科研製薬, 東京), キモトリプシン (Sigma-Aldorich, St. Louis, MO, USA), ペプシン (和光純薬工業株式会社, 大阪) を各々適切な緩衝液を用いて、終濃度が 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 4 mg/mL, 8 mg/mL, 16 mg/mL, 32 mg/mL になるように等量混合し、37 $^{\circ}$ C, 24h インキュベートし、マイクロプレート法により最大プロテアーゼ耐濃度を調査した。

#### 5-2-5. 他のバクテリオシン産生株とのクロステスト

バクテリオシンに対する耐性と抗菌傾向を調べるために、バクテリオシン産生性の MBR916 株, JCM7638 株 (ナイシン Z 産生株), NBRC12007 株 (ナイシン A 産生株), JCM11657 株 (ガセリシン A 産生株), *Lb. gasseri* JCM 11064 株 (LA158, 以下, JCM11064 株; ガセリシン T/X 産生株) と、バクテリオシン非産生株とされる JCM1002 株, *Lc. lactis* JCM5805 株 (以下, JCM5805 株) をそれぞれ至適温度 (MBR916 株, JCM7638 株, NBRC12007 株, JCM5805 株は 30  $^{\circ}$ C, JCM11657 株, JCM 11064 株, JCM1002 株は 37  $^{\circ}$ C) で 24 時間培養し、0.75 % Agar を添加した MRS 培地に 0.25% 添加し、寒天平板を作製した。そして、各培養液を遠心分離 (3,000 rpm, 15 min) した後孔径 0.2  $\mu$ m フィルターでろ過滅菌し、上清を取得した。この

各上清と作製した寒天平板を用いてバクテリオシンとその産生株の生育阻止円のクロステストを行い、ペニシリンカップ法により生育阻止円直径を測定した。

#### 5-2-6. 培養条件によるバクテリオシン産生の消長比較

バクテリオシン産生性の MBR916 株, JCM7638 株, NBRC12007 株, JCM11657 株, JCM11064 株と, バクテリオシン非産生株とされる JCM1002 株, JCM5805 株をそれぞれ 24 時間培養し, 培養液を遠心分離 (3,000 rpm, 15 min) 後, 0.2 $\mu$ m のフィルターを用いてろ過滅菌し, 上清を取得した。培養条件は, 培養温度を 30 $^{\circ}$ C と 37 $^{\circ}$ C に設定した場合の比較, 至適温度 (MBR916 株, JCM7638 株, NBRC12007 株, JCM5805 株は 30 $^{\circ}$ C, JCM11657 株, JCM 11064 株, JCM1002 株は 37 $^{\circ}$ C) において, 遠心分離 (3000 rpm, 15 min) にて上清を分離し, 回収した後, 新しい上清を入れて培養することを 3 回繰り返した。回収した上清は, 0.2  $\mu$ m フィルターでろ過してサンプルとした。また, JCM7638 株, NBRC12007 株, MBR916 株は, 培養中, 30 $^{\circ}$ C における攪拌操作も行い, 上清の活性値を静置培養と比較した。

#### 5-2-7. HPLC によるバクテリオシン活性画分の分取とアミノ酸配列解析

4-2-8 で示した方法により部分精製した画分のうち, 強い抗菌活性を示した 60% イソプロピルアルコール (IPA) 抽出画分, 60% アセトニトリル (AcCN) 抽出画分について, HPLC による活性画分の分取, MALDI-ToF-MS 解析, アミノ酸配列解析を行った。分析は東海大学生命科学統合支援センター (伊勢原市) に依頼した。サンプルを 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) 水溶液にて 10 倍程度希釈し, HPLC Prominence (株式会社島津製作所, 京都) に供した。サンプル 100  $\mu$ L を Vydac 214TP52 C4 カラム (2.1 mm i.d.  $\times$  250 mm) [HICHROM (Grace), Berkshire, Theale, UK] に吸着させたのち, 0.1% TFA を含む溶離液組成を溶離開始 5 分間 100% H<sub>2</sub>O, その後 70 分間で, H<sub>2</sub>O : AcCN = 30 : 70 まで連続的に変化させ, その後 10 分間 100% AcCN にて溶出させ, 280 nm の吸光度により検出した。また, 溶出画分は, フラクシオンコレクターにより 140  $\mu$ L ずつ分取した。分取した画分について, Spot on Lawn 法<sup>86)</sup>により抗菌活性を確認し, バクテリオシンの検出ピークを決定した。

活性画分のうち, 明瞭な抗菌活性と強いピークが得られたものを MALDI-ToF-MS 解析に供した。また, 同一サンプルについて, アミノ酸配列解析を行うため, プ



ロテインシーケンサーPPSQ-21（株式会社島津製作所）に供した。一部サンプルについては、N末端のエドマン分解が不能であったため、ホルミル基を除去する目的で、0.6M HClに溶解させ、室温にて24時間静置し、再度解析に供した。

### 第3節 結果と考察

MBR916 株を MRS-BT(U3500)培地で培養し、MWCO 14,000 の透析膜で透析した内液の JCM1002 株に対する抗菌活性値は、 $2^{10}$  A.U./100  $\mu$ L 以上であった。予備試験で、MRS 培地で培養した場合の抗菌活性値は  $2^9 \sim 2^{10}$  A.U./100  $\mu$ L であることが示されているため、透析による Bac916 の損失はほとんどなかったことが示唆された。次に、フリーズドライにより作製した 1 mg/mL の Bac916FD の抗菌活性値を測定したところ、抗菌活性値は  $2^{10}$  A.U./100  $\mu$ L であった。これは、市販の 1 mg/mL のナイシン(ナイシンとして 5%程度を含む)と同等の抗菌活性値であり、Bac916FD は試薬のナイシンとほぼ同等の抗菌活性を有することが示唆された。

Table 5-1 には様々な pH 条件下における、オートクレーブ処理後の Bac916 の活性を示した。Bac916 は、室温条件において、pH2-12 まで安定した活性を示し、加熱条件では、pH5 以上で阻止円直径の縮小が観察された。ゆえに、Bac916 は、常温では pH 2-12 で安定に存在し、加熱すると、酸性条件 (pH 2-4) では安定だが、弱酸性～塩基性条件 (pH5-12) では、不安定であることが示された。Davies らは、ナイシンの場合、pH 2-4 の酸性条件で安定な活性を保持するが、それ以上の pH 条件では不溶化により活性を減少させ、加熱した場合でもほぼ同様の結果となると報告している<sup>87)</sup>。ナイシンと比較すると、Bac916 は、常温における活性の安定性は極めて高いが、pH を酸性領域以外にした場合、安定性が低くなることが示唆された。

Table 5-2 に MBR916 株上清、MBR916 株上清(pH7.0)、Bac916FD、ナイシン、JCM11657 株上清について、プロテアーゼを作用させ、活性の減少を測定した結果を示した。Bac916 が含まれる MBR916 株の上清は、中性化などしていない場合には、トリプシン以外のプロテアーゼの消化を受けなかった。一方、MBR916 株の培養上清を中性化したり、ある程度精製したりする (Bac916FD) と、プロテアーゼの消化を受け、活性が大きく低下した。Proteinase K や、アクチナーゼ、キモトリプシンは、中性から弱塩基性溶液において最大活性を示すことが知られている。培養上清と、これらプロテアーゼのバッファーとを混ぜた状態で pH を測定してみると、5.7 であった。弱酸性領域ではこれらのプロテアーゼは、活性が落ちるものの完全に失活することは考えにくい。Bac916 は、酸性領域で安定であることは前述したとおりだが、その安定性のため、プロテアーゼの作用を受けにくい機序が存在すると考えられた。しかしながら、Bac916 の安定性とプロテアーゼ耐性に関しては更なる

検証が必要である。

Table 5-3 にバクテリオシン産生株同士のクロステストを行い、阻止円直径を測定した結果を示した。ナイシン A 産生株である NBRC12007 株の上清は、ナイシン Z 産生株である JCM7638 株と類似性の高い挙動を示し、JCM5805 株、MBR916 株への抗菌活性が高いという特徴が示された。また、MBR916 株を指標菌として使用した場合、JCM1002 株の上清を除く、すべての上清の抗菌活性に感受性であった。また、抗菌の傾向を観察すると、JCM5805 株、JCM11657 株に効かないなど、JCM11657 株と類似性の高い傾向を示した。MBR916 株の抗菌活性の傾向は、ナイシン産生性の NBRC12007 株や JCM7638 株と異なり、MBR916 株が産生している Bac916 はナイシンとは異なる抗菌スペクトルを有している可能性が示唆された。JCM11657 株が産生するガセリシン A は、標的受容体を持たないバクテリオシンであり、抗菌スペクトルが類似する Bac916 も同様に標的受容体を持たないタイプであると推察している。興味深いことに、バクテリオシン産生性でないとされている JCM1002 株や JCM5805 株も一部指標菌に抗菌活性を示した。JCM1002 株は自身を指標菌とした場合に抗菌活性を示し、JCM5805 株は *Lc. lactis* 種である NBRC12007 株、JCM7638 株、MBR916 株に高い抗菌活性を示した。バクテリオシン産生性でないとされているこれらの株が抗菌活性を示した理由には、乳酸などの有機酸酸性による pH の低下による影響か、未知のバクテリオシンを含む何らかの抗菌物質の産生が考えられる。しかしながら、JCM5805 株を 30°C、24 時間培養したとき、上清の pH は 4.5 で、試験に供した乳酸菌株が生育を阻害される pH ではない。すなわち、JCM5805 株が増殖に伴い、自身の増殖活動を抑制する物質を放出するが、この物質が同じ属種である *Lc. lactis* 種にも抑制効果として働いた可能性が考えられる。これらの菌株が産生する抗菌物質については、今後の研究で解明していきたい。

Fig. 5-1 に MBR916 株、NBRC12007 株、JCM7638 株、JCM11657 株、JCM11064 株の培養条件の違いによる、活性値の比較を示した。まず、培養温度 30°C と 37°C での比較 [Fig. 5-1 (A)] において、MBR916 株は、30°C においては、活性値が 2,048 (2<sup>11</sup>) A.U./100  $\mu$ L と高い活性を示したが、37°C においては、活性値が消失した。37°C 培養の MBR916 株の培養液を観察すると、目視でも十分に増殖が確認できるほどであったため、菌株の生育不良ではなかった。一方、JCM11657 株は、30°C においては活性値が 4 と低かったが、37°C では 64 を示した。JCM11657 株と JCM11064

株は、どちらも培養至適温度が 37°Cであるが、JCM11064 株は低温の 30°Cにおいても至適温度と変わらない活性を示した。次に、培養ごとに上清のみを交換するサイクル培養 [Fig. 5-1 (B)] において、サイクルを繰り返すと、JCM11064 株を除くすべての株で活性値の低下傾向が示された。MBR916 株は、37°Cで培養すると、菌体の増殖は見られたものの、バクテリオシンの産生が停止したこと、また、攪拌条件で培養すると抗菌活性値が低下したことから、酸化条件と温度条件がストレスとなり、バクテリオシンの産生が低下、停止したと推察される。37°Cの培養条件でバクテリオシンの産生が停止した原因の一つに、Bac916 産生にかかわる遺伝子群が温度感受性プラスミド<sup>88)</sup>上に存在する可能性があると考えた。例えば、タンパク質複製遺伝子 *repA* を有する温度感受性プラスミド *pVE6002*<sup>89)</sup>は、37.5°C、8 時間の培養で複製数が著しく低下することが知られている。また、Chen らは、*Lc. lactis* MG1363 株が 37°Cで生育する条件として、培地溶存酸素による酸化ストレスに対応するためリボフラビンが必要であると述べている<sup>90)</sup>。もし、MBR916 株が MG1363 株と同様に 37°Cでの生育条件としてリボフラビンを要求したのであれば、本試験で使用した MRS 培地には、酵母エキスが含まれており、酵母エキス中のビタミン類の存在により 37°Cでの増加が可能であったと推察される。リボフラビンは、乳酸菌の NADH オキシダーゼ、NADH ペルオキシダーゼ、スーパーオキシドディスムターゼ、RecA タンパク質などを発現し、酸化ストレスを防御することが知られている<sup>91)</sup>。しかしながら、酸化条件と 37°C条件でバクテリオシンの活性が低下、消失した原因までは明らかになっていない。Jiang らは、*Lc. lactis* 種のナイシンの産生が曝気による酸素の影響で増加したと報告しており<sup>91)</sup>、酸素の影響がバクテリオシンの産生にどのように寄与するのかは、バクテリオシンの産生経路を明らかにする必要がある。今後、酸化ストレスとバクテリオシンの産生について遺伝子の発現を軸に研究を進めていきたい。

固相カラムに吸着させた培養上清を 60 % AcCN にて溶離させたサンプルを HPLC に供した際に得られたクロマトグラムを Fig. 5-2(a)に、同様に 60 % IPA にて溶離させたサンプルを供して得られたクロマトグラムを Fig. 5-2(b)に示した。両サンプルともクロマトグラム後半、総流量 6.8 mL (68 min) から 7.5 mL (75 min) にかけて、ピークが検出された。予備試験において、この範囲のフラクションから強い抗菌活性が得られたことから、60% AcCN 抽出サンプルにおいては、フラクション No. 48 (#1F48), No. 49 (#1F49), No. 52 (#1F52), 60% IPA 抽出サンプル

においては、フラクション No. 49 (#2F49) について全量を回収し、MALDI-ToF-MS 解析、アミノ酸一時配列解析に供した。

Fig. 5-3 に各フラクションを MALDI-ToF-MS 解析に供し、得られたスペクトルを示した。各サンプルとも、おおむね分子量 5,930 前後に強いシグナルが出現した。ラクチシン Q は、N 末端にホルミルメチオニンを有する 53 アミノ残基から構成され、その分子量は 5,926 であり<sup>83)</sup>、Bac916 は極めてこれに近い。Bac916 は、バクテリオシンのラクチシン Q に類似の物質である可能性が示唆された。

Table 5-4 に各フラクションに含まれるたんぱく質について、N 末端側から 20 アミノ残基まで一時配列を解析した結果を示した。#1F48, #1F49, #2F49 については、アミノ酸シーケンスの結果、N 末端から 20 残基までラクチシン Q と 100% 一致した。しかしながら、N 末端は、通常のメチオニンでホルミル基除去の処理をせずともアミノ酸シーケンスに供することが可能であった。一方、#1F52 は、ラクチシン Q に近い一次配列を持ちながら、N 末端側から 9 番目と 11 番目のアミノ残基が Q (グルタミン) から E (グルタミン酸) に、11 番目が L (ロイシン) から K (リシン) に置換されていた。ラクチシン Q に構造の近いバクテリオシンを NCBI の BLASTP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) で検索すると、ラクチシン Z, AucA, aureocin A53 が当該した。しかしながら、これらのいずれも、#1F52 との相同性が低く、#1F52 に含まれるたんぱく質の新奇性が強く示唆された。このたんぱく質は、ラクチシン Q ラクチシン Z と相同性が高いこと、同じ *Lc. lactis* 種が産生することから、ラクチシン様バクテリオシンであると推察した。すなわち、*Lc. lactis* MBR916 株は、Bac916 を産生するが、Bac916 は、ラクチシン Q とそれに類似するラクチシン様バクテリオシンの少なくとも 2 種類のバクテリオシンを産生している可能性が考えられた。今後、新奇性が期待されるラクチシン様バクテリオシンの構造遺伝子の特定を行う予定である。

Table 5-1 Heat resistance of Bac916 against pH variation(2-12)

pH	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
room temp.	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Autoclave(121°C,15min)	○	○	○	W	W	W	W	W	W	W	W

w: weak activity

Table 5-2 Maximum concentration of protease for diminution antimicrobial activity (mg/mL)

	Protease			
	Proteinase K	Trypsin	Actinase E	Chymotrypsin
MBR916 Sup. (Bac916)	32	1	32	32
MBR916 Sup. (pH7.0)	1	0.5	8	0.5
Bac916FD	0	0	0	0
Nisin	8	0	1	0.5
JCM11657 Sup. (Gassericin A)	32	0.5	2	8

Table 5-3 Inhibition circle of supernatant against indicatorbacteria (unit: mm)

	indicator bacteria						
	JCM1002	JCM5805	NBRC12007	JCM7638	JCM11657	JCM11064	MBR916
JCM1002	12.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
JCM5805	14.3	0.0	14.3	11.8	2.0	4.2	15.3
NBRC12007 (Nisin A)	34.0	16.8	4.0	0.0	12.8	9.7	18.3
JCM7638 (Nisin Z)	33.3	14.0	7.2	10.3	8.5	4.7	15.7
JCM11657 (Gassericin A)	24.5	0.0	12.0	9.3	0.0	9.2	14.0
JCM11064 (Gassericin T/X)	21.5	0.0	12.2	6.8	6.5	0.0	12.7
MBR916 (Bac916)	28.2	0.0	10.3	9.5	0.0	10.0	13.3

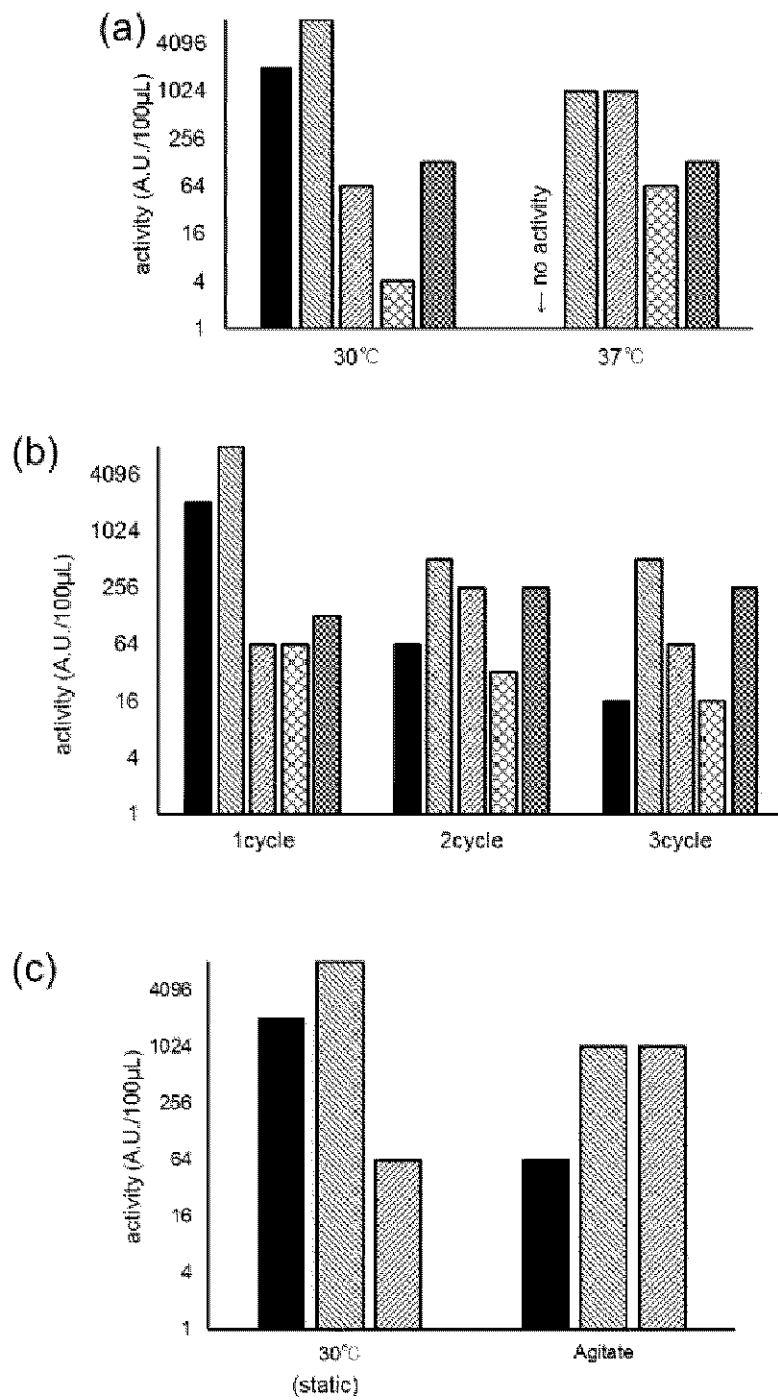


Fig. 5-1 Anti-microbial activity comparison by differential cultural condition, (a) temperature, (b) exchange new supernatant, (c) static or agitated.  
 Bar; ■: MBR916, ▨: NBRC12007, ▩: JCM7638, ▪: JCM11657, ▫: JCM11064

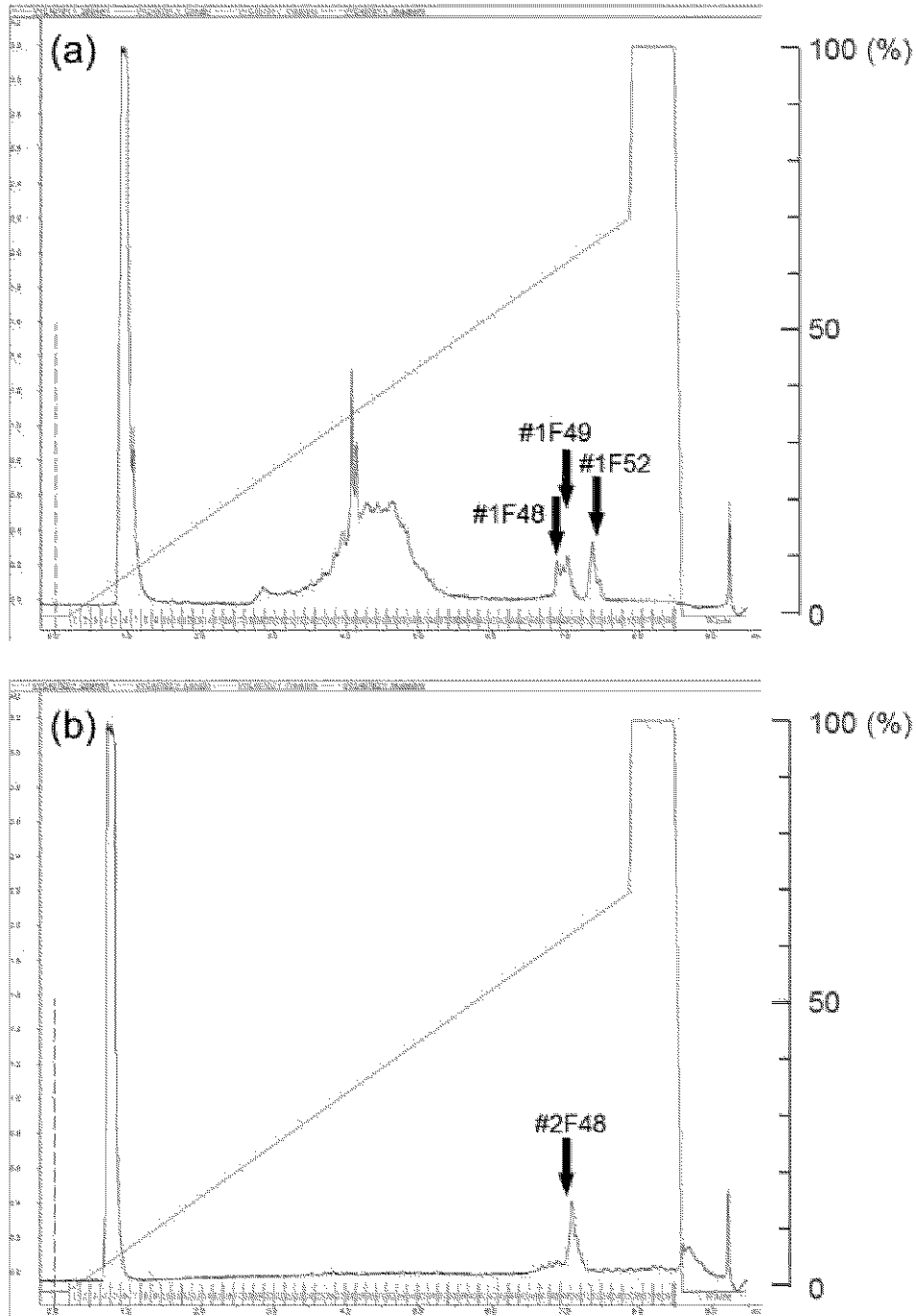


Fig. 5-2 The chromatogram obtained by subjecting a bacteriocin purified using a C18 column to HPLC. (a) shows the sample eluted with 60 % AcCN, (b) shows the sample eluted with IPA. X-axis is HPLC eluent volume. Y-axis is absorbance. Red line is AcCN gradient concentration (%) of eluent. Booths on the X-axis are each fraction. The arrow is the fraction that bacteriocin is presumed to exist.



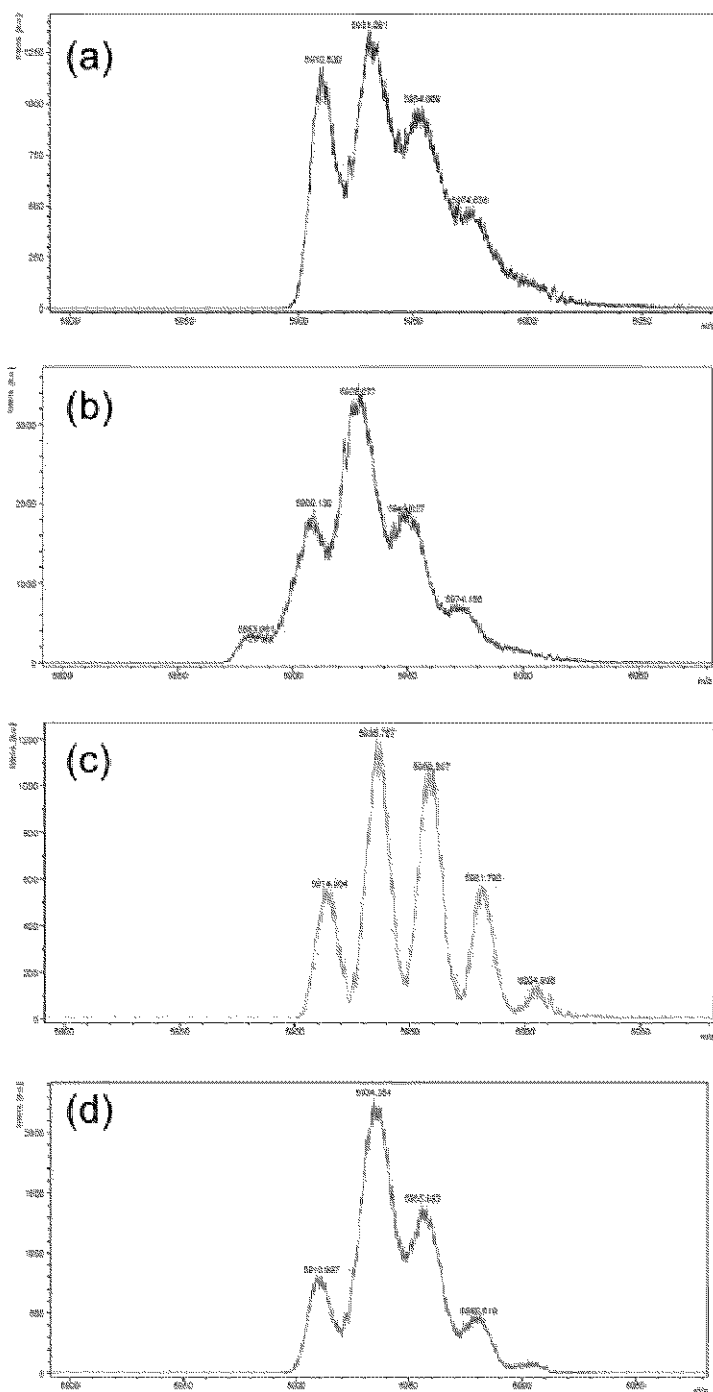


Fig. 5-3 Molecular mass spectrum of each fraction obtained by MALDI-ToF-MS analysis.(a):#1F48, (b): #1F49, (c): #1F52, (d): #2F49.

Table S-4 The amino acid sequence of bacteriocin in each fraction.

Extraction solvent from C18	Fraction No.	Sample ID	Molecular mass from MALDI-ToF-MS analysis (Da)	Amino acid sequence (1-20 residual)	Identity	Remarks
60%A/CN	48	#1F48	5931.666	MAGFLKVVQL LAKYGSKAVQ	lacticin Q	
	49	#1F49	5928.744	MAGFLKVVQL LAKYGSKAVQ	lacticin Q	
	52	#1F52	5934.120	MAGFLKVVHL KAKYGSKAVE	Noble	Formylated N-terminal methionine
60%IPA	49	#2F49	5934.354	MAGFLKVVQL LAKYGSKAVQ	lacticin Q	
	lacticin Q (Accession No. AB235201)			MAGFLKVVQL LAKYGSKAVQ	-	Formylated N-terminal methionine
	lacticin Z (AB298287)			MAGFLKVVQL LAKYGSKAVQ	-	formylated N-terminal methionine
Auca (AY266269)			MAGFLKVVKA VAKYGSKAVK	-	formylated N-terminal methionine	
aureocin A53 (AF447813)			M-SWLNFLKY IAKYGKKAAS	-	formylated N-terminal methionine	

\* bold is different residues from lacticin Q

## 第6章 新奇バクテリオシン

### Bac916 の食産業への応用

---

## 第1節 諸言

現在，畜産業・水産業の現場では，飼育動物の病気の治療・予防のため，抗菌薬及び抗生物質が使用されている。このため，畜産を取り巻く環境では，抗生物質による選択圧により，抗生物質に耐性を示す薬剤耐性菌が出現している。薬剤耐性菌は，抗生物質が使用される環境において，突然変異や耐性遺伝子の獲得によって発生するとされており，人や動物にとっての病原菌が耐性遺伝子を獲得すると，抗生物質による治療が困難になり，重篤な症状や経済的損失を及ぼすリスクとなるばかりか，病原菌でなくとも獲得した耐性遺伝子を放出することで，他の細菌に耐性遺伝子を伝播するリスクも懸念される。第1章で述べたとおり，ブタの飼育環境で使用されていた AVP が VCM 耐性菌を生み出す原因となったことを考慮すると，家畜飼育環境における抗生物質の使用と抗生物質耐性菌を生み出さない抗菌方法が望まれる。

一方，乳酸菌及びそのバクテリオシンは，家畜の病原菌感染予防のための抗生物質の代替品としての利用が検討されている。本論文の第4章で示された通り，MBR916 株が産生するバクテリオシン Bac916 は，高い耐熱性とプロテアーゼ耐性を有し，食品およびその周辺の様々な環境下で有効な抗菌作用が期待できる。また，ナイシンと異なる抗菌スペクトルを有し，ナイシンを補完するようなバクテリオシンであることが示唆されている。

本章では，Bac916 の食品への応用を視野に入れ，食品保存料としての利用の可能性を探索するため，かまぼこを食品モデルとした日持ち向上を検討する。また，耐性菌は，畜産環境の堆肥から農作物への汚染が経路として考えられるため，堆肥の前段階である糞便に多く存在していると推察できる。この耐性菌を減少させることを目的とし，本章ではブタの糞便をモデルとした Bac916 の耐性菌駆除効果を検討した。

## 第2節 材料と方法

### 6-2-1. モデルかまぼこの作製

かまぼこ汚染菌の抗菌試験を行う目的で、かまぼこを作製した。市販のスケソウダラのすり身 500 g, かたくり粉 50 g, 食塩 10 g, 水道水 150 mL を 3 区分用意し、水道水には区分ごとに、6.5 mg Bac916FD 添加, 6.5 mg ナイシン (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA) 添加, 無添加 (対照) とし, 区分ごとにフードプロセッサーを用いて 10 min 程度よく混練した。混練したサンプルをアルミ製 (縦 100 mm×横 200 mm×高さ 50 mm) のバットに, なるべく空隙ができないように詰め, オートクレーブを用いて 121°C, 15 min 加熱した。加熱後, 室温で十分に冷却し, 無菌条件で各 4 サンプルに等分し, 汚染菌を植菌した。汚染菌は, 笹かまぼこより分離した *Carnobacterium maltaromaticum* C29 株<sup>92)</sup> (以下, C29 株) と *Ec. faecalis* C41 株 (以下, C41 株), 第 2 章でわさび漬けより分離した *Ec. faecalis* MYU572A (以下, MYU572A 株), 宮城県産業技術総合センターが食品製造場から分離した *Ec. faecium* MBR306 株を用いた。汚染菌をそれぞれ 30°C, 24 時間, 2 回継代培養した定常状態の培養物を  $1 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4$  cfu/mL になるように希釈し, 作製したかまぼこ区分ごとに 1/100 重量接種し, 保存試験を開始した。

### 6-2-2. かまぼこの保存試験

保存試験は 10°C, 1 週間行い, かまぼこ作製した日を 0 日とし, 7 日間まで 1 日ごとに各サンプルから清潔なナイフを用いて 10 g 程度採取し, 重量を測定した。重量を測定後, 不織布フィルター付きバッグ (日本細菌検査株式会社, 大阪市) に入れ, サンプルの重量の 10 倍になるように滅菌希釈水 (0.85 %食塩, 0.1%ペプトン) を添加し, BagMixer400 (INTERSCIENCE, Saint Nom, France) を用いて 60 rpm, 1 分間ストマッキングし, フィルター部分より 10 mL 採取したものを無希釈サンプルとし, 定法に従い, 滅菌希釈水を用いて段階希釈し, 各希釈段階のサンプルを 1 mL ずつ 2 シャーレ分採取し, 1.2% MRS Agar 培地と混釈して 30°C, 24~48 h インキュベートした。インキュベート後, 同サンプル 2 シャーレのコロニーを数えて平均化し, 各希釈倍率を乗じることで各汚染菌の生菌数とした。

### 6-2-3. プタ糞便菌数の経時変化

ブタ糞便における一般生菌数、3種の抗生物質耐性菌数、バシトラシン（BC）耐性菌数の変化を調査する目的で、ブタ糞便の菌数測定、Bac916添加時、BC添加時の菌数の変化を調査した。宮城県内各農場から収集したブタの糞便をランダムに6サンプル選出し、各およそ10gずつ、計60gのサンプルを混合し、同重量の純水を添加し、室温でよく攪拌した。攪拌後、30gずつ50mL容のチューブに攪拌しながら分注し、4区分のサンプルを作製した。区分ごとに、Bac916FD添加区分（終濃度1mg/g）、BC添加区分（終濃度256µg/g）、MBR916株添加区分（終濃度 $10^7$ cfu/g）、無添加区分とし、25°C、1週間静置した。菌数の測定は、0日目、1週間後の2回行った。菌数の測定は、サンプルごとに、変法GAM寒天培地（日水製薬株式会社、東京）を基とし、3種類の抗生物質（AMK 12µg/mL、IPM 12µg/mL、CPFX 1µg/mL）添加、256µg/mL BC添加、無添加培地を調製し、定法に従い段階希釈したサンプルに混釈することでプレートを作製した。培地と混釈したシャーレを常温で固化させ、40°Cで48h培養してコロニーを生育させ、各培地における菌数をカウントした。

#### 6-2-4. ブタ糞便の菌叢解析

糞便の菌叢変化を観察するために、Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism（以下、T-RFLP）解析に供した。ブタ糞便は、菌数変化測定サンプルの1日目、3日目、7日目の対照区、BC添加区、Bac916FD添加区、MBR916株添加区のサンプルをそれぞれ1g程度採取し、直ちに-80°Cにて凍結した。凍結したサンプルを株式会社テクノスルガラボ（静岡市）に依頼し、Nagashima法にてT-RFLP解析を行った。

## 第3節 結果と考察

6-3-1. かまぼこの保存試験 図 Fig. 6-1 に Bac916FD, ナイシンをそれぞれ添加したかまぼこの汚染菌数変化を菌種ごとに示した。ナイシンは, C29 株や C41 株を添加したサンプルで, 添加していないサンプルよりその菌の増殖を抑える傾向があることが示唆された。しかし, MYU572A 株や MBR309 株には抗菌効果を示さなかった。Bac916FD は, C29 株 MBR309 株に対して顕著に抗菌効果を示した。しかし, Bac916FD は, C41 株, MYU572A 株に対しては, 抗菌の傾向はあるものの, 明確な抗菌効果は確認できなかった。C29 株は *Carno. maltaromaticum* 種であり, 石川らは, かまぼこから分離される乳酸菌の一種として報告している<sup>92)</sup>。*Carnobacterium* 属は, 海水や淡水などの自然環境, 乳その他非加熱性食品など幅広く検出され, 魚類の病原菌であるとの報告もある<sup>93)</sup>。また, *Carno. maltaromaticum* 種は, その活動により麦芽様の臭気物質を産生することでも知られ<sup>94)</sup>, かまぼこ及びその原料のすり身を腐敗させ悪臭を発生させる原因菌となる。C41 株と MYU572A 株はともに *Enterococcus* 属であり, *Carnobacterium* 属同様, かまぼこの汚染菌として知られる。内藤は, 食品の汚染にみられる *Enterococcus* 属の特性について調べたところ, 抗菌剤に対して抵抗性を持つものが多かったと報告している<sup>95)</sup>。食品加工場において, 従業員の手指に付着している *Enterococcus* 属細菌が, 消毒液の作用に耐え, 工場内の環境と食品に移行する可能性が推察され, かまぼこのみならず, あらゆる加工食品から検出されがちな菌種であると考えられる。特に, *Ec. faecium* と *Ec. faecalis* は, VRE としても報告される菌種であり, 万一, 食品加工現場に耐性遺伝子を持つこれらの菌種が存在すると, 食品を介した多剤耐性遺伝子の伝播が強く危惧される。今回の試験において, Bac916 は, これらの汚染菌に対してある程度の抗菌効果を発揮したが, 十分な抗菌効果が得られたわけではない。Hashimoto らは, *Carno. maltaromaticum* KH1 株が産生するバクテリオシン, ピシコリン KH1 とナイシンを混合してかまぼこに使用することにより, 汚染菌 *Ec. faecalis* の増殖を抑制できたとしている<sup>96)</sup>。また, 山崎らは, ナイシンとショ糖エステル類をかまぼこに添加し, 芽胞菌の発芽抑制に効果を示したと報告している<sup>97)</sup>。本試験において, ナイシンや Bac916 のみの添加では, 初期の静菌は可能でも, 時間の経過とともに, 生菌数が増加する結果となった。しかしながら, Bac916 は, ナイシンと異なる抗菌スペクトルにより, ナイシンでは抗菌できなかった *Ec. faecium*

MBR309 株に抗菌効果を示したことから、Bac916、ナイシン、その他の保存料を併用することでより効果のある抗菌方法の開発につなげられることを期待する。

### 6-3-2. ブタ糞便菌数と菌叢の経時変化

Fig. 6-2 にブタ糞便に BC, Bac916FD, MBR916 株を添加し、25°C、7 日間静置した際の一般生菌数、BC 耐性菌数、抗生物質 (AMK, IPM, CPF) 耐性菌数の 0 日目と 7 日目の比較を示した。一般生菌数は、各試験区分で変化がなかったが、BC 耐性菌数は、BC 添加区で有意に高かった。また、すべての試験区で、抗生物質耐性菌数が有意に増加したが、Bac916FD 添加区の抗生物質耐性菌数は、7 日目において、他の試験区よりも優位に少なかったことが示された。BC 添加区で、BC 耐性菌が大きく増殖したのは、BC の濃度を、BC 耐性菌スクリーニングにおける、感受性・耐性の BP と同じ 256 µg/mL<sup>98)</sup>と設定したためであると考えられる。すなわち、ブタ糞便における BC の選択圧が上昇し、多くの感受性菌が抗菌されたため、BC 耐性菌数が大幅に増える結果となったと推察できる。一方、Bac916FD 添加区では、3 種の抗生物質耐性菌数が少なかった。これは、Bac916 の抗菌スペクトルの広さと、抗生物質との作用機序の違いが関係していると推察している。バシトラシンは、ペプチド性で N-末端側が環状に結合している環状ポリペプチドであり、その作用機序は、細菌の細胞壁合成の PG 末端に結合し、PG の伸長を阻害することによる。この作用機序は、バクテリオシンの作用機序の一つである PG 結合による細胞壁合成阻害と酷似している。しかしながら、バクテリオシンにはもう一つの作用機序である、細胞膜への孔形成能力がある。つまり、BC のように、PG 合成阻害という単一の機構では、その耐性菌存在した場合、抗菌することができないが、バクテリオシン特有の孔形成能力があれば、PG 阻害に耐性を持つ細菌でも抗菌が可能であり、結果的に、BC 耐性菌、3 種の抗生物質耐性菌を減少させたと推察できる。Bac916 の素性が明らかになっていない以上、推察になるが、Bac916 は、バクテリオシンに広く確認される孔形成などにより、他の菌に対して抗菌活性を示していると考えられる。以上より、Bac916 は、自身の耐性菌を生み出すことなくブタ糞便中の多剤耐性菌の増殖を抑えることができることが示唆された。

Fig. 6-3 に T-RFLP 法により解析された各サンプルの菌叢変化を示した。Control と BC 添加区分において、7 日目では *Bacteroides* 目細菌が増加した。*Bacteroides* 目の主構成種である *Bacteroides* 属細菌は、基本的に病原性はないが、日和見感染



症の原因菌であることが報告され、耐性遺伝子を受け取り、プールする役割を担うとされている。

一方、MBR916 株添加区分においては、*Lactobacillales* 目、*Clostridium* subcluster XIVa の増加が観察された。*Lactobacillales* 目、*Clostridium* subcluster XIVa は、単一の operational taxonomic unit (以下、OTU) で示されるが、他の *Clostridium* subcluster XIVa の OTU が増加していないことを考慮すると、*Lactobacillales* 目、*Clostridium* subcluster XIVa の増加は、*Lactobacillales* 目の増加によるものと考えられる。*Lactobacillales* 目の主構成菌種は、*Carnobacteriaceae* (カルノバクテリウム科)、*Enterococcaceae* (エンテロコッカス科)、*Lactobacillaceae* (乳酸桿菌科)、*Leucinostocaceae* (ロイコノストック科)、*Streptococcaceae* (レンサ球菌科) 等の乳酸菌である。また、MBR916 株添加区分は、1 日目の *Lactobacillales* 目が他のサンプルと比較して顕著に低いことが示された。MBR916 株添加区分は、他の区分と比較すると乳酸菌を添加したことにより、乳酸菌を含む他の細菌群を乳酸やバクテリオシン Bac916 などで抗菌した可能性が考えられる。1 日目で減少した乳酸菌は、MBR916 株または、Bac916 に耐性を示す乳酸菌が 7 日目までに増加したことが示唆された。

以上のことから、堆肥化の前処理としてブタの糞便に MBR916 株を添加することで、耐性遺伝子をプールする *Bacteroides* 目の増加を抑え、乳酸菌を増加させることが期待できる。今後、さらなる実証研究を行い、ブタ糞便中の耐性菌減少に寄与するプロセスの構築を目指していきたい。

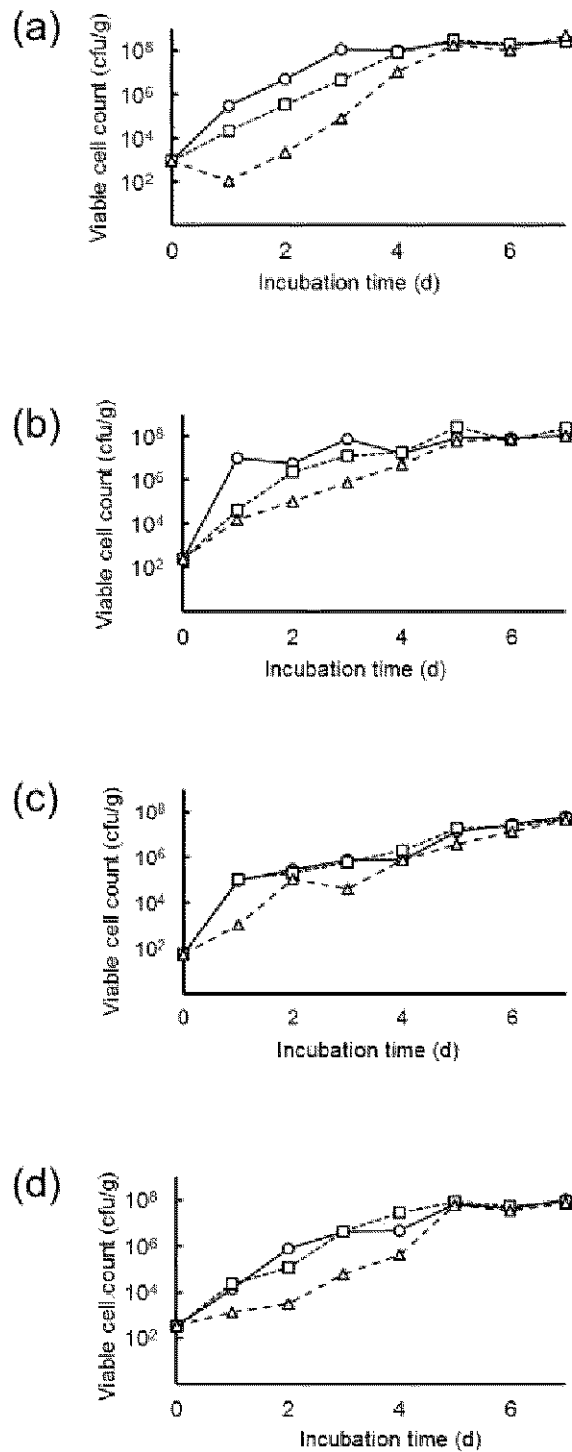


Fig. 6-1 Time course of bacterial count in each anti-bacterial *surimi* test group, (a) *Carnobacterium maltaromaticum* C29, (b) *Enterococcus faecalis* C41, (c) *Enterococcus faecalis* MYU572A, (d) *Enterococcus faecium* MBR309.

Symbol; ○: control, □: nisin, △: Bac916FD

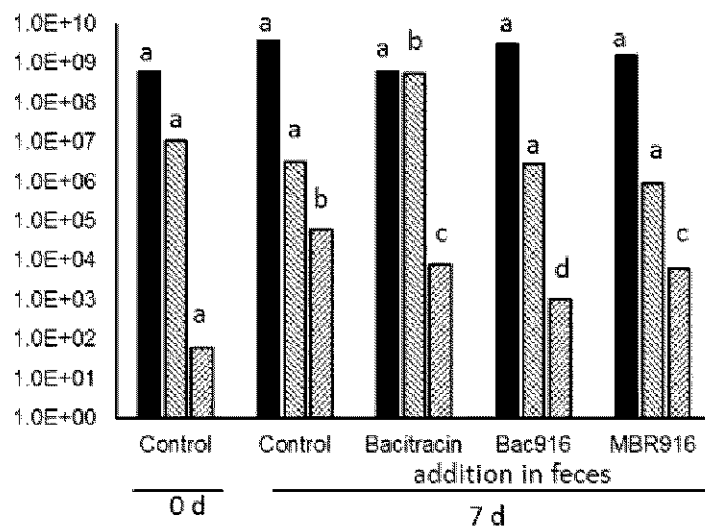


Fig. 6-2 Changes in the number of pig faecal bacteria, Screened by mGAM Agar at 40°C, anaerobic for 48h. mGAM agar modified by control (no addition), 256 µg/mL bacitracin, antibiotics mixture (12 µg/mL AMK, 12 µg/mL IPM, 1 µg/mL CPFEX).  
 Bar; ■: control, ▨: bacitracin, ▩: mixture of antibiotics.  
 Significant difference with different letters for each series of mGAM agar, p<0.01.

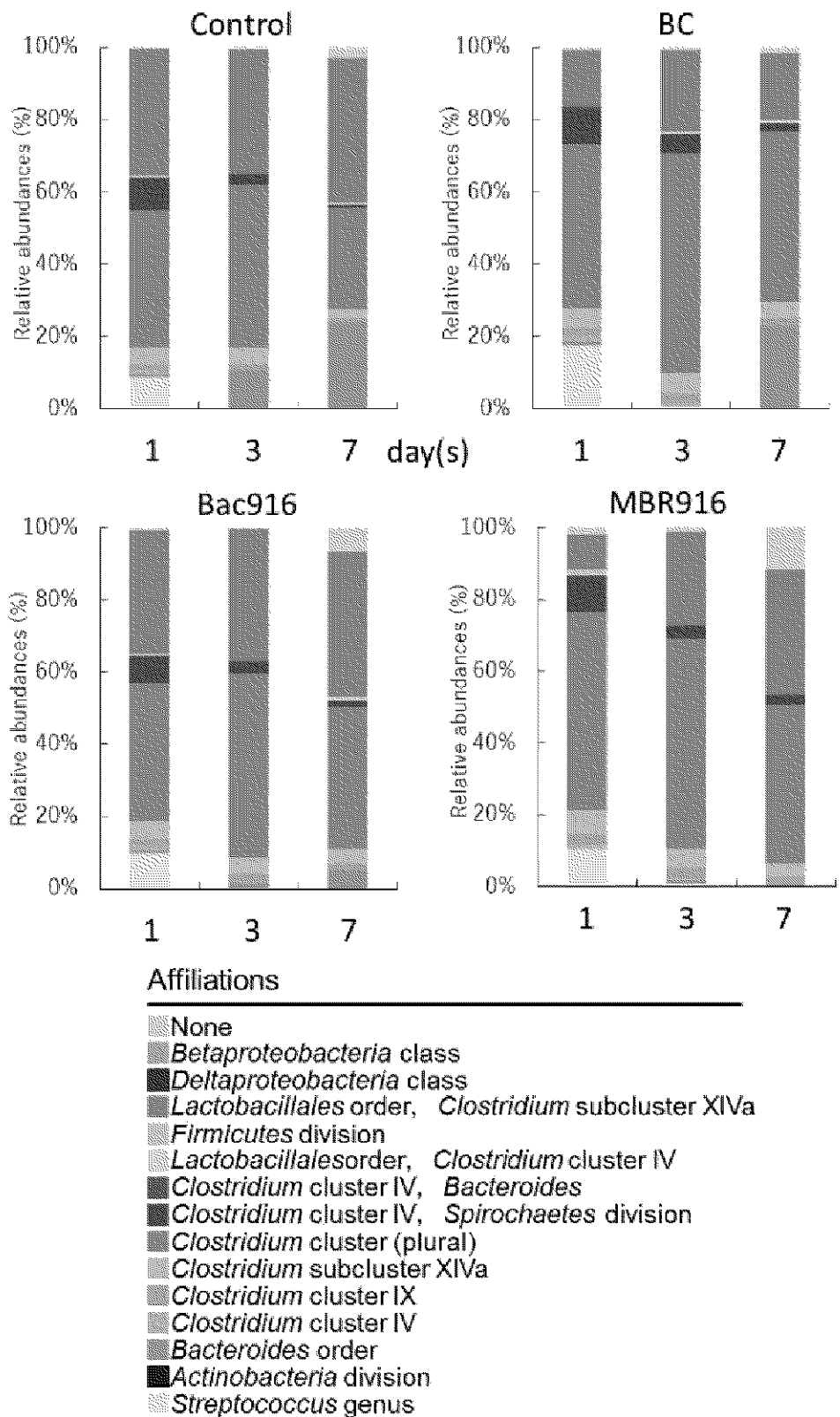


Fig. 6-3 Changes in the domination of pig faecal flora shown by T-RFLP analysis

## 第7章 総括

---

## 第1節 総括

近年、多量の抗生物質の使用により多剤耐性菌が数多く出現しており、ヒトへの感染拡大が危惧されている。そこで抗生物質に代わり、安全性が高い乳酸菌のバクテリオシンを使用して、多剤耐性菌の感染リスクを低減できないかと考えた。

宮城県産業技術総合センターが保有する 908 菌株の乳酸菌から *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM1002 株と *Bacillus* sp. C107 株に対して強い抗菌活性を示す 27 菌株をバクテリオシン高産生株として選抜した。また、食品やブタ糞便から薬剤耐性スクリーニング培地を用いて分離した菌株や、抗菌ディスク感受性試験を行い薬剤耐性が認められた菌株など、合わせて 11 菌株を薬剤耐性細菌として分離した。バクテリオシン高産生株の上清について、JCM1002 株を指標菌として、pH 中性化処理および熱処理を行った後、抗菌活性を試験したところ、各上清の抗菌活性は熱耐性および pH 依存性によってグループ化できた。また、アクチナーゼ E (プロテアーゼ) による消化試験に供したところ、*Lc. lactis* MBR916 株の培養上清はナイシンやガセリシン A と比較して高いプロテアーゼ耐性を示した。

MBR916 株の培養上清は、*Bacillus* sp. R11 株を除き試験した全ての薬剤耐性菌に対して抗菌活性を示し、抗菌スペクトルが広いバクテリオシンであると考えられた。本バクテリオシン(Bac916 と命名)は、抗菌活性スペクトルを比較すると、ナイシン様バクテリオシンであることが推察されたが、高いプロテアーゼ耐性を有すること、SDS-PAGE から推定した分子量が 4,200 でありナイシンと異なること、生育阻止円の特徴が異なることなどから、新奇バクテリオシンである可能性が示唆された。MBR916 株について、*Lc. lactis* 種が産生する既知のバクテリオシンの構造遺伝子を検出するプライマーペア 12 種類を用いて構造遺伝子の検出を試みたところ、いずれのプライマーペアでも増幅は認められなかった。

Bac916 の性状についてまとめると、MBR916 株によって産生され、大きな抗菌活性値( $< 2^{10}$  A.U./100mL)を有し、耐熱性に優れ、酸性から中性領域で抗菌活性を示し、プロテアーゼの消化作用に対して高い耐性を有するバクテリオシンであることが明らかとなった。特に、プロテアーゼに対して高い耐性を示す特性は、プロテアーゼが豊富な環境下においても抗菌活性を保持することが期待されるため、食品加工における口持ち向上や土壌環境の改善などへの応用が考えられる。Bac916 について、透析及びカラムクロマトグラフィーにより精製を行い、MALDI-TOF/MS

解析に供した結果、バクテリオシン本体由来と推察されるフラグメントが 5924.8 m/z に出現した。

食品および食品環境における Bac916 の多剤耐性菌への抗菌を検証するため、簡易的に精製した Bac916 粉末を原料に添加してかまぼこを作製し、かまぼこの汚染菌として検出された *Carno. maltaromaticum* C29 株や多剤耐性菌になりうる *Ec. faecalis* MYU572A 株等の汚染菌を付着させ、菌数の経時変化を観察した。Bac916 は、汚染菌が増殖する初期の段階で抗菌的に働き、ナイシンやその他の抗菌物質と併用することでかまぼこの汚染を防止できる可能性が示唆された。また、多剤耐性菌が発生しやすいブタの糞便に Bac916 を添加したところ、増殖する多剤耐性菌の菌数を有意に減少させることができた。

本研究において、乳酸菌のバクテリオシンを用いた多剤耐性菌の殺菌の可能性が示された。今後の展望として、Bac916 の構造遺伝子を中心とした遺伝子クラスターの特異性、解析を経て、1次構造の完全解明、合成経路の解明、作用機構の解明へとつなげていきたい。また、応用研究として、Bac916 を産生する MBR916 の家畜用餌としての可能性を探り、プロバイオティクス性やその他の機能性、また、糞便として排出された際の多剤耐性菌抑制効果など、家畜用機能性乳酸菌として応用を検討していきたい。

## 第2節 文献

- 1) 宮木高明: 医薬はいかにしてつくられたか. 日本獣醫協會雑誌, **3**, pp. 42-46, (1950)
- 2) 藤野政彦: 創薬の移り変わり. 日本内科学会雑誌, **91**, pp. 3190-3193, (2002)
- 3) Barber, M. and Rozwadowska-Dowzenko, M.: Infection by penicillin-resistant staphylococci. *Lancet*, **2**, pp. 641-4, (1948)
- 4) SPRATT, B.G.: Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. *proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **72**, pp. 2999-3003, (1975)
- 5) Massova, I. and Mobashery, S.: Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, **42**, pp. 1-17, (1998)
- 6) Perkins, H.R.: Specificity of combination between mucopeptide precursors and vancomycin or ristocetin. *Biochem J*, **111**, pp. 195-205, (1969)
- 7) Frere, J.M. and Joris, B.: Penicillin-sensitive enzymes in peptidoglycan biosynthesis. *Crit Rev Microbiol*, **11**, pp. 299-396, (1985)
- 8) Matagne, A., Lamotte-Brasseur, J., and Frere, J.M.: Catalytic properties of class A beta-lactamases: efficiency and diversity. *Biochem J*, **330 ( Pt 2)**, pp. 581-98, (1998)
- 9) Bo, G.: Giuseppe Brotzu and the discovery of cephalosporins. *Clinical Microbiology and Infection*, **6**, pp. 6-8, (2000)
- 10) 石井良和:  $\beta$ -ラクタマーゼの機能分類. 日本臨床微生物学雑誌, **24**, pp. 171-179, (2014)
- 11) Ambler, R.P.: The Structure of  $\beta$ -Lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **289**, pp.



- 321-331, (1980)
- 12) Kumarasamy, K.K., Toleman, M.A., Walsh, T.R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., Chaudhary, U., Doumith, M., Giske, C.G., Irfan, S., Krishnan, P., Kumar, A.V., Maharjan, S., Mushtaq, S., Noorie, T., Paterson, D.L., Pearson, A., Perry, C., Pike, R., Rao, B., Ray, U., Sarma, J.B., Sharma, M., Sheridan, E., Thirunarayan, M.A., Turton, J., Upadhyay, S., Warner, M., Welfare, W., Livermore, D.M., and Woodford, N.: Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis*, **10**, pp. 597-602, (2010)
  - 13) Bush, K. and Jacoby, G.A.: Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, **54**, pp. 969-76, (2010)
  - 14) Queenan, A.M. and Bush, K.: Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*, **20**, pp. 440-58, table of contents, (2007)
  - 15) Acar, J., Casewell, M., Freeman, J., Friis, C., and Goossens, H.: Avoparcin and virginiamycin as animal growth promoters: a plea for science in decision-making. *Clinical Microbiology and Infection*, **6**, pp. 477-482, (2000)
  - 16) Sievert, D.M., Rudrik, J.T., Patel, J.B., McDonald, L.C., Wilkins, M.J., and Hageman, J.C.: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. *Clin Infect Dis*, **46**, pp. 668-74, (2008)
  - 17) 厚生労働省: 薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン (2016-2020). pp. (2016)
  - 18) 岡川早苗: 乳酸菌の定義と分類・同定, in 乳酸菌の科学と技術, pp. 9-12, (1996)
  - 19) 森地俊樹, 富川房男, 岡川早苗, 山本憲二, 佐々木隆: 乳酸菌・ビフィズス菌の研究の現状と将来, in 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, 京都大学学術出版会, p. 2, (2010)
  - 20) 辨野義己: 「整腸力」, かんき出版, p. 49, (2013)

- 21) Nishimura, J., Kawai, Y., Aritomo, R., Ito, Y., Makino, S., Ikegami, S., Isogai, E., and Saito, T.: Effect of Formic Acid on Exopolysaccharide Production in Skim Milk Fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *Biosci Microbiota Food Health*, **32**, pp. 23-32, (2013)
- 22) Cotter, P.D., Hill, C., and Ross, R.P.: Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol*, **3**, pp. 777-88, (2005)
- 23) Nishie, M., Nagao, J.-I., and Sonomoto, K.: Antibacterial Peptides “Bacteriocins”: An Overview of Their Diverse Characteristics and Applications. *Biocontrol Science*, **17**, pp. 1-16, (2012)
- 24) Dufour, A., Hindre, T., Haras, D., and Le Pennec, J.P.: The biology of lantibiotics from the lactacin 481 group is coming of age. *FEMS Microbiol. Rev.*, **31**, pp. 134-67, (2007)
- 25) Matsusaki, H., Endo, N., Sonomoto, K., and Ishizaki, A.: Lantibiotic nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis* IO-1: relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**, pp. 36-40, (1996)
- 26) Fukao, M., Obita, T., Yoneyama, F., Kohda, D., Zendo, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K.: Complete covalent structure of nisin Q, new natural nisin variant, containing post-translationally modified amino acids. *Biosci Biotechnol Biochem*, **72**, pp. 1750-5, (2008)
- 27) de Kwaadsteniet, M., Ten Doeschate, K., and Dicks, L.M.: Characterization of the structural gene encoding nisin F, a new lantibiotic produced by a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolate from freshwater catfish (*Clarias gariepinus*). *Appl Environ Microbiol*, **74**, pp. 547-9, (2008)
- 28) O'Connor, P.M., O'Shea, E.F., Guinane, C.M., O'Sullivan, O., Cotter, P.D., Ross, R.P., and Hill, C.: Nisin H Is a New Nisin Variant Produced by the Gut-Derived Strain *Streptococcus hyointestinalis* DPC6484. *Appl Environ Microbiol*, **81**, pp. 3953-60, (2015)

- 29) Wirawan, R.E., Klesse, N.A., Jack, R.W., and Tagg, J.R.: Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. *Appl Environ Microbiol*, **72**, pp. 1148-56, (2006)
- 30) Wu, Z., Wang, W., Tang, M., Shao, J., Dai, C., Zhang, W., Fan, H., Yao, H., Zong, J., Chen, D., Wang, J., and Lu, C.: Comparative genomic analysis shows that *Streptococcus suis* meningitis isolate SC070731 contains a unique 105K genomic island. *Gene*, **535**, pp. 156-64, (2014)
- 31) Mulders, J.W.M., Boerrigter, I.J., Rollema, H.S., Siezen, R.J., and Vos, W.M.: Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *Eur. J. Biochem.*, **201**, pp. 581-584, (1991)
- 32) Stein, T., Borchert, S., Kiesau, P., Heinzmann, S., Klöss, S., Klein, C., Helfrich, M., and Entian, K.-D.: Dual control of subtilin biosynthesis and immunity in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, **44**, pp. 403-416, (2002)
- 33) Xu, J., Fu, S., Liu, M., Xu, Q., Bei, W., Chen, H., and Tan, C.: The two-component system NisK/NisR contributes to the virulence of *Streptococcus suis* serotype 2. *Microbiol. Res.*, **169**, pp. 541-6, (2014)
- 34) Breukink, E., Wiedemann, I., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Sahl, H.-G., and de Kruijff, B.: Use of the Cell Wall Precursor Lipid II by a Pore-Forming Peptide Antibiotic. *Science*, **286**, p. 5448, (1999)
- 35) Islam, M.R., Nagao, J., Zendo, T., and Sonomoto, K.: Antimicrobial mechanism of lantibiotics. *Biochem. Soc. Trans.*, **40**, pp. 1528-33, (2012)
- 36) 浜川康次, 佐藤憲一, 川上準子, 星憲司, 青木空眞: 抗菌薬サークル図データブック, 株式会社じほう, pp. 12-13, (2010)
- 37) Isobe, M., Uejima, E., Seki, M., Yamagishi, Y., Miyawaki, K., Yabuno, K., Masaoka, M., Hamaguchi, S., Yoshioka, N., and Tomono, K.:

- Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia at a university hospital in Japan. *J Infect Chemother*, **18**, pp. 841-7, (2012)
- 38) 千葉菜穂子: わが国における侵襲性肺炎球菌感染症の実態とその予防としての肺炎球菌ワクチン. 日本化学療法学会雑誌, **59**, pp. 561-572, (2011)
- 39) 川山智隆, 徳永尚登, 横山俊伸, 本田順一, 名取英世, 市川洋一郎, 大泉耕太郎: 易感染者におけるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 感染症の臨床的検討. 感染症学雑誌, **67**, pp. 615-621, (1993)
- 40) Courvalin, P.: Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis*, **42 Suppl 1**, pp. S25-34, (2006)
- 41) Giraffa, G.: Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.*, **26**, pp. 163-71, (2002)
- 42) Akopyanz, N., Bukanov, N.O., Westblom, T.U., and Berg, D.E.: PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res.*, **20**, pp. 6221-5, (1992)
- 43) 日本臨床微生物学会: 抗菌薬感受性検査のための標準法. 特定非営利活動法人日本臨床検査標準協議会, (2012)
- 44) Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., Dymock, D., and Wade, W.G.: Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, **64**, pp. 795-9, (1998)
- 45) Hutter, G., Schlagenhaut, U., Valenza, G., Horn, M., Burgemeister, S., Claus, H., and Vogel, U.: Molecular analysis of bacteria in periodontitis: evaluation of clone libraries, novel phylotypes and putative pathogens. *Microbiology*, **149**, pp. 67-75, (2003)
- 46) 岩田健太郎, 宮入烈: 抗菌薬の考え方, 使い方. 株式会社中外医学社, pp. 366-375, (2004)
- 47) Taber, H.W., Mueller, J.P., Miller, P.F., and Arrow, A.S.: Bacterial

- uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol Rev*, **51**, pp. 439-57, (1987)
- 48) Drancourt, M. and Raoult, D.: rpoB gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, pp. 1333-8, (2002)
- 49) 松本哲也: 多剤耐性緑膿菌. *モダンメディア*, **53**, pp. 14-19, (2007)
- 50) Kuehn, B.M.: "Nightmare" bacteria on the rise in US hospitals, long-term care facilities. *JAMA*, **309**, pp. 1573-4, (2013)
- 51) 荒川宜親: 広域  $\beta$ -ラクタム薬耐性に関与する  $\beta$ -ラクタマーゼの特徴と遺伝的相関. *The journal of the Japanese Society for Clinical Microbiology*, **13**, pp. 150-161, (2003)
- 52) 朝野和典: 多剤耐性緑膿菌・腸球菌感染症. *臨床透析*, **22**, pp. 203-208, (2006)
- 53) 石井良和: 多剤耐性緑膿菌. *Medical Practice* **22**, pp. 2097-2098, (2005)
- 54) 小小林史尚, 柿川真紀子, 山田丸, 陳彬, 石廣玉, 岩坂泰信: 黄砂発生源におけるバイオエアロゾル拡散に関する研究. *エアロゾル研究*, **22**, pp. 218-227, (2007)
- 55) Ichinose, Y. and Iwanaga, M.: Experimental Study on the Parenteral Use of Antibiotics for the Treatment of Bacterial Diarrheal Diseases. *Tropical medicine*, **25**, pp. 11-21, (1983)
- 56) 農林省: 飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令. 昭和51年7月24日. 農林省令第35号, (1976)
- 57) Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N.K., Sawano, T., Inoue, R., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H., and Hiramatsu, K.: Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus*

- aureus*. *Lancet*, **357**, pp. 1225-40, (2001)
- 58) Ishihara, Y., Yagi, T., Mochizuki, M., and Ohta, M.: Capsular Types, Virulence Factors and DNA Types of *Klebsiella oxytoca* Strains Isolated from Blood and Bile. *Kansenshogaku Zasshi*, **86**, pp. 121-126, (2012)
- 59) Hoffmann, K.M., Deutschmann, A., Weitzer, C., Joainig, M., Zechner, E., Hogenauer, C., and Hauer, A.C.: Antibiotic-associated hemorrhagic colitis caused by cytotoxin-producing *Klebsiella oxytoca*. *Pediatrics*, **125**, pp. e960-3, (2010)
- 60) Ueda, S., Kuwabara, Y., Agata, N., Tokumaru, Y., Konuma, H., and Shinagawa, K.: Occurrences of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in Vegetables and Soil. *JAPANESE JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY*, **7**, pp. 177-182, (1991)
- 61) 光岡知足: 腸内フローラとその機能. 食品衛生学雑誌, **36**, pp. 583-587, (1995)
- 62) Lauderdale, T.L., Shiau, Y.R., Wang, H.Y., Lai, J.F., Huang, I.W., Chen, P.C., Chen, H.Y., Lai, S.S., Liu, Y.F., and Ho, M.: Effect of banning vancomycin analogue avoparcin on vancomycin-resistant enterococci in chicken farms in Taiwan. *Environ. Microbiol.*, **9**, pp. 819-23, (2007)
- 63) Suda, Y., Villena, J., Takahashi, Y., Hosoya, S., Tomosada, Y., Tsukida, K., Shimazu, T., Aso, H., Tohno, M., Ishida, M., Makino, S., Ikegami, S., and Kitazawa, H.: Immunobiotic *Lactobacillus jensenii* as immune-health promoting factor to improve growth performance and productivity in post-weaning pigs. *BMC Immunol*, **15**, pp. 24, (2014)
- 64) 勝田賢: 耐性菌と抗生物質による治療. 家畜感染症学会誌, **2**, pp. 1-8, (2013)
- 65) 川西路子, 比企基高: 牛及び豚用フルオロキノロン剤のリスク管理措置について. 日本 SPF 豚研究会, **41**, pp. 44-47, (2012)
- 66) 宮崎博章, 入江利行, 素元美佐, 溝口裕美, 永山真紀: カルバペネ

- ム薬の使用制限下によるイミペネム耐性緑膿菌と多剤耐性緑膿菌の検出率の推移. *環境感染*, **21**, pp. 162-167, (2006)
- 67) Hayakawa, M., Yamamura, H., Nakagawa, Y., Kawa, Y., Hayashi, Y., Misonou, T., Kaneko, H., Kikushima, N., Takahashi, T., Yamasaki, S., Uegaki, Y., Terasawa, A., Takao, K., Mori, T., Ago, K., Saito, N., and Hasegawa, T.: Taxonomic Diversity of Actinomycetes Isolated from Swine Manure Compost. *Actinomycetologica*, **24**, pp. 58-62, (2010)
- 68) Brown, J.M., Steigerwalt, A.G., Morey, R.E., Daneshvar, M.I., Romero, L.J., and McNeil, M.M.: Characterization of clinical isolates previously identified as *Oerskovia turbata*: proposal of *Cellulosimicrobium funkei* sp. nov. and emended description of the genus *Cellulosimicrobium*. *Int J Syst Evol Microbiol*, **56**, pp. 801-4, (2006)
- 69) Severina, E., Severin, A., and Tomasz, A.: Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. *J Antimicrob Chemother*, **41**, pp. 341-7, (1998)
- 70) Kawai, Y., Saito, T., Kitazawa, H., and Itoh, T.: Gassericin A; an uncommon cyclic bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39 linked at N- and C-terminal ends. *Biosci Biotechnol Biochem*, **62**, pp. 2438-40, (1998)
- 71) Zhu, H., Qu, F., and Zhu, L.H.: Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Res.*, **21**, pp. 5279-80, (1993)
- 72) Akopyanz, N., Bukanov, N.O., Westblom, T.U., Kresovich, S., and Berg, D.E.: DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, **20**, pp. 5137-42, (1992)
- 73) Cholden, L.S.: A Simplified Technique for the Agar Cup Assay of Penicillin. *J. Bacteriol.*, **47**, pp. 402-3, (1944)
- 74) Tsukatani, T., Higuchi, T., Suenaga, H., Akao, T., Ishiyama, M.,

- Ezoe, T., and Matsumoto, K.: Colorimetric microbial viability assay based on reduction of water-soluble tetrazolium salts for antimicrobial susceptibility testing and screening of antimicrobial substances. *Anal Biochem*, **393**, pp. 117-25, (2009)
- 75) Holder, I.A. and Boyce, S.T.: Agar well diffusion assay testing of bacterial susceptibility to various antimicrobials in concentrations non-toxic for human cells in culture. *Burns*, **20**, pp. 426-9, (1994)
- 76) 厚生労働省: 食安基発第 0302003 号及び食安監発第 0302003 号厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長及び監視安全課長連名通知, (2009)
- 77) Hastings, J.W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K.L., Vederas, J.C., and Stiles, M.E.: Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J. Bacteriol.*, **173**, pp. 7491-500, (1991)
- 78) Jack, R.W., Tagg, J.R., and Ray, B.: Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev*, **59**, pp. 171-200, (1995)
- 79) Miller, K.W., Schamber, R., Osmanagaoglu, O., and Ray, B.: Isolation and characterization of pediocin AcH chimeric protein mutants with altered bactericidal activity. *Appl Environ Microbiol*, **64**, pp. 1997-2005, (1998)
- 80) Nishie, M., Nagao, J.-I., and Sonomoto, K.: Antibacterial Peptides "Bacteriocins": An Overview of Their Diverse Characteristics and Applications. *Biocontrol Science*, **17**, pp. 1-16, (2012)
- 81) 善藤威史, 石橋直樹, 園元謙二: 乳酸菌バクテリオシンの探索と利用. 日本乳酸菌学会誌, **25**, pp. 24-33, (2014)
- 82) Alegria, A., Delgado, S., Roces, C., Lopez, B., and Mayo, B.: Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. *Int J Food Microbiol*, **143**, pp. 61-6, (2010)
- 83) Iwatani, S., Yoneyama, F., Miyashita, S., Zendo, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K.: Identification of the genes involved in the



- secretion and self-immunity of lacticin Q, an unmodified leaderless bacteriocin from *Lactococcus lactis* QU 5. *Microbiology*, **158**, pp. 2927-35, (2012)
- 84) Sawa, N., Zendo, T., Kiyofuji, J., Fujita, K., Himeno, K., Nakayama, J., and Sonomoto, K.: Identification and characterization of lactocyclicin Q, a novel cyclic bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. strain QU 12. *Appl Environ Microbiol*, **75**, pp. 1552-8, (2009)
- 85) Huot, E., Meghrous, J., Barrena-Gonzalez, C., and Petitdemange, H.: Bacteriocin J46, a New Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* J46: Isolation and Characterization of the Protein and Its Gene. *Anaerobe*, **2**, pp. 137-145, (1996)
- 86) Mayr-Harting, A., Hedges, A.J., and Berkeley, R.C.W.: Methods for studying bacteriocins. *Methods in Microbiology*, pp. 7A: 315-422, (1972)
- 87) Davies, E.A., Bevis, H.E., Potter, R., Harris, J., Williams, G.C., and Delves-Broughton, J.: Research note : The effect of pH on the stability of nisin solution during autoclaving. *Lett. Appl. Microbiol.*, **27**, pp. 186-188, (1998)
- 88) Muth, G., Nußbaumer, B., Wohlleben, W., and Pühler, A.: A vector system with temperature-sensitive replication for gene disruption and mutational cloning in streptomycetes. *MGG Molecular & General Genetics*, **219**, pp. 341-348, (1989)
- 89) Maguin, E., Duwat, P., Hege, T., Ehrlich, D., and Gruss, A.: New thermosensitive plasmid for gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.*, **174**, pp. 5633-5638, (1992)
- 90) Chen, J., Shen, J., Solem, C., and Jensen, P.R.: Oxidative stress at high temperatures in *Lactococcus lactis* due to an insufficient supply of Riboflavin. *Appl Environ Microbiol*, **79**, pp. 6140-7, (2013)
- 91) Jiang, L., Liu, Y., Yan, G., Cui, Y., Cheng, Q., Zhang, Z., Meng, Q., Teng, L., and Ren, X.: Aeration and fermentation strategies on nisin production. *Biotechnol. Lett*, **37**, pp. 2039-45, (2015)

- 92) 石川潤一, 橋本建哉, 川井泰, 齋藤忠夫, 矢口仁: 笹かまぼこ汚染菌叢の解析と乳酸菌による保存性向上の可能性. 宮城県産業技術総合センター研究報告, **6**, pp. 22-25, (2009)
- 93) Leisner, J.J., Laursen, B.G., Prevost, H., Drider, D., and Dalgaard, P.: *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods. *FEMS Microbiol. Rev.*, **31**, pp. 592-613, (2007)
- 94) Miller, A., Morgan, M.E., and Libbey, L.M.: *Lactobacillus maltaromicus*, a New Species Producing a Malty Aroma. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **24**, pp. 346-354, (1974)
- 95) 内藤茂三: 乳酸菌と酵母による食品工場汚染と食品の異臭変敗. におい・かおり環境学会誌, **41**, pp. 14, (2010)
- 96) Hashimoto, K., Bari, M.L., Inatsu, Y., Kawamoto, S., and Shima, J.: Biopreservation of Kamaboko (Steamed Surimi) Using Piscicolin KH1 Produced by *Carnobacterium maltalomaticum* KH1. *Japanese Journal of Food Microbiology*, **28**, pp. 193-200, (2011)
- 97) Yamazaki, K., Tashiro, T., Shirahama, S., Jun, J.-y., and Kawai, Y.: Growth Inhibition of Spore-forming Bacteria in Fish-paste Products by Nisin. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **61**, pp. 70-76, (2014)
- 98) 一般財団法人日本食品分析センター: 畜水産食品における薬剤耐性菌の出現実態調査報告書. (2008)

## 第3節 謝辞

第2章および第3章の研究は、公益財団法人伊藤記念財団の支援を受け実施致しました。感謝申し上げます。

実験方法のご指導をいただきました日本大学生物資源科学部准教授 川井泰先生、岡山大学大学院環境生命科学研究科 荒川健佑先生に心から感謝申し上げます。

論文の作成に当たり、実験、学会発表など、全般の指導をいただきました、本学食産業学部教授 石田光晴先生に心から感謝申し上げます。乳酸菌の研究者として、いつもご指導と温かいご助言をいただき、本論文の副査を務めていただきました東北大学大学院農学研究科教授 齋藤忠夫先生に心から感謝申し上げます。投稿論文の作成から、研究全般のアドバイス、研究機器の使用にいたるまで、きめ細やかに指導していただきました、本学食産業学部教授 須田義人先生、准教授 菰田俊一先生に心から感謝申し上げます。膨大な量の乳酸菌スクリーニングをお手伝いいただいた、本学食産業学部フードビジネス学科微生物機能健康科学研究室の針生萌絵さん、吉田安友子さん、渡邊健さん、渡邊航平さん、同学科応用微生物学研究室の佐々木直美さん、中居久拓さん、同学科食品分子栄養学研究室の高橋隼登さんに心から感謝申し上げます。学生生活において、色々と相談に乗っていただいた、本学博士後期課程農環境研究領域学生 宮井克弥さんに心から感謝申し上げます。大学院進学に際し、当時の上司という立場から適切なアドバイスと入学試験の推薦状をいただきました、元・宮城県産業技術総合センター副所長、本学名誉教授 池戸重信先生に心から感謝申し上げます。小生が社会人学生として就学するに際し、業務分担に寛大な配慮をいただきました、宮城県産業技術総合センター 守和彦所長、千葉伸洋副所長、食品バイオ技術部 三瓶郁雄部長、橋本建哉総括研究員、畑中咲子総括研究員、樋口敦研究員、吉村緑技師に心から感謝申し上げます。

最後に、研究の導入から、研究内容の精査、実験、学会発表、論文作成に至るまで、熱意を持って虚飾なくご指導をいただきました、東海大学農学部バイオサイエンス学科 木下英樹先生に心から感謝申し上げます。