

令和 7 年 7 月 4 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2024

課題番号：19K05890

研究課題名（和文）炭疽菌およびセレウス菌の芽胞・栄養型細胞に抗菌活性を有する食品添加物の多面的活用

研究課題名（英文）Multiple Applications of Food Additives with Antimicrobial Activity against Spores and Nutrient-Type Cells of *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus*.

研究代表者

奥谷 晶子（OKUTANI, AKIKO）

国立感染症研究所・獣医科学部・室長

研究者番号：60392320

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：食品添加物のグリシン、甘草抽出物およびL体・D体アミノ酸の炭疽菌芽胞の発芽阻止能と栄養型細胞の増殖能を確認した。Muller Hinton brothに炭疽菌ワクチン株34F2株芽胞液を接種し、37℃で振とう培養しながらOD600を経時的に測定した。グリシン、甘草抽出物では芽胞発芽時の吸光度低下と24時間後の増殖がみられず、発芽抑制作用と増殖抑制作用を持つことが明らかになった。L体アミノ酸ではL-alanineが最も発芽促進作用が高く、D体アミノ酸では部分的な発芽抑制がみられたものの、L体・D体ともに24時間後の栄養型細胞への増殖が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究では、身近な食品添加物（グリシン、甘草抽出物）が炭疽菌という危険な細菌の芽胞（休眠状態の菌）の発芽を防ぎ、増殖も抑制することを発見しました。炭疽菌は生物兵器としても懸念される病原菌ですが、日常的に使用される安全な食品添加物で対策できる可能性が示されました。この知見は、食品保存技術の向上や、万が一の生物テロ対策における新しい防御手段の開発につながる重要な発見といえます。安全で入手しやすい物質による感染症対策の可能性を示した点で、学術的にも社会的にも大きな意義があります。

研究成果の概要（英文）：The ability of the food additives glycine, licorice extract and L- and D-amino acids to inhibit the germination of *Bacillus anthracis* spores and the growth of vegetative cells was confirmed. A *Bacillus anthracis* vaccine strain 34F2 spore solution was inoculated into Muller Hinton broth, which was then shaken at 37°C while the OD600 was measured over time. Glycine and licorice extract were found to reduce the absorbance at the time of spore germination, and to prevent proliferation after 24 hours. This indicates that they have both germination- and growth-inhibiting effects. Of the L-amino acids tested, L-alanine had the strongest germination-promoting effect. Although partial germination inhibition was observed with D-amino acids, both L- and D-amino acids promoted the growth of vegetative cells after 24 hours.

研究分野：獣医公衆衛生

キーワード：芽胞発芽制御 炭疽菌

### 1. 研究開始当初の背景

炭疽菌は重篤な人獣共通感染症であると同時に、過去においては細菌兵器として使用され、発生すると、公衆衛生上も動物衛生上も影響の大きい病原体である。土壌では芽胞として長期間生息可能で、生体内に入ると芽胞から発芽して栄養型となり血液中で莢膜を発現して爆発的に増殖する。また、炭疽菌と遺伝学的に非常に近縁なセレウス菌は、食中毒や院内感染の起原菌であり、米国やアフリカにおいては炭疽菌の病原性遺伝子を保有して炭疽と類似の疾病を引き起こす高病原性セレウス菌が土壌や野生動物から分離されている。このような炭疽菌や高病原性セレウス菌の感染防御対策は、土壌・水系などの環境検体、野生動物や家畜動物検体、食品など多岐に渡る分野にまたがって必要である。日本においては、近年炭疽の発生はないものの、食中毒や院内感染セレウス菌の発生は毎年発生している。

これまで炭疽菌芽胞の除染には主にホルマリンや過酢酸、次亜塩素酸ナトリウムなどの環境や人体への毒性が極めて強い薬剤が用いられてきた。一方で持続可能な環境を保全するため、「環境への負荷の少ない除染方法」が望まれている。また、炭疽菌の薬剤耐性菌対策においては、自然発生で報告のあるペニシリン耐性の他に生物テロによる使用を想定する上では人為的な薬剤耐性が賦与される可能性を考慮する必要があるため、既存の抗菌薬以外の抗菌薬による「薬剤耐性菌への対策」の整備も重要である。また、院内感染の起原となるセレウス菌の感染防御は、「治療薬との拮抗を生じない対策」を講じる必要がある。このような対応が可能となる抗菌物質として既に市販食品の耐熱性芽胞菌の発育抑制のために使用されている食品添加物の中から、炭疽菌の芽胞の発芽抑制および栄養型細胞の増殖抑制効果を持つものを探索する予備的実験の中で効果を有する複数の候補物質が得られた。日持向上剤として使用されているグリシン、甘草抽出物が炭疽菌の芽胞からの発芽と栄養型細胞の増殖を有意に抑制することを確認した。また、他の日持向上剤であるホップ抽出物、緑茶カテキンの他に乳化剤であるシヨ糖エステルやシクロデキストリンが炭疽菌の栄養型細胞の増殖を優に抑制することも確認した。このことから、これら化合物の詳細な抗菌作用機序を明らかにすることで上記の課題を克服するための基礎的な知見を得ることが可能となると考えるに至った。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、現在芽胞菌の増殖抑制に使用されている食品添加物で炭疽菌やセレウス菌に対して抗菌活性を有する化合物を用いて、通常用いられる環境負荷の高い化学剤に代わる抗芽胞薬への応用や、既存の抗生物質に代わる抗菌作用を期待した抗菌薬への応用につながるための「人にも環境にも負荷の少ない殺芽胞薬・抗菌薬としての各種天然由来食品添加物の多面的な利用・応用へと発展させるための基礎的な知見を得ることを目指す」ことである。炭疽菌のみならずセレウス菌への有用性を確認することで、食の安全性のさらなる担保も可能となる。

本研究では、食品添加物として使用されている各種天然由来抗菌性化合物による炭疽菌とセレウス菌芽胞に対する抗発芽作用と、野生株・薬剤耐性炭疽菌および食中毒・院内感染セレウス菌に対する栄養型細胞の増殖抑制活性の抗菌作用機序を明らかにすることが目的である。食品添加物として実際に食品に使用されているホップ抽出物(キサントフモール)や甘草抽出物、グリシン、シヨ糖エステル、シクロデキストリンおよび緑茶カテキンは耐熱性芽胞菌の増殖抑制に有効であることが報告されている。これまでの報告では、これら化合物によるセレウス菌芽胞を用いた抗菌作用の報告はあるものの、炭疽菌や食中毒や院内感染で分離されたセレウス菌を用いた詳細な作用機序の検証は行われていない。そのため、本研究では野生株および薬剤耐性炭疽菌および食中毒・院内感染セレウス菌を材料として、「芽胞からの発芽の抑制」と「発芽後の栄養型細胞の増殖抑制」に分けて活性の検証を行い、関与する遺伝子を分子生物学的手法により明らかにする

### 3. 研究の方法

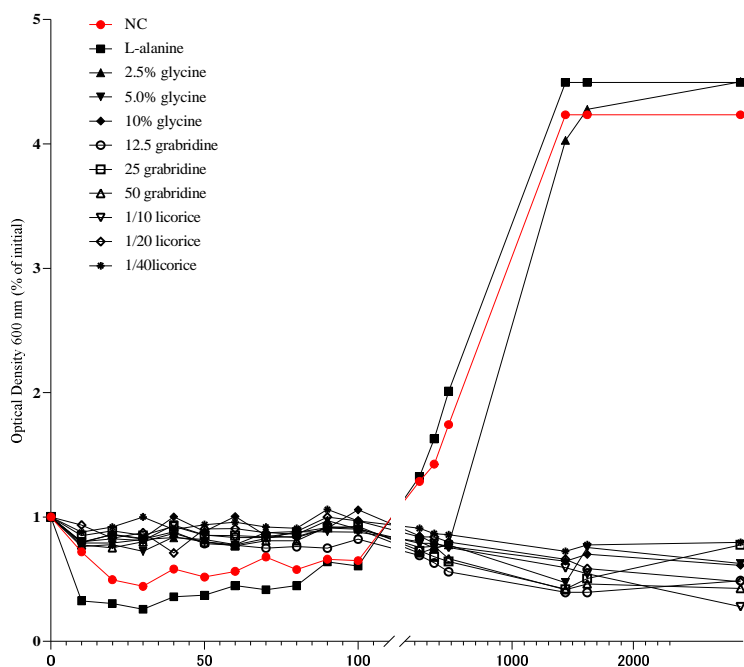
炭疽菌芽胞の発芽抑制活性の検証と作用機序の解明のため、キサントフモール(ホップ抽出物由来)、甘草抽出物、グリシン、シヨ糖エステルおよびシクロデキストリン、緑茶カテキンの中で最も抗菌活性が高いと報告のあるエピガロカテキンガレート(EGCg)の各化合物を用いて炭疽菌芽胞を液体培地と上記化合物に混合させ培養を行った。炭疽菌および食中毒・院内感染セレウス菌芽胞を液体培地と上記化合物に混合させ培養を行う。37℃で一定時間(0~24時間)反応させて芽胞からの発芽を濁度低下の割合で確認し、各化合物の殺芽胞最小有効濃度および最小発育阻止濃度を測定し、食品への使用濃度との比較を行った。

37℃で一定時間(0~24時間)反応させて芽胞からの発芽を濁度低下の割合で確認し、各化合物の殺芽胞最小有効濃度および最小発育阻止濃度を検証した。また、炭疽菌および食中毒・院内感染セレウス菌に対して有効な抗菌剤と併用し、抗菌剤の最小発育阻止濃度の低下と併用効果を検

証した。

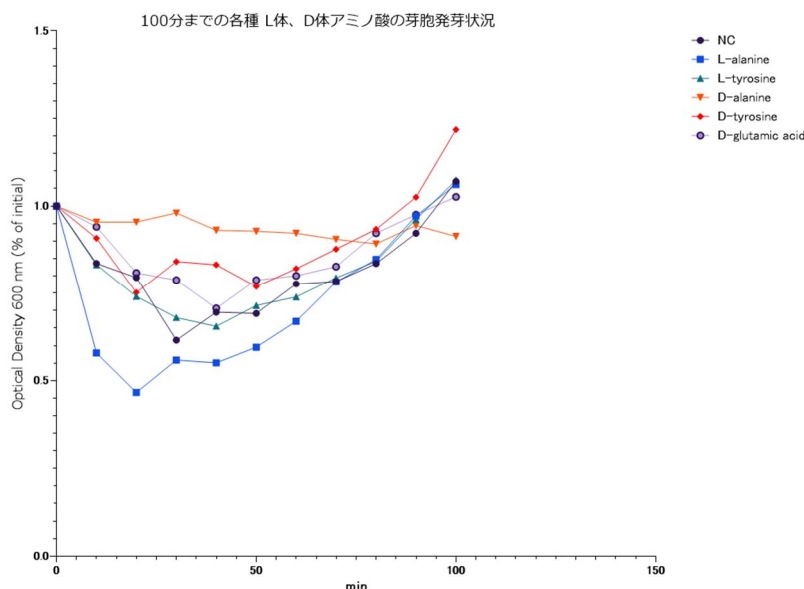
#### 4. 研究成果

炭疽菌とセレウス菌芽胞に対する抗発芽作用と、野生株・薬剤耐性炭疽菌および食中毒・院内感染セレウス菌に対する栄養型細胞の増殖抑制活性の抗菌作用が顕著に認められた甘草抽出物、および甘草抽出物の構成成分であるグラブリジン、グリシンを用いて炭疽菌芽胞を用いて「芽胞からの発芽の抑制」と「発芽後の栄養型細胞の増殖抑制」に分けて活性の検証を行った。甘草抽出物は 37 度で液体培地中に 2.5w/v%、5.0w/v%、10.0w/v%の添加では発芽が抑制され、その後の菌増殖もみられなかった。グラブリジンは 37 度の液体培地中に 0.75 μg/mL、1.5 μg/mL、3.125 μg/mL 添加した場合には炭疽菌芽胞の発芽を抑制されず、栄養型細胞の増殖がみられたが、25 μg/mL、12.5 μg/mL、6.25 μg/mL の添加では発芽が抑制されその後の菌増殖もみられなかった。グリシンは、37 度で液体培地中に 1.25w/v%、2.5w/v%添加した場合には炭疽菌芽胞の発芽を抑制されず、栄養型細胞の増殖がみられたが、5.0w/v%の添加では発芽が抑制されその後の菌増殖もみられなかった。



L 体アミノ酸 (L-alanine、L-tyrosine)、D 体アミノ酸 (D-alanine、D-tyrosine、D-glutamic acid) をの炭疽菌芽胞の発芽阻止能および栄養型細胞の増殖能を確認した。Muller Hinton broth に混合し、炭疽菌ワクチン株 34F2 株の芽胞液を植菌し、37 度で一晩振とう培養した。培養開始 100 分までは 10 分毎、以降は 24 時間後まで経時的に OD600 を測定して芽胞の発芽および栄養型細胞の増殖の有無を確認した結果、発芽促進作用のある L 体アミノ酸では L-alanine が最も促進作用が高かった。D 体アミノ酸

では培地のみと比較して吸光度の低下は抑制され、部分的な発芽の抑制はみられたものの、L 体、D 体ともに 24 時間後の栄養型細胞への増殖が確認された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Akiko Okutani, Masakatsu Taira, Shun Iida, Eun-Sil Park, Mikuni Tokuyoshi, Yuya Watari, Tadaki Suzuki, and Ken Maeda.	4. 巻 5
2. 論文標題 Draft genome sequence of Yersinia pseudotuberculosis isolated from a wild rat in Japan	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mra.01269-23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Akiko Okutani, Shigeru Morikawa and Ken Maeda	4. 巻 8
2. 論文標題 Green tea catechin epigallocatechin gallate inhibits vegetative cell outgrowth and expression of beta-lactamase genes in penicillin-resistant Bacillus anthracis strain PCr	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 699
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pathogens13080699	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Akiko Okutani, Shu Okugawa, Fumie Fujimoto, Mahoko Ikeda, Takeya Tsutsumi, Kyoji Moriya, and Ken Maeda	4. 巻 2
2. 論文標題 Draft genome sequence including the capsule operon of a Bacillus cereus strain isolated from a patient with bacteremia in Japan	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00766-23.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 奥谷晶子
2. 発表標題 炭疽菌等の全ゲノム配列を用いた疫学的研究 感染研・獣医科学部での事例紹介
3. 学会等名 第167回日本獣医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 奥谷晶子	4. 発行年 2024年
2. 出版社 文栄堂出版	5. 総ページ数 496
3. 書名 獣医公衆衛生学	

1. 著者名 岡本陽、奥谷晶子	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 3524
3. 書名 Molecular Medical Microbiology, 3rd Edition.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------