

研究成果報告書

【申請者氏名】

平山 力

【所属機関】

農業・食品産業技術総合研究機構生物機能利用研究部門

【研究題目】

Enterococcus 属細菌の増殖を抑制する飼料組成の解明と抗菌剤無添加飼料の開発

【研究目的】

現在、カイコの人工飼料には細菌類の増殖防止のため、抗菌剤が添加されている。しかしながら、畜産分野において抗菌剤が多用されたことによる薬剤耐性菌の出現が世界中で報告されており、畜産分野における抗菌剤の規制が年々厳しくなっているため、今後蚕病に有効な抗菌剤の使用が制限される懸念がある。カイコの人工飼料は、共同飼育所における稚蚕人工飼料育のために使用されている他、蚕種業者、有用物質生産を行うバイオ企業、大学等の教育機関、公的な研究機関等においても日常的に利用されている。もし、カイコの人工飼料へ添加する抗菌剤が規制されることになれば、蚕糸関連業界に大きな影響があるものと予想される。また、抗菌剤を添加した人工飼料で飼育を行なっているにもかかわらず、しばしば *Enterococcus* 属細菌による軟化病の発生が見られることから、実際問題として耐性菌がすでに出現している可能性も考えられている。そこで、本申請研究では、細菌性軟化病の原因菌（腸球菌；*Enterococcus* 属細菌）の増殖を抑制する飼料組成について解明を行うとともに、「抗菌剤無添加飼料」の開発を試みる。

【研究内容及び成果】

カイコ本来のエサである桑葉で飼育を行なった場合、幼虫の消化管やフン中には桑葉に由来する数種類の細菌が検出されるものの、生育に影響を及ぼすことはない。ところが、人工飼料で飼育を行うと、飼育環境に由来する *Enterococcus* 属細菌のみが優先的に増殖し、壮蚕期(4、5 齢)に軟化症状を示し、死亡する幼虫が多発することがある。この原因はカイコの飼料そのもの、あるいは飼料を摂取した幼虫の腸内環境が *Enterococcus* 属細菌の増殖に適しているためと考えられる。組成を様々に変えた飼料を作成し、人工飼料上や消化管内における *Enterococcus* 属細菌の増殖の違いについて解析し、*Enterococcus* 属細菌が増殖しにくい人工飼料の開発を試みることにした。

そこで、まずは実験に使用する *Enterococcus* 属細菌を軟化症状で死亡した幼虫から分離することにした。分離された細菌は 16SrRNA の配列データから、*Enterococcus munditii* であり、カイコ軟化病の原因菌としてこれまで報告されている細菌と同種であることが確認され

た。

また、実験に使用する飼料としては、あえて腐敗や細菌感染のリスクが多い「湯練り飼料」を用いることにした。まず、防腐剤、防カビ剤として添加されている抗生物質クロラムフェニコール、有機酸類（アスコルビン酸、クエン酸、ソルビン酸、プロピオン酸）の有無によって8種類の粉体飼料を作成し、熱湯を加えて湯練り調製を行った。調製直後と調製後室温で48時間放置した後の一般細菌数を測定したところ、クロラムフェニコールの有無によらず、有機酸類を添加した飼料では、一般細菌の増殖がないことが確認された（表1）。一方で、クロラムフェニコール単独では防腐効果がないことが判明した（表1）。

表1. 抗菌剤、有機酸類の添加の異なる湯練り飼料における一般細菌の増殖

細菌数 (cfu/g)	抗菌剤（クロラムフェニコール）添加なし				抗菌剤（クロラムフェニコール）添加あり			
	有機酸添加 なし	+VC +クエン酸	+VC +クエン酸 +ソルビン酸	+VC +クエン酸 +ソルビン酸 +プロピオン酸	有機酸添加 なし	+VC +クエン酸	+VC +クエン酸 +ソルビン酸	+VC +クエン酸 +ソルビン酸 +プロピオン酸
0h	2.9×10^3	7.3×10^2	7.0×10^2	2.0×10^2	7.3×10^2	6.7×10^2	4.7×10^2	5.7×10^2
48h後	1.0×10^8 以上	6.0×10^2	8.7×10^2	8.7×10^2	1.6×10^7	5.0×10^2	7.7×10^2	4.7×10^2

次に、*Enterococcus munditii* は 60°C で 30 分の加熱で死滅すること、粉体飼料に添加した *E. munditii* は熱湯による湯練り調製によって死滅することが確認された。さらに、*E. munditii* を湯練り調製後の飼料（抗菌剤無添加）に接種したところ、少なくともクエン酸が添加してあれば増殖が抑制されることが明らかになった（表2）。また、同様にカイコから分離された *Enterobacter cloacae* を湯練り調製後の飼料（抗菌剤無添加）に接種した場合は、クエン酸とアスコルビン酸 (VC) の添加によりほぼ完全に増殖が抑制されることが明らかになった。また、*E. cloacae* に対しては、添加する有機酸類の種類が多くなるほど殺菌的に作用することが判明した。

表2. 有機酸類の添加量の異なる湯練り飼料（抗菌剤無添加）における *E. munditii* の増殖（接種量 cfu 4.4×10^2 /飼料片）

細菌数 (cfu/飼料片)	有機酸添加 なし	+VC	+クエン酸	+VC +クエン酸	+VC +クエン酸 +ソルビン酸	+VC +クエン酸 +プロピオン酸	+VC +クエン酸 +ソルビン酸 +プロピオン酸
	24h後	2.9×10^7	3.4×10^7	5.0×10^2	6.7×10^2	4.7×10^2	3.7×10^2
48h後	1.6×10^8	1.1×10^8	3.0×10^2	7.3×10^2	4.3×10^2	4.7×10^2	6.3×10^2

表3. 有機酸類の添加量の異なる湯練り飼料（抗菌剤無添加）における *E. cloacae* の増殖（接種量 cfu 1.3×10^3 /飼料片）

	有機酸添加	+VC	+クエン酸	+VC	+VC	+VC	+VC
細菌数 (cfu/飼料片)	なし			+クエン酸	+クエン酸 +ソルビン酸	+クエン酸 +プロピオン酸	+クエン酸 +ソルビン酸 +プロピオン酸
24h後	9.8×10^8	3.9×10^8	1.7×10^5	7.3×10^2	3.3×10	0	0
48h後	1.4×10^9	1.4×10^9	1.0×10^8	3.3×10	0	0	0

飼料の pH が酸性であれば、飼料自体に細菌増殖の危険性はないと考えられるので、カイコ飼育中で懸念される細菌増殖の「場所」は、カイコの消化管内や糞ではないかと推測された。そこで、まずカイコの糞の pH の測定を行なった。飼料自体の pH が 4.6 の場合、4 齢中の糞の pH は 4.6 から 5.5 へ上昇し、5 齢になると一時的に 4.6 に戻った。5 齢中の糞の pH は日を追うごとに上昇し、吐糸直前ではほぼ中性であった(図 1)。また、5 令 5 日目のカイコを凍結し、体節ごとに輪切りにして消化管内容物を取り出し、その pH を測定した。最前部の pH は 8.5 付近であったが、消化管の奥に行くほど pH は高くなり最高値は 10 を超えたが、消化管の後部では 9 以下に低下した (図 2)。

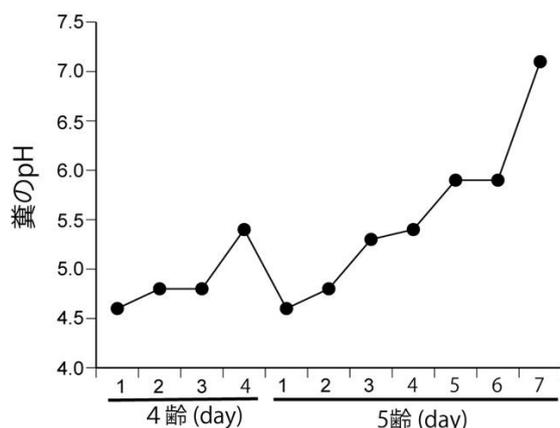


図 1. カイコの発育時期による糞の pH の変化

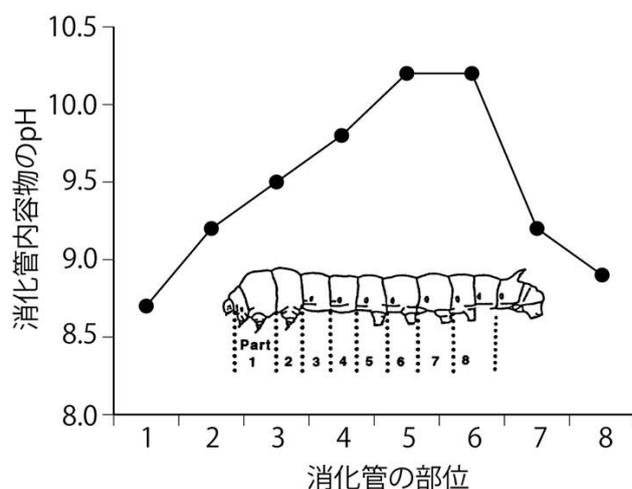


図 2. カイコの消化管内容物の pH

これらの結果から、カイコの糞や消化管内においては、元の飼料が有していた有機酸類による抗菌性が消失している可能性が予測されたので、元の飼料(pH4.6)に水酸化カリウムを添加して pH を 6, 8, 10 と変化させた飼料を作成し、*E. munditii* の増殖を調べた。その結果、クロラムフェニコールの添加が無い場合、飼料の pH が高くなると *E. munditii* の増殖が起きることが判明した (表 4)。また、クロラムフェニコール無添加飼料で飼育した場合には、5 令 6 日目のカイコの糞に *E. munditii* を接種したところ、*E. munditii* の増殖が見られた。一方、クロラムフェニコール添加飼料で飼育した場合には、*E. munditii* の増殖は見られず、クロラムフェニコールは糞中においても *E. munditii* に対する抗菌活性を保持したままであることがわかった (表 5)。

表4. pHの異なる湯練り飼料における*E. munditii*の増殖 (接種量 cfu 2.0×10^2 /飼料片)

細菌数 (cfu/g)	抗菌剤 (クロラムフェニコール) 添加なし				抗菌剤 (クロラムフェニコール) 添加あり			
	pH4.6	pH6	pH8	pH10	pH4.6	pH6	pH8	pH10
24h後	5.7×10	1.7×10^3	1.3×10^7	1.8×10^7	0	1.7×10	1.2×10^2	1.7×10
48h後	6.7×10	1.6×10^5	4.6×10^7	3.4×10^7	3×10	4.1×10^2	1.7×10^2	1.5×10^2

表5. 湯練り飼料で飼育したカイコ(5齢6日)の糞における*E. munditii*の増殖 (接種量 cfu 3.6×10^2 /糞)

細菌数 (cfu/糞)	クロラムフェニコール添加なし	クロラムフェニコール添加あり
24h後	3.4×10^7	3.4×10^2
48h後	1.8×10^8	5.1×10^2

以上の結果から、飼料自体の防腐性を保つためには飼料に有機酸類を添加して酸性にするだけで十分ではあるが、カイコ消化管内や糞のように pH が中性～アルカリ性になってしまうとその抗菌性が失われてしまうので、軟化病の発生予防の観点から中性～アルカリ性において *E. munditii* に対する抗菌活性を保持するクロラムフェニコールの添加は必要であることが示唆された。次に、クロラムフェニコールに代わる安全な抗菌活性物質を飼料に導入するため、有機酸類無添加の試験飼料に様々な化合物を添加し、臭覚と視覚により細菌増殖の有無を判断する簡易的なスクリーニングを行なった。その結果、p-ヒドロキシ安息香酸やナイシンに細菌増殖抑制効果が見られた (表 6)。なお、ナイシンは多環式抗菌ペプチドで、食品への添加が認められている。

表6. 湯練り飼料に各種化合物を添加した場合の細菌の増殖

	p-ヒドロキシ安息香酸 (1%)	ナイシン (0.025%)	グリシン (5%)	ポリリジン (0.25%)	添加なし
細菌の増殖	—	—	++	++++	++++

++++ : 2日目から; +++ : 3日目から; ++ : 4日目から; + : 5日目から; — : 増殖なし

【今後の課題】

p-ヒドロキシ安息香酸やナイシンが、中性～アルカリ性において *E. munditii* に対して抗菌活性を発揮するか、確認を行う。また、実用的な飼料の開発を進めるためには、より安心で安価な化合物を引き続きスクリーニングする必要がある。特にアルカリ性でタンパク質に対する凝集活性を有するとされるタンニン酸等の天然のポリフェノール化合物について、検討する予定である。また、有力な候補物質が見出された場合、それらを添加した飼料による飼育試験を行って、実用性を評価することにする。

【発表論文等】

現在、投稿論文として取りまとめ中である。