

# メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対する ヤスダヨーグルト®の抗菌活性の検討

田島 陽介<sup>1</sup>・立石 善隆<sup>2</sup>・亀山 仁史<sup>1</sup>

松本 壮吉<sup>2</sup>・若井 俊文<sup>1</sup>

新潟大学大学院医歯学総合研究科

<sup>1</sup> 消化器・一般外科学分野（第一外科）

<sup>2</sup> 細菌学分野

## Antibacterial Activity of Yasuda Yogurt® Against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Yosuke TAJIMA<sup>1</sup>, Yoshitaka TATEISHI<sup>2</sup>, Hitoshi KAMEYAMA<sup>1</sup>  
Sohkichi MATSUMOTO<sup>2</sup> and Toshifumi WAKAI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Division of Digestive and General Surgery

<sup>2</sup> Division of Bacteriology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

### 要 旨

【目的】新潟県で開発・市販されているヤスダヨーグルト®（以下YYG）は、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*；以下MRSA）に対して抗菌活性を示す。本研究の目的は、YYGのMRSAに対する抗菌活性成分を同定することである。

### 【方法】

- 1) 抗菌活性の評価：ディスク拡散法により抗菌活性を検討した。
- 2) YYGの遠心分離成分の抗菌活性の評価：YYGを4000 rpm, 15分の条件で遠心分離し、得られた上清および沈澱物成分について抗菌活性を評価した。
- 3) 抗菌活性を示す乳酸菌のYYGからの単離・同定：MRSA菌液を添加したMRS寒天培地にYYGを塗布し、37℃, 24時間の好気培養を行った。阻止円を形成したコロニーを採取し、MRS液体培地を用いて24時間静置培養（37℃, 好気条件）した。16S rRNA遺伝子解析を行い、抗菌活性を示す乳酸菌種を同定した。
- 4) 乳酸菌が産生する抗菌活性成分の同定：抗菌活性を示す乳酸菌培養液上清に対して加熱・限外濾過・アルカリ処理・消化酵素処理の各処理を行い、抗菌活性の変化を評価した。その結果から、抗菌活性成分の同定を試みた。
- 5) 培養条件が乳酸菌増殖に与える影響の検討：好気培養と嫌気培養、および静置培養と振盪培養による乳酸菌培養を行い、各培養条件と乳酸菌増殖、培養液上清pHおよび抗菌活性との関連をMann-WhitneyのU検定で解析した。また、培養液上清pHと抗菌活性の強さを検討した。

Reprint requests to: Yosuke TAJIMA  
Division of Digestive and General Surgery,  
Niigata University Graduate School of  
Medical and Dental Sciences,  
1-757 Asahimachi-dori, Chuo-ku,  
Niigata 951-8510, Japan.

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通1-757  
新潟大学大学院医歯学総合研究科  
消化器・一般外科学分野（第一外科） 田島 陽介

**【結果】**

- 1) 抗菌活性の評価：ディスク拡散法により適切に抗菌活性を半定量的に評価することが可能であった。
- 2) YYGの遠心分離成分の抗菌活性の評価：YYGの遠心分離成分のうち、沈澱物に強い抗菌活性を認めた。また、YYGをビーズ破砕した後に遠心分離すると、沈澱物の抗菌活性は消失した。よって、抗菌活性成分はYYGに含まれる乳酸菌が産生していると推測した。
- 3) 抗菌活性を示す乳酸菌のYYGからの分離・同定：16S rRNA遺伝子解析の結果、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (以下LDB)がMRSAに対する抗菌活性を示すことが判明した。
- 4) 乳酸菌が産生する抗菌活性成分の同定：LDB上清はアルカリ処理により抗菌活性が減弱または消失した。さらに、過酸化水素を分解するカタラーゼをLDB培養液に添加すると、抗菌活性が著明に減弱した。
- 5) 各培養条件における乳酸菌培養液の比較：静置培養は振盪培養に比べて菌の増殖がよく ( $P = 0.002$ )、また上清のpHが有意に低下し ( $P = 0.002$ )、抗菌活性は強かった ( $P = 0.002$ )。一方、好気培養と嫌気培養の間では、菌の増殖、上清pH、抗菌活性のいずれも有意な差を認めなかった ( $P = 0.310$ ,  $P = 0.589$ ,  $P = 1.000$ )。また、LDB培養液上清pHと阻止円径との間に強い負の相関関係を認めた (相関係数  $= -0.875$ ,  $P < 0.001$ )。

**【結論】** YYGのMRSAに対する抗菌活性は、YYGに含まれる乳酸菌LDBが産生する乳酸および過酸化水素によるものであることが示唆された。

**キーワード：** ヨーグルト, MRSA, 乳酸, 過酸化水素, プロバイオティクス, 抗菌性機能食品

**緒 言**

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) はヒトの体表面の代表的な常在菌であり、ヒトの約27%に黄色ブドウ球菌が検出される<sup>1)</sup>。黄色ブドウ球菌は、皮膚軟部組織感染症やカテーテル関連血流感染症から肺炎・腸炎に至るまで多彩な感染症を引き起こす。黄色ブドウ球菌による菌血症全体の死亡率は20から40%であり、合併疾患を有する患者や高齢者ではとくに高率である<sup>2)</sup>。

現在の感染症治療の中心は抗菌薬である。しかし、抗菌薬使用に伴う耐性菌の出現は大きな問題である。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA)は、系統の異なる多数の抗菌薬に耐性を示すため、しばしば治療に難渋する。バンコマイシンはMRSA感染症治療の第一選択薬であるが、すでにバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌(vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*)の存在が確認されており<sup>3)</sup>、さらに他の抗MRSA薬に対する

耐性黄色ブドウ球菌の出現も危惧されている。多剤耐性菌に対する新規抗菌薬の創薬が強く求められている一方、その開発は停滞している。その理由として、開発に莫大な費用を要するにもかかわらず投与期間が短いため、製薬企業の利益が少ないことが挙げられる<sup>4)</sup>。

そのような状況の中、プロバイオティクスによる感染制御効果が注目されている。プロバイオティクス(probiotics)は、抗生物質(antibiotics)と対比される言葉として1965年に提唱され<sup>5)</sup>、近年は「宿主に適量を摂取したときに健康効果を発揮する生きた微生物」と定義されている<sup>6)</sup>。たとえば肝移植・胆道癌・肝癌などの高度侵襲外科手術において、プロバイオティクス投与により術後の感染合併症が減少することが報告されている<sup>7)-9)</sup>。プロバイオティクスは抗菌薬とは異なり耐性菌出現を惹起しないとされるが、その作用機序には未だ不明な点が多い。

ヨーグルトは大量の乳酸菌を含んでおり、代表的なプロバイオティクス食品とされる。我々は以

前に、新潟県で開発され市販されているヤスタヨーグルト®（以下 YYG）が MRSA に対して抗菌活性を示すことを報告した<sup>10)</sup>。そこで今回、YYG の MRSA に対する抗菌活性成分の同定を目的とした基礎的研究を行ったので報告する。

## 材料と方法

### 1. 菌 株

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）は、新潟大学医歯学総合病院臨床検査室から提供された臨床分離株 4434 を被検株として用いた。

### 2. ヨーグルト

抗菌活性測定の対象として、YYG（ドリンクタイプ）を使用した。

### 3. MRSA に対する抗菌活性の測定方法

MRSA 菌株を Brain-heart infusion（以下 BHI）液体培地で増殖させ、OD<sub>600</sub> 0.1 の MRSA 菌液を調製した。次に、その MRSA 菌液を BHI 寒天培地上に滅菌綿棒で一様に塗布した。BHI 寒天培地上に直径 7 mm の円筒状の小孔を作成した。抗菌活性を評価したい検体を小孔内に 200  $\mu$ l 滴下して 24 時間静置培養（37℃，好気条件）を行い、阻止円形成により抗菌活性を評価した。

### 4. YYG の遠心画分の抗菌活性評価

YYG を遠心分離（4000 rpm，15 分）して上清と沈澱画分に分離した。また、ビーズ破碎処理（5000 rpm，15 秒×3 回，4℃；Bead Smash 12，和研薬）を行った YYG を遠心分離（4000 rpm，15 分）して上清と沈澱画分に分離した。それらの上清および沈澱画分について、阻止円形成の有無により MRSA に対する抗菌活性を評価した。

### 5. 抗菌活性を示す乳酸菌の YYG からの単離

生理食塩水で希釈した YYG を De Man-Rogusa-Sharpe（以下 MRS）寒天培地上に塗布し、好気および嫌気条件下で 37℃・24 時間静置培養を行った。コロニー形成を認めた培地上に、10<sup>6</sup>

CFU/ml となるように MRSA 菌液を添加した 0.75%BHI 軟寒天培地を重層した。24 時間静置培養（37℃，好気条件）した後に阻止円を形成したコロニーを採取し、MRS 液体培地を用いて 24 時間静置培養（37℃，好気条件）した。各培養液中の細菌を同定するため 16S rRNA 遺伝子解析を行い、抗菌活性を示す乳酸菌を同定した。

### 6. 乳酸菌が産生する抗菌活性成分の抽出

単離・同定した乳酸菌を MRS 液体培地下で 48 時間静置培養（37℃，好気条件）し、得られた培養液を遠心分離（4000 rpm，15 分）した。得られた上清について、阻止円形成の有無により MRSA に対する抗菌活性を評価した。

### 7. 乳酸菌が産生する抗菌活性成分の同定

上記で得られた乳酸菌培養液の上清に対して加熱、限外濾過、酸／アルカリ処理、消化酵素処理の各処理を行った。処理後の上清について MRSA に対する抗菌活性を評価し、その結果から抗菌活性成分の同定を試みた。

- 1) 加熱負荷：乳酸菌培養液の上清をヒートブロックにより 65℃・80℃・95℃（Ultimate Dry Bath Incubator, Major Science），またはオートクレーブにより 121℃（LSX-500, トミー精工）の各温度条件下で 10 分間加熱処理した。処理後の上清について、阻止円形成の有無により MRSA に対する抗菌活性を評価した。
- 2) 限外濾過：乳酸菌培養液上清に対して、10 kDa または 3 kDa の限外濾過膜（アミコンウルトラ UFC901008 / UFC903008，メルクミリポア）で濾過処理した。処理後の上清について、阻止円形成の有無により MRSA に対する抗菌活性を評価した。
- 3) 酸／アルカリ処理：2.5 M 水酸化ナトリウム溶液あるいは 1.0 M 塩酸を乳酸菌培養液上清に添加し、pH 3, pH 8, pH 11 に調整した。調整後の上清について、阻止円形成の有無により MRSA に対する抗菌活性を評価した。
- 4) 酵素処理：ペプシン（1：100，和光純薬）を 0.2% 塩化ナトリウム水溶液に混和して 4% (w/

v) 溶液を作成し、1.0 M 塩酸を添加して pH 3 に調整した。トリプシン (1:250, 和光純薬)、パンクレアチン (和光純薬)、胆汁末 (和光純薬) をそれぞれ 1% リン酸緩衝液 (pH 7.4, Thermo Fisher Scientific) に添加して 1% (w/v) 溶液を作成した。各酵素の最終濃度が 0.1 mg/ml となるように調整液を乳酸菌培養液上清に添加し、37℃、2 時間静置した。処理後の上清について、阻止円形成の有無により MRSA に対する抗菌活性を評価した。

## 8. 培養条件が乳酸菌増殖に与える影響の検討

- 1) 通気条件：振盪培養における振盪回数は 120 回/分とし、水平往復振盪とした。単離・同定した乳酸菌を 48 時間静置または振盪培養 (37℃、好気条件) した。得られた培養液の OD<sub>600</sub> を測定した後に遠心分離 (4000 rpm, 15 分) して上清を得た。上清の pH を測定し、さらに MRSA に対する抗菌活性を阻止円径により評価した。
- 2) 酸素濃度：好気培養は室内気における培養とした。嫌気培養はアネロパック・ケンキ (三菱ガス化学) を用いた。単離・同定した乳酸菌を 37℃、静置条件下で 48 時間好気または嫌気培養した。得られた培養液の OD<sub>600</sub> を測定した後に遠心分離 (4000 rpm, 15 分) して上清を得た。上清の pH を測定し、さらに MRSA に対する抗菌活性を阻止円径により評価した。

- 3)  $P < 0.05$  を有意差ありとして Mann-Whitney の U 検定を行い、培養条件による培養液 OD<sub>600</sub> および培養液上清 pH の差を統計解析した。また、培養液上清 pH と阻止円径との相関を Pearson の相関係数により解析した。

## 結 果

### 1. YYG の遠心画分の抗菌活性

YYG の遠心画分のうち、沈殿画分に強い抗菌活性を認めた。一方、上清にもわずかながら抗菌活性を認めた。ビーズ破碎処理を行った YYG の遠心画分では、沈殿画分・上清ともに抗菌活性が消失した。このことから、抗菌活性成分は YYG に含まれる乳酸菌が産生していることが推測された。

### 2. 抗菌活性を示す乳酸菌の YYG からの分離

MRSA に対する阻止円を形成した複数のコロニーから釣菌を行った。得られた細菌を MRS 液体培地で増殖させた後に 16S rRNA 遺伝子解析を行った結果、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (以下 LDB) (図 1) を同定した。なお、抗菌活性を示さなかったコロニーからも釣菌を行って同様に 16S rRNA 遺伝子解析を行い、*Streptococcus thermophilus* を同定した。

### 3. LDB が産生する抗菌活性成分の上清中への抽出

LDB 培養液を 37℃、好気条件下で静置培養し

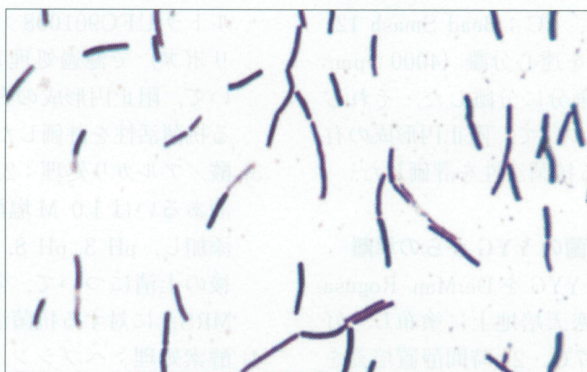


図 1 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* の鏡検像グラム染色, ×1000 倍。

た結果、18 から 24 時間経過時より培養液 OD<sub>600</sub> および上清 pH がプラトーに達することが判明した (図 2)。24 時間静置培養 (37℃, 好気条件) した LDB 培養液上清を遠心分離 (4000 rpm, 15 分) した結果、抗菌活性を示す上清を得ることができた。

#### 4. LDB が産生する抗菌活性成分の同定

- 1) 抗菌活性を示す LDB 培養液上清を 4 種の温度条件 (65℃, 80℃, 95℃, 121℃) で 10 分間加熱した結果、121℃・10 分の加熱処理でのみ抗菌活性が消失した。
- 2) LDB 培養液上清に対して分画分子量 10 kDa および 3 kDa の透析膜で限外濾過を行ったが、

いずれも抗菌活性は減弱せず、抗菌活性成分は 3 kDa 以下の小分子物質であることが示唆された。

- 3) 酸/アルカリ処理を行った結果、LDB 培養液上清の pH が高くなるほど抗菌活性は減弱し、pH 8 以上では抗菌活性が消失した。この結果より、LDB が産生する乳酸をはじめとした有機酸が MRSA に対して抗菌活性を示すことが示唆された。
- 4) ペプシン・トリプシン・キモトリプシン・胆汁末の各酵素で処理した LDB 培養液上清は、MRSA に対する抗菌活性が保たれていた。一方、カタラーゼで処理した LDB 培養液上清の抗菌活性は減弱した。この結果より、LDB が

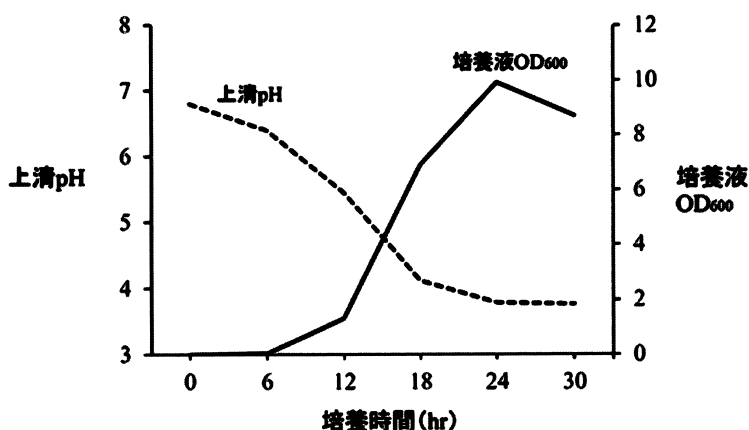


図 2 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* の培養時間と上清 pH および培養液 OD<sub>600</sub>

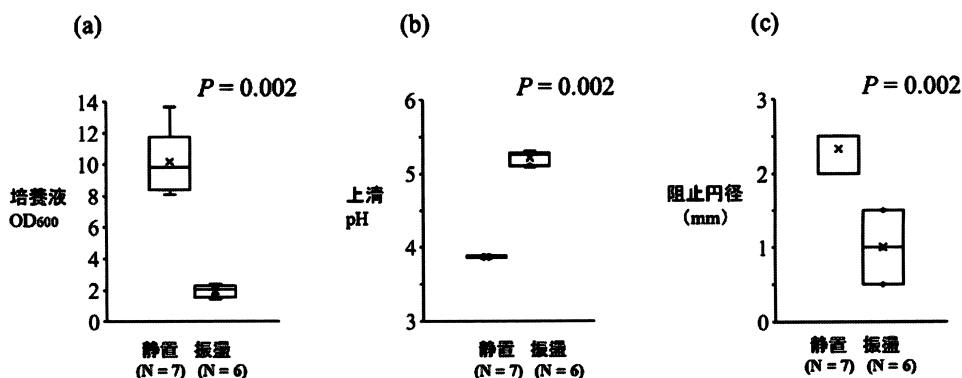


図 3 通気条件による *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* の増殖、培養液上清の pH、および抗菌活性の比較 (48 時間好気培養)。(a) 培養液 OD<sub>600</sub>。(b) 培養液上清 pH。(c) 阻止円径。

産生する過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) も MRSA に対して抗菌活性を示すことが示唆された。

## 5. 各種培養条件下における LDB 培養液の変化

- 1) 通気条件：静置培養は振盪培養と比べて LDB 培養液  $\text{OD}_{600}$  が有意に高値であり ( $P = 0.002$ )、LDB 培養液上清 pH が有意に低値であり ( $P = 0.002$ )、LDB 培養液上清の MRSA に対する抗菌活性が大きかった ( $P = 0.002$ ) (図3)。
- 2) 酸素濃度：嫌気培養と好気培養では LDB 培養液  $\text{OD}_{600}$ 、LDB 培養液上清 pH、および LDB 培養液上清の MRSA に対する抗菌活性に有意差を認めなかった ( $P = 0.310$ ,  $P = 0.589$ ,  $P = 1.000$ ) (図4)。

- 3) LDB 培養液の上清 pH と阻止円径との間に強い負の相関関係を認めた (相関係数 =  $-0.875$ ,  $P < 0.001$ ) (図5)。

## 考 察

本研究より、ヤスダヨーグルト® (YYG) の MRSA に対する抗菌活性成分は、YYG に含まれる乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LDB) が産生する ①乳酸をはじめとした有機酸、②過酸化水素、であることが示唆された。

LDB を含む乳酸菌は糖を発酵代謝し、主な最終産物として乳酸を生成することでエネルギーを獲得する<sup>11)</sup>。乳酸は非解離型で他の細菌の細

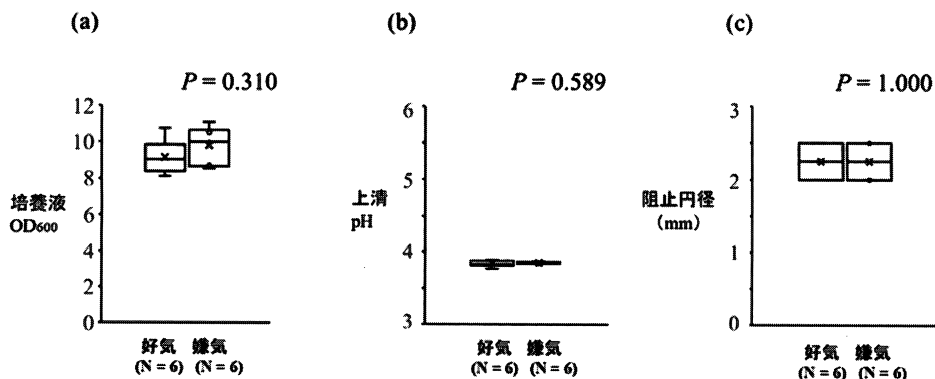


図4 酸素濃度による *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* の増殖、培養液上清の pH、および抗菌活性の比較 (48 時間静置培養)。(a) 培養液  $\text{OD}_{600}$ 。(b) 培養液上清 pH。(c) 阻止円径。

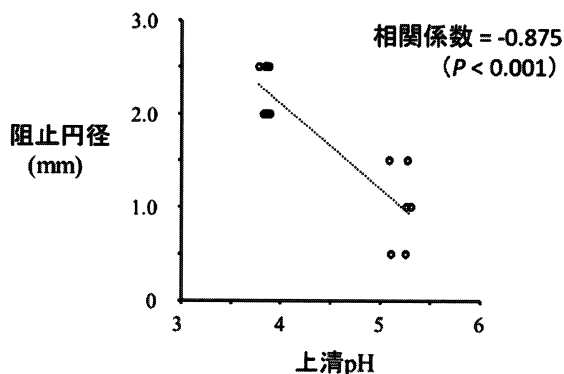


図5 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* の培養液上清 pH と阻止円径の相関



胞内に移行し、解離型となってプロトンを放出することで細胞内 pH の低下を惹起する。細胞内 pH の低下は、解糖系酵群の失活<sup>12)</sup>、DNA の損傷<sup>12)</sup>、プロトン駆動力減少による輸送系障害<sup>13)</sup>により標的細菌を死滅させる。一方、黄色ブドウ球菌は一般に pH 4.6 から 10 の範囲で発育可能とされ、7 前後が至適発育 pH とされる<sup>14)</sup>。乳酸を添加した酸性化乳においては、pH 4.5 から 4.4 でブドウ球菌の発育が完全に抑制されたと報告されている<sup>15) 16)</sup>。本研究では、LDB 培養上清の pH と MRSA の阻止円径との間に相関関係を認めた。すなわち、LDB の MRSA に対する抗菌活性は pH 依存적であることから、LDB が産生した乳酸により MRSA の発育が抑制されることが示唆された。しかし、一般に LDB はホモ乳酸発酵菌のため通常乳酸以外の有機酸を産生しないが、ある一定の条件下ではヘテロ乳酸発酵を行うことにより酢酸も同時に生成することが知られている<sup>17)</sup>。酢酸は乳酸に比べてより高い pH でブドウ球菌発育を抑制することが報告されており<sup>18)</sup>、本研究における LDB の MRSA に対する抗菌効果の成分として酢酸が寄与している可能性もある。今後 LDB 上清の有機酸分析を行って検証する予定である。

乳酸菌のうちとくに *Lactobacillus* 属により産生された過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) がブドウ球菌に対して抗菌効果を示すことは、in vitro でよく研究されている<sup>19) - 22)</sup>。乳酸菌の菌体内で産生された  $H_2O_2$  は拡散により標的細菌内に移行し、Fenton 反応によりヒドロキシラジカル ( $\cdot OH$ ) に還元される。 $\cdot OH$  は核内に移行し、DNA 鎖を切断することにより細胞毒性を示すと考えられている<sup>23)</sup>。本研究においても、LDB 培養液上清にカタラーゼ処理を行ったところ抗菌活性が著明に減弱したことから、 $H_2O_2$  が MRSA に対して抗菌活性を示すことが示唆された。LDB は溶存酸素を消費して  $H_2O_2$  を産生する一方<sup>24)</sup>、溶存酸素が 0 ppm に近づいて初めて発酵を開始すること<sup>25)</sup>が報告されている。本研究では、振盪培養は静置培養に比べて培養液上清の pH が有意に高かった。その理由として、振盪による培地内への酸素供給により

溶存酸素が保たれ、乳酸発酵が開始されなかったことが示唆された。一方で、静置条件下では好気培養と嫌気培養で培養液上清 pH がともに低下し、有意差を認めなかった。LDB の培養時間が 48 時間と長かったため、好気培養下でも培養液内の溶存酸素が十分消費され、乳酸発酵を行うことができたと考えられた。よって、今回得られた LDB 上清における  $H_2O_2$  および乳酸の抗菌活性への寄与の割合は、静置／振盪培養、好気／嫌気培養、培養時間などの諸条件によって大きく左右されていると考えられる。今後  $H_2O_2$  および乳酸産生と培養条件との関連についてより詳細に検討する予定である。

われわれは、YYG の MRSA に対する抗菌活性を示した前回の報告において、YYG に含まれる乳酸菌が抗菌ペプチドであるバクテリオシンを産生する機序を想定していた<sup>10)</sup>。実際に、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* BB18 が産生する分子量 4.2 kDa のバクテリオシン bulgaricin BB18 がブドウ球菌に抗菌効果を示したとする報告もある。一方、今回の研究では、分画分子量 3 kDa および 10 kDa の透析膜で限外濾過を行った LDB 培養液上清においても抗菌活性が減弱しなかった。そのため、3 kDa 以下の小分子のバクテリオシンが本研究における LDB の抗菌効果に寄与している可能性があり、今後さらなる分析が必要である。

## 結 論

本研究より、ヤスダヨーグルト®の MRSA に対する抗菌活性成分は、ヤスダヨーグルト®に含まれる乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* が産生する ①乳酸をはじめとした有機酸、②過酸化水素、であることが示唆された。今後はヤスダヨーグルト®の抗菌活性機序についてさらに詳細な分析を行うとともに、食品でありながら特異な抗菌効果を示すヤスダヨーグルト®の消化器外科領域への導入を模索し、耐性菌の出現しない周術期感染制御を目指していく。

## 謝 辞

本研究にご協力いただいた有限会社ヤスダヨーグルトに感謝の意を表する。

本研究はJSPS 科研費 JP16K21041 の助成を受けたものである。

## 文 献

- 1) Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA and Nouwen JL: The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 5: 751-762, 2005.
- 2) Lesens O, Methlin C, Hansmann Y, Remy V, Martinot M, Bergin C, Meyer P and Christmann D: Role of comorbidity in mortality related to *Staphylococcus aureus* bacteremia: a prospective study using the Charlson weighted index of comorbidity. *Infect Control Hosp Epidemiol* 24: 890-896, 2003.
- 3) Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T and Tenover FC: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility *J Antimicrob Chemother*. 40: 135-136, 1997.
- 4) 渡辺 彰, 館田一博, 岩田 敏: 新規抗菌薬の開発に向けた6学会提言「耐性菌の現状と抗菌薬開発の必要性を知っていただくために」: 提言発表の背景と目的. *感染症学雑誌* 88: 409-416, 2014.
- 5) Lilly DM and Stillwell RH: Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147: 747-748.
- 6) Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, October 2001.
- 7) Rayes N, Seehofer D, Hansen S, Boucsein K, Müller AR, Serke S, Bengmark S and Neuhaus P: Early enteral supply of *Lactobacillus* and fiber versus selective bowel decontamination: a controlled trial in liver transplant recipients. *Transplantation* 74: 123-127, 2002.
- 8) Kanazawa H, Nagino M, Kamiya S, Komatsu S, Mayumi T, Takagi K, Asahara T, Nomoto K, Tanaka R and Nimura Y: Synbiotics reduce postoperative infectious complications: a randomized controlled trial in biliary cancer patients undergoing hepatectomy. *Langenbecks Arch Surg* 390: 104-113, 2005.
- 9) Usami M, Miyoshi M, Kanbara Y, Aoyama M, Sakaki H, Shuno K, Hirata K, Takahashi M, Ueno K, Tabata S, Asahara T and Nomoto K: Effects of perioperative synbiotic treatment on infectious complications, intestinal integrity, and fecal flora and organic acids in hepatic surgery with or without cirrhosis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 35: 317-328, 2011.
- 10) 田島陽介, 岡部康之, 立石善隆, 西山晃史, 尾関百合子, 亀山仁史, 松本壮吉, 若井俊文: プロバイオティクス医療を視野に入れたヨーグルトの抗菌効果の検討. *新潟医学会雑誌* 129: 593-600, 2015.
- 11) 日本乳酸菌学会編: 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, 京都, p129, 2010.
- 12) Cotter PD and Hill C: Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 429-453, 2003.
- 13) van de Guchte M, Serrero P, Chervaux C, Smokvina T, Ehrlich SD and Maguin E: Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82: 187-216, 2002.
- 14) Nouaille S, Even S, Charlier C, Le Loir Y, Coccagn-Bousquet M and Loubière P: Transcriptomic response of *Lactococcus lactis* in mixed culture with *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* 75: 4473-4482, 2009.
- 15) Tatini SR, Jezeski JJ, Olson JC Jr and Casman EP: Factors influencing the production of staphylococcal enterotoxin A in milk. *J Dairy Sci* 54: 312-320, 1971.
- 16) Haines WC and Harmon LG: Effect of selected lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin. *Appl*



- Microbiol 25: 436-441, 1973.
- 17) Ingram M: "Lactic Acid Bacteria in Beverages and Foods", Carr JG, New York, p9, 1975.
  - 18) Minor TE and Marth EH: Growth of *Staphylococcus aureus* in acidified pasteurized milk. J. Milk Food Technol 33: 516-520, 1970.
  - 19) Klebanoff SJ, Hillier SL, Eschenbach DA and Waltersdorff AM: Control of the microbial flora of the vagina by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating *Lactobacilli*. J Infect Dis 164: 94-100, 1991.
  - 20) Ocaña VS, de Ruiz Holgado AA and Nader-Macías ME: Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* isolated from the human vagina. FEMS Immunol Med Microbiol 23: 87-92, 1999.
  - 21) Ocaña VS, Pesce de Ruiz Holgado AA and Nader-Macías ME: Selection of vaginal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating *Lactobacillus* species for probiotic use. Curr Microbiol 38: 279-284, 1999.
  - 22) Otero MC, Morelli L and Nader-Macías ME: Probiotic properties of vaginal lactic acid bacteria to prevent metritis in cattle. Lett Appl Microbiol 43: 91-97, 2006.
  - 23) Luo Y, Henle ES and Linn S: Oxidative damage to DNA constituents by iron-mediated Fenton reactions. The deoxycytidine family. J Biol Chem 271: 21167-21176, 1996.
  - 24) Sasaki Y, Horiuchi H, Kawashima H, Mukai T and Yamamoto Y: NADH Oxidase of *Streptococcus thermophilus* 1131 is Required for the Effective Yogurt Fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038. Biosci Microbiota Food Health 33: 31-40, 2014.
  - 25) Horiuchi H, Inoue N, Liu E, Fukui M, Sasaki Y and Sasaki T: A method for manufacturing superior set yogurt under reduced oxygen conditions. J Dairy Sci 92: 4112-4121, 2009.

(平成 29 年 9 月 25 日受付)