

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

田島 陽介¹・岡部 康之¹・立石 善隆²・西山 晃史²
尾関百合子²・亀山 仁史¹・松本 壮吉²・若井 俊文¹

新潟大学大学院医歯学総合研究科

¹消化器・一般外科学分野（第一外科）

²細菌学分野

Antibacterial Activity of Yogurt with a View to Probiotics Medicine

Yosuke TAJIMA¹, Yasuyuki OKABE¹, Yoshitaka TATEISHI², Takeshi NISHIYAMA², Yuriko OZEKI²
Hitoshi KAMEYAMA¹, Sohkiichi MATSUMOTO² and Toshifumi WAKAI¹

¹Division of Digestive and General Surgery,

²Division of Bacteriology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

要 旨

【目的】消化管手術の周術期には、黄色ブドウ球菌などの皮膚常在菌による創部感染、絶食による腸内細菌叢の攪乱に伴う Bacterial translocation、抗菌薬使用に伴う methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) などの薬剤耐性菌の出現が起こりうる。このような状況に対して応用的プロバイオティクスによる周術期感染制御を視野に、ヨーグルト製品のもつ抗菌効果の特性を微生物学的に解析した。

【方法】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）に注目して、1) 抗菌活性スペクトル（被験株：methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) ならびに MRSA 臨床分離株、大腸菌株 DH5α）、2) 配合菌株の異なる他の 5 種の市販ヨーグルト製品との抗菌活性の相違、3) YYG 各配合菌種（Yc-x11 および Yc-180）の示す抗菌作用、および 4) 抗菌活性を示す分離画分について、ディスク法による阻止円形成により検討した。

【結果】YYG は大腸菌に比して MSSA に優位な抗菌活性を示した。また、YYG は MRSA 臨床分離株に対しても抗菌活性を示した。他製品との比較において、YYG は最も高い抗菌活性を示した。YYG 配合菌種は、通常の低塩濃度培地上では抗菌活性を示したものの高塩濃度条件下では、その効果は減弱あるいは消失した。YYG の抗菌活性は、上清ではなく沈殿画分に認めた。

【結論】YYG は MRSA を含む黄色ブドウ球菌に対する直接的な抗菌活性を示した。その抗菌効果は、特有の配合菌種に依拠する抗菌活性物質によることが示唆された。ヨーグルトの中でも YYG は極めて有望な抗菌性機能食品として、周術期感染制御に貢献できる可能性がある。

キーワード：ヨーグルト、methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*、抗菌ペプチド、プロバイオティクス、抗菌性機能食品

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

緒 言

消化管手術における周術期の感染制御は、術後の予後と機能の回復を左右する重要な要素である¹⁾。大腸内では *Bacteroidaceae*, *Eubacterium*, 嫌気性連鎖球菌などの嫌気性菌が優位であるが、手術創部は皮膚常在菌、特に黄色ブドウ球菌の侵入の門戸となる。さらに、周術期における抗菌薬投与は腸管内常在菌叢の攪乱を惹起し、methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) などの薬剤耐性菌の出現リスクが高くなる。近年、MRSA やリネゾリド耐性などの薬剤耐性黄色ブドウ球菌の出現により、従来の抗菌薬による感染制御が困難となりつつある²⁾。

以上の状況において、昨今、腸内細菌叢のバランスを整え、健康に有益な働きをする微生物やそれらの産生する増殖促進物質を利用したプロバイオティクスが注目されている。特にヨーグルトは、ブルガリア地方などで古くから親しまれた乳製品であり³⁾、国際的には *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* と *Streptococcus thermophilus* の2種の乳酸菌の共発酵により作られた食品とされる⁴⁾。日本の食品衛生法では「ヨーグルト」の

名称は使用されておらず、発酵乳の範疇に含まれ、発酵における菌種も指定されていない。乳酸菌は、発酵によって糖類から多量の乳酸を産生することでpHを下げることや、バクテリオシンなどの抗菌ペプチドを産生することで抗菌作用を発揮するとされており⁵⁾⁶⁾、ヨーグルトは「抗菌性機能食品」として非常に有望視されている。しかし、ヨーグルト製品そのものの抗菌活性を検討した報告は少ない上⁷⁾、食餌摂取による臨床応用が可能であることを示した検討もなされていない。

本研究では、外科手術における周術期感染に対する応用的プロバイオティクスを視野に、新潟県で開発され市販されているヤスダヨーグルト®の抗菌活性について、薬剤耐性菌を含めた抗菌活性スペクトルの評価、他の市販ヨーグルト製品との抗菌活性の相違、各配合菌種の示す抗菌作用、および抗菌活性を示す分離画分について検討した。

材料と方法

1. 菌 株

methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) あるいは MRSA は、いずれも新潟大学

表1 各ヨーグルトに含まれる主な配合菌種

製品	主な配合菌種
ヤスダヨーグルト	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>
ヨーグルト A	<i>Lactobacillus gasseri</i> SP
ヨーグルト B	<i>Lactobacillus debrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> OLL1073R-1
ヨーグルト C	<i>Lactobacillus gasseri</i> OLL2716
ヨーグルト D	<i>Bifidobacterium animals</i> subsp. <i>lactis</i> DN-173010
ヨーグルト E	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota

医歯学総合病院臨床検査室から提供された臨床分離株を用いた。大腸菌は実験室で汎用される K-12 株 DH5 α を用いた。

2. ヨーグルト

抗菌活性測定の対象として、ヤスダヨーグルト社製ヤスダヨーグルト®（以下 YYG），互いに異なる乳酸菌の配合菌種を有する 5 種類のヨーグルト製品 A・B・C・D・E を使用した。それぞれのヨーグルトに特有の配合菌種は表 1 のごとくであった。

3. 抗菌活性の測定

ヨーグルトの抗菌活性はディスク法で行った。まず、被験菌株をブレインハートインフュージョン（BHI）液体培地で増殖させ、OD₆₀₀ 0.2 に達したものを 1,000 倍に希釈し、BHI 平板培地に綿棒で一様に塗布した。次に、ヨーグルトを 7 mm 角のろ紙に染み込ませ、菌液を塗布した平板培地に静置し、37℃ 24 時間培養したのち、阻止円の形成を評価した。

4. 配合乳酸菌株（Yc-x11, Yc-180）ごとの抗菌活性の評価

ヤスダヨーグルトでは 2 種類の乳酸菌スターター

（クリスチャンハンセン社）Yc-180 と Yc-x11 を使用している（表 1）。まず、前記 MRSA 臨床分離株の一つである MRSA 菌株 4434 を被験株として、OD₆₀₀ 0.2 の菌液を 1,000 倍に希釈して Müller-Hinton（MH）寒天培地、およびマンニット食塩培地に菌液を塗布した。乳酸菌発育に好適な MRS 培地および M17 培地を用いて Yc-180 と Yc-x11 を 37℃ 24 時間培養し、それらの培養液を染み込ませたろ紙を平板培地に静置し、抗菌活性を評価した。

5. ヨーグルトの遠心画分の採取

ヤスダヨーグルトを遠心分離（10,000 rpm/min, 20 min）して上清と沈殿物に分離した。上清および沈殿画分について、前記と同じくディスク法を用いて抗菌活性を評価した。

結 果

1. YYG の抗菌活性

黄色ブドウ球菌臨床分離株 NI274（MSSA）と大腸菌 K12 株である DH5 α の 2 菌種に対して、YYG 原液を染み込ませたろ紙を用意し、抗菌活性をディスク法で評価した。NI274 ではろ紙の周囲に明瞭な阻止円を形成したが、DH5 α では阻止円

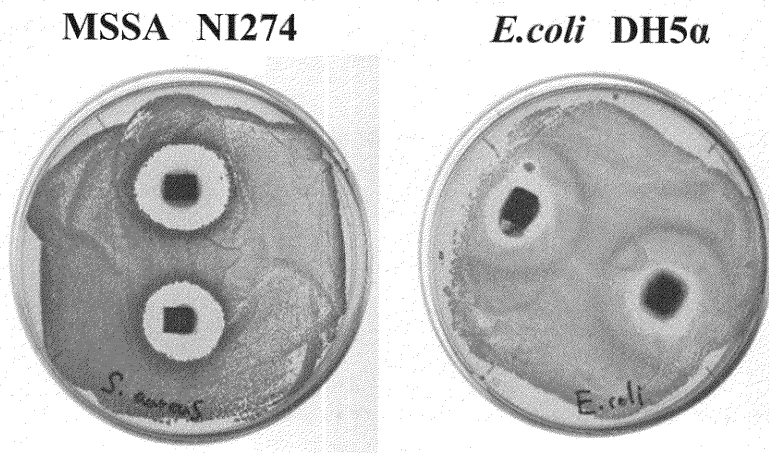


図 1 ヤスダヨーグルトの抗菌活性
MSSA および大腸菌に対する YYG の抗菌活性。
MSSA に対して優位な抗菌効果を示した。

が小規模あるいは不明瞭であったことから、YYGはNI274に対して優位な抗菌活性を示した(図1)。

2. MRSA に対するヤスダヨーグルトの抗菌活性

5株のMRSA臨床分離株に対して、YYG原液を染み込ませたろ紙を用意し、抗菌活性をディスク法で評価した。阻止円の径に多少の差はあるものの、いずれのMRSA菌株にも阻止円を形成した(図2)。すなわち、YYGはMRSAに対して抗菌活性を示した。

3. 他のヨーグルト製品との抗菌活性の比較

YYGは他の市販製品とは異なる乳酸菌の配合菌種を有しており(表1)、抗菌活性の程度に影響している可能性がある。YYGを含む6種類のヨーグルトについてMSSAに対する抗菌活性を比較

したところ、YYGのみが明瞭な阻止円を形成したことから、検討製品の中で最も抗菌活性が高いと判断した(図3)。

4. YYGの原料となる2種類の乳酸菌懸濁液製品 Yc-x11 および Yc-180 の抗菌活性の比較

YYGの原料となる乳酸菌スターターはYc-x11とYc-180の2種類である。Yc-x11には*Streptococcus thermophilus*と*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*の2種類の乳酸菌が含まれており、Yc-180はそれらに加えて*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*の3種類の乳酸菌が含まれている。これらの乳酸菌配合スターター単独でのMRSAに対する抗菌活性をディスク法で評価したところ、いずれの製品もMH寒天培地ではMRSAに対して阻止円を形成し、とくに

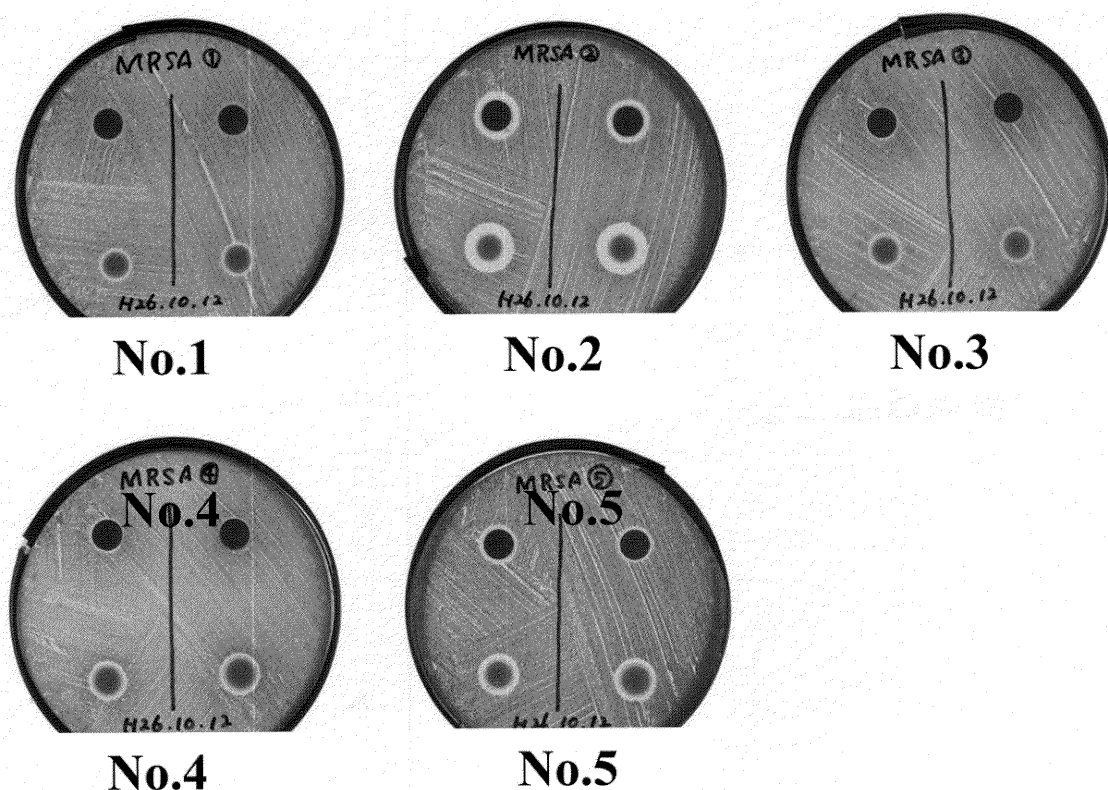


図2 MRSAに対するヤスダヨーグルトの抗菌活性
5株のMRSAのいずれにも抗菌効果を示した。

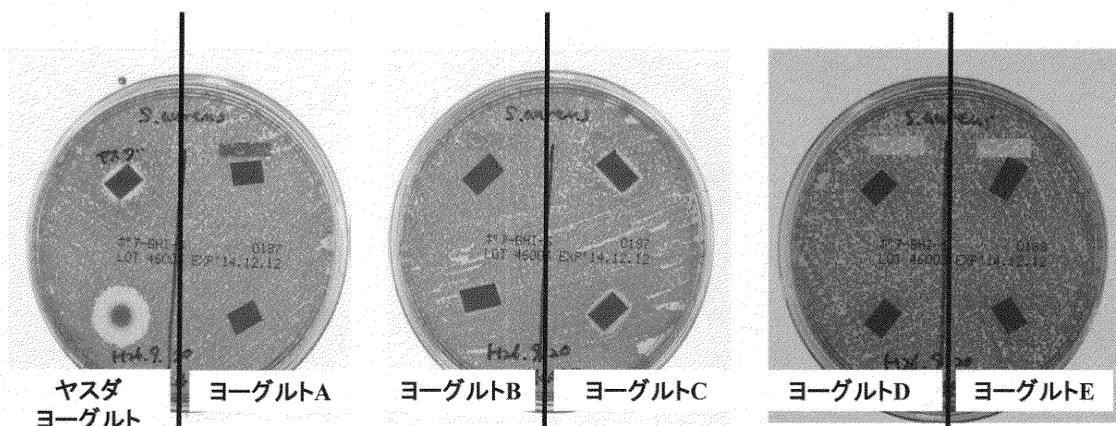


図3 ヤスダヨーグルトと他のヨーグルト製品との
MSSA に対する抗菌活性の比較
ヤスダヨーグルトが最も高い抗菌効果を示した。

a) MH培地

b) マンニット食塩培地

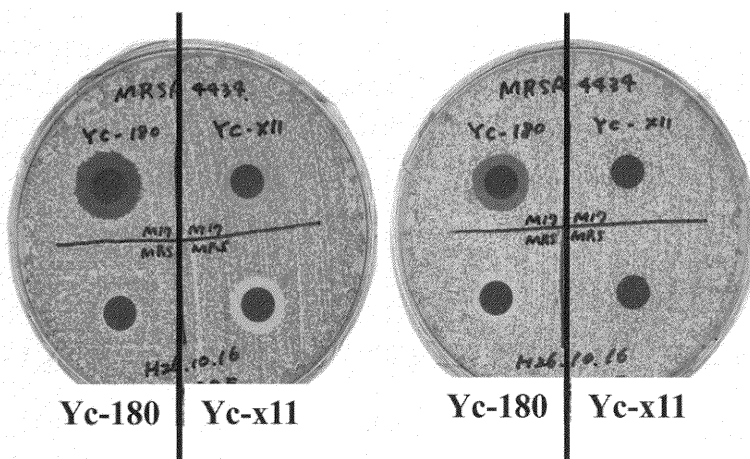


図4 ヤスダヨーグルトの配合乳酸菌株 Yc-x11 および Yc-180 の
MRSA に対する抗菌活性の評価

いずれも MH 培地で抗菌効果を示したが、マンニット食塩培地では
効果の減弱・消失を認めた。

Yc-180 において、より明瞭な阻止円を形成した
(図 4a)。一方、マンニット食塩培地の場合は、
Yc-180 において MH 培地に比べて阻止円は狭小
化し、Yc-x11 においては阻止円を形成しなかつ
た (図 4b)。この結果から、3 種類の乳酸菌の配

合比率によりヨーグルトの抗菌活性が増強するこ
と、ならびに高塩濃度下では抗菌活性が減弱ある
いは消失することが示された。

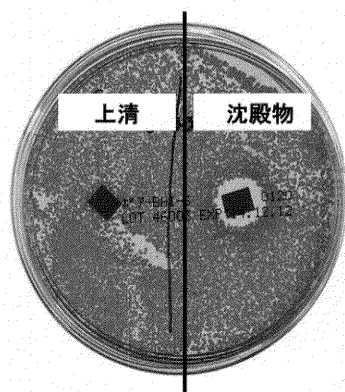


図5 YYG 遠心分離後の上清および沈殿物の抗菌活性の評価
上清ではなく沈殿画分に抗菌活性を認めた。

5. YYG の抗菌画分の決定

抗菌活性を示す画分を調べるために、YYG を遠心分離で上清と沈殿画分に分離し、それぞれ NI274 に対する抗菌活性を評価した。沈殿物を染み込ませたろ紙の周囲には阻止円を形成したが、上清では阻止円は形成されなかったことから、沈殿画分に抗菌物質が存在することが示された (図5)。

考 察

消化管手術における手術侵襲・絶食は、免疫能低下や腸内細菌叢の攪乱を介して創部細菌感染ならびに腸管内細菌感染を惹起しやすい。また、周術期の抗菌薬投与により起因菌の薬剤耐性獲得の確率が高くなる。MRSA 保菌ラットを用いた実験では、セフェム系抗菌薬により大腸菌や *Bacteroides* などの嫌気性菌を含めた腸内常在菌の増殖を抑制すると、腸管内 MRSA の菌数が増加すると報告されている⁸⁾。本研究で YYG が MRSA も含めた黄色ブドウ球菌に対して高い抗菌効果を示したことは、周術期における創部・腸管内の黄色ブドウ球菌感染のコントロールに YYG が有効である可能性を示唆している。一方、乳酸菌による腸内細菌叢の是正効果も報告されており⁹⁾¹⁰⁾、YYG 摂取による腸内細菌叢の正常化が bacterial translocation を抑制に寄与することが期待

される。

本研究において、YYG の抗菌画分が上清よりもむしろ沈渣画分に存在したのは興味深い。乳酸菌の産生する抗菌ペプチドの一種であるバクテリオシンは、産生菌に近縁なグラム陽性菌に抗菌活性を示すが、真菌類やグラム陰性菌には抗菌活性がない¹¹⁾。本研究においても、YYG の大腸菌に対する抗菌活性は不明瞭であった。また、 β デフェンシンなどの一般的な抗菌ペプチドは高塩濃度下でその抗菌活性が減弱するが¹²⁾、本研究でも高塩濃度下の YYG の乳酸菌スターターの阻止円形成が不良であった。加えて、低 pH 環境下での有害細菌の発育抑制も古くから知られているものの¹³⁾、本研究では pH 低値である上清画分には抗菌効果を認めなかった。これらの結果から、ヤスダヨーグルトの抗菌活性は、乳酸などによる pH 低値よりもむしろ乳酸菌産生性の抗菌ペプチドによるものと考えられる。YYG の原料となる2種類の乳酸菌懸濁液製品 Yc-x11 と Yc-180 のいずれもが抗菌活性を示し、かつ後者においてより強い抗菌活性を示したことから、YYG の抗菌活性には3種の配合菌株の比率が重要であることが示唆された。配合株の比率の最適化が特定の抗菌物質産生を促進するのか、あるいは複数の抗菌物質の相乗作用をもたらすのか、興味の持たれるところである。

ロシアの生物学者 Metchnikoff が、ヨーグルト消費量の多いブルガリア地方に長寿者が多いことを報告したのは 1907 年である³⁾。それ以来、乳酸菌自体を扱った実験室レベルの研究は多数報告されているものの、ヨーグルト製品自体の抗菌作用について臨床医学的にエビデンスレベルの高い研究は未だ行われていない。富岡らは、サルモネラ O4 群と黄色ブドウ球菌を下痢便より持続排菌する症例に対して、ヨーグルトを 1 か月間投与することにより除菌に成功した¹⁴⁾。また、薩田らは、ヨーグルト中では黄色ブドウ球菌の菌数が 1 日後にはおよそ 10 分の 1 にまで抑制されることを見出した⁷⁾。さらに、ヨーグルトはラットにおける胃炎・胃潰瘍の治癒作用があるとも報告されている¹⁵⁾。これらの前駆的な研究と本研究結果を併せて考えると、ヨーグルトは、抗菌効果と抗炎症効果の相乗作用により生体内での病原細菌の異常増殖阻止ならびに生体恒常性改善を促進する理想的な「抗菌性機能食品」であることが示唆される。本研究者は、消化管手術患者に対するヤスダヨーグルトの応用的プロバイオティクスを目指して、すでに Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) に基づいた液体培地によるヨーグルトの最少発育阻止濃度の評価法の確立とヤスダヨーグルトの抗菌活性物質の網羅的解析に着手している。

結 論

今回、新潟県で開発されたヤスダヨーグルトの抗菌活性の特性について、1) MRSA を含めた黄色ブドウ球菌に強い抗菌効果を示す、2) 他の市販ヨーグルト製品と比較してもその抗菌活性が明瞭、3) 分離画分、高塩濃度下の抗菌活性測定において、抗菌ペプチドがその作用の機序を担っている可能性があること、を明らかにした。

文 献

- 1) Alexander JW: The contribution of infection control to a century of surgical progress. *Ann Surg* 201: 423 - 428, 1985.
- 2) Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Wennersten C, Venkataraman L, Moelleng RC and Ferraro MJ: Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 358: 207 - 208, 2001.
- 3) Metchnikoff E: The prolongation of life. *Optimistic Studies*. William Heinemann. London, pp161 - 183, 1907.
- 4) FAO (Food and Agriculture Organization) & WHO (World Health Organization): CODEX STAN - DARD FOR FERMENTED MILK (Codex Standard 243 - 2003), http://www.codexalimentarius.net/input/download/standards/400/CXS_243e.pdf, 2013.
- 5) Abee T, Krockel L and Hill C: Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int J Food Microbiol* 28: 169 - 185, 1995.
- 6) Moll GN, Konings WN and Driessen AJ: Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76: 185 - 198, 1999.
- 7) 薩田清明, 稲葉雅子, 中村章子, 紺野ゆき江, 川嶋美千代, 中里奈津紀, 小俣文乃, 矢満田紀子, 岡田久美子, 土田枝里, 江本綾子, 斉藤絵里: 各種ヨーグルトおよびコーヒー中における食中毒細菌の変動に関する研究. *東京家政学院大紀* 45: 29 - 39, 2005.
- 8) 青柳 健: ラットを用いた大腸術後感染予防のための抗菌薬選択に関する実験的研究. *日本大腸肛門病会誌* 48: 979 - 991, 1995.
- 9) Alexander JW, Boyce ST, Babcock GF, Gianotti L, Peck MD, Dunn DL, Pyles T, Childress CP and Ash SK: The process of microbial translocation. *Ann Surg* 212: 496 - 510, 1990.
- 10) Berg RD: Promotion of the translocation of enteric bacteria from the gastrointestinal tracts of mice by oral treatment with penicillin, clindamycin, or metronidazole. *Infect Immun* 33: 854 - 861, 1981.
- 11) 石橋直樹, 善藤威史, 園元謙二: 乳酸菌バクテリオシン 戦略的な探索・発見・活用とゼロエミッション PJ まで. *日乳酸菌会誌* 22: 38 - 48, 2011.

- 12) Midorikawa K, Ouhara K, Komatsuzawa H, Yamada S, Fujiwara T, Yamazaki K, Sayama K, Taubman MA, Kurihara H, Hashimoto K and Sugai M: Staphylococcus aureus susceptibility to innate antimicrobial peptides, beta - defensins and CAP18, expressed by human keratinocytes. Infect Immun 71: 3730 - 3739, 2003.
- 13) Döderlein A: Das Scheidensekret und seine Bedeutung für Puerperalfieber. Zbl Bakt 11: 699, 1892.
- 14) 富岡政江, 松澤和夫, 中野正雄, 松下茂樹: 市販の乳酸菌製品により腸内病原菌の除菌に成功した症例. BACTERIAL ADHERENCE & BIOFILM 18: 54 - 58, 2005.
- 15) Uchida M and Kurakazu K: Yogurt containing Lactobacillus gasseri OLL2716 exerts gastroprotective action against acute gastric lesion and antral ulcer in rats. J Pharmacol Sci 96: 84 - 90, 2004.

(平成27年5月20日受付)

[特 別 掲 載]