

# 消化管病原細菌に及ぼすココアの抑制効果

神谷 茂 (杏林大学医学部教授)

## 新興感染症と再興感染症

近年、感染症に対する関心が高まっている。1995年9月米国クリントン大統領主催の米国科学技術会議で国際科学工学技術政策のワーキンググループによる報告の中で初めて新興・再興感染症という言葉が提起された。新興感染症 emerging infectious diseases とは“今までに知られておらず新しく同定された病原体による感染症で、局地的あるいは国際的にも公衆衛生上大きな問題を惹起する感染症”と定義される。再興感染症 re-emerging infectious diseases とは“もはや公衆衛生上問題とならないほどに減少してきた感染症であるが、近年再び流行し始め患者数が増加してきた感染症”と定義され、結核、ジフテリア、コレラ、狂犬病などが含まれる。主な新興感染症を表1に示す。これらの新興感染症のうち、ヘリコバクター・ピロリ *Helicobacter pylori* (以下ピロリ菌) と O157 : H7 EHEC (腸管出血性大腸菌) の2つの消化管病原細菌に及ぼすココアの効果を検討した。

表1 主な新興感染症

年	病原微生物	種類	疾病
1973	ロタウイルス	ウイルス	小児の下痢
1976	<i>Cryptosporidium parvum</i>	寄生虫	下痢
1977	エボラウイルス	ウイルス	エボラ出血熱
1977	<i>Legionella pneumophila</i>	細菌	レジオネラ症 (在郷軍人病)
1977	ハンタウイルス	ウイルス	腎症候性出血熱
1977	<i>Campylobacter jejuni</i>	細菌	下痢
1980	HTLV-1	ウイルス	成人T細胞白血病
1981	<i>Staphylococcus aureus</i> (TSST 毒素産生性)	細菌	毒素性ショック症候群
1982	<i>Escherichia coli</i> O157 : H7	細菌	出血性大腸炎、溶血性 尿毒症症候群
1982	<i>Borrelia burgdorferi</i>	細菌	ライム病
1983	HIV	ウイルス	エイズ
1983	<i>Helicobacter pylori</i>	細菌	胃炎胃潰瘍
1985	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	寄生虫	持続性下痢
1986	<i>Cyclospora cayatanensis</i>	寄生虫	持続性下痢
1988	HHV6	ウイルス	突発性発疹
1988	E型肝炎ウイルス	ウイルス	E型肝炎
1989	<i>Ehrlichia chafeensis</i>	細菌	エールリッヒア症
1989	C型肝炎ウイルス	ウイルス	C型肝炎
1991	グアナリトウイルス	ウイルス	ベネズエラ出血熱
1991	<i>Encephalitozoon hellem</i>	寄生虫	結膜炎
1992	<i>Vibrio cholerae</i> O139	細菌	コレラ
1992	<i>Bartonella henselae</i>	細菌	猫ひっかき病
1994	サビアウイルス	ウイルス	ブラジル出血熱

## ピロリ菌の性状

ピロリ菌は1983年オーストラリアの Warren と Marshall によって慢性胃炎患者の胃粘膜より分離されたグラム陰性らせん状細菌である。本菌は $0.5\sim 1.0\times 2.5\sim 5.0\mu\text{m}$ 大のらせん状形態を示し、端在性に数本の有鞘性鞭毛を活発に動かし、運動性を発揮する(図1)。本菌はウレアーゼを産生し、胃粘膜中の尿素を分解し、アンモニアを合成し胃酸を中和することにより、菌体周辺のpHを自らの生存に適するpH 7前後に調整する。ピロリ菌は胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍患者より高率に分離されることが報告されている(表2)。本菌感染は急性胃炎、慢性胃炎を引き起こすとともに、胃十二指腸潰瘍の再発因子及び治癒遅延因子として作用する。すなわちピロリ菌の除菌により胃十二指腸潰瘍の再発率(通常1年後に70~80%が再発する)は激減する(再発率0~30%)ことが多くの研究者により報告されている(図2)。またピロリ菌は胃癌発生との関連性が指摘されている。胃癌患

図1 ピロリ菌の透過型電顕像。らせん状菌体と端在性の有鞘性鞭毛が観察される。(×68,000)

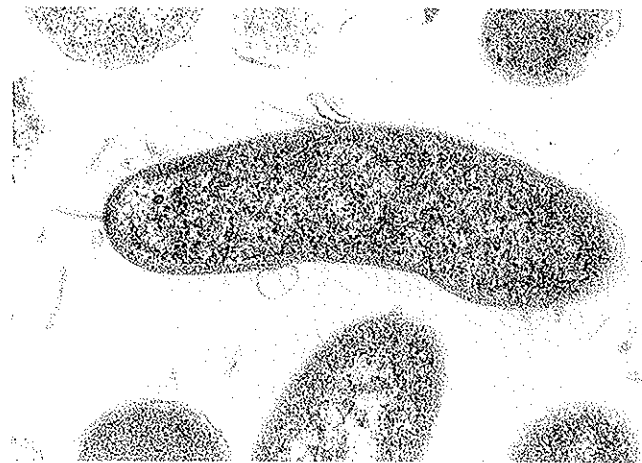
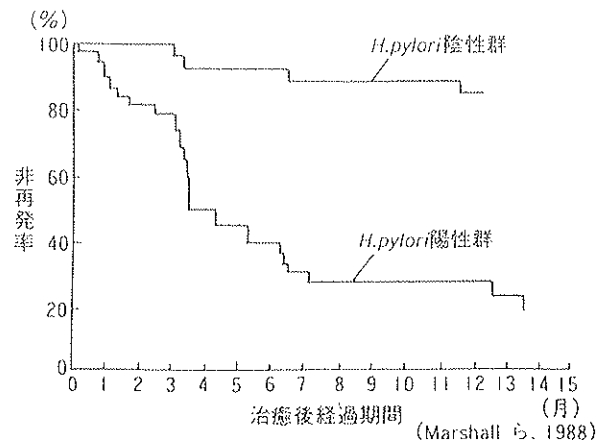


表2 胃十二指腸疾患とピロリ菌 (*H. pylori*) 感染

病変	患者数	ピロリ菌 ( <i>H. pylori</i> )	
		範囲	陽性率 (%)
慢性活動性胃炎	401	64~95	88
胃潰瘍	178	35~86	64
十二指腸潰瘍	246	75~100	85
正常	230	0~20	9

(Blaser, 1990)

図2 Marshall らの十二指腸潰瘍再発率のプロスペクティブな検討結果



者では健常人に比べ有意に高い抗ピロリ菌抗体陽性率を示し、WHOもピロリ菌を胃癌のリスクファクターとして認めている。

### ピロリ菌の感染経路

ピロリ菌の感染経路を図3に示す。本菌は口-口感染及び糞-口感染によりヒトへ感染する。口-口感染とは本菌に汚染した食品を同一の食器を介して食事をした場合や唾液を介してヒトからヒトへ伝播する感染様式のことである。糞-口感染とは本菌を含む糞便が食品や水に汚染し、経口的にヒトに摂取され伝播される感染様式のことである。この他、家畜、飼いネコ、家バエからの感染が報告されているが詳細は不明である。

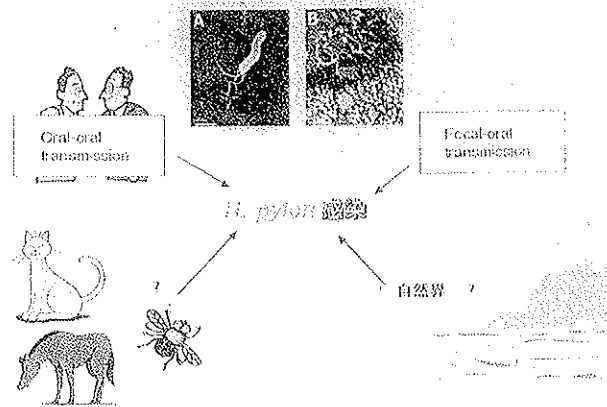


図3 ピロリ菌の感染経路

### ココアのピロリ菌に対する殺菌効果

ココアのピロリ菌に対する殺菌効果について検討した(図4)。10%ウシ胎児血清を含む増殖培地(ブレインハートインフュージョン：BHI)に0.5、3.5、10%ココアを加えたピロリ菌の増殖を調べた。24時間後に増殖培地のみではピロリ菌数は約30倍増加した。一方、3.5および10%ココア添加培地では添加4時間後より菌数は1/5以下に減少し、24時間後には1/10<sup>5</sup>以下に減少した。3.5~10%濃度のココアはきわめて強いピロリ菌に対する殺菌効果をもつことが示された。この殺菌効果がココアの可溶性および不溶性成分のいずれに起因するかを調べた(表3)。3.5%および10%ココアいずれも可溶性成分にその殺菌効果が認められた。しかし、リグニン等を含む繊維成分のある不溶性成分には殺菌効果は認められなかった。

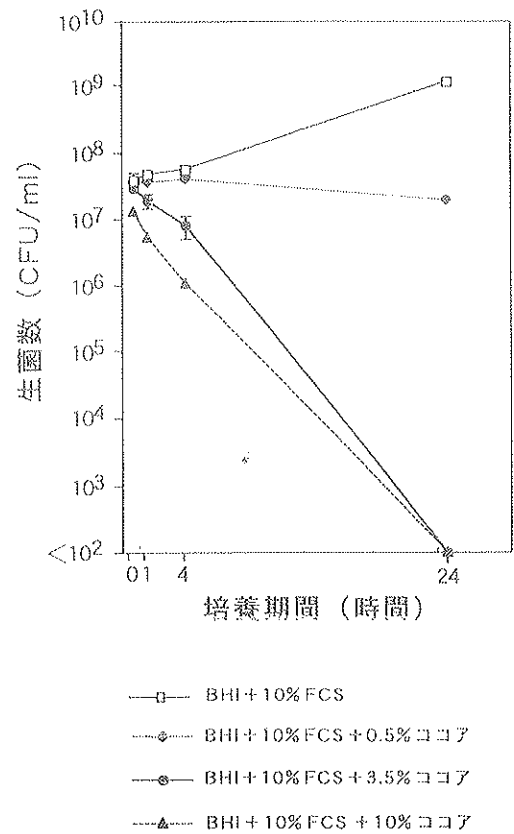


図4 ココアによるピロリ菌の殺菌効果

表3 ココアの可溶性成分および不溶性成分のピロリ菌殺菌効果

培地添加成分*	生菌数 (×10 <sup>7</sup> CFU/ml)	
	培養0時間後	培養24時間後
無添加	4.1±0.87	34.0±3.1
3.5%ココア可溶性成分	5.0±1.1	0.011±0.01
3.5%ココア不溶性成分	4.2±0.40	4.7±0.72
10%ココア可溶性成分	4.4±0.87	ND**
10%ココア不溶性成分	5.6±1.1	3.2±0.83

\* : 基礎培地 BHI+10%FCS

\*\* : Not Detected

### ココアによるピロリ菌の形態変化

ココアのピロリ菌の形態に及ぼす効果を電子顕微鏡により調べた。10%ココア処理4時間により80~90%の菌はらせん状から球状に形態変化を示した。24時間処理によりその大きさは縮小されココア不溶性成分を介して互いの菌が凝集している像が観察された。また菌数も未処理の対照に比べ、明らかに減少してココアによる溶菌が示唆された。

### 無菌マウスにおけるココアのピロリ菌感染防止効果

ココアのピロリ菌に及ぼす効果を無菌マウスを用いた in vivo 実験にて検討した。10<sup>9</sup>個以上のピロリ菌を10%ココア添加及び無添加の条件で経口的に無菌マウスに接種し、3日及び7日後に感染マウスを屠殺し胃内ピロリ菌を定量培養した(図5)。ピロリ菌のみの接種により、3日及び7日後に胃内ピロリ菌数は10<sup>4</sup>個/g粘液を示し、安定なピロリ菌の持続感染が認められた。一方、10%ココアを添加したピロリ菌接種マウスでは、3日及び7日目にはいずれも胃内よりピロリ菌は分離されなかった。この定着阻害は計7匹(3日後4匹、7日後3匹)全てのマウスにおいて認められた(表4)。ココアの持つピロリ菌殺菌効果は1及び4時間ではわずか(1/5程度)であるため、ココアはピロリ菌の胃内定着をも有意に抑制することが示唆された。

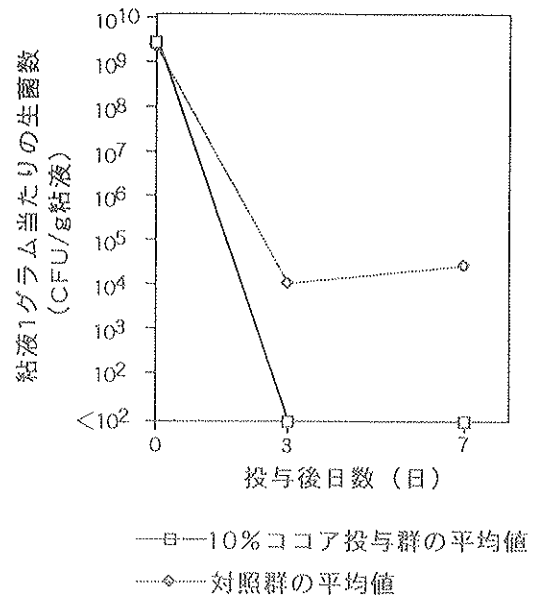


図5 無菌マウスにおけるココアのピロリ菌感染防止効果—ピロリ菌投与後の胃粘液中の生菌数—

表4 ピロリ菌投与後の胃内定着率に及ぼすココアの効果

投与群	3日後	7日後
10%ココア投与群	0/4*	0/3
対照群	2/4	4/4

\* : ピロリ菌陽性マウス数/ピロリ菌投与マウス数

### ピロリ菌に及ぼすココアの効果—まとめ

ココアは以下のようなピロリ菌に及ぼす効果を示すことが明らかにされた。

1. ココアは増殖培地中のピロリ菌に対して殺菌効果を示した。
2. 抗菌効果がココアの可溶性成分中に認められた。

3. ココア中で培養することにより、ピロリ菌の球状化と凝集像などが認められた。
4. ココアとピロリ菌を同時に無菌マウスに経口投与することにより、ピロリ菌の胃内定着が阻止された。

### O157:H7 腸管出血性大腸菌 (EHEC) の性状

大腸菌は非病原性大腸菌と病原性大腸菌とに分類される(表5)。非病原性大腸菌といえども、通常の存在部位ではない膀胱、腎臓、肺などでは異所性炎症(膀胱炎、腎盂腎炎、肺炎)を引き起こす。病原性大腸菌とは急性腸炎を引き起こす下痢原性大腸菌のことである。これには腸管病原性大腸菌(EPEC)、腸管毒素原性大腸菌(ETEC)、腸管出血性大腸菌(EHEC)、腸管侵入性大腸菌(EIEC)、腸管付着凝集性大腸菌(EAggEC)が含まれる。EHECには1996年に我が国で6000人を越す食中毒患者が発生する事件の原因菌となったO157:H7大腸菌が含まれる。

表5 大腸菌 *Escherichia coli*

1. 非病原性大腸菌—異所性炎症(肺炎、膀胱炎、腎盂腎炎など)
2. 病原性大腸菌—下痢原性
  - 1) ETEC (毒素原性大腸菌)
  - 2) EPEC (腸管病原性大腸菌)
  - 3) EAggEC (腸管付着凝集性大腸菌)
  - 4) EHEC (腸管出血性大腸菌)
  - 5) EIEC (腸管侵入性大腸菌)

### ココアの O157:H7 EHEC に対する殺菌効果

ココアの O157:H7 EHEC に及ぼす殺菌効果を調べた(図6)。約1万個の O157:H7 大腸菌を生理食塩水に類似した PBS に懸濁するとともに、ココアを3.5及び5%に添加した。PBS 中では O157:H7 EHEC は24時間にわたり増殖は示さなかった。しかし、3.5及び5%ココア存在下で、O157:H7 EHEC は10個以下の菌数となり検出できなかった。一方、1万個の O157:H7 EHEC を増殖培地(LB培地)に懸濁した場合、24時間後にその菌数は $10^8$ 個以上に増加した。

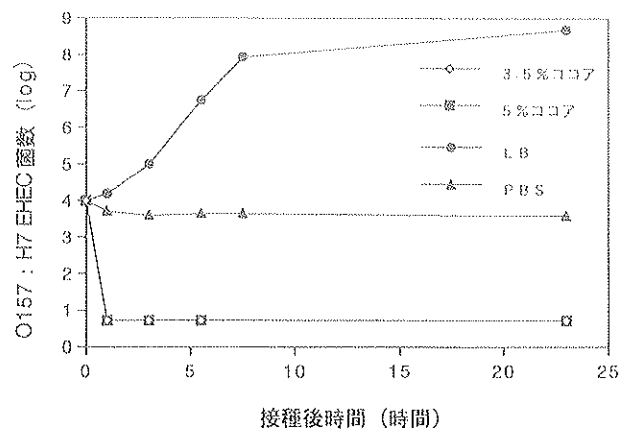


図6 O157:H7 EHEC に対するココアの殺菌効果

## ココアのパロ毒素中和効果

O157:H7 EHEC は赤痢菌志賀毒素に似たパロ毒素 (VT) を産生する。VT は微小血管障害性、腎毒性、神経毒性を有するため、O157:H7 EHEC 感染では単なる下痢ではなくて、出血性腸炎、溶血性尿毒症症候群(HUS)、脳症などの重篤な合併症を引き起こす。VT には VT1 と VT2 の 2 種類の毒素が含まれる。VT1 および VT2 に及ぼすココアの中和効果を調べた (図 7)。VT 濃度を 0.2~125pg/ml に調整し、ここにココアを 0.2、1.0、5.0% に加え、4℃、40 時間インキュベートした。その後 Vero 細胞(サル腎由来)に加え、死細胞の割合を吸光度測定により調べた。VT1、VT2 いずれもその毒性はココア添加により影響を受けなかった。すなわち、ココアには直接 VT1 および VT2 の毒性を中和する作用はなかった。

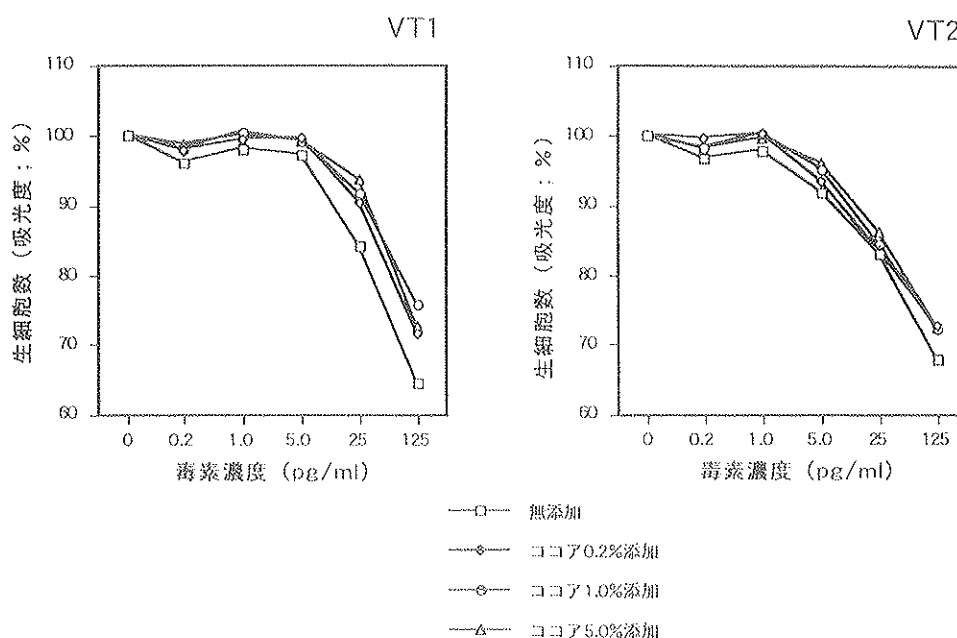


図 7 ココアによるパロ毒素中和効果

## ココアによる VT の Vero 細胞への結合抑制効果

VT の毒性発揮には、本毒素の細胞への結合が必須となる。ココアの VT の細胞への結合(付着性)に及ぼす効果をフローサイトメーターにより解析した (図 8)。1%及び5%ココアで予め Vero 細胞を 4℃、1 時間前処理した。次いで VT1 及び VT2 を同濃度のココア存在下に Vero 細胞に添加した。ココアを処理しない対照に比べ、ココアを処理した VT1 および VT2 では平均蛍光強度が有意に減少することが確認された。この結果はココア (1%、5%) は VT1 および VT2 の Vero 細胞への付着・結合を阻害することを示している。

## 増殖培地におけるココアの O157:H7 EHEC に及ぼす効果

増殖培地 (CAYE 培地) 中で O157:H7 EHEC は活発な増殖を示す。ココアの O157:H7 EHEC に及ぼす効果を調べた。PBS に懸濁した場合 (図 6) と異なり、増殖培地中では O157:H7 EHEC の増殖能は強く、ココアが完全に O157:H7 EHEC を殺菌することは出来なかった (図 9)。しかし、8%ココア添加により、O157:H7 EHEC の菌数は対照 (ココア非添加) に比べ約 1/10 (3 時間後) 及び約 1/100 (6 時間後) に減少した。またこのときの VT1 および VT2 の産生量を測定した

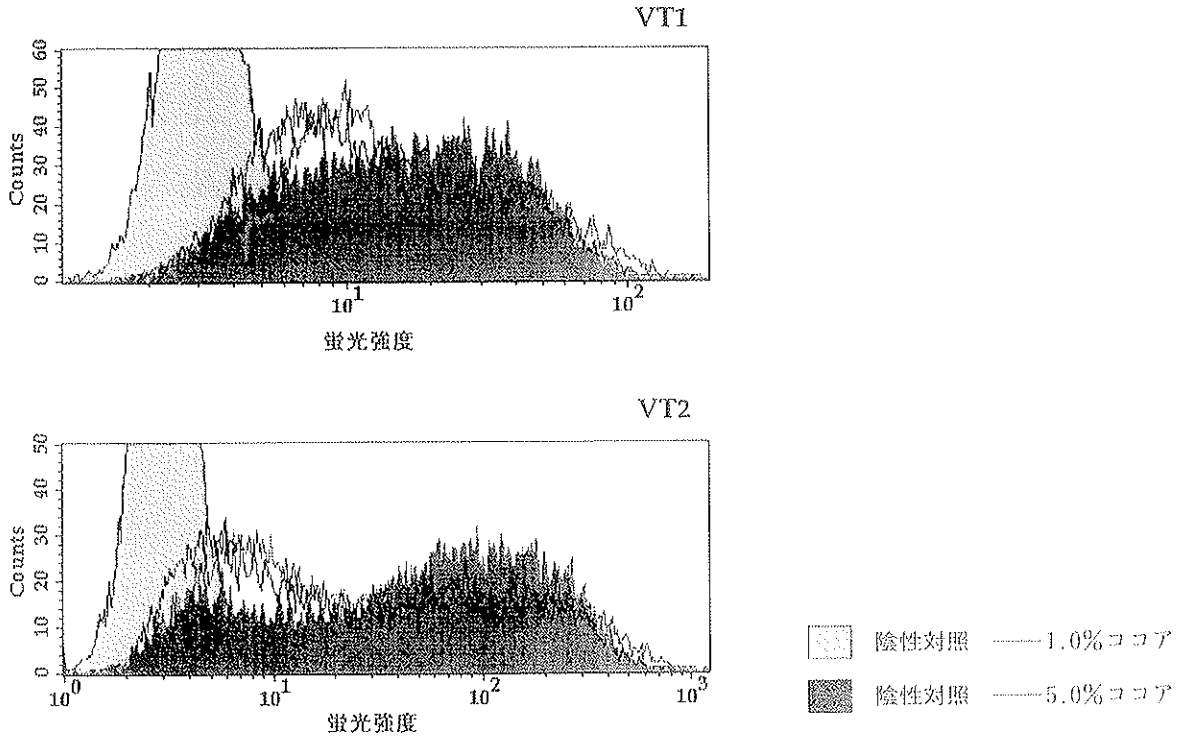


図8 ココアによるベロ毒素の Vero 細胞への結合抑制効果

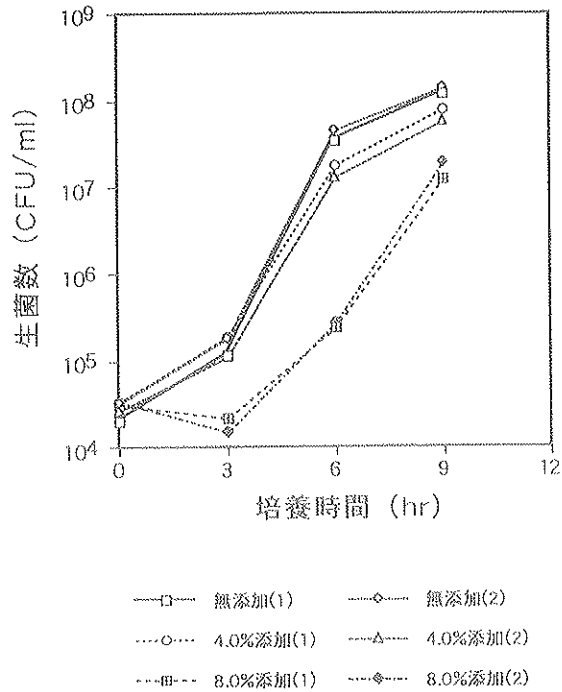


図9 ココアによるベロ毒素産生抑制効果—増殖曲線—

(図10)。VT1、VT2の産生量は8%ココア添加によりいずれも対照の1/4~1/64、1/8~1/32に低下していた。これらの結果より増殖培地中では8%ココアはO157:H7 EHECの増殖を1/10~1/100に抑制するとともに、VTの産生を1/4~1/64に低下させることが明らかとなった。

#### ココア熱水抽出画分のO157:H7 EHEC 殺菌効果

ココアのどんな成分がO157:H7 EHECに殺菌効果を示すかを解析した。図11に脱脂ココア熱水

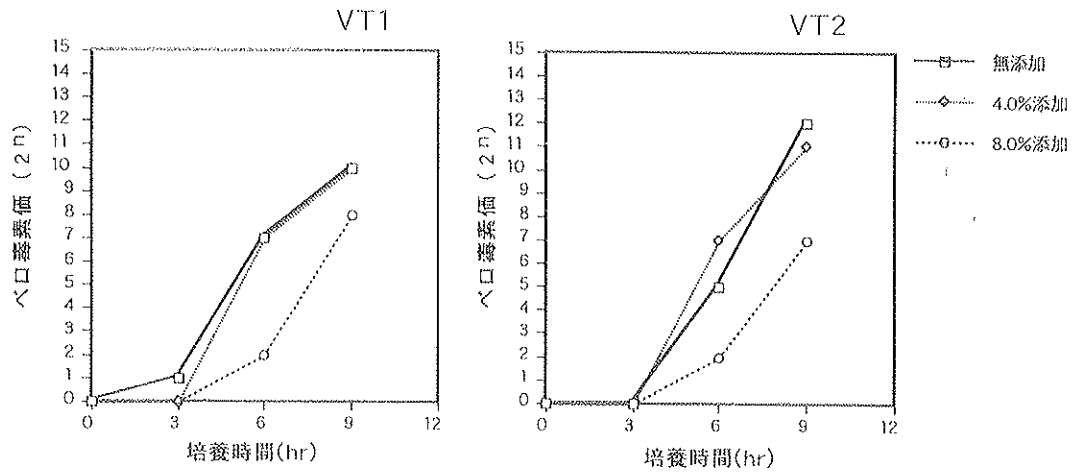


図10 ココアによる O157 : H7 EHEC のベロ毒素産生抑制効果

抽出液 (121°C、15分、1気圧処理) の有機溶媒抽出法を示す。クロロホルム層には主にカフェインが抽出され、酢酸エチル層には低分子のポリフェノールが抽出される。またブタノール層には重合した高分子のポリフェノールが抽出され、残存水層中には親水性のポリフェノールなどが存在する。これらの抽出画分の O157 : H7 EHEC 増殖能に及ぼす効果を調べた (図12)。また陽性対照として、緑茶由来の精製カテキン (1 mg/ml) も使用した。PBS 中に懸濁した O157 : H7 EHEC ( $5 \times 10^3$ 個) 数はカテキン存在下、6 時間後に検出限界以下に減少した (図12A)。一方、7 %ココア存在下では、3 時間後に O157 : H7 EHEC 数は検出限界以下に減少した。すなわち、7 %ココアは 1 mg/mlカテキンよりも O157 : H7 EHEC に対する強い殺菌効果を持つことが明らかにされた。

抽出画分中ではクロロホルム層画分には殺菌効果は全く見られず、酢酸エチル層画分の殺菌効果も微弱であった (図12B)。ブタノール層画分の添加により、培養 6 時間後には O157 : H7 EHEC 菌数は対照の約 1/40 に低下した。また残存水層画分の添加は、オリジナルの熱水抽出液と同様、3 時間培養により完全に O157 : H7 EHEC の増殖を阻害した。

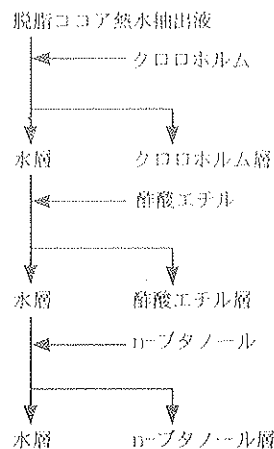


図11 有機溶媒抽出法による脱脂ココア熱水抽出液の分画

### O157 : H7 EHEC に及ぼすココアの効果—まとめ

ココアは以下のような O157 : H7 EHEC に及ぼす効果を示すことが明らかにされた。

1. ココアは PBS 中で O157 : H7 EHEC に対して殺菌効果を示した。



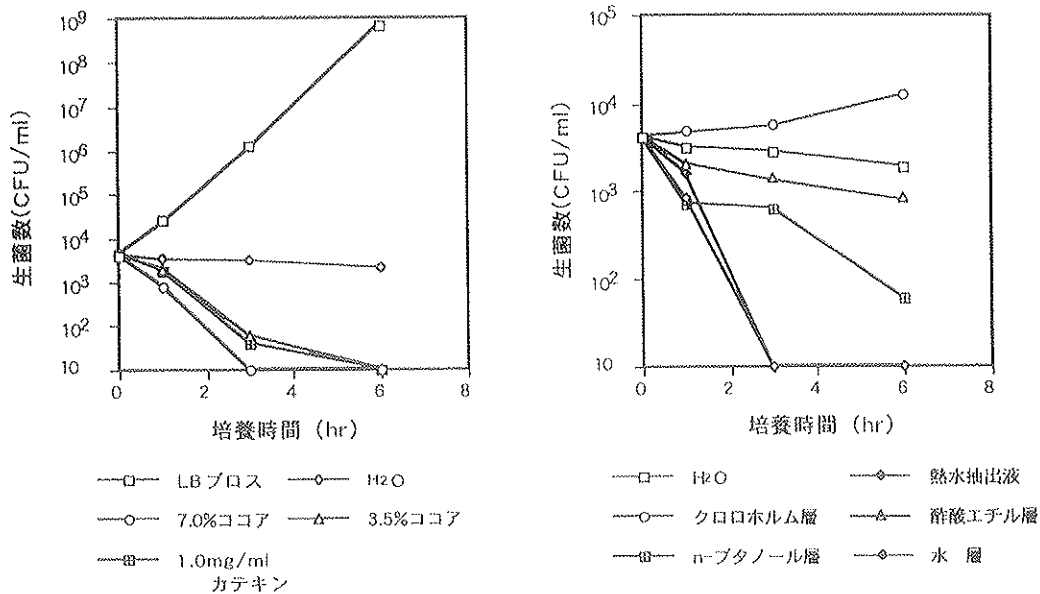


図12 ココアによる O157:H7 EHEC の増殖抑制効果

2. ココアはペロ毒素 (VT) を中和しなかったが、毒素の Vero 細胞への付着・結合を抑制した。
3. ココアは増殖培地 (CAYE 培地) 中で O157:H7 EHEC の増殖を抑制し、同時に VT 産生を抑制した。
4. ココア熱水抽出液の有機溶媒抽出で得られた両分のうち、ブタノール層及び残存水層両分に増殖抑制活性が認められた。

#### 終わりに

ココアは新興感染症病原菌のうち代表的な消化管病原細菌であるピロリ菌および O157:H7 腸管出血性大腸菌に対し強い抑制効果を示した。その効果は殺菌効果のみならず、菌の細胞付着性、毒素産生抑制及び毒素の細胞結合阻害など幅広い領域に及んでいた。もとより、ピロリ菌や O157:H7 EHEC の治療には各種抗生物質が最も効果が大きいことは周知の事実である。しかし、日常生活の中で予防的な観点からピロリ菌や O157:H7 EHEC などの病原細菌の侵入を阻止するのにココアが有効であることは強調したい。またその実効濃度が常用飲用量である 3.5~10% となることも重ねて強調されるべきであろう。本研究ではココアのどんな成分がこれらの病原菌に有効であるかは十分に解析できなかった。カテキンを代表とするポリフェノールであることも考えられるが、その他の成分が抗菌活性を有する可能性も現時点では残されている。今後、詳細な研究が展開される予定である。