

# ココアに含まれる抗菌物質の分析と 下痢原性細菌への効果

神谷 茂 (杏林大学医学部教授)

## はじめに

我々は既にココア（カカオマス）が胃十二指腸潰瘍の発症に関連するヘリコバクター・ピロリ *Helicobacter pylori* の胃上皮細胞への付着を抑制するとともに同菌に対する殺菌効果を *in vitro* および *in vivo* の実験系において明らかにした<sup>1-3)</sup>。また、O157:H7 腸管出血性大腸菌 enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) に対してもココアが殺菌効果を示すとともに本菌感染後の致命的な病態である溶血性尿毒症症候群 hemolytic uremic syndrome (HUS) の原因となるベロ毒素 (VT) 産生を抑制することを見出した<sup>3,4)</sup>。

今回、ココアに含まれる抗菌物質の分析をゲルろ過クロマトグラフィーおよび有機溶媒抽出法により行った。更に、ココアが赤痢菌、サルモネラ、コレラ菌、腸炎ビブリオ、カンピロバクター、エルシニアなどの下痢原性細菌にも抗菌効果を有するか否かについて検討を加えた。

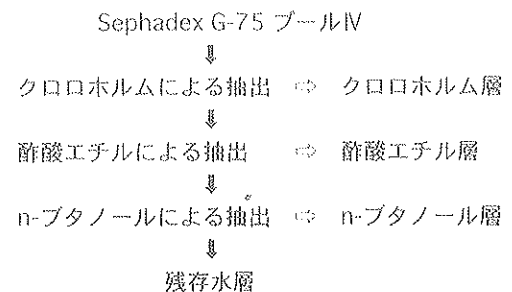
## 方 法

### 1. ココア（カカオマス）中の抗菌物質の抽出・分画化およびその分析

カカオマス（森永製菓株式会社より分与）懸濁液を、121℃、15 分間高圧滅菌しカカオマス熱水抽出液 heat extract (HE) を得た。カカオマス HE の Sephadex G-75 を用いたゲルろ過クロマトグラフィーによる分画 (pool I ~ IV) を行った。ついで抗菌活性を示す画分 pool IV をクロロホルム、酢酸エチルおよび n-ブタノールの各種有機溶媒を用いて抽出した (図 1)。

またカカオマス HE を 80% エタノールを用いた分別沈殿法により分離し、その抗菌活性を測定した。ポリフェノール吸着剤であるポリビニルポリピロリドン polyvinylpolypyrrolidone (PVPP: Sigma-Aldrich) を用いて被験物質を前処理し、抗菌活性を測定した。また、他の嗜好性飲料として緑茶およびウーロン茶の 80% エタノールによる抽出を行い、その抗菌活性も比較検討した。

図 1 有機溶媒抽出法によるプール IV 中の抗菌活性成分の分離



### 2. 使用菌株

杏林大学医学部微生物学教室保存株である O157:H17 EHEC 006 および 020 株、腸管凝集性大腸菌 enteroaggregative *E. coli* (EAggEC) TN-3 株、腸管病原性大腸菌 enteropathogenic *E. coli* (EPEC) O159 株、非病原性大腸菌 *E. coli* B178 株、赤痢菌 (*Shigella sonnei* K-CL 株、

*Shigella flexneri* 3a 株)、サルモネラ属細菌 (*Salmonella* Enteritidis 11654 株、*Salmonella* Typhi 2533 株)、コレラ菌 (*Vibrio cholerae* O1, V86 株)、腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus* K4 株)、カンピロバクター属細菌 (*Campylobacter jejuni* ATCC33560 株、*Campylobacter coli* NCTC11366 株)、クレブシエラ属細菌 (*Klebsiella pneumoniae* 7-29-09 株、*Klebsiella oxytoca* 2-71 株)、アエロモナス属細菌 (*Aeromonas hydrophila* 2-39 株)、エルシニア属細菌 (*Yersinia enterocolitica* O3, 85 株、*Yersinia pseudo-tuberculosis* I-Ip1059 株)、エンテロバクター属細菌 (*Enterobacter aerogenes* 1-23 株、*Enterobacter cloacae* 1-31 株)、プロテウス属細菌 (*Proteus mirabilis* 1-49 株、*Proteus vulgaris* 1-59 株)、クロストリディウム属細菌 (*Clostridium difficile* VPI10463 株、*Clostridium difficile* KZ1678 株)、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 020 株の計 20 菌種 25 菌株を実験に供した。

### 3. 抗菌活性の測定

被験菌を各種増殖用培地中で発育させた後、生理食塩水に懸濁させた。終濃度 1.75~7.0% にカオマス HE あるいは各種抽出画分を加え、培養後経時的にサンプリングし、生菌数を定量した。

### 4. 細菌毒素の測定

O157:H7 EHEC の培養上清中のベロ毒素 (VT1, VT2) の定量は逆受身ラテックス凝集法 (VTEC-RPLA「生研」：デンカ生研) により定量した。また MRSA の培養上清中の毒素性ショック症候群毒素-1 (Toxic shock syndrome toxin-1: TSST-1) およびエンテロトキシン C (Staphylococcal enterotoxin C: SET-C) はそれぞれ逆受身ラテックス凝集法 (TST-RPLA「生研」および SET-RPLA「生研」：デンカ生研) により定量した。

## 結 果

### 1. ココア (カオマス) に含まれる抗菌物質の分析

カオマス HE の Sephadex G-75 を用いたゲルろ過クロマトグラフィーを行った (図 2)。280nm および 490nm の吸光度は pool IV が最高値 (25.8, 1.75) を示した。また、pool III にも高い吸光度 (4.89, 0.606) が認められた。O157:H7 EHEC を対象として pool I~IV の抗菌活性を測定した (図 3)。pool IV はカオマス HE と同程度の抗菌活性を示したが、pool I~III には全

図 2 Sephadex G-75を用いたゲルろ過クロマトグラフィーによるカオマス熱水抽出液の分画

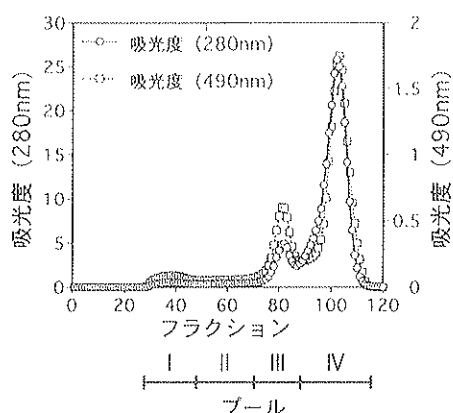
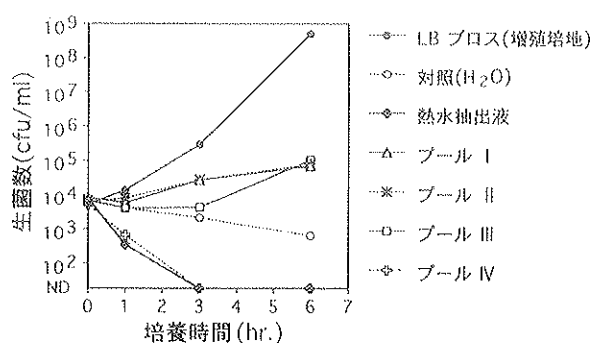


図 3 Sephadex G-75を用いたゲルろ過クロマトグラフィー画分の抗菌活性



く抗菌活性は検出されなかった。pool IVを更にクロロホルム、酢酸エチルおよびn-ブタノールで連続的に抽出を行い、得られた抽出画分の抗菌活性を調べた(図4)。クロロホルム、酢酸エチルおよびn-ブタノール抽出画分にはいずれも O157:H7 EHEC に対する抗菌活性は検出されず、残存水層にのみ抗菌活性が認められた。

また、カカオマス HE をポリフェノール吸着剤 PVPP で前処理した場合、その抗菌活性はほとんど消失していた(図5)。カカオマス、緑茶およびウーロン茶の 80% エタノール抽出液には強い抗菌活性が認められたが、カカオマスのエタノール抽出液には抗菌活性は全く検出されなかった(図6)。

図4 プールⅣの有機溶媒抽出画分の抗菌活性

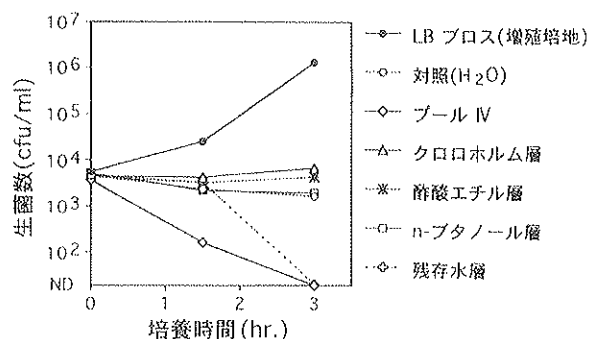


図5 PVPP-処理後のカカオマス熱水抽出液の抗菌活性

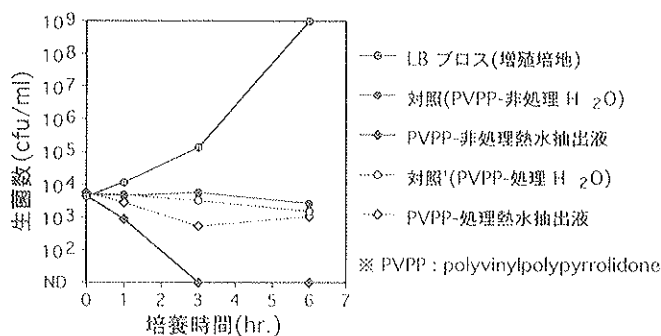
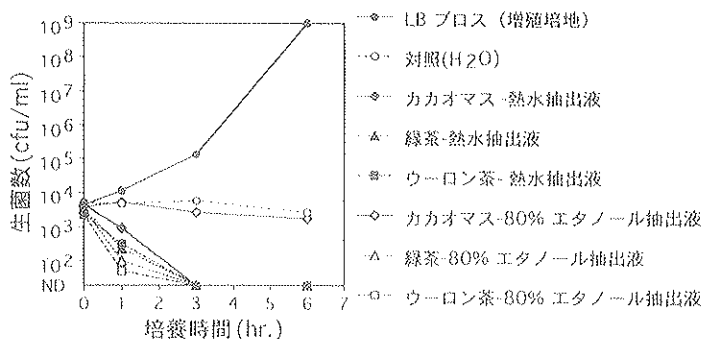


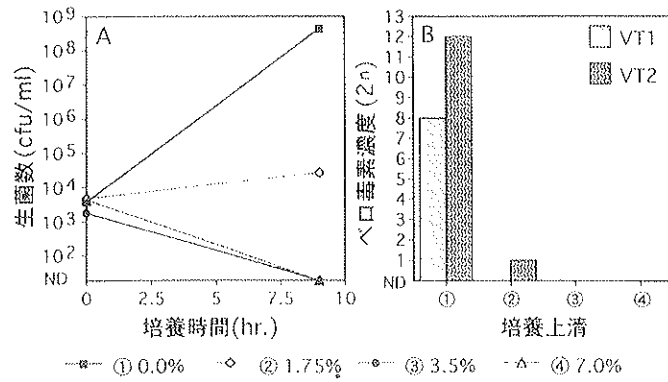
図6 各種嗜好飲料の熱水抽出液および80%エタノール抽出液の抗菌効果



## 2. ココア (カカオマス) のベロ毒素 (VT) 産生に及ぼす効果

1.75、3.5 および 7.0% カカオマス HE 存在下での O157:H7 EHEC の増殖と VT (VT1 および VT2) 産生を調べた(図7)。3.5 および 7.0% HE は菌の増殖を完全に抑制したが、1.75% カカオマス HE にはそのような抗菌効果は見られなかった(図7A)。毒素産生については、カカオマス HE 非存在下で 2<sup>8</sup> および 2<sup>12</sup> ユニットの VT1 および VT2 が産生されたが、1.75% カカオマス HE 添加により VT 産生は顕著に抑制され、VT1 は検出されず、VT2 量は 2<sup>1</sup> ユニットまで低下した。また、3.5 および 7.0% カカオマス HE 添加により VT1 および VT2 は全く検出されなかった(図7B)。

図7 O157:H7 EHECの増殖(A)およびベロ毒素産生(B)に対する熱水抽出液の効果



### 3. ココア（カカオマス）の下痢原性細菌に及ぼす効果

#### 1) 大腸菌に及ぼす効果

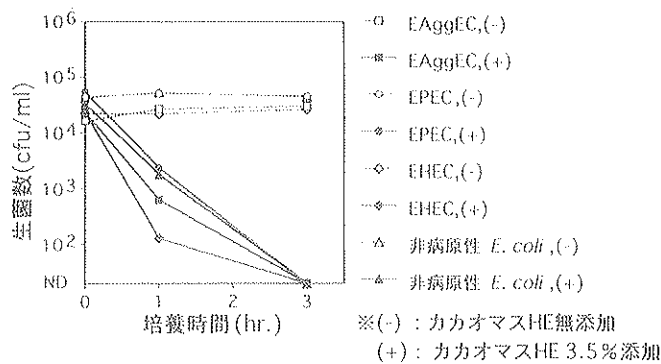
大腸菌 *E. coli* は病原性大腸菌と非病原性大腸菌に分類される<sup>5)</sup>。表1に病原性大腸菌の分類を示す。3.5%カカオマス HE の *E. coli* に及ぼす効果を調べた (図8)。培養1時間後での増殖抑制は EHEC および EAggEC で強く、EPEC および非病原性 *E. coli* で弱かった。しかしながら培養3時間後では何れの菌株も増殖を完全に抑制された。

表1 病原性大腸菌の分類

腸管病原性大腸菌 (広義)

enterotoxigenic <i>E. coli</i> (ETEC)	毒素原性大腸菌
enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC)	組織侵入性大腸菌
enteroaggregative <i>E. coli</i> (EAggEC)	腸管粘着凝集性大腸菌
enteropathogenic <i>E. coli</i> (EPEC)	腸管病原性大腸菌 (狭義)
enterohaemorrhagic <i>E. coli</i> (EHEC)	腸管出血性大腸菌

図8 各種大腸菌に対する熱水抽出液の抗菌効果



#### 2) 赤痢菌、サルモネラ、コレラ菌に及ぼす効果

3.5%のカカオマス HE は赤痢菌 (*S. sonnei*, *S. flexneri*) およびサルモネラ (*Salmonella* Enteritidis, *S. Typhi*) の増殖を3時間で完全に抑制した (図9A, 図9B)。また同 HE はコレラ菌 (*V. cholerae*) の菌数を 1/10<sup>6</sup>以下に抑えた (1.75%添加)。また腸炎ビブリオの菌数は検出限界以下に低下した (1.75%添加) (図10)。

#### 3) カンピロバクターに及ぼす効果

カンピロバクター・ジェジュニ (*C. jejuni*) は主に鶏肉を介した食中毒を引き起こすとともに、

図9 赤痢菌属(A)およびサルモネラ菌属(B)に対する熱水抽出液の抗菌効果

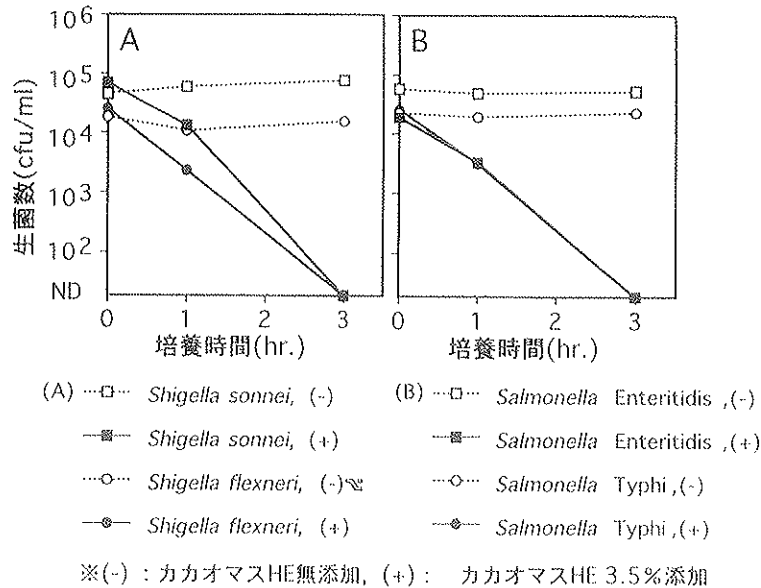
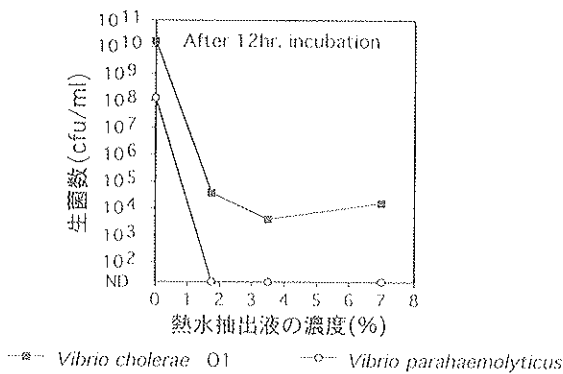


図10 増殖培地中におけるコレラ菌と腸炎ピブリオ菌に対する熱水抽出液の抗菌効果



末梢性神経障害であるギランバレー症候群との関連も考えられている(表2)<sup>67)</sup>。3.5%カカオマスHEは*C.jejuni*の増殖を抑えなかったが、7.0%カカオマスHEにより菌数が約 $1/10^4$ に低下した(図11)。一方、*C.coli*に対する殺菌効果は著明で3.5%HEにより菌数は約 $1/10^3$ に低下した。

4) その他の腸内細菌科細菌に及ぼす効果

3.5%HEはクレブシエラ属、エンテロバクター属、アエロモナス属細菌の増殖を完全に抑制した(3時間培養)が、エルシニア属およびプロテウス属細菌に対する増殖抑制効果は著明ではなかった(図12、図13A、13B、14A、14B)。

5) デイフィシル菌に対する効果

デイフィシル菌(*C.difficile*)は偽膜性大腸炎および抗平物質誘導下痢症の原因菌である(図15、表3)<sup>8,9)</sup>。3.5%カカオマスHEによりデイフィシル菌(VPI110463株, KZ1678株)の増殖は $1/10^6$ 以下に抑制された(図16)。

表2 *Campylobacter jejuni*の性状

- ・ヒトや動物の腸管,口腔,生殖器より検出される
- ・Skirrow培地で分離する
- ・病原性
  - 1) カンピロバクター腸炎(鶏肉,生乳,生ガキ)
  - 2) ギランバレー症候群との関連(?)
- ・治療: エリスロマイシン,ミノマイシン

図11 カンピロバクター菌属に対する熱水抽出液の抗菌効果

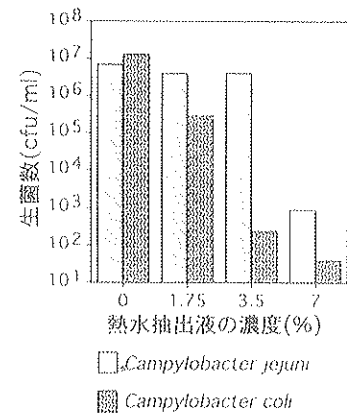


図12 クレブシエラ菌属に対する熱水抽出液の抗菌効果

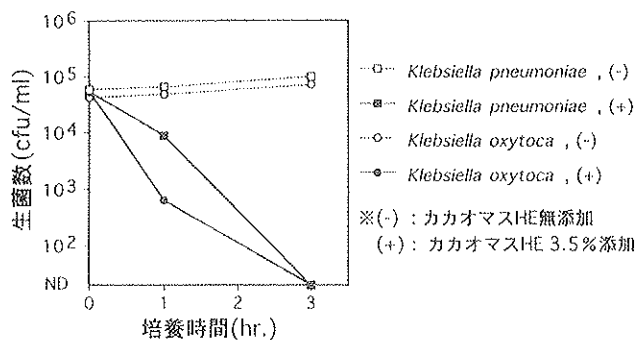


図13 エンテロバクター菌属(A)およびアエロモナス菌属(B)に対する熱水抽出液の抗菌効果

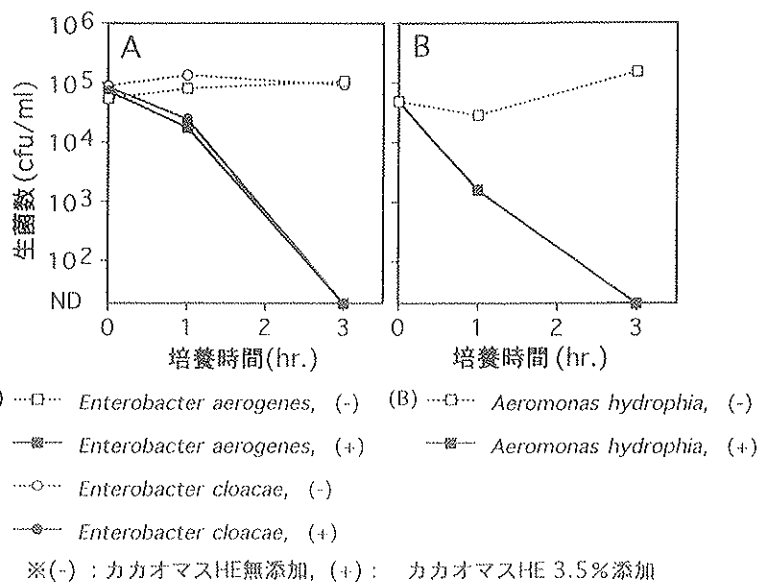


図14 エルシニア菌属(A)およびプロテウス菌属(B)に対する熱水抽出液の抗菌効果

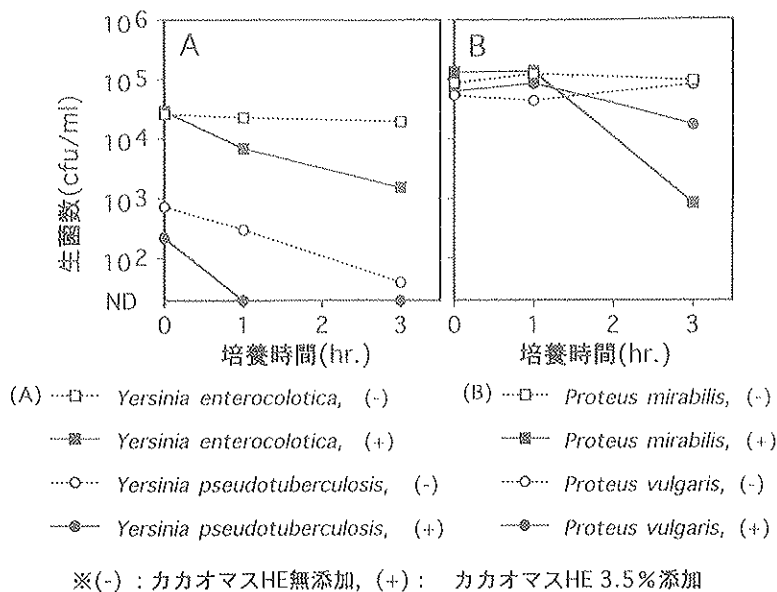


図15 Clostridium difficile のグラム染色

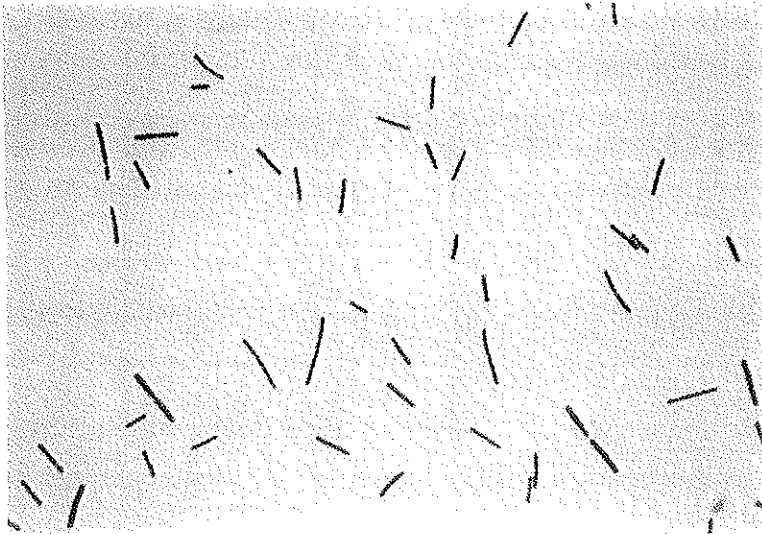
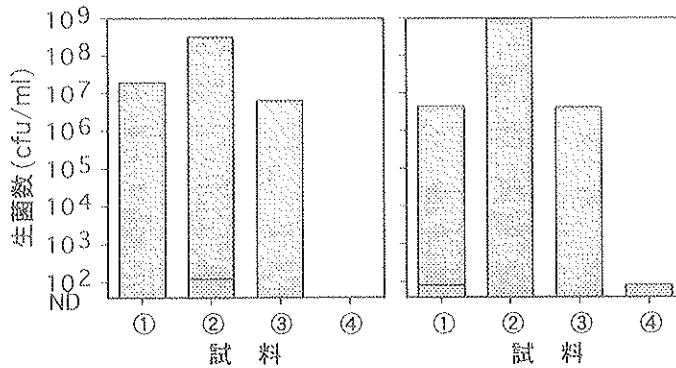


表3 Clostridium difficile の性状

- ・ ヒト腸管内(5~10%)や環境中より検出される
- ・ CCFA (cycloserine-cefoxitin fructose agar) 培地で分離する
- ・ 有毒株：トキシンA,トキシンB産生(+)
- ・ 無毒株：トキシンA,トキシンB産生(-)
- ・ 病原性
  - 1) 偽膜性大腸炎
  - 2) 抗生物質関連下痢症
- ・ 治療：
  - 1) 原因抗生剤の投与中止
  - 2) バンコマイシン,メトロニダゾール

図16 ディフィシル菌に対する熱水抽出液の抗菌効果

Clostridium difficile ,VPI10463 Clostridium difficile ,KZ1678



- ① (-) Extract, before incubation
- ② (-) Extract, after 5.0hr. incubation
- ③ (+) 3.5% Extract, before incubation
- ④ (+) 3.5% Extract, after 5.0hr. incubation

6) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) への効果

MRSA は院内感染の起因菌として最も重要な位置を占めるグラム陽性球菌である(図17)<sup>10)</sup>。3.5%カカオマス HE は MRSA の菌数を 1/10<sup>8</sup>以下に低下させ、7.0%カカオマス HE 処理によ

り菌数は検出限界以下となった(図18)。また、MRSAの産生する毒素(TSST-1およびSET-C)は3.5%および7.0%カカオマスHEにより完全にその合成が抑制された(図19A, 19B)。

図17 Staphylococcus aureusのグラム染色

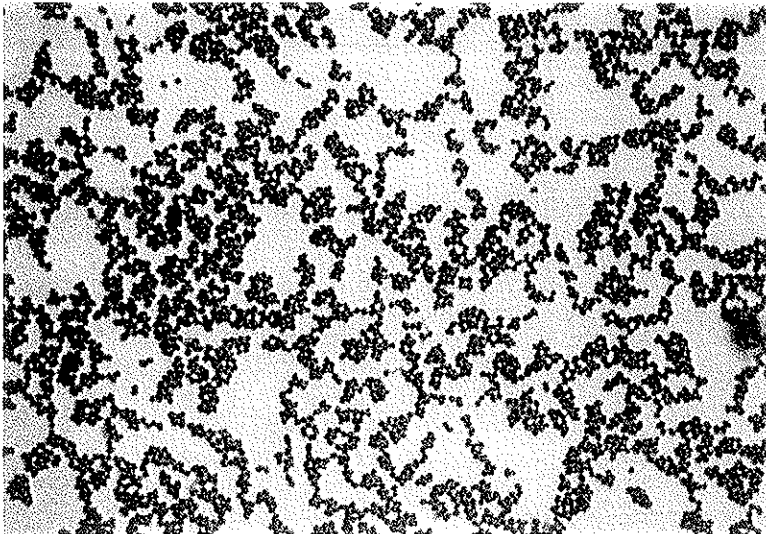


図18 黄色ブドウ球菌(MRSA)に対する熱水抽出液の抗菌効果

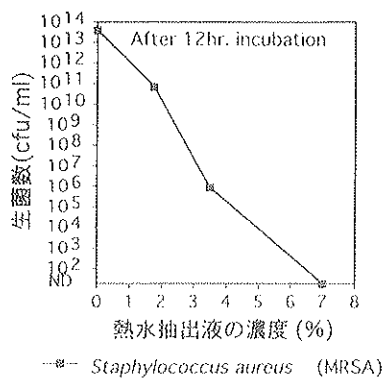
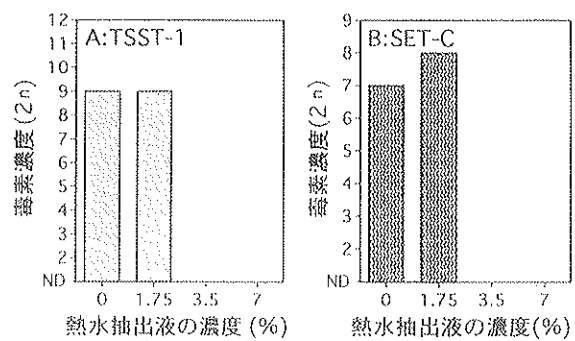


図19 黄色ブドウ球菌(MRSA)毒素産生に対する熱水抽出液の抑制効果



## 考 察

カカオマスHEはO157:H7 EHECをはじめとする種々の下痢原性細菌の増殖を抑制することが明らかにされた。Sephadex G-75を用いたゲルろ過クロマトグラフィーで得られたpool IV画分(分子量3000以下)に本抗菌活性が検出された。本活性はポリフェノール除去剤PVPP処理により消失すること、また酢酸エチルおよびn-ブタノール抽出画分ではなく、残存水層に認められたことより高分子のフェノール性化合物が殺菌効果をもつと考えられる。また、緑茶やウーロン茶と異なり、カカオマスの80%エタノール抽出液には抗菌活性が認められないことより、カカオマス独特の殺菌性フェノール性化合物の存在が示唆される。今後、殺菌成分の詳細な分析を行っていく予定である。

カカオマスHE(3.5~7.0%)は病原性大腸菌、サルモネラ、赤痢菌、コレラ菌、カンピロバクター、デイツィシル菌など様々な下痢原性細菌の増殖を抑制した。一方、カカオマスHEのエルシニア属、プロテウス属細菌に対する抗菌効果は顕著では無かった。従って、ココアの殺菌効果は菌種によりその強さが異なる事が示された。この原因は不明だが、菌種毎の表層構造の違いが関連しているかも知れない。カカオマスHEによりヘリコバクター・ピロリの凝集像と球状化が電顕的に明



らかにされている<sup>2)</sup>。グラム陰性菌である腸内細菌科細菌の表層にはリポ多糖体 (LPS) からなる外膜 outer membrane が存在している<sup>11)</sup>。カカオマス HE が外膜を傷害することにより、抗菌活性を引き起こすことが想定され、今後電顕的検討を加える予定である。

一方、カカオマス HE はグラム陽性菌であるディフィシル菌や MRSA に対しても抗菌活性を示した。グラム陽性菌は外膜 (LPS を含む) を持たず、40~50 層ものペプチドグリカンが表層を覆っている<sup>12)</sup>。従って、カカオマス HE は LPS のみならず、ペプチドグリカンにも傷害を与えていることが示唆される。

ある種の細菌は蛋白性の外毒素 (エキソトキシン) と呼ばれる毒素を産生する<sup>13)</sup>。カカオマス HE は O157 : H7 EHEC のペロ毒素 (VT) <sup>14)</sup> および MRSA の TSST-1、SET-C<sup>15)</sup> の産生を阻害した。とくに、1.75% カカオマス HE は O157 : H7 EHEC の増殖にほとんど影響を与えず、VT 産生を 1/2<sup>11)</sup> (VT2 の場合) にまで抑制したことはきわめて興味深い。ココアは常用飲用濃度 (3.5%) で殺菌効果を示し、低濃度では病原因子の発現を抑制するといった多面的効果を持つと言える。

## 終わりに

ココアの殺菌効果は多くの下痢原性細菌に対して認められた。今回、抗菌活性物質の同定はできなかったが、ココア特異的なフェノール性成分が殺菌的に作用することが考えられる。腸管には外来性の下痢原性細菌よりもはるかに多い約 200 種、100 兆個を超す細菌から成る腸内フローラが存在する<sup>16)</sup>。病原性細菌のみならず、今後、正常フローラにココアがどんな効果を及ぼすかについても検討を加えたい。

最後に、3.5% という常用飲用濃度でココアが種々の病原性細菌に殺菌的に働くことの驚異と重要性を繰り返し強調したい。

## 文 献

- 1) 神谷 茂：ココアのピロリ菌感染に及ぼす効果。食の科学 242 : 48-60 (1998)
- 2) 佐藤 進, 他：Helicobacter pylori の増殖および付着・胃内定着に及ぼすココアの効果。Prog Med 19 : 1207-1213 (1999)
- 3) 神谷 茂：消化管病原細菌に及ぼすココアの抑制効果。食の科学 252 : 38-44 (1999)
- 4) 高橋 俊雄, 他：カカオマスの腸管出血性大腸菌 O157 : H7 に対する抗菌効果の検討。感染症学雑誌 73 : 694-701 (1999)
- 5) Levine M : Escherichia coli that cause Diarrhea : Enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohaemorrhagic, and enteroadherent. J Infect Dis 155 : 377-389 (1987)
- 6) 神谷 茂：ヘリコバクター・ピロリとカンピロバクター・ジェジュニ。医学のあゆみ 185 : 289-293 (1998)
- 7) 結城 伸泰：Campylobacter jejuni 腸炎と Guillain-Barre 症候群。神経内科 43 : 195-204 (1995)
- 8) Larson HE, Price AB, Honour P, Borriello SP : Clostridium difficile as the aetiology of pseudomembranous. Lancet ii : 1063-1066 (1978)
- 9) 神谷 茂, 中村 信一：Clostridium difficile の病原因子と腸管感染症。ピフィズス 6 : 129-141 (1993)
- 10) 横田 健：MRSA 感染症。臨床検査 32 : 770-775 (1988)
- 11) 神谷 茂：感染の成立と生体防御。臨床検査 42 : 1188-1211 (1998)
- 12) 緒方 幸雄, 神谷 茂編著：チャート基礎医学シリーズ, 8, 微生物学。医学評論社, (1996)
- 13) 本田 武司：病気と細菌毒素。化学同人, (1988)
- 14) 坂崎 利一, 田村 和満：志賀毒素産生大腸菌感染症。日本臨床微生物学雑誌 6 : 89-98 (1996)
- 15) 五十嵐 英夫：ブドウ球菌感染症。竹田 義文, 本田 武司編「毒素産生菌とその感染症」医学ジャーナル p. 28-44 (1998)
- 16) 神谷 茂, 小澤 敦：腸内細菌叢とその意義。臨床検査 38 : 521-527 (1994)