Escherichia coli O157:H7 に対する ケフィールの抗菌作用

高橋 史生^{*1}・川上 英之^{*2}

(^{*1}山陽学園短期大学食物栄養学科, ^{*2}広島大学生物生産学部食品衛生学教室)

(受付 平成 11 年 11 月 1 日)

(受理 平成 12 年 2 月 7 日)

Antibacterial Action of Kefir against *Escherichia coli* O157:H7

Fumio TAKAHASHI^{*1} and Hideyuki KAWAKAMI^{*2}

(^{*1}Dept. of Food Science and Nutrition, Sanyo Gakuen College, 1-14-1 Hirai, Okayama 703-8501)

(^{*2}Dept. of Food Microbiology and Hygiene, Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University, 1-4-4 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima 739-0046)

Kefir, which is a fermented milk product that was recently introduced in Japan is becoming available for widespread consumption.

Because there is the effect of controlling the growth of food poisoning bacteria in acid milk, it is expected that the growth of *E. coli* O157:H7 in kefir can be similarly controlled. When *E. coli* ATCC or *E. coli* O157:H7 was cultivated in a pH-neutral condition, the growth of the bacterium was not influenced at all regardless of the presence of kefir. On the other hand, when *E. coli* ATCC or *E. coli* O157:H7 was cultivated in pH-acid condition, the growth of these was markedly inhibited. The growth of *E. coli* ATCC of 10^9 cfu/ml or *E. coli* O157:H7 of 10^7 cfu/ml to which kefir of pH 4 was added was especially completely inhibited in a short time.

These results suggested that an antibacterial substance to the growth of *E. coli* ATCC or *E. coli* O157:H7 was existed in kefir.

Key words: Kefir, *E. coli* O157:H7, pH

緒 言

食品に乳酸菌を利用する目的として、食品自体が保有している栄養効果を高める、風味を改善する、あるいは保存性を向上させるなどが挙げられる。また、乳酸菌を利用した発酵乳は整腸作用および生体の恒常性維持機能なども期待できる⁷⁾。

発酵乳の一種であるケフィール(kefir)はコーカサス地方を中心に普及した飲料であり、我が国においても「ヨーグルトきのこ」などとして各家庭で利用が普及している。この飲料は乳酸菌やアルコール発酵性酵母などが共生状態にある。また、乳酸発酵で得られた酸乳中には各種食中毒起因菌の生育を抑制する成分の存在が報告^{5,6,8)}されているのでケフィールにおいても上記と同様な作用が期待される。

1982年、アメリカでハンバーガーを原因食とした集

団食中毒が発生した。その時の起因菌が腸管出血性大腸菌 enterohemorrhagic *Escherichia coli* (以下、EHEC) として分離、確認された。我が国においても近年多発傾向にあり、特に1996年5月以降、学校給食などの集団施設を中心に発生した *E. coli* O157:H7 による集団食中毒は多数の死者が出たため大きな社会問題となり、同年、厚生省は *E. coli* O157:H7 を含む EHEC を指定伝染病とした。

本実験は、日常的に飲用可能な発酵乳の一種であるケフィールを使用して *E. coli* O157:H7 の発育に及ぼす影響を検討した。その結果、ケフィール(pH 4)が短時間でその菌の発育を完全に抑制する効果を有していることが判明したので報告する。

材料および方法

1) 使用菌株

標準菌株は *E. coli* ATCC 25922 を使用した。*E. coli* O157:H7 96068 および *E. coli* O157:H7 96156 は広

^{*1} ☎703-8501 岡山市平井 1-14-1

^{*2} ☎739-0046 東広島市鏡山 1-4-4

Fig. 1. Effect of kefir on the growth of *E. coli* ATCC 25922 and *E. coli* O157:H7 96156 at various pH.

1-a (pH 5.0), 1-c (pH 4.0): *E. coli* ATCC 25922

1-b (pH 5.0), 1-d (pH 4.0): *E. coli* O157:H7 96156

Symbols (□, △, ○): Inoculum size (10^9 , 10^7 , 10^5 cfu/ml).

pH 4.0 and pH 5.0 of each buffer solution (black) was adjusted with acetate buffer. pH of kefir supernatant (white) was adjusted with NaOH solution.

島市衛生研究所から分与された菌株を使用した。

2) 使用培地

生菌数測定には標準寒天培地（栄研化学）を使用した。菌の培養や保存はハートインフュージョンブイヨン培地（栄研化学）、大腸菌の分離はマッコンキー寒天培地（日水製薬）を使用した。

3) 菌体浮遊液の調製

あらかじめ各 *E. coli* を 10 ml のハートインフュージョン培地に接種して 24 時間培養後、90 ml の生理食塩水に加えて 10 倍段階希釈の原液を作製した。本実験で使用した各菌原液の菌数は *E. coli* ATCC 25922 が 6.15×10^9 個/ml, *E. coli* O157:H7 96156 が 7.00×10^9 個/ml である。

4) pH の調整

pH 6 と pH 7 の調整にはリン酸緩衝液、pH 4 と pH 5 の調整には酢酸緩衝液を使用した。各 *E. coli* の発育に及ぼす pH の影響は 10 ml の各 0.1 M 緩衝液に菌原液 1 ml を添加、混和（以下、対照系）して、一定時間培養した。各培養菌液の段階希釈液 0.1 ml をマッコンキー寒天培地に塗抹して 37℃ で 24 時間培養した後、コロ

ニー数を計測した。

5) ケフィールの調製

日本ナスコム社製のケフィール粒 100 g を 2,000 ml の市販牛乳に加え、30℃ で 20 時間培養後、遠心分離を行った。その上清液を NaOH 溶液で pH 7, 6, 5 および 4 に調製後、試験管に 10 ml ずつ分注した。この試験管に原液およびあらかじめ段階希釈した菌液 1 ml を添加して攪拌した後、37℃ で一定時間作用させた（以下、作用系）。コロニー数の計測は対照系と同様の方法で行った。

6) 実験回数

実験は菌原液（ 10^9 個/ml）を使用した場合 4 回、菌液を希釈した場合 6 回行った。測定値は生菌数のデータを常用対数に変換し、その値を平均値で表示した。ただし、pH 4.0 に調製したケフィールに作用させた実験回数は原液の場合 2 回、希釈した試料の場合 3 回行った。

結 果

ケフィールの pH を 7.0 や 6.0 に調整後、各大腸菌に一定時間作用させた。図には示さなかったが、各菌の発育に及ぼすケフィールによる強い抑制作用は、使用菌数

の多少にかかわらず、認められなかった。

pH 5.0 に調整したケフィールを *E. coli* ATCC 25922 および *E. coli* O157:H7 96156 に作用させると、培養時間とともにいずれの場合も、生残菌数に減少傾向が認められ、24 時間培養後はケフィールの有無にかかわらず生残菌数が認められなかった。また、使用菌数の少ない $10^5/\text{ml}$ では培養初期から減少した。対照系も作用系に類似した結果を示し、 $10^7/\text{ml}$ や $10^9/\text{ml}$ の菌数を使用した場合、ともに培養初期から生残菌数の減少を示した (図 1, a および b)。

一方、pH 4.0 に調整したケフィールを *E. coli* ATCC 25922 に作用させた場合、いずれの菌数を使用した場合も菌の生残が全く認められなかった (図 1, c)。対照系では、 $10^9/\text{ml}$ と $10^7/\text{ml}$ の菌数を使用した 1 時間培養後にのみ菌の生残が認められた。*E. coli* O157:H7 96156 に作用させた場合は、 $10^9/\text{ml}$ の菌数を使用して 1 時間培養した後にのみ菌の生残が認められた (図 1, d)。それ以外は、すべて完全な抑制作用を示した。対照系は、 $10^9/\text{ml}$ の菌数で 1 時間培養と 3 時間培養した後、および $10^7/\text{ml}$ の菌数で 1 時間培養した後に菌の生残を認めた。その他の培養時間では、菌の生残を全く認めなかった。なお、*E. coli* O157:H7 96068 についても実験を行ったが *E. coli* O157:H7 96156 の結果と類似した結果 (未発表) であった。

考 察

E. coli ATCC 25922 と *E. coli* O157:H7 96156 に各 pH でケフィールを作用させた後の生残菌数から各 *E. coli* の耐酸性について比較した結果、pH 7.0, 6.0 および 5.0 で双方間に大きな差は認められなかった。また、ケフィールを作用させていない各 *E. coli* において原因は不明であるが pH 6.0 で 10^7 の菌数を使用した培養結果、つまり *E. coli* ATCC 25922 の生残菌数が *E. coli* O157:H7 96156 のそれより高い値であることを除いた以外に大きな差異を認めなかった。pH 4.0 においてケフィール作用の有無にかかわらず $10^9/\text{ml}$ の菌数を使用した場合、*E. coli* ATCC 25922 が *E. coli* O157:H7 96156 よりも生残菌数が少く、耐酸性が弱い結果を示した。また、pH 4 で各 *E. coli* に対する残存菌数を比較すると、他の pH の残存菌数結果と異なり、作用系の菌数が対照系に比べて減少する結果を得た。以上の結果はケフィール (pH 4.0) 中に *E. coli* の生育を抑制する成分が存在していることを示唆している。その抑制成分については分析していないので推測の域を出ないが乳酸やクエン酸などの有機酸の影響が考えられる。

各 *E. coli* に pH 7, 6, 5 の条件で使用菌数が $10^7/\text{ml}$ や $10^9/\text{ml}$ の菌数を使用した場合、対照系が作用系に比べて生残菌数が減少する傾向を示した。これは、対数増殖

期の *E. coli* をマグネシウムのような二価陽イオン不在下の生理食塩水で処理すると RNA の崩壊¹⁾が生じやすいが、ケフィール作用系ではその中に含まれている二価陽イオンあるいはタンパク質成分などによる緩衝作用でその影響が緩和された結果であり、菌に必要な栄養素が存在しないからであると推察した。

E. coli O157:H7 は低い pH にも抵抗性があることが知られており、リンゴジュース (pH < 4.0) を原因とした食中毒も発生している⁴⁾。円谷ら²⁾は食酢 (酢酸) による静菌作用は 0.1% 以上の濃度が必要であり、しかもより完全な殺菌作用を期待するためには高濃度で長時間作用させる必要があることを述べている。

本実験で最も強く *E. coli* ATCC 25922 や *E. coli* O157:H7 の発育を抑制したケフィールの pH は 4.0 に調整したときであり、その作用は 1 時間以内に約 10^9 個 (cfu/ml) の *E. coli* ATCC 25922 や約 10^7 個 (cfu/ml) の *E. coli* O157:H7 の生育をほぼ完全に抑制した。*E. coli* O157:H7 は微量な生菌数の摂取で発症する場合もある³⁾。そのためこの菌に対する感染防止には完全な殺菌作用が必要である。通常、ケフィールを発酵させて飲用するときの pH は発酵乳とほぼ同様の 4.0 以下である。本実験結果はケフィールを十分発酵させて使用すればこれらの菌に対する感染防止効果が期待できることを示唆している。

謝 辞

ケフィールをご提供いただいた日本ナムコム株式会社 (広島市) に御礼申し上げます。

文 献

- 1) Ito, K., Nakamura K., Izaki K. and Takahashi H.: Degradation of RNA in *Escherichia coli* induced by sodium chloride, Agric. Biol. Chem., **41**, 257-263 (1977).
- 2) 円谷悦造, 浅井美都, 太田美智男: 調理食品での腸管出血性大腸菌 O157:H7 をはじめとする食中毒菌に対する食酢の抗菌作用. 栄養・食糧学会誌, **51**, 101-106 (1998).
- 3) 甲斐明美: 腸管出血性大腸菌 O157 食中毒とその発生要因. 日食微誌, **15**, 91-95 (1998).
- 4) 田中信正: 21 世紀に向けての食品安全性の課題と挑戦. 日食微誌, **15**, 65-70 (1998).
- 5) 全 炯日, 牧野壮一, 白幡敏一, 三上正幸: バクテリオン産生菌 *Pediococcus acidilactici* K1 による食品中での抗菌作用. 日食微誌, **15**, 113-117 (1998).
- 6) 早川邦彦: 乳酸菌を利用した食品の効果. 食品工業, **8**, 59-64 (1988).
- 7) 古川 徳, 岡 昭善, 山中良忠: マウスへのヨーグルトおよびケフィール投与が腫瘍の増殖に及ぼす影響. 日本栄養・食糧学会誌, **43**, 450-453 (1990).
- 8) 吉田 忠, 豊島琴恵: 発酵飲料ケフィールの乳酸菌と酵母. 日本栄養・食糧学会誌, **47**, 55-59 (1994).