Bifidobacterium の他細菌の増殖に対する抑制作用について

三 橋 重 之, 村 田 信 子

雪印乳業株式会社技術研究所

Inhibitory Activity of *Bifidobacterium* on the Growth of Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria

Shigeyuki MITSUHASHI and Nobuko MURATA

Technical Research Institute, Snow Brand Milk Products Co., Ltd., Kawagoe 350

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 44, 365~372 (1991)

Two hundred sixty-seven strains of *Bifidobacterium* were tested for an inhibitory effect on the growth of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacteroides fragilis* and *Clostridium perfringens*. Testing was by the disk diffusion method using skim milk culture supernatants of *Bifidobacterium* incubated at 37°C. Most supernatants with pH values of 4.0~4.5 had an inhibitory effect on *E. coli*, *P. aeruginosa* and *B. fragilis*, however, when the pH of the supernatants was adjusted to 5.4 with an alkaline solution, more than 10 strains of *Bifidobacterium* had an inhibitory effect on *B. fragilis* alone. This inhibitory effect persisted even after adding catalase to the supernatants.

Key Words *Bifidobacterium*, inhibitory effect, skim milk culture, disk diffusion test, pH.

(Received December 12, 1990)

乳酸菌には、古くから静菌作用が認められている¹⁾。それらは、乳酸菌の生産する乳酸の作用であるとされているとともに、また乳酸桿菌、球菌ともに抗菌性物質を生産することとして知られている。

すなわち、*Lactobacillus* 属では、Lactocidin²⁾, acidophilin³⁾, Acidolin⁴⁾などが古くから有名であり、*Streptococcus* 属では、Nisin⁵⁾, Diplococcin⁶⁾などが知られている。ことに Nisin はスイスチーズなどで、膨張抑制のために使用する研究が進められている⁶⁾。

最近では戸羽⁷⁾⁸⁾は *L. acidophilus* から抗菌性物質を分離し、それが Bacteriocin であることを確かめ、Acidophilucin と命名した。

しかし *Bifidobacterium* 属の生産する抗菌性物質についての報告は Anaud⁹⁾ らの *Bifidobacterium bifidum* の生産する Bifidin 1 件のみである。なお金子ら¹⁰⁾は *B. longum* に抗菌作用を観察しているが、その作用がどのような物質によるのかは確認していない。

以前から、母乳栄養児をはじめ成人の腸内フローラにおいても *Bifidobacterium* が優勢であるのは、*Bifidobacterium* が生産する乳酸、酢酸の作用によると説明さ

れている¹¹⁾¹²⁾。しかし腸内フローラ中のビフィズス菌と他の細菌との間の動きを観察すると、必ずしも酸の作用のみではないようでもある。*Lactobacillus*, *Streptococcus* と同様に抗菌性物質を生産することにより、自己の増殖を図っているとも考えられる。

われわれは、乳児より分離した菌株を含め、保有している *Bifidobacterium* 株を用いて、他細菌の増殖に対する抑制作用の本質を明らかにすべく実験を試みたので、ここに報告する。

実験方法

1. 供試菌株

技術研究所保存株中より *Bifidobacterium longum* 150 株, *B. infantis* 7 株, *B. bifidum* 10 株, *B. breve* 100 株を実験に供した。

2. 抑制作用の検討のために用いた対象菌株

Bacteroides fragilis SBT-3181 (M-57 Mitsuoka), *Clostridium perfringens* SBT-3239 (ATCC-13124), *Escherichia coli* SBT-3259 (ATCC-25992), *Pseudomonas aeruginosa* SBT-3267 (ATCC-27853), *Staphylococcus aureus* SBT-3266 (ATCC-25923) を用いた。なお SBT-3259, SBT-3267, SBT-3266 は、薬剤感受性標

準株もしくは抗生物質検定用標準株である。

これらの菌株の賦活増菌培養は、次のとおりに行った。

1) *B. fragilis* SBT-3181, *C. perfringens* SBT-3239 はシステイン添加ブリックスリバーブロス (115°C, 20 分殺菌) を用い、37°C で 16 時間培養を行った。

2) *E. coli* SBT-3259, *S. aureus* SBT-3266, *P. aeruginosa* SBT-3267 は普通ブイヨン (121°C, 15 分殺菌) を用い、37°C, 16 時間培養した。それぞれの培地はあらかじめ 10 ml ずつ小試験管に分注した。

3. 抑制作用の検計方法

1) *Bifidobacterium* 属の増菌方法 試験する *Bifidobacterium* の菌株を、あらかじめ 10 ml ずつ分注し 115°C, 20 分間殺菌した 0.5% 酵母エキス添加、10% 還元脱脂乳に接種し、37°C, 16 時間培養した。

2) 抑制作用の測定方法 予備試験(スクリーニング)は次のとおり行った。すなわち、スクリュエキャップつき小試験管に 9 ml ずつ分注し 115°C, 20 分間殺菌した、0.5% 酵母エキス添加 10% 還元脱脂乳に試験する菌株を接種し、37°C に 48 時間培養した。これを 3,500 rpm, 15 分間遠心分離し(弱い凝固を示すときは 4,000 rpm), 得られた上澄液を直径 8 mm の円形濾紙にしみ込ませた。この濾紙を、次に示すそれぞれの培地に、あらかじめ対象菌を接種し調製した平板上に置き、対象菌固有の方法により培養して、生じた対象菌の生育阻止円の大きさを計測し、その大きさにより阻止力を ー, 士, 十, 十~卅で表した。

培地および培養方法を次に示す(菌液の接種量は 1%, 菌液を接種した培地 8 ml を直径 9 cm のシャーレに流して固めて用いた)。また、記号の説明を付記した。

(1) 標準寒天培地(栄研)(好気性培養) *E. coli* SBT-3259 (37°C)。

(2) 普通寒天培地(栄研)(好気性培養) *S. aureus* SBT-3266, *P. aeruginosa* SBT-3267 (37°C)。

(3) GAM 寒天培地(日水)(嫌気培養) *B. fragilis* SBT-3181, *C. perfringens* SBT-3239 (37°C)。

(4) 阻止円の大きさの表記 ー=8 mm φ の濾紙の周囲に円の形成のないもの, 士=弱く認められる, 十=直径 9~10 mm, 十~=直径 12~14 mm, 卅=直径 15~18 mm, 卅~=直径 20~25 mm, なお() を付したものは阻止円の中に弱い菌の発育が見られたものである。

ついで pH を調整したときの抑制作用の検討を次のとおり行った。すなわち、37°C, 15 時間培養後の上澄液を pH 5.4 に調整して、pH による静菌作用の影響を除いた抑制効果を測定した。このときに脱脂乳濃度 (8, 10, 12%) と培養時間 (20, 29, 45 時間、一部の菌株は 15, 22.5, 65 時間) が抑制効果の発現に及ぼす影響の検討を同時に行った。測定は予備試験と同様に行った。

3) H_2O_2 の確認試験 pH 調整後に阻止円を形成した検体について、阻止円を示す原因物質が H_2O_2 であるかどうかを確認するための試験を行った。すなわち、2) で培養した後の上澄液の 5 ml に、カタラーゼ (Biozyme laboratories 製、由来: 牛肝臓、水に 10 mg/10 ml に溶解) を 0.2 ml 添加して阻止円の測定を行った。無添加の上澄液の示す阻止円を対照として、これと同等またはそれ以上の阻止円を示す上澄液には H_2O_2 は存在しないものとした。pH 調整した上澄液についても同様の試験をした。

4) 有機酸の細菌増殖抑制作用の検討 脱脂乳に添加した有機酸が示す細菌の抑制作用についての検討を次のように行った。すなわち、115°C, 20 分間の滅菌を行った 0.5% 酵母エキス添加 10% 還元脱脂乳に有機酸溶液(酢酸と乳酸のモル比として 3:2 の混合液)を添加して、Table 4 に示す各段階の pH に調整し、それを 2) に示した抑制作用の検討方法に従って処理して、阻止円を計測した。なお、有機酸溶液の添加量は Table 4 に示した。

実験結果

Fig. 1~4 に、脱脂乳培地に培養したときの対象菌に対する抑制効果を阻止円の大きさで表したものを示す。いずれも pH 調整前の結果である。

B. longum は、*E. coli* に対して、阻止円を形成しない検体の pH は、4.5~5.1 に分布した。阻止円形成 十~卅 の検体は pH 4.0~4.5 に分布していた。*P. aeruginosa* と *B. fragilis*, *C. perfringens* に対しては、抑制力は pH 4.0~4.5 にあり、ともに 十~卅 (*C. perfringens* に対しては十) を示した。すなわちこれらの菌株に対しては、pH 4.5 以下で抑制を示した。*S. aureus* は、*B. longum* の抑制力に対して抵抗を示し、(十) と (卅) はあるものの十以上を示す菌株はなかった。

B. bifidum と *B. breve* も *B. longum* とほぼ同一の傾向を示した。*B. infantis* は *B. fragilis* および *C. perfringens* に対して抑制効果を示す菌株は少なく、この点が *B. longum* と相違した。なお(十)~(卅)は形成した阻止円の中に対象菌の生育が見られたものである。

次に *Bifidobacterium* を培養したのち pH を 5.4 に調整して、抑制作用を測定した結果を示す。

Table 1 に *B. fragilis* に抑制作用を示した *Bifidobacterium* の菌株の分布を示す。*B. longum* はテストした 16 株中 6 株が抑制作用を示した。*B. bifidum* は 10 株中 0 株、*B. breve* は 20 株中 5 株であった。Table 2 には *B. longum* を種々の時間で培養し、その濾液が、pH 調整後に *E. coli* など 5 菌株の対象菌に対して示す

Fig. 1. Inhibition of bacterial strains by *B. longum*. Fig. 2. Inhibition of bacterial strains by *B. bifidum*.

Fig. 3. Inhibition of bacterial strains by *B. breve*. Fig. 4. Inhibition of bacterial strains by *B. infantis* subsp. *liverorum*.

Table 1. Spectrum of inhibitory effect among bifidobacteria against the growth of *B. fragilis*.

Species of <i>Bifidobacterium</i>	No. of strains applied	Inhibition strength	Incubation time			
			15 h		48 h	
			A	B	A	B
<i>B. longum</i>	16	++	0*	0*	0*	0*
		+	10	6	12	2
		±	4	7	2	0
		—	2	3	0	14
<i>B. bifidum</i>	10	++	0	0	1	0
		+	0	0	9	0
		±	2	2	0	0
		—	8	8	0	10
<i>B. breve</i>	20	++	0	0	4	0
		+	5	5	16	0
		±	7	6	0	0
		—	8	9	0	0

A : pH of supernatants was not adjusted. B : pH of supernatants was adjusted to 5.4±0.1.

* : Number of strains.

抑制作用を表示し、Table 3 にはその1菌株について、無脂乳固形分濃度によって抑制作用の強さに差があるかどうかについて検討した結果を示した。

Table 2 に示したとおり、pH 調整後に、*B. fragilis* に抑制作用を示した菌株は、いずれも *E. coli* など他の菌に対しては抑制効果を示さなかった。またこの性質は29時間以下の培養時間で観察され、45時間以上では抑制効果は見いだされなかった。また無脂乳固形分濃度にも依存しており、Table 3 に示したように8%濃度では弱く、12%と濃くなるほど、抑制作用は強かった。

なおカタラーゼ添加によって、これらの菌株の示す阻止円の大きさに変化はなかったので、この抑制作用は過酸化水素によるものではないと判断できる。

Table 4 に示したように有機酸そのものによる細菌の生育抑制作用は、*E. coli* で pH 4.23 以下、*B. fragilis* では pH 4.05 以下で観察された。なお *P. aeruginosa* では、阻止円中に弱い菌の生育が見られる型であるが、pH 4.50 以下で抑制が見られた。

考 察

乳酸および酢酸はそれ自体静菌作用を有し食品の保存に用いられている¹¹⁾。またこれらは母乳栄養児の腸内フローラ中で *Bifidobacterium* が最優勢となり、他の菌が減少することの原因とされている¹²⁾¹³⁾。今回の実験において、pH 調整前の *Bifidobacterium* の抑制作用はこの

ことを裏付けているように考えられる。すなわち、pH 4.5 以下において *E. coli* などの生育を抑制し、有機酸の作用にはほぼ一致していた。

pH 5.4 に調整したときにほとんどの菌株は抑制効果を示さなかった。しかし一部の菌株は pH 5.4 でも *B. fragilis* に抑制作用を示し、カタラーゼによってもその力を失わなかったことは、一つの新知見であると考えられる。

Nisin はそれを分泌する細菌株の生育の初期から生成される¹⁴⁾という。今回の SBT-2906 などの菌株から分泌される物質も 37°C、20~29 時間での生成が観察されている。この物質の分泌は、生育期間、もしくは菌の発育状況（培地の pH）に依存しているように観察されること、またなぜ *B. fragilis* にのみ抑制作用を示すのかなどを含めて、これらの点については今後に検討を行いたい。

今回一部の細菌にはあるが、*Bacteroides* の生育に抑制的に作用する物質の存在が確認されたことは、この *Bifidobacterium* と *Bacteroidaceae* の間の、拮抗的な生育現象を説明するのに役立つものであると考える。この物質の生成は培養15時間ないし29時間の増殖期に見られ、48時間後のような、生育後期には分泌されない。このようなことから、本物質は *Bifidobacterium* が自身の増殖を有利にするために分泌していると考えられる。すなわち *Bifidobacterium* は酢酸、乳酸などの有機酸を分泌して、腸内環境を整えたとともに、現在観察されるのは一

Table 2. Effect of incubation time on the inhibitory effect of skim milk culture supernatants of *B. longum*.

Strains	Incubation time (h)	pH		Test strains									
		A	B	<i>Escherichia coli</i>		<i>Clostridium perfringens</i>		<i>Bacteroides fragilis</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
				A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0212 A	20	4.15	5.41	+	—	+	—	+	+	(++)	—	—	—
	29	4.03	5.42	++	—	+	—	+	—	(++)	—	—	—
	45	3.92	5.42	+++	—	(+)	—	+	—	+	—	(++)	—
0213 A	20	4.21	5.42	+	—	±	—	+	+	(++)	—	—	—
	29	4.07	5.41	+	—	+	—	+	+	(++)	—	—	—
	45	3.99	5.43	++	—	(+)	—	+	—	(++)	—	(++)	—
0214	20	4.15	5.46	+	—	±	—	+	+	(++)	—	—	—
	29	4.02	5.39	++	—	+	—	+	±	(++)	—	—	—
	45	3.88	5.40	+++	—	(+)	—	+	—	(++)	—	(++)	—
2906	20	4.60	5.43	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—
	29	4.48	5.43	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—
	45	4.23	5.41	+	—	—	—	+	—	(++)	—	—	—
2920	20	5.18	5.46	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—
	29	4.58	5.42	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—
	45	4.22	5.42	+	—	—	—	+	—	(++)	—	(++)	—
2940	20	4.58	5.46	—	—	—	—	+	++	—	—	—	—
	29	4.19	5.42	+	—	—	—	+	++	(++)	—	—	—
	45	3.99	5.44	++	—	+	—	+	—	(++)	—	—	—

A : pH of supernatants was not adjusted. B : pH of supernatants was adjusted to 5.4 ± 0.1 .

部の菌株ではあるが、*Bacteroides* の生育を抑える物質を分泌し、さらに自身の増殖を有利にしているものと考ええる。現在までの実験においては、これらの菌株の示す抑制作用は *Bacteroides* のみに観察され、他の、特に好気性のグラム陰性の細菌の *E. coli* などに対しての抑制作用については観察されない。今後この存在すると推測される物質の単離が必要であると考ええる。またこの物質の生成機構についても検討を行いたい。

この推定される物質は、有機酸が細菌の生育抑制作用を示す pH の範囲よりは高いところにあり、またカタラーゼによって失活しないことから、酸もしくは過酸化水素ではないものと考えられる。

要 約

Bifidobacterium 培養物の抗菌作用について、検討するために、*Bifidobacterium* 属 267 株の脱脂乳培養物の上澄液の、*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Staphylococcus aureus, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens* などに対する生育抑制作用を検討した。

上澄液の pH 調整前 (4.0~4.5) においてほとんどの菌株は、*E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. fragilis* に対して抑制作用を示した。pH 5.4 に調整すると一部の菌株が *B. fragilis* に対してのみ抑制作用を示した。

この pH 5.4 で抑制作用を示した菌株の上澄液は、カタラーゼ処理によっても効力を失わなかったことから、有効物質は有機酸もしくは過酸化水素以外の物質であると推測される。

本論文について、日本獣医畜産大学教授岡知博士にご校閲を賜ったことを記し深謝申し上げます。また研究に用いた菌株の分離と同定には大江道夫氏、望月英輔氏らの協力を得たこと、抑制作用の検討には海津浩美氏の協力を得たことを付記し感謝いたします。

Table 3. Effect of the SNF concentration and incubation time of skim milk culture on the inhibitory effect of *B. longum*.

Strains	Incubation time (h)	% of SNF in the medium	pH		Test strains									
			A	B	<i>Escherichia coli</i>		<i>Clostridium perfringens</i>		<i>Bacteroides fragilis</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
					A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
2906	20	8	4.90	5.45	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
	29	8	4.92	5.40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	45	8	4.40	5.51	—	—	—	—	±	—	(++)	—	—	—
2906	20	10	4.60	5.43	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—
	29	10	4.48	5.43	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—
	45	10	4.23	5.41	+	—	—	—	+	—	(++)	—	—	—
2906	15	12	5.02	5.47	±	—	—	—	++	++	—	—	—	—
	22.5	12	4.25	5.49	++	—	+	—	++	++	(##)	—	(++)	—
	63	12	3.95	5.39	##	±	+	—	+	—	+	—	(++)	—

A : pH of supernatants was not adjusted. B : pH of supernatants was adjusted to 5.4 ± 0.1 .

SNF : Solid non fat.

Table 4. Inhibitory effect of organic acid solution* added to reconstituted skim milk** against the growth of test strains.

Volume of organic acid solution (ml)***	pH		Test strains									
	A	B	<i>Escherichia coli</i>		<i>Clostridium perfringens</i>		<i>Bacteroides fragilis</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
			A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1.0	3.61	5.46	##	—	++	—	+	—	+	—	+	—
0.5	4.05	5.43	##	—	—	—	+	—	(++)	—	(##)	—
0.4	4.23	5.45	++	—	—	—	—	—	—	—	(++)	—
0.3	4.49	5.42	±	—	—	—	—	—	—	—	(+)	—
0.25	4.59	5.48	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.2	4.82	5.43	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.15	4.88	5.43	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.1	5.19	5.48	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.075	5.35	5.47	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.05	5.54	5.45	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.01	5.85	5.52	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

A : pH after adding organic acid solution to reconstituted skim milk. B : pH of supernatants was adjusted to 5.4 ± 0.1 .

* Molar ratio of acetic acid and lactic acid was 3 : 2. ** 10% of skim milk powder and 0.5% of yeast extract. *** Each volume of organic acid solution (ml) was added to 40 ml of reconstituted skim milk. A hundred ml of organic acid solution contained 18.0 g of acetic acid and 18.02 g of lactic acid.

文 献

- 1) 光岡知足：腸内細菌の話，(1978)，岩波書店（東京）
- 2) Vincent, J.G., Veomett, R.C. and Rily, R.F. : *J. Bacteriol.*, 78, 477 (1959)
- 3) Vakil, J.R. and Snahani, K.W. : *Bacteriol. Proc.*, 9 (1965)
- 4) Matick, A.T.R., Hirsch, A. : *Nature*, 154, 551 (1944)
- 5) Oxford, A.E. : *Biochem. J.*, 38, 178 (1944)
- 6) Hamdan, I.Y., Mikolajcik, E.M. : *J. Antibiot.*, 27, 631 (1974)
- 7) 戸羽隆宏，吉岡恵美子，伊藤敏敏：農化，64（講演要旨集），454（1990）
- 8) 戸羽隆宏，吉岡恵美子，伊藤敏敏：第 83 回日本畜産学会大会講演要旨，85（1990）
- 9) Anaud, S.K., Srinivasan, R.A. and Lao, L.K. : *Cult. Dairy Prod. J.*, November, 6 (1984)
- 10) 金子 勉，森 浩晴，鈴木英毅，重松幹二，加東正猛：月間フードケミカル，5(10)，98 (1989)
- 11) 光岡知足：ピフィズス，1，13 (1987)
- 12) 光岡知足：臨床と細菌，2，199 (1975)
- 13) 光岡知足：腸内菌の世界，5-339 (1980)，叢文社（東京）
- 14) Hurst, A. : *Adv. Appl. Microbiol.*, 27, 85 (1981)

(1990 年 12 月 12 日受理)