

原著論文

乳酸菌 *Lactococcus lactis* IO-1 が産生するバクテリオシン，ナisin Z の抗菌活性

田中 義人*，堀川 和美，中山 宏，塚谷 裕子，北森 成治

乳酸菌 *Lactococcus lactis* IO-1が産生するバクテリオシン，ナisin Z の腸管系病原微生物に対する抗菌活性を検討した．その結果，ナisin Z は液体培地及び寒天培地中において，グラム陰性菌には抗菌活性を示さなかったが，グラム陽性の黄色ブドウ球菌，*Staphylococcus aureus*，ボツリ双菌及びウェルシュ菌に対して25IU/mL - 800IU/mL で抗菌性を示すことが明らかになった．また，その抗菌性は EDTA や市販の抗菌剤と併用することにより，活性の増加及び補完効果がみられた．ナisin Z は乳酸菌が産生する抗菌性のペプチドで，人体に影響がなく，かつ，食品の味や風味に影響を与えないことから食品への利用が期待される．

〔キーワード：バクテリオシン，ナisin Z，乳酸菌，*Lactococcus lactis* IO-1，抗菌性，腸管系病原微生物〕

1 はじめに

食品衛生，特に食中毒及び腸管系伝染病に対する関心は，腸管出血性大腸菌 O157や乳製品の黄色ブドウ球菌汚染などの事例により非常に高くなっている．食品の衛生管理には，生産，加工，流通，貯蔵それぞれの段階での適正な食品管理が重要である．すなわち，生産，加工時の細菌汚染の防止と，流通，貯蔵時の細菌増殖の防止対策が要求されることとなる．しかし，徹底した高温殺菌などは食品の持つ本来の味，風味を損なおそれがある．また，過剰の防腐剤や殺菌剤の使用は人体への影響が懸念される．

近年，人体にとって有用でかつ食品の有害微生物汚染を防止できる乳酸菌の利用が検討されている．乳酸菌は古くから乳製品をはじめとする発酵食品に広く利用されてきた．我が国にも醸造食品の清酒や味噌などをはじめとして，乳酸菌を利用した独特な伝統的食品が受け継がれている．これら食品には，ぬか床の様な長期間安定した発酵能（菌叢）を維持している食品もみられ，その機構解明に対する検討が近年盛んに行われている．

ある種の乳酸菌が抗菌性を持つバクテリオシンを産生する事は以前から知られており，その中の一つであるナisin A は欧米など50カ国以上ですでに食品添加物として認可使用されている．乳酸菌のバクテリオシンは一般的に類縁のグラム陽性菌に対して抗菌性を示す耐熱性のペプチドである．本研究で対象としたナisin Z はナisin A に類似のバクテリオシンで，34個のアミノ酸残基のうち，N 末端から27番目のアミノ酸

が一つ異なるだけとなっている（ナisin A；ヒスチジン，ナisin Z；アスパラギン，図1）．我が国でも石崎らのグループによって分離された乳酸菌 *Lactococcus lactis* IO-1 がバクテリオシンの一種であるナisin Z を産生することが報告され¹⁾，その有効性及び実用化の検討がなされている．すでに，ナisin A とナisin Z は同様な抗菌性を示すことが報告されているが²⁾，食中毒或いは腸管系の感染性の細菌に対する抗菌活性はほとんど検討されておらず，ナisin A 及び Z の有効利用の為には有害な腸管系病原微生物に対して抗菌活性を調査する必要がある．

そこで，本研究では腸管系病原微生物に対するナisin Z の有効性について検討した．まず，食品には液状と固形が存在することから，形態別の黄色ブドウ球菌やボツリ双菌等に対する抗菌活性を，液体培地中及び寒天培地中にナisin A 及び Z を添加して検討した．また，食品の腐敗は様々な菌の繁殖が原因であることから，食品（豆腐）から分離された一般細菌に対する抗菌性についても検討した．さらに，食品中には様々な成分や食品添加物が添加されている．よって，ナisin Z の抗菌活性に与える共存物質の影響及び市販の抗菌剤との併用による抗菌活性についても若干検討した．

2 研究方法

2・1 液体培地による抗菌活性試験

液状の食品におけるナisinの抗菌性を評価するために液体培地中でのナisin Z 及びナisin A の腸管系病原細菌に対

福岡県保健環境研究所（〒818-0135 太宰府市大字向佐野39）

* 現：福岡県環境部環境政策課（〒812-8577 福岡市博多区東公園7-7）

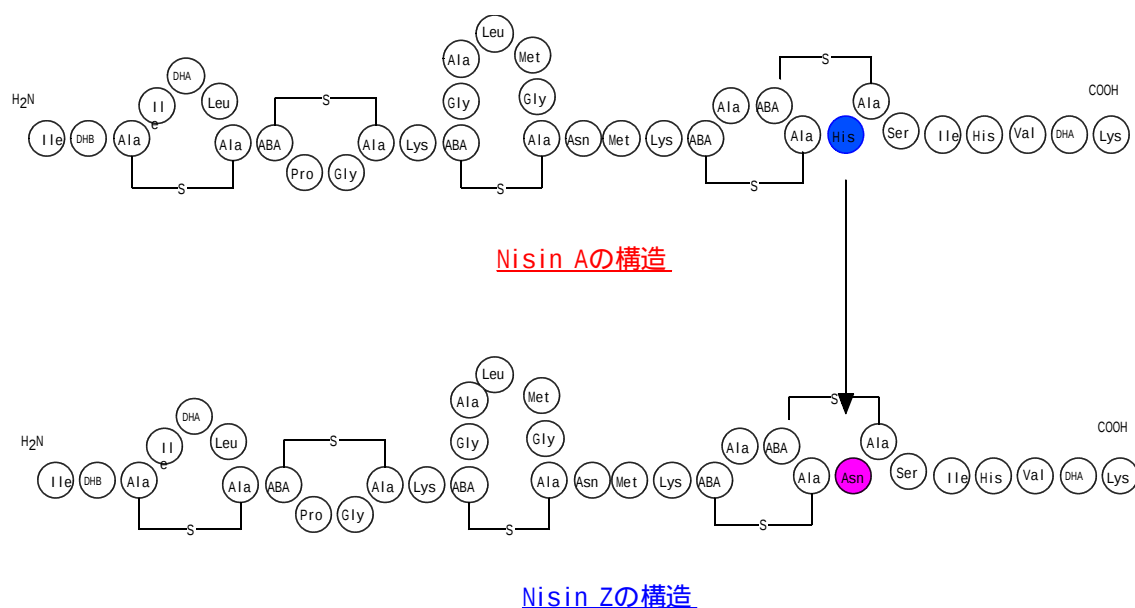


図 1 ナisin A 及びナisin Z の構造

する抗菌活性を検討した。グラム陰性菌株は大腸菌 (*Escherichia coli*) , サルモネラ菌 (*Salmonella Enteritidis*) , シネ赤痢菌 (*Shigella sonnei*) の 3 種類を用い、グラム陽性菌株は、セレウス菌 (*Bacillus cereus*) , 黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) , ホツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) 及びウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) の 4 種類を用いた。これら菌株は大腸菌 (*Escherichia coli* JM 109)を除き、保健環境研究所で実際の食中毒事例あるいは食品サンプルから分離した野生株を用いた。大腸菌については、今回、標準株以外に腸管出血性大腸菌 O157 (ベロ毒素産生能が異なる 2 株) , 及び病原血清型大腸菌 O26, O111, O146 の各 1 株もあわせて計 5 株について検討した。液体培地による抗菌活性試験はナisin 溶液と対象菌株を懸濁し、マイクロタイプレート法中で 24 時間から 48 時間培養後、対象菌の増殖を培養液の濁度で判定した。対象菌株の添加菌液は、寒天培地上で一夜培養したシグナルを 9 mL の各液体培地に懸濁したものを用いた。また、ナisin 溶液は pH3.0 塩酸水で最高濃度 500IU/mL から順次 2 倍希釈をし、抗菌作用のみられる最小濃度 (MIC, IU/mL) の測定を行った。

2・2 寒天培地による抗菌活性試験

固形食品におけるナisin の抗菌性を検討するために寒天培地によるナisin Z 及びナisin A の腸管系病原細菌に対する抗菌活性を検討した。用いた腸管系病原細菌はグラム陰性菌として大腸菌、腸炎ヒブリアリ (*Vibrio parahaemolyticus*) , カンピロバクター (*Campylobacter jejuni*) , ネグチチス菌 (*Salmonella typhimurium*) , グラム陽性菌として枯草菌 (*Bacillus subtilis*) , 黄色ブドウ球菌及び

白色ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) を用いた。本実験で用いた菌株はすべて American Type Culture Collection (ATCC) 或いは財団法人発酵研究所 (IFO) より標準菌株を購入し試験に用いた。寒天培地による抗菌活性試験は、対象菌株を液体培地で一夜培養し、その培養液 100μL を 2.0mL のソフトアガー (agar 0.7%, NaCl 0.8%) に懸濁後、各寒天培地上に重層して行った。その重層された寒天表面にナisin 溶液 10μL をスポットした。ナisin 溶液は最高濃度 1600IU/mL として順次 2 倍希釈液を調製し試験に用いた。判定は、スポット箇所周辺の増殖阻害を起こした透明帯の有無で行った。

2・3 食品から分離した一般細菌に対する抗菌活性

食品 (豆腐) から分離した任意の細菌について、ナisin Z の抗菌性の有無を検討した。任意の細菌は、2 週間室温で放置しておいた豆腐から一般生菌数試験に準じて分離した。36 , 48 時間培養後、標準寒天に生育した菌株を 24 菌株釣菌し、それぞれの菌を数回、標準寒天培地で塗抹を繰り返し培養し単独菌として、その菌をグラム染色及び抗菌試験に用いた。抗菌活性試験は液体培地による方法と同様に行った。

2・4 共存物質のナisin 抗菌活性に与える影響

食品中には種々の成分が含まれる。そこで、食品中に存在するナisin の抗菌性を補完或いは増強させる物質の探索を行った。試験した物質は、NaCl、乳酸、アスコルビン酸、リグニン、EDTA の 5 種類とした。対象としたグラム陰性菌は標準菌株の大腸菌とし、グラム陽性菌は黄色ブドウ球菌とした。まず、試験対象物質の各菌種に対する影響を検討した。その結果得られた各試験菌株の増殖を抑制しな

い最大濃度（最大無作用量）にナイシ Z 溶液を100IU/mL になるように添加した．培養方法は寒天培地を用いた抗菌活性試験の方法と同様に行い，判定も同様に行った．

2・5 ナイシと市販の抗菌剤の併用試験

ナイシ Z を市販されている抗菌剤5種と併用し，その抗菌活性について検討した．ここで，本実験では抗菌剤の特定は商品名を掲載することは，今後の共同研究者の開発に支障が考えられるので略号で表す．対象とした菌株は2・2の寒天培地の抗菌活性を検討した標準菌株を用いた．ナイシ Z 及び各抗菌剤の濃度は共同研究機関が実際の製品の味や風味に影響を与えないとした濃度を参考にし，ナイシ Z 25IU/mL，抗菌剤0.8%（一部0.2%）とした．抗菌活性は寒天培地による抗菌活性試験と同様に行った．

本実験で用いたナイシ A 標準品は SIGMA 製，ナイシ Z はオム乳業株式会社が発酵生産，精製したものを使用した．また，市販の抗菌剤は株式会社やまより提供された．また，本実験で用いた各種細菌の培養は微生物学必携第3版³⁾に従って培養した．使用した培地は日水，栄研化学など市販の培地を用いた．

3 結果

3・1 液体培地による抗菌活性試験

ナイシ Z と A の液体培地による抗菌活性試験の結果を表1に示す．その結果，ナイシ A は大腸菌や*サルモネラ*のようなグラム陰性菌に対しては抗菌性を示さなかった．しかし，*セラチア*菌に対して125IU/mL，*ブドウ球菌*に対して250IU/mL とグラム陽性菌に対しては抗菌性を示した．特に，*クロストリジウム*属の*ボツリ双菌*及び*ウェルシュ菌*に対して15.6IU/mL と高い抗菌活性を示した．同様に，ナイシ Z もグラム陰性菌の大腸菌及び*サルモネラ*菌には抗菌性を示さなかった．しかし，グラム陽性菌に対しては*セラチア*菌及び*ブドウ球菌*，250IU/mL，*ボツリ双菌*及び*ウェルシュ菌*に31.3IU/mL の抗菌活性を示した．この結果より，ナイシ A 及びナイシ Z は今回試験したグラム陰性菌には抗菌性は示さないが，グラム陽性菌に対しては比較的広く抗菌性を示すことが明らかになった．

3・2 寒天培地による抗菌活性試験

ナイシ A 及びナイシ Z の寒天培地による抗菌活性試験の結果を表2に示す．また，抗菌活性試験の結果，ナイシ A は*セラチア*菌に対して200IU/mL，*枯草菌*に対して400IU/mL，*リステリア*菌に対して400IU/mL，黄色*ブドウ球菌*及び白色*ブドウ球菌*に対してそれぞれ25IU/mL 及び400IU/mL の抗菌活性を示した．また，液体培地による抗菌活性試験と同様に*ウェルシュ菌*に対して高い抗菌活性を示した．しかし，グラム陰性菌である*サルモネラ*菌，大腸菌，*カンピロバクター*には抗菌性を示さなかった．一方，ナイシ Z に関しても同様な

傾向がみられた．すなわち，*ウェルシュ菌*に対して高い抗菌活性を示し，他のグラム陽性菌に対しても抗菌性を示した．しかし，グラム陰性菌に対しては抗菌性は認められなかった．

表1 液体培地中でのナイシの抗菌活性

菌 種	MIC (IU/mL)	
	ナイシ A	ナイシ Z
<i>E. coli</i> O157*)	>500	>500
<i>E. coli</i> O157**)	>500	>500
<i>E. coli</i> O26	>500	>500
<i>E. coli</i> O111	>500	>500
<i>E. coli</i> O146	>500	>500
<i>S. enteritidis</i>	>500	>500
<i>S. sonnei</i>	>500	>500
<i>B. cereus</i>	125	250
<i>S. aureus</i>	250	250
<i>C. botulinum</i>	15.6	31.3
<i>C. perfringens</i>	15.6	31.3

*)*VT1+VT2* 産生株，

**) *VT1* 産生株

表2 寒天培地上でのナイシの抗菌活性

菌 株	菌株番号	MIC (IU/mL)	
		ナイシ A	ナイシ Z
<i>B. cereus</i>	IFO13494	200	800
<i>B. subtilis</i>	IFO3134	400	800
<i>E. coli</i> JM109	IFO3301	>1600	>1600
<i>S. aureus</i>	IFO12732	25	200
<i>S. epidermidis</i>	IFO12993	400	800
<i>V. parahaemolyticus</i>	IFO12711	1600	1600
<i>C. jejuni</i>	ATCC4344	>1600	>1600
<i>S. typhimurium</i>	ATCC1331	>1600	>1600
<i>E. coli</i> O157	ATCC4389	>1600	>1600
<i>C. perfringens</i>	ATCC3624	25	25
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC1531	400	800

腸炎*ビブリア*に関しては，ナイシ A 及びナイシ Z とともに最高濃度1600IU/mL で判定が困難で，寒天培地表面に明瞭な透明体は形成されなかったが，対照群と比較して若干の生育阻害が観察された．よって，MIC を1600IU/mL とした．今回検討した抗菌活性試験から，寒天培地上においてもナイシ A 及びナイシ Z は抗菌性を示すことが明らかになった．

3・3 食品（豆腐）から分離した一般細菌に対する抗菌活性

2週間放置した食品（豆腐）から豆腐本体とパック水部に分けて一般生菌数試験を行った。一般生菌数試験法によって得られた多数の菌の内、菌形態が異なると思われた一般細菌24菌株を標準寒天培地に植え継いで分離した。このとき、これら任意の菌株について前述の液体培地を用いた抗菌活性試験を行った。培養可能であった20菌株に対するナisin Zの抗菌活性の結果とグラム染色の結果を表3に示す。抗菌活性試験の結果、今回分離されたグラム陽性菌株14菌株中6菌株に対して抗菌性を示した。また、その抗菌性は高い活性を示した（MIC15.6 - 125IU/mL）。一方、グラム陰性菌株に対しては、5菌株中、抗菌性を示すものはなかった。

表3 豆腐に存在した一般細菌に対するナisin Zの抗菌活性

菌番号	分離源	MIC(IU/mL)	グラム染色
1	パック水	31.3	陽性
2	パック水	>500	陽性
3	パック水	>500	陽性
4	パック水	62.5	陽性
5	パック水	>500	陽性
6	パック水	15.6	陽性
7	パック水	>500	陽性
8	パック水	>500	陰性
9	豆腐	>500	陽性
10	豆腐	31.3	陽性
11	豆腐	>500	陽性
12	豆腐	>500	陰性
13	パック水	>500	陰性
14	パック水	>500	陽性
15	パック水	62.5	陽性
16	パック水	>500	陰性
17	豆腐	125	陽性
18	豆腐	>500	陰性
19	豆腐	>500	陽性
20	豆腐	125	判別不可

3・4 ナisin Zの抗菌活性に与える共存物質の影響

対象とした共存物質の単体での細菌増殖抑制濃度とナisin Z共存下での抗菌活性試験の結果を表4および表5にそれぞれ示す。その結果、大腸菌およびブドウ球菌いずれに対してもEDTAと共存する場合、抗菌活性が上昇した。

3・5 ナisin Zと市販の抗菌剤の併用試験

ナisin Zを実際の食品あるいは食品製造に利用する場合、その抗菌性を補完あるいは強化するためには他の成分との併用が必要である場合もある。そこで、5種類の市販抗菌剤との併用試験を行い、その結果を表6に示す。

その結果、抗菌剤Dのようにナisin Zのみでは抗菌性を示さなかったグラム陰性菌にも抗菌性をもつ組み合わせが示唆された。また、グラム陽性菌に対しては比較的多くの抗菌剤と共に使用しても抗菌性を示した。ただし、ナisin Zの濃度25IU/mLはウェルシュ菌に対しては、単独で抗菌性を示す濃度である。しかし、抗菌剤A及びDでは抗菌性がみられなくなった。

4 考察

食品流通及び加工技術が発達した今日でも、多くの食中毒事件が発生している。1999年の細菌による食中毒事件は、2356件（患者数27741名、うち死者4名）となっており⁴⁾、食品の衛生管理技術の向上は重要な問題となっている。本研究では食品の微生物汚染に対するナisin Zの有効性について検討を行った。その結果、ナisin Zは液体状および固体状の食品中でも、グラム陽性の腸管系病原微生物に対し、有効であることが明らかになった。また、一般細菌にも広い抗菌性を示すことが明らかになった。さらに、対象となる食品あるいは食品製造過程において共存する成分や市販されている抗菌剤との併用を検討すれば、ナisin Zの有効性はさらに増すと考えられる。

今回、検討対象としたナisin ZはすでにEC各国で認可使用されているナisin Aとアミノ酸の数や異常アミノ酸の位置など基本的な構造は同一である。ナisin Zはナisin Aのアミノ酸残基の一つがヒスチジンからアラニンに置換しており、そのために中性付近での溶解性や安定性がさらに増している。このことは、ナisin Zの食品保存料としての利用範囲がナisin Aより有用であることを示唆している⁵⁾。ナisinは人体に入ると消化酵素により分解される。乳酸菌自体も古くから食品に利用されていることから従来の抗菌物質などに比べその安全性は高い。さらに、食品に加熱処理などを行わず混合することができるため、その食品の風味を損なわないなど多くの利点が知られている。

さらに、乳酸菌の利用には、乳酸菌の人体での役割や生理作用への有効性も検討されている⁶⁾⁷⁾。乳酸菌及び乳酸菌が産生するナisinの抗菌性は、菌本体の働きによるものと代謝産物によるものとが存在する。ナisinの食品への利用は後者に属するものと考えられるが、菌本来の特徴を利用できる食品の開発も期待される。

表 4 共存物質の単体での増殖抑制効果

菌 株	最少増殖抑制濃度 (%)					
	乳 酸	NaCl	グリシン	アスコルビン酸	イタノール	EDTA
<i>E. coli</i> JM109	0.094	>1.5	0.625	0.16	>2.5	0.04
<i>E. coli</i> O157	0.094	>1.5	0.625	0.16	>2.5	0.04
<i>S. aureus</i>	0.094	>1.5	>2.5	0.04	>2.5	0.04

表 5 各成分の最大無作用濃度とナイシン Z 100IU/mL による抗菌活性

菌 株	ナイシン Z 100IU/mL 共存での抗菌活性					
	乳 酸	NaCl	グリシン	アスコルビン酸	イタノール	EDTA
<i>E. coli</i> JM109	-	-	-	-	-	+
<i>E. coli</i> O157	-	-	-	-	-	+
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	+

- ; 抗菌性無, + ; 抗菌性有

表 6 ナイシン Z と市販抗菌剤との併用試験結果

菌 株	A	B	C	D	E
<i>B. cereus</i>	-	-	±	-	+
<i>B. subtilis</i>	±	-	±	+	-
<i>E. coli</i> JM109	-	-	-	±	-
<i>S. aureus</i>	+	-	-	+	-
<i>S. epidermidis</i>	±	-	-	+	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	-	-	-	-	-
<i>C. jejuni</i>	-	-	-	-	-
<i>S. typhimurium</i>	-	-	-	+	-
<i>E. coli</i> O157	-	-	-	±	-
<i>C. perfringens</i>	-	+	+	-	+
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-	-	-

*) ナイシン Z 濃度25IU/mL, 市販抗菌剤濃度0.8% (抗菌剤 A のみ0.2%)

+ ; 抗菌性有り, - ; 抗菌性無し,

± ; 対照群との比較から弱い抗菌効果が観られる

5 文献

- 1) 松崎 弘美, 園元 謙二, 石崎 文彬: 乳酸菌が生産する増殖阻害物質, バクテリア, 生物学, 75(2), 125-133, 1997
- 2) Klaenhammer T.R.: Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, FEMS Microbiol. Rev., 12, 39-86, 1993.
- 3) 微生物検査必携, 細菌・真菌検査第3版, (財)日本公衆衛生協会, 1987.
- 4) 厚生省食中毒関連情報: <http://www.mhw.go.jp/>
- 5) 園元 謙二, 木村 宏和, 松崎 弘美, 石崎 文彬: ぬか床から分離した乳酸球菌の新しいバクテリア, 生物工学会誌, 75(5), 363-366, 1997.
- 6) 有原圭三, プラマイティック乳酸菌の食肉製品への利用, 38(1), 47-56, 1997.
- 7) 有原圭三, 伊藤 良, 近藤 洋: 卵製品への乳酸菌の利用, 畜産の研究, 51(9), 1001-1006, 1997.

謝辞

本研究は財団法人福岡県産業・科学技術振興財団の産学官共同研究プロジェクトの一部として行われた。ここにプロジェクトリーダーである九州大学農学部, 石崎文彬教授並びに園元謙二助教授には, 研究面のご指導とご助言を賜り感謝申し上げます。また, 本研究に際し, ご協力を賜りました各共同研究機関の研究員の方にも深く感謝申し上げます。

The antibacterial activity of lantibiotic nisin Z produced by *Lactococcus lactis* IO-1

Yoshito TANAKA^{*)}, Kazumi HORIKAWA^{**)}, Hiroshi NAKAYAMA^{**)}, Hiroko TSUKATANI^{**)} and Shigeji KITAMORI^{**)}

^{*)}*Fukuoka Prefectural Office, Environmental Policies Division,
7-7 Higashikouen, Hakata ward, Fukuoka city, Fukuoka 812-8577, Japan*

^{**)}*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,
39 Mukaizano, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan*

In this report, we studied the antibacterial activity of nisin Z against food-poisoning bacteria. Nisin Z is produced by *Lactococcus lactis* IO-1, and is a 34 amino-acid-long peptide that has the ability to kill bacteria effectively by pore-formation in the plasma membrane. We found that nisin Z had high antibacterial activity against gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Sta. epirdemidis*, *Clostridium botulinum*, *Cl. perfringens*, *Bacillus cereus*) at 25IU/mL ~ 800IU/mL, while it had no effect on gram negative bacteria. Nisin Z is candidate for new antibiotics and food preservation.

[key words : Bacteriocin, Nisin Z, *Lactococcus lactis* IO-1, Antibacterial activity, Food poisoning]