

## *Streptococcus faecalis* が生成する過酸化水素 による黄色ブドウ球菌の増殖抑制

菊地 政則\*・星山 和弘\*  
中条 美彦\*・松井 幸夫\*

### Inhibition of *Staphylococcus aureus* by Hydrogen peroxide producing *Streptococcus faecalis*

Masanori KIKUCHI\*, Kazuchiro HOSHIYAMA\*, Mikihiko NAKAJO\*  
and Yukio MATSUI\*  
(May, 1982)

#### 緒 言

発酵食品のスターターとして古くから利用されている乳酸菌は一部の細菌の発育を抑制することが知られている。この菌はまた健康動物の腸内で一定の細菌叢を形成し、腸内の恒常性維持に重要な役割を果していることも解明されている。

この乳酸菌が外来病原菌等の増殖を抑制するメカニズムについては幾つか知られているが、この菌の生成する乳酸、酢酸などによる pH の低下が大きく関与していることを多くの研究者が認めている<sup>4),5),10),14),18)</sup>。特に酢酸は大腸菌, *Proteus* などの増殖に対す抑制効果が高く、ただ単に pH の低下のみでは説明できない点のあることが指摘されている<sup>17)</sup>。

一方、乳酸菌の生成する抗生物質としては、古くは *Streptococcus lactis* の nisin<sup>2),12)</sup> *S. cremoris* の diplococcin<sup>13)</sup> などが著名である。特に nisin は欧米諸国においてチーズ、ハムなどの clostridia 防止に利用されている。

ところで、乳酸菌の示めす抗菌性の理由を、過酸化水素に帰着させる報告も多い。Dahiya ら<sup>3)</sup> は *Lactobacillus lactis*, *L. bulgaricus* が生成する過酸化水素は *Staphylococcus aureus* の増殖を抑制するとしている。筆者ら<sup>11)</sup> も *L. sake* が多量に集積する過酸化水素が *S. aureus*, *Pseudomonas fluorescens* を抑制すると報告した。

また、Price ら<sup>16)</sup> は *L. plantarum* が生成する過酸化水素が *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Porteus* の増殖を抑制すると報告している。しかし、stroptococci が過酸化水素を生成す

\* 酪農学科, 酪農微生物学研究室

Laboratory of Dairy Microbiology, Department of Dairy Science, The College of Dairying, Ebetsu, Hokkaido 069-01, Japan.

るという報告は少なく、Gilliland ら<sup>6)</sup>による *S. latis* の例と、Haines ら<sup>8)</sup>の *S. lactis*, *S. cremoris* による *S. aureus* の増殖およびエンテロトキシン生成能を抑制するというものにはすぎない。

そこで筆者らは、*S. faecalis* による過酸化水素の生成能、更にそれが *S. aureus* の増殖にどのような影響をおよぼすかについて検討した。

### 実験材料および方法

#### 1. 供試菌

乳酸菌：本学酪農微生物学研究室で冷蔵保存乳より分離、*Streptococcus faecalis* と同定された D 2012 株（以下 *S. faecalis* と略）で、トマトジュース寒天（栄研）の高層培地に穿刺培養し保存したものである。

*Staphylococcus aureus*：209 P (IFO 13276 以下 *S. aureus* と略) 株で標準寒天培地で保存し供試した。

#### 2. 生菌数測定法

*S. faecalis* の生菌数測定は堀江ら<sup>9)</sup>の次の組成の AE 培地を用い、混釈平板法にて 37°C 36 時間培養し、発育集落数から菌数をもとめた。AE 培地の組成は、ポリペプトン（大五）10 g, 酵母エキス（大五）5 g, NaCl 5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g, エスクリン 1 g, NaN<sub>3</sub> 0.5 g, クエン酸鉄アンモニウム 0.5 g, 寒天 15 g, 純水 1,000 ml である。また *S. aureus* の生菌数はスタヒロコッカス 110 培地（栄研）を用い、37°C—48 時間培養後に測定した。なお *S. faecalis* と *S. aureus* の混合培養において前述選択培地を使用することによってそれぞれの菌数を分別計数が可能であることをあらかじめ確認した。

#### 3. 過酸化水素生成用液体培地および菌の相互作用の検討

酵母エキス 5.5 g, トリプトン 12.5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.25 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.25 g, 酢酸ナトリウム 1 g, 硫酸マグネシウム 0.1 g, 硫酸マンガン 5 mg, 硫酸第一鉄 5 mg, 純水 1,000 ml から成る液体培地（以下 YT 培地と略）10 ml に保存培地の菌を 1 白金耳接種し、*S. faecalis* は 32°C, *S. aureus* は 37°C で 24 時間培養を行ない、更にその YT 培地 0.5 ml を 10 ml の同一培地に接種する操作を 2 回繰返し接種液を調製した。

*S. faecalis* による過酸化水素の生成量測定は、500 ml 容の坂口フラスコに YT 培地を 250 ml 分注し、あらかじめ調製しておいた接種液を 0.5% の割合に接種、振盪培養機（ストローク 70 mm, 100 rpm）を用い、経時的に過酸化水素の集積量を測定した。

*S. faecalis* と *S. aureus* の混合培養における菌の相互作用は、YT 培地に前記と同様に前培養した菌液をそれぞれ一定量、単独および混合培養し、集積過酸化水素量と選択培地

による菌数測定を行ない菌の相互作用を検討した。

#### 4. 過酸化水素の定量

過酸化水素の定量は o-dianisidine 存在下で Peroxidase を用いる Gilliland<sup>7)</sup> の酵素法に準拠した。すなわち培養液 10 ml へ 1.0 ml の 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) を添加, それを 5 ml ずつに 2 分し, 一方には peroxidase 溶液 (SIGMA 製 1.75 u/ml) 1 ml と 0.1 ml の 1% o-dianisidine (SIGMA 製) を添加, 10 分間反応させたのち, 4 N HCl 0.2 ml を加え反応を停止, 10 分後に 400 nm における吸光度を測定した。また対照として peroxidase 溶液の代わりに純水 1 ml を加え同様に操作した。

#### 5. *S. faecalis* 培養液の抗菌活性の測定

*S. faecalis* を YT 培地で培養したのち菌体を遠心除去 (5,000 G-15 分間) し, その上清液を pH 7.0 に修正したのち, ザイツろ過器で無細胞抽出液を調製し, *S. aureus* の培養液に無菌的に添加し, *S. aureus* の増殖におよぼす影響を生菌数およびバイオフォトレコーダー (東洋科学 TN 112 D) で 660 nm における濁度を経時的に測定した。

### 結果および考察

#### 1. *S. faecalis* による過酸化水素の集積

*S. faecalis* をブドウ糖および乳糖添加の YT 培地に接種し, 20°C, 30°C で培養した時の過酸化水素の集積量を Table 1, 2 に示した。ブドウ糖添加 YT 培地では, 糖の濃度が 0.1~0.2% では比較的少量の過酸化水素を集積するが, 0.5% にするとほとんどその集積がみられなかった。また乳糖添加 YT 培地でもそれが 0.1~0.2% の低濃度の場合よく過酸化水素の集積が認められたが, 高濃度では集積は微量であった。しかし乳糖添加のものがブドウ糖添加のものに比べ過酸化水素の集積量が最高 17 µg/ml と高い傾向を示した。

**Table 1.** Hydrogen peroxide formation by *Streptococcus faecalis* in the presence of glucose

Incubation time (day)	Incubation at 20°C				Incubation at 30°C			
	Glucose con. (%)				Glucose con. (%)			
	0	0.1	0.2	0.5	0	0.1	0.2	0.5
	(µg H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /ml)				(µg H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /ml)			
1	0.50	0.93	0.66	0	4.12	5.98	2.66	0
2	3.20	2.79	4.65	0	1.33	5.71	6.78	0.10
3	4.00	8.24	1.99	0.12	0.55	6.25	7.98	0
4	4.65	7.32	0.53	0.10	0.30	6.25	5.32	0
5	0.45	1.86	0.40	0	0.25	4.30	4.38	0

**Table 2.** Hydrogen peroxide formation by *Streptococcus faecalis* in the presence of lactose

Incubation time (day)	Incubation at 20°C				Incubation at 30°C			
	Lactose con. (%)				Lactose con. (%)			
	0	0.1	0.2	0.5	0	0.1	0.2	0.5
	( $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{ml}$ )				( $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{ml}$ )			
1	0.53	3.00	0.40	0.40	4.12	11.80	12.90	0
2	3.19	4.12	5.58	0.35	1.33	11.40	16.60	0
3	3.99	10.30	11.97	0.80	0.50	9.97	17.00	0
4	4.78	8.24	11.00	3.30	0.30	8.00	17.10	0.20
5	0.10	0.15	8.24	0.40	0.25	0.60	13.10	0

このように過酸化水素の集積は加えた糖の量によって差異が認められたが、Dahiya ら<sup>3)</sup>は lactobacilli の過酸化水素の生成にブドウ糖 (0.25%) が有効であったと報告している。これらのことは *S. faecalis* の初期発育に微量の糖が有効に作用するためと考えられるが、0.5% と糖濃度が高い場合には乳酸菌の生成する乳酸により過酸化水素の集積が阻害されるものと考えられる。

緒言で述べたように乳酸桿菌の多くは一般に過酸化水素を集積することが知られているが、上述したように streptococci が過酸化水素を生成するという報告は少ない。Premi ら<sup>15)</sup>は、その理由として *S. lactis*, *S. diacetilactis* などの菌種には NADH oxidase や NADH peroxidase 活性があるために過酸化水素が集積しないとしている。

## 2. 混合培養時における *S. faecalis* による *S. aureus* の増殖抑制

*S. faecalis* と *S. aureus* を YT 培地にそれぞれ  $10^4/\text{ml}$  の同菌数を同時に接種し、双方の菌株の増殖パターンを選択培地を用いて測定した。また同時に過酸化水素の集積量をも測定した。その結果を Fig. 1 に示したが、*S. faecalis* と *S. aureus* の同菌数を同時に培養すると、8 時間までに両菌株ともに  $10^7/\text{ml}$  まで達し、その後の菌数は単独、混合培養ともに大差なく推移した。またこの時の過酸化水素の集積量も *S. faecalis* の単独培養の  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  に対し、混合培養では  $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  であり、このような条件下においては *S. faecalis* による *S. aureus* に対する増殖抑制効果はみとめられなかった。

Fig. 2 は初期菌数を *S. faecalis* を  $10^4/\text{ml}$ , *S. aureus* を  $10^2/\text{ml}$  になるように接種し、これらの増殖の推移をみたものであるが、*S. aureus* の接種菌数が、*S. faecalis* より 2 対数低い条件下では、*S. aureus* の増殖はほとんどみとめられず、24 時間後に死滅した。また 16 時間での過酸化水素の集積は単独培養のものと同量の  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  であった。更に初期菌数は両菌とも  $10^4/\text{ml}$  であるが、*S. aureus* の接種時間を 16 時間遅らせて接種したものでは、

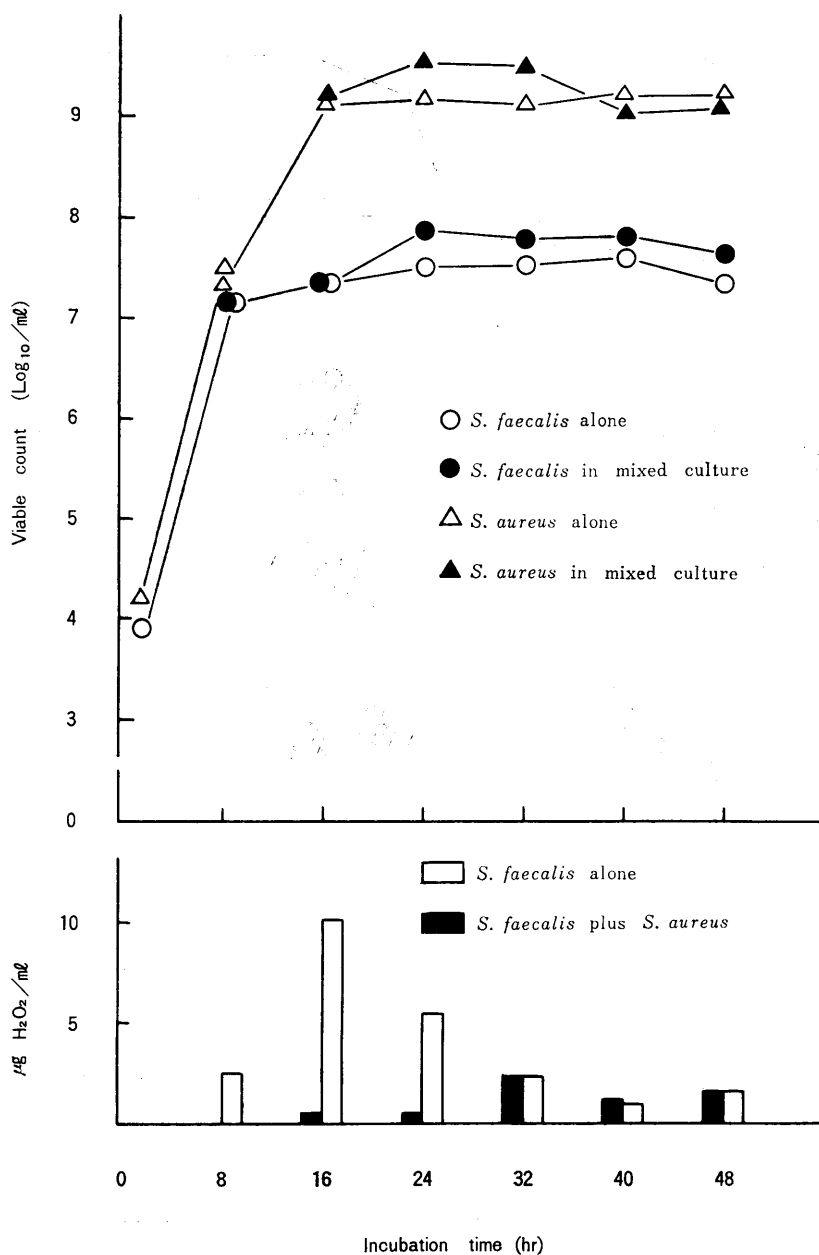


Fig. 1. The growth of *S. aureus* in pure culture and in association with *S. faecalis*.

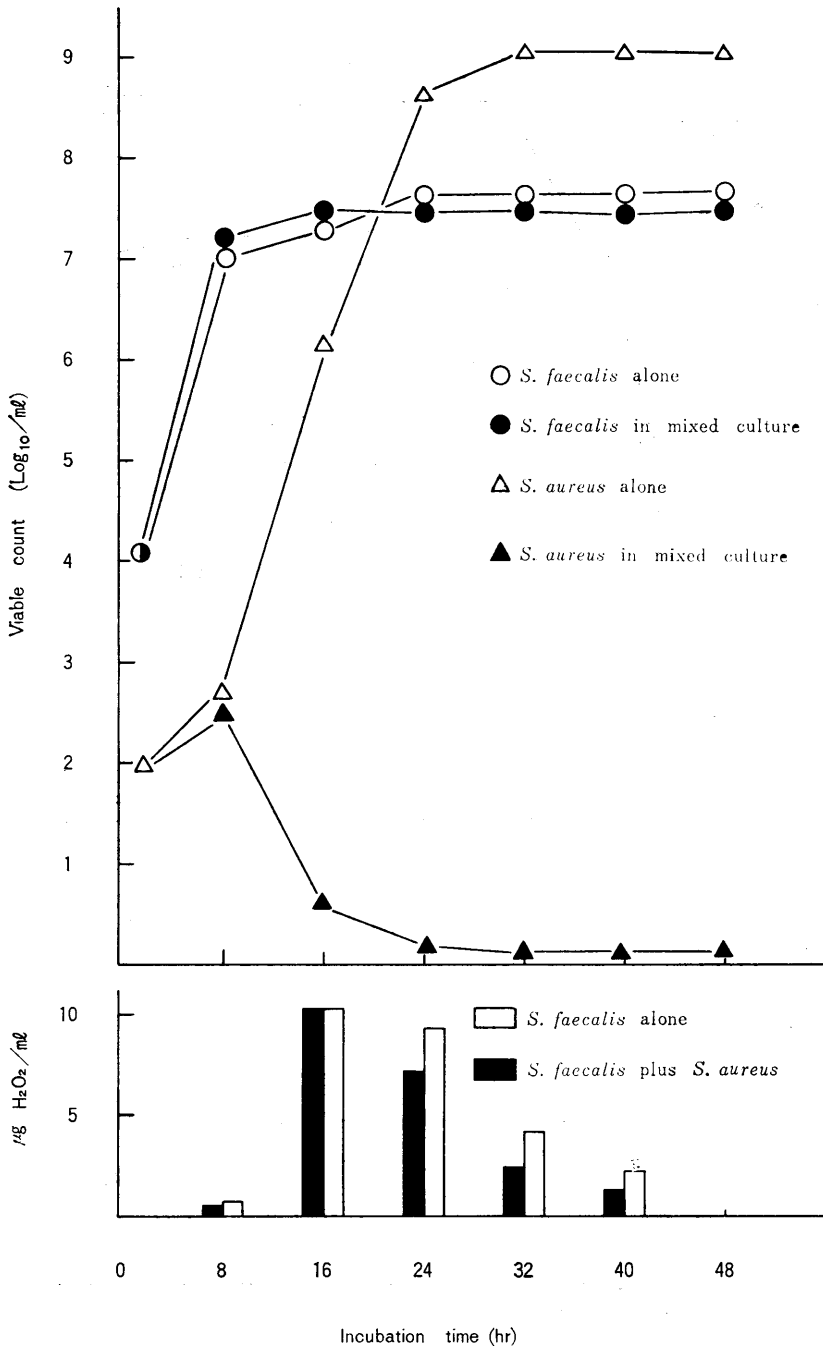


Fig. 2. The growth of *S. aureus* in pure culture and in association with *S. faecalis*.

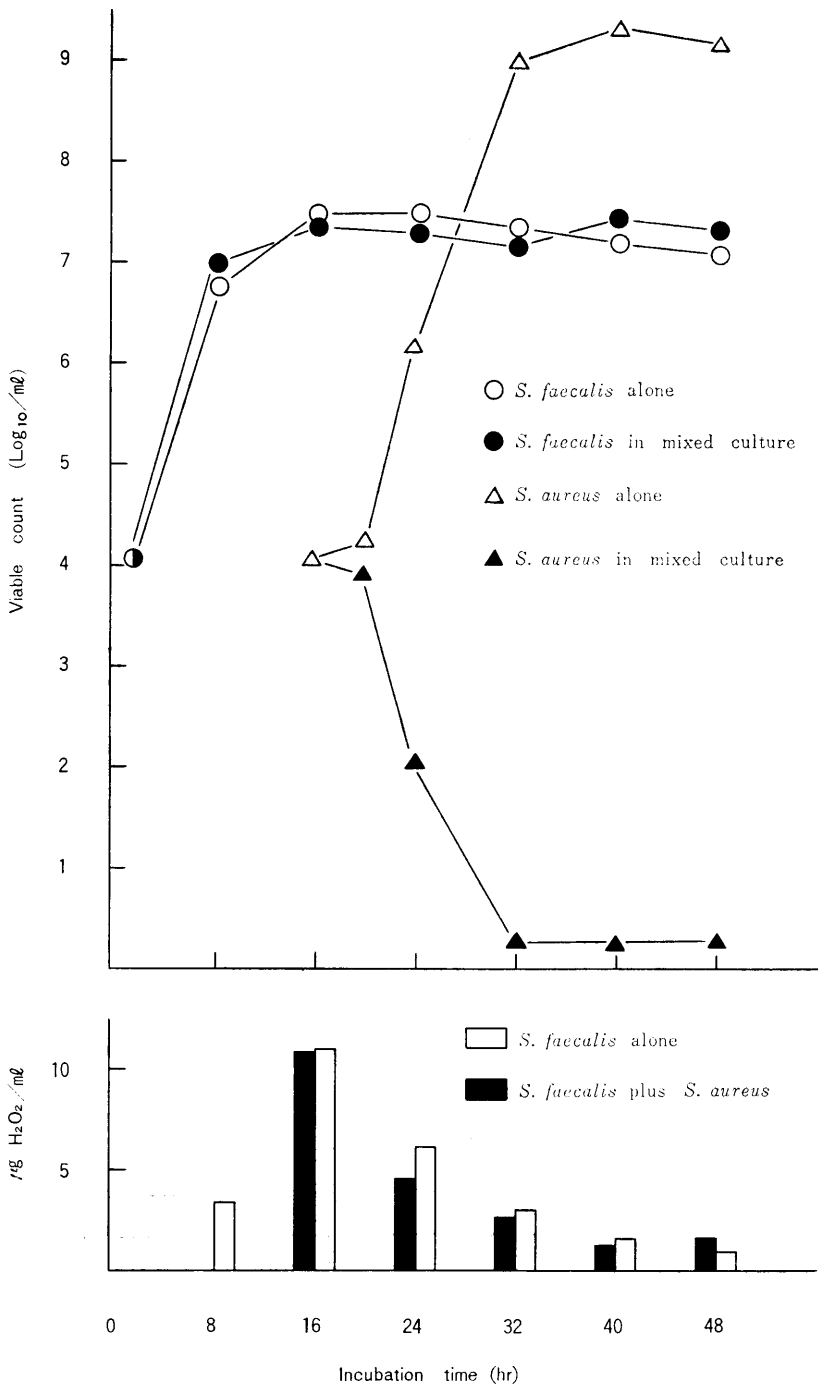


Fig. 3. The growth of *S. aureus* in pure culture and in association with *S. faecalis*.

Fig. 3 にしめしたように, *S. faecalis* との菌数がすでに  $10^3$  の差となり, 更に過酸化水素の集積が認められたことから, *S. aureus* の菌数は急激に減少し, 接種 16 時間後には完全に死滅するに至った。

これらのことから *S. faecalis* と *S. aureus* の同菌数を同時に接種した場合は, *S. aureus* が生成するカタラーゼの作用により, 乳酸菌の生成する過酸化水素を直ちに分解し, その

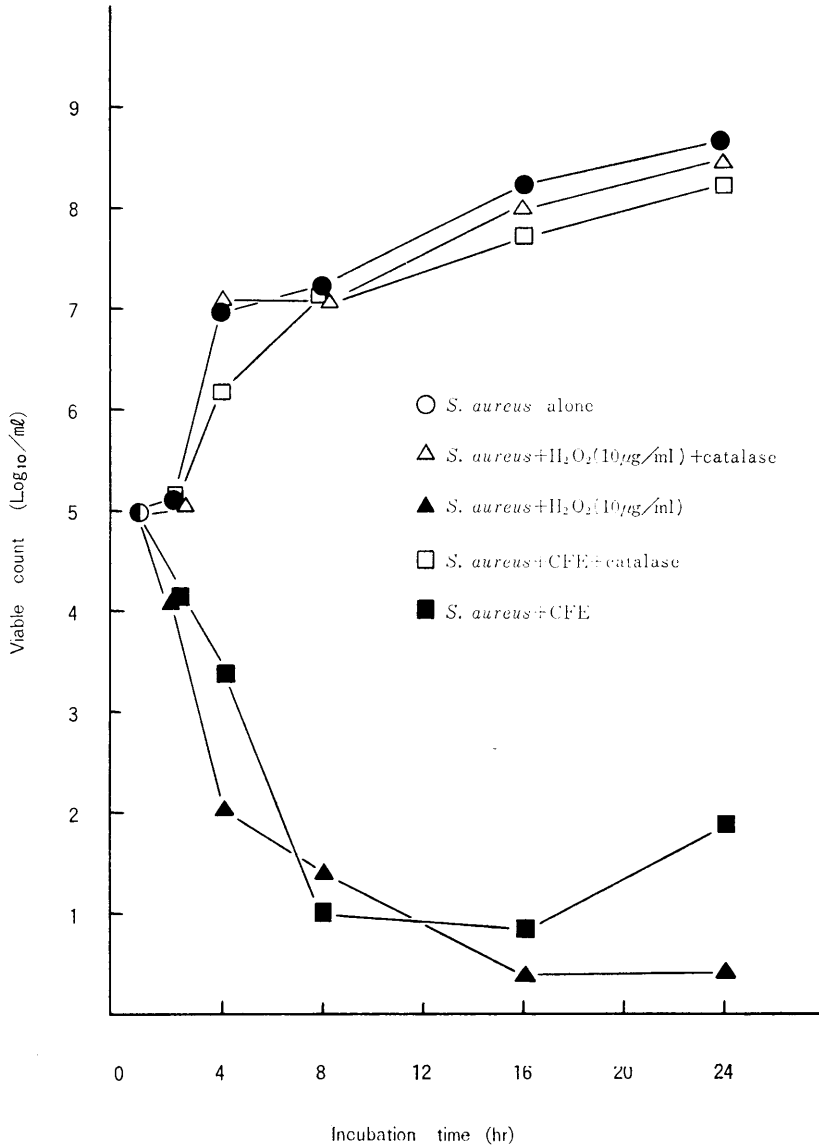


Fig. 4. Effect of cell free extract (CFE) of *S. faecalis* on growth of *S. aureus*.



抑制力を失わしめるものと考えられる。しかし Fig. 2 のように *S. aureus* の初期菌数を *S. faecalis* より少なくしたり, Fig. 3 のように接種時間を遅らせ, *S. faecalis* の菌数を高めた条件下においては, 過酸化水素の集積が認められ, *S. aureus* の増殖が抑制されるものと考えられる。

### 3. *S. faecalis* の培養ろ液 (CFE) が *S. aureus* に対する増殖抑制作用

*S. aureus* と *S. faecalis* を混合培養した場合, *S. faecalis* が *S. aureus* の増殖を抑制することが認められたが, Fig. 4 は *S. faecalis* の培養ろ液が *S. aureus* の増殖におよぼす影響について検討したものである。

*S. faecalis* の培養ろ液をカタラーゼ処理したもの, またそのろ液に集積されている量と同量の過酸化水素を添加してそれをカタラーゼ処理した場合, いずれも無添加の場合と大差なく, *S. aureus* は 16 時間で  $10^8$ /ml まで増殖した。しかし処理しなかったものでは直ちに菌数減少がおり, 8 時間で  $10^1$ /ml 以下となった。また Table 3 は *S. faecalis* の培養液を YT 培地に一定量添加し, *S. aureus* を  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ /ml となるように接種し振盪培養した時の誘導期間を示したものである。培養ろ液を添加しないものと, それを添加したのちカタラーゼで処理したものに対し, 培養ろ液を添加した場合は, いずれにおいても誘導期の顕著な延長が認められた。しかし培養ろ液を添加したものでも, 16~17 時間の誘導期の後に *S. aureus* が増殖を始めるのは, 振盪培養をしているため, 培養ろ液中の過酸化水素が自然分解を起し低濃度になった時点で菌の増殖が始まるためと考えられる。

これらのことから *S. faecalis* の培養ろ液が *S. aureus* の増殖に対し明らかに阻害作用を示すこと, カタラーゼ処理によってその阻害作用が失活することから, その阻害因子は

**Table 3.** Inhibition of *Staphylococcus aureus* by spent medium from a 48 hour culture of *Streptococcus faecalis*

Initial population	Supplements	Inhibitor-induced Lag (hr)
10 <sup>4</sup> /ml	Control (no additives)	7.0
	CFE*+Catalase	7.3
	CFE	23.5
10 <sup>5</sup> /ml	Control (no additives)	4.1
	CFE+Catalase	5.3
	CFE	21.0
10 <sup>6</sup> /ml	Control (no additives)	1.7
	CEF+Catalase	3.2
	CEF	19.0

\* CFE: Cell free extract of *S. faecalis*.

過酸化水素であることが確認された。一般に腐敗細菌の増殖が過酸化水素によって抑制されることはよく知られているが、Amin ら<sup>1)</sup>はその抑制の程度、感受性は菌のもつカタラーゼ活性の程度によって異なるとしている。また Yoshe-puver ら<sup>19)</sup>は *Escherichia* を用い、その菌の過酸化水素に対する感受性とカタラーゼ活性の関係を検討し、過酸化水素に対する *E. coli* の感受性とその増殖期に影響するとしている。これらのことから乳酸菌の生成する過酸化水素による増殖の抑制程度は菌の種類およびその菌の増殖期によって一様でないものと考えられる。しかし従来から lactobacilli の一部のものは過酸化水素を生成し、腐敗細菌を抑制するとされているが、今回の報告のように *S. faecalis* の生成する過酸化水素が *S. aureus* の増殖を抑制する因子となりうるということが明白となった。

### 要 約

レンサ球菌の1種 *Streptococcus faecalis* が生成する過酸化水素が *Staphylococcus aureus* の増殖にどのような影響をおよぼすかについて検討した。

*S. faecalis* の過酸化水素生成は、ブドウ糖および乳糖を 0.1~0.2% 含む培地を用いて振盪培養することで集積が助長された。*S. faecalis* と *S. aureus* を同菌数接種し培養した時には *S. aureus* の増殖率の低下はみられなかった。しかし *S. aureus* の菌数を *S. faecalis* より2対数下げて接種すると、*S. aureus* の増殖率は明らかに低下した。また同菌数を接種しても、接種時間を遅らせた場合にも *S. aureus* の発育に影響がみられた。

*S. faecalis* の培養ろ液を添加した培地では、*S. aureus* の増殖は抑制されるが、カタラーゼ処理した培地では無添加のものと同様に増殖した。これらのことから *S. faecalis* の生成する過酸化水素は、*S. aureus* の増殖を抑制する因子となりうるということが認められた。

### 文 献

- 1) Amin, V. M. and N. F. Olson, 1968. Influence of catalase activity on resistance of coagulase-positive staphylococci to hydrogen peroxide. *Appl. Microbiol.*, **16**: 267-270.
- 2) Berridge, N. J., 1949. Preparation of the antibiotic nisin. *Biochem. J.*, **45**: 486-493.
- 3) Dahiya, R. S. and M. L. Speck, 1968. Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.*, **51**: 1568-1572.
- 4) Frank, J. F. and E. H. Marth, 1977. Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* by homofermentative lactic acid bacteria in skim milk. 1. Comparison of strains of *Escherichia coli*. *J. Food Prot.*, **40**: 749-753.
- 5) Frank, J. F. and E. H. Marth, 1977. Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* by homofermentative lactic acid bacteria in skim milk. 2. Comparison of lactic acid bacteria and enumeration methods. *J. Food Prot.*, **40**: 754-759.
- 6) Gilliland, S. E. and M. L. Speck, 1969. Biological response of lactic streptococci and lactobacilli to catalase. *Appl. Microbiol.*, **17**: 797-800.

- 7) Gilliland, S. E. 1969. Enzymatic determination of residual hydrogen peroxide in milk. *J. Dairy Sci.*, **52**: 321-324.
- 8) Haines, W. C. and L. G. Harmon, 1973. Effect of selected lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin. *Appl. Microbiol.*, **25**: 436-441.
- 9) 堀江 進・佐藤史郎・森田 亨・井上広志・和泉 力・山形 誠, 1974. アザイド・エスクリン寒天平板培地による冷凍食品の腸球菌検査法. *食衛誌* **15**: 105-109.
- 10) Juffs, H. S. and F. J. Babel, 1975. Inhibition of psychrotrophic bacteria by lactic cultures in milk stored at low temperature. *J. Dairy Sci.*, **58**: 1612-1619.
- 11) 菊地政則・中条美彦・緒方俊之・松井幸夫, 1981. 乳酸桿菌が生成する過酸化水素と腐敗細菌の増殖におよぼす影響. 日本畜産学会, 第72回大会講演要旨, 180.
- 12) Mattick, A. T. R. and A. Hirsch, 1944. A powerful inhibitory substance produced by group N streptococci. *Nature*, **154**: 551-552.
- 13) Oxford, A. E. 1944. Diplococcin, anti-bacterial protein elaborated by certain milk streptococci. *Biochem. J.*, **38**: 178-182.
- 14) Pinheiro, A. J. R., B. J. Liska and C. E. Parmelee, 1968. Properties of substances inhibitory to *Pseudomonas fragi* produced by *Streptococcus citrovorus* and *Streptococcus diacetylactis*. *J. Dairy Sci.*, **51**: 183-187.
- 15) Premi, L. and V. Bottazzi, 1972. Hydrogen peroxide formation and hydrogen peroxide splitting activity in lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft* **27**: 762-765.
- 16) Price, R. J. and J. S. Lee, 1970. Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing lactobacilli. *J. Milk Food Technol.*, **33**: 13-18.
- 17) Sorrells, K. M. and M. L. Speck, 1970. Inhibition of *Salmonella gallinarum* by culture filtrates of *Leuconostoc citrovorum*. *J. Dairy Sci.*, **53**: 239-241.
- 18) Speck, M. L., 1972. Control of food-borne pathogens by stater cultures. *J. Dairy Sci.*, **55**: 1019-1022.
- 19) Yoshpe-purer, Y. and Y. Henis, 1976. Factors affecting catalase level and sensitivity to hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**: 465-469.

### Summary

The effects of hydrogen peroxide, generated by *Streptococcus faecalis* which is one of the lactic streptococci, on the growth of *Staphylococcus aureus* were examined. Accumulation of the hydrogen peroxide generated by *S. faecalis* was accelerated in the culture with 0.1-0.2% glucose and lactose by agitating the culture.

When the same number of *S. faecalis* as that of *S. aureus* were introduced into the culture, no inhibition of *S. aureus* by *S. faecalis* was observed.

When the number of *S. aureus* was reduced to 1/100 of the number of *S. faecalis*, however, certain inhibitions were clearly observed.

When *S. faecalis* and *S. aureus* were mixed in the same quantity with a time lag, inhibitions of *S. aureus* by *S. faecalis* were also observed.

In the culture with cell-free extracts of *S. faecalis* added, the growth of *S. aureus* was inhibited. In the catalatically treated culture, however, no inhibition of *S. aureus* was observed.

All these experiments indicated that the hydrogen peroxide generated by *S. faecalis* was an inhibitory factor to the growth of *S. aureus*.