

三菌種配合乳酸菌製剤（レベニン[®]S配合散およびレベニン[®]S配合錠） および抗生物質・化学療法剤耐性乳酸菌製剤 （レベニン[®]散およびレベニン[®]錠）の腸管病原菌に対する効果

わかもと製薬株式会社 相模研究所

中 林 夏 子 中 谷 清 吾 小久保 直 美
 窪 田 武 士 内 藤 聡

要 旨

抗生物質使用による菌交代症や日和見感染症は、腸内細菌叢のバランスの乱れなどが原因と考えられている。そこで、腸内細菌叢の異常による諸症状の改善を効能とした整腸剤である、三菌種配合乳酸菌製剤（レベニン[®]S配合散およびレベニン[®]S配合錠）および抗生物質・化学療法剤耐性乳酸菌製剤（レベニン[®]散およびレベニン[®]錠）の腸管病原菌に対する効果を検討した。

レベニン[®]S配合散およびレベニン[®]S配合錠、レベニン[®]散およびレベニン[®]錠に配合されている乳酸菌は、いずれも人工胃液および胆汁酸塩の影響をほとんど受けなかった。またレベニン[®]S配合散は、*Clostridium difficile*、Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)、Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC)、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* との混合培養において抑制効果を示し、レベニン[®]散の培養上清は、MRSA、ETEC、*Clostridium perfringens* の増殖を抑制した。

以上より、「三菌種配合乳酸菌製剤（レベニン[®]S配合散およびレベニン[®]S配合錠）」は感染症の予防や抗生物質使用による疾患の治療効果などが、「抗生物質・化学療法剤耐性乳酸菌製剤（レベニン[®]散およびレベニン[®]錠）」は抗生物質との併用による相乗効果などが、整腸効果に加えて期待できると考えられる。

緒 論

腸内細菌叢は、宿主や微生物間の相互作用により一定のバランスを維持している¹⁾。生体が健康の場合、生体防御機能（胃酸、腸運動、胆汁、菌接着のレセプター、免疫抗体、リゾチームなど）によって、そのバランスは非常に安定²⁾しており、くずれすることはほとんどない³⁾。その安定により、腸内細菌叢は外部から病原菌が侵入してきても排除する生物学的なバリアーとなり、腸管病原菌に対する生体防御機能の1つとして重要な役割を担っていると考えられている¹⁾。

抗生物質使用による菌交代症や日和見感染症は以前より問題^{4)~6)}となっており、これらは抗生物質使用による腸内細菌叢のバランスの乱れ⁷⁾、あるいは

生体防御機能の低下⁸⁾が原因と考えられている。これらを発症した場合、使用中の抗生物質の投与中止や原因菌に効果のある抗生物質の投与が多く選択される⁹⁾¹⁰⁾。一方、腸内細菌叢の乱れによる疾患の治療として、乳酸菌の投与が試みられており、効果が認められている⁷⁾。

そこで今回我々は、菌交代症である偽膜性大腸炎を引き起こす *Clostridium difficile* や日和見感染症を引き起こす Methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) だけでなく、食中毒菌である Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) などに対する三菌種配合乳酸菌製剤（レベニン[®]S配合散およびレベニン[®]S配合錠）および抗生物質・化学療法剤耐性乳酸菌製剤（レベニン[®]散およびレベニン[®]錠）の効果について検討を行った。

I 材料および方法

1. 使用製剤

レベニン®S 配合散 (わかもと製薬㈱, 以下, LSP), レベニン®S 配合錠 (わかもと製薬㈱, 以下, LST), レベニン®散 (わかもと製薬㈱, 以下, LP), レベニン®錠 (わかもと製薬㈱, 以下, LT), ビフィズス菌製剤 A, ビフィズス菌製剤 B および ラクトミン A を用いた。

2. 使用菌株

乳酸菌として, LSP および LST に配合されている *Streptococcus faecalis* WB2000 (以下, Sf), *Lactobacillus acidophilus* WB2001 (以下, La) および *Bifidobacterium longum* WB1001 (以下, Bl), LP および LT に配合されている *Streptococcus faecalis*-PCR (以下, PCR), *Lactobacillus acidophilus*-4AR (以下, 4AR) および *Bifidobacterium infantis*-SMR (以下, SMR) を用いた。

病原菌として, *Clostridium difficile* JCM5243 (以下, Cd), *Staphylococcus aureus* JCM8703 (以下, MRSA1), *Staphylococcus aureus* JCM8702 (以下, MRSA2), *Escherichia coli* WHO43 (以下, ETEC), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* JCM1652 (以下, Se) および *Clostridium perfringens* JCM1290 (以下, Cp) を用いた。

3. 使用培地

液体培地として, GAM ブイヨン「ニッスイ」(日水製薬㈱) に 0.7% グルコースを添加した GAM 液体培地を用いた。

菌数測定用寒天培地として, Cd にはクロストリジウムディフィシル寒天培地 (シスメックス・ピオメリュー㈱), MRSA1 にはマンニト食塩寒天培地 (エンバイオ㈱), ETEC にはマッコンキー寒天培地 (エンバイオ㈱), Se には XLD 寒天培地 (エンバイオ㈱), その他には BL 寒天培地 (日水製薬㈱) を用いた。

4. 人工胃液耐性試験

0.32% 含糖ペプシン添加 GAM 液体培地を pH 4.0 に調整し, 人工胃液とした。各乳酸菌を約 $7 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/mL}$ となるように人工胃液に接種し, 37°C にて静置したものを経時的に採取し, 生菌数を測定した。

5. 胆汁酸塩耐性試験

小腸上部に分泌される主要な胆汁酸は, 抱合型一次胆汁酸であるグリココール酸塩¹¹⁾ のため, グリココール酸塩に対する耐性試験を行った。

小腸上部におけるグリココール酸ナトリウム濃度は $600 \mu\text{g/mL}$ ¹²⁾ のため, グリココール酸ナトリウムを $100 \sim 1500 \mu\text{g/mL}$ および各乳酸菌を約 $6 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/mL}$ となるように GAM 液体培地に接種した。 37°C , 嫌気条件下にて 24 時間静置後, 濁度を測定した。対照は, グリココール酸ナトリウム無添加のものとし, 増殖率を求めた。

6. 生菌による病原菌抑制試験

各病原菌を約 $5 \sim 6 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/mL}$ および各製剤を下記濃度となるように GAM 液体培地に添加し, 37°C にて静置培養したものを経時的に採取し, 生菌数を測定した。ただし Cd についてのみ, 嫌気条件下にて培養した。なお, 各製剤の添加量は, ETEC に対する抑制試験では成人の 1 回服用量の 1/50 量 /mL, それ以外の病原菌では 1/100 量 /mL とした。

7. 培養上清による病原菌抑制試験

PCR, 4AR および SMR を配合した製剤である LP に対して, PCR のみを配合した製剤を PCR 単独製剤とし, これを調製した。

LP または PCR 単独製剤を約 $5 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/mL}$ となるように GAM 液体培地に添加し, 37°C にて 96 時間静置培養した。この培養液を遠心分離後, フィルター滅菌した上清 $50 \mu\text{L}$ および各病原菌を約 $6 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/mL}$ となるように接種した GAM 液体培地 $50 \mu\text{L}$ を混合した。 37°C にて 24 時間静置培養後, 濁度を測定した。対照は, 培養液の代わりに GAM 液体培地を添加したものとし, 抑制率を求めた。ただし Cp についてのみ, 嫌気条件下にて培養した。

8. L-乳酸, 酢酸産生量および pH の測定

各製剤を成人の 1 回服用量の 1/100 量 /mL となるように GAM 液体培地に添加し, 37°C , 嫌気条件下にて培養したものを経時的に採取した。L-乳酸および酢酸産生量は, 採取した培養液を遠心分離後, その上清を E-キット-L-乳酸または E-キット-酢酸 (いずれも R-Biopharm AG) を用いて測定した。また, 採取した培養液の pH を測定した。

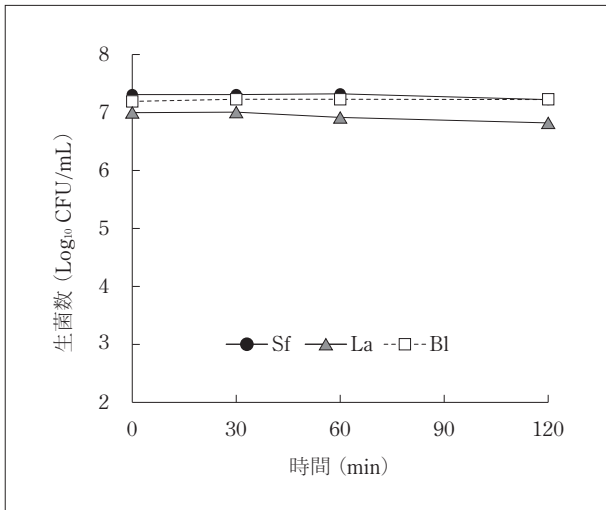


図1 LSP および LST に配合されている乳酸菌の人工胃液に対する安定性

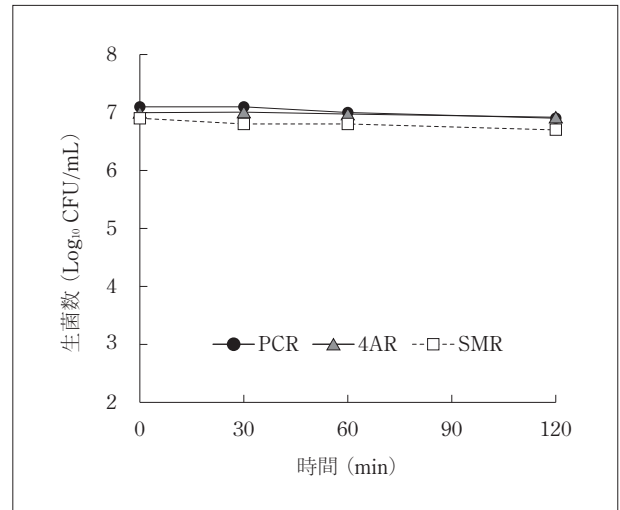


図2 LP および LT に配合されている乳酸菌の人工胃液に対する安定性

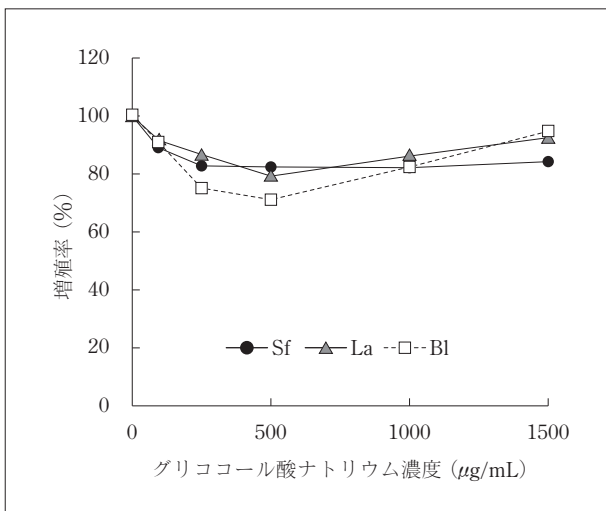


図3 LSP および LST に配合されている乳酸菌の胆汁酸塩に対する安定性

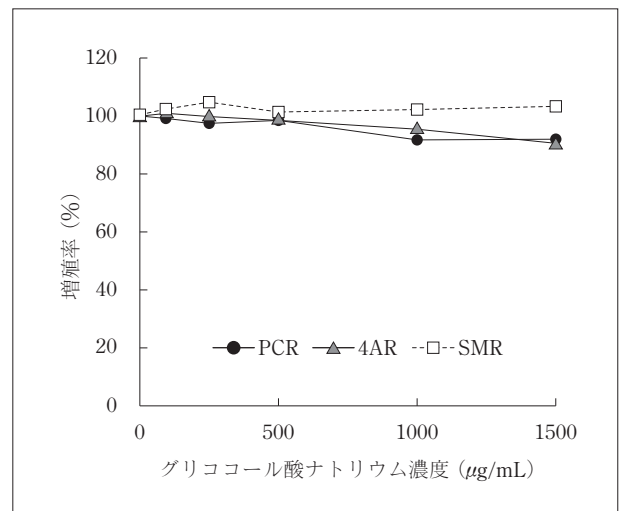


図4 LP および LT に配合されている乳酸菌の胆汁酸塩に対する安定性

II 結 果

1. 人工胃液に対する安定性

Sf, La, Bl, PCR, 4AR および SMR の人工胃液中での生菌数は、120 分後においてもほぼ維持された (図1, 図2)。

2. 胆汁酸塩に対する安定性

グリココール酸ナトリウム 100 ~ 1500 µg/mL における LSP および LST に配合されている乳酸菌の増殖率は 71 ~ 94%, LP および LT に配合されている乳酸菌の増殖率は 91 ~ 104% とグリココール酸ナトリウムの影響はほとんど受けなかった (図3, 図4)。

3. 生菌による病原菌の増殖抑制効果

(1) *Clostridium difficile*

LSP との混合培養により、培養開始直後から Cd の増殖が抑制され、生菌数が急激に減少した。ピフィズ菌製剤 A またはピフィズ菌製剤 B との混合培養では 12 時間以降に、ラクトミン A との混合培養では培養開始直後から Cd の増殖抑制効果が認められた (図5A)。

(2) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

LSP との混合培養により、培養開始 6 時間以降に MRSA1 の増殖が抑制され、12 時間以降に生菌数が急激に減少した。ピフィズ菌製剤 A との混

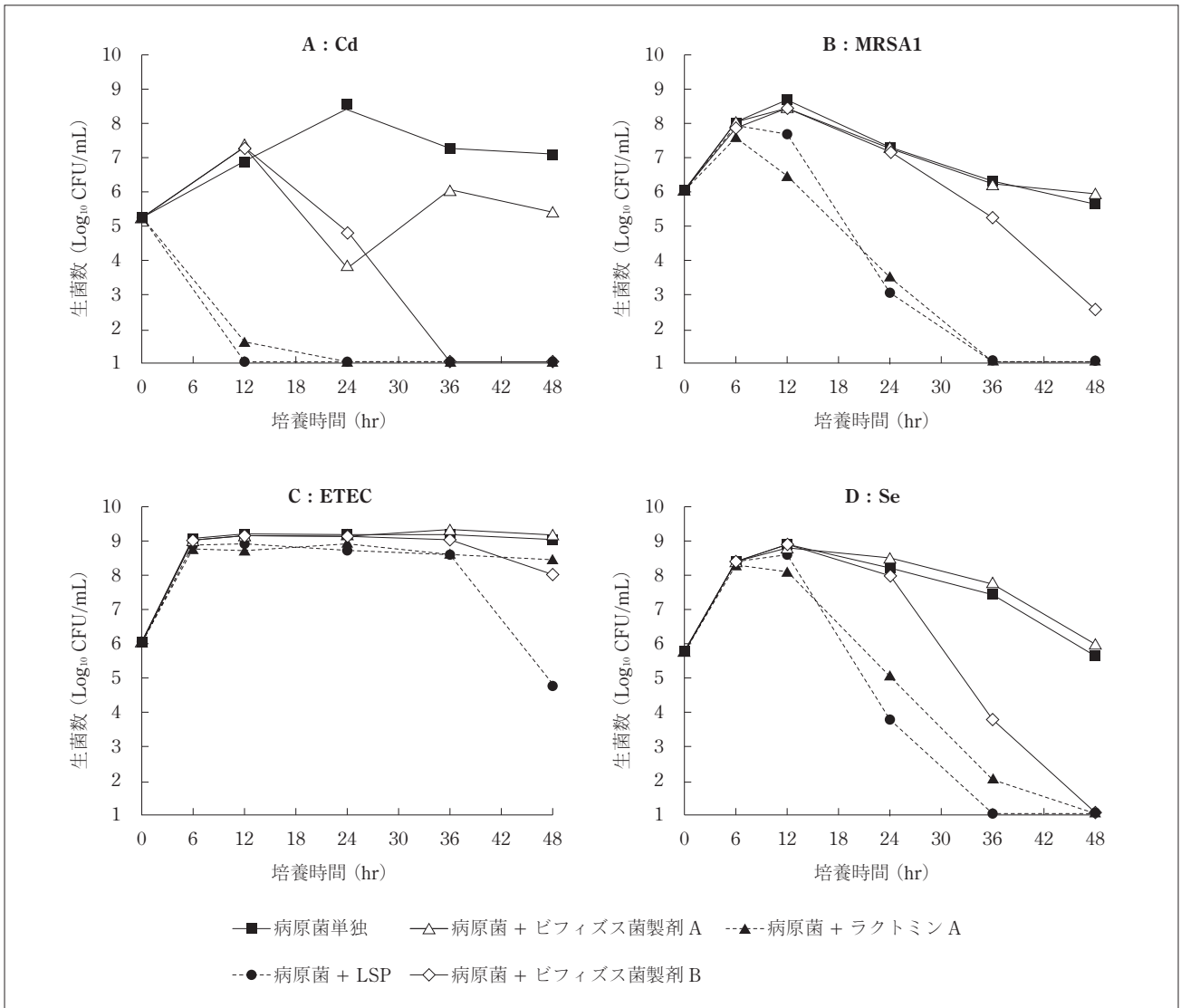


図5 生菌による病原菌の増殖抑制効果

合培養では MRSA1 の抑制効果は認められず、ピフィズス菌製剤 B との混合培養では 24 時間以降に、ラクトミン A との混合培養では 6 時間以降に MRSA1 の抑制効果が認められた (図 5B)。

(3) Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC)

LSP との混合培養により、ETEC の生菌数は培養開始 36 時間以降に減少した。一方、ピフィズス菌製剤 A, B あるいはラクトミン A との混合培養では、ETEC はほとんど減少しなかった (図 5C)。

(4) *Salmonella enterica* subsp. *enterica*

LSP との混合培養により、Se の生菌数は培養開始 12 時間以降に急激に減少した。ピフィズス菌製剤 A との混合培養では Se の増殖抑制は認められなかった。一方、ピフィズス菌製剤 B との混合培養では 24 時間以降に、ラクトミン A との混合培養で

は 12 時間以降に Se の抑制効果は認められたが、LSP の効果よりは弱かった (図 5D)。

4. 培養上清による病原菌の増殖抑制効果

LP の培養上清は、MRSA2, ETEC および Cp の増殖を抑制した。その抑制効果は、PCR 単独製剤の培養上清よりも強かった (図 6)。

5. L-乳酸および酢酸の産生量と pH の推移

LSP および LST 中の乳酸菌は、L-乳酸を培養開始 4 ~ 8 時間で多く産生し、培養開始 12 時間でほぼ最大産生量に達した。酢酸は培養開始直後から 8 時間で多く産生し、培養開始 12 時間でほぼ最大産生量に達した。L-乳酸および酢酸の産生に伴い pH は低下し、培養開始 12 時間以降にほぼ一定となった (図 7)。また培養開始 8 時間の L-乳酸および酢酸産生量は、LSP とラクトミン A はほぼ同等、ピ

フィズス菌製剤 A およびビフィズス菌製剤 B は LSP より低い産生量であった (図 8 および図 9)。

LP および LT 中の乳酸菌は、L-乳酸を培養開始直後から 24 時間で多く産生し、ほぼ最大産生量に達した。酢酸は培養開始直後から 48 時間で多く産生し、ほぼ最大産生量に達した。L-乳酸および酢酸の産生に伴い pH は低下し、培養開始 24 時間以降にはほぼ一定となった (図 10)。

III 考 察

服用した乳酸菌製剤が腸管病原菌に効果を発揮するためには、まず生菌として腸内に到達することが重要である¹³⁾。LSP および LST, LP および LT に配合されている乳酸菌は、いずれも人工胃液および胆汁酸塩の影響をほとんど受けなかった。そのため LSP および LST, LP および LT 中の乳酸菌は、生菌として腸内に到達すると考えられる。

腸内細菌叢のバランスの乱れは、薬物 (抗生物質や抗がん剤など)、疾患、食べ物、宿主の生理 (消化管内 pH, 胆汁など) などによる¹³⁾ と言われており、そのような場合、腸内では病原菌の増殖が認められる³⁾。整腸剤の効能は「腸内細菌叢の異常による諸症状の改善」であるため、腸内に到達した生菌による病原菌の抑制効果について *in vitro* 試験を行った。LSP は、各種病原菌との混合培養により、腸管病原菌 4 菌種を抑制した。また LP は、各種病原菌 (*Clostridium difficile*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Campylobacter jejuni*) との混合培養により、増殖抑制効果を示したことを村山ら¹⁴⁾ が報告している。さらに LP の

培養上清は、腸管病原菌 3 菌種の増殖を抑制した。乳酸菌が病原菌の増殖に影響を与える因子として、エネルギー源の争奪、乳酸や酢酸の産生、それに伴う pH の低下やバクテリオシン様物質などの抗菌性物質の産生などが考えられている⁸⁾¹⁵⁾。LSP および LP において、L-乳酸および酢酸の産生が認められ、また産生に伴って pH の低下が認められたことから、生菌および培養上清による増殖抑制因子の 1 つは、乳酸や酢酸による殺菌効果およびそれに伴う pH 低下と考えられる。しかし、LSP の L-乳酸および酢酸の産生は培養開始 12 時間ではほぼ最大産生量となっているにも関わらず、ETEC の抑制は培養開始 36 時間以降でのみ認められた。したがって、生菌による増殖抑制は乳酸および酢酸による殺菌効果や pH 低下によるものだけでなく、エネルギー源の争奪、バクテリオシン様物質などの抗菌性物質や乳

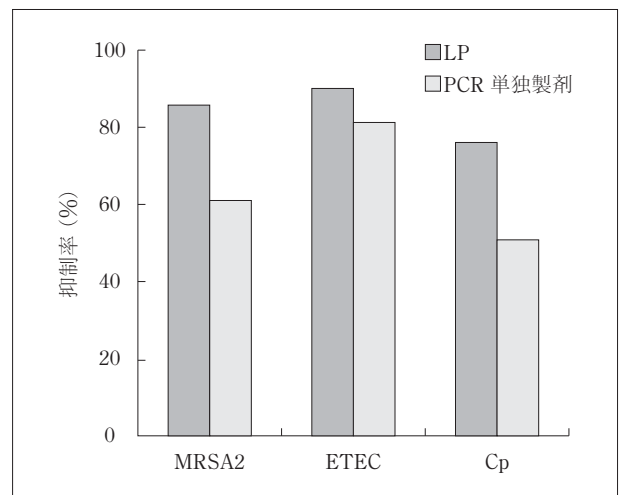


図 6 培養上清による病原菌の増殖抑制効果

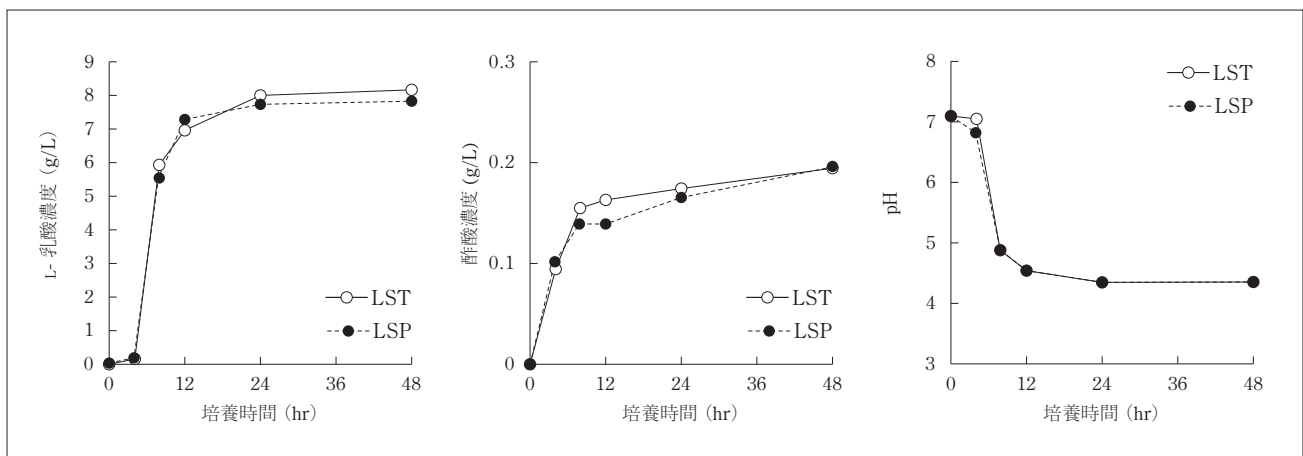


図 7 LSP および LST の L-乳酸および酢酸産生量と pH の推移

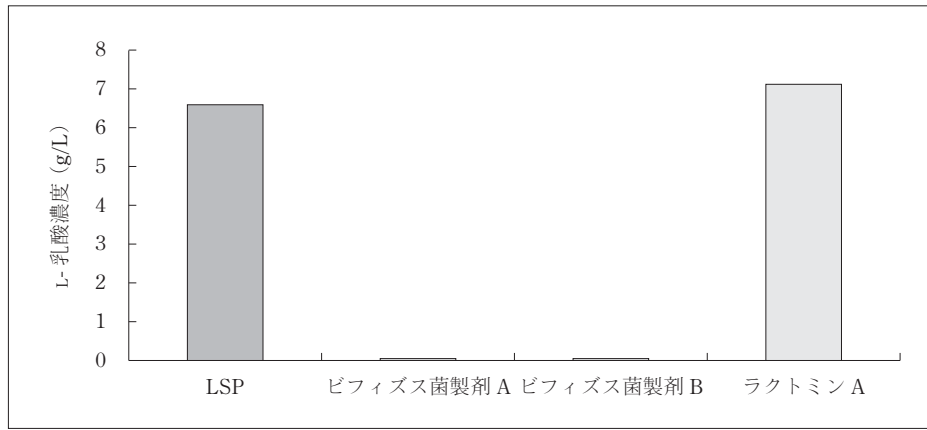


図8 L-乳酸産生量の製剤間比較

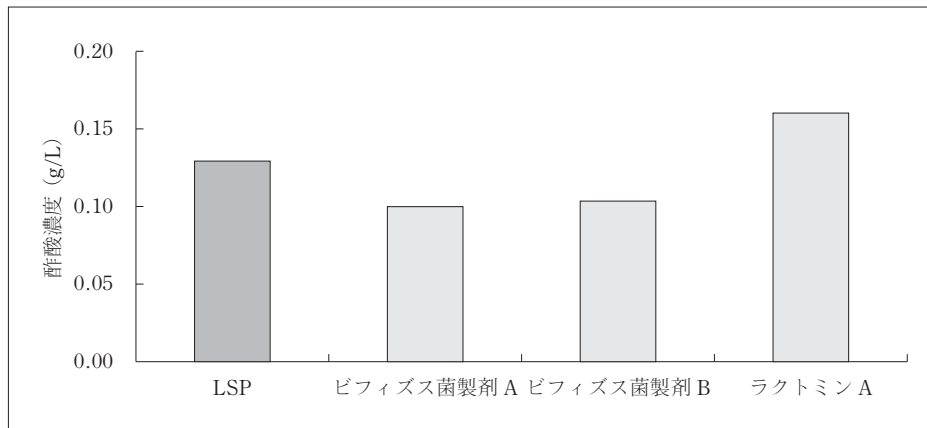


図9 酢酸産生量の製剤間比較

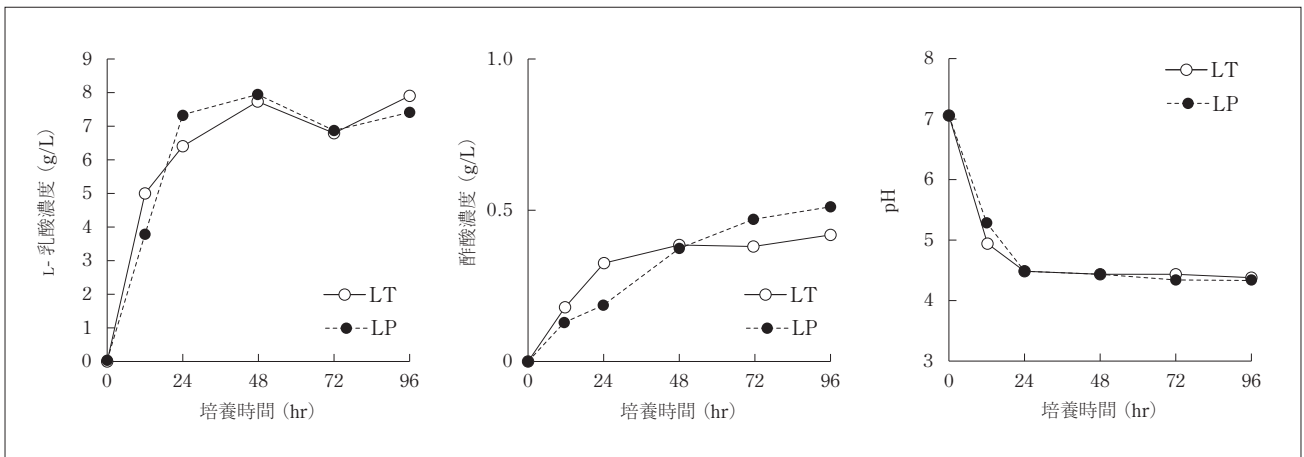


図10 LPおよびLTのL-乳酸および酢酸産生量とpHの推移

酸菌そのものを含めた多くの因子が作用しているものと考えられる。

LSPは、腸管病原菌4菌種に対して、4製剤中最も高い抑制効果を示した。LSPのL-乳酸および酢酸産生量は培養開始8時間時点で他製剤と同等以上であった。したがって、LSPが最も高い抑制効果

を示した理由の1つは、早期での乳酸および酢酸の産生と考えられる。また、乳酸菌1菌種の培養上清と比較して、乳酸菌3菌種の培養上清の方が腸管病原菌に対する高い増殖抑制効果を示した。病原菌の増殖に影響を与える因子である乳酸や酢酸、バクテリオシン様物質などの抗菌性物質の産生は、乳酸菌

の菌種により種類も量も異なる¹⁶⁾¹⁷⁾。さらに、複数の因子の組み合わせは、単独の因子よりも高い抑制効果となる¹⁸⁾。そのため、LSPが他製剤と比較して最も多くの3菌種を配合した製剤である点も、LSPが最も高い抑制効果を示した1つの理由と考えられる。

感染症の治療に抗生物質が使用される頻度は高く、またその効果も非常に高い。しかし一方で、抗生物質の使用による別の疾患の発症や耐性菌の出現などの問題が発生していることも多く報告されている⁷⁾⁹⁾¹⁹⁾。乳酸菌製剤の効果は治験により多く報告されており^{7)~9)}、生体内におけるメカニズムについても数々考察されている⁹⁾が、未解明の部分もまだ多く、依然として大きな課題となっている。本検討により、三菌種配合乳酸菌製剤(レベニン[®]S配合散およびレベニン[®]S配合錠)および抗生物質・化学療法剤耐性乳酸菌製剤(レベニン[®]散およびレベニン[®]錠)の腸管病原菌の抑制効果が示唆された。そのため、「三菌種配合乳酸菌製剤」は感染症の予防や抗生物質使用による疾患の治療効果などが、また「抗生物質・化学療法剤耐性乳酸菌製剤」は抗生物質との併用による相乗効果などが、整腸効果に加えて期待できると考えられる。感染症の予防と治療において、乳酸菌製剤などの生物学的方法を上手に利用していくことが重要と考える。

参 考 文 献

- 1) 光岡知足：腸内フローラ・宿主・細菌間の相互作用. pp.1-5, 学会出版センター, 東京, 2004.
- 2) 光岡知足：腸内フローラと生体防御. pp.11-27, (株)学会出版センター, 東京, 1982.
- 3) 光岡知足：腸内菌の世界—嫌気性菌の分離と同定—. pp.11-41, 叢文社, 東京, 1980.
- 4) 青木泰子, 他：メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)抗菌薬感受性の変化—最近20か月の経時的推移—. CHEMOTHERAPY **39**: 570-576, 1991.
- 5) Gould CV, et al: Bench-to-bedside review: *Clostridium difficile* colitis. Crit Care **12**: 203, 2008.
- 6) Black SR, et al: Regional infection control assessment of antibiotic resistance knowledge and practice. Infect Control Hosp Epidemiol **36**: 381-386, 2015.
- 7) 本間 道, 他：ビフィズス菌—腸内菌叢と健康とのかかわり合い—. pp.185-293, (株)ヤクルト本社, 東京, 1979.
- 8) 光岡知足：腸内フローラの生態と役割. pp.1-29, (株)学会出版センター, 東京, 1990.
- 9) 光岡知足：腸内フローラと感染症. pp.43-78, (株)学会出版センター, 東京, 1986.
- 10) 松尾収二, 他：便よりメチシリン耐性黄色ブドウ球菌が検出された34患者の臨床のおよび病理学的検討. 感染症学雑誌 **65** : 1394-1401, 1991.
- 11) 真島英信：生理学(改訂第17版). p.434, 文光堂, 東京, 1978.
- 12) Ibrahim SA, et al: Survival of bifidobacteria in the presence of bile salt. J Sci Food Agric **62**, 351-354, 1993.
- 13) 光岡知足：プロバイオティクス・プレバイオティクス・バイオジェニックス：腸内細菌の関わりを中心としたその研究と意義. pp.205-210, 財団法人日本ビフィズス菌センター, 東京, 2006.
- 14) 村山 力, 他：In vitroにおけるレベニン乳酸菌の*Clostridium difficile*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* および *Campylobacter jejuni* に対する増殖抑制効果. 臨床と細菌 **10** : 447-455, 1983.
- 15) 光岡知足：腸内フローラと感染症. pp.1-12, (株)学会出版センター, 東京, 1986.
- 16) 辨野義巳：プロバイオティクスとして用いられる乳酸菌の分類と効能. モダンメディア **57** : 277-287, 2011.
- 17) 松田敏生：乳酸菌による食品有害微生物の制御. 日本乳酸菌学会誌 **8** : 76-82, 1998.
- 18) 森地敏樹：バイオプリザベーション：その意義と乳酸菌の利用性. 日本食生活学会誌 **16**, 190-193, 2005.
- 19) 北山 隆：抗生物質と耐性菌の終わりなき戦い. 化学 **58** : 22-24, 2003.