

カカオマスの腸管出血性大腸菌 O157：H7 に対する抗菌効果の検討

森永製菓株式会社研究所¹⁾, 杏林大学医学部微生物学講座²⁾, 杏林大学医学部共研 FCM 部門³⁾

高橋 俊雄¹⁾ 田口 晴彦²⁾ 山口 博之²⁾ 大崎 敬子³⁾
佐藤 進¹⁾ 亀井 優徳¹⁾ 橋爪 秀一¹⁾ 神谷 茂²⁾

(平成 11 年 4 月 1 日受付)

(平成 11 年 5 月 18 日受理)

Key words : antimicrobial activity, cacao mass, enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7, verotoxin

要 旨

カカオマスの腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 : H7 006 株に対する抗菌効果を検討した。カカオマス熱水抽出液は PBS 中において飲用濃度に相当する 3.5% 添加で培養開始 3 時間以内に EHEC O157 : H7 を死滅させた。さらに、増殖培地である CAYE 培地中においても 8.0% 添加により対照の 1/10~1/100 に増殖を抑制し、結果としてペロ毒素の産生を対照の 1/4~1/32 に低下させた。また、カカオマス熱水抽出液はペロ毒素の細胞毒性を中和する効果は無かったが、ペロ毒素の標的細胞への結合を阻害した。

以上の結果から、カカオマスは EHEC O157 : H7 に対する抗菌効果を有しており、EHEC O157 : H7 の感染を防御する可能性が示唆された。

[感染症誌 73 : 694~701, 1999]

序 文

1982 年米国でのハンバーガー食中毒事例により発見され、わが国においても 1996 年の堺市での大流行で記憶に新しい腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 : H7 は、ペロ毒素を主要な病原因子として産生することから Verotoxin producing *E. coli* (VTEC)¹⁾ あるいは Shiga-like toxin producing *E. coli* (STEC)²⁾ とも呼ばれている。EHEC O157 : H7 は経口感染により激しい下痢や出血性大腸炎を引き起こすのみでなく、合併症として脳症や溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome : HUS) と呼ばれる腎不全、血小板減少、溶血性貧血等の致死的な疾患を伴うことから臨床的に大きな関心を持たれている新興感染症病原菌であ

る^{3)~7)}。一方、ココアはカカオ豆を煤焼、磨砕して得たカカオマスから一定量のカカオバターを取り除いたもので、4000 年以上の長い食経験がある嗜好飲料の一種であり、緑茶、紅茶、ウーロン茶あるいはコーヒー等と同様に抗酸化性、免疫調節、ストレス抑制等の機能的な側面が注目を浴びている食品である^{8)~12)}。

われわれは、今回 EHEC O157 : H7 の感染予防を目的としてカカオマス熱水抽出液の抗菌効果の検討を行ったので報告する。

材料および方法

1. 供試菌株およびその培養

臨床分離株の EHEC O157 : H7 006 株 (杏林大学医学部微生物学教室保存株) を使用し、実験前に LB Broth (Difco, Detroit, USA) 中で 37℃、一晚好気条件下で前培養を行い、以下の実験に供した。

別刷請求先 : (〒230-0012) 横浜市鶴見区下末吉 2-1-1

森永製菓株式会社研究所 高橋 俊雄

2. カカオマス熱水抽出液の調製

脱脂カカオマス（ココア）を10%（w/v）になるように純水で懸濁し、15分間、121℃でオートクレーブ処理した後、1,000×g、35℃で15分間の遠心により得られた上清を10%カカオマス熱水抽出液（以下、ココア抽出液と略記する）とした。

3. ベロ毒素の細胞毒性中和効果の測定法

25ng/mlの精製ベロ毒素（VT1およびVT2；VTEC-RPLA「生研」キット¹³⁾、デンカ生研、東京）を0, 0.4, 2.0および10%ココア抽出液と1:1の割合で混合し、これらを4℃、40時間攪拌しながら中和反応を行わせた。反応後、10%ウシ胎児血清（HyClone, Logan, USA）を含むphenol red-free RPMI1640（Gibco, Rockville, USA）（以下、RPMI 1640と略記する）で希釈し、予めVero細胞（サル腎由来）を隙間無く単層になるまで培養した96ウェル培養プレートの各ウェルに100μl添加し、1夜、37℃、5%CO₂条件下で培養し、Vero細胞とベロ毒素との反応を行った。培養上清を除き、RPMI 1640とテトラゾリウム塩を用いた細胞増殖測定試薬；TetraColor ONE（生化学工業、東京）を5:1の割合で混合したものを60μl各ウェルに添加してさらに1時間、37℃、5%CO₂条件下で反応した後、630nmを対照波長として450nmの吸光度を測定した。TetraColor ONEは細胞内ミトコンドリアによる還元でホルマザン色素へと変換され、生細胞数とホルマザン色素による450nmにおける吸収には相関が認められる。従って、450nmにおける吸光度を生細胞数の指標とした。なお、ベロ毒素無添加の培地で培養したコントロールウェルの吸光度を100%として表した。また、精製ベロ毒素とココア抽出液との中和反応液中の免疫学的なベロ毒素量をVTEC-RPLA「生研」キット¹³⁾で測定した。

4. ベロ毒素の標的細胞への結合抑制効果の測定法

トリプシンで剥離したVero細胞をRPMI1640で4×10⁶個/mlの密度に懸濁し、その250μlと0, 2.0および10%ココア抽出液250μlとをそれぞれ混合して1時間、4℃で攪拌することによりVero細胞をココア抽出液で処理した。遠心分離して上

清を除き、処理したVero細胞に約0.2μg/mlのVT1および約6.0μg/mlのVT2を含むEHEC O157:H7 006株培養上清を500μl添加し、さらに10分間、4℃で攪拌しながらベロ毒素とVero細胞とを反応させた後、遠心分離して上清を除き、0.5%牛血清アルブミン（オリエンタル酵母工業、東京）を含むPBS（日水製薬、東京）でVero細胞を洗浄した。ウサギ抗VT1あるいはVT2特異抗血清（デンカ生研）を加えて30分間、4℃で攪拌しながらVero細胞へ結合したベロ毒素と特異抗血清とを反応させた。遠心分離して上清を除き、洗浄した後、FITC標識r-プロテインG（Zymed, South San Francisco, USA）を添加して30分間、4℃で攪拌しながらベロ毒素に結合したウサギIgGとプロテインGとを反応させた。上清を除き洗浄した後、細胞を均一になるように0.5%牛血清アルブミンを含むPBSで懸濁し、ベロ毒素が結合することにより蛍光標識されたVero細胞をフローサイトメーターで分析した。

5. EHEC O157:H7の増殖抑制効果の測定法

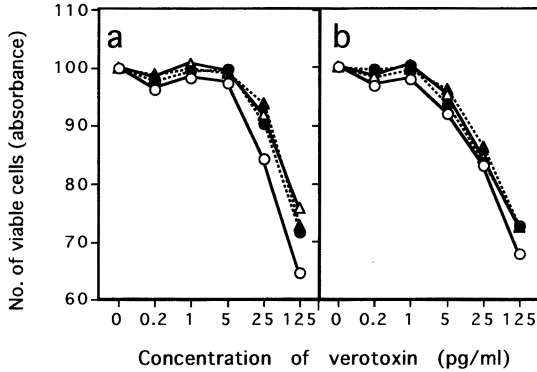
0, 3.5および7.0%になるようにココア抽出液を加えたPBSならびに終濃度1.0mg/mlのカテキン（Sigma, St. Louis, USA）を添加したPBSにEHEC O157:H7 006株を接種し、37℃、好気条件下で培養を行い、経時的にソルビトール・マッコンキー寒天培地（Oxoid, Basingstoke, England）を用いて生菌数（CFU/ml）を測定した¹⁴⁾。なお、陽性対照として増殖培地であるLB Broth（Difco）中でも培養を行った。

6. EHEC O157:H7によるベロ毒素産生への抑制効果の測定法

CAYE培地（日水製薬）に0, 4.0および8.0%になるようにココア抽出液を添加した培地にEHEC O157:H7 006株を接種し、37℃、好気条件下で培養を行った。経時的にソルビトール・マッコンキー寒天培地を用いて生菌数（CFU/ml）を測定する¹⁴⁾とともに、VTEC-RPLA「生研」キット¹³⁾により培養上清中および超音波破碎処理した菌体を含む培養液の遠心上清中のベロ毒素濃度を決定した。

7. 抽出液中の抗菌活性成分の分画

Fig. 1 Effect of cocoa extract on cytotoxicity of verotoxins, VT1 (a) and VT2 (b); control (○), addition of 0.2% cocoa extract (●), addition of 1.0% cocoa extract (△) and addition of 5.0% cocoa extract (▲).



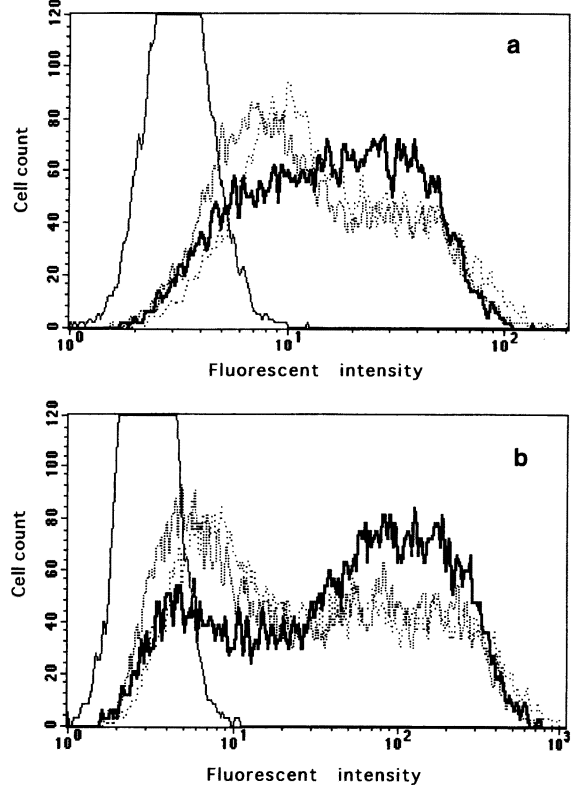
7-1. Sephadex G-75 カラムを使用したゲルろ過法による活性成分の分画

ココア抽出液 25.0ml を Sephadex G-75 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) カラム (直径 5.0×長さ 122cm; ベッド容積 2,200ml) で展開溶媒として純水を用いて分画 (22ml/フラクション) を行った。それぞれのピークに相当するフラクションを合わせ、45°C でロータリーエバポレーターを用いて各々ゲルろ過に供したサンプル量と同じ 25.0ml に濃縮し、Pool-I~IV を得た。これらのプールについて、純水に対する 280nm および 490nm での吸光度の測定と PBS 中での 3.5% 供試ココア抽出液とこれに相当する容量の Pool-I~IV の EHEC O157:H7 006 株の増殖に及ぼす影響を検討した。

7-2. 有機溶媒抽出法による活性成分の分画

7-1. で得られた活性画分を 2 倍量のクロロホルム、酢酸エチルおよび n-ブタノールで 2 回ずつ抽出を行い¹⁵⁾、残存水層も含めた各画分をロータリーエバポレーターを用いて 45°C で濃縮して各々の容積を分画前の容積に純水で合わせた後、それぞれの画分の純水に対する 280nm および 490nm での吸光度の測定および 70% (v/v) の Pool-IV と各抽出画分を加えた PBS 中での EHEC O157:H7 006 株の増殖を検討した。

Fig. 2 Effect of cocoa extract on the binding of VT1 and VT2 to Vero cells; —, negative control; —, positive control, ····, addition of 1.0% cocoa extract; ···, addition of 5.0% cocoa extract.



成 績

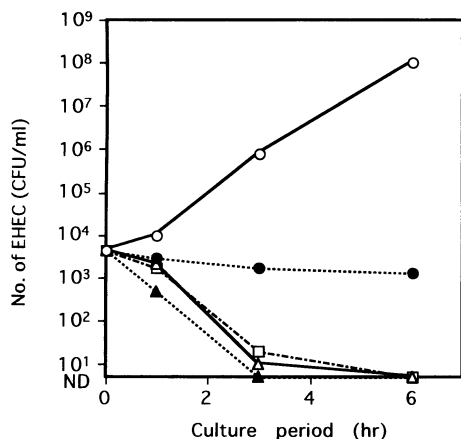
1. ココア抽出液によるペロ毒素の細胞毒性に対する中和効果

Fig. 1 に精製ペロ毒素の細胞毒性に対するココア抽出液の中和効果を示した。Vero 細胞に対する細胞毒性は VT1 では 5.0pg/ml 以上で、VT2 では 1.0pg/ml 以上の濃度で認められたが、ココア抽出液によるペロ毒素の細胞毒性に対する中和効果はいずれの毒素においても認められなかった。また、VTEC-RPLA 「生研」¹³⁾を用いた免疫学的な毒素濃度についてもココア抽出液の影響は認められなかった。

2. ペロ毒素の標的細胞への結合に対する抑制効果

Vero 細胞とペロ毒素との結合を蛍光強度を指標としてフローサイトメーターを用いて分析した

Fig. 3 Bactericidal effect of cocoa extract on EHEC O157 : H7. Number of EHEC in LB broth (○) ; PBS (●), PBS supplemented with 3.5% cocoa extract (△), PBS supplemented with 7.0% cocoa extract (▲) and PBS supplemented with 1.0 mg/ml Catechin (□).



結果を Fig. 2 に示す。Vero 細胞を 1% あるいは 5% のココア抽出液で予め処理することによって、VT1 および VT2 のいずれのペロ毒素についても Vero 細胞への結合は部分的に抑制された。なお、ココア抽出液によるペロ毒素の前処理は本毒素の標的細胞への結合性に全く影響を与えなかった (データ未提示)。

3. ココア抽出液の EHEC O157 : H7 に対する殺菌効果

ココア抽出液の EHEC O157 : H7 006 株に対する殺菌効果の有無を調べた (Fig. 3)。LB Broth 中では培養開始直後から活発な増殖を続け、6 時間後の生菌数は 10⁸CFU/ml 以上であった。また、PBS 中では生菌数は徐々に減少するものの 6 時間後においても 10³CFU/ml 以上であった。一方、ココア抽出液を添加した PBS 中での生菌数は 7.0% 添加の場合、1 時間後には 500CFU/ml 以下に減少していた。また、3.5% および 7.0% 添加の場合、3 時間後にはほぼ検出限界 (10CFU/ml) 未満であった。

なお、緑茶の抗菌活性成分と言われているカテキン²⁰⁾が通常の緑茶飲用時に含有されている濃度である 1.0mg/ml で示す抗菌活性は、ココアの飲

Fig. 4 Effect of cocoa extract on the growth of EHEC O157 : H7 in CAYE growth medium ; growth of EHEC in CAYE (○), CAYE supplemented with 4.0% cocoa extract (●) and CAYE supplemented with 8.0% cocoa extract (△).

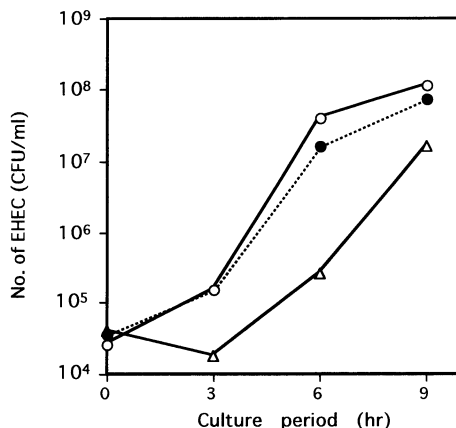


Fig. 5 Effect of cocoa extract on the production of VT1 and VT2 by EHEC O157 : H7. EHEC was incubated in CAYE supplemented with 0% (○), 4.0% (●) or 8.0% (△) of cocoa extract. (a), VT1 titer in culture supernatant ; (b), VT2 titer in culture supernatant ; (c), VT1 titer in whole cell extract ; (d), VT2 titer in whole cell extract.

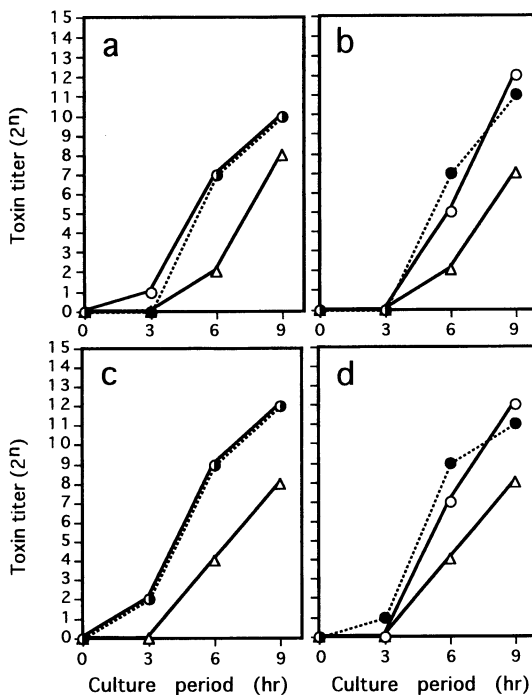


Fig. 6 Column chromatography of cocoa extract using Sephadex G-75 gel ; ○, A_{280} ; ●, A_{490} .

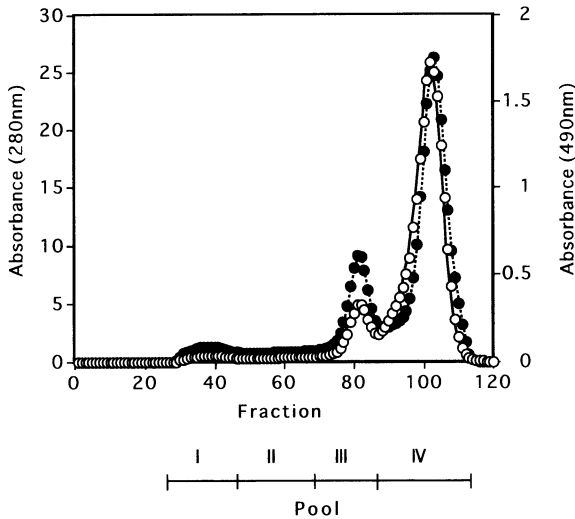
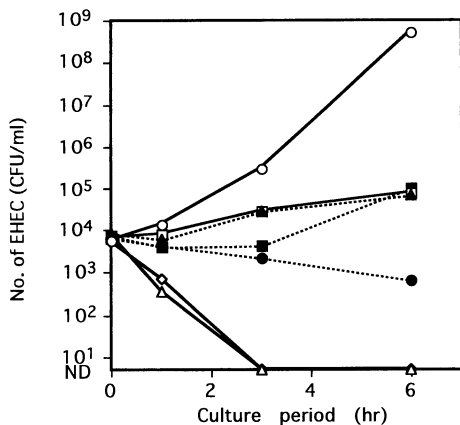


Fig. 7 Effect of pooled fractions (I~IV) separated by Sephadex G-75 gel chromatography on EHEC O157 : H7. Number of EHEC in LB broth (○), PBS (●), PBS supplemented with cocoa extract (△), PBS supplemented with Pool-I (▲), PBS supplemented with Pool-II (□), PBS supplemented with Pool-III (■) and PBS supplemented with Pool-IV (◇).

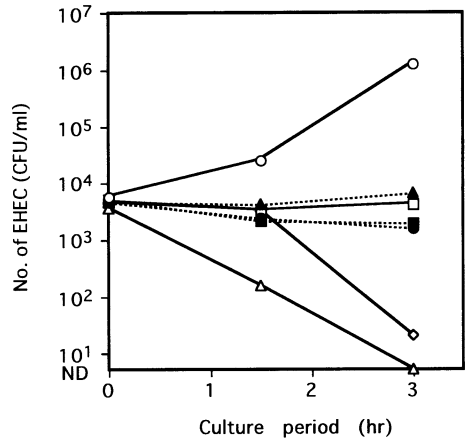


用濃度相当の3.5%ココア抽出液添加時とほぼ同等であった。

4. EHEC O157 : H7 からのペロ毒素産生に対する抑制効果

増殖培地である CAYE 培地にココア抽出液を

Fig. 8 Effect of organic solvent-extractable fractions on EHEC O157 : H7. Number of EHEC in LB broth (○), PBS (●), PBS supplemented with Pool-IV (△), PBS supplemented with Chloroform fraction (▲), PBS supplemented with Ethyl acetate fraction (□), PBS supplemented with n-Butanol fraction (■) and PBS supplemented with residual water fraction (◇).



添加して EHEC O157 : H7 006 株を培養した場合の生菌数と菌体外および菌体内毒素も含めた全体のペロ毒素濃度を Fig. 4 および 5 に示した。8.0%ココア抽出液の添加により生菌数は約 1/10~1/100 に抑えられ、ペロ毒素の産生は VT1, VT2 共に 1/4~1/32 に減少した。

5. ココア抽出液中の抗菌活性成分の分画

5-1. Sephadex G-75 カラムを使用したゲルろ過法による活性成分の分画

Fig. 6 に示したように、Sephadex G-75 カラムを使用したゲルろ過によりココア抽出液成分は、280 nm および 490nm での吸収がほぼ同様の3つのピークに分かれ、ボイドボリューム直後の Pool-I とカラムボリューム近傍の Pool-IV および Pool-IV 直前に溶出される Pool-III とに分画、回収された。それらの PBS 中での EHEC O157 : H7 006 株の増殖に及ぼす効果を Fig. 7 に示したが、EHEC O157 : H7 006 株に対する増殖抑制活性はそのほとんどが Pool-IV に回収されることが明らかとなった。また Pool-IV は、ポリペプチドおよびフェノール基の存在を示す 280nm および褐色の

程度を示す 490nm の一番大きな吸収ピークと重なり、分子量が数千ダルトン以下の低分子であることが分かった。そこで次に、Pool-IV を有機溶媒抽出法により分画することにした。

5-2. 有機溶媒抽出法による活性成分の分画

Pool-IV を有機溶媒抽出法により分画し、その各分画の EHEC O157 : H7 006 株に対する増殖抑制活性を調べたところ、ほとんどの増殖抑制活性は残存水層に回収された (Fig. 8)。また、280nm および 490nm の吸収もそのほとんどが残存水層に回収された (データ未提示)。

考 察

EHEC O157 : H7 感染により起こる臨床症状の主な原因と考えられているベロ毒素に対するココア抽出液の効果を先ず検討した。Fig. 1 に示すように、ココア抽出液にはベロ毒素に直接作用し中和する効果は認められなかった。しかしながら、ベロ毒素が細胞毒性を発揮するために必要な標的細胞への結合を抑制することが明らかとなった (Fig. 2)。このココア抽出液によるベロ毒素と標的細胞との結合抑制効果は、標的細胞である Vero 細胞をココア抽出液で前処理した場合のみ発現されたことから、ココア抽出液中の抑制成分は標的細胞上のレセプターであるグロボトリオースセラミド糖脂質¹⁶⁾に何らかの影響を与えることによりベロ毒素との結合を抑制していると考えられる。ところで、ベロ毒素はヒマ科植物中に含有されるリシンと共通性が高いことが知られており、A および B サブユニットから構成され、A サブユニットが毒性(酵素活性)を発現し、B サブユニットは細胞膜表面のレセプターとの結合を受け持っている¹¹⁾¹⁷⁾。結果の項でも述べたように、ココア抽出液によるベロ毒素の前処理は本毒素の標的細胞への結合性に全く影響を与えなかった (データ未提示) ことから、ココア抽出液中には B サブユニットに作用し、標的細胞上のレセプターへの結合を阻害する成分が含まれていないことは明らかであり、このことが、ココア抽出液のベロ毒素に対する細胞毒性中和効果が認められなかった原因の一つであると思われる。

また、フローサイトメーターによる分析の際の

毒素検出感度が低いため、今回はベロ毒素の濃度としてその活性を発現する濃度より 100~1,000 倍高い濃度を採用し実験を行ったが、実際の活性発現濃度である数 pg/ml 程度の毒素を用いた場合にはより高い結合抑制効果が誘導されるものと考えられる。

次にココア抽出液による EHEC O157 : H7 の増殖抑制効果を調べた。Fig. 3 に示されているように、PBS 中ではココア抽出液は強い殺菌効果を有することが明らかとなった。われわれはココア抽出液成分が特異的にグラム陰性菌外膜成分であるリポポリサッカロイド (LPS ; 内毒素) の生物活性を抑制することを既に報告している¹⁸⁾が、EHEC O157 : H7 もグラム陰性菌であることからココア抽出液成分が菌体外膜成分である LPS に作用することにより増殖に抑制的に作用することが推察される¹⁹⁾。

PBS 中での増殖抑制効果に加えて更に増殖培地中でのベロ毒素産生抑制効果について検討した (Fig. 4 および Fig. 5)。増殖培地中での生菌数とベロ毒素産生量との関係を調べたところ、生菌数の減少だけではなくベロ毒素産生量の減少も同時に観察された。生菌数の減少が 1/10~1/100 であるのに対してベロ毒素産生量の減少が 1/4~1/32 と小さいのは、ベロ毒素の産生量が死菌も含めた総菌数を反映しているためと考えられる。これらの結果からココア抽出液成分は菌体当たりのベロ毒素の産生あるいは合成されたベロ毒素の膜透過性を低下させるのでは無く、EHEC O157 : H7 の増殖を抑えた結果としてベロ毒素の産生を抑制したものと考えられる。

ゲルろ過を行い、その画分の増殖抑制効果を検討した結果 (Fig. 6 および Fig. 7)、ココア抽出液中の抗菌活性成分は 280nm の吸収が一番大きいピークである Pool-IV に含まれ、分子量が数千ダルトン以下であることが明らかとなった。分子量の大きなタンパク質は熱水抽出の段階で変性、沈澱の結果除かれると考えられ、この Pool-IV には低分子ポリペプチドやアミノ酸および 280nm の吸収を示すポリフェノール等が含まれている可能性が考えられた。ポリフェノールは抗酸化性等の

種々の生物活性を有していることが知られ^{8)~12)}、近年、最も注目を浴びている食品中の機能性物質の一つである。今回の実験にも用いたカテキンを初めとし、緑茶やウーロン茶、紅茶等に含まれるポリフェノール類を分離する際には、有機溶媒抽出法で酢酸エチル相へとポリフェノールが移行することが一般に知られている²¹⁾のに対し、本活性成分は最後まで水相に残存する (Fig. 8) ことから、これらのポリフェノールとは異なるカカオマス独特の成分である可能性が考えられる。今後更に研究を進め、この抗菌成分を明らかにする必要があると考えている。

以上の結果から、ココアは EHEC O157:H7 に対して *in vitro* での抗菌効果を有することが確認された。ヒト消化管内でココア濃度は飲用濃度より低下することが想定されるため、今後 *in vivo* における EHEC O157:H7 感染予防効果について検討する予定である。

文 献

- 1) Karmali MA : Infection by Verotoxin-producing *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1989 ; 2 : 15-38.
- 2) 坂崎利一, 田村和満 : 志賀毒素産生大腸菌感染症. 日本臨床微生物学雑誌 1996 ; 6 : 89-98.
- 3) Chohen MB, Giannella RA : Hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* O157 : H7. Advances in Internal Medicine 1991 ; 37 : 173-194.
- 4) Levine M : *Escherichia coli* that cause Diarrhea : Enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohaemorrhagic, and enteroadherent. J Infect Dis 1987 ; 155 : 377-389.
- 5) Cleary TC : Cytotoxin-producing *Escherichia coli* and the hemolytic uremic syndrome. Pediatr Clin North Am 1988 ; 35 : 485-501.
- 6) Ong J, Zhe L, Robins-Browne R, Gapes M, O' Loughlin EV : Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* serotype O157 : H7 in children with diarrhoea attending a Sydney hospital. J Paediatr Child Health 1993 ; 29 : 185-187.
- 7) 竹田多恵, 吉野健一, Thandavarayan Ramamurthy, 内田 寛, 松田枝理子, Amit Pal : 1996 年夏, 日本で多発した腸管出血性大腸菌 O157 感染症. 日本細菌学雑誌 1996 ; 51 : 1037-1042.
- 8) 神谷 茂 : ココアのピロリ菌感染に及ぼす効果. 食の科学 1998 ; 242 : 48-60.
- 9) Osakabe N, Yamagishi M, Sanbongi C, Natsume M, Takizawa T, Osawa T : The antioxidative substances in cacao liquor. J Nutr Sci Vitaminol-Tokyo 1998 ; 44 : 313-321.
- 10) Sanbongi C, Suzuki N, Sakane T : Polyphenols in chocolate, which have antioxidant activity, modulate immune functions in human in vitro. Cell Immunol 1997 ; 177 : 129-136.
- 11) Sanbongi C, Osakabe N, Natsume M, Takizawa T, Gomi S, Osawa T : Antioxidative Polyphenols Isolated from *Theobroma cacao*. J Agric Food Chem 1998 ; 46 : 454-457.
- 12) 武田弘志 : カカオマスポリフェノールの薬理学的特徴 : 抗ストレス効果. 食の科学 1998 ; 240 : 63-65.
- 13) 甲斐明美, 山田澄夫, 松下 秀, 他 : ラテックス凝集反応による大腸菌 Verocytotoxin 1 及び 2 の検出とその応用. 日本細菌学雑誌 1989 ; 44 : 434.
- 14) 甲斐明美, 畠山 薫, 尾畑浩魁, 五十嵐英夫, 伊藤 武 : 培地試薬およびマニュアル作成委員会・合同報告 ; 臨床材料を対象とした腸管出血性大腸菌 (Vero 毒素産生性大腸菌) の検査法. 日本臨床微生物学雑誌 1998 ; 8 : 70-78.
- 15) 中里賢一, 竹尾忠一 : 烏龍茶抽出物の抗炎症効果. 日本農芸化学会誌 1998 ; 72 : 51-54.
- 16) Lingwood CA, Law H, Richardson S *et al.* : Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. J Biol Chem 1987 ; 262 : 8834-8839.
- 17) Huang A, Friesen J, Brunton JL : Evidence that glutamic acid 167 is an active site residue of Shiga-like toxin I. Proc Natl Acad Sci 1988 ; 85 : 2568-2572.
- 18) 高橋俊雄 : エンドトキシン活性中和剤. 日本公開特許公報, 特開平 11-29492 (1999.2.2.).
- 19) Axen A, Carlsson A, Engstrom A, Bennich H : Gloverin, an antibacterial protein from the immune hemolymph of *Hyalophora pupae*. Eur J Biochem 1997 ; 247 : 614-619.
- 20) Shimamura T : The Anti-microbial Activity of Tea. Proceedings of the International Symposium on Tea Science Shizuoka, Japan 1991 : 27-31.
- 21) Sagesaka Y, Miwa M, Okada S : Platelet Aggregation Inhibitors in Hot Water Extract of Green Tea. Proceedings of the International Symposium on Tea Science Shizuoka, Japan 1991 : 235-239.

Antibacterial Effects of Cacao Mass on Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7

Toshio TAKAHASHI¹⁾, Haruhiko TAGUCHI²⁾, Hiroyuki YAMAGUCHI²⁾,
Takako OSAKI³⁾, Susumu SATO¹⁾, Masanori KAMEI¹⁾,
Shuichi HASHIZUME¹⁾ and Shigeru KAMIYA²⁾

¹⁾Research Institute, Morinaga & Co., Ltd.

²⁾Department of Microbiology, Kyorin University School of Medicine

³⁾Division of Flowcytometry, Kyorin University School of Medicine

The antimicrobial activities of aqueous cacao mass extract against enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157 : H7 006 strain were studied.

Hot water extract of cacao mass (cocoa extract) was shown to inhibit the growth of EHEC O157 : H7 006 strain in PBS or CAYE medium. In addition, the production of verotoxins (types 1 and 2) of EHEC O157 : H7 006 strain was significantly inhibited by 8.0% cocoa extract. The cocoa extract did not neutralize the cytotoxicity of verotoxins, but had inhibitory effect on adhesion of verotoxins to the target Vero cells.

These results demonstrate that cacao mass has antimicrobial effects on EHEC O157 : H7.