

アロニアに含まれる黄色ブドウ球菌に対する増殖抑制成分の検索

森本 亮祐¹, 阪上 綾¹, 中垣 剛典²,
隅谷 栄伸³, 伊勢川 裕二^{*1,4}

(2017年10月24日受付; 2018年3月30日受理)

要旨: 黄色ブドウ球菌は、健常者における常在菌である。しかしながら、黄色ブドウ球菌の産生するエンテロトキシンによる食中毒や院内感染症の主要な起因菌であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) が問題となっている。本研究ではアロニア (*Aronia melanocarpa*) が有する機能性に注目し、これらの問題点を打開するため抗黄色ブドウ球菌効果を示す有効成分の検索を行った。有効成分の大きな見当をつけるため、異なる抽出方法でアロニア試料の抗菌活性を測定した。その結果、アロニアジュース凍結乾燥後の水溶性成分において試験菌株すべてに強い抗菌効果が確認された。抗菌成分の検索のために行った分画・細分取では逆相クロマトグラフィー非吸着・アセトニトリル 20-30% 溶出画分に強い抗菌効果を確認した。質量分析の結果、アロニア中の抗黄色ブドウ球菌効果を示す成分として、クロロゲン酸、プロトカテク酸やゲンチシン酸のような、数種の低分子化合物を同定した。

キーワード: アロニア, 黄色ブドウ球菌, MRSA

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は通性嫌気性グラム陽性細菌であり、人の鼻腔・手指に常在している。*S. aureus* は健常者において明らかな疾患を起こすことがなく保菌状態であるが、健常保菌者の定着部位から食品が汚染されることによって食中毒を生じる。また塩濃度の高い食品中でも増殖可能であり、*S. aureus* から産生されるエンテロトキシンが食品汚染の観点から問題になっている¹⁻³⁾。さらに院内感染症の起因菌の1つであるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA: Methicillin-resistant *S. aureus*) はβ-ラクタム系以外にも多くの抗生物質に薬剤耐性を獲得し、抗生物質の過剰使用などの背景から急速に多剤耐性化が進行しているため⁴⁻⁷⁾、その対策が急がれる。

アロニア属 (*Aronia*) は北米原産のバラ科の小果樹であり、*A. arbutifolia*, *A. melanocarpa* の2種が存在する。本研究で使用した *Aronia* にはポリフェノールが豊富に含まれ、その食品機能性⁸⁻¹⁶⁾が幅広く報告されている。また、*S. aureus*, 大腸菌 (*Escherichia coli*), セレウス菌 (*Bacillus cereus*), 緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) に対する *A. melanocarpa* の抗菌効果¹³⁾が報告されているが、その主要な抗菌成分に関して報告はされていない。アロニアジュースの長期飲用による尿路感染症の発症低下¹⁷⁾やバラ科に属する果実中のフェノール類がセレウス菌などの病原微生物に対して抗菌効果を示す報告より¹⁸⁾、食品を

通して感染症の治療や予防も期待されている。

本研究では食中毒や院内感染症などの問題の起因となる黄色ブドウ球菌に対して *A. melanocarpa* に含まれる抗菌成分について検討したので報告する。

実験方法

1. アロニア試料の作製方法

有機栽培されたブルガリア産アロニア果実 (*A. melanocarpa*) は収穫後、果実に付着した不純物を除くため洗浄操作を行った。搾汁・濾過後、加熱滅菌 (75-85°C, 5 min) されたアロニアジュース (果汁 100%) を使用した。アロニアジュースの原液およびその水溶性成分、エタノール可溶性成分、クロロホルム-メタノール可溶性成分を試料とした。水溶性成分とエタノール可溶性成分は、アロニアジュース凍結乾燥物を蒸留水もしくはエタノールに溶解させ、不溶物をろ過後試料とした。なお、エタノールによる溶解は遮光条件下で1時間行った。クロロホルム-メタノール可溶性成分は、凍結乾燥物をクロロホルム-メタノール混合液 (2:1 (v/v)) を用いて遮光条件下 60°C で1時間溶解させ、不溶物を除いたのち溶媒を除去し、エタノールに再溶解させた。

2. 試験菌株

黄色ブドウ球菌標準株として大阪大学大学院医学系研究科感染防御学講座より、メチシリン耐性株 (臨床分離

* 連絡者・別刷請求先 (E-mail: isegawa@mukogawa-u.ac.jp)

¹ 武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科 (663-8558 兵庫県西宮市池開町 6-46)

² 中垣技術士事務所 (593-8328 大阪府堺市西区鳳北町 10-39)

³ 公益財団法人東洋食品研究所 (666-0026 兵庫県川西市南花屋敷 4-23-2)

⁴ 武庫川女子大学バイオサイエンス研究所 (663-8179 兵庫県西宮市甲子園 9-11-68)

株：K・N株，Y・Y株，M・A株）は一般財団法人阪大微生物病研究会より分与して頂いた。メチシリン耐性株3株は共通してペニシリン系，セフェム系，カルバペネム系に耐性を示している。加えて，K・N株はマクロライド系，リンコマイシン系，キノロン系，Y・Y株はアミノグリコシド系，M・A株はアミノグリコシド系，マクロライド系，リンコマイシン系，テトラサイクリン系，キノロン系に特徴的な耐性を示し，3株すべて多剤耐性である。

また，3株は抗メチシリン耐性菌薬であるバンコマイシン，テイコプラニン，リネゾリド，アルベカシン，またスルファメトキサゾール/トリメトプリム，リファンピシンに感受性を示している。K・N株，M・A株はクリンダマイシン（CLDM）に耐性を示し，M・A株のみミノサイクリンに対して耐性を示している。なお，すべての試験菌はバイオセーフティレベル2の実験施設で取り扱った。

3. 抗菌活性試験法と評価方法

抗菌活性の試験方法として液体培地希釈法を用いた。普通液体培地に普通寒天平板培地上の試験菌コロニーを接種し，37℃・振盪回数180回/分で18時間の前培養を行った。前培養した菌液は菌数 10^6 CFU/mLに調整後，各アロニア可溶性成分を添加した試験菌液を作成した。37℃・振盪回数180回/分で24時間本培養後，適宜滅菌水で希釈した試験菌液を普通寒天平板培地上に塗抹した。37℃・24時間静置培養後にコロニー数を計測した。抗菌効果の評価として50%阻害濃度（ IC_{50} 値）を用いた。

4. 抗菌成分の分画

アロニアジュース50 mLを凍結乾燥後，蒸留水5 mLで溶解した10倍濃縮試料をワコーゲル C_{18} 逆相オープンカラムクロマトグラフィーで分画を行った。ワコーゲル C_{18} 10 gをメタノールで平衡化し，カラムに充填後，アセトニトリル50 mLで洗浄し，使用直前に100 mLの蒸留水で置換後，溶解試料を供した。移動相はA液（アセトニトリル）ならびにB液（蒸留水）を用いて，アセトニトリル濃度10%のステップワイズ法を用いて溶出し，洗浄2画分を含む計12画分を各60 mLずつ得た。溶出画分はエバポレーターで溶媒を除去し，凍結乾燥物を蒸留水に溶解した。溶液は使用まで-30℃で保存した。細分画についてはBiotage[®]（東京）のIsolera[™] Spektra（バイオタージ・ジャパン（株），東京）を使用し，カラムとしてSNAP Ultra C_{18} 12 g（バイオタージ・ジャパン（株））を用いた。移動相はA液（アセトニトリル）ならびにB液（蒸留水）を用いて流速12 mL/min，フラクション量として10 mL分取した。平衡化状態：アセトニトリル濃度0%の状態では画分1-5を分取し，画分6-11：アセトニトリル濃度5%，画分12-16：アセトニトリル濃度10%，画分17-21：アセトニトリル濃度15%，画分22-26：アセトニトリル濃度20%，画分27-32：アセトニトリル濃度25%，画分33-37：アセトニ

トリル濃度30%，画分38以降は30%→100%のグラジエントで行った。

5. 抗菌成分の同定

LC-MSで分子量，LC-MS/MSでは分子量と分子式を測定した。

5.1 LC-MS測定条件 LC装置はAgilent1260 (Agilent1260 Infinity バイナリ LCシステム，アジレント・テクノロジー（株），東京），カラムはSynergi Hydro-RP (100 mm × 3 mm, $\Phi 2.5 \mu\text{m}$) ((株) 島津ジーエルシー，東京)，オープン温度は40℃，移動相はA液（2%酢酸水溶液），B液（0.5%酢酸水溶液：アセトニトリル=1:1 (v/v)），流速は0.4 mL/min，注入量は5.0 μL で分離後に検出した。LC-MSのLC移動相グラジエント条件は0 min (A: 90%，B: 10%)，0-8 min (A: 76%，B: 24%)，8-16 min (A: 70%，B: 30%)，16-24 min (A: 45%，B: 55%)，24-33.2 min (B: 100%)，33.2-34 min (A: 100%)，34-36 min (A: 100%)とした。MS装置はAgilent LC MS 6430 (Agilent6200 シリーズ Accurate-Mass Time-of-Flight LC/MSシステム，アジレント・テクノロジー（株），東京），窒素ガスは350℃（12 L/min），ネブライザー圧は60 psi，キャピラリー電圧は2,500 V，フラグメンター電圧は100 V，イオン化法はESIのPositive/Negative同時測定とした。

5.2 LC-MS/MS測定条件 LC装置は島津LC-20A ((株) 島津製作所，京都)を使用し，カラム，オープン温度，移動相，流速，注入量，移動相グラジエントはLC-MSと同条件で行った。MS装置はmicrOTOF-Q II (ブルカー・ダルトニクス（株），神奈川)，窒素ガスは200℃（8 L/min），ネブライザー圧は1.6 bar，キャピラリー電圧は-4,500 V/2,800 V，イオン化法はESI (Positive/Negative 各測定)，Auto MS/MSで測定した。

6. 解析ソフト

LC-MS・LC-MS/MSではQualitative Analysis Ver. B・Date Analysis Ver.4.0 SP2ソフトにて測定結果を解析した。

実験結果

1. アロニアの抗黄色ブドウ球菌効果

それぞれの方法で得られたアロニアジュース可溶性成分の抗菌効果を示した（表1）。アロニアジュース原液ならびに水溶性成分は使用したすべての試験菌株において幅広い抗菌効果が確認された。特に水溶性成分は標準株に対して最も高い抗菌効果を有していた。使用したメチシリン耐性株に対する IC_{50} 値の差はあるものの，原液ならびに水溶性成分は黄色ブドウ球菌の増殖を濃度依存的に抑制することが確認された。

2. 分画画分の標準株に対する抗菌効果

C_{18} オープンカラムクロマトグラフィー法では，アロニアジュース水溶性成分2,870 mgを蒸留水にて溶解し，カラムに供した。得られた分画画分の抗菌効果を検討したところ，非吸着画分（0%アセトニトリル溶出画分）

表 1 アロニア溶解物の固形分の回収率と黄色ブドウ球菌株に対する IC₅₀ 値比較

アロニア可溶性成分の回収率				
	原液	水溶性成分	エタノール可溶性成分	クロロホルム-メタノール可溶性成分
抽出液乾燥重量 (mg/mL)	250	153	26	2
回収率 (%)	—	61	10	1
アロニアジュース IC ₅₀ (mg/mL)				
試験菌名	原液	水溶性成分	エタノール可溶性成分	クロロホルム-メタノール可溶性成分
標準株	6.78	1.77	ND	ND
K・N株*	3.17	3.42	ND	ND
Y・Y株*	3.17	3.42	ND	ND
M・A株*	27.33	3.39	ND	ND

それぞれ4種類の可溶性成分(アロニアジュース原液, 水溶性成分, エタノール可溶性成分, クロロホルム-メタノール可溶性成分)は原液1 mLの乾燥固形物重量から回収率(各抽出液1 mLあたりに換算)を求めた。各試料は液体培地希釈法を使用し, 抗菌効果を測定し IC₅₀ 値で抗菌効果を評価した。また試験菌液に対して, 最大添加濃度において抗菌効果を示さなかった試料は ND とした(有機溶媒は試験菌液に対して2%添加を最大添加濃度とし, エタノール可溶性成分は1.04 mg/mL, クロロホルム-メタノール可溶性成分は0.08 mg/mLであった)。

*メチシリン耐性(MRSA)株。

表 2 アロニアジュース水溶性成分の C₁₈ オープンクロマトグラフィーと標準株に対する IC₅₀ 値

アセトニトリル溶出濃度 (%)	0	0'	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
IC ₅₀ (mg/mL)	1.9	ND	ND	1.2	4.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
分取重量 (mg)	2,537	11	31	68	22	23	27	38	9	11	5	2

アロニアジュース凍結乾燥試料(2,870 mg)を蒸留水に溶かし, C₁₈ ゲルに供した。蒸留水で2回洗浄後, アセトニトリル濃度10%のステップワイズ法を用いて成分を溶出し, 洗浄2画分(0ならびに0')を含む計12画分を得た。得られた画分は凍結乾燥後, 蒸留水1 mLに溶解し, フィルター滅菌後に試験した。抗菌効果の評価は IC₅₀ 値で示した。

ND: 抗菌効果を示さなかった試料。

表 3 20%アセトニトリル溶出画分の分取 LC 細分画

細画分番号	2	16	18
アセトニトリル溶出濃度 (%)	0	10	15
IC ₅₀ (mg/mL)	0.79	0.27	0.95
乾燥重量 (mg)	8	4	12

SNAP Ultra C₁₈ 細分画で得られた画分のうち, 活性を有していた画分ならびに乾燥重量と IC₅₀ 値 (mg/mL) を示した。なお, 20%アセトニトリル溶出画分は SNAP Ultra C₁₈ (10 g) に対して68 mg 供し, 50本の細画分を得た。得られた画分は凍結乾燥後, 蒸留水1 mLに溶解し, フィルター滅菌後に試験した。抗菌効果の評価は IC₅₀ 値で示した。

ならびに20%, 30%アセトニトリル溶出画分で濃度依存的な抗菌効果を示した(表2)。

我々は標準株に対して最も抗菌効果の強かった20%アセトニトリル溶出画分を SNAP Ultra C₁₈ を用いた分取 LC に供し, 細分画を試みた。その結果, 計50本の細画分が得られ, 分取 LC クロマトグラムにおいて10%から25%アセトニトリル溶出画分に特異的な吸光度ピークが検出された(未公開データ)。このピークが得られた各細画分の抗菌効果を測定したところ, 非吸着画分(細画

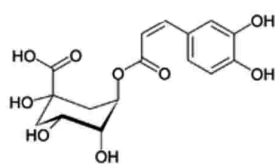
分番号2)や10%ならびに15%アセトニトリル溶出画分(細画分番号16, 18)のような強い抗菌効果を示す画分が得られた。

3. アロニアジュースに含まれる抗菌成分の検討

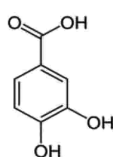
我々は非吸着画分(細画分番号2)と10%ならびに15%アセトニトリル溶出画分(細画分番号16, 18)を含む細画分の活性試験を行った。抗菌効果が確認された細画分の分取重量と IC₅₀ 値を表3に示す。これらの画分を LC-MS で解析した結果, 抗菌効果を示した画分中

非吸着画分

クロロゲン酸



プロトカテク酸



アセトニトリル10%ならびに15%画分

ゲンチシン酸

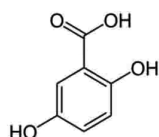


図1 アロニアに含まれる抗黄色ブドウ球菌効果を示す成分

分取画分の内、活性を示した画分を質量分析機器にて解析を行い、同定された成分を示す。

表4 同定成分と黄色ブドウ球菌に対する IC₅₀ 値

試験菌名	IC ₅₀ (mg/mL)		
	クロロゲン酸	ゲンチシン酸	プロトカテク酸
標準株	3.54	1.05	2.02
K・N株*	3.08	3.51	1.15
Y・Y株*	3.96	1.98	2.43
M・A株*	4.21	2.30	1.46

各化合物は溶媒に溶解し、液体培地希釈法を用いて抗黄色ブドウ球菌活性を測定した。抗菌効果の評価は IC₅₀ 値で示した。

*メチシリン耐性 (MRSA) 株。

には低分子化合物が含まれていることが確認された。更なる解析を LC-MS/MS で行った結果、図1に示す成分の候補が数種挙げられた。なお、候補成分は市販純品との LC-MS 検出時間の一致により同定とした。その結果より、抗菌効果を示す *A. melanocarpha* の成分として3種類 (クロロゲン酸、ゲンチシン酸、プロトカテク酸) の物質同定に至った (図1)。その成分はすべての試験菌株で濃度依存的な抗菌効果を示した。標準株に対してゲンチシン酸が、メチシリン耐性株 (K・Nならびに M・A株) に対してプロトカテク酸が強い増殖阻害活性を示した (表4)。

考 察

黄色ブドウ球菌は食中毒や院内感染症において主要な起因菌であり、日本においてもメチシリン耐性株による院内感染は増加傾向であることが報告され、今後の対策が急がれる³⁾⁶⁾⁷⁾。

本研究では様々な生理活性について報告されている *A. melanocarpha* の機能性に着目した。すでにアロニアと同じバラ科であるベリー類は *B. cereus* などの病原微生物

物に対して抗菌効果を示すことが報告¹⁸⁾¹⁹⁾されており、その機能性は多岐にわたる。しかしながら黄色ブドウ球菌に対する *A. melanocarpha* の主要な抗菌成分の詳細に関する報告は少ない。同じバラ科に属するベリー類の抗菌効果¹⁹⁾やクランベリーの抗バイオフィーム効果に関する報告²⁰⁾もあり、様々なバラ科果実が感染症の予防・治療に活用され始めている。そこで本研究ではアロニアの更なる機能性を検討するため、*A. melanocarpha* に含まれる抗菌成分の検討を試みた。

異なる溶媒を用いて得られた可溶性成分の抗菌効果を表1に示す。特に、水溶性成分は標準株に対して濃度依存的な抗菌効果を示し、アロニアジュース原液ならびに水溶性成分は使用した全試験菌株の増殖を阻害した。エタノール可溶性成分やクロロホルム-メタノール可溶性成分が増殖阻害効果を示さなかったことより、*A. melanocarpha* に含まれている抗菌成分は親水性の高い成分である可能性が示唆された。そこで我々は標準株に対して高い阻害効果を示したアロニアジュース水溶性成分に含まれる抗菌成分の検索を試みた。C₁₈ オープンカラムクロマトグラフィー画分と分取 LC による細分画に供し、抗菌画分の特定を行った。ワコーゲル C₁₈ による画分では非吸着画分、20%および30%アセトニトリル溶出画分に濃度依存的な抗菌効果が確認された (表2)。またアロニアジュースと非吸着画分の IC₅₀ 値に差がなかったことから使用したカラム容量に対して過剰量を負荷していた可能性が考えられたため、吸着画分のうち活性が確認された20%アセトニトリル溶出画分 (68 mg) を分取 LC にて細分画を進め、50本の細分画を得た。その内、非吸着画分は約8 mg、アセトニトリル溶出細分画の総乾燥重量は約47 mgであった。得られた画分の内、非吸着画分 (細分画番号2) や10%アセトニトリル溶出画分 (細分画番号16)、15%アセトニトリル溶出画分 (細分画番号18) において高い増殖阻害効果が確認された。分取重量はそれぞれ4 mg、12 mgであり、IC₅₀ 値は0.27 mg/mLと0.95 mg/mLと抗菌効果を示していたため、画分16には少量で抗菌効果に参与している抗菌成分が含まれていることが考えられた。これらの画分に含まれている成分を LC-MS にて検討した結果、非吸着画分 (細分画番号2) や10%アセトニトリル溶出画分 (細分画番号16)、15%アセトニトリル溶出画分 (細分画番号18) に複数のピークスペクトルが確認され、いくつかの低分子化合物が挙げられた。*A. melanocarpha* にはアントシアニンが豊富に含まれていることが報告されているが¹⁶⁾、含有ピークが非常に低いことから本研究結果ではアントシアニンはアロニアジュース水溶解物の主要な抗菌効果に参与していないことが示唆された。候補成分は LC-MS 保持時間の一致により、3種の低分子化合物 (クロロゲン酸・プロトカテク酸・ゲンチシン酸) の同定に至り、メチシリン耐性株を含んだすべての試験菌に対して濃度依存的な増殖抑制を確認した。クロロゲン酸やプ

ロトカテク酸は非吸着画分（細画分番号2）より、ゲンチシン酸は10%ならびに15%アセトニトリル溶出画分（細画分番号16, 18）にて検出され、これらの3つの候補成分はアロニアに含まれる成分であることが示唆された。更にこれらの低分子化合物はブドウ球菌の細胞壁合成を阻害し、細胞膜を不安定化することが確認された（未公開データ）。表4に同定成分の黄色ブドウ球菌に対するIC₅₀値を示す。粗精製の過程に伴い、高い抗菌効果を示す画分が得られ、LC-MSスペクトルではいくつかの特異的ピークが確認された。Kulling & Rawel²¹⁾やBorowska & Brzóska²²⁾は *A. melanocarpa* に含まれるポリフェノールなどの低分子化合物として、クロロゲン酸がアロニア果実中に含まれていることを報告している。しかしながらクロロゲン酸を含む同定成分の抗菌効果はアロニアジュース水溶性成分のIC₅₀値と近似した値となり、LC-MSスペクトル解析において活性画分には複数の低分子化合物が確認された。Kulling & Rawel²¹⁾やBorowska & Brzóska²²⁾の報告に加え、Lin *et al.*²³⁾のメチシリン耐性株に対する低分子化合物の抗菌効果の報告や本研究の結果より、同定した成分以外に未知の強い抗菌活性を示す成分が存在する可能性が示唆された。

A. melanocarpa のアロニアジュース水溶性成分は黄色ブドウ球菌やメチシリン耐性株に対しても非常に高い抗菌効果を示し、複数の成分が抗菌効果に関与している可能性が示唆された。同じバラ科に属するベリー類²⁴⁾や杏²⁵⁾の高い抗菌効果の報告や本結果からも、黄色ブドウ球菌に対してバラ科やアロニアジュースは汎用性が高い食品であることが期待できた。今後はアロニアに含まれる低分子化合物や作用機構・高等動物に対する毒性を検討することで、黄色ブドウ球菌に起因する院内感染症や食中毒の予防に有用であることが考えられる。

利益相反

本論文発表内容に関連して申告すべきCOI状態はない。

本研究を遂行するにあたり、黄色ブドウ球菌（標準株）を分与していただいた大阪大学医学部感染防御学講座の杉本央教授、MRSAの3株を分与していただいた一般財団法人阪大微生物病研究会の岡本徹博士に厚く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Argudín MA, Mendoza MC, Rodicio MR (2010) Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins Rev* 2: 1751-73.
- 2) Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 13: 16-34.
- 3) Le Loir Y, Baron F, Gautier M (2003) *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res* 2: 63-76.
- 4) Totsuka K, Shiseki M, Kikuchi K, Matsui Y (1999) Combined effects of vancomycin and imipenem against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) *in vitro* and *in vivo*. *J Antimicrob Chemother* 44: 455-60.
- 5) Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, Shah S, Rudrik JT, Pupp GR, Brown WJ, Cardo D, Fridkin SK (2003) Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing vanA resistant gene. *N Engl J Med* 348: 1342-7.
- 6) Burton DC, Edward JR, Horan TC, Jernigan JA, Fridkin SK (2009) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* central line-associated bloodstream infections in US intensive care units, 1997-2007. *JAMA* 301: 727-36.
- 7) Thompson RL, Cabezudo I, Wenzel RP (1982) Epidemiology of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med* 97: 309-17.
- 8) Thi ND, Hwang ES (2014) Bioactive compound contents and antioxidant activity in *aronia* (*Aronia melanocarpa*) leaves collected at different growth stages. *Prev Nutr Food Sci* 19: 204-12.
- 9) Park H, Liu Y, Kim HS, Shin JH (2016) Chokeberry attenuates the expression of genes related to de novo lipogenesis in the hepatocytes of mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Res* 36: 57-64.
- 10) Matsumoto M, Hara H, Chiji H, Kasai T (2004) Gastroprotective effect of red pigments in black chokeberry fruit (*Aronia melanocarpa* Elliot) on acute gastric hemorrhagic lesions in rats. *J Agric Food Chem* 52: 2226-29.
- 11) Kozuka M, Yamame T, Nakano Y, Nakagaki T, Ohkubo I, Ariga H (2015) Identification and characterization of a dipeptidyl peptidase IV inhibitor from aronia juice. *Biochem Biophys Res Commun* 465: 433-36.
- 12) Valcheva-Kuzmanova SV, Belcheva A (2006) Current knowledge of *Aronia melanocarpa* as a medicinal plant. *Folia Med* 48: 11-7.
- 13) Liepina I, Nikolajeva V, Jakobsons I (2013) Antimicrobial activity of extracts from fruits of *Aronia melanocarpa* and *Sorbus aucuparia*. *Environ Exp Biol* 11: 195-9.
- 14) Park S, Kim JI, Lee I, Lee S, Hwang MW, Bae JY, Heo J, Kim D, Han SZ, Park MS (2013) *Aronia melanocarpa* and its components demonstrate antiviral activity against influenza viruses. *Biochem Biophys Res Commun* 440: 14-9.
- 15) Bräunlich M, Okstad OA, Slimestad R, Wangensteen H, Malterud KE, Barsett H (2013) Effects of *Aronia melanocarpa* constituents on biofilm formation of *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*. *Molecules* 18: 14989-99.
- 16) Takahashi A, Shimizu H, Okazaki Y, Sakaguchi Y, Taira T, Suzuki T, Chiji H (2015) Anthocyanin-rich phytochemicals from *Aronia* fruits inhibit visceral fat accumulation and hyperglycemia in high-fat diet-induced dietary obese rats. *J Oleo Sci* 64: 1243-50.
- 17) Handeland M, Grude N, Torp T, Slimestad R (2014) Black chokeberry juice (*Aronia melanocarpa*) reduces incidences of urinary tract infection among

- nursing home residents in the long term—a pilot study. *Nutr Res* **34**: 518–25.
- 18) Nohynek LJ, Alakomi HL, Kahkonen MP, Heinonen M, Helander IM, Oksman-Caldentey KM, Puupponen-Pimia RH (2006) Berry phenolics antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutr Cancer* **54**: 18–32.
- 19) Saini R, Dangwal K, Singh H, Garg V (2014) Antioxidant and antiproliferative activities of phenolics isolated from fruits of Himalayan yellow raspberry (*Rubus ellipticus*). *J Food Sci Technol* **51**: 3369–75.
- 20) Reido G, Hsieh J, Potter P, Mighton J, Lam D, Warren D, Stephenson J (2000) Cranberry juice consumption may reduce biofilms on uroepithelial cells: pilot study in spinal cord injured patients. *Spinal Cord* **39**: 26–30.
- 21) Kulling SE, Rawel HM (2008) Chokeberry (*Aronia melanocarpa*)—A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Med* **74**: 1625–34.
- 22) Borowska S, Brzóska MM (2016) Chokeberries (*Aronia melanocarpa*) and their products as a possible means for the prevention and treatment of non-communicable diseases and unfavorable health effects due to exposure to xenobiotics. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **15**: 982–1017.
- 23) Lin RD, Chin YP, Hou WC, Lee MH (2008) The effects of antibiotics combined with natural polyphenols against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Planta Med* **74**: 840–6.
- 24) Kylii P, Nohynek L, Puupponen-Pimlã R, Westerlund-Wikstrom B, McDougall G, Stewart D, Heinonen M (2010) Rowanberry phenolics: compositional analysis and bioactivities. *J Agric Food Chem* **58**: 11985–92.
- 25) Yigit D, Yigit N, Mavi A (2009) Antioxidant and antimicrobial activities of bitter and sweet apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernels. *Braz J Med Biol Res* **42**: 346–52.

J Jpn Soc Nutr Food Sci **71**: 161–166 (2018)

Original Paper

Growth-inhibitory Components in the Juice of *Aronia melanocarpa* with Activity against *Staphylococcus aureus*

Ryosuke Morimoto,¹ Aya Sakagami,¹ Takenori Nakagaki,²
Hidenobu Sumitani,³ and Yuji Isegawa^{*,1,4}

(Received October 24, 2017; Accepted March 30, 2018)

Summary: *Staphylococcus aureus* is a resident bacterium in healthy humans. However, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) is a major causative bacterium of nosocomial infectious diseases. In addition, the enterotoxin produced by *S. aureus* causes food poisoning. In this study, we searched for components within the juice of aronia (*Aronia melanocarpa*) that would exert antibacterial activity against the growth of *S. aureus*. To search these active components, we carried out different extraction methods. We found that the water-soluble components of freeze-dried aronia juice had a strong antimicrobial effect against *S. aureus* strains. To search for the active ingredients, we carried out fractionation of aronia juice by reverse-phase chromatography and examined the antibacterial effects of fractions eluted with 20–30% acetonitrile. Mass spectrometry identified some low-molecular-weight compounds—chlorogenic acid, protocatechuic acid, and gentisic acid—as components of aronia.

Key words: *Aronia melanocarpa*, *Staphylococcus aureus*, MRSA

* Corresponding author (E-mail: isegawa@mukogawa-u.ac.jp)

¹ Department of Food Sciences and Nutrition, Mukogawa Women's University, Nishinomiya, Hyogo 663-8558, Japan

² Nakagaki Technical Office, Limited Company, Sakai, Osaka 593-8328, Japan

³ Toyo Food Research Institute, Public Interest Foundation, Kawanishi, Hyogo 666-0026, Japan

⁴ Institute for Biosciences, Mukogawa Women's University, Nishinomiya, Hyogo 663-8179, Japan