



本研究は、日本農芸化学会2022年度大会（京都）における「ジュニア農芸化学会」（発表は新型コロナウイルス感染症対策のためオンライン形式で実施）に応募された研究のうち、本誌編集委員会が優れた研究として選定した6題の発表のうちの一つです。

カテキン類と抗生物質

アンピシリンの抗菌効果に関する化学構造

秋田県立秋田高等学校生物部緑茶班

荒井優菜，金子 聡，佐藤真美，平川青空（顧問：遠藤金吾）

近年、薬剤耐性菌感染症の拡大が問題となっている中、私たちは既存の抗生物質の効果に影響を与える物質をカテキン類やその由来物質の中から探索したいと考えた。(-)-エピカテキン，(+)-カテキン，(-)-エピガロカテキンガレート，(+)-タキシフォリンはアンピシリンの抗菌効果には影響がなかったが，C環がカルボニル基に置換している(+)-タキシフォリンが，条件によっては大腸菌 (*Escherichia coli*) に対してアンピシリンの抗菌効果を促進することができる可能性を見出した。



本研究の目的・方法および結果と考察

【目的】

近年、薬剤耐性菌の爆発的増加による薬剤耐性菌感染症への罹患が深刻化している。薬剤耐性菌とは抗菌性物質に抵抗性を示す細菌のことであり、薬剤の作用部位を元々持たない自然耐性と、後天的に作用部位の変異や耐性遺伝子の獲得によって耐性となる場合があり⁽¹⁾、後者の機序として、抗生物質の分解能の獲得⁽²⁾、抗生物質結合能を持つタンパク質の獲得⁽³⁾、菌体外への薬剤排出^(4, 5)などが存在する。カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE)、多剤耐性アシネトバクター (MDRA)、多剤耐性緑膿菌 (MDRP)、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) などは日和見感染症を引き起こし、感染防御機能の低下した患者では尿路感染症や敗血症など様々な感染症を起こすことがある⁽⁶⁾。薬剤耐性菌の感染者数は2013年で70万人以上に達し、2050年には1,000万人に上ると予測されている⁽⁷⁾。しかし、新規の抗生物質の開発

は停滞しているのが現状である⁽⁸⁾。

一方で、抗生物質の作用がカテキン類によって増強される例がいくつか報告されている。例えば、緑茶の成分である (-)-エピカテキンガレートがメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) に対してβ-ラクタム系抗生物質オキサシリンの抗菌効果を増強させる報告がある⁽⁹⁾。また、黄色ブドウ球菌において、カテキン水和物がリンコマイシン系の抗生物質クリンダマイシンおよびマクロライド系抗生物質エリスロマイシンと相乗効果を示す報告もある⁽¹⁰⁾。そこで私たちは、薬剤耐性菌による感染症の拡大に対抗するため、既存の抗生物質を効果的に利用する方法を開発することを本研究の目的とした。

私たちが注目したのは、これらの先行研究で用いられていたカテキン類である^(9, 10)。カテキン類およびカテキン由来の化合物の中から抗生物質の抗菌作用を促進するものの探索を試みた。また、今後のスクリーニングのために、抗菌作用の促進をもたらす化合物の構造を特定することとした。

【実験方法】

1. 材料

抗生物質の抗菌力を示す指標菌として大腸菌 (*Escherichia coli*) AB1157株、抗生物質としてアンピシリン (β-ラクタム系) を用いた。また試料として (-)-エピカテキン，(+)-カテキン，(-)-エピガロカテキンガレート，(+)-タキシフォリンを用いた (図1 (A)~(D))。

指標菌用培地としてLB (寒天) 培地を用いた。LB (寒天) 培地の組成は、NaCl 0.5g, Yeast Extract 1.0g,

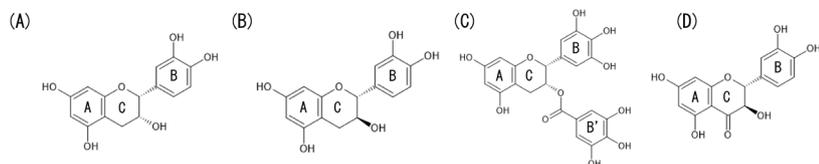


図1 ■ 本研究で用いた試料化合物の構造式

(A): (-)-エピカテキン, (B): (+)-カテキン, (C): (-)-エピガロカテキンガレート, (D): (+)-タキシフォリンを示しており, 図中のA, B, Cはそれぞれ一般にA環, B環, C環と呼ばれる部位を示している⁽⁵⁾.

Hipolypepton 2.0 g, (Agar 2.5 g), dH₂O 200 mLである.

2. 方法

大腸菌 AB1157 株を LB 液体培地に入れ, 37°C で一晩振とう培養した. その後, LB 液体培地で菌液を 1/10 に希釈し, 100 μM の濃度になるようにアンピシリン水溶液を, 2.0 mM の濃度になるように (-)-エピカテキン, (+)-カテキン, (-)-エピガロカテキンガレート, (+)-タキシフォリンをそれぞれ加え, 37°C で 3 時間振とう培養した. そして各菌液をリン酸緩衝液で適当に希釈し, 直径 9 cm のシャーレに作製した LB 寒天培地に 100 μL ずつ撒き, 37°C で 18 時間培養した. 培養後, 生育したコロニー数を計測し, 各々の希釈率に応じて菌数を算出した. 対照実験区の菌数を 100% とし, 各実験区の菌数の相対値を次の式(1)の通り求め, 生存率とした.

$$\text{生存率}[\%] = \frac{\text{各実験区の菌数}}{\text{対照実験区の菌数}} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

3. 検定方法

Kruskal-Wallis 検定を用いて有意水準 5% で 3 または 5 群間の平均値の比較を行い, 差が認められた場合, 有意水準 5% でマンホイットニーの U 検定による多重比較を行った.

【結果】

1. 実験 1

大腸菌 AB1157 株において, アンピシリンを加えて振とう培養した実験区のコロニー数を計測し, アンピシリンを加えなかったものを対照実験区として生存率を算出し, アンピシリン単独での抗菌効果を検証した. その結果, アンピシリン 100 μM で生存率 0.055% (Kruskal-Wallis の検定: $p = 2.0 \times 10^{-10}$, アンピシリン 10 μM-100 μM 間のマンホイットニーの U 検定: $p = 3.7 \times 10^{-6}$ ともに有意水準 5% で有意差あり) であり, 十分な抗菌効果が見られており, 以後, この濃度をアンピシリン処理濃度とするものと決定した (図 2).

2. 実験 2

大腸菌 AB1157 株において, 各試料を単独に加えて振とう培養した実験区のコロニー数を計測し, 試料を何も加えなかったものを対照実験区として生存率を算出し,

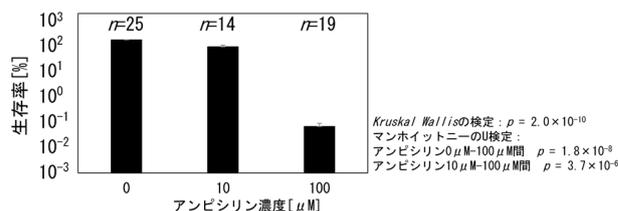


図2 ■ アンピシリン処理時の大腸菌 AB1157 株の生存率

生存率は, アンピシリン非処理時 (対照実験区) における菌数を 1 とし, 各実験区の菌数を対照実験区の菌数で除したもので算出しており, エラーバーは各実験区の平均値の標準誤差とした.

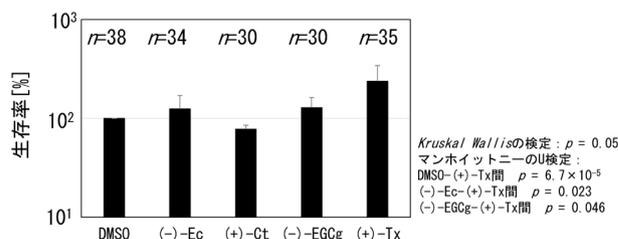


図3 ■ 各試料単独処理時の大腸菌 AB1157 株の生存率

DMSO (ジメチルスルホキシド) は各試料の溶媒として用いた対照実験区であり, (-)-Ec は (-)-エピカテキン, (+)-Ct は (+)-カテキン, (-)-EGCg は (-)-エピガロカテキンガレート, (+)-Tx は (+)-タキシフォリンを加えた実験区を示す. 生存率は, 対照実験区における菌数を 1 とし, 各実験区の菌数を対照実験区の菌数で除したもので算出しており, エラーバーは各実験区の平均値の標準誤差とした.

各試料単独での抗菌効果を検証した. その結果, (-)-エピカテキン, (+)-カテキン, (-)-エピガロカテキンガレート, (+)-タキシフォリンは, いずれも溶媒である DMSO にできるだけ溶解させ, 菌液に処理する際の菌体に対する影響を抑えるために DMSO の占める体積を 1/100 程度に抑えた 2.0 mM の濃度では単独での抗菌効果は示さなかった (図 3).

3. 実験 3

大腸菌 AB1157 株において, 各試料とともにアンピシリン 100 μM を加えて振とう培養した実験区のコロニー数を計測し, アンピシリン非存在下で各試料を単独で加えたものを対照実験区として生存率を算出し, アンピシリンの抗菌作用の強さを検証した. その結果, 各試料とアンピシリンの同時処理時の生存率の中で, (+)-タキシ

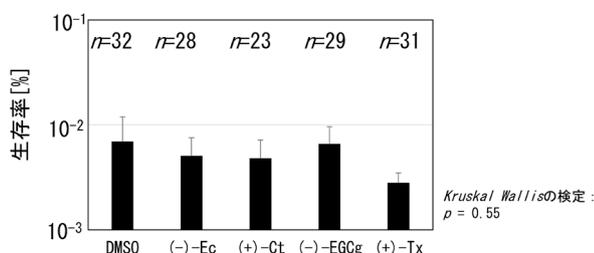


図4 ■ アンピシリンと各試料の同時処理時の大腸菌 AB1157 株の生存率

DMSO (ジメチルスルホキシド) は各試料の溶媒として用いた対照実験区であり, (-)-Ec は (-)-エピカテキン, (+)-Ct は (+)-カテキン, (-)-EGCg は (-)-エピガロカテキンガレート, (+)-Tx は (+)-タキシフォリンを加えた実験区を示す. 生存率は, 各試料の単独処理時における菌数を1として, 各実験区の菌数を各試料単独処理実験区の菌数で除したもので算出しており, エラーバーは各実験区の平均値の標準誤差とした.

フォリンとアンピシリンの同時処理時の生存率は, アンピシリン単独処理時の生存率の約40%に低下していたものの, *Kruskal-Wallis* の検定において $p=0.05$ であり, 各試料とアンピシリンを同時に加えた実験区間の生存率に有意水準5%で有意差を確認することはできなかった (図4).

【考察】

今回の実験では, カテキン類およびその代謝産物は単独では抗菌効果をもたらさなかった. また, 統計的にはアンピシリンの抗菌効果に差は生じさせなかったものの, (+)-タキシフォリンはアンピシリンの抗菌効果を促進する可能性を見出すことができた.

カテキン類は2個のベンゼン環 (図1中の一般にA環, B環と呼ばれる部位) が, この3個の炭素原子と1個の酸素原子とともに形成している6員環 (図1中の一般にC環と呼ばれる部位) を形成している化合物である⁽¹¹⁾.

(+)-カテキン (図1(B)) と (+)-タキシフォリン (図1(D)) の構造上の違いは, C環の4位の炭素がカルボニル化されていることである. 大腸菌 AB1157 株において, (+)-タキシフォリンは, 単独での抗菌効果は示さず, むしろ大腸菌の増加に寄与しており (図3), これは (+)-タキシフォリンの持つ抗酸化作用⁽¹²⁾ によって酸化ストレスが低減されたことに起因した可能性がある. 一方で, (+)-タキシフォリンは, アンピシリンと併用した場合は, カテキン類を用いた場合と同程度の生存率まで低下したことから, (+)-タキシフォリンは, より低濃度のアンピシリンを用いるなど, 条件によってはアンピシリンの抗菌効果を促進できる可能性が示唆された (図4). (+)-カテキンではこのような可能性は見出せなかったことから, 今後このような効果が確認できた場合,

(+)-タキシフォリン中のC環のカルボニル基に起因することになる.

実験2の結果より, 大腸菌 AB1157 株において, (-)-エピカテキン, (+)-カテキン, (-)-エピガロカテキンガレートは, それら単独での抗菌効果は示さなかった (図3). また, 実験3の結果より, アンピシリンの抗菌効果に対してはDMSOと比べて (-)-エピカテキン, (+)-カテキン, (-)-エピガロカテキンガレートに差異は認められず, 促進も抑制も行わなかった (図4). (-)-エピカテキン (図1(A)) と (+)-カテキン (図1(B)) の構造上の違いは, C環から出るB環とヒドロキシ基 (-OH) の立体的な配座が異なる点であり, これらは立体異性体の一種であるジアステレオマーの関係にある. また, (-)-エピカテキン (図1(A)) と (-)-エピガロカテキンガレート (図1(C)) の構造上の違いは, (-)-エピガロカテキンガレートではB環にフェノール性ヒドロキシ基が1個追加されていることと, C環から出るヒドロキシ基がガレート基 (図1(C) 中のB') に置換されていることである. このことから, (-)-エピカテキンと (+)-カテキンの構造上の違いであるB環とヒドロキシ基の立体的な配座や, (-)-エピカテキンと (-)-エピガロカテキンガレートの構造上の違いであるC環から出るヒドロキシ基の存在およびB環のフェノール性ヒドロキシ基の数はアンピシリンの抗菌効果には影響がないことが明らかになった.

本研究で用いた (+)-タキシフォリンは, メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対してβ-ラクタム系であるアンピシリン, ニューロキノ系であるレボフロキサシンやセファロsporin系のセフトジジム, マクロライド系のアジスロマイシンの抗菌効果を高めるとい報告がある⁽¹³⁾. 本研究の成果より, グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌だけでなく, グラム陰性菌である大腸菌においても, (+)-タキシフォリンがアンピシリンの抗菌効果を促進する可能性はある. (+)-タキシフォリンはシベリアカラマツなどごく一部の樹木からしか抽出できなかったが, 近年, カテキン分解菌 *Burkholderia oxyphila* OX-01 株によって (+)-カテキンと (-)-エピカテキンから容易かつ安定的に (+)-タキシフォリンに変換できることが発見されており⁽¹⁴⁾, (+)-タキシフォリンを用いて, 安価に効果的に抗生物質を使用する方法が開発できる可能性がある.

本研究の意義と展望

本研究で得られた成果をもとに, 今後は (+)-タキシ

フォリンとアンピシリンを同時処理する際の条件をさらに検討していくとともに、C環にカルボニル基を持つ化合物に着目して、アンピシリンの抗菌効果を促進させる化合物を探索していきたい。また、アンピシリン以外の抗生物質への影響や大腸菌以外の細菌に対する効果も検証していきたい。そして、これらの知見をもとに、抗生物質の抗菌効果を促進する化合物をさらに効率良く探索していきたい。

これらの実験を進めていくことで、既存の抗生物質を効果的に利用するための基礎的なデータを集めることができると考えられる。そのデータを活用することによって、既存の抗生物質を用いて薬剤耐性菌感染症の拡大に対抗できる有効な手段を開発できる可能性がある。今後、集めたデータを発信し、人類の健康や福祉に貢献していきたい。

謝辞：本研究はJSTグローバルサイエンスキャンパス東北大学探求型「科学者の卵養成講座」、公益財団法人斎藤憲三・山崎貞一顕彰会、公益財団法人武田科学振興財団の支援のもとで実施されました。

文献

- 1) 農林水産省：動物医薬品検査所検査第二部抗生物質製剤検査室：薬剤耐性菌についてのQ&A, 2010.
- 2) E. P. Abraham & E. Chain: *Nature*, **146**, 837 (1940).

- 3) M. P. Jevons: *BMJ*, **1**, 124 (1961).
- 4) S. S. Pao, I. T. Paulsen & M. H. Saier Jr.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 1 (1998).
- 5) M. Putman, H. W. van Veen & W. N. Konings: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**, 672 (2000).
- 6) 柴山恵吾：一般社団法人日本感染症学会webサイト, <https://www.kansensho.or.jp/ref/d71.html>, 2019.
- 7) M. Cecchini, J. Langer & L. Slawomirski: *G7 OECD Report* (2015).
- 8) T. F. Schäberle & I. M. Hack: *Trends Microbiol.*, **22**, 165 (2014).
- 9) S. Shiota, M. Shimizu, T. Mizushima, H. Ito, T. Hatano, T. Yoshida & T. Tsuchiya: *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 1388 (1999).
- 10) M. Mikłasińska, M. Kępa, R. D. Wojtyczka, D. Idzik, A. Dziejczak & T. J. Waśnik: *Molecules*, **21**, 244 (2016).
- 11) 堤 広之：*YAKUGAKU ZASSHI*, **132**, 925 (2012).
- 12) F. Topal, M. Nar, H. Gocer, P. Kalin, U. M. Kocyigit, İ. Gülçin & S. H. Alwaseel: *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **31**, 674 (2016).
- 13) J. An, G. Y. Zuo, X. Y. Hao, G. C. Wang & Z. S. Li: *Phyto-medicine*, **18**, 990 (2011).
- 14) Y. Otsuka, M. Matsuda, T. Sonoki, K. Sato-Izawa, B. Goodell, J. Jelison, R. R. Navarro, H. Murata & M. Nakamura: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **80**, 2473 (2016).

Copyright © 2022 公益社団法人日本農芸化学会
DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.60.486