

【原著・基礎】

Streptococcus pneumoniae に対する epigallocatechin gallate の殺菌作用伊藤 勇¹⁾・大久保幸枝¹⁾・福地 邦彦²⁾・原 征彦³⁾・島村 忠勝¹⁾¹⁾昭和大学医学部細菌学教室*²⁾昭和大学臨床病理学教室³⁾東京フードテクノ株式会社

(平成13年12月13日受付・平成14年1月15日受理)

Streptococcus pneumoniae に対する緑茶抽出エキスおよび茶から抽出、精製したカテキン(-) epigallocatechin gallate: EGCg) の抗菌・殺菌作用について検討した。菌株は標準株9株と臨床分離株49株を用いた。これら菌株に対する EGCg の MIC は 250 µg/mL (MIC₉₀) であった。殺菌実験において緑茶抽出エキスは、通常飲用濃度 (2.5%) で十分な殺菌作用を示した。EGCg 500 µg/mL では 1×10⁴/mL の菌 (初発菌数) が5時間で死滅した。しかし EGCg 250, 125 µg/mL では初発菌数の 1/100 ~ 1/1,000 にまで減少した生菌数が再び増加した。そこでこの系において、6時間経過した時点で MIC 未満の EGCg を添加したところ、1/2 MIC の添加によって再増殖することなく死滅することがわかった。さらに penicillin-resistant *S. pneumoniae* (PRSP) 11株に対する EGCg とペニシリンとの併用効果について検討した。1/4 MIC の EGCg を併用することによって、高度耐性株が感受性株と同じ濃度のペニシリンで殺菌されることがわかった。そこで、PCR法を用いてこれら耐性株の耐性遺伝子の検出を行ったところ、penicillin binding protein (PBP) 2B class B が8株検出された。PBP 2B class A は0株、他の3株は別の耐性獲得機序によるものと思われた。このことから、PRSP に対するペニシリンと EGCg の併用効果は、PRSP の耐性獲得機序に関係なく得られることが判明した。

Key words: カテキン(-) epigallocatechin gallate: EGCg), *S. pneumoniae* (PRSP, PSSP), 併用効果, benzylpenicillin (PCG), Penicillin binding protein (PBP) 2B

われわれは、茶エキスおよび茶より抽出・精製したカテキンが、下痢起因菌^{1,2)}、呼吸器感染症起因菌^{3,4)}、皮膚糸状菌^{5,6)} などに対して抗菌・殺菌作用を示すこと、細菌性毒素を阻害すること⁷⁻⁹⁾、また細菌細胞膜の脂質二重層を破壊することによって殺菌作用を示すことを証明した^{10,11)}。カテキンの構造と殺菌作用や抗毒素作用との関係についてもすでに報告した^{12,13)}。さらにメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA) に対するオキサシリンの抗菌作用がカテキンを併用することによって出現すること^{14,15)}などを報告してきた。

近年、多剤に耐性を示すペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) の増加が世界的な問題となっている。わが国では、1980年代の後半から PRSP による重症感染症例の報告が散見されはじめた^{16,17)}が、それらの治療に用いられた抗菌薬は多種多様であり、症例の予後も多岐にわたっている。PRSP による臨床的難治例の増加に伴い、抗菌薬の一層慎重な選択が求められており、最近さまざまな化学療法薬による併用療法が試みられている。

われわれは、茶エキスおよびカテキンが臨床材料から分離された *Streptococcus pneumoniae* に抗菌・殺菌作用を示すこと、さらに PRSP に対して MIC 未満のカテキンとペニシ

リンを併用することによって、PRSP が penicillin susceptible *S. pneumoniae* (PSSP) と同じ濃度のペニシリンに感受性を示すようになることを見出したので報告する。

I. 材料と方法

1. 供試菌株

S. pneumoniae 58株のうち、1株は教室保存株 IID 553, 8株はそれぞれ血清型の異なる標準株 (KK 23, KK 47, KK 57, KK 85, KK 108, MA-1, KK 112, KK 134), また49株は昭和大学病院臨床分離株である。標準株は北里大学基礎研究所の佐々木武二博士によって患与されたものを用いた。臨床分離 *S. pneumoniae* のうち MIC が 0.06 µg/mL 以下をペニシリン感受性肺炎球菌 (penicillin-susceptible *S. pneumoniae*; PSSP), 0.1 ~ 1 µg/mL をペニシリン中等度耐性肺炎球菌 (penicillin-intermediate *S. pneumoniae*; PISP), 2 µg/mL 以上をペニシリン耐性肺炎球菌 (penicillin-resistant *S. pneumoniae*; PRSP)⁸⁾とした。今回、われわれは高度耐性株である PRSP に対して照準を絞りカテキンとの併用実験を行った。

2. カテキン

*東京都品川区旗の台1-5-8

(-) epigallocatechin gallate (EGCg) (純度 98% 以上, HPLC (東京フードテクノ) を用時滅菌精製水に溶解, 所定濃度に希釈して用いた。

3. 緑茶抽出エキスの調整

緑茶は仲井芳東園 (京都, 田辺) の無農薬, 無添加, 単一茶葉を使用した。抽出方法は, 茶葉は 20 w/v% に PBS で室温 3 時間浸出後, ガーゼ 3 枚で濾過し, 10% NaOH または 10% HCl にて pH を 7.0 に修正, 15,000 rpm (TOMY MC-150), 5 分遠心した上清をメンブレンフィルター (Mini-sart, NML 0.2 μm) で濾過したものを緑茶抽出エキスとした。実験に際し, 用時所定濃度に希釈して用いた。

4. Benzylpenicillin (Penicillin G: PCG)

Penicillin G (PCG, 和光純薬) は, 用時滅菌精製水に溶解, 所定濃度に希釈して用いた。

5. 微量液体希釈法による MIC の測定

使用した菌株の EGCg および PCG に対する MIC の測定は, 日本化学療法学会標準法¹⁹⁾および米国, NCCLS²⁰⁾に準じて行った。ただし, ウマまたは羊の血液に代えて, 血清 (Fetal Bovine Serum Lot. No.4080315 Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd) を使用した。なお, 血液添加 cation adjusted Mueller-Hinton Broth (CAMHB; Difco Lab., USA) (以下 CAMHB) と血清添加 CAMHB との間の菌の増殖に差のないことを確認している。

6. 殺菌実験

(1) EGCg 単独による殺菌

2 倍濃度の CAMHB と 2 倍濃度の EGCg 溶液または滅菌精製水 (control) の等量混合液に, CAMHB で 15 時間培養した菌液を final で 1×10^4 CFU/mL の菌濃度に添加し, 添加直後, 1, 3, 5, 24 時間 37 °C, 5% CO₂ 存在下で培養後の生菌数を血液寒天平板を用いて経時的に CFU カウント法で測定した。血液寒天平板は 3% 馬無菌脱繊維血 (日本生物材料センター) 添加 Brain Heart Infusion agar (Difco Lab., USA) を使用した。

(2) 緑茶抽出エキスによる殺菌

2 倍濃度の CAMHB と 2 倍濃度の緑茶抽出エキスおよび滅菌精製水を用いて, 緑茶エキス濃度が 0, 2.5, 5.0, 10 w/v% となる各混合液を作成した。この各混合液に, CAMHB で 15 時間培養した菌液を約 1×10^4 CFU/mL に添加, 添加直後, 1, 3, 5, 24 時間培養後の生菌数を EGCg 単独の場合と同様に CFU カウント法で測定した。

(3) MIC 未満の EGCg による殺菌

S. pneumoniae は EGCg の MIC が 250 μg/mL を示した教室保存株 (IID 553) を用いた。試験液は (1) および (2) の場合と同様に 2 倍濃度の CAMHB と滅菌精製水または EGCg 溶液を用いて EGCg の濃度が 125 μg/mL (1/2 MIC) のもの 4 系列と EGCg を含まない

もの 1 系列を作成した。それぞれの系に培養菌液を 1×10^4 CFU/mL に添加し, 殺菌実験を行った。実験開始後 6 時間経過した時点で EGCg (125 μg/mL) の系に, さらに EGCg を追加した。追加後の EGCg 濃度がそれぞれ 0, 31.3, 62.5, および 125 μg/mL となるように EGCg を添加し, 開始直後, 1, 3, 6 (EGCg 追加直前), 7, 10, 24 時間後の生菌数を CFU 法で測定した。

(4) EGCg と PCG との併用による殺菌

PRSP 株を使用した。2 倍濃度 CAMHB と滅菌精製水との等量混合液を control とした。EGCg の濃度は各菌株の 1/4 MIC を, また PCG の濃度は感受性株の上限である 0.06 μg/mL をそれぞれ使用した。すなわち, PCG 単独は 2 倍濃度 CAMHB と 0.12 μg/mL の PCG を等量混合 (PCG 濃度: 0.06 μg/mL), EGCg 単独は 2 倍濃度の CAMHB と 1/2 MIC の EGCg を等量混合した (EGCg 濃度: 1/4 MIC)。PCG と EGCg の併用はまず PCG 0.24 μg/mL と EGCg 1 MIC とを等量混合 (PCG: 0.12 μg/mL, EGCg: 1/2 MIC) し, さらにこの混合液に 2 倍濃度の CAMHB を等量加え, それぞれの最終濃度を PCG: 0.06 μg/mL, EGCg: 1/4 MIC とした。これら各試験液に, CAMHB で 15 時間培養した菌液を約 1×10^4 CFU/mL に添加し, 添加直後, 3, 6, 18 時間培養後の生菌数を CFU カウント法で測定した。

7. PCR 法による耐性遺伝子の検出

PBP 2 B 遺伝子における変異をみるため Garcia ら²¹⁾, Dowson ら²²⁾が報告している遺伝子の塩基配列にもとづき下記のプライマーを用いて, 肺炎球菌確認の autolysin 遺伝子の検出, および耐性遺伝子 class A および class B の検出を試みた。DNA 抽出には核酸抽出剤セパジーン (三光純薬) を用いた。

S. pneumoniae に特有な autolysin 遺伝子 (LyA)²¹⁾ の 273 bp の primer pair: Forward: 5'TGAAGCGGAT TATCACTGGC 3'; Reverse: 5'GCTAAACTCCCTGTAT CAAGCG 3';

Penicillin-Binding Protein 2 B (PBP 2 B) class A 遺伝子²²⁾の 215 bp の primer pair: Forward: 5'CTAG GCCAATGCCGATTACG 3'; Reverse: 5'AGTAGATT CATCTGGTAGGTC 3';

PBP 2 B class B 遺伝子²²⁾の 286 bp の primer pair: Forward: 5'CCAAACCTTAACAGATCAGC 3'; Reverse: 5'AGTAGATTCATCTGGTAGGTC 3';

DNA 増幅反応条件は template DNA には 0.1 μg を使用し, 熱変性 94 °C 30 sec, アニール 50 °C 90 sec, 伸張反応 72 °C 90 sec を 1 cycle として 30 cycle で行った。PCR 産物は 5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動で確認した。DNA の抽出に用いた菌株は PRSP 12 株 (標準株 1 株, 臨床分離株 11 株) と PSSP 1 株 (標準株) である。

II. 成績

1. 微量液体希釈法による MIC

S. pneumoniae 58 株に対する EGCg および PCG 微量液体希釈法を用いての MIC を測定した。その結果、EGCg の MIC は *S. pneumoniae* 58 株のうち 125 µg/mL; 9 株, 250 µg/mL; 46 株, 500 µg/mL; 3 株であった。また PCG に対する MIC は 0.03 µg/mL 以下; 19 株, 0.06 µg/mL; 14 株, 0.13 µg/mL; 2 株, 0.5 µg/mL; 2 株, 1 µg/mL; 9 株, 2 µg/mL; 11 株, 4 µg/mL; 1 株であった。そこで EGCg および PCG に対する MIC₅₀, MIC₉₀ をそれぞれ求め、その結果を Table 1 に示した。

2. 緑茶抽出エキスの殺菌作用

緑茶抽出エキス (2.5 ~ 10 w/v%) の殺菌作用を EGCg の場合と同様に検討し、Fig. 1 に示した。その結果、10 w/v% の場合、菌は 3 時間後に検出限界以下となり死滅

した。5.0 w/v% の場合、3 時間後に生菌数は初発菌数の 1/1,000 程度まで減少し、24 時間で死滅した。2.5 w/v% では、5 時間後に 1/10 程度の減少であったが 24 時間後には死滅した。

3. EGCg の殺菌作用

S. pneumoniae IID 553 に対する EGCg 125, 250, 500 µg/mL による殺菌作用を Fig. 2 に示した。EGCg 500 µg/mL の場合、 1×10^4 /mL の菌が 3 ~ 5 時間で死滅した。EGCg 250 µg/mL の場合は、5 時間後までは時間の経過とともに減少し、検出限界以下となったが、以後増殖に転じた。EGCg 125 µg/mL の場合、生菌数の減少は初発菌数の 1/100 程度までで、5 時間以後は EGCg 250 µg/mL の場合と同様に増殖に転じた。

4. MIC 未満の EGCg による殺菌作用

3 の殺菌実験の結果、1 MIC または 1/2 MIC の場合、実験開始 5 ~ 6 時間までは生菌数を減少させるが、それ以後増殖に転ずることからこの時点で EGCg を追加し、試験液中の EGCg 濃度をある程度持続的に保つことを試みた。すなわち、EGCg 125 µg/mL (1/2 MIC) 実験系において、培養 6 時間後に EGCg を追加し、その後の殺菌作用を検討した。追加時に濃度が 125, 62.5, 31.3 µg/mL の EGCg を添加した。その結果 Fig. 3 に示すように control の菌数は 10 時間後にはほぼ平衡状態に達した。途中追加なしの EGCg 125 µg/mL では、培養 6 時間後までは減少傾向を示したが、その後増殖に転じた。62.5 および 125 µg/mL EGCg を追加した場合には、時間の経過とともに生菌数は減少し、実験開始 10

Table 1. Antibacterial activity of EGCg against clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*

Strain* (n = 58)	MIC (µg/mL)		
	range	50%	90%
Penicillin-susceptible (n = 46)	125-500	125	250
Penicillin-resistant (n = 12)	125-500	250	250

*49 clinical isolates and 9 reference strains.

Penicillin-susceptible (including intermediate) 1 µg/mL,

Penicillin-resistant: 2 µg/mL

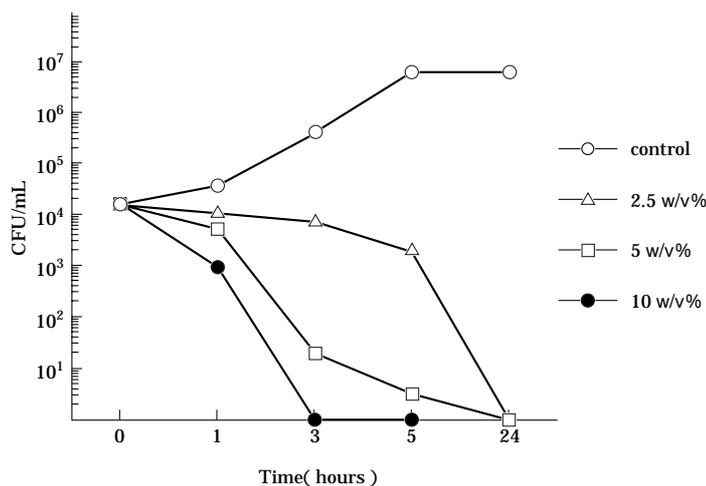


Fig. 1. Bactericidal activity of green tea extract on *Streptococcus pneumoniae*.

CAMHB medium with varying concentrations of tea-extract was included in culture tubes and then *S. pneumoniae* (1×10^4 /mL) added. After incubation, the number of viable bacteria (CFU) in broth was determined by the standard plate count with Brain Heart Infusion agar plates (additional 3% horse blood).

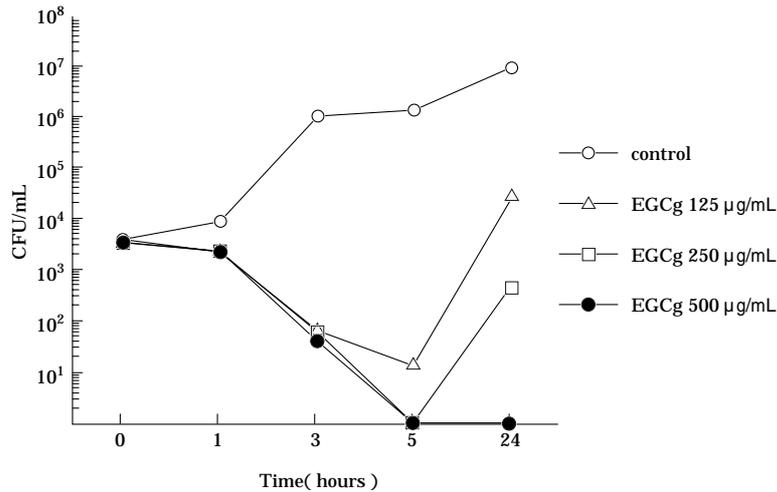


Fig. 2. Bactericidal activity of EGCg on *Streptococcus pneumoniae*. CAMHB medium with varying concentrations of EGCg was included in culture tubes and then *S. pneumoniae* (1×10^4 /mL) added. After incubation, the number of viable bacteria (CFU) in broth was determined by the standard plate count with Brain Heart Infusion agar plates (additional 3% horse blood).

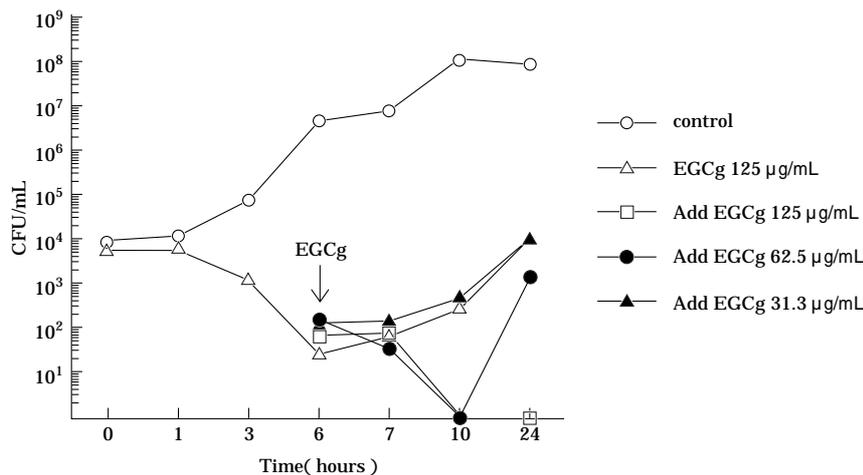


Fig. 3. Bactericidal effect of additional EGCg on *Streptococcus pneumoniae*. CAMHB medium with EGCg 125 µg/mL (half MIC) was dispensed in culture tubes and *S. pneumoniae* (1×10^4 /mL) added. After incubation, varying concentrations of EGCg (below MIC) was added 6 h later, and results revealed that remaining bacteria were killed at only half the MIC.

時間（追加後4時間）後にはいずれも検出限界以下となり125 µg/mL追加では、再増殖することなく死滅した。しかし62.5 µg/mLでは、24時間後に再び増殖していることが認められた。また、31.3 µg/mLでは追加なしのEGCg 125 µg/mLと同様の増殖曲線を示し、EGCgの追加効果はまったく見られなかった。

5. EGCgとPCGの併用による殺菌作用

菌株は、PCGに対するMICが2 µg/mLおよび4 µg/mLのPRSPを用いた。EGCgの濃度はMICの1/4（最終濃度が62.5 µg/mLまたは31.3 µg/mL）、PCGの濃

度はPSSPの上限となる0.06 µg/mLを用い、それぞれ単独の場合と同様にPRSP 5株の殺菌作用を検討し、Fig. 4に示した。その結果、PCG単独（0.06 µg/mL）の場合、PRSPは無添加controlと同じ増殖曲線を示した。また、31.3 µg/mL単独の場合、3時間後に検出限界以下まで減少したが6時間後から増殖に転じた。しかし、PCGとEGCgを併用した場合、EGCg単独の場合と同様に3時間で検出限界以下となり、その後再び増殖することはなかった。

6. PCR法によるPBP 2B耐性遺伝子の検出

S. pneumoniae autolysin 遺伝子 ltyA primer を用いて検索した PRSP 12 株すべてに 273 bp の DNA 増幅が認められた。PBP 2 B の class A 領域を増幅する primer で 215 bpDNA の増幅は認められず, class B primer で 286 bpDNA の増幅は 8 株に認められた。残りの 4 株 (PSSP 標準株 1 株と臨床分離株 3 株) では class A, class B ともに増幅されなかった。Fig. 5 に結果を示した。

III. 考 察

肺炎球菌の病原性は強く, 肺炎, 急性気管支炎などの

呼吸器感染症や中耳炎, 化膿性髄膜炎, 敗血症の起原菌となる。その病原因子として莢膜, 細胞壁, pneumolysin, autolysin, neuramidase, IgA-protease などが知られている。特に莢膜の存在は白血球やマクロファージに対する抗食菌因子であるばかりでなく, 莢膜多糖に対する特異抗体が型特異的な感染防御活性をもつことから主要病原因子として決定的である。またこの菌はヒトの鼻咽頭の常在菌で健康人の上気道から, かなりの頻度で分離される。

われわれは, 1988 年以来, 茶カテキンの各種病原菌

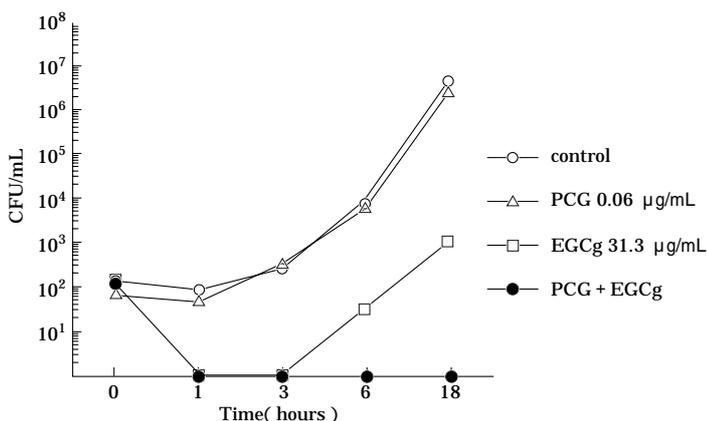


Fig. 4. Bactericidal effect in combination with benzylpenicillin (PCG) and EGCg on penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* (PRSP). After incubation, the number of viable bacteria (CFU) in broth was determined by the standard plate count with Brain Heart Infusion agar plates (additional 3% horse blood).

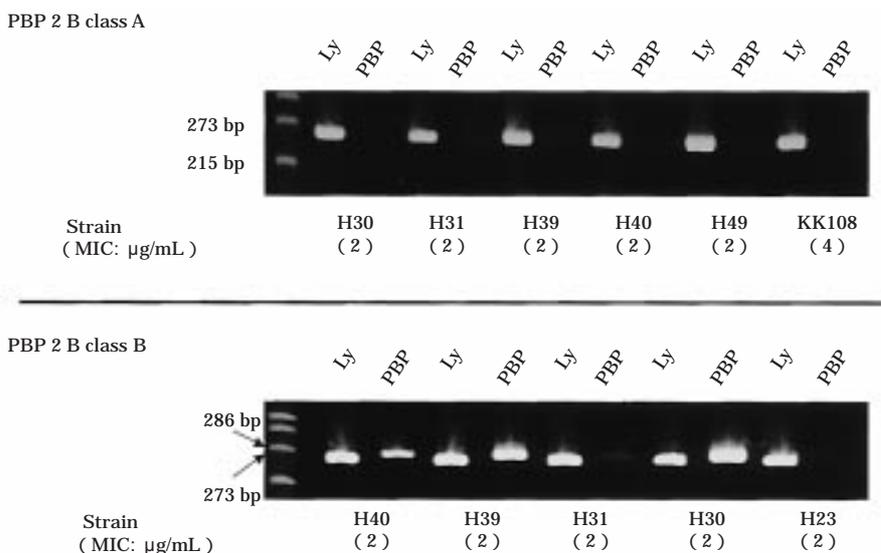


Fig. 5. Electrophoresis of PCR product.

Streptococcus pneumoniae DNA was used for 30 cycle PCR to amplify autolysin (LyA) and penicillin-binding protein (PBP) B class A or class B gene region. PCR products were separated on 5% polyacrylamide gel electrophoresis. Clinical isolated strain: H 23, H 30, H 31, H 39, H 40, H 49 Reference strain: KK 108

に対する抗菌、殺菌作用について報告してきたが、呼吸器感染症の起因菌であるマイコプラズマや百日咳菌に対しても殺菌作用のあることも報告した^{3,4)}。今回、肺炎球菌（臨床分離株 49 株，教室保存株および標準株 9 株）に対する緑茶抽出エキスおよびカテキンの抗菌・殺菌作用について検討した。10 w/v% の緑茶抽出エキスを含む CAMHB 中の菌 1×10^4 個/mL が 3 時間で検出限界以下となった。5 w/v%（通常飲用濃度の約 2 倍に相当）でも 3 時間で初発菌数の 1/1,000 まで減少し，24 時間で死滅した。さらに茶の主要カテキン成分である EGCg 500 μ g/mL は肺炎球菌の増殖を完全に抑制し，死滅させた。また，臨床分離株を含む肺炎球菌 58 株に対する EGCg の MIC₉₀ は 125~250 μ g/mL であった。この EGCg 濃度は抗生物質の MIC に比べればかなりの高値である，しかし茶葉 100 g 中にカテキンが約 10~15% 含まれており，その主要カテキン成分である EGCg は，全カテキン量の約 60% を占める (Table 2) ことから S. pneumoniae に対する EGCg の有効殺菌濃度は日常飲用濃度 (2.5~3%) の緑茶 1 mL 中に含まれる EGCg 量の 1/5~1/10 量と微量である。S. pneumoniae 58 株の PCG 感受性は PRSP 12 株，PSSP 46 株で臨床からの PRSP 検出率は約 20% と全国平均 (40~60%) に比し低値であった。従来，肺炎球菌はペニシリンに感受性を示していたが，1960 年代に出現したペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) は，海外では 1980 年頃から，わが国では生方や山崎らの報告^{23,24)}にみられるように 1990 年前半から年々増加傾向を示し，感染防御能の弱い小児や高齢者および免疫不全宿主が発症した場合，難治化，重症化しやすく世界的に問題となっている。

われわれは MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) に対して MIC 未満の oxacillin と EGCg とを併用することによって oxacillin が MSSA (methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*) と同じ濃度の oxacillin に感受性を示すようになることをすでに報告した^{14,15)}。今回の実験で茶エキスおよび EGCg が PRSP および PSSP に対して抗菌・殺菌作用を示したことから，さらに PRSP に対して MIC 未満の PCG と EGCg との併用を試みた。その結果，単独ではまったく抗菌活性を示さない PCG が PSSP と同じ PCG 濃度 (0.06 μ g/mL) に感受性を示した。このカテキンによる強い殺

菌作用のメカニズムは，ほぼ解明されている^{10,11)}。電子顕微鏡を用いて，*Trichophyton mentagrophytes* に対するカテキンの作用を形態学的に観察し，報告⁶⁾した。真菌の細胞壁は厚く，強固で肺炎球菌の細胞壁や莢膜とは異なるもの—グルカンやキチンなどの多糖に富んでおり，カテキンによる細胞壁の破壊，細胞質の流出，菌体の崩壊には細菌に比し，高濃度 (1~2 mg) のカテキンと長い作用時間 (48~72 時間) の要することを観察している。また蛍光色素を封入した人工 liposome 膜を用いた実験では，カテキンの細胞膜傷害活性が確認されている¹⁰⁾。さらにカテキンが *Staphylococcus aureus* の毒素やコレラ毒素および腸管出血性大腸菌の産生するペロ毒素などの細菌性蛋白毒素に結合し，これを不活化することもすでに報告しており⁷⁻⁹⁾，カテキンは多糖への作用は弱いがある種の蛋白に非常に強く結合し，作用を示すことが知られている。したがって，*S. pneumoniae* に対するカテキンの殺菌作用のメカニズムはまだ明らかではないが今回もカテキンが厚い多糖性莢膜の間隙から細胞壁へ徐々に作用し，penicillin binding protein (PBPs) に結合してその酵素活性を阻害または不活化し，細胞壁合成阻害剤である PCG と相乗的に PRSP に作用することも十分考えられる。

PRSP の耐性本態はペニシリン結合蛋白 (PBPs) の変異による薬剤の結合親和性の低下である。S. pneumoniae の有する 6 種類の PBPs (1A, 1B, 2A, 2B, 2X, 3) のうち PRSP では 1A, 2A, 2X, 2B に対する β -ラクタム薬の結合親和性が低下して耐性になるといわれている。遺伝子解析の結果からこれらの耐性遺伝子は，元来ペニシリン耐性の口腔内常在連鎖球菌の PBP 遺伝子の一部が肺炎球菌へ伝達され，肺炎球菌の PBP 遺伝子の一部と組換えを起こしたモザイク遺伝子とされている²⁴⁾。そこで今回分離された PRSP 株の遺伝的背景を知る目的で，PCR 法を用いて耐性遺伝子の検出を試みた。特に代表的な PBP 2B class B および PBP 2B class A の存在を検索した。その結果，臨床分離株 49 株中 7 株に PBP 2B class B が検出された。PBP 2B class A は検出されなかった。class B の検出率はわが国の全国統計と同じ 70% 弱であった。残りの 4 株はこれら以外の耐性遺伝子によるものと思われる。なお，高い MIC 値から考えて，今回の PBP class B 検出株のなかに class A, class B 以外の耐性遺伝子を保有する株があることも十分考えられる。

以上の結果から，厚い多糖性莢膜を有する肺炎球菌に対するカテキンの抗菌・殺菌作用は，PSSP, PRSP に関係なく発揮されること，また PRSP の遺伝的背景の違いにかかわらず，MIC 未満の PCG とカテキンとの併用で PRSP が PCG に対して PSSP と同じ感受性を示すことなどが明らかとなった。

わが国における PRSP の急速な増加に伴う，特に小

Table 2. Catechins in green tea-extract

Tea catechins	Relative %
(+)-catechin (+C)	-
(+)-gallocatechin (+GC)	1.6
(-)-epicatechin (EC)	6.4
(-)-epigallocatechin (EGC)	19.2
(-)-epicatechin gallate (ECg)	13.7
(-)-epigallocatechin gallate (EGCg)	59.1
Total	100.0

児にみられる上気道感染症の遷延・反復例の増加は、経口セフェム系薬の安易な投与とまったく無関係ではないと思われる。また Guillemot らは、経口 β -ラクタム系薬の少量長期投与による肺炎球菌耐性化の可能性を示唆している²⁵⁾。一方、患者背景として喘息性気管支炎や気管支過敏症、アトピー体質、アレルギー体質などいわゆる気道過敏症を示す患者の増加が気道クリアランス能の低下をもたらしており、肺炎球菌の他インフルエンザ菌、モラクセラ・カタラーリスなどによる複数菌感染の増加も指摘されている。

また、米国で開発された現行のワクチンはその有効性が認められているものの莢膜抗原によって血清型 82 型まで型別されているうちの 23 型しかカバーできないうえ、中耳炎を繰り返す小児に対して、抗体産生を十分に誘導できず、有効性の低いことが指摘されている。カテキンは臨床において、MRSA や緑膿菌による難治性呼吸器感染症の高齢患者へのカテキン吸入療法で菌の検出量の減少もしくは消失が報告されており²⁶⁾、その有効性がすでに確認されている。

さらにインフルエンザウイルスに対して、マウス、ブタを用いた動物実験およびヒトの臨床実験で A 型および B 型ウイルス両者の感染を阻止する可能性のあることが報告されている²⁷⁻³⁰⁾。

ワクチンによる防御効果もそれほど期待できない小児や高齢者においては、肺炎球菌による感染や発症を未然に防ぐことが第一である。

緑茶はわれわれ大人にとって日常的な嗜好飲料であっても小児にはなじみの少ない飲料と思われるがその主要成分であるカテキンの一般毒性はきわめて低く、副作用もなく抗生物質のような耐性菌の問題もない³¹⁾。吸入療法やうがいなどに緑茶やカテキン溶液の積極的な応用が鼻腔や咽頭における病原微生物のクリアランスに役立つばかりでなく感染や発症を未然に防ぐ効果も期待できる。

この研究にあたり標準菌株を恵与下さいました北里大学の佐々木武二先生に深く感謝致します。

文 献

- 1) Toda M, Okubo S, Shimamura T, et al.: The Bactericidal activity of tea and coffee. Lett Appl Microbiol 8: 123 ~ 125, 1989
- 2) 戸田眞佐子, 大久保幸枝, 島村忠勝, 他: 日本茶の抗菌作用及び殺菌作用について。日細菌誌 44: 669 ~ 672, 1989
- 3) 堀内善伸, 戸田眞佐子, 大久保幸枝, 他: 茶およびカテキンの百日咳菌に対する防御作用。感染症誌 66: 599 ~ 605, 1992
- 4) 帖佐 浩, 戸田眞佐子, 島村忠勝, 他: 茶カテキンのマイコプラズマに対する抗菌・殺菌作用。日細菌誌 46: 509 ~ 514, 1991
- 5) 大久保幸枝, 戸田眞佐子, 島村忠勝, 他: 白癬菌に対する茶およびカテキンの抗菌・殺菌作用。日細菌誌 46: 509 ~ 514, 1991
- 6) 豊島良枝, 大久保幸枝, 島村忠勝, 他: カテキンによる *Trichophyton mentagrophytes* の電子顕微鏡学的変化。感染症誌 68: 295 ~ 303, 1994
- 7) Okubo S, Ikigai H, Shimamura T, et al.: The antihemolysin activity of tea and coffee. Lett Appl Microbiol 9: 65 ~ 66, 1989
- 8) Toda M, Okubo S, Ikigai H, et al.: The protective activity of tea catechins against experimental infection by *Vibrio cholerae* O 1. Microbiol Immunol 36: 999 ~ 1001, 1992
- 9) 大久保幸枝, 佐々木武二, 原 征彦, 他: 腸管出血性大腸菌 O 157: H 7 に対する catechin の殺菌作用および抗毒素作用。感染症誌 72: 211 ~ 217, 1998
- 10) Ikigai H, Nakae T, Shimamura T, et al.: Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. Biochim Biophys Acta 1147: 132 ~ 136, 1993
- 11) 生貝 初, 原 征彦, 大鶴 洋, 他: Epigallocatechin gallate の膜傷害作用に関する研究 polymyxin B との比較。日化療会誌 46: 179 ~ 183, 1998
- 12) 戸田眞佐子, 大久保幸枝, 島村忠勝, 他: 茶カテキン類およびその構造類似物質の抗菌作用ならびに抗毒素作用。日細菌誌 45: 561 ~ 566, 1990
- 13) 生貝 初, 戸田眞佐子, 島村忠勝, 他: カテキンおよびテアフラビンの構造と溶血毒阻害作用について。日細菌誌 45: 913 ~ 919, 1990
- 14) 高橋雅彦, 戸田眞佐子, 島村忠勝, 他: カテキンによる MRSA に対するオキサシリンの抗菌作用出現。感染症誌 69: 1126 ~ 1133, 1995
- 15) 戸田眞佐子, 大久保幸枝, 島村忠勝, 他: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* に対するカテキンの抗菌・殺菌作用。日細菌誌 46: 839 ~ 845, 1991
- 16) Zhao W, Hu Z, Okubo S, et al.: Mechanism of Synergy between Epigallocatechin Gallate and β -Lactams against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agent And Chemotherapy: 1737 ~ 1742, 2001
- 17) 重野秀明, 山崎 透, 那須 勝, 他: β -ラクタム薬耐性肺炎球菌で死亡した 1 症例と分離菌の耐性機序。感染症誌 66: 508 ~ 515, 1992
- 18) 紺野昌俊, 生方公子: 改訂ペニシリン耐性肺炎球菌。ペニシリン耐性肺炎球菌研究会, 株式会社協和企画通信刊, 1999
- 19) 抗菌薬感受性測定法検討委員会報告 (1992)。日化療会誌 41: 183 ~ 189, 1993
- 20) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (NCCLS). M 100-S-II, 21, 2001
- 21) Garcia P, Garcia K L, Garcia E, et al.: Nucleotide sequence and expression of the pneumococcal autolysin gene from its own promoter in *Escherichia coli*. Gene 43: 265 ~ 272, 1986
- 22) Dowson C G, Hutchison A, Spratt B G: Nucleotide sequence of the penicillin-binding protein 2 B gene of *Streptococcus pneumoniae* strain R 6. Nucleic Acid Res 17: 7518, 1989
- 23) 生方公子: 全国各地で分離された肺炎球菌の疫学的研究。感染症誌 68: 1338 ~ 1351, 1994
- 24) 山崎整児, 杉本勇二, 松本行雄: ペニシリン耐性肺炎球菌の疫学的検討。感染症誌 72: 475 ~ 481, 1998
- 25) Guillemot D, Carbon C, Balkau B, et al.: Low dosage and long treatment duration of β -lactam.

- JAMA 279: 365 ~ 370, 1998
- 26) 山口晃史, 島村忠勝: 難治性呼吸器感染症とカテキン吸入療法。呼吸と循環 49: 173 ~ 178, 2001
- 27) Nakayama M, Suzuki K, Toda M, et al.: Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols. Antiviral Research 22: 289 ~ 299, 1993
- 28) 中山幹男, 戸田眞佐子, 大久保幸枝, 他: 紅茶エキスによるインフルエンザウイルス感染性の阻止 in vivo における検討。感染症誌 68: 824 ~ 829, 1994
- 29) 岩田雅史, 戸田眞佐子, 中山幹男, 他: 紅茶とうがい薬のインフルエンザウイルス感染性阻止の比較検討。感染症誌 71: 1175 ~ 1177, 1997
- 30) 中山幹男, 岩田雅史, 戸田眞佐子, 他: 茶カテキンと特異抗体のインフルエンザウイルスに対する効果。感染症誌 70: 1190 ~ 1192, 1996
- 31) Hara Y: Prophylactic function of tea polyphenols. In Food Phytochemicals for Cancer prevention, p.34 ~ 50 American Chemical Society, U. S. A., 1994

Antibacterial and bactericidal activity of EGCg on *Streptococcus pneumoniae*

Isamu Ito¹⁾, Sachie Okubo¹⁾, Kunihiro Fukuchi²⁾,
Yukihiko Hara³⁾ and Tadakatsu Shimamura¹⁾

¹⁾Departments of Microbiology and Immunology, and ²⁾Clinical Pathology, Showa University School of Medicine, 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa, Tokyo 142-8555, Japan

³⁾Tokyo Food Techno Co., Ltd.

The antibacterial activity of (-)epigallocatechin gallate (EGCg), purified from green tea was studied using 9 reference strains and 49 clinical isolated strains of *Streptococcus pneumoniae*. The MIC₉₀ of EGCg against *S. pneumoniae* was 250 µg/mL. The concentration of EGCg having antibacterial activity is equal to a daily consumable concentration of tea. The time-killing assay showed that a concentration of 500 µg/mL of EGCg showed marked killing activity against 1×10⁴mL of bacteria (initial bacterial count) within 5 hours. However, 250 or 125 µg/mL of EGCg killed only moderate numbers of bacteria and remaining bacteria spread again later. To these remaining bacteria, EGCg at concentrations below the MIC was added 6 hours later. In these cases, remaining viable bacteria were killed using only half the MIC of EGCg. We studied the bactericidal effects of EGCg combined with benzylpenicillin (PCG) using 11 strains of penicillin-resistant *S. pneumoniae* (PRSP). Combining PCG with 1/4 the MIC of EGCg the concentration of PCG (0.06 µg/mL) that kills penicillin-sensitive strains now also killed highly penicillin-resistant strains. Analysis of penicillin-resistant genes in PRSP by polymerase chain reaction (PCR) showed 8 penicillin binding protein (PBP) 2 B class B strains but no PBP 2 B class A strain, indicating that the combined antibacterial effect of penicillin and EGCg on PRSP was obtained regardless of the resistance acquisition mechanism.