

# MRSA に対する抗生物質の緑茶エキスによる併用抗菌作用の増強

山崎 堅一郎

大宮赤十字病院検査部\*

(平成 8 年 2 月 28 日受付・平成 8 年 4 月 9 日受理)

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) に対する緑茶 (*Camellia sinensis*) エキスと 17 薬剤との相乗的抗菌効果について、MRSA 塗布平板に緑茶エキスとセンシディスクを併置し、その間に生じた阻止帯の有無を調べた。その結果、 $\beta$ -ラクタム剤の cefazolin (CEZ), cefotiam (CTM), cefmetazole (CMZ), ceftizoxime (CZX), flomoxef (FMOX), imipenem (IPM), ampicillin (ABPC) と緑茶エキスとの間に明瞭な阻止帯が観察され、MRSA に対する相乗的抗菌効果が認められた。しかし、oxacillin (MPIPC), carumonam (CRMN) および  $\beta$ -ラクタム剤以外の薬剤, clindamycin (CLDM), vancomycin (VCM), netilmicin (NTL), levofloxacin (LVFX), chloramphenicol (CP), minocycline (MINO), erythromycin (EM), fosfomycin (FOM) では、この効果は 7 薬剤に比べわずかに観察されるか、あるいはまったく観察されなかった。明瞭な阻止帯が観察された  $\beta$ -ラクタム剤 (CEZ, CTM, CMZ, CZX, FMOX, IPM, ABPC) の MIC 値は、緑茶エキス添加により顕著に低下した。

**Key words:** MRSA, 抗生物質, 緑茶エキス, *Camellia sinensis*,  $\beta$ -ラクタム系薬剤

近年、抗生物質以外の抗菌物質について研究がなされ、青森ヒバから抽出されたヒバ油、およびヒバ油から分離精製されたヒノキチオール<sup>1)</sup>、緑茶から分離精製された (-) エピガロカテキンガレート (EGCg)、および紅茶から分離精製されたテアフラビンジガレート (TF3) が MRSA に対して抗菌効果のあることが報告され<sup>2)</sup>、院内感染予防や環境清浄化への応用が期待されている。

多くの研究成果から茶の生物活性も解明されつつある。病原微生物に対しては、グラム陽性、陰性を問わず、細菌性下痢起因菌<sup>3,4)</sup>、*Bordetella pertussis*<sup>5)</sup>、*Trichophyton mentagrophytes*<sup>6)</sup>、*Streptococcus mutans*<sup>7-9)</sup> およびウイルス<sup>10-13)</sup> などその効果は多岐にわたっている。作用メカニズムも複雑であり、抗毒素作用、菌付着抑制作用などによる抗菌殺菌活性、ウイルスの感染阻止作用等、対応する微生物により異なる。

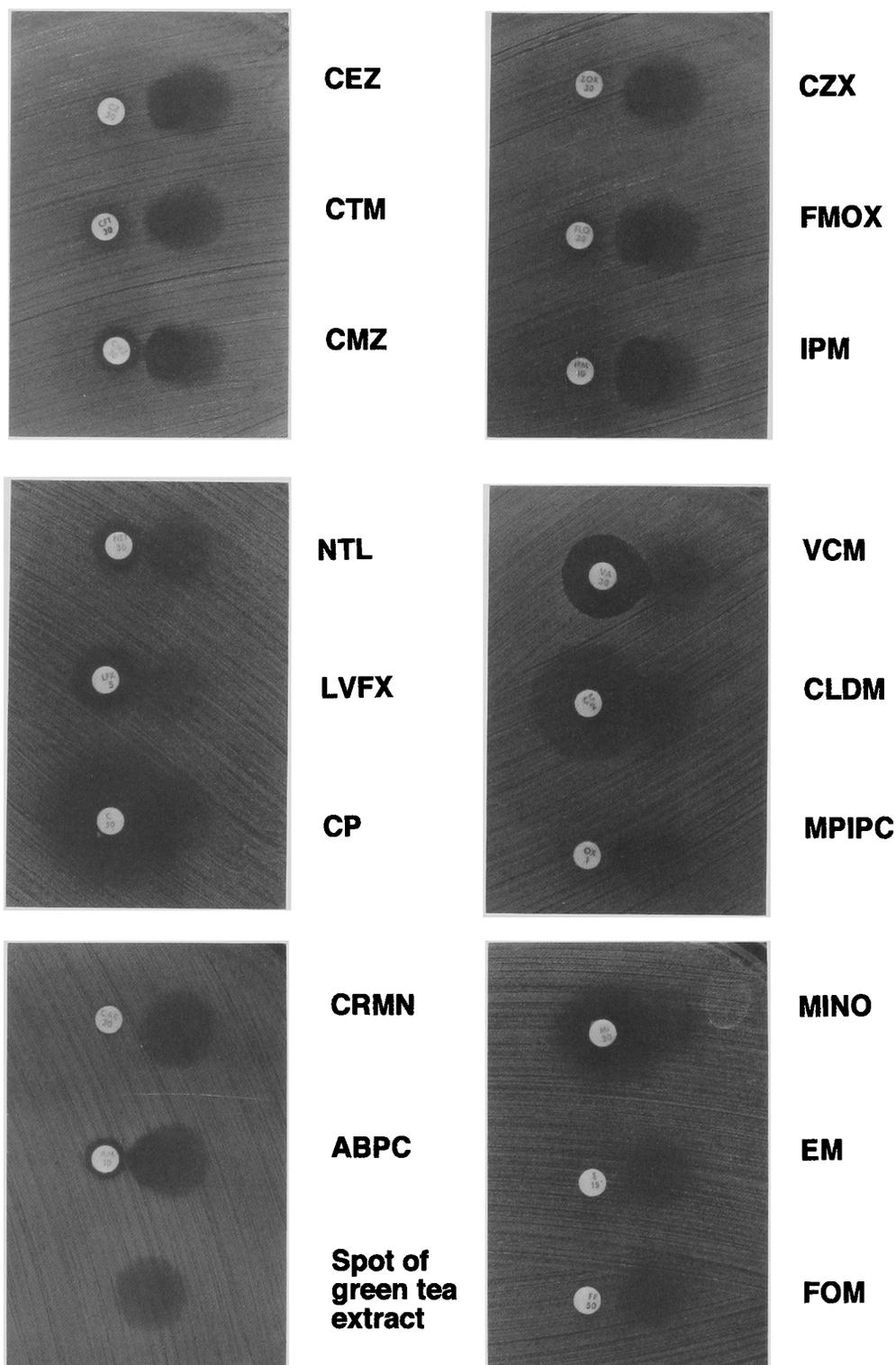
戸田らは、日本茶が *Staphylococcus* や *Vibrio* など多くの腸管感染症起因菌に対し抗菌、殺菌作用を示し、茶葉の抗菌活性および抗毒素作用にカテキン類の関与があることを示唆した<sup>3,4)</sup>。堀内らは、百日咳菌<sup>5)</sup> に対して緑茶エキス、紅茶エキスおよび EGCg, TF3 が殺菌、菌付着抑制、毒素不活化作用を通じて防衛的に作用する可能性を示唆した。茶の抗菌、殺菌作用は真菌についても観察され、大久保らは、*T. mentagrophytes*<sup>6)</sup> に対する殺菌効果は、紅茶エキス濃度、接触時間に依存することを認めた。しかし、TF3 に比べ、EGCg は殺菌効果を示さなかった。また、ウーロン茶<sup>7,8)</sup> および日本茶<sup>9)</sup> からの抽出物が、う蝕の原因菌である *Streptococcus*

*mutans* の glucosyltransferase の抑制によってプラークの蓄積を減少させるなど、その作用は菌種、茶の種類、精製抽出物の種類によって異なる。

Ikigai ら<sup>14)</sup> は EGCg, エピカテキン (EC) を用いた検討から殺菌のカテキンは細菌の菌体膜に損傷を与え、菌体内物質を漏出させることを示唆した。この作用は、グラム陽性菌よりグラム陰性菌に対する方が弱い、この原因として、カテキン類が脂質二重層に浸透し、バリアー機能に損傷を与える際、グラム陰性菌の表層部のネガティブに荷電したリポポリサッカライドの存在が影響すると説明している。さらに、茶成分中の EGCg や TFC を含む他のタンニン<sup>15)</sup> もまた、微生物の NADH 脱水素酵素のインヒビターとしての働きがあり、殺菌機構は非常に複雑である。

茶エキスおよびカテキン類はウイルスに対しても興味ある知見が報告されている。ウイルスの感染阻止のメカニズムについて Nakayama ら<sup>10,11)</sup> は、EGCg あるいは TF3 が、インフルエンザウイルスのタイプ、サブタイプに関係なく直接ウイルスを凝集したり、ウイルスの血球凝集素に対し特異的に結合して、宿主細胞表面レセプターへのウイルスの吸着を阻害することを報告した。この作用は、ロタウイルス、エンテロウイルスにおいてもみられる<sup>12)</sup>。

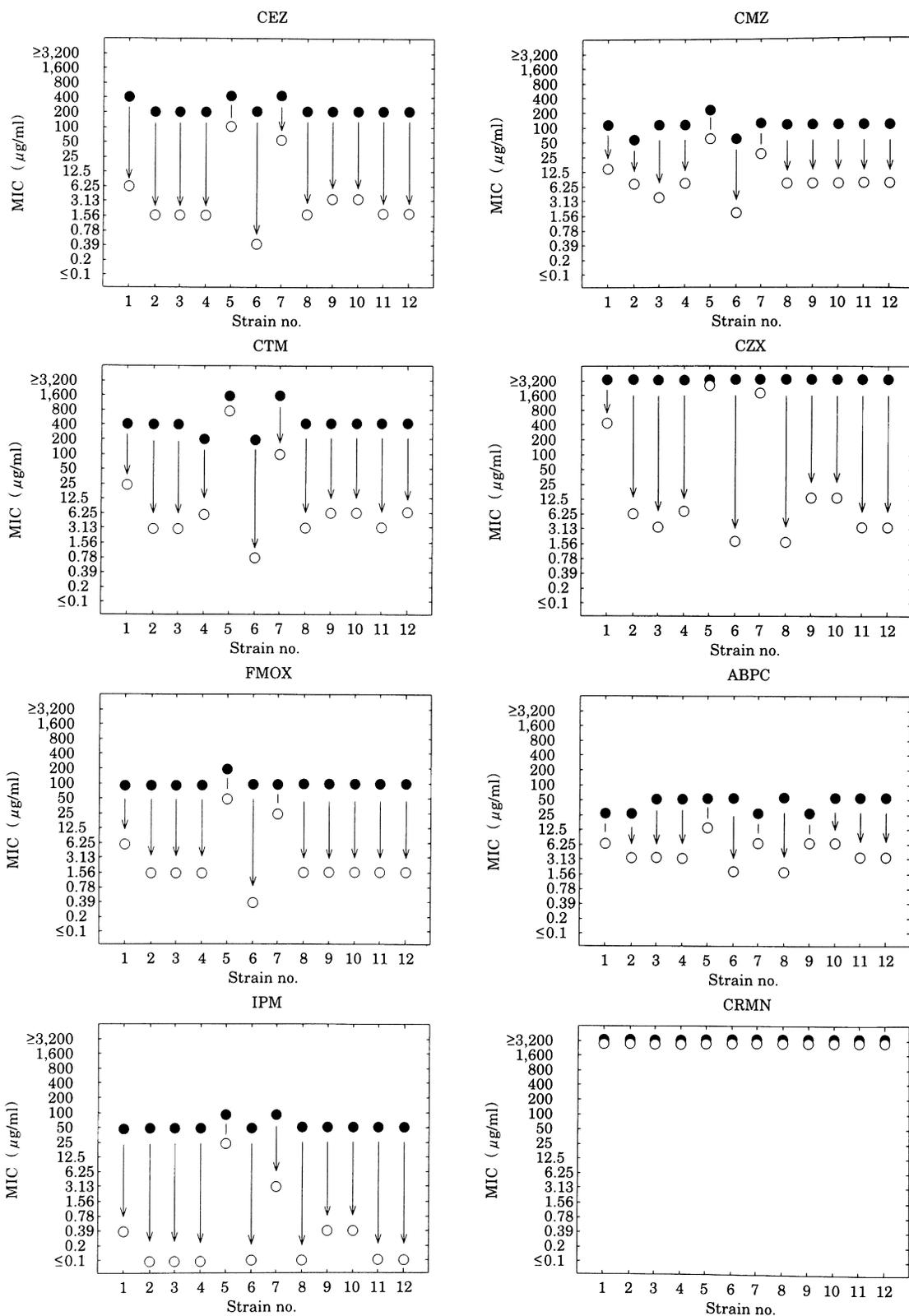
また近年世界各国で大問題になっている後天性免疫不全症候群 (AIDS) の HIV ウイルスについて興味ある報告がある。HIV ウイルスの逆転写酵素は、AIDS の化学療法剤のターゲットの一つであると考えられており、AZT, DDC, HPA23, suramin など種々の逆転写酵素インヒビターが報



CEZ: cefazolin, CTM: cefotiam, CMZ: cefmetazole, CZX: ceftizoxime, FMOX: flomoxef, IPM: imipenem, NTL: netilmicin, LVFX: levofloxacin, CP: chloramphenicol, VCM: vancomycin, CLDM: chindamycin MPIPC: oxacillin, CRMN: carumonam, ABPC: ampicillin, MINO: minocycline, EM: erythromycin, FOM: fosfomicin

Fig. 1. Growth-inhibitory zones of MRSA appeared between sensidisk of  $\beta$ -lactam antibiotics and a spot of green tea extract on MH agar.





CEZ: cefazolin, CMZ: cefmetazole, CTM: cefotiam, CZX: ceftizoxime, FMOX: flomoxef, ABPC: ampicillin, IPM: imipenem, CRMN: carumonam

Fig. 3. MICs of antibiotics with or without green tea extract against MRSA. Each circle indicates MIC of antibiotic with (○) and without (●) green tea extract against each strain of MRSA of on MH agar.

まったく変化がなかったが、その他の 7 薬剤では、CEZ: 1.56, CTM: 3.13~6.25, CMZ: 6.25, CZX: 1.56~12.5, FMOX: 1.56, IPM:  $\leq 0.1$ , ABPC: 3.13 であった (Fig. 2)。この緑茶エキス 5 % 単独では、MRSA の発育を阻止しなかった。

MRSA 12 菌株の各株について、緑茶エキス無添加および添加時の 8 薬剤に対する MIC 値の変化を Fig. 3 に示した。菌株 No. 5, No. 7 は、CEZ, CTM, CMZ, CZX, FMOX, IPM で、他の 10 菌株に比べて MIC 値の低下は比較的小さかった。

### III. 考 察

今回の検討では、MRSA に対して単独では無効であった  $\beta$ -ラクタム剤 (CEZ, CTM, CMZ, CZX, FMOX, IPM, ABPC) の MIC 値は、緑茶エキス添加により顕著に低下し、7 薬剤と緑茶エキスとの間に MRSA に対する相乗的抗菌効果のあることが確認された。日常、お茶と薬を一緒に服用しないという習慣に相反するまったく新しい知見である。さらに、重要なことは、緑茶エキスと抗生物質を併用することによって、抗生物質の MIC 値の著しい低下 (約 1/100~1/1,000) がみられたことである (Fig. 2)。したがってこのことから、臨床における抗生物質の使用量の減少、ひいてはそれにもとづく副作用の低減および新たな薬剤耐性菌の出現頻度の低下といったメリットが予想される。将来臨床への応用が可能であるが、さらに検討する必要がある。以上の結果より、単独では MRSA に無効な薬剤が、通常の飲用に使用されている濃度の緑茶で低濃度でも有効になることが明らかになり、併用により今後の化学療法の一助になることが期待される。

緑茶エキス中の抗菌成分については興味を持たれるところであるが、高橋ら<sup>17)</sup>の報告から、この成分がカテキンであることが示唆された。MRSA の  $\beta$ -ラクタム系抗生物質に対する耐性は、MRSA が  $\beta$ -ラクタム剤と結合親和性の低い PBP2' を産生し、これが 4 種の PBP の機能を肩代わりするため耐性を示すとする説が一般的であるが、PBP2' の機能は不明である<sup>18)</sup>。カテキンが MRSA の細胞膜に変化を起こさせるとともに、PBP2' に結合してこれを不活化するといった考えもあるが<sup>19)</sup>、まったく異なる別の機構も考えられる。その理由として、今回の検討結果から、 $\beta$ -ラクタム剤の種類によって相乗的抗菌効果が異なることがあげられる。すなわち MIPIC, CRMN のように、同じ  $\beta$ -ラクタム剤であってもほとんど相乗的抗菌効果が期待できないものがある。また、Fig. 3 に示したように菌株 No. 5, No. 7 のように MIC 値の低下が小さい株があった。これらの結果は、カテキンが 4 種の PBP あるいは PBP2' に作用し不活化するといった機序ではない、まったく新しい機構を示唆するものかもしれない。

また、高橋ら<sup>17)</sup>は MRSA に対するカテキンと種々薬剤の併用効果について述べているが、我々の緑茶エキスとの併用効果と異なる点がある。すなわち高橋らは、カテキンは MIPIC および methicillin (DMPPC), ABPC, cefalexin (CEX), penicillin G (PCG), および amikacin (AMK), tetracycline (TC), CP で抗菌作用の増強が認められ、GM ではその効果は弱いとしている。しかし、我々の結果からは、緑茶エキスとの併用で、 $\beta$ -ラクタム剤でも MIPIC および CRMN のように抗菌作用の増強が見られない薬剤も存在し、 $\beta$ -ラクタム剤以外では CP, CLDM, VCM, NTL, LVFX, CP, MINO, EM, FOM のいずれも効果はほとんどみられなかった。この相違は、カテキン単独と他のポリフェノール、クロロフィル、カフェインや遊離糖をも含む茶成分全体の効果の相違であるか、試験法の相違であるか、緑茶エキス中のカテキンの濃度に依存するものであるのか結論は出ない。緑茶エキス中に含まれる他の成分がカテキンと共に複雑に作用している可能性があり、今後の検討課題であると思われる。

### 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導を戴いてきました帝京大学医学部細菌学講座、山口英世教授、末柄信夫講師、村山琮明講師をはじめとする諸先生に深謝いたします。なお、本論文の要旨は第 43 回日本化学療法学会総会 (1995 年 6 月、東京) にて発表した。

### 文 献

- 1) 大河内慎一郎, 安齊栄子, 福井 徹, 飯沼和三, 齊藤幸司, 岡部敏弘, 熊坂一成: 青森ヒバ抽出成分の MRSA に対する抗菌効果。第 42 回日本感染症学会, 東日本地方会総会・第 40 回日本化学療法学会, 東日本支部総会合同学会講演抄録集 (青森) 97, 1993
- 2) 戸田真佐子, 大久保幸枝, 原 征彦, 島村忠勝: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* に対するカテキンの抗菌・殺菌作用。日本細菌学雑誌 46: 839~845, 1991
- 3) 戸田真佐子, 大久保幸枝, 大西玲子, 島村忠勝: 日本茶の抗菌作用および殺菌作用について。日本細菌学雑誌 44: 669~672, 1989
- 4) 戸田真佐子, 大久保幸枝, 生貝 初, 島村忠勝: 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。日本細菌学雑誌 45: 561~566, 1990
- 5) 堀内善信, 戸田真佐子, 大久保幸枝, 原 征彦, 島村忠勝: 茶およびカテキンの百日咳菌に対する防御作用。感染症学雑誌 66: 599~605, 1992
- 6) 大久保幸枝, 戸田真佐子, 原 征彦, 島村忠勝: 白癬菌に対する茶およびカテキンの抗菌・殺菌作用。日本細菌学雑誌 46: 509~514, 1991
- 7) Ooshima T, Minami T, Aono W, Izumitani A, Sobue S, Fujiwara T, Kawabata S, Hamada S: Oolong tea Polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with mutans streptococci. Caries Res 27: 124~129, 1993
- 8) Ooshima T, Minami T, Aono W, Tamura Y, Hamada S: Reduction of dental plaque deposition in

- humans by oolong tea extract. *Caries Res* 28: 146~149, 1994
- 9) Otake S, Makimura M, Kuroki T, Nishihara Y, Hirasawa M: Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. *Caries Res* 25: 438~443, 1991
- 10) Nakayama M, Suzuki K, Toda M, Okubo S, Hara Y, Shimamura T: Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols. *Antiviral Research* 21: 289~299, 1993
- 11) 中山幹夫, 戸田眞佐子, 大久保幸枝, 原 征彦, 島村忠勝: 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。感染症学雑誌 68: 824~829, 1994
- 12) Mukoyama A, Ushijima H, Nishimura S, Koike H, Toda M, Hara Y, Shimamura T: Inhibition of rotavirus and enterovirus infections by tea extracts. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 44: 181~186, 1991
- 13) Nakane H, Ono K: Differential inhibitory effects of some catechin derivatives on the activities of human immunodeficiency virus reverse transcriptase and cellular deoxyribonucleic and ribonucleic acid polymerases. *Biochemistry* 29: 2841~2845, 1990
- 14) Ikigai H, Nakae T, Hara Y, Shimamura T: Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1147: 132~136, 1993
- 15) Konishi K, Adachi H, Ishigaki N, Kanamura Y, Adachi I, Tanaka T, Nishioka I, Nonaka G, Horikoshi I: Inhibitory effects of tannins on NADH dehydrogenases of various organisms. *Biol. Pharm. Bull* 16: 716~718, 1993
- 16) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改定について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 17) 高橋雄彦, 蔡 哲, 戸田眞佐子, 原 征彦, 島村忠勝: 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。感染症学雑誌 69: 1126~1134, 1995
- 18) 井田孝志, 井上松久: MRSAの耐性機序。臨床医 21: 296~301, 1995

## Enhancing effect of Japanese green tea extract on the growth-inhibitory activity of antibiotics against clinically isolated MRSA strains

Kenichiro Yamazaki

Ohmiya Red Cross Hospital, Clinical Laboratory, 903 Kami-ochiai, Yono, Saitama 338, Japan

The enhancing or synergistic effect on the growth-inhibitory activity of antibiotics and Japanese green tea (*Camellia sinensis*) extract was examined against clinically isolated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Using a disk method, growth-inhibition of MRSA was clearly observed in distinct areas where sub-MIC concentrations of the tea extract and  $\beta$ -lactam antibiotic had been applied.  $\beta$ -lactam antibiotics included cefazolin (CEZ), cefotiam (CTM), cefmetazole (CMZ), ceftizoxime (CZX), flomoxef (FMOX), imipenem (IPM) and ampicillin (ABPC). This suggested that there was an enhancing or co-operative effect between the tea extract and the  $\beta$ -lactams. Lower levels of growth-inhibition or no inhibition were seen with MIPIC, CRMN, and non- $\beta$ -lactam antibiotics including clindamycin (CLDM), vancomycin (VCM), netilmicin (NTL), levofloxacin (LVFX), chloramphenicol (CP), minocycline (MINO), erythromycin (EM) and fosfomycin (FOM). The MICs against MRSA of CEZ, CTM, CMZ, CZX, FMOX, IPM and ABPC were significantly decreased by treatment with the tea extract.