

博士論文

鎖状テルペンアルコールの抗ブドウ球菌作用と
作用機構に関する研究

平成 25 年度

富樫 直子

目 次

序論	1
第一章 長鎖アルコールの <i>S. aureus</i> に対する抗菌作用	
第 1 節 緒言	3
第 2 節 材料及び方法	3
第 3 節 結果	6
第 4 節 考察	11
第二章 鎖状テルペンアルコール及び長鎖アルコールの細菌細胞膜損傷作用	
第 1 節 緒言	13
第 2 節 材料及び方法	15
第 3 節 結果	18
第 4 節 考察	25
第三章 鎖状テルペンアルコールを組み合わせた時の <i>S. aureus</i> に対する 作用	
第 1 節 緒言	27
第 2 節 材料及び方法	27
第 3 節 結果	29
第 4 節 考察	33
総括	34
本研究の誌上発表	36
謝辞	37
参考文献	38

序論

医療の高度化や高齢化が進む一方で、易感染性宿主の増加が顕著である。こうした状況は、院内感染をはじめ、様々な感染症に対するリスクを高めている。黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) はヒトの常在菌でありながら、 α 毒素やロイコシジン、腸管毒素 A をはじめとする様々な毒素を産生し、化膿性疾患や食中毒の原因菌となっている。また、*S. aureus*、緑膿菌及び霊菌等は、抗菌薬の使用とともに次々と薬剤耐性を獲得してきた。多くの耐性菌の薬剤耐性機構は薬剤分解酵素産生によるものである。メチシリン耐性 *S. aureus* (methicillin-resistant *S. aureus*; MRSA) は、薬剤分解酵素産生性に加え、変異したペニシリン結合タンパク (penicillin binding proteins; PBPs) を産生する。結果として、メチシリンばかりでなく多くの β -ラクタム薬にも耐性を示すため、選択可能な抗菌薬が少なくなっている。このため有効かつ副作用が少ない *S. aureus* に対する抗菌薬が求められており、新規の抗 *S. aureus* 薬の開発が行われてきた。その中で、抗菌性物質の探索は微生物代謝産物以外についても精力的に行われ、各種植物成分による抗菌作用が報告されてきた。¹⁻³⁾

一部の植物から得られる精油は、民間薬として使われており、経験的に抗菌作用や抗炎症作用などの効能を持つことが知られている。精油は様々な揮発性化合物よりなる混合物で、主な成分としてテルペン類が知られている。これまで環状テルペンの抗菌性に興味をもたれており、*S. aureus* に対する α -pinene の作用⁴⁾ や、menthol の *Escherichia coli* (*E. coli*) に対する抗菌作用などが報告されている。⁵⁾ しかしながら、多くが疎水性化合物であるため、同一化合物の抗菌活性の評価が報告により異なるといった問題が指摘されている。新井らは精油などの疎水性化合物の抗菌活性の測定法を再検討し、振盪しながら経時的に増殖抑制効果を測定する方法（以後、振盪法と略す）を確立した。⁶⁾ この振盪法を用いて鎖状テルペンの抗菌活性を調べ、セスキテルペンアルコールである farnesol や plaunotol が *S. aureus* に対し強力な抗菌活性を示すことを羽田らは報告している。⁷⁾ Farnesol の作用機序について、細胞膜の損傷作用や HMG-CoA reductase 阻害作用の関与が示されているが、^{8, 9)} まだ不明な点が多いのが現状である。

本研究ではテルペン類の抗菌力を明確にするため、鎖状テルペンアルコールの抗 *S. aureus* 作用を詳細に検討した。さらに作用機構を解析し、抗菌薬としての応用の可能性について検討した。第一章では、長鎖アルコールを用いて低濃度領域での *S. aureus* に対する抗菌作用について検討した。第二章では、長鎖アルコール及び鎖状テルペンアルコールの殺

菌作用機序を検討した。第三章では、複数の鎖状テルペンアルコールを組み合わせることで、副作用軽減と抗 *S. aureus* 作用増強の両立の可能性を評価した。これらの検討から、farnesol を始めとする鎖状テルペンアルコールの抗 *S. aureus* 作用機序の一部と、新規抗菌薬としての有用性を初めて明確にした。

第一章 長鎖アルコールの *S. aureus* に対する抗菌作用

第1節 緒言

抗 *S. aureus* 作用は鎖状テルペンアルコールの種類によって大きく異なっている。羽田は、⁷⁾ モノテルペンアルコールの抗 *S. aureus* 作用は報告されているほど強くなく、また、セスキテルペンアルコールは細胞膜障害を伴う強い抗 *S. aureus* 作用があり、ジテルペンアルコールは低濃度領域において静菌作用を示すとしている。さらに羽田は、抗菌性と炭素鎖に何らかの関わりがあることを報告している。⁷⁾ そこで、著者は鎖状テルペンアルコールの構造上の特徴である炭素鎖に注目し、炭素鎖長と抗菌活性との関係を調べた。すなわち、鎖状テルペンと異なり側鎖を持たない飽和長鎖脂肪族第一級アルコール（以下長鎖アルコールと略す）10種の、*S. aureus* に対する静菌・殺菌作用を比較した。

これまでに長鎖アルコールの抗菌活性についての報告があるもののその評価が分かっている。^{4, 10, 11, 12)} これは長鎖アルコールが疎水性のために抗菌性の測定が困難であることに由来する。それらを克服する為に、新井らは振盪培養を行いながら経時的に菌の増殖抑制作用を測定する振盪法を確立した。⁶⁾ これにより、低濃度領域（ $\mu\text{g/ml}$ レベル）における非水性植物成分の抗菌作用を詳細に測定することを可能とした^{7, 13, 14, 15)}。

従って、長鎖アルコールの *S. aureus* に対する増殖抑制作用を検討する為に、新井らが開発した振盪法及び従来の微量液体希釈法を採用した。

第2節材料及び方法

a) 材料

1) 使用菌種

黄色ブドウ球菌標準株 *S. aureus* FDA209P を用いた。

2) 使用培地

Brain Heart Infusion broth medium (BHI broth: DIFCO 社) 及び Mueller-Hinton (MH; Becton, Dickinson and Company) medium を使用した。

3) 使用薬剤

1-octanol ($\text{C}_8\text{-OH}$), 1-nonanol ($\text{C}_9\text{-OH}$), 1-decanol ($\text{C}_{10}\text{-OH}$), 1-undecanol ($\text{C}_{11}\text{-OH}$),

1-dodecanol (C₁₂-OH), 1-tridecanol (C₁₃-OH), 1-tetradecanol (C₁₄-OH), 1-hexadecanol (C₁₆-OH), 1-heptadecanol (C₁₇-OH) (以上 和光純薬工業株式会社) 及び 1-pentadecanol (C₁₅-OH)(Aldrich 社)を使用した。また、可溶加剤として、methanol (和光純薬工業株式会社) 及び dimethyl sulfoxide (DMSO) (和光純薬工業株式会社) を使用した。以下、上述の長鎖アルコールの略号を、炭素数に従い、1-octanol を括弧内に示したように C₈-OH と略して記述した。

b) 方法

1) 微量液体希釈法による増殖抑制作用の測定

微量液体希釈法は日本化学療法学会標準法^{16,17)}に従い測定した。BHI broth 10ml に DMSO を用いて各長鎖アルコールを溶解させ、256 µg/ml から 32 µg/ml までの 2 倍希釈系列を調製した。それぞれを十分攪拌させ 2 分後、96 穴マイクロプレートに 100 µl ずつ分注した。次に 32 µg/ml の溶液をあらかじめ BHI broth 100 µl を分注しておいたウェルに 100 µl 分注し、攪拌した。さらに、調製された 16 µg/ml の溶液 100 µl をあらかじめ BHI broth 100 µl が分注されているウェルに移し、よく攪拌した。さらにこれを 4 回繰り返すことで、16 µg/ml から 1 µg/ml までの 2 倍希釈系列を作成した。*S. aureus* FDA209P を 1.0×10⁴ CFU/ml になるように各ウェルへ 5 µl ずつ接種した。37 °C で 24 時間培養し、最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration; MIC) の判定を行った。また、菌の増殖が見られなかったものについて、5 µl を BHI agar に接種し、37 °C で 24 時間培養し、最小殺菌濃度 (minimum bactericidal concentration; MBC) を調べた。

2) 振盪法による増殖抑制作用の測定

BHI broth 10ml に各試料を加え vortex で攪拌し、80 µg/ml から 5 µg/ml までの 2 倍希釈系列を調製した。C₁₃-OH, C₁₄-OH, C₁₅-OH, C₁₆-OH 及び C₁₇-OH については可溶化剤として methanol を使用した。これに BHI broth で 37 °C、一夜培養した *S. aureus* FDA209P を 1.0×10⁴ CFU/ml になるように接種した。バイオフィトレコーダー (アドバンテック) を用いて、37 °C、40 rpm で振盪培養を行いながら一定時間ごとの波長 660nm における吸光度を測定し、菌の増殖を記録した。48 時間培養後、菌の増殖が見られなかったものについて 100 µl とり、BHI broth 10ml に接種し、37 °C にて 24 時間培養し、MBC を調べた。さらに、試料を含まない培地における菌の増殖と、各試料の

40 $\mu\text{g/ml}$ の濃度における増殖を比較して、 OD_{660} が 0.9 に達するまでの時間の遅れを delay in proliferation (DP)として計算した⁶⁾。

3) Time-Kill assay 法による殺菌作用の測定

PBS buffer (pH 7.0) 10ml に $\text{C}_8\text{-OH}$, $\text{C}_9\text{-OH}$, $\text{C}_{10}\text{-OH}$, $\text{C}_{11}\text{-OH}$ 及び $\text{C}_{12}\text{-OH}$ の各試料をそれぞれ 80 $\mu\text{g/ml}$ になるように加え、充分攪拌した。BHI broth で 37 °C、一夜培養した *S. aureus* FDA209P を PBS buffer で二回洗浄後、約 $1.0 \times 10^8 \text{CFU/ml}$ になるように試料液に接種し、37 °C、40rpm で振盪培養した。一定時間ごとに一定量を採取し、MH agar に塗布した。37 °C、24 時間培養後、観察されるコロニー数から生菌数を測定した。⁸⁾

第3節 結果

a) 長鎖アルコールの増殖抑制作用

微量液体希釈法によって得られた長鎖アルコールの *S. aureus* FDA209P に対する増殖抑制作用の結果を表 1 に示した。

C₁₃-OH、C₁₄-OH 及び C₁₅-OH の MIC はいずれも 4 µg/ml であった。MBC はいずれも 8 µg/ml であった。C₈-OH から C₁₂-OH では、炭素鎖長が長くなるにつれて増殖抑制作用が増強した。一方、C₁₆-OH 以上では、強い増殖抑制作用は見られなかった。

振盪法によって得られた長鎖アルコールの増殖抑制作用の結果と分配係数 log P_{o/w} を表 2 にまとめた。その結果、C₁₀-OH 及び C₁₁-OH の MIC が 40 µg/ml、C₁₂-OH 及び C₁₃-OH が 10 µg/ml であった。他の長鎖アルコールでは増殖抑制作用は認められなかった。

MBC は C₁₀-OH で 80 µg/ml、C₁₁-OH で 40 µg/ml であった。他の長鎖アルコールでは殺菌作用は認められなかった。

C₉-OH から C₁₈-OH においては DP が検出され、C₈-OH 及び C₉-OH では炭素鎖の長さの長い C₉-OH の方が強い増殖抑制作用を示し、さらに炭素鎖の長さが長い C₁₀-OH から C₁₃-OH では、いずれも 48 時間以上増殖を抑制していた。炭素鎖がさらに長くなる C₁₄-OH 以上では C₁₇-OH まで、増殖抑制作用は減弱していった。

分配係数は炭素鎖が長くなるにつれて値が大きくなるが、増殖抑制作用における炭素鎖長との関係とは異なった結果が得られた。したがって、鎖状アルコールの抗菌活性は、疎水性と相関がないことを示唆している。

増殖抑制作用をより詳細に検討するため、振盪法によって得られた長鎖アルコールを作用させた時の *S. aureus* FDA209P の増殖曲線を図 1 に示した。

C₈-OH では、測定したいずれの濃度においても対照と比べて有意差は見られなかった。

C₉-OH は、20 µg/ml 以上で濃度が上昇するに従って増殖抑制が増強したが、48 時間以上の増殖抑制効果は見られなかった。

C₁₀-OH 及び C₁₁-OH は、5.0 µg/ml 以上で濃度が上昇するに従って増殖抑制作用が増強し、40 µg/ml 以上において、48 時間以上菌の増殖を抑制した。

表 1 *S. aureus* FDA209P に対する長鎖アルコールの抗菌活性

<i>n</i> -alcohol	MIC($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}	MBC($\mu\text{g/ml}$) ^{b)}
1-Octanol (C ₈ -OH)	256	256
1-Nonanol(C ₉ -OH)	64	128
1-Decanol(C ₁₀ -OH)	32	64
1-Undecanol(C ₁₁ -OH)	16	32
1-Dodecanol(C ₁₂ -OH)	8	16
1-Tridecanol(C ₁₃ -OH)	4	8
1-Tetradecanol(C ₁₄ -OH)	4	8
1-Pentadecanol(C ₁₅ -OH)	4	8
1-Hexadecanol(C ₁₆ -OH)	256	512
1-Heptadecanol(C ₁₇ -OH)	≥ 512	512
1-Octadecanol(C ₁₈ -OH)	≥ 512	512

a) 微量液体希釈法により測定

b) 寒天法により測定

表 2 *S. aureus* FDA209P に対する長鎖アルコールの抗菌活性と分配係数

<i>n</i> -alcohol	MIC($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}	MBC($\mu\text{g/ml}$) ^{b)}	DP(h) ^{c)}	logP _{o/w} ^{d)}
1-Octanol (C ₈ -OH)	ND	ND	0	2.83
1-Nonanol(C ₉ -OH)	ND	ND	17.5	3.29
1-Decanol(C ₁₀ -OH)	40	80	≥ 48.0	3.75
1-Undecanol(C ₁₁ -OH)	40	40	≥ 48.0	4.2
1-Dodecanol(C ₁₂ -OH)	10	ND	≥ 48.0	4.66
1-Tridecanol(C ₁₃ -OH)	10	ND	≥ 48.0	5.11
1-Tetradecanol(C ₁₄ -OH)	ND	ND	29.7	5.57
1-Pentadecanol(C ₁₅ -OH)	ND	ND	27.2	6.03
1-Hexadecanol(C ₁₆ -OH)	ND	ND	17.3	6.48
1-Heptadecanol(C ₁₇ -OH)	ND	ND	6.5	6.94
1-Octadecanol(C ₁₈ -OH)	ND	ND	10	7.39

ND; Not detected at the concentration tested

a) 振盪法により測定

b) 振盪法で 48 時間増殖が見られなかったものに対して BHI 培地に接種し判定

c) control と 40 $\mu\text{g/ml}$ の濃度における増殖を比較して OD₆₆₀ が 0.9 に達するまでの時間の遅れの差

d) European Journal of Medical Chemistray, 19, 71 (1984)

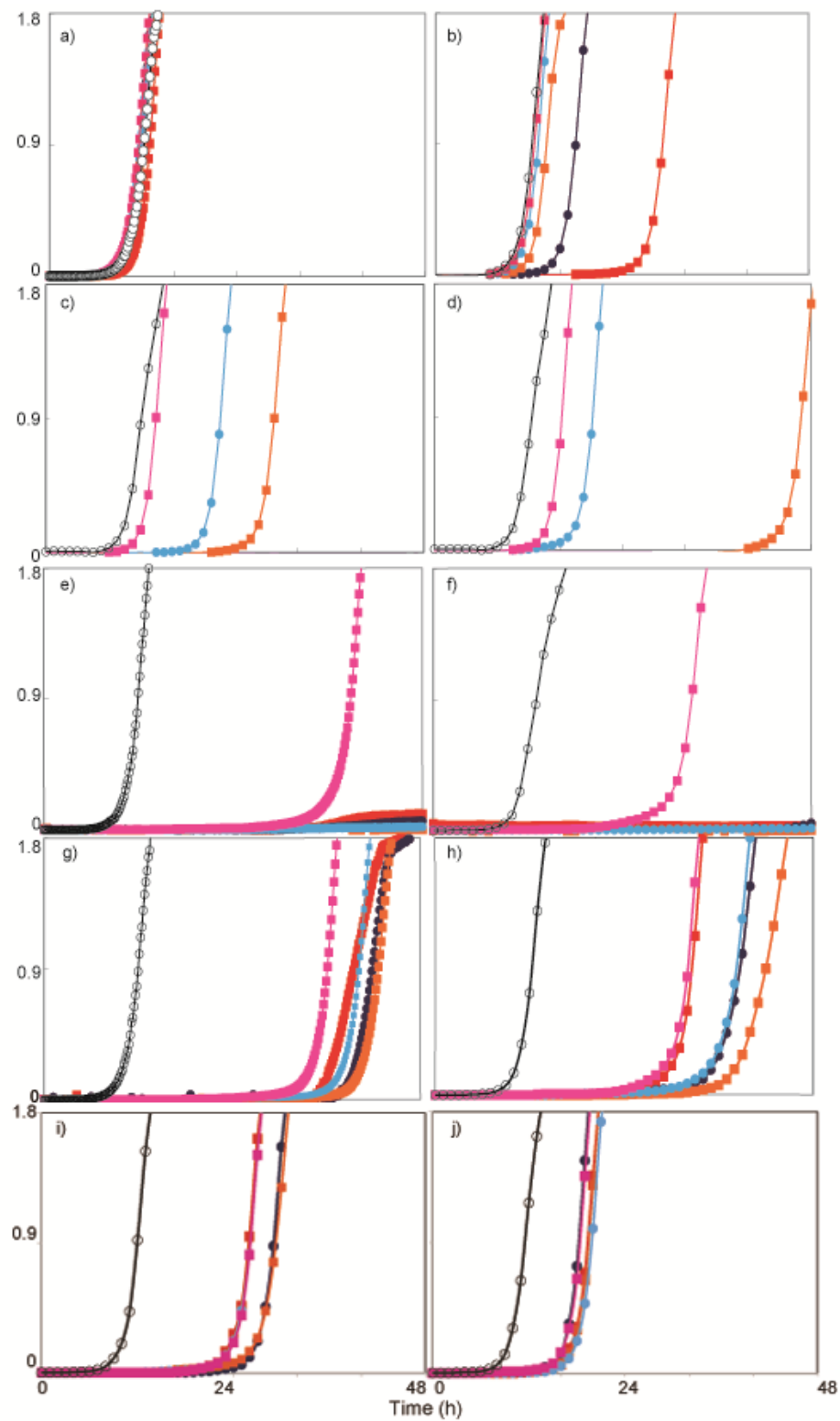


図1 振盪法における長鎖アルコールの *S. aureus* FDA209P に対する増殖抑制曲線

a)C₈-OH; b)C₉-OH; c)C₁₀-OH; d)C₁₁-OH; e)C₁₂-OH; f)C₁₃-OH; g)C₁₄-OH; h)C₁₅-OH; i)C₁₆-OH; j)C₁₇-OH

symbols : control(○),C_n-OH 5(■),10(●),20(■),40(●),80(■) μg/ml

C₁₂-OH 及び C₁₃-OH は、いずれも 10 µg/ml 以上の濃度において 48 時間以上菌の増殖を抑制した。

C₁₄-OH から C₁₈-OH は、増殖抑制作用を示したが濃度には依らず、測定した濃度範囲では 48 時間の菌の増殖抑制作用は見られなかった。

また、C₁₅-OH は、5~20 µg/ml においては濃度が高くなるにつれて増殖抑制作用が増強したが、それ以上の濃度では、濃度が高くなるにつれて増殖抑制作用が減弱する二相性を示した。

C₁₆-OH 及び C₁₇-OH でも明確ではないが、同様の二相性が見られた。

各試料の濃度 40 µg/ml について増殖抑制作用を比較した (図 2)。C₈-OH 及び C₉-OH は炭素鎖の長さが長いものほど増殖抑制作用が強くなった。C₁₀-OH から C₁₃-OH は、いずれも 48 時間以上菌の増殖を抑制した。C₁₄-OH から C₁₆-OH では、炭素鎖の長いものほど増殖抑制作用が弱くなった。

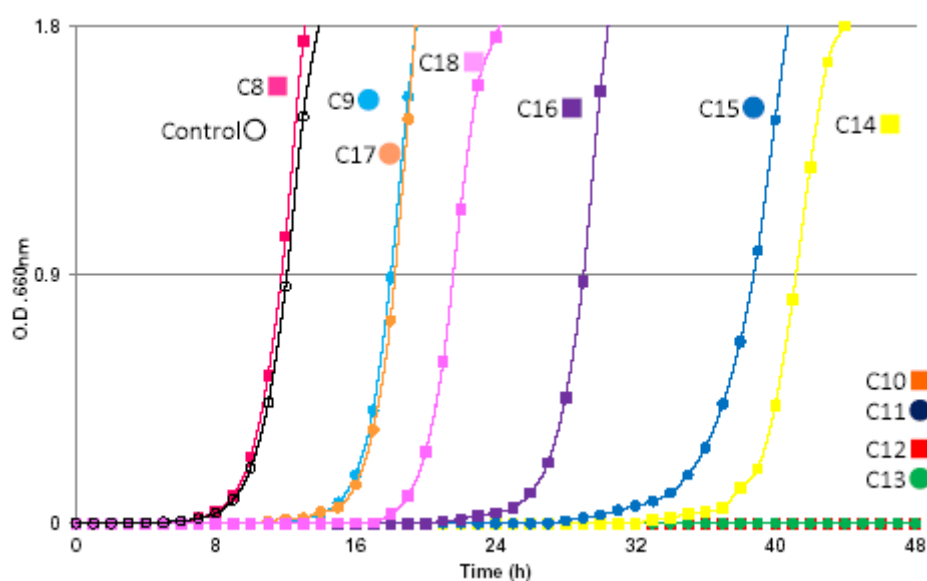


図 2 振盪法における長鎖アルコールの *S. aureus* FDA209P に対する増殖抑制曲線

各試薬の最終濃度：40 µg/ml

b) 長鎖アルコールの殺菌作用

C₈-OH から C₁₂-OH を最終濃度 80 µg/ml で *S. aureus* FDA209P に作用させたときの、一定時間ごとの生菌数変化を図 3 に示した。PBS buffer に懸濁させたときの生菌数は、24 時間で 6.4×10^7 CFU/ml から 3.6×10^6 CFU/ml まで減少した。C₈-OH では生菌数に減少は見られなかったが、C₉-OH では、4 時間後には約 1.0×10^5 CFU/ml まで減少し、その後生菌数はほとんど減少しなかった。

C₁₀-OH 及び C₁₁-OH では強い殺菌作用が見られ、それぞれ 4 時間後及び 2 時間後には検出限界以下となった。

C₁₂-OH では、2 時間後に約 1.0×10^4 CFU/ml まで減少し、8 時間後には検出限界以下となった。

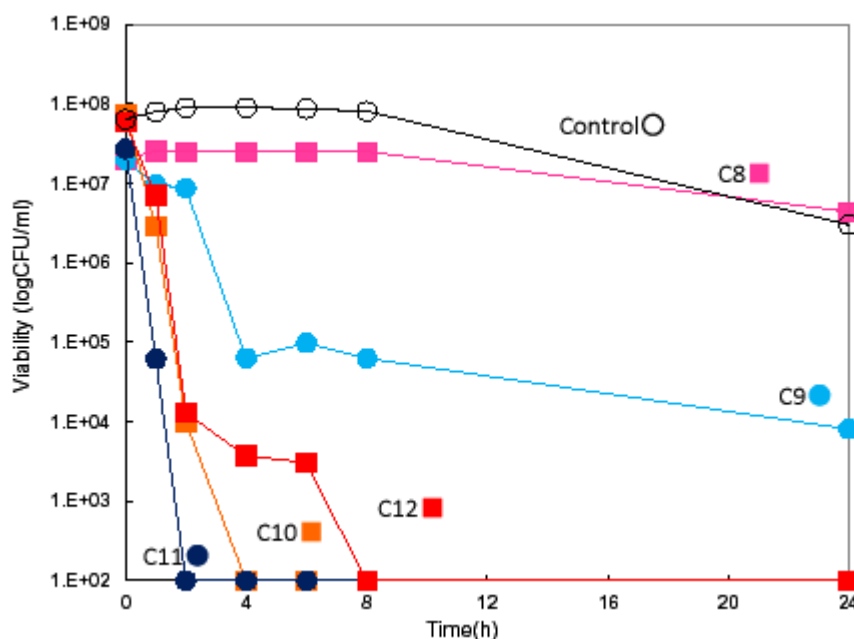


図 3 長鎖アルコールの *S. aureus* FDA209P に対する時間殺菌曲線
各試薬の最終濃度：80 µg/ml

第4節 考察

炭素鎖の長さが抗菌活性の強さに与える影響についていくつかの報告がある。久保らは、微量液体希釈法を用いて、6 から 18 の炭素が直鎖で連なった長鎖アルコールの抗菌活性を測定し、炭素鎖の長さが長くなるに伴って MIC が低下し、C₁₂-OH で最小(12.5 µg/ml)となるが、さらに長くなると MIC は増加することを報告している。^{18, 19)}

一方加藤らは、寒天平板希釈法を用いて同様の測定を行い、炭素鎖の長さが長くなるに伴い MIC は低下し、C₁₂-OH 及び C₁₃-OH で最小値 20 µg/ml を示すこと、さらに長くなると MIC は増加することを報告している。¹²⁾ 本研究の微量液体希釈法を用いた測定では、C₁₃-OH から C₁₅-OH の増殖抑制の活性が最も高く、MIC はいずれも 4 µg/ml であった。抗菌活性が高くなる炭素鎖長が存在する点は久保らや加藤らと同様だが、最も高い抗菌活性を示す炭素鎖長や MIC 値は著者の研究結果とは異なっていた。

微量液体希釈法は可溶化できる抗菌物質の抗菌活性の測定を想定した方法であるため、本実験のような非水性成分を同方法で測定した場合、その疎水性のために薬剤を均一に分散させることができず、再現性が得られない可能性がある。そこで、再現性の高い振盪法による測定を行った。振盪法は、振盪することにより菌と薬剤を十分に接触させることができるため、非水性成分のより正確な増殖抑制作用を測定できる方法として有用であるためである。その結果、C₁₀-OH から C₁₃-OH が明確な静菌作用を示すこと、C₁₀-OH 及び C₁₁-OH のみが殺菌作用を示すこと著者は明らかにした。殺菌作用は、Time-kill assay の結果と一致していた。

一部の長鎖アルコールと鎖状テルペンアルコールの構造及び carbiny 炭素から末端炭素までの結合距離を図 4 に示した。これまでに古瀬、羽田及び廣瀬らは、鎖状テルペンアルコールのうちセスキテルペンである farnesol 及び nerolidol が強い増殖抑制作用を示すことを報告している。^{7, 13, 15)} これらの carbiny 炭素から最も遠い炭素までの結合距離は、それぞれ 14.0 Å 及び 11.8 Å である。一方、振盪法で明確な増殖抑制作用が見られた C₁₀-OH, C₁₁-OH, C₁₂-OH 及び C₁₃-OH の炭素鎖の長さはそれぞれ 11.5 Å, 12.7 Å, 14.0 Å, 及び 15.3 Å であり、farnesol 及び nerolidol の炭素鎖の長さに近いことから、増殖抑制作用には carbiny 炭素から結合末端炭素までの長さが重要であることが示唆された。振盪法の結果において、C₁₅-OH では二相性に基づく明確な減弱作用が見られたが、ジテルペンアルコールである geranylgeraniol でも同様の二相性が見られることがすでに報告されている。²⁰⁾

炭素鎖の長さは、geranylgeraniol 及び C₁₅-OH でそれぞれ 18.8Å 及び 17.8Å であることから、この二相性に基づく減弱作用にも水酸基からの炭素鎖の長さが関与しているものと考えられる。

以上より、抗菌活性を決定する因子として重要なのは、Sikkema らが提唱する分配係数⁴⁾ではなく、炭素鎖の長さであることを初めて明らかにした。そして、C₁₀-OH, C₁₁-OH, C₁₂-OH 及び C₁₃-OH が明確な静菌作用を示すこと、C₁₀-OH 及び C₁₁-OH のみが殺菌作用を示すこと明らかにした。

		C-OH距離 (Å)	C-OH距離 (Å)
長鎖アルコール	1-Nonanol (C ₉ -OH)	10.2	
	1-Decanol (C ₁₀ -OH)	11.5	
	1-Undecanol (C ₁₁ -OH)	12.7	
	1-Dodecanol (C ₁₂ -OH)	14.0	
	1-Tridecanol (C ₁₃ -OH)	15.3	
	1-Tetradecanol (C ₁₄ -OH)	16.6	
	1-Pentadecanol (C ₁₅ -OH)	17.8	
鎖状テルペンアルコール	geraniol	8.5	
	farnesol	14.0	
	nelolidol	11.8	
	phytol	19.1	
	geranylgeraniol	18.8	

図4 長鎖アルコール及び鎖状テルペンアルコールの構造式と
carbonyl 炭素から結合末端炭素までの長さ

第二章 鎖状テルペンアルコール及び長鎖アルコールの細菌細胞膜損傷作用

第1節 緒言

鎖状テルペンアルコールを *S. aureus* に作用させると、添加直後に菌懸濁液中のカリウムイオン濃度が急激に上昇する。^{7, 8, 15)} 鎖状テルペンアルコールによるカリウムイオン流出作用は、細胞膜に何らかの損傷が起きて、細胞内のカリウムイオンが流出しているものと考えられる。このカリウムイオン流出作用の強弱は、鎖状テルペンアルコールの炭素鎖の長さによって異なっていた。⁷⁾

S. aureus はグラム陽性球菌であり、グラム陰性菌に見られる外膜を持たないので、物質の透過は細胞膜により調節されている。そこで、炭素鎖の長さと細胞膜への影響をより詳細に調べるため、第一章と同様に長鎖アルコールを用いて、*S. aureus* FDA209P に作用させたときの細菌細胞からのカリウムイオンの流出挙動を調べた。

細胞膜の脂質二重膜内部から外部へとカリウムイオンが移行するには、次のような機構が知られている。²¹⁾ イオノフォアによる拡散、カリウムチャネルによる拡散、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ ポンプを介する移行である。これらの機構が働くとき細胞膜は規則正しく並び、流動性にほとんど変化はない (図 5)。

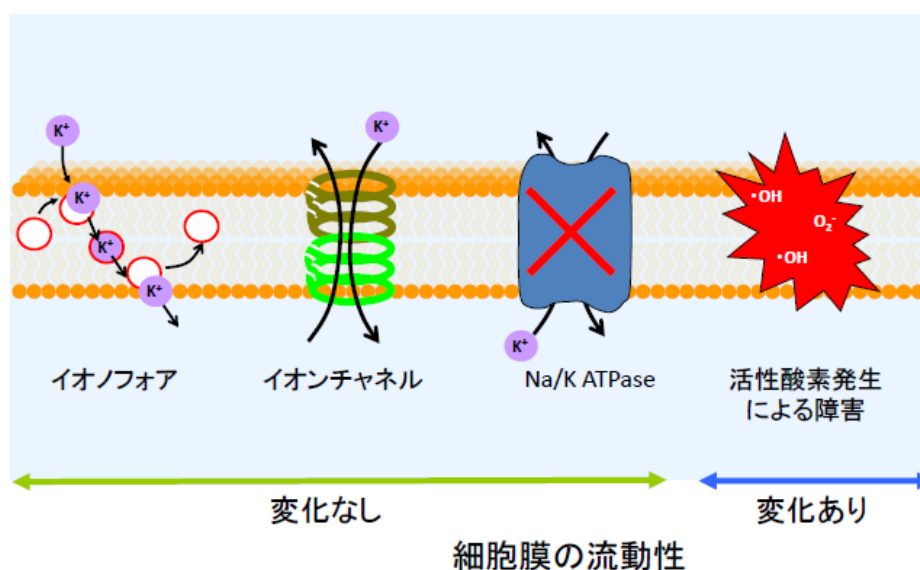


図 5 細胞膜透過機構の模式図

細胞膜の損傷が上述に挙げたような機構で進行しているのかを確かめるために、用いた鎖状テルペンアルコールの中で最も抗菌作用の強い farnesol を *S. aureus* FDA209P に作用させたときの細胞膜の流動性変化を、電子スピン共鳴を用いて観察した。また、細胞膜を短時

間に損傷させるのに活性酸素が原因となることがある。そこで、farnesol を *S. aureus* FDA209P に作用させた時に活性酸素が発生しているか、NBT 法を用いて確認した。さらに、カリウムチャンネルが関与しているかを調べるために、2 種類のカリウムチャンネル阻害剤を用いて farnesol を作用させた時の変化を調べた。また、細胞膜を安定化させる化合物の添加によって、farnesol の *S. aureus* への増殖抑制作用に変化があるのかについても検討した。

細胞膜の機能には、真核細胞と原核細胞とで共通の機能と異なる機能がある。前者には、細胞内浸透圧を保つためのバリアー機能や栄養分・イオンなどの特定物質の輸送などがあり、後者には、細胞壁合成や膜脂質の合成などがある。

細胞膜は、脂質の層が二重に重なり、二次元の流動性を示す。このため細胞膜の構造は流動モザイクモデルと呼ばれる。その流動性は、細胞膜の構成成分で決まる。ヒトの細胞（真核細胞）膜は、phosphatidylcholine などのリン脂質や cholesterol などの sterol が主な構成成分であり、cholesterol が加わることで二次元の流動性が生じる。真正細菌の細胞（原核細胞）膜は、細胞壁内側の細胞膜（cytoplasmic membrane）及び外側の外膜（outer membrane）に分類される。*S. aureus* の細胞膜は、phosphatidylglycerol、diphosphatidylglycerol (cardiolipin)、phosphatidylglycerol-phosphate などのリン脂質で主に構成され、ステロール類は含まれない。一方真正細菌においては、bacteriohopanoid と呼ばれる 5 環性のトリテルペノイドである diploptene、22-hydroxyhopane、hopanepolyols がステロール類の果たす役割を担うとされている。²²⁾ 細菌細胞では、真核細胞と異なり、細胞膜中にエネルギー生産に関わる電子伝達系など様々な機能を持った 200 種にもものぼるタンパク質や、細胞壁合成に関わるタイコ酸などが存在する。

このように、真核細胞と原核細胞とでは細胞膜の構成成分も機能も異なる点が多い。鎖状テルペンアルコール及び長鎖アルコールが細菌細胞膜を損傷するのであれば、どの程度の影響が哺乳動物の細胞膜に及ぶのかを確かめるためにウサギ脱繊維血液を用いて溶血反応を調べた。

第2節 材料及び方法

a) 材料

1) 使用菌種

第一章 第2節 a)材料 1) に記した使用菌株を用いた。

2) 使用培地

第一章 第2節 a)材料 2) に記した使用培地を用いた。

3) 使用薬剤

鎖状アルコールについては、第一章 第2節 a)材料 3) に記した使用薬剤を用いた。

鎖状テルペンアルコールについては farnesol, nerolidol, plaunotol, geranylgeraniol, phytol, geraniol (Sigma 社)を使用した。Carotenoid (Sigma 社), quinine, tetra ethyl ammonium chloride (和光純薬工業株式会社)を使用した。ウサギ脱繊維血液（コスモ・バイオ株式会社）を使用した。

b) 方法

1) カリウムイオン流出挙動の測定

BHI broth 中で 37 °C、一夜培養した *S. aureus* FDA209P を MOPS-Tris buffer (pH 7.2) で二回洗浄後、10ml の同 buffer に再懸濁した。この菌懸濁液 0.5ml を 3.5ml の同 buffer に加えた。37 °Cにおいて、DMSO を用いて溶解させた各試料をそれぞれ 80 µg/ml になるように菌懸濁液に加え、菌体外カリウムイオンの濃度変化についてカリウムイオン選択電極を用いて経時的に測定した。得られた結果から、総流出量及び初期流出速度を求めた。単位は mol /µg 及び mol/µg/min をそれぞれ用いた。すなわち、相互比較を行うために菌体の単位重量あたりの流出量として表示した。菌量は、超音波破碎した菌懸濁液を bradford 法にて測定した総タンパク量として表示した。このとき、ウシ血清アルブミン (Sigma 社)を標品として検量線を作成した。

2) 溶血反応

鎖状テルペンアルコールは 20, 40 及び 80 µg/ml に、長鎖アルコールは 40 µg/ml に

なるように DMSO を用いて溶解させた各試料を、生理食塩液に加え、ウサギ脱繊維血 0.2ml を添加して室温で放置した。1, 2 時間及び 4 時間経過後にそれぞれ $750\times g$ で 5 分間遠心分離後、上清を採取し 576 nm における吸光度を測定、溶血率を次の式を用いて算出した。陽性対象は精製水とした。

$$\text{溶血率 (\%)} = A_{576}(\text{試験液}) - A_{576}(\text{空試験}) / A_{576}(\text{陽性対象}) - A_{576}(\text{空試験})$$

3) Nitro blue tetrazolium (NBT)を用いた活性酸素の測定

0.1% NBT 溶液を PBS buffer を用いて調製した。BHI broth 中で 37 °C 一夜培養した *S. aureus* FDA209P を PBS buffer で二回洗浄後、10 ml の同 buffer に再懸濁した。この菌懸濁液 1ml に、farnesol を最終濃度 80 $\mu\text{g/ml}$ になるように加え、さらに 0.1% NBT 溶液を 1ml 加え、37 °C で 30 分インキュベートした。0.1mol/l の塩酸を加えた後、 $1500\times g$ で 10 分遠心分離後上清を除去し、DMSO 600 μl 、PBS buffer 800 μl で再懸濁した後、575nm における吸光度を測定した。²³⁾

4) 電子スピン共鳴(electron spin resonance: ESR)による細胞膜流動性変化の測定

細菌細胞膜の流動性変化を古賀らの方法に従って、電子スピン共鳴によって測定した。

²⁴⁾

スピンラベル剤として 5-doxyl stearic acid (5-NS)及び 16-doxyl stearic acid methyl ester (16-NMS) (5-NS、16-NMS とともに Sigma-Aldrich) を用いた。

スピンラベル剤は、クロロホルムに 0.1 g/ml になるように溶解し、その 25 μl を石英ガラス製のキャピラリーマイクロピペット(Drummond Scientific Co., Broomall, PA, USA)で吸い上げた。室温で放置することにより、クロロホルムを除去し、キャピラリーマイクロチューブの内壁にスピンラベル剤を塗布した。

Farnesol を 80 $\mu\text{g/ml}$ になるように加えた菌懸濁液 20 μl を、スピンラベル剤を内壁に塗布したキャピラリーマイクロチューブで吸い上げ、もれないように片側を ESR silent のパテ (テルモシール, テルモ) で閉じた。37 °C、3min 間インキュベートした後、電子スピン共鳴測定を行った。測定機器は JEOL JEX-RE 1X を用いた。測定温度は 37 °C、modulation amplitude は 1 G、scan range は 100 G、time constant は 0.3 秒、scan speed は 100 G / 4min で測定した。

5-NS を用いたときの流動性変化は、次の式にしたがってオーダーパラメータ S_{op} を算出して比較した。

$$S_{OP} = (T_{//} - T_{\perp}) / A$$

16-NMS を用いたときの流動性変化は、次の式にしたがって相関時間(τ)を算出して比較した。

$$\tau = 0.65 \times H\phi \times (h\phi/h_{(+1)})^{1/2} \times 10^{-10} \quad (\text{ストークス-アインシュタイン-デバイの式})$$

5) 細胞膜安定化剤及びカリウムチャネル阻害薬添加時の増殖抑制作用の測定

BHI broth 10ml に各試料を加え十分に攪拌し、farnesol の最終濃度が 5 $\mu\text{g/ml}$ になるように調製した。そこに、quinine は 1.56 から 50 $\mu\text{g/ml}$ 、tetra ethyl ammonium chloride は 1.56 から 100 $\mu\text{g/ml}$ の 2 倍希釈系列を調製した。Carotenoid は 5、10 及び 25 $\mu\text{g/ml}$ になるように添加した。各々の溶液に BHI broth 中で 37 $^{\circ}\text{C}$ 、一夜培養した *S. aureus* FDA209P を 1.0×10^4 CFU/ml になるように接種した。バイオフィトレコーダーを用いて、37 $^{\circ}\text{C}$ 、40rpm で振盪培養を行いながら一定時間ごとの波長 660 nm における吸光度を測定し、菌の増殖を記録した。

第3節 結果

a) カリウムイオン流出挙動

長鎖アルコールを添加すると、添加直後に菌懸濁液中の K^+ の濃度が上昇していた。特に、 C_{10} -OH 及び C_{11} -OH では急激な K^+ 濃度の上昇が見られた。調べた 10 種の他の長鎖アルコールも添加直後に菌懸濁液中の K^+ 濃度の上昇が見られたが、これらの流出曲線は C_{10} -OH よりも緩やかであった。

C_8 -OH から C_{14} -OH までの K^+ 総流出量及び K^+ 初期流出速度を図 6 に示した。 K^+ 総流出量と K^+ 初期流出速度はともに C_{10} -OH が最も高く、次に C_{11} -OH が高値を示した。調べた 10 種の他の長鎖アルコールでは、 K^+ 総流出量は C_{10} -OH の約 1/10、 K^+ 初期流出速度では C_{10} -OH の約 1/7 であった。

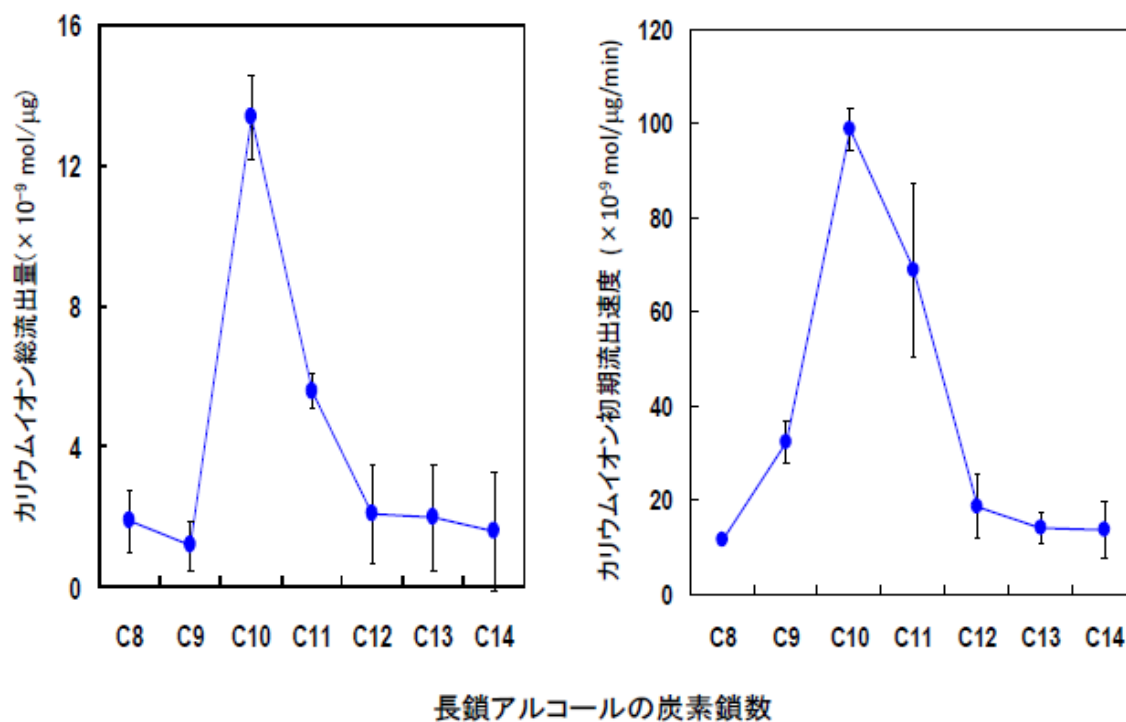


図 6 長鎖アルコールによる *S. aureus* FDA209P のカリウムイオン流出挙動
試薬の最終濃度：80 μ g/ml

b) 溶血作用

1) 鎖状テルペンアルコールによる溶血作用

ウサギ脱繊維血液に各鎖状テルペンアルコールを単独で作用させた時の溶血率の変化を図 7 に示した。Farnesol 40 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度では 1 時間の接触でほぼ 100% の溶血率を示した。また、20 $\mu\text{g/ml}$ においては、4 時間後で溶血率は 40% まで上昇した。Nerolidol は 40 $\mu\text{g/ml}$ で 2 時間の接触でほぼ 100% の溶血率を示した。Plaunotol は 20 $\mu\text{g/ml}$ でも 4 時間の接触でほぼ 100% の溶血率を示した。Geranylgeraniol は 40 $\mu\text{g/ml}$ で 2 時間の接触でほぼ 100% の溶血率を示した。Geranylgeraniol 80 $\mu\text{g/ml}$ では 1 時間の接触で溶血率はほぼ 100% であった。40 $\mu\text{g/ml}$ においては 2 時間後でほぼ 100% の溶血率を示した。それ以下の濃度では、4 時間接触させても、溶血率は 20% を超えなかった。一方、phytol は 80 $\mu\text{g/ml}$ に濃度を上げないと 4 時間の接触でも溶血率 90% に達しなかった。Geraniol による溶血率は、測定した濃度・接触時間では、いずれの条件でも 5% を超えなかった。

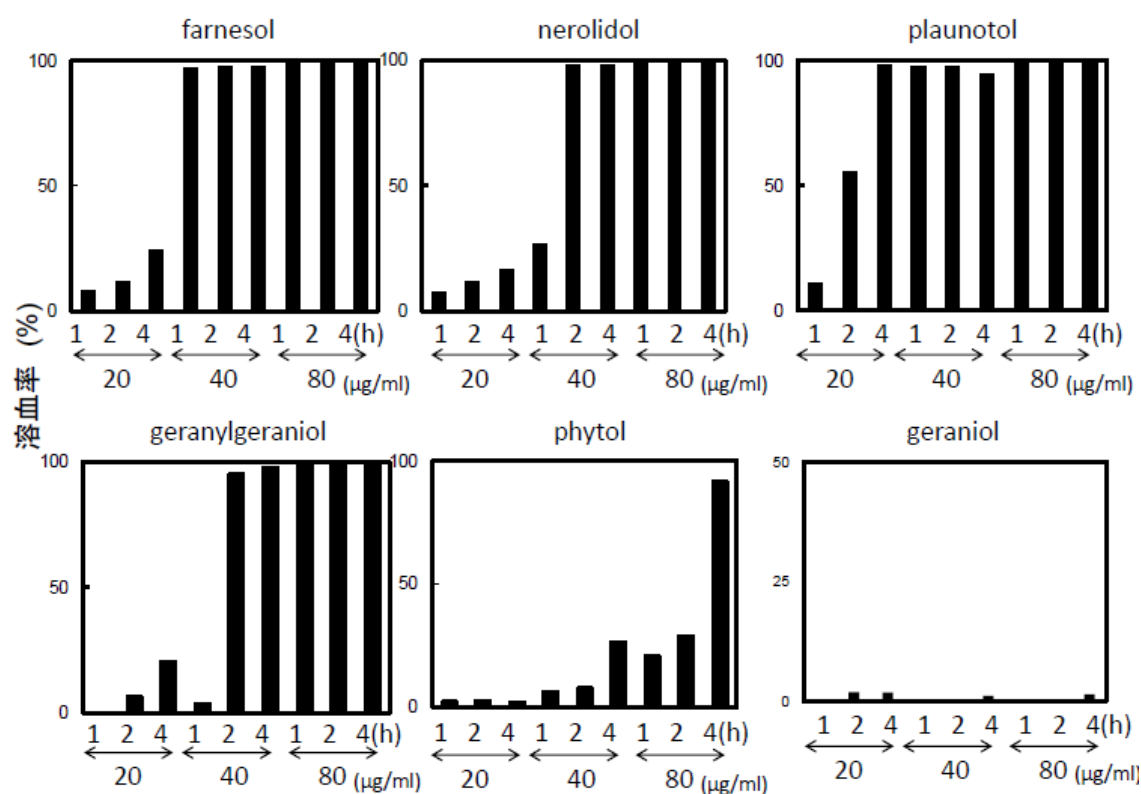


図 7 鎖状テルペンアルコールの溶血作用

各試薬の濃度：20, 40, 80 $\mu\text{g/ml}$

反応時間：1, 2, 4 時間

2) 長鎖アルコールによる溶血作用

ウサギ脱繊維血液に長鎖アルコールを単独で作用させた時の溶血率の変化を図 8 に示した。40 $\mu\text{g/ml}$ においては、 $\text{C}_{10}\text{-OH}$ 、 $\text{C}_{11}\text{-OH}$ 及び $\text{C}_{12}\text{-OH}$ では 1 時間の接触でほぼ 100% の溶血率を示した。 $\text{C}_{13}\text{-OH}$ は 4 時間の接触で 90% まで上昇した。その他の炭素鎖長では、接触時間にかかわらず溶血率は 50% を超えなかった。

濃度を 80 $\mu\text{g/ml}$ にすると、 $\text{C}_9\text{-OH}$ から $\text{C}_{12}\text{-OH}$ は 1 時間の接触でほぼ 100% の溶血率を示した。 $\text{C}_{13}\text{-OH}$ は 2 時間の接触でほぼ 100% まで上昇した。その他の炭素鎖長では、接触時間にかかわらず溶血率は 50% を超えなかった。(データ省略)

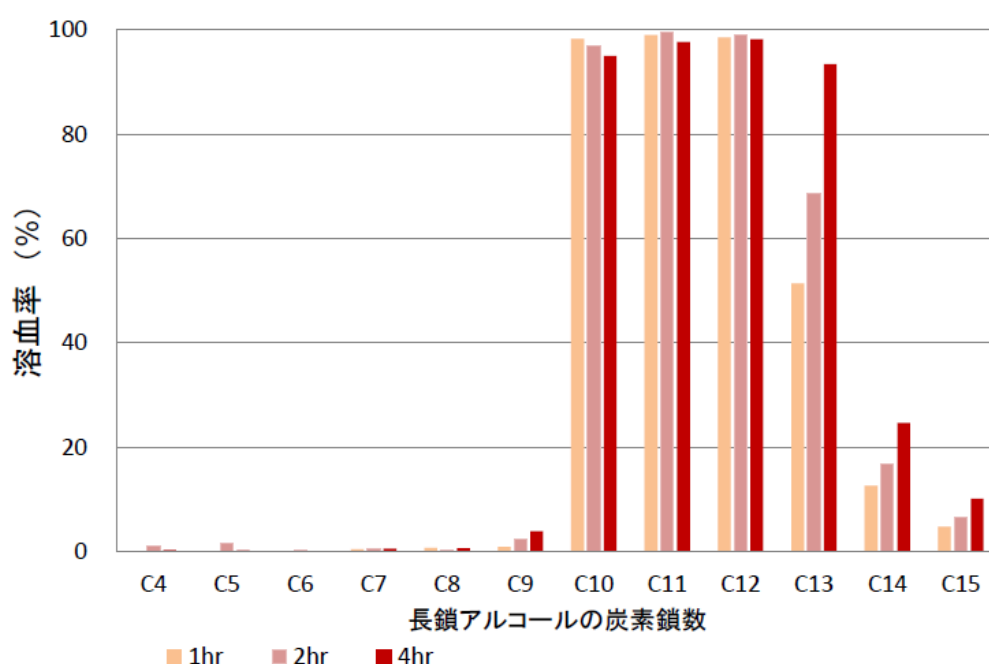


図 8 長鎖アルコールの溶血反応

試薬の最終濃度：40 $\mu\text{g/ml}$

c) 活性酸素による影響

S. aureus に farnesol を作用させ生じる活性酸素量を NBT 法によって測定した。

farnesol を添加した系としていない系において有意差が認められず、活性酸素の影響はなかった (図 9)。

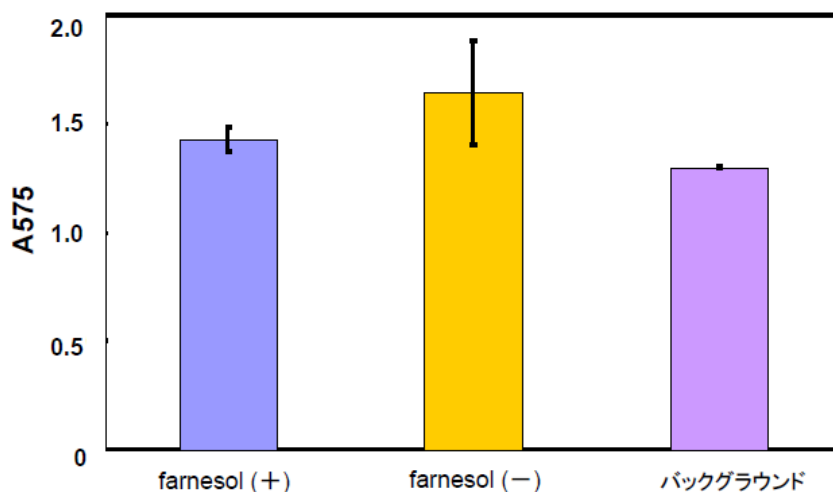


図 9 Farneol によって生じる活性酸素量の測定

farnesol (+) : 80 μ g/ml farnesol (-) : 0 μ g/ml

d) 電子スピン共鳴による細胞膜流動性変化

電子スピン共鳴 (ESR) を用いて、*S. aureus* に farnesol を作用させたときの細胞膜の流動性の変化を測定した結果を図 10 に示した。流動性変化を比較しやすくするため、farnesol を添加しない条件の時の S_{op} 及び $1/\tau$ を 100% としたときの値 [流動性(%)] として示した。

細胞膜表面近くの情報を反映する 5-doxyl-stearic acid をプローブ分子とした時 (図 11)、及び菌液のみの場合と比べて farnesol を加えた系では流動性を示す S_{OP} は 1.82 倍に上昇していた。

また、細胞膜深部の情報を反映する 16-doxyl-stearic acid methyl ester をプローブ分子とした時 (図 11)、菌液のみの場合と比べて farnesol を加えた系では相関時間を示す τ が減少していた。相関時間は、分子が向きを変えるのにかかる平均時間と解釈されており、粘性が高い環境では分子の向きが変わりにくくなり相関時間は長くなる。相関時間の減少は細胞膜中のリン脂質が向きを変えるのに必要な時間が短い、すなわち、動きやすい環境に変化していることを表している。

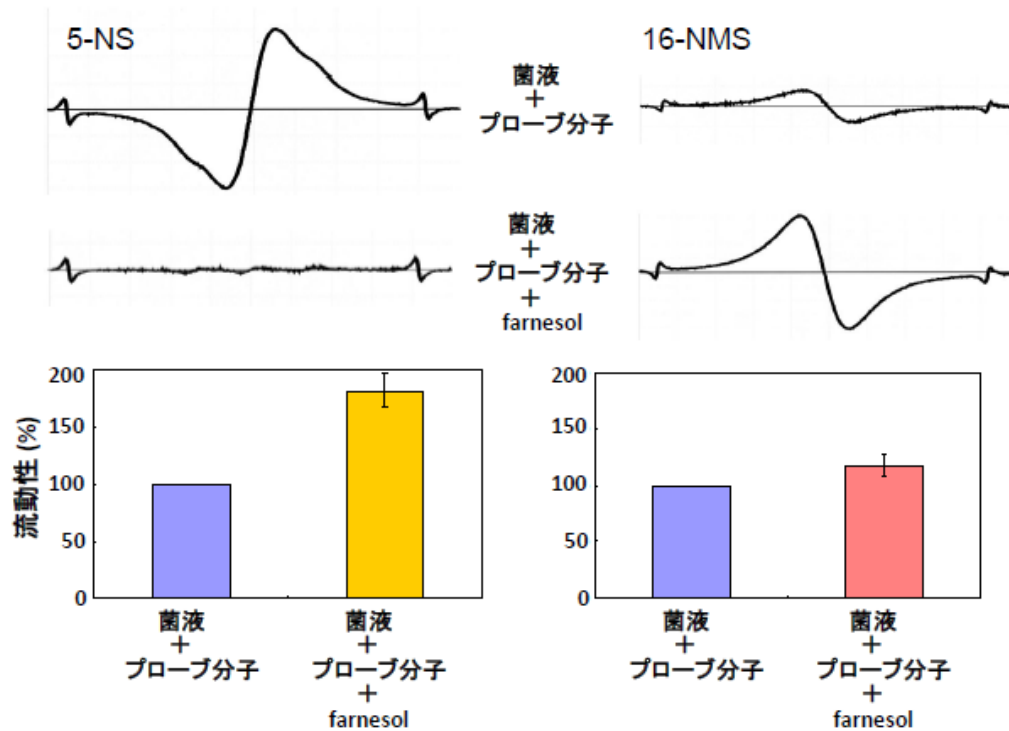


図 10 Farnesol による *S. aureus* FDA209P の細胞膜流動性変化

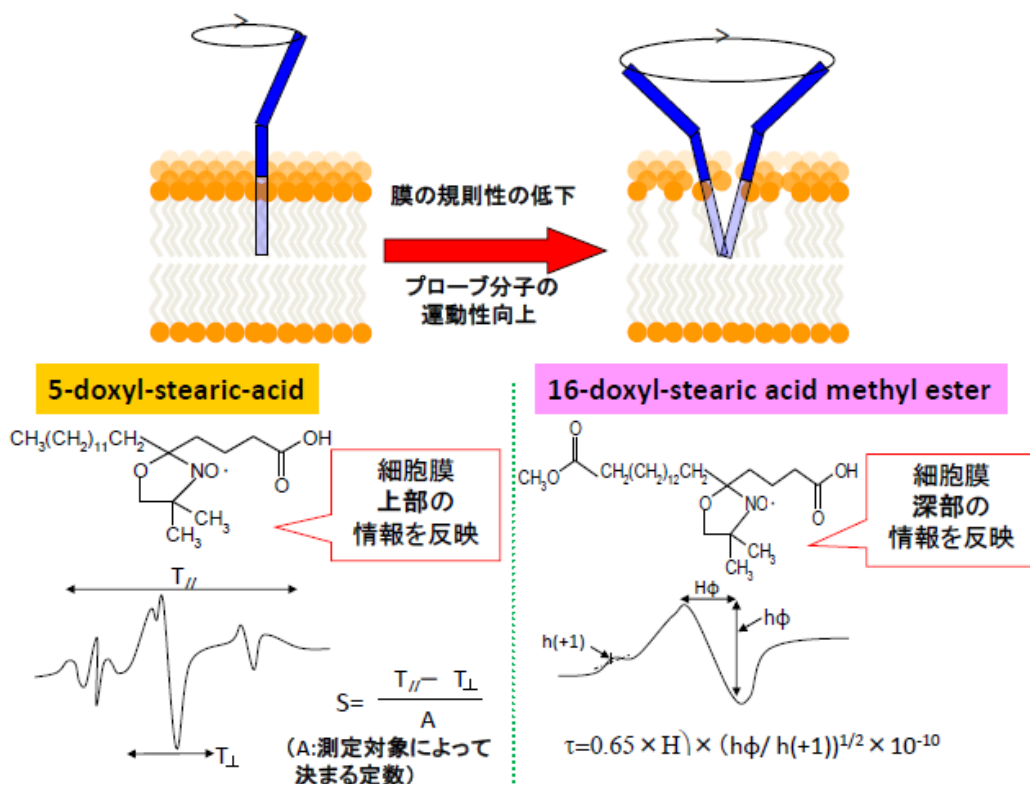


図 11 電子共鳴スピンにおける細胞膜流動性の測定原理

e) 細胞膜安定化剤及びカリウムチャネル阻害薬添加時の増殖抑制作用

Farnesol と carotenoid を作用させた時の *S. aureus* FDA209P の振盪法によって得られた増殖曲線を図 12 に示した。Carotenoid は farnesol の増殖抑制作用を減弱させた。Carotenoid 単独で増殖抑制作用は見られなかった。

同様に振盪法によって得られた、farnesol と quinine 及び farnesol と tetra ethyl ammonium chloride を作用させた時の *S. aureus* FDA209P の増殖曲線の変化をそれぞれ図 13 及び 14 に示した。quinine 及び tetra ethyl ammonium chloride の farnesol の増殖抑制作用への明確な減弱は見られなかった。

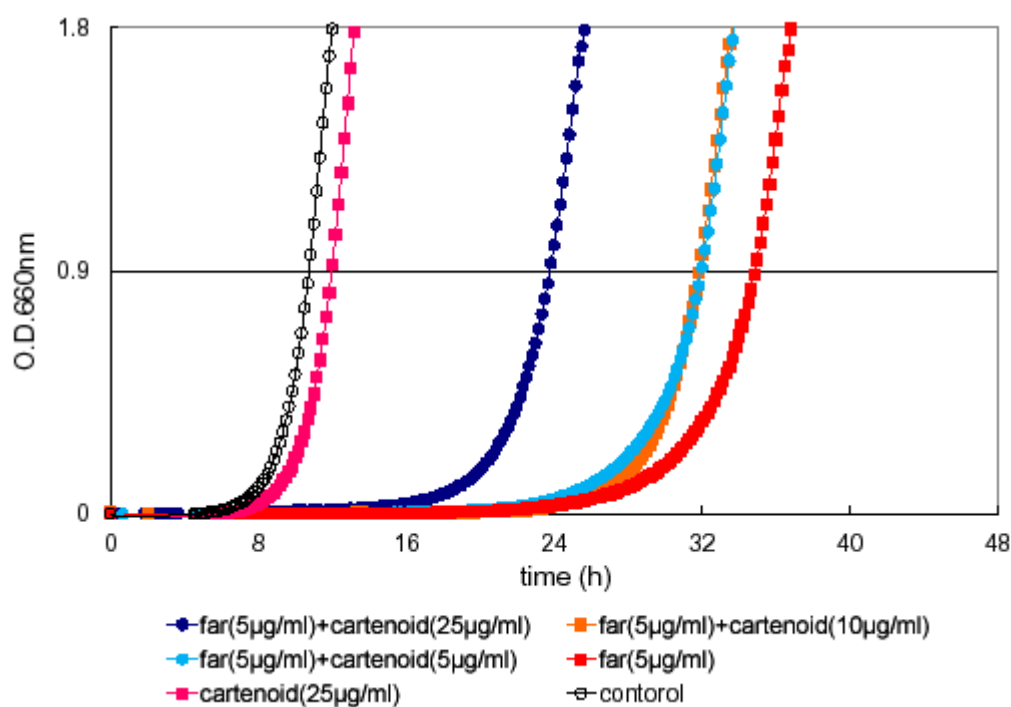


図 12 Cartenoid 添加による farnesol の *S. aureus* FDA209P に対する増殖抑制曲線の変化

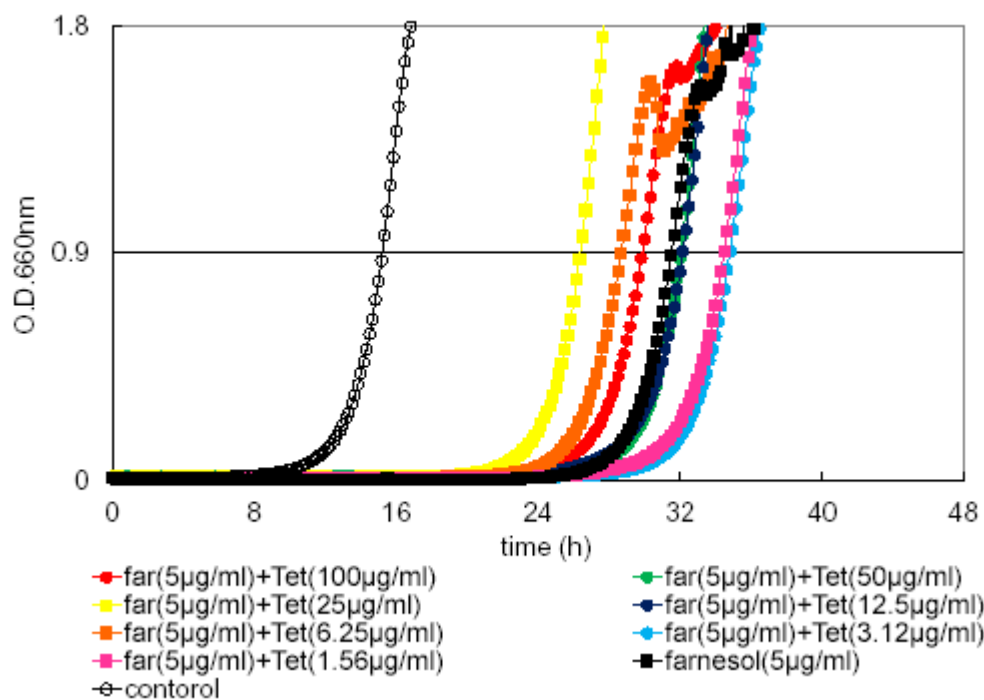


図 13 Tetra ethyl ammonium chloride 添加による farnesol の *S. aureus* FDA209P に対する増殖抑制曲線の変化

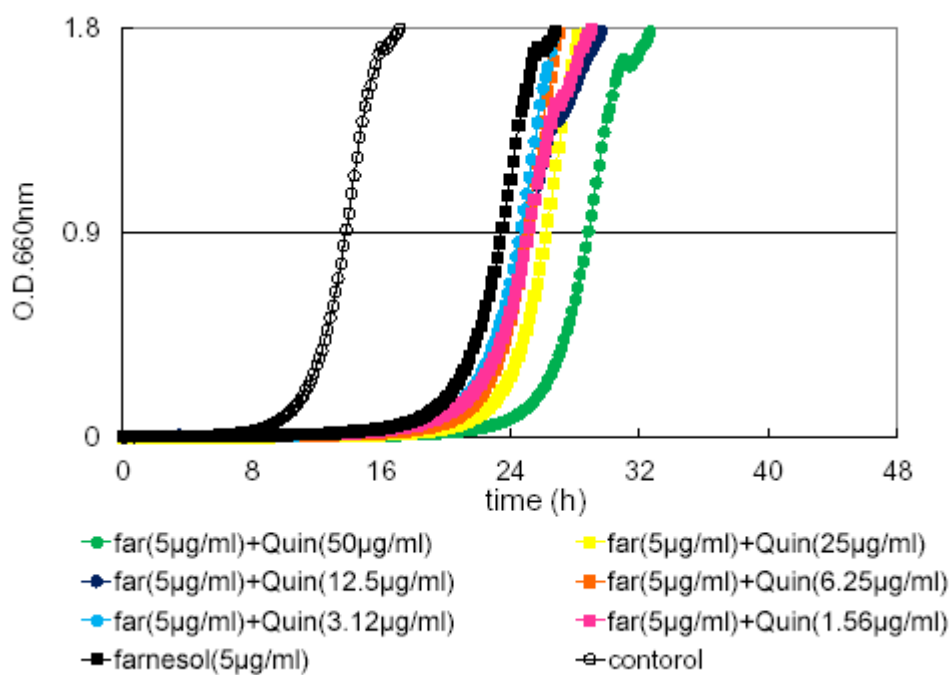


図 14 Quinine 添加による farnesol の *S. aureus* FDA209P に対する増殖抑制曲線の変化

第4節 考察

C₁₀-OH 及び C₁₁-OH の添加直後に菌懸濁液中のカリウムイオン濃度が急激に上昇し、計測されたカリウムイオン総流出量及びカリウムイオン初期流出速度の値は他の長鎖アルコールと比べて大きかった。振盪法及び Time-kill assay 法の結果は、C₁₀-OH 及び C₁₁-OH が最も強い殺菌作用を示すことを示唆した。これらのことから殺菌作用のメカニズムは細胞膜の損傷によるものと推察できる。長鎖アルコールと同様のことが、鎖状テルペンアルコールでも観察された。^{7, 8, 25)} すなわち、炭素鎖の長さが C₁₀-OH 及び C₁₁-OH に近い farnesol 及び nerolidol は、他の鎖状テルペンアルコールよりも顕著なカリウムイオン流出作用を示し、MBC も低い値を示した。これらの結果より細胞膜損傷作用は炭素鎖長すなわち carbonyl 炭素から結合末端炭素までの長さが重要であることが明らかになった。Geranylgeraniol のカリウムイオン流出作用は至適濃度があり、garenylgeraniol の濃度が上がるにつれてカリウムイオン流出作用、すなわち細胞膜損傷作用は減弱することが報告されている。^{7, 25)} C₁₅-OH 及び geranylgeraniol の濃度を上げていくと、ある濃度を境に、増強していた増殖抑制作用が減弱に転ずるという二相性が見られる。これらの炭素鎖長は *S. aureus* FDA209P の脂質二重層のリン脂質の約半分の長さであり、²⁶⁾ 作用させる薬剤の濃度の上昇により脂質二重層中の濃度が上昇し、carotenoid のように細胞膜を保護する作用が出現したためと考えた。

鎖状テルペンアルコール及び長鎖アルコールの細菌細胞膜損傷作用から、哺乳動物の細胞膜への影響が懸念される。そこでウサギ脱繊維血液に作用させたところ、C₁₀-OH, C₁₁-OH 及び C₁₂-OH 及びセスキテルペンアルコールである farnesol と nerolidol で強い溶血作用が確認された。

細菌細胞からのカリウムイオンの流出を強く引き起こす化合物が溶血作用を顕著に示すことから、長鎖アルコール C₁₀-OH 及び C₁₁-OH とセスキテルペンアルコール farnesol 及び nerolidol は、細菌細胞のみならず哺乳動物の細胞膜にも損傷を与えうることがわかった。溶血反応において geranylgeraniol は明確な二相性を示さなかった。

S. aureus の細胞膜リン脂質は、phosphatidylglycerol、diphosphatidylglycerol (cardiolipin)、phosphatidylglycero-phosphate などで構成されており、哺乳動物赤血球の構成成分である phosphatidylethanolamine、phosphatidylcholine、sphingomyelin と異なっている。Geranylgeraniol の細胞膜損傷は黄色ブドウ球菌及びウサギ赤血球において確認されたが、挙動に異なる点も見られるため、脂質二重膜のリン脂質の成分・組成の違いは

細胞膜損傷作用に何らかの関係があると考えた。

細菌細胞の細胞膜透過性が上昇する機構として、イオノフォアによる拡散、カリウムチャネル、 $\text{Na}^+ \cdot \text{K}^+ \text{ATPase}$ ポンプを介する経路などの機構が知られている。²¹⁾ これらの機構は細胞膜の流動性をほとんど変化させない。電子スピン共鳴測定による細胞膜流動性変化は、farnesol を *S. aureus* に添加したときの細胞膜流動性変化を電子スピン共鳴で測定したところ、細胞膜上部及び細胞膜深部流動性が共に上昇していた。したがって、farnesol はイオノフォアのような挙動や、カリウムチャネルや $\text{Na}^+ \cdot \text{K}^+ \text{ATPase}$ ポンプを攻撃すること以外で細胞膜の透過性を向上させていると考えられる。カリウムチャネルへの攻撃は、quinine 及び tetra ethyl ammonium chloride を用いた実験結果からも可能性は低いと考えた。

鎖状テルペンアルコール及び長鎖アルコールによるカリウムイオン流出は、作用させてから数秒で起こっていた。^{7, 8, 27)} 短時間に大きな損傷を与えるものとして活性酸素が考えられるが、farnesol を作用させた実験の結果から活性酸素の関与は確認できなかった。

ESR 測定及びカリウムイオン流出測定の結果は、鎖状テルペンアルコールや長鎖アルコールが、細胞膜の脂質二重膜のリン脂質部分に直接作用していることを示唆している。

リン脂質からなる二重膜は、低温での結晶相からゲル相、リップル相、流動相へと流動性が変化する。²¹⁾ リン脂質の炭素鎖を短くすることで流動性が促進され、²⁸⁾ farnesol と geranylgeraniol が phosphatidylethanolamine の脂質二重膜に入り込むと、相転移を起こす。²⁹⁾ これらの報告と得られた実験結果から、鎖状テルペンアルコール及び長鎖アルコールは、*S. aureus* の細胞膜脂質二重膜に取り込まれ、間隙を作ることによって細胞膜のリン脂質の流動性を変化させて細胞膜損傷作用を引き起こしていると考えた。脂質二重膜のリン脂質部分に作用する麻酔薬に長鎖アルコールを添加するとき、炭素鎖長により麻酔作用に影響が出る現象も、³⁰⁾ 流動性変化が起きているためと思われる。

細胞膜保護作用がある carotenoid を farnesol と同時に *S. aureus* FDA209P に作用させたとき、増殖抑制作用が farnesol 単独と比べて減弱したことが振盪法の結果より示された。Richard らによると carotenoid は、脂質二重膜のリン脂質部位に入り込み、流動性を低下させることで細胞膜を補強するように作用するとされている。²⁶⁾ このことから farnesol の抗 *S. aureus* 作用は、細胞膜脂質二重層の流動性上昇による損傷と考えた。

本研究から、長鎖アルコール及び鎖状テルペンアルコールは、細胞の脂質二重膜の流動性を上昇させることで細胞膜を損傷し、その抗 *S. aureus* 作用を示すと考えた。また、細胞膜損傷作用の強度は carbinyl 炭素から結合末端炭素までの結合距離によって決定づけられると考察した。

第三章 鎖状テルペンアルコールを組み合わせた時の *S. aureus* に対する作用

第1節 緒言

第二章にてウサギ血液に対する鎖状テルペンアルコールの溶血作用を記した。この溶血作用は、farnesol がヒトの赤血球などの細胞にも損傷を与え、有害な副作用になりうる。

第三章ではこの問題を解決するために、抗 *S. aureus* 作用を損なうことなく、安全な臨床応用を可能にする方法を検討した。Farnesol をはじめとするセスキテルペンアルコールには、既存の抗菌薬と併用することで抗菌薬の感受性を高めることが報告されている。^{31,32)} また、様々な生理活性を示す精油中には farnesol をはじめとする鎖状テルペンアルコールなど複数の成分が含まれている。そこで、炭素鎖の長さの異なる精油成分を組み合わせることにより、抗 *S. aureus* 作用や細胞膜損傷作用への影響を調べた。

第2節 材料及び方法

a) 材料

1) 使用菌種

第一章 第2節 a)材料 1) に記した使用菌株を用いた。

2) 使用培地

第一章 第2節 a)材料 2) に記した使用培地を用いた。

3) 使用薬剤

第二章 第2節 a)材料 3) に記した使用薬剤を用いた。

b) 方法

1) 振盪法による増殖抑制作用の測定

第一章 第2節 b)方法 2) に記した振盪法により測定した。

2) カリウムイオン流出挙動の測定

第二章 第2節 b)方法 2) に記したカリウムイオン流出挙動の測定により測定した。

3) 溶血反応

第二章 第2節 b)方法 2) に記した方法により測定した。

第3節 結果

a) Farnesol と geraniol または geranylgeraniol を組み合わせて作用させたときの増殖抑制作用

Farnesol と geraniol を同時に、あるいは farnesol と geranylgeraniol を同時に *S. aureus* FDA209P に作用させた時の増殖曲線の変化を図 15 に示した。

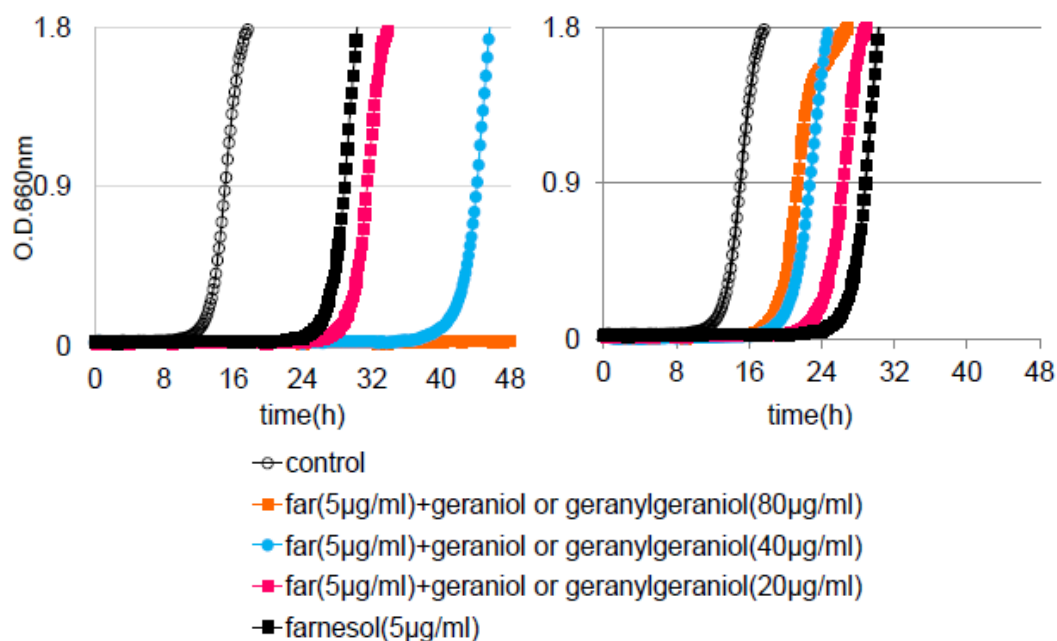


図 15 Farnesol と geraniol または geranylgeraniol を組み合わせて作用させたときの増殖抑制曲線

左) geraniol 右) geranylgeraniol

最終濃度を 5 µg/ml に固定した farnesol に geraniol の 20、40 及び 80 µg/ml をそれぞれ加えると、geraniol の濃度の上昇とともに増殖抑制作用が増強した。

これに対し、最終濃度を 5 µg/ml に固定した farnesol に geranylgeraniol の 20、40 及び 80 µg/ml をそれぞれ加えた時は、geranylgeraniol の濃度の上昇とともに増殖抑制作用が減弱した。

Farnesol と geraniol あるいは farnesol と geranylgeraniol を組み合わせて作用させた時の DP を表 3 に示した。DP は geraniol 濃度が高くなるにつれて延長したが、逆に geranylgeraniol の濃度が高くなるにつれて DP は短縮した。

表 3 Farnesol と geraniol または geranylgeraniol を組み合わせて作用させたときの *S. aureus* FDA209P に対する増殖抑制作用

鎖状テルペンアルコール(μg/ml) farnesol : geraniol		DP ^{a)} (h)	鎖状テルペンアルコール(μg/ml) farnesol : geranylgeraniol		DP ^{a)} (h)
5 : 0		13.8	5 : 0		13.8
5 : 5		13.5	5 : 5		17.2
5 : 10		14.5	5 : 10		14.3
5 : 20		16.3	5 : 20		11.3
5 : 40		29.0	5 : 40		7.7
5 : 80		43.7	5 : 80		6.3

a) control と増殖を比較して OD₆₆₀ が 0.9 に達するまでの時間の遅れの差

b) Farnesol と geraniol または geranylgeraniol を組み合わせて作用させた時のカリウムイオン流出

最終濃度を 10 $\mu\text{g/ml}$ に固定した farnesol に geraniol を最終濃度が 5, 10, 20, 40 及び 80 $\mu\text{g/ml}$ となるように加えた溶液を、*S. aureus* 懸濁液中に添加した時の K⁺総流出量及び K⁺初期流出速度を表 4 に示した。

表 4 Farnesol と geraniol を組み合わせて作用させた時のカリウムイオン流出作用

鎖状テルペンアルコール($\mu\text{g/ml}$) farnesol : geraniol	カリウムイオン総流出量 ($\times 10^{-9}\text{mol}/\mu\text{g}$)	カリウムイオン初期流出速度 ($\times 10^{-10}\text{mol}/\mu\text{g}/\text{sec}$)
10 : 0	267	8.8
10 : 5	190	8.5
10 : 10	271	11.1
10 : 20	395	13.2
10 : 40	186	3.1
10 : 80	173	2.4

数値は各々 3 回の実験結果の平均値を算出

Geraniol の濃度の上昇に伴い、添加直後の K^+ の濃度上昇が抑制されていた。また、平衡状態に到達するまでの時間も、geraniol の濃度が上がるにつれて延長していた。

K^+ 総流出量と K^+ 初期流出速度はともに farnesol と geraniol を 10:20 $\mu\text{g/ml}$ で添加した時が高く、40 及び 80 $\mu\text{g/ml}$ と組み合わせる geraniol の濃度が高くなるにつれて減少していた。

Geranylgeraniol について、geraniol と同じ方法で測定した。その結果を表 5 に示した。 K^+ 総流出量と K^+ 初期流出速度はともに geranylgeraniol の割合が高くなるにつれて減少しており、geraniol のときと同じ傾向であった。

表 5 Farnesol と geranylgeraniol を組み合わせて作用させた時の
カリウムイオン流出作用

鎖状テルペンアルコール ($\mu\text{g/ml}$) farnesol : geranylgeraniol	カリウムイオン総流出量 ($\times 10^{-9}\text{mol}/\mu\text{g}$)	カリウムイオン初期流出速度 ($\times 10^{-10}\text{mol}/\mu\text{g}/\text{sec}$)
10: 0	267	8.8
10 : 5	34	1.5
10 : 10	28	1.1
10 : 20	27	0.8
10 : 40	33	0.8
10 : 80	15	0.3

数値は各々3回の実験結果の平均値を算出

c) Farnesol と geraniol を組み合わせた時の溶血作用

最終濃度を 20 $\mu\text{g/ml}$ に固定した farnesol に、geraniol を最終濃度が 2.5、10 及び 40 $\mu\text{g/ml}$ になるようにそれぞれ加えた溶液の溶血作用の結果を図 16 に示した。Farnesol 単独では薬剤との接触時間が長くなるにつれて溶血率は上昇し、4 時間後には約 24% に達した。一方、geraniol を加えた条件では溶血反応は抑えられ、2.5 $\mu\text{g/ml}$ を添加したときに 4 時間後でも溶血率が 10% 以上は上昇していなかった。

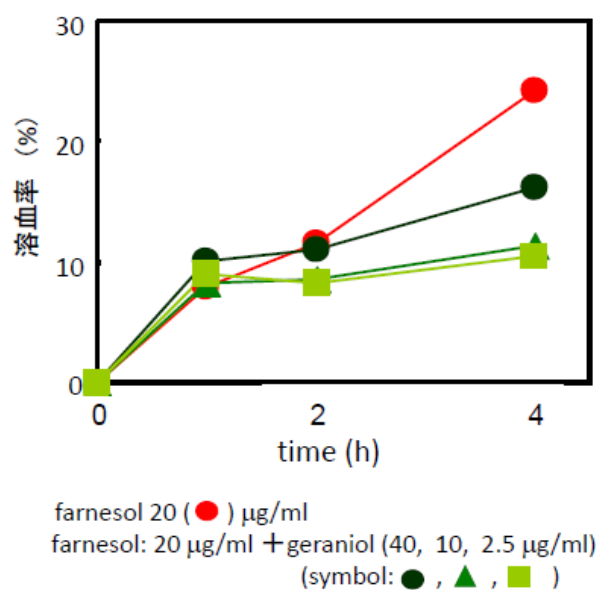


図 16 Farnesol と geraniol を組み合わせた時の溶血作用の変化

d) Farnesol と Cn-OH を組み合わせた時の溶血作用

最終濃度を 40 µg/ml に固定した farnesol に、C₅-OH, C₆-OH, C₇-OH, C₈-OH, C₉-OH, C₁₀-OH, C₁₁-OH, C₁₂-OH, C₁₃-OH, C₁₄-OH 及び C₁₅-OH を 40 µg/ml ずつ添加した時の溶血反応の結果を図 17 に示した。C₇-OH を添加した時、溶血率は最も小さい値を示した。炭素鎖が長くなるにつれ溶血率は増加し、C₁₂-OH 以降再び減少傾向であった。

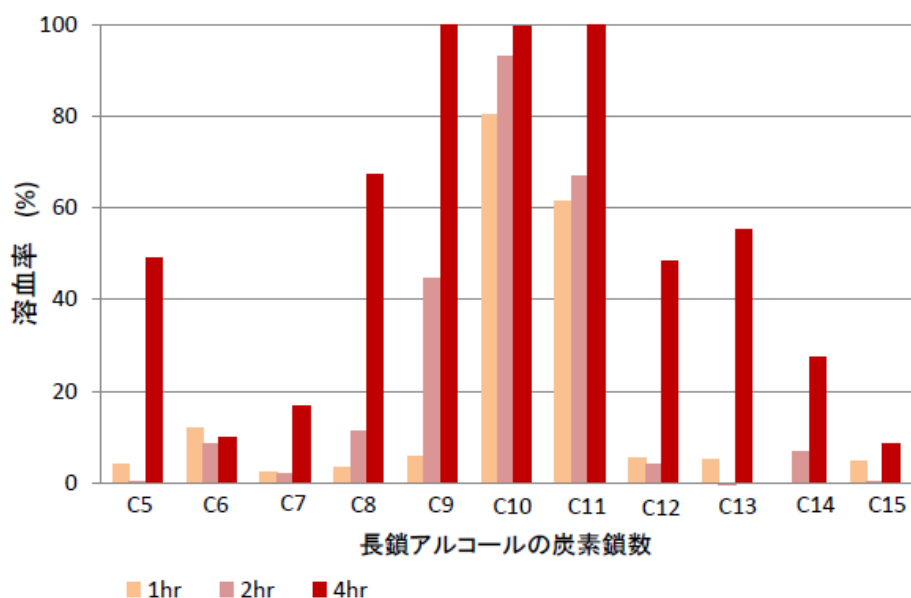


図 17 Farnesol と Cn-OH を組み合わせた時の溶血作用

farnesol の最終濃度を 40 µg/ml に固定し、各長鎖アルコールを最終濃度 40 µg/ml になるように添加した。

第4節 考察

Farnesol と geranylgeraniol を同時に *S. aureus* FDA209P に作用させたとき、geranylgeraniol の濃度の上昇に従って増殖抑制作用が減弱していた。このときのカリウムイオン流出作用も減弱していた。この結果は、geranylgeraniol の細胞膜保護作用によるものと考えられる。

一方、farnesol と geraniol を同時に *S. aureus* FDA209P に作用させたとき、geraniol の濃度の上昇に伴い farnesol のみを作用させた条件より増殖抑制作用が増強していた。このときカリウムイオンの流出は、組み合わせる geraniol の濃度がある一定濃度を超えると減弱していた。さらに、溶血反応において溶血率の進行を抑えることを見いだした。カリウムイオンの流出挙動と溶血作用の結果から、farnesol を geraniol と同時に作用させると濃度によって *S. aureus* FDA209P への増殖抑制作用を増強させながら、細胞膜損傷作用を減弱できることを明らかにした。

Farnesol と C₆-OH、C₇-OH 及び C₁₅-OH をそれぞれ組み合わせて反応させた時の溶血作用では 4 時間後まで溶血率の進行を抑えることを明らかにした。これらの炭素鎖長は、geraniol 及び geranylgeraniol と近い値であった。

Farnesol と geraniol を組み合わせて *S. aureus* に作用させた時、geraniol は細胞膜の脂質二重膜に入り込むが損傷には至らず、farnesol も geraniol が存在しているため細胞膜を十分に損傷できなくなると思われる。また、geraniol のようにリン脂質に比べて特に炭素鎖長が短い薬剤が脂質二重膜に存在する時、生じた間隙とリン脂質同士が互いに噛み合わさり、流動性が低下して細胞膜として安定化することが報告されている。²⁸⁾そして、細胞内に入り込めた farnesol により、金子らが報告している HMG-CoA reductase 阻害作用などの細胞膜損傷作用以外の機構⁹⁾が進行することで抗 *S. aureus* 作用が増強するものと推察される。

以上のことから、炭素鎖長の異なる鎖状テルペンアルコール及び長鎖アルコールを組み合わせることで、抗 *S. aureus* 作用を損なわずに、副作用となりうる細胞膜損傷作用を抑制できる可能性を初めて明らかにした。

総括

本研究では、テルペン類の抗菌活性を明確にするため、鎖状テルペンアルコール及び化学構造の似ている長鎖アルコールの抗 *S. aureus* 作用を詳細に検討した。さらに、作用機構の解明及び臨床応用の可能性について検討した。

第一章では、長鎖アルコールの抗 *S. aureus* 作用について検討した。構造上の特徴である炭素鎖に注目し、鎖状テルペンアルコールが化合物によって大きく抗 *S. aureus* 作用が異なる要因を調べるため、増殖の遅れを比較した。 C_{10} -OH、 C_{11} -OH、 C_{12} -OH 及び C_{13} -OH が静菌作用を示し、さらに C_{10} -OH 及び C_{11} -OH が殺菌作用を示すことを明確にした。さらに、 C_{15} -OH の増殖抑制作用が二相性を示すことをはじめて明らかにした。長鎖アルコールの抗 *S. aureus* 作用は、Shikkema ら⁴⁾ が提唱する分配係数ではなく、構造中の炭素鎖の長さによって決定づけられることを明らかにした。

第二章では、長鎖アルコール及び鎖状テルペンアルコールの殺菌作用機序について検討した。細菌細胞からのカリウムイオンの流出挙動から長鎖アルコール及び鎖状テルペンアルコールが細胞膜損傷作用を示すことを明らかにした。この細胞膜損傷作用は、炭素鎖の長さによって異なり、鎖状テルペンアルコールの carbinyl 炭素から結合末端炭素までの長さが重要であることを明らかにした。さらに、farnesol による急激な細胞膜透過性向上の機構を調べるため、細胞膜の流動性変化を電子スピン共鳴にて測定したところ、脂質二重膜の安定性が損なわれている結果を得た。このとき、活性酸素の発生は認められず、カリウムチャンネルが標的になっていないこと、細胞膜を安定化させる化合物の添加によって farnesol による抗菌作用が減弱することを確認した。

得られた結果から、farnesol は細胞膜の脂質二重膜に非特異的に入り込み、細胞膜の流動性を向上させ、膜構造の損傷を引き起こしていることが強く示唆された。さらに、farnesol による細胞膜損傷作用は、哺乳動物細胞の細胞膜にも及ぶことも示した。

第三章では、炭素鎖長の異なる鎖状テルペンアルコールの組み合わせにより、宿主への副作用軽減と抗 *S. aureus* 作用増強の両立の可能性を検討した。ウサギ脱繊維血液に対して鎖状テルペンアルコールは溶血作用を示すことから、細菌細胞膜に farnesol が損傷をきたす作用は、ヒト細胞に対しても起こりうるため、重要な副作用につながる可能性がある。精油中には farnesol をはじめとする鎖状テルペンアルコールなど複数の成分が含まれていることに着目し、炭素鎖の長さの異なる精油成分の組み合わせにより細胞膜損傷作用が減弱するかを調べた。細胞膜損傷作用の低い geraniol を farnesol と同時に *S. aureus* FDA209P に

作用させたところ、カリウムイオン流出が減弱していた。また、溶血作用が減弱する一方で抗 *S. aureus* 作用が増強しており、抗 *S. aureus* 作用を増強させながら、副作用を軽減できることを見いだした。このように、複数の鎖状テルペンアルコールとの組み合わせによる臨床応用への可能性を明らかにした。

現在知られている細菌の薬剤耐性機序は、薬剤分解酵素の産生や薬剤結合部位のタンパク変性、薬剤排出ポンプの形成などが報告されている。仮に farnesol の作用点が変わり、細胞膜の脂質二重膜へ作用しなくなるためには、脂質二重膜の全体を変異させる必要があるため耐性を生じる可能性は低いと考えられる。消毒剤として汎用されている、塩化ベンザルコニウムやクロルヘキシジンなどの界面活性剤は細胞膜損傷作用があるとされている。しかし、細胞膜表面の電荷により薬剤の吸着作用の変化、ミセル形成や金属イオン存在による抗菌作用の低下などの問題点がある。疎水性である鎖状テルペンアルコールは、これらのような抗菌作用の減弱は起こりにくいと考えられる。近年上市された抗 MRSA 薬の daptomycin も、細胞膜に孔を開けることにより抗 *S. aureus* 作用を示すとされていることから、³³⁾ farnesol も daptomycin と同様に耐性をもつ細菌に対しても有用であると考えられる。さらに、farnesol には HMG-CoA reductase 阻害作用を持つことが報告されており、⁹⁾ 抗菌作用機序を複数もつ薬剤であるため耐性を獲得されにくいことが考えられる。

また、farnesol については近年、*Candida albicans* のバイオフィーム形成を調節する quorum sensing 分子として研究されている。³⁴⁾ 易感染性宿主は真菌感染症にも罹患するリスクがあることから、farnesol の quorum sensing 分子としての作用も明確になることが期待される。

これまで述べたように、本研究において farnesol をはじめとする鎖状テルペンアルコールの抗 *S. aureus* 作用機序の一部を明らかにした。そのために、抗 *S. aureus* 作用の測定は、従来の方法ではなく振盪法を用いて精査した。そして定説とされていた、抗菌作用は分配係数に支配されるという考え方⁴⁾ではなく、炭素鎖長が重要であることを証明した。そして、炭素鎖の長さによってユニークな性質、すなわち膜損傷作用及び膜保護作用を示すことも明らかにした。さらに、テルペン化合物などの組み合わせにより副作用の軽減も可能であることを初めて明らかにした。これにより、耐性化が進んだ *S. aureus* に対して、効果的な抗 *S. aureus* 作用を持ち、宿主に使いやすい新規抗菌薬となりうる化合物として、鎖状テルペンアルコールは有用であることを明らかにした。

本研究の誌上発表

- Togashi, N., Hamashima, H., et al., *Molecules*, **12**, 139-148 (2007).
- Togashi, N., Hamashima, H., et al., *J. Essent. Oil Res.*, **22**, 263-269 (2010).
- Togashi, N., Hamashima, H., et al., in preparation.
- Togashi, N., Hamashima, H., et al., *Molecules*, **13**, 3069-3076 (2008).

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始御懇篤なるご指導を賜りました昭和薬科大学 薬品作用学研究室 濱島肇教授に深甚なる謝意を表します。

本稿の御校閲を戴きました昭和薬科大学 統合感染免疫学研究室 石戸聡教授ならびに天然物化学研究室 増田和夫教授、薬物動態学研究室 山崎浩史教授に深謝いたします。

また、数々の有意義なご助言とご指導を賜りました昭和薬科大学 井上能博准教授に深く御礼申し上げます。

さらに、終始建設的なご助言、ご指導を戴きました白石明子先生、西坂美樹氏、金子瑞穂氏に深謝致します。

参考文献

- 1) Chang ST.,Chen PF.,Chang SC.,*J Ethnopharmacol.*,**77**,123-127 (2001)
- 2) Imai H.,Osawa K.,Yasuda H.,Hamashima H.,Arai T.,Sasatu M.,
Microbios.,**106**,31-39 (2001)
- 3) Shapiro S.,Meier A.,Guggenheim B.,
Oral Microbiol Immunol.,**9**,202-208 (1994)
- 4) Sikkema J., Bont J.A.M., Poolman B., *Microbiological Reviews*, **59**, 201-222 (1995)
- 5) Pattnaik S., Subramanyam V.R., Bapaji M., Kole C.R.,
Microbios, **89**, 39-46 (1997)
- 6) 新井武利, 濱島肇, 笹津備規, *日本化学療法学会雑誌*, 44, 786-791 (1996)
- 7) 羽田とし子, 平成 18 年度博士論文
- 8) Inoue Y., Shiraishi A., Hada T., Hirose K., Hamashima H., Shimada J., *FEMS Microbiol. Letters*, **237**, 325-331 (2004)
- 9) Kaneko M., Togashi N., Hamashima H., Hirohara M., Inoue Y., *The Journal of Antibiotics*, **64**, 547-549 (2011)
- 10) 青野力三,中島春紫, *蛋白質核酸酵素*, 42, 2532-2541(1997)
- 11) Kubo I., Muroi H., Kubo A., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **41**, 2447-2450(1993)
- 12) 加藤信行、芝崎勲、*防菌防黴*, **8**, 325-331 (1980)
- 13) 古瀬志穂, 平成 12 年度修士論文
- 14) Hada T., Inoue Y., Shiraishi A., Hamashima H., Masuda K., Shiojima K.,
Arai T., Sasatsu M., *Microbios*, **102**, 133-141(2001)
- 15) 廣瀬一眞, 平成 15 年度修士論文
- 16) 日本化学療法学会,*Chemotherapy.*,**38**,102-105 (1990)
- 17) 日本化学療法学会, *Chemotherapy.*,**41**,183-189 (1993)
- 18) Kubo I., Muroi H., Himejima M., Kubo A., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **3**, 1305-1308(1993)
- 19) Kubo I., Muroi H., Kubo A., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **3**, 873-880 (1995)
- 20) Inoue Y., Hada T., Shiraishi A., Hirose K., Hamashima H., Kobayashi S., *Anitimicrob. Agents and Chemother.*, **49**, 1770-1774 (2005)

- 21) 野澤義則、大木和夫、「生体膜のバイオダイナミクス」 羊土社 (1993)
- 22) 斎藤裕之, *Res. Org. Geochem.*, **26**, 123-128 (2010)
- 23) Paez P.L., Becerra M.C. Albesa I., *FEMS Microbiol. Lett.*, **303**, 101-105 (2010)
- 24) Koga T., Watanabe H, Kawada H, Takahashi K, Utsui Y, Domon H, Ishii C, Narita T, Yasuda H, *J. Antimicrobial Chemotherapy*, **42**, 133-140 (1998)
- 25) Togashi N., Hamashima H., Shiraishi A., Inoue Y., Takano A., *J. Essential Oil Research*, **22**, 263-269 (2010)
- 26) Taylor R.F., *Microbiological Reviews*, **48**, 181-198 (1984)
- 27) Togashi N., Shiraishi A., Nishizaka M., Matsuoka L., Endo K., Hamashima H., Inoue Y., *Molecules*, **12**, 139-148 (2007)
- 28) Kranenburg M., Smit B., *FEBS Letters* **568**, 15-18 (2004)
- 29) Funari S.S., Prades J., Escribá P.V., Barceló F., *Mol. Membr. Biol.*, **22**, 303-11 (2005)
- 30) 寺田弘、金品昌志、*蛋白質核酸酵素*, **36**, 1770-1778 (1991)
- 31) Byron F. Brehm-Stecher., Eric A. Johnson., *Antimicrob. Agents and Chemother.*, **47**, 3357-3360 (2003)
- 32) Togashi N., Inoue Y., Hamashima H., Takano A., *Molecules.*, **13**, 3069-3076 (2008)
- 33) Silverman J.A., Perlmutter N.G., Shapiro H.M., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**, 2538-2544 (2003)
- 34) Ramage G., Saville S.P., Wickes B.L., López-Ribot J.L., *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 5459-5463 (2002)