

原著論文

# バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) に抗菌活性をもつ コノテガシワの葉部分 (ソクハクヨウ) の成分について

和田 朋子<sup>1)</sup>, 黒田 照夫<sup>2)</sup>, 土屋 友房<sup>3)</sup>, 塩田 澄子<sup>1),4)</sup> \*

<sup>1)</sup> 就実大学大学院医療薬学研究科, <sup>2)</sup> 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科,

<sup>3)</sup> 立命館大学薬学部, <sup>4)</sup> 就実大学薬学部

## The compound from leaves of *Platycladus orientalis* that showed antimicrobial activity against Vancomycin resistant-Enterococci

Tomoko Wada<sup>1)</sup>, Teruo Kuroda<sup>2)</sup>, Tomofusa Tsuchiya<sup>3)</sup> Sumiko Shiota<sup>1),4)</sup> \*

<sup>1)</sup> Graduate School of Clinical Pharmacy, Shujitsu University,

<sup>2)</sup> Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University

<sup>3)</sup> College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University

<sup>4)</sup> School of Pharmacy, Shujitsu University

(Received 30 October 2015; accepted 27 November 2015)

**Abstract:** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) and vancomycin resistant Enterococci(VRE) are multidrug-resistant bacteria and cause nosocomial infection. The infections caused by these bacteria are hard to treat because drugs to choose for the treatment are limited. While we searched new compounds that showed antibacterial effect such multidrug-resistant bacteria, we found the methanolic extract of leaves of *Platycladus orientalis*, called “Sokuhakuyou”, showed antibacterial activity against MRSA and VRE. We isolated the compound from methanolic extract and identified it as one of the diterpens, *trans*-communic acid. The minimum inhibitory concentration(MIC) of *trans* -communic acid against MRSA and VRE are >32 µg/ml and 16-32 µg/ml, respectively. Although *trans* -communic acid was reported to have anti-MRSA or anti-mycobacterial effect, this is the first report that showed *trans*-communic acid had antibacterial effect against VRE.

Keywords: *trans*-communic acid; antimicrobial activity; vancomycin-resistant Enterococci(VRE)

### 緒言

MRSA や VRE は多剤耐性菌であり, 院内感染を起こす菌として知られる. 厚生労働省院内感染

対策サーベイランス事業 (JANIS) によると, MRSA はデータを提出した 897 の医療機関のすべてで検出されており, VRE は 8.8%にあたる 79

施設から検出されている<sup>1)</sup>。MRSA に比して VRE の検出は少ないが、保菌状態のものはこの数に含まれていない。日本における VRE の集団感染の報告はかなりあり、多いときには一度に 106 名の感染者を出し、終息までには 7~17 ヶ月かかっている<sup>2)</sup>。従って、MRSA や VRE に有効な抗菌薬や消毒薬の開発は急務である。

筆者らはこれまで次の 2 つの観点から、生薬やハーブを用いて抗菌活性をもつ成分の単離同定を行ってきた。一つは、古来より飲食してきたため、安全性が高く、毒性の低い物質が得られる可能性があること。もう一つは、現在使用されている抗菌薬の多くが、微生物の二次代謝産物もしくは化学合成された物質であることから、植物から有効な物質を得ることができれば、これまでの抗菌薬と全く異なる作用機序をもつ医薬品のリードを得ることができるかもしれないという点である。

今回、13 種の生薬成分を用いてスクリーニングを行い、ソクハクヨウ (ヒノキ科のコノテガシワ *Platyclus orientalis* の葉部分の生薬名) の 100% メタノール抽出物に MRSA と VRE に対して抗菌活性を示す物質が含まれていることを見出した。これまでに MRSA に対して強い抗菌活性を示すローリエ由来の kaempferol 3-*O*- $\alpha$ -L-(2'', 4''-di-*E*-*p*-coumaroyl)-rhamnoside 及び kaempferol 3-*O*- $\alpha$ -L-(2''-*E*-*p*-coumaroyl-4''-*Z*-*p*-coumaroyl)-rhamnoside を報告している<sup>3)</sup>。また、VRE に対して抗菌活性を示すセイジ由来の oleanolic acid も報告している<sup>4)</sup>。ソクハクヨウのメタノール抽出物の MRSA と VRE に対する MIC がローリエやセイジのメタノール抽出物と同程度であったことから、ソクハクヨウの 100% メタノール抽出物について精製を進めると kaempferol 誘導体や oleanolic acid のような強い抗菌活性を有する物質を単離できる可能性があると考えた。そこで、ソクハクヨウ 100% メタノール抽出物に含まれる抗菌活性成分の単離を目指して分画を進めた。

## 方法

### 菌株と培養条件

用いた菌株を表 1 に示す。

表 1. 用いた菌株と耐性遺伝子

菌株	耐性遺伝子
<i>Staphylococcus aureus</i>	
OM481 (MRSA)	<i>mecA</i>
OM584 (MRSA)	<i>mecA</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	
NCTC12201 (VRE)	<i>vanA</i>
FA2-2 (VRE)	<i>vanA</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	
FN-1 (VRE)	<i>vanA</i>
BM4147 (VRE)	<i>vanA</i>

黄色ブドウ球菌は 2 株とも臨床分離された MRSA ある。腸球菌はバンコマイシン耐性が確認されており、臨床現場で日和見感染を起こすことで問題となる *Enterococcus faecalis* と *E. faecium* の 2 菌種を二株ずつ用いた。いずれも VRE である。MRSA は Nutrient(N) 培地、VRE は Brain Heart Infusion(BHI)培地を用い 37°C で培養した。

### 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

日本化学療法学会標準法<sup>5)</sup>に従い、微量液体希釈法による MIC の測定を行った。感受性測定用培地には cation supplemented Mueller-Hinton broth (CSMHB) を用いた。プレートは 96 穴の U 字型ウェルのマイクロプレート (FALCON) を使用し、最終接種菌量が約 10<sup>4</sup> CFU/ウェルとなるよう接種した。37°C で 24 時間静置培養後、肉眼で菌の有無を観察し、菌の生育が認められない最小の濃度をもって MIC と判断した。

### 植物成分の抽出

13 種の植物を用い、それぞれ 10 g をミキサーで粉碎し、100% メタノール 200 ml を用いて室温で 1 時間抽出した後、減圧濾過してろ液と残渣に分けた。ろ液をエバポレーターで濃縮し、得られたサンプルを少量のメタノールで回収した。各サンプルを窒素ガスにより乾燥させ、乾燥が不十

分の場合はデシケーターを用いて乾燥させた。

**各種有機溶媒を用いた抽出と分画**

ソクハクヨウの 100% メタノール抽出物について、分液ロートを用いて、順次、ヘキサン、酢酸エチル、ブタノール、水による抽出を行った。

シリカゲルカラム分画: Silica gel, 70-230 mesh, 60Å(SIGMA-ALDRICH Co.)を用い、移動相を *n*-hexane-CHCl<sub>3</sub>(100:0, 99:1, 98:2, 95:5, 90:10, 80:20, 0:100), CHCl<sub>3</sub>-acetone(99:1, 98:2, 95:5, 90:10, 80:20, 0:100), 100% methanol とし、TLC 分析の結果に基づいて 10 個のフラクション (S1~S10) に分けた。

TLC による分析: プレートは Silica gel 60F<sub>254</sub>(Merck)を用い、展開溶媒は *n*-hexane : AcOEt=2:1 とした。

HPLC による分画: 最も活性の高かったフラクションから抗菌活性物質を得るため、HPLC で分取を行った。セミ分取用 Inertsil ODS-3 カラムを用い、85%メタノール-H<sub>2</sub>O を移動相に用いて、ピークごとに回収した。

**抗菌活性成分の構造決定**

NMR spectrum は Varian INOVA 600(<sup>1</sup>H-NMR, 600MHz; <sup>13</sup>C-NMR, 151 MHz)により測定した。MS スペクトルの測定から分子量を確認した。

**結果**

**有機溶媒による分画と抗菌活性の測定**

13 種類の植物の 100% メタノール抽出物の MIC を測定したところ、ソクハクヨウ抽出物の MRSA と VRE に対する MIC は 500 µg/ml であり、抗菌活性をもつことが分かった。そこでこの抽出物から活性成分を単離同定することとした。

精製を進めるにあたり、まず、ソクハクヨウの 100% メタノール抽出物の成分を極性の違いに基づいて大まかに分けるため、各種有機溶媒を用いて分画を行った。得られたヘキサン、酢酸エチル、ブタノール、水の各分画について MRSA と VRE に対する MIC を測定した (表 2)。

最も強い活性を示した hexane 層の MIC は

MRSA OM481 株で 125 µg/ml, OM584 株で 62.5 µg/ml, VRE NCTC12201 株で 125 µg/ml, FN-1 株で 15.6 µg/ml であった。

元の 100% メタノール抽出物と比較すると MIC が 1/2 から 1/8 程度に低下しており、精製が進むと、抗菌活性が上昇することが示された。

表 2. ソクハクヨウメタノール抽出物の有機溶媒分画後の MIC

Extract	MIC (µg/ml)			
	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
	OM481	OM584	NCTC12201	FN-1
hexane 層	125	62.5	125	15.6
AcOEt 層	500	500	>500	500
BuOH 層	500	>500	>500	>500
H <sub>2</sub> O 層	500	>500	>500	>500
不溶物	250	250	>500	500

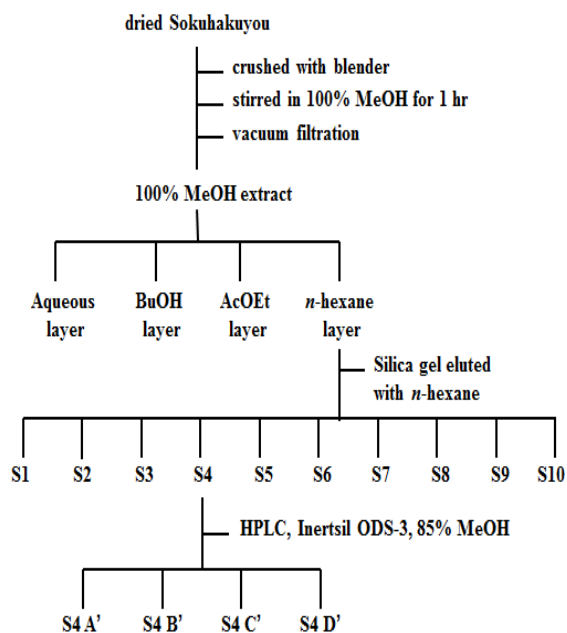


図 1 活性成分の抽出・分画の過程

ソクハクヨウ 500 g を 100%メタノール 1L で 5 回抽出し、61 g の抽出物を得た。そのうち、28 g を 300mL の *n*-ヘキサンと同量の水で 5 回抽出した。溶媒を酢酸エチル、ブタノールに変えて、同様に抽出した。収量はそれぞれ 4.6 g, 1.0 g, 4.0 g, で、水層が 9.2 g, 不溶物が 5.8g であった。次に、3.2 g のヘキサン層から、シリカゲルを用いて分画し S1~S10 のフラクションを得た。活性のあった S4 フラクションは 919.3 mg 取れた。そのうち 148.7 mg を HPLC で 4 分画に分けた。4 つのフラクションの A', B', C', D'の収量はそれぞれ、9.9 mg, 27.1 mg, 32.1 mg, 39.0 mg となった。

図1に示すように抗菌活性を指標にヘキサシラン層を分画していった。ヘキサシラン層を、シリカゲルを用いて移動相ごとに回収し、TLCを用いてスポットを確認し、S1~S10の10の分画を得た。

それぞれの分画のMICを測定したところ、最も高い抗菌活性を示したS4分画のMICはMRSAに対して16 µg/ml、VREに対し8 µg/mlであった(表3)。

表3. シリカゲル画分のMIC

Fraction	MIC (µg/ml)			
	<i>S. aureus</i> OM481	<i>S. aureus</i> OM584	<i>E. faecalis</i> NCTC12201	<i>E. faecium</i> FN-1
S1	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
S2	>128	>128	>128	>128
S3	>128	>128	>128	>128
S4	16	16	8	8
S5	128	128	128	64
S6	>128	>128	>128	>128
S7	>128	>128	>128	>128
S8	>128	>128	>128	>128
S9	>128	>128	>128	>128
S10	>128	>128	>128	>128

最終的にS4分画をHPLCで分取した。分取によって得られたA', B', C', D'の4つの分画のMICを表4に示した。いずれの分画もMRSAについては、MICは32 µg/mlより高いことから抗菌活性は強くないことが分かった。またB', C', D'は*E. faecalis*および*E. faecium*に対し、それぞれ16 µg/ml, 4~8 µg/mlと抗菌活性を示した。

表4. HPLC画分の単独MIC

Fraction	MIC (µg/ml)			
	<i>S. aureus</i> OM481	<i>S. aureus</i> OM584	<i>E. faecalis</i> NCTC12201	<i>E. faecium</i> FN-1
A'	>32	>32	>32	>32
B'	32	32	16	8
C'	>32	>32	16	8
D'	32	32	16	4

**NMRによる構造解析**

HPLCチャートで単一ピークを示したS4-B'分画とS4-C'分画について、<sup>13</sup>C-NMRおよび<sup>1</sup>H-NMRスペクトルによる分析を行った。両分画を

比較したところ、S4-B'分画は単一物質で、S4-C'分画には2種類の物質が含まれ、そのうち1つはS4-B'分画と同じ物質であることが示唆された。そこで、S4-B'分画について<sup>13</sup>C-NMRおよび<sup>1</sup>H-NMRスペクトルに基づき、構造解析をし、文献検索を行ったところ、本物質は*trans-communic acid*と推定された<sup>6)</sup>。さらにMSスペクトルの測定結果から分子量は304となり、本物質がジテルペンである*trans-communic acid*であることが確認できた(図2)。

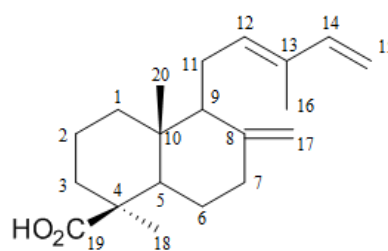


図2. *trans-communic acid*の構造

**他のVREに対する*trans-communic acid*の抗菌効果**

*trans-communic acid*が他のVREに対しても抗菌活性を示すかを調べた。*E. faecalis* FA2-2株及び*E. faecium* BM4147株はどちらもVREであるが、表5に示すようにこれらの株に対する*trans-communic acid*のMICはそれぞれ32 µg/ml, 16 µg/mlとなり、抗菌活性を示すことが分かった。

表5. *trans-communic acid*のVREに対するMIC

	MIC (µg/ml)	
	<i>E. faecalis</i> FA2-2	<i>E. faecium</i> BM4147
<i>trans-communic acid</i>	32	16

**考察**

コノテガシワはヒノキ科に属する中国原産の常用の小高木あり、葉の部分はソクハクヨウ(側柏葉)と呼ばれる伝統的な生薬である<sup>7)</sup>。ソクハクヨウにはジテルペンやフラボノイドが含まれ

ており、抗酸化作用、抗炎症作用、抗菌作用、止血作用など様々な生理活性をもつ<sup>8)</sup>。ソクハクヨウに関する成分研究はほとんど行われていないが、ヒノキチオール hinokitiol や 15-methoxypinusolidic acid(15-MPA)などが含まれる<sup>9)</sup>。ヒノキチオールにはすでに多種類の菌に抗菌活性を示すことが報告されており、黄色ブドウ球菌に対する MIC は 1.56~3.13 µg/ml、腸球菌でも 6.25 µg/ml と高い抗菌活性を示している<sup>9,11)</sup>。

今回、ソクハクヨウから院内感染で問題となる VRE に抗菌活性をもつ *trans-communic acid* が単離された。*trans-communic acid* は MRSA に対し MIC で 4~128 µg/ml と株によっては抗菌活性をもつことが報告されている<sup>12)</sup>。また、結核菌とは異なる一部の *Mycobacterium* 属にも MIC が 4 µg/ml と高い抗菌活性をもつことが報告されている<sup>13)</sup>。*trans-communic acid* は、本研究で用いた MRSA の OM481 および OM584 では、MIC は 32 µg/ml より高くなり高い抗菌活性は見られなかった。一方 VRE に対しては、MIC は 8~32 µg/ml となり、ある程度の抗菌活性をもつことが示された。すでに VRE に抗菌活性をもつと報告している *oleanolic acid* では *E. faecalis* FA2-2 株及び、*E. faecium* BM4147 株に対する MIC が 8 µg/ml であった<sup>4)</sup>。今回見出した *trans-communic acid* はそれぞれの菌株に対する MIC が 32 µg/ml、16 µg/ml であり、抗菌活性では *oleanolic acid* には及ばなかった。

バンコマイシンが多用される欧米諸国では VRE は血流関連感染症患者から高頻度に分離され問題になった<sup>14)</sup>。VRE による感染者は国内では少ないものの、保菌者による集団感染は頻繁に起こっている。一旦 VRE が院内感染を起こすと終息までに時間がかかり、保菌状態で転院したり、退院するため、地域への広がりも問題になっている。従って VRE に効果的な抗菌効果を持つ治療薬や消毒薬の開発が望まれている。

*trans-communic acid* の VRE に対する抗菌活性は臨床で抗菌薬として使用できる MIC の濃度範

囲よりも高い値を示している。このまま、抗菌薬として用いることができなくても、消毒薬や防腐剤としての応用が考えられる。また、ソクハクヨウのメタノール抽出物から純粋な化合物を分離していく間に、抗菌活性が下がっていった。最も高い抗菌活性を示した S4 分画については、複数の抗菌活性をもつ物質が混ざった状態で相乗効果が出て、抗菌活性が高まったことも考えられる。また、精製が進んだ分画では、HPLC のピークでは確認できないほどの低濃度で抗菌活性を示す物質があった可能もある。すでに報告のあるヒノキチオールも今回は単離されなかったことから、S4 分画については、更なる検討が必要と考える。

#### 謝辞

構造決定に関して、丁寧なご指導をくださいました岡山大学薬学部生薬学教室波多野力教授に感謝いたします。

#### 引用文献

- 1) 厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業 JANIS, 公開情報 2014 年. [http://www.nih-janis.jp/report/open\\_report/2014/3/1/ken\\_Open\\_Report\\_201400.pdf](http://www.nih-janis.jp/report/open_report/2014/3/1/ken_Open_Report_201400.pdf)
- 2) 藤沢市民病院 VRE 対策会議・感染対策チーム編「藤沢市民病院バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) 「院内感染アウトブレイクに関する報告書」2012 年. [http://www.city.fujisawa.kanagawa.jp/hospital/news/documents/20120518\\_vrereport.pdf](http://www.city.fujisawa.kanagawa.jp/hospital/news/documents/20120518_vrereport.pdf)
- 3) Otsuka N, Liu MH, Shiota S, Ogawa W, Kuroda T, Hatano T, Tsuchiya T.: Anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) compounds isolated

- from *Laurus nobilis*. *Biol Pharm Bull.* 31(9): 1794-1797(2008).
- 4) Horiuchi K, Shiota S, Hatano T, Yoshida T, Kuroda T, Tsuchiya T.: Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant Enterococci (VRE). *Biol Pharm Bull.* 30(6):1147-1149(2007).
- 5) 『微量液体希釈による MIC 測定法 (微量液体希釈法)』—日本化学療法学会標準法—  
Chemotherapy Vol. 38, 1月号 p.102~105(1990)
- 6) Fukushima J, Yatagai M, Ohira T.: Abietane-type and labdane-type diterpenoids from the cones of *Chamaecyparis obtuse*. *J. Wood Sci.* 48(4):326-330(2002)
- 7) 野呂征夫他編集:薬用植物学改訂第5版, 南江堂, 東京, (1999)
- 8) Shan MQ<sup>1</sup>, Shang J, Ding AW.: Platycadus orientalis leaves: a systemic review on botany, phytochemistry and pharmacology. *Am J Chin Med.* 42:523-542 (2014)
- 9) Arima Y, Nakai Y, Hayakawa R, Nishino T.: antibacterial effect of  $\beta$ -thujaplicin on staphylococci isolated from atopic dermatitis: relationship between changes in the number of viable bacterial cells and clinical improvement in an eczematous lesion of atopic dermatitis. *J Antimicrob Chemother.* 53(1): 113-122(2003)
- 10) Koo KA, Sung SH, Kim YC.: A New Neuroprotective Pinusolide Derivative from the Leaves of *Biota orientalis*. *Chem. Pharm. Bull.* 50(6) 834—836(2002)
- 11) Morita Y, Matsumura E, Tsujibo H, Yasuda M, Sakagami Y, Okabe T, Ishida N, Inamori Y, Biological activity of  $\alpha$ -thujaplicin, the minor component of *Thujopsis dolabrata* SIEB. et ZUCC. var. *hondai* MAKINO. *Biol Pharm Bull.* Jun;24:607-611(2001)
- 12) Smith EC, Williamson EM, Wareham N, Kaatz GW, Gibbons S.: Antibacterials and modulators of bacterial resistance from the immature cones of *Chamaecyparis lawsoniana*. *Phytochemistry.*(2007) Jan;68(2):210-7. Epub Nov 15(2006)
- 13) Gordien AY, Gray AI, Franzblau SG, Seidel V. Antimycobacterial terpenoids from *Juniperus communis* L.(Cupressaceae). *J Ethnopharmacol.* 10;126:500-505(2009)
- 14) Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP.: Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect. Dis.* Aug;29(2):239-244(1999).