

Studies on the effects of oakmoss and its components on *Legionella* spp. and *Acanthamoeba castellanii*.

Harue Nomura

Abstract

Legionella spp. has been isolated at first time as causative agents of the outbreak of pneumonia so called Legionnaires' disease in U.S.A., 1976. *Legionella* spp. are gram-negative bacteria that are widely distributed in natural and artificial water environments¹⁾, and inhalation of aerosol contaminated by these bacteria may lead to outbreaks of legionellosis, a severe form of pneumonia or non-pneumonic Pontiac fever. For the purpose of prevention of legionellosis outbreak, chlorination of water supplied through artificial water systems is commonly introduced as a standard disinfection method, however, chlorination has a number of significant drawbacks associated with the presence of chlorine gas for example water discoloration, pH-induced damage to circulation facilities or alteration of aqueous metal ion level, etc. About 20 species of *Legionella* are pathogenic to human^{2,3)} and in environment water, they multiply not only as planktonic free cells but also in biofilm or in their host amoeba^{4,5)}. The bacterial cells living in biofilm or in host amoeba cells are highly resistant to the disinfectants commonly applied, therefore it is desired to develop a new type of disinfectant effective on multiple stage of life cycle of *Legionella* spp. In this study, oakmoss, a natural fragrance ingredient, and its components were investigated for their effects against *Legionella* spp. and host amoeba *Acanthamoeba castellanii*.

Using two types of oakmoss, 20 compounds were isolated and their chemical structures were defined. The chemical structures of oakmoss components were classified into three chemical groups, phenol derivatives (12 compounds), didepside derivatives (four compounds) and isochromen derivatives (four compounds). Among them, one didepsid derivative (3-methoxy-5-methylphenyl 2,4-dihydroxy-6-methylbenzoate) and one isochromen derivative (8-(2,4-dihydroxy-6-(2-oxoheptyl)phenoxy)-6-hydroxy-3-pentyl-1*H*-isochromen-1-one) were found to be novel compounds which have not been reported.

Analyses of antibacterial activity of oakmoss and its components against pathogenic five species of genus *Legionella* revealed that all of didepside and isochromen derivatives exhibited high antibacterial activity and, in particular, the antibacterial activities of two isochromen derivatives were almost equivalent to that of the common disinfectant chlorhexidine gluconate. Time-kill assay showed the antibacterial effects of these compounds were bactericidal while that of oakmoss itself was bacteriostatic. On the other hand, none of oakmoss and its components exhibited antibacterial activity against other gram-negative and gram-positive bacterial strains tested indicating that their antibacterial activity is *Legionella* spp. specific. In general, the outer membrane surface of gram-negative bacteria is hydrophilic, but the outer membrane surface of *Legionella* spp. is known to be highly hydrophobic⁶⁾ because of the presence of O-polysaccharide portion of LPS. This physicochemical property might be responsible for high susceptibility of *Legionella* spp. to hydrophobic oakmoss and its components.

The effects of oakmoss and its components on biofilm formation of *L. pneumophila* were examined. Three didepside derivatives and six phenol derivatives inhibited the biofilm formation of *L. pneumophila*. It was suggested that the presence of the ester group of phenol derivatives, and the number and/or position of hydroxyl groups of didepside derivatives might play an important role in the inhibitory effects on the biofilm formation. Three didepside derivatives and one isochromen derivative exhibited bactericidal activity against *L. pneumophila*

in the biofilm. These compounds are rather hydrophilic compared with other didepside and isochromem derivatives so that they might be able to permeate into the hydrophilic biofilm.

Since *A. castellanii* is a host for *L. pneumophila* in nature, amoebicidal activity and inhibitory effect on uptake of *L. pneumophila* into *A. castellanii* were examined. Six phenol derivatives, one didepside derivative and two isochromem derivatives exhibited amoebicidal activity against *A. castellanii*. The differences in the effects of phenol derivatives on *A. castellanii* might be attributed to the type of the ester group and the presence of methoxyl group(s). The chemical structures of four didepside derivatives and four isochromem derivatives are respectively closely related. The differences in the observed effects of these compounds on *A. castellanii* might have arisen from the number and/or position of the substitution of the hydroxyl group with methoxyl group, resulting in different physicochemical characteristics and hence, resulting in different interaction with the *A. castellanii* cell membrane. The inhibitory effect of oakmoss and its components on the uptake of *L. pneumophila* into *A. castellanii* was examined at a concentration of $0.25 \times \text{MIC}$. After pre-treatment of *L. pneumophila* cells with sub-MIC concentrations of oakmoss and one didepside derivative, which exhibited high antibacterial and amoebicidal activity, significantly inhibited the uptake of *L. pneumophila* into *A. castellanii* ($p < 0.05$). Another didepside derivative and one isochromem derivative also exhibited the inhibitory effect though their activities were lower than those of above mentioned oakmoss and the active didepside derivative. Although the exact inhibitory mechanism is not known at present, the active didepside derivative may interact with the outer membrane of *L. pneumophila* because of its amphiphilic characteristic. Since the O-specific polysaccharide portion of *L. pneumophila* lipopolysaccharide (LPS) is highly hydrophobic, the active didepside derivative may interact with this hydrophobic part of the LPS resulting in alteration of the cell surface or outer membrane structures and physicochemical properties that may play a role in the adhesion and/or uptake of *L. pneumophila*.

In the present study, 20 components isolated from oakmoss were identified and two of them were found to be novel compounds which have not hitherto been reported. Oakmoss and its components exhibited bacteriostatic and bactericidal activity specifically against the planktonic cells of *Legionella* spp. Among these compounds, several compounds were found to exhibit potent inhibitory activities against biofilm formation of *L. pneumophila*, bactericidal activity against *L. pneumophila* in the biofilm, amoebicidal activity against the host amoebae *A. castellanii* and inhibitory effect on the uptake of *L. pneumophila* into *A. castellanii*. As described above, oakmoss and its components inhibited each stage of the *L. pneumophila* life cycle including the growth and colonization in natural environments. It was therefore strongly suggested that the usage of these compounds in combination might lead to development of a new type of disinfectant for better prevention of legionellosis outbreak.

REFERENCE

1. Diederer B. M. W., *J. Infect.*, **56**; 1–12 (2008).
2. Wingender J. and Flemming H. C., *Int. J. Hyg. Environ. Health.*, **214**; 417–423 (2011).
3. Bitar D. M., Molmeret M. and Kwaik Y. A., *Int. J. Med. Microbiol.*, **293**; 519–527 (2004).
4. Cooper I. R. and Hanlon G. W., *J. Hosp. Infect.*, **74**; 152–159 (2010).
5. Garcia M. T., Jones S., Pelaz C., Millar R. D. and Kwaik Y. A., *Environ. Microbiol.*, **9**; 1267–1277 (2007).
6. Miller R. D., *Curr. Microbiol.*, **9**; 349–354 (1983).

学位論文要旨

野村陽恵

Legionella 属細菌は、1976 年にアメリカで発生した集団肺炎の原因菌として発見され、その後世界各国の自然や環境人工環境水中に広く生息していることが明らかとなった¹⁾。*Legionella* 属細菌に起因するレジオネラ症は、*Legionella* 属細菌に汚染されたエアロゾルを吸入することにより発症し、重篤なレジオネラ肺炎と軽微な非肺炎性のポンティアック熱の 2 つの臨床パターンを示す。日本国内では、温泉関連施設における感染例が多く、温泉関連施設の *Legionella* 属細菌汚染に対する適切な衛生的管理の重要性が伺える。その対策として塩素系消毒剤が使用されているが、様々な問題を抱えており、新規消毒剤の開発が必要となっている。*Legionella* 属細菌は偏性好気性のグラム陰性桿菌であり、約 20 種がヒトに対して病原性を示す。環境水中において *Legionella* 属細菌は、biofilm 又は宿主アメーバ内で増殖するが^{2,3)}、一般的に塩素系消毒剤は biofilm 又は宿主アメーバ内に生息する菌体に対する消毒効果は低い^{4,5)}。つまり、新規消毒剤には浮遊菌体に対する抗菌活性のみならず、biofilm 形成の阻害活性、biofilm とアメーバ内に生息する菌体に対する高い抗菌活性、さらに宿主アメーバに対する殺アメーバ活性を示すことが望まれる。

本研究では、香料の有する生理活性に着目し、天然香料 oakmoss 含有成分の単離とその構造解析、単離した化合物の浮遊 *Legionella* 属細菌と biofilm 内 *L. pneumophila* に対する抗菌活性、*L. pneumophila* の biofilm 形成に対する影響、宿主アメーバに対する殺アメーバ活性及び *L. pneumophila* のアメーバ内への取込みに対する影響について評価した。

2 種類の oakmoss (OM と OMAT) を用いて各種精製を行った結果、合計 20 種の化合物を単離した。この中で、didepside 誘導体の 3-methoxy-5-methylphenyl 2,4-dihydroxy-6-methylbenzoate と isochromen 誘導体の 8-(2,4-dihydroxy-6-(2-oxoheptyl)phenoxy)-6-hydroxy-3-pentyl-1*H*-isochromen-1-one は新規化合物であることを明らかにした。単離した化合物は、phenol 誘導体 12 種、didepside 誘導体 4 種及び isochromen 誘導体 4 種に分類された。

ヒトに対して病原性を示す 5 種の *Legionella* 属細菌に対する抗菌活性を評価した結果、didepside 誘導体と isochromen 誘導体はすべての *Legionella* 属細菌に対して高い抗菌活性を示した。特に、isochromen 誘導体の 2 種の化合物は既存の消毒薬である chlorhexidine gluconate と同程度の高い抗菌活性を示した。また、これらの化合物はいずれも他のグラム陰性細菌とグラム陽性細菌に対しては抗菌活性を示さず、*Legionella* 属細菌に対してのみ特異的に高い抗菌活性を示した。一般的に、グラム陰性細菌は外膜表層が親水性であるが、*Legionella* 属細菌の外膜表層は疎水性に富むことが知られており⁶⁾、このことが oakmoss 含有成分に対して高い感受性を示すことに関係することが考えられる。さらに、time-kill assay により経時的抗菌作用を解析した結果、*L. pneumophila* に対して oakmoss 自体は静菌的作用を示すが、上記の 2 種の新規化合物は殺菌的作用を示すことが明らかとなった。

次に、*L. pneumophila* の biofilm 形成に対する影響を評価した結果、3 種の didepside 誘導体と 6 種の phenol 誘導体が *L. pneumophila* の biofilm 形成を抑制した。Phenol 誘導体はエステル基の存在が、didepside 誘導体は水酸基の数と位置が biofilm 形成抑制作用に影響することが示唆された。さらに、didepside 誘導体と isochromen 誘導体について、biofilm 内 *L. pneumophila* に対する抗菌活性を評価し

た。その結果、3種の didepside 誘導体と1種の isochromen 誘導体が biofilm 内 *L. pneumophila* に対して殺菌的作用を示した。しかし、浮遊 *Legionella* 属細菌に対して高い抗菌活性を示した oakmoss と1種の isochromen 誘導体は、biofilm 内 *L. pneumophila* に対しては殆ど殺菌的作用を示さなかった。このことから、親水性の高い化合物の方が biofilm に対する透過性が高く、抗菌活性を示したと考えられる。

さらに、*Legionella* 属細菌の宿主アメーバである *Acanthamoeba castellanii* に対する殺アメーバ活性を評価した。6種の phenol 誘導体、1種の didepside 誘導体及び2種の isochromen 誘導体が殺アメーバ活性を示した。構造的比較から、これらの化合物の殺アメーバ活性の発現には、エステル基の側鎖の長さ (phenol 誘導体) 又は水酸基の数 (didepside 誘導体) が関与することが示唆された。Oakmoss 自体も *A. castellanii* に対して高い殺アメーバ活性を示したが、殺アメーバ活性を示した化合物の含有量は極少量であることから、単離した化合物の相乗効果又は未知の成分の存在によるものと考えられた。最後に、*A. castellanii* 内への *L. pneumophila* の取込みに対する影響を評価した。本試験には、高い殺アメーバ活性を示した OMAT、1種ずつの didepside 誘導体と isochromen 誘導体、また浮遊 *Legionella* 属細菌に対して高い抗菌活性を示した didepside 誘導体と isochromen 誘導体の1種ずつを用いた。Oakmoss とこれらの化合物を予め $0.25 \times \text{MIC}$ の濃度で *L. pneumophila* に作用させた後に *A. castellanii* と接触させた結果、OMAT と殺アメーバ活性を示した didepside 誘導体は *A. castellanii* 内への *L. pneumophila* の取込みを抑制した ($p < 0.05$)。浮遊 *L. pneumophila* に対して高い抗菌活性を示した didepside 誘導体と isochromen 誘導体は、弱いながらも *A. castellanii* 内への *L. pneumophila* の取込みを抑制した。高い取込み抑制効果を示した didepside 誘導体は、その化学構造から両親媒性を有すると考えられ、外膜構成成分である LPS の疎水性部分に直接又は間接的に作用することで、*L. pneumophila* の宿主アメーバへの接着又は細胞内侵入に関与する菌体表面や外膜構造を変化させることが示唆された。

本研究では、天然香料 oakmoss の含有成分を単離精製し、2種の新規化合物の存在を明らかにすると共に、oakmoss 含有成分が *L. pneumophila* をはじめとした *Legionella* 属細菌に対して特異的に抗菌活性を示すことを明らかとした。これらの化合物の中には、*L. pneumophila* の消毒剤に対する防御機構の一つである biofilm の形成に対して抑制効果を示し、また biofilm 内 *L. pneumophila* に対して抗菌活性を示すもの、さらに *Legionella* 属細菌の自然界宿主である *A. castellanii* に対する殺アメーバ活性と *A. castellanii* 内への *L. pneumophila* の取込みを抑制するものも含まれることを見出した。

以上、本研究により oakmoss と oakmoss から単離した化合物は自然界における *Legionella* 属細菌の増殖と定着に関わる生活環の複数のステップを同時に阻害することが明らかとなり、これらの化合物はレジオネラ症防止のための有用な消毒薬となり得る可能性が強く示唆された。

参考文献

1. Diederer BMW., *J Infect*, **56**; 1 - 12 (2008)
2. Wingender J. and Flemming HC., *Int J Hyg Environ Health*, **214**; 417 - 423 (2011)
3. Bitar DM., Molmeret M. and Kwaik YA., *Int J Med Microbiol*, **293**; 519 - 527 (2004)
4. Cooper IR. and Hanlon GW., *J Hosp Infect*, **74**; 152 - 159 (2010)
5. Garcia MT., Jones S., Pelaz C., Millar RD. and Kwaik YA., *Environ Microbiol*, **9**; 1267 - 1277 (2007)
6. Miller RD., *Curr Microbiol*, **9**; 349 - 354 (1983)

論文審査の結果の要旨

Legionella 属細菌は、人工環境水中に広く生息しており、わが国では、レジオネラ症発生の防止には温泉関連施設の *Legionella* 属細菌汚染に対する適切な衛生的管理が求められ、塩素系消毒剤の使用が推奨されているが、塩素臭の発生や装置の腐食等の諸問題を抱えており、新規消毒剤の開発が必要となっている。また、*Legionella* 属細菌は、自然及び人工環境水中において物質表面に付着すると、ゲル状の菌体外マトリックスを分泌することで biofilm を形成し、宿主アメーバ等に貪食されると、ファゴソーム内で増殖し、成熟した菌体が細胞外へ遊出する。塩素系消毒剤は biofilm 内およびアメーバ内の菌体に対する消毒効果が低く、biofilm の形成阻害、biofilm 内又は宿主アメーバ内の菌体に対して高い抗菌活性を有し、かつ *Legionella* 属細菌の増殖と耐性化の場所である宿主アメーバに対する殺アメーバ活性を示す新規消毒剤の開発に期待が持たれる。

本論文では、香料の有する生理活性に着目し、地衣類 *Evernia prunastiri* (L.) Arch. より得られる天然香料 oakmoss (OM) が *L. pneumophila* に対して特異的に高い抗菌活性を示すことから、OM 含有成分の単離とその構造解析、OM から単離した化合物の浮遊 *Legionella* 属細菌と biofilm 内 *L. pneumophila* に対する抗菌活性、*L. pneumophila* の biofilm 形成に対する影響、宿主アメーバに対する殺アメーバ活性及び *L. pneumophila* のアメーバ内への取込みに対する影響について評価し、新規消毒剤の開発を目的とした。

第1章では OM に含まれる成分のゲルろ過カラムクロマトグラフィー、固相抽出及び逆相カラムを用いた HPLC による単離精製とそれらの構造解析を行うと共に、単離した化合物の *Legionella* 属細菌に対する抗菌活性を評価した。2種類の OM より 20種の化合物を単離し、新規化合物 3-methoxy-5-methylphenyl 2,4-dihydroxy-6-methylbenzoate (**9**) と 8-(2,4-dihydroxy-6-(2-oxoheptyl)phenoxy)-6-hydroxy-3-pentyl-1*H*-isochromen-1-one (**20**) を得た。また、それぞれを化学構造から phenol 誘導体、didepside 誘導体、isochromen 誘導体に分類し、*L. pneumophila* および *L. bozemani*、*L. dumoffii*、*L. longbeachae* 及び *L. micdadei* に対する抗菌活性を評価し、didepside 誘導体、isochromen 誘導体に高い抗菌活性を認めた。さらに新規 didepside 誘導体 (**9**) 及び isochromen 誘導体 (**20**) の経時的な抗菌作用を解析し、*L. pneumophila* に対して殺菌的な作用を示すことを明らかにした。

第2章では、OM および OM から単離した化合物の biofilm 形成に対する影響と biofilm 内 *L. pneumophila* に対する抗菌活性を評価した。OM は濃度依存的に *L. pneumophila* の biofilm 形成率を増加させたが、didepside 誘導体、phenol 誘導体では濃度依存的に biofilm 形成を抑制し、didepside 誘導体では、構造中の水酸基の数が抑制効果に影響し、phenol 誘導体ではエステル基の存在が関与することを示唆した。これらの結果から didepside 誘導体は *L. pneumophila* の biofilm 形成を抑制し、かつ biofilm 内 *L. pneumophila* に対して高い抗菌活性を示し、*L. pneumophila* に対する消毒剤への応用に最も有用であることを示唆した。

第3章では、OM と単離した化合物の宿主アメーバに対する殺アメーバ活性とアメーバ

内への *L. pneumophila* の取込みに対する影響を評価した。宿主アメーバとして一般的な *Acanthamoeba castellanii* ATCC30234 を用い、alamarBlue 法により殺アメーバ活性を評価した結果、OM、didepside 誘導体の 3-hydroxy-5-methylphenyl 2,4-dihydroxy-6-methylbenzoate (5) と isochromen 誘導体 6,8-dihydroxy-3-pentyl-1*H*-isochromen-1-one に強い活性を認めたが、成分含量から、OM が示した殺アメーバ活性はこれらの成分の相乗的効果又は未知の高い殺アメーバ活性を示す成分の存在によると考察した。*A. castellanii* 内への *L. pneumophila* JCM7571 の取込みに対する影響の評価では、化合物 (5) に *A. castellanii* 内への *L. pneumophila* の取込み抑制を認め、化合物 (5) は両親媒性の性質により lipopolysaccharides の疎水性部分に直接又は間接的に作用することで、*L. pneumophila* の宿主アメーバへの接着又は細胞内侵入に関与する菌体表面や外膜構造を変化させることを示唆した。

本論文では、天然香料 OM の有する抗菌活性に着目し、OM からその含有成分を単離して 2 種類の新規化合物の存在を明らかにすると共に、OM と単離した化合物が *L. pneumophila* をはじめとした *Legionella* 属細菌に対して特異的に抗菌活性を示すことを明らかとした。これらの化合物の中には、*Legionella* 属細菌の消毒剤に対する防御機構の一つである biofilm の形成に対して抑制効果を示し、また biofilm 内 *Legionella* 属細菌に対して抗菌活性を示すものが含まれることを見出した。さらに、OM と単離した化合物中には、*Legionella* 属細菌の自然界における宿主である *A. castellanii* に対する殺アメーバ活性と、*A. castellanii* 内への *L. pneumophila* の取込みを抑制するものも含まれることを見出した。

以上、本論文は我が国において増加しているレジオネラ症の原因である *Legionella* 属細菌の自然界における増殖と定着に関わる多くの生活環を OM と OM から単離した化合物が阻害し、発症防止のための有用な消毒薬となり得る可能性を強く示唆するものである。論文構成に問題はなく、実験方法も適切であり、研究内容の新規性、有用性に富むものであることから、本研究科課程によらない博士（薬科学）の論文に十分値するものと判断した。