

天然香料 oakmoss とその含有成分の
Legionella 属細菌と *Acanthamoeba castellanii* に対する
作用に関する研究

2014 年

野 村 陽 恵

目次

略語	・ ・ i
----	-------

<総論の部>

緒言	・ ・ 1
----	-------

第 1 章 天然香料 oakmoss 含有成分の単離・同定と単離化合物の <i>Legionella</i> 属細菌に対する抗菌活性評価	・ ・ 8
第 1 節 Oakmoss に含まれる抗菌活性成分の単離精製と構造解析	・ ・ 8
第 2 節 Oakmoss と oakmoss から単離した化合物の <i>Legionella</i> 属細菌に対する最小発育阻止濃度 (MICs) と最小殺菌濃 度 (MBCs)	・ ・ 17
第 3 節 Oakmoss とその含有成分として見出された新規化合物 9 と 20 の抗菌作用解析	・ ・ 22
第 4 節 小括と考察	・ ・ 24
第 2 章 Oakmoss と oakmoss から単離した化合物の <i>L.pneumophila</i> の biofilm 形成に対する影響と biofilm 内 <i>L.pneumophila</i> に対する抗菌活性評価	・ ・ 27
第 1 節 <i>L.pneumophila</i> の biofilm 形成に対する影響	・ ・ 27
第 2 節 Biofilm 内 <i>L.pneumophila</i> に対する抗菌活性評価	・ ・ 32
第 3 節 小括と考察	・ ・ 34

第 3 章 Oakmoss と oakmoss から単離した化合物の <i>Acanthamoeba castellanii</i> に対する殺アメーバ活性と <i>A. castellanii</i> 内への <i>L. pneumophila</i> の取込みに対する影響	・ ・ 37
第 1 節 <i>A. castellanii</i> に対する殺アメーバ活性評価	・ ・ 37
第 2 節 <i>A. castellanii</i> 内への <i>L. pneumophila</i> の取込みに対する影響	・ ・ 40
第 3 節 小括と考察	・ ・ 43
総括	・ ・ 46
謝辞	・ ・ 48

<実験の部>

第 1 章 実験の部	・ ・ 49
1. 使用菌株	
2. 培地と培養条件	
3. 使用香料と抗菌物質	
4. Oakmoss に含まれる抗菌活性成分の単離精製	
5. 理化学的性状と構造解析	
6. 試験菌懸濁液の調製	
7. <i>Legionella</i> 属細菌とその他の細菌に対する抗菌活性評価	
8. Time-kill assay	

第 2 章 実験の部

• • 57

1. 使用菌株
2. 培地と培養条件
3. 使用香料と抗菌物質
4. 試験菌懸濁液の調製
5. *L.pneumophila* の biofilm 形成に対する影響評価
6. Biofilm 内 *L.pneumophila* に対する抗菌活性評価

第 3 章 実験の部

• • 60

1. 使用菌株とアメーバ
2. 培地と培養条件
3. 使用香料と抗菌物質
4. *L.pneumophila* と *A.castellanii* の懸濁液の調製
5. *A.castellanii* に対する殺アメーバ活性評価
6. *A.castellanii* 内への *L.pneumophila* の取込みに対する影響評価

参考文献

• • 65

略語

本論文中で使用した略語について以下に記載する。

ABPC	: Ampicillin
Ac buffer	: Acanthamoeba buffer
ATCC	: American Type Culture Collection
BCYE- α	: Buffered Charcoal Yeast Extract Agar supplemented with α -ketoglutarate containing L-cysteine
BSG	: Buffered Saline supplemented with 0.01% Gelatin
BYE- α	: Buffered Yeast Extract supplemented with α -ketoglutarate containing L-cysteine
CA	: Cinnamic aldehyde
CAM	: Clarithromycin
CFU	: Colony Forming Unit
CHG	: Chlorhexidine gluconate
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
EI-MS	: Electron Impact Mass Spectrometry
EPS	: Extracellular polymeric substance
GTC	: Gifu Type Culture Collection
HMBC	: Heteronuclear Multiple Bond Connectivity
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
IC ₅₀	: Half Maximal (50%) Inhibitory Concentration
IID	: The Institute for Infectious Disease
IR	: Infrared Spectroscopy

JBCC	: Josai Bacterial Culture Collection
JCM	: Japan Collection of Microorganisms
LPS	: Lipopolysaccharides
MBC	: Minimum Bactericidal Concentration
MHB	: Mueller Hinton II Broth cation adjusted
MIC	: Minimum Inhibitory Concentration
MOI	: Multiplicity of Infection
NBRC	: NITE Biological Resource Center
NMR	: Nuclear Magnetic Resonance
OD _{600 nm}	: Optical Density at 600 nm
OM	: Absolute Mousse De Chene Selecta
OMAT	: Absolute Oakmoss AT 086
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PYG	: Proteose Yeast Glucose medium
SG	: Serogroup
TSA	: Trypticase Soy Agar

総論の部

緒言

1976年に米国フィラデルフィアで開催されたアメリカ在郷軍人会の支部総会において原因不明の集団肺炎が発生し、その原因菌として *Legionella* 属細菌が発見された。この時に分離された原因菌は、在郷軍人 (Legionnaires) と肺に好発する (pneumo-phila) という意味から、*Legionella pneumophila* と命名された。この集団感染事例は、会場ホテルで使用していた空調の冷却水が *L. pneumophila* によって汚染されていたことが原因であった。その後、*Legionella* 属細菌は、土壌、沼、湖及び河川等の自然環境水中だけでなく、空調設備の冷却塔、加湿器、給湯設備、シャワーヘッド、水道及び温泉施設等の人工環境水中にも広範囲にわたり生息していることが見いだされた¹⁾。それと共に、日本を初めとして多くの国々で自然環境水や人工環境水からの *Legionella* 属細菌の検出と、それを原因とするレジオネラ症の発生が報告されてきた。日本では、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」によりレジオネラ症は4類感染症に分類され、患者の全数把握が義務づけられている。国立感染症研究所のレジオネラ症発生動向調査²⁾によると、2012年以前のレジオネラ症の年間患者数は600～800人程度であったのに対して、2013年には1000人を超える患者数が報告されている(Fig. 1)。これは、2011年より新たな検査方法が保険適用になったことで検査の利用が増加し、報告されるレジオネラ症患者数の増加に繋がったものと考えられる。*Legionella* 属細菌は本来、日和見感染原因菌であり、健常人に対する病原性は低いものの、高齢者や幼児にとっては病原性を発揮し、重篤なレジオネラ肺炎と、インフルエンザ様で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。その感染経路は、主に *Legionella* 属細菌に汚染されたエアロゾルを吸入することによる経気道感染であり、特に日本国内においては、入浴を好む国民性と相まって温泉関連施

設における感染例が多い。従って、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の重要性が伺える。

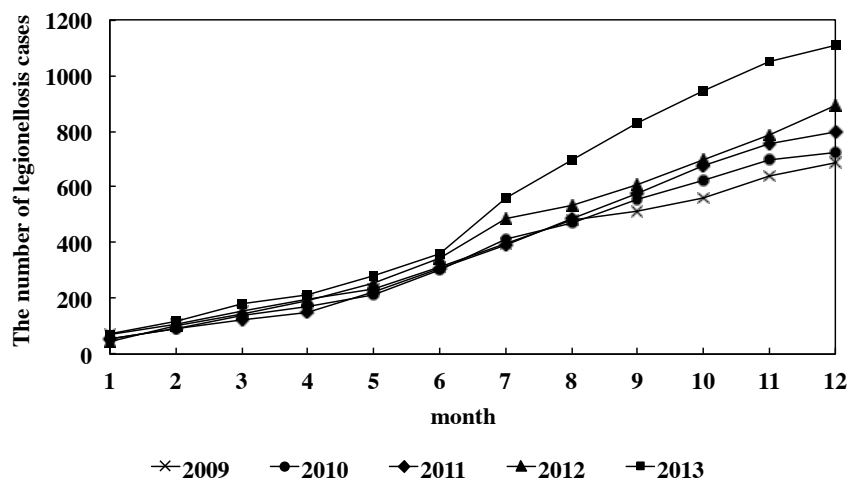


Fig. 1 The numbers of legionellosis cases (2009 ~ 2013)

Legionella 属細菌は、通性細胞内寄生性を有するグラム陰性桿菌であり、現在までに約 56 種 (70 血清型以上) が報告されており^{3,4)}、その中で約 20 種がヒトに対して病原性を示すことが知られている。レジオネラ症患者より検出される *Legionella* 属細菌の中では、*L. pneumophila* serogroup 1 (SG 1) の検出頻度が突出して高く、世界全体では 84%⁴⁾、ヨーロッパでは 95%⁵⁾、日本では 80%⁶⁾ を占めている。次いで、*L. pneumophila* のその他の血清型や、*L. longbeachae*、*L. bozemanii*、*L. micdadei* 及び *L. dumoffii* 等の菌種が検出されている⁷⁾。また、一般的に空調設備の冷却塔水からは *L. pneumophila* SG 1 が、温泉及び循環式浴槽水からは *L. pneumophila* SG 1 と共に SG 3、SG 5 及び SG 6 が有意に高頻度で検出される^{6,8)}。特に、日本においては温泉及びその関連施設からの *L. pneumophila* SG 1 の検出と、それらに起因するレジオネラ症の発生が多く報告されている^{9,10)}。近年、温泉の掘削技術の進歩に伴い、様々な場所で温泉を採掘することが可能となった。その結果、日帰り温泉をはじめとした多くの温泉施設が建設され、多くの人々が温泉を気軽に楽しむことができるよ

うになっている。こうした状況に対応すべく、浴槽の大型化による省エネルギー・節水が必要となり、浴槽水を循環させて頻回使用する循環濾過システムが普及してきた。その結果、温泉水や循環式浴槽水及び循環設備そのものの *Legionella* 属細菌による汚染と、それに伴う易感染性宿主に対する集団感染の発生が大きな問題となってきた。2002 年には、宮崎県日向市の温泉施設において 295 名 (死亡 ; 7 名) のレジオネラ症の集団感染が発生している¹¹⁾。この感染事例では、浴槽水と患者喀痰から共に *L. pneumophila* SG 1 が検出されたことから、温泉施設が感染源であることが明らかにされている。また、2012 年には埼玉県日高市の日帰り温泉施設において *Legionella* 属細菌の集団感染 (8 名) が発生した。この温泉施設からは、基準値以上の濃度 (1×10^2 CFU/100 mL、CFU: colony forming unit、生菌数) の *Legionella* 属細菌が検出された。サンプルを採取した場所の中の 1 カ所からは *L. pneumophila* SG 1 が検出され、DNA 解析の結果、患者由来分離株と一致したことから、日帰り温泉施設の *Legionella* 属細菌による汚染が集団感染の原因であることが明らかにされている¹²⁾。これらの事例以外にも国内外を問わず様々な場所での集団感染の発生が報告されている。

こうした背景のもと、レジオネラ症防止対策として、2009 年に厚生労働省よりレジオネラ症防止指針第 3 版 が示された¹³⁾。その中で *Legionella* 属細菌の検出濃度は、浴槽水やシャワー等のヒトがエアロゾルを直接吸入する恐れのあるものは指針に示されている培養法の検出下限値 (10 CFU/100 mL) 以下、冷却塔等のエアロゾルを直接吸入する可能性の低いものは 10^2 CFU/100 mL 以下とされた。そのため、循環式浴槽水中の残留塩素濃度を 0.2 ~ 0.4 mg/L に保ち、かつ最大で 1.0 mg/L を超えないことと共に、消毒装置の維持・管理を適切に行う指導がなされている。しかし、無機物質を豊富に含む温泉水や低 pH の浴槽水中での塩素系消毒剤の使用は、金属イオンとの反応による塩素ガスの発生

及び酸化物の生成等の問題を生じ、一方で適切な塩素濃度を維持・管理するためには塩素系消毒剤の過剰使用が必要となり、それらに伴う塩素臭の発生や循環装置の腐食、及び生物浄化機能の破壊等の様々な問題を生じている。同指針¹³⁾によると、水質等の理由から塩素系消毒剤が使用できない場合、非塩素系の消毒方法として紫外線及びオゾンの使用が認められているが、紫外線の殺菌効果には残留性がないこと、またオゾンは人体に有害であることから、水質に影響を与えない範囲で塩素系消毒剤を併用することが推奨されている。

Legionella 属細菌は、自然及び人工環境中において通常 biofilm 内及び細菌捕食性原虫内で生育していることが明らかとなっている¹⁴⁻¹⁷⁾。*Legionella* 属細菌は、金属やプラスチック及びガラス等の固い物質表面に付着し、付着した菌体はゲル状の菌体外マトリックス (extracellular polymeric substance; EPS) を分泌する。この分泌された EPS 中で *Legionella* 属細菌は増殖し、さらに EPS を分泌することで成熟した biofilm を形成する (Fig. 2)¹⁸⁾。Biofilm 形成能を有する細菌は、biofilm を形成することで外界からのストレス (栄養素の枯渇、pH の変化又は抗菌物質等) に対して自己防衛をしている。実際に、レジオネラ症防止対策として使用されている塩素系消毒剤は、biofilm 内に生存する *Legionella* 属細菌に対する抗菌効果が低いことが報告されている^{19, 20)}。また、自然環境中において、*Legionella* 属細菌はアメーバ等の細菌捕食性原虫を宿主として生育している。*Legionella* 属細菌がアメーバ等の宿主に遭遇すると、宿主細胞表面に付着し、細胞内へ貪食される。宿主細胞の中では、取込まれた *Legionella* 属細菌を含むファゴソームに小胞及びリボソームが融合し、*Legionella*-containing vacuole (LCV) を形成する。LCV 内で *Legionella* 属細菌は増殖し、最終的に、成熟した *Legionella* 属細菌は宿主細胞を破壊して細胞外へ遊出し、さらに環境中へ拡散していく (Fig. 2)²¹⁻²⁴⁾。自然環境中において、*Legionella* 属細菌の増殖にアメーバ等の原虫の存在が関係していること²⁵⁻²⁷⁾と、

自然及び人工環境水中からの *Legionella* 属細菌の検出率とアメーバ等の原虫の検出率は相関関係にあること^{28, 29)}が報告されている。さらに、塩素系消毒剤はアメーバ内 *Legionella* 属細菌に対する消毒効果が低いこと^{20, 30)}や、アメーバより遊出した *Legionella* 属細菌は抗菌物質に対する抵抗性を獲得していることが報告されている³¹⁾。

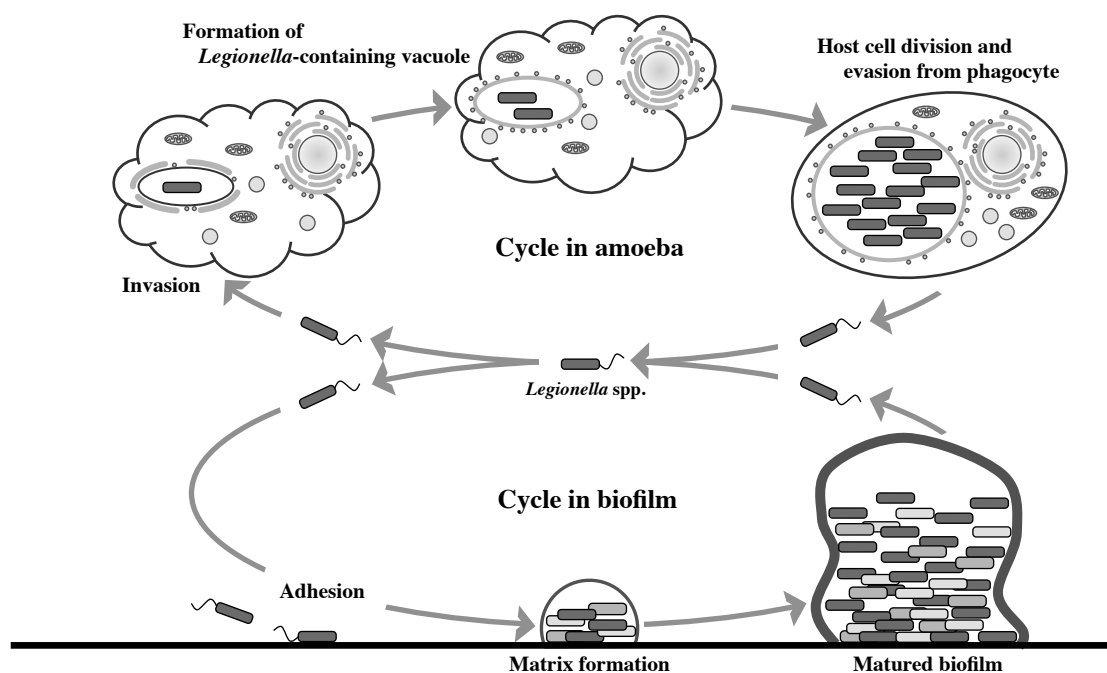


Fig. 2 Life cycle of *Legionella* spp. in environments. *L. pneumophila* biofilm development occurs through several key steps: 1; adhesion, 2; microcolony formation and extracellular matrix secretion, 3; biofilm maturation and dispersion. The course of *L. pneumophila* infection can be divided into key steps: 1; *L. pneumophila* adhesion to and invasion of the host cell, 2; formation of the replication-permissive vacuole, 3; intracellular replication, 4; host cell division and evasion from phagocyte.

このような *Legionella* 属細菌の生活環から、細胞単位で存在する浮遊菌体に対して抗菌活性を示すだけでなく、*Legionella* 属細菌の防御機構の一つである biofilm の形成阻害と、biofilm 内に生息する菌体及び宿主アメーバ細胞内の菌体に対して高い抗菌活性を有し、さらには *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。これまでにレジオネラ症の治療を目的とした抗菌薬開発、又は感染防止のための既存の塩素系消毒薬の消毒効果の評価に関する研究が多く行われてきた。しかしながら、*Legionella* 属細菌の感染を未然に防ぐことを目的とし *Legionella* 属細菌の生活環全体を対象とする消毒剤の開発研究は少ない。感染症を未然に防ぐことは、人々の生活の質 (Quality of Life) を向上させる観点からも重要であり、レジオネラ症防止に有効な新規消毒剤の開発は重要であると考える。

本研究では、動植物由来精油成分である天然香料の有する生理活性に着目した。天然香料の利用の歴史は古く、古代エジプトのミイラ作りにおいても防腐効果を目的として使用されており³²⁾、古来より天然香料が防腐・防虫効果を有することが経験的に知られていた。近年、cinnamic aldehyde^{33,34)}、hinokitiol^{35,36)}、tea tree oil³⁷⁾ 等の天然由来香気成分が多様な生理活性を有することが改めて注目され、抗菌活性と抗菌スペクトルの両観点から広く研究されている。また、香料はこれまでに香粧品や食品等への添加物として利用されてきたことから、ヒトに対する安全性は高いと考えられる。しかし、天然香料の成分は不均一であり、また成分の多くは脂溶性かつ揮発性であること等の理由から、抗菌活性を指標とした香料及びその成分の標準化された評価方法が確立されていなかった。武田ら³⁸⁾は、米国臨床検査基準協会 (Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI) の微量液体希釈法に準じ、香料の抗菌活性を評価する試験法を確立した。この評価方法を用いて 1000 種類を超える香料について各種細菌及び真菌に対する抗菌活性を評価した結果、複数の天然及び合成香料が抗菌活性を示すことが明らかとなった^{38,39)}。それらの中でも、特に天然香料 oakmoss が *L. pneumophila* に対して特異的に高い抗菌活性を有することが示された⁴⁰⁾。

Oakmoss は、中央から南ヨーロッパにかけて自生している櫛の木に着生する地衣類 *Evernia prunastiri* (L.) Arch. をベンゼン、石油エーテル及びアルコール

抽出することにより得られる香料であり、香気は海辺や森林を想わせるグリーンな感じで、やや腐食的で土臭い香りを含んでいる⁴¹⁾。Oakmoss は持続性及び拡散性に優れていることからシプレー調の香水をはじめとした化粧品香料として幅広く利用されている。本研究では、oakmoss とその含有成分の *Legionella* 属細菌に対する抗菌活性に着目し、oakmoss に含まれる抗菌成分の単離及びその構造解析と共に、単離した化合物について浮遊及び 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。

第 1 章 天然香料 oakmoss 含有成分の単離・同定と単離化合物の *Legionella* 属細菌に対する抗菌活性評価

清水ら⁴⁰⁾により、天然香料 oakmoss が *L. pneumophila* に対して特異的に高い抗菌活性を示すことが明らかにされた。しかし、oakmoss は多くの成分を含む天然香料であり、*L. pneumophila* に対して抗菌活性を示す成分は明らかにされていない。さらに oakmoss には、皮膚感作性を示す成分が含まれることが報告されており⁴²⁻⁴⁵⁾、oakmoss 自体をそのまま消毒薬に応用することはできない。そのため、皮膚感作性を示す成分の除去を含めて oakmoss に含まれる成分を単離し、それらの構造解析を行うと共に、*L. pneumophila* をはじめとする *Legionella* 属細菌に対して特異的に抗菌活性を示す成分を明らかにすることを試みた。

第 1 節 Oakmoss に含まれる抗菌活性成分の単離精製と構造解析

Oakmoss に含まれる化合物の単離精製には、製造元の異なる 2 種類の oakmoss (Absolute Mousse De Chene Selecta、OM と Oakmoss Absolute AT 086、OMAT) を用いた。OM と OMAT の HPLC による成分分析の結果を Fig. 3 に示した。HPLC 分析の結果、OM では 15 種の成分が、OMAT では 12 種の成分が検出された。また、OM と OMAT に含まれる成分には含有量の差は見られたが、主含有成分の種類と数には大きな差は見られなかった。

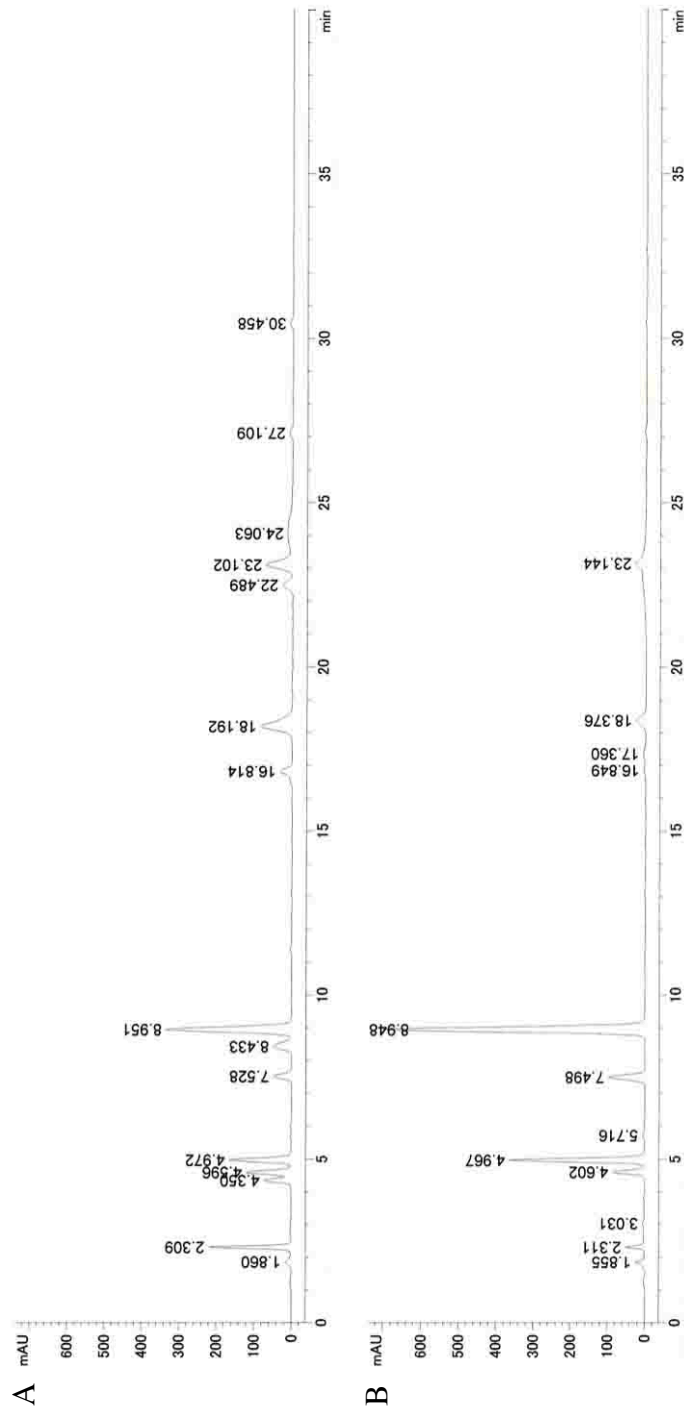


Fig. 3 High performance liquid chromatography (HPLC) of OM (A) and OMAT (B). HPLC conditions; Column: Capcell Pak C18 MG II 3 x 150 mm, Flow rate: 0.5 mL/min, Mobile phase: 40 ~ 80% acetonitrile/40 min, Detector ; UV at 280 nm, Injection weight: 10 µg.

OM に含まれる成分は、ゲルろ過クロマトグラフィー、固層抽出及び逆層カラムを用いた HPLC により精製した。また、OMAT のみに含まれる成分は、シリカゲルカラムクロマトグラフィーと逆層カラムを用いた HPLC により精製した。その結果、OM より 19 種の化合物と OMAT より OM には含まれない 1 種の化合物の計 20 種の化合物を単離した。単離したこれらの化合物は、EI-MS と NMR 解析により構造を決定した。化合物 9 と 20 を除く 18 種の化合物は、後述の様にいずれも phenol、didepside 及び isochromen 誘導体に属する既知化合物であることが明らかとなった。

新規化合物であると思われる化合物 9 は、EI-MS 解析の結果から分子イオンピーク m/z 288.1020 が検出され、その分子式は $C_{16}H_{16}O_5$ であることが示された。また、UV スペクトル (acetonitrile) では λ_{max} (ϵ) 219 (19800)、268 (16200) 及び 302 (6180) nm が検出された。IR スペクトル (KBr) では、 ν_{max} 3324、2926、1661、1458、1300 及び 1169 cm^{-1} を示し、水酸基とカルボニル基の存在が明らかとなった。化合物 9 の 1H - と ^{13}C -NMR 解析の結果を Table 1 に示した。 ^{13}C -NMR 解析 (125 MHz, methanol- d_4) では、2 本の芳香族メチル基に由来する炭素 (δ_C 24.8、21.5)、5 本の芳香族メチン炭素 (δ_C 102.0、106.1、113.1、113.6、115.7)、7 本の芳香族 4 級炭素 (δ_C 105.2、144.7、144.7、152.3、162.0、165.0、166.6)、1 本のメトキシ基に由来する炭素 (δ_C 55.9) 及び 1 本のカルボニル基に由来する炭素 (δ_C 171.5) のシグナルが観察された。 1H -NMR 解析 (500 MHz, methanol- d_4) では、2 個の芳香族メチルの水素 (δ_H 2.24, *s*; 2.47, *s*)、5 個の芳香族水素 (δ_H 6.06, *d*, $J = 2.4$ Hz; 6.18, *d*, $J = 2.4$ Hz; 6.48, *m*; 6.51, *m*; 6.59, *m*) 及び 1 個のメトキシ基の水素 (δ_H 3.69, *s*) のシグナルが観察された。さらに、 1H - ^{13}C heteronuclear multiple bond connectivity (HMBC) 解析の結果、Table 1 に示した様な相関が観察されたことから、化合物 9 は 3-methoxy-5-methylphenyl 2,4-dihydroxy-6-methylbenzoate であることを明らかに

した (Fig. 4)。

また、化合物 **9** と同様に新規化合物であると思われる化合物 **20** は、EI-MS 解析の結果、分子イオンピーク m/z 468.2176 が検出され、その分子式は $C_{27}H_{32}O_7$ であることが示された。UV スペクトル (acetonitrile) では、 λ_{max} (ϵ) 211 (14700)、246 (34300)、279 (7670) 及び 324 (5160) nm が検出された。また、IR スペクトル (KBr) では ν_{max} 3405、2958、2931、2857、1697、1600、1463、1359 及び 1164 cm^{-1} を示した。化合物 **20** の 1H - と ^{13}C -NMR 解析の結果を Table 2 に示した。 ^{13}C -NMR 解析 (125 MHz, acetone- d_6) では、2 個のメチル基に由来する炭素 (δ_C 14.2、14.1)、9 個のメチレン炭素 (δ_C 44.3、42.5、33.7、31.9、31.8、27.2、23.9、23.0、23.0)、5 個の芳香族メチン炭素 (δ_C 109.9、104.8、103.6、103.2、102.0)、9 個の芳香族 4 級炭素 (δ_C 164.5、162.8、159.0、156.2、151.1、142.9、133.8、130.8、102.5) 及び 2 個のカルボニル基に由来する炭素 (δ_C 207.0、159.3) のシグナルが観察された。 1H -NMR 解析 (400 MHz, acetone- d_6) では、2 個のメチル基の水素 (δ_H 0.92, t , $J = 7.0$ Hz; 0.82, t , $J = 7.4$ Hz)、9 個のメチレン水素 (δ_H 3.54, s ; 2.48, t , $J = 7.6$ Hz; 2.38, t , $J = 7.4$ Hz; 1.68, m ; 1.39, m ; 1.38, m ; 1.36, m ; 1.19, m ; 1.10, m) 及び 5 個の芳香族水素 (δ_H 6.47, s ; 6.46, s ; 6.33, s ; 6.27, s ; 6.08, s) のシグナルが観察された。HMBC 解析の結果、Table 2 に示した様な相関が観察されたことから、化合物 **20** は 8-(2,4-dihydroxy-6-(2-oxoheptyl)phenoxy)-6-hydroxy-3-pentyl-1*H*-isochromen-1-one であることを明らかにした (Fig. 5)。単離した化合物 **9** と **20** は、いずれも新規化合物であった。

上記の 2 化合物を含めて単離したすべての化合物の IUPAC 名 (一般名)、収量及び収率を Table 3 に、各化合物の構造を Fig. 6 に示した。本研究において、OM と OMAT から 20 種の化合物を単離精製することができた。これらの化合物は化学構造により、phenol 誘導体 12 化合物 (**1**、**2**、**3**、**4**、**6**、**7**、**8**、

11、13、15、18、19)、didepside 誘導体 4 化合物 (5、9、10、16) 及び isochromen 誘導体 4 化合物 (12、14、17、20) に分類された。

Table 1 ^1H - and ^{13}C -NMR data for novel compound **9** in methanol- d_4

No.	^{13}C Chemical shift (ppm)	^1H Chemical shift (ppm)	^1H - ^{13}C correlation observed in HMBC
1	105.2	—	
2	165.0	—	
3	102.0	6.06 (1H, <i>d</i> , $J = 2.4$ Hz)	C-1, C-2, C-4, C-5
4	166.6	—	
5	113.1	6.18 (1H, <i>d</i> , $J = 2.4$ Hz)	C-1, C-3, C-8
6	144.7	—	
7	171.5	—	
8	24.8	2.47 (3H, <i>s</i>)	C-1, C-5, C-6
1'	152.3	—	
2'	106.1	6.48 (1H, <i>m</i>)	C-1', C-3', C-6'
3'	162.0	—	
4'	113.6	6.59 (1H, <i>m</i>)	C-2', C-6'
5'	144.7	—	
6'	115.7	6.51 (1H, <i>m</i>)	C-1', C-2', C-4', C-7'
7'	21.5	2.24 (3H, <i>s</i>)	C-4', C-5', C-6'
8'	55.9	3.69 (3H, <i>s</i>)	C-3'

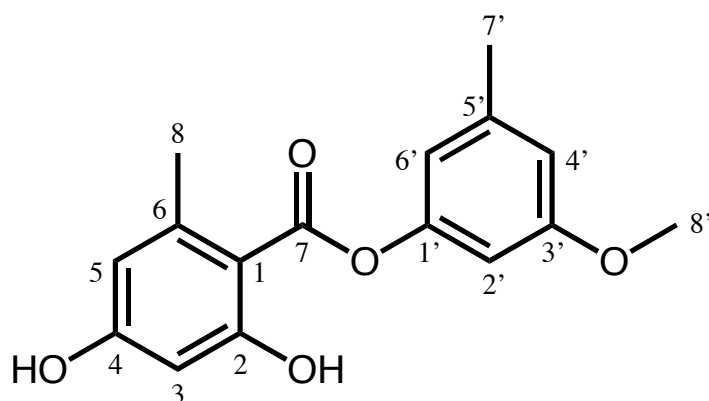


Fig. 4 Chemical structure of a novel compound **9**.

Table 2 ¹H- and ¹³C-NMR data for novel compound **20** in acetone-*d*₆

No.	¹³ C Chemical shift (ppm)	¹ H Chemical shift (ppm)	¹ H- ¹³ C correlation observed in HMBC
1	159.3	—	
2	—	—	
3	159.0	—	
4	103.2	6.27 (1H, <i>s</i>)	C-3, C-4a, C-5, C-8a, C-9
4a	142.9	—	
5	104.8	6.46 (1H, <i>s</i>)	C-4, C-6
6	164.5	—	
7	102.0	6.08 (1H, <i>s</i>)	C-5, C-8, C-8a
8	162.8	—	
8a	102.5	—	
9	33.7	2.48 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7.6)	C-3, C-4, C-10, C-11
10	27.2	1.68 (2H, <i>m</i>)	C-3, C-11, C-12
11	31.8	1.39 (2H, <i>m</i>)	C-12
12	23.0	1.38 (2H, <i>m</i>)	C-11
13	14.2	0.92 (3H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7.0)	C-11, C-12
1'	133.8	—	
2'	151.1	—	
3'	103.6	6.47 (1H, <i>s</i>)	C-1', C-2', C-4', C-5'
4'	156.2	—	
5'	109.9	6.33 (1H, <i>s</i>)	C-1', C-3', C-4', C-7'
6'	130.8	—	
7'	44.3	3.54 (2H, <i>s</i>)	C-1', C-5', C-6', C-8'
8'	207.0	—	
9'	42.5	2.38 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7.4)	C-8', C-10', C-11'
10'	23.9	1.36 (2H, <i>m</i>)	C-8', C-9'
11'	31.9	1.10 (2H, <i>m</i>)	C-12'
12'	23.0	1.19 (2H, <i>m</i>)	C-10', C-11', C-13'
13'	14.1	0.82 (3H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7.4)	C-11', C-12'

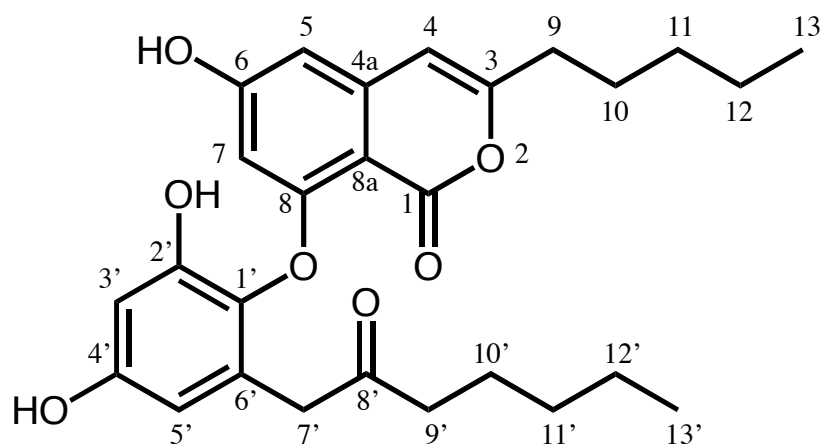
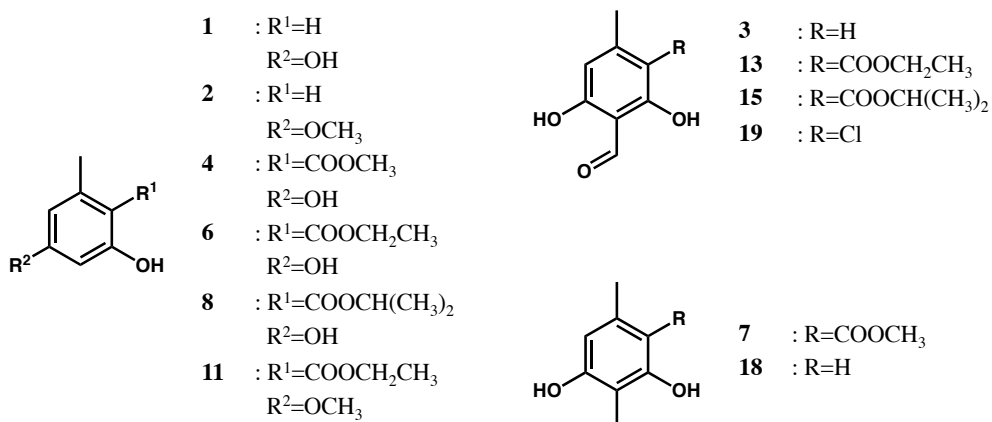


Fig. 5 Chemical structure of a novel compound **20**.

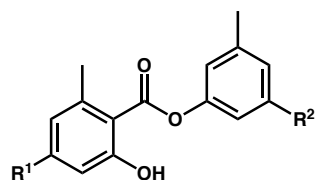
Table 3 IUPAC names and yields of compounds isolated from OM and OMAT

No.	IUPAC name (Common name)	Weight of isolated compound (mg)	Yield (% w/w)
From OM (2.24 g)			
1	5-methylbenzene-1,3-diol (orcinol)	197.8	8.03
2	3-methoxy-5-methylphenol (<i>O</i> -methylorcinol)	61.9	2.76
3	2,6-dihydroxy-4-methylbenzaldehyde (atranol)	19.7	0.88
4	methyl 2,4-dihydroxy-6-methylbenzoate (methyl orsellinate)	1.3	0.06
5	3-hydroxy-5-methylphenyl 2,4-dihydroxy-6-methylbenzoate (lecanorin)	8.4	0.38
6	ethyl 2,4-dihydroxy-6-methylbenzoate (ethyl orsellinate)	35.4	1.58
7	methyl 2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoate (atraric acid)	231.1	10.32
8	isopropyl 2,4-dihydroxy-6-methylbenzoate (isopropyl orsellinate)	2.1	0.09
9	3-methoxy-5-methylphenyl 2,4-dihydroxy-6-methylbenzoate	2.0	0.09
10	3-hydroxy-5-methylphenyl 2-hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoate	13.5	0.60
11	ethyl 2-hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoate (everninate)	51.7	2.31
12	6,8-dihydroxy-3-pentyl-1 <i>H</i> -isochromen-1-one (olivetonide)	2.1	0.09
13	ethyl 3-formyl-2,4-dihydroxy-6-methylbenzoate (haematommate)	8.4	0.38
14	8-(2,4-dihydroxy-6-pentylphenoxy)-6-hydroxy-3-pentyl-1 <i>H</i> -isochromen-1-one	21.7	0.97
15	isopropyl 3-formyl-2,4-dihydroxy-6-methylbenzoate	22.7	1.01
16	3-methoxy-5-methylphenyl 2-hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoate	6.2	0.28
17	8-(2-hydroxy-4-methoxy-6-pentylphenoxy)-6-hydroxy-3-pentyl-1 <i>H</i> -isochromen-1-one	7.9	0.35
18	2,5-dimethylbenzene-1,3-diol (β -orcinol)	1.6	0.07
19	3-chloro-2,6-dihydroxy-4-methylbenzaldehyde (chloroatranol)	5.3	0.24
From OMAT (210 g)			
20	8-(2,4-dihydroxy-6-(2-oxoheptyl)phenoxy)-6-hydroxy-3-pentyl-1 <i>H</i> -isochromen-1-one	78.5	0.04

<Phenol derivatives>

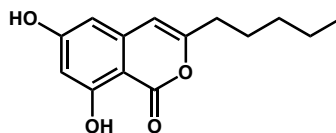


<Didepside derivatives>

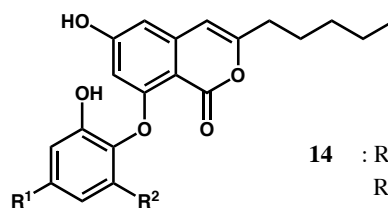


- 5** : R¹=OH
R²=OH
- 9** : R¹=OH
R²=OCH₃
- 10** : R¹=OCH₃
R²=OH
- 16** : R¹=OCH₃
R²=OCH₃

<Isochromen derivatives>



12



- 14** : R¹=OH
R²=(CH₂)₄CH₃
- 17** : R¹=OCH₃
R²=(CH₂)₄CH₃
- 20** : R¹=OH
R²=CH₂CO(CH₂)₄CH₃

Fig. 6 Chemical structures of the compounds isolated from OM and OMAT.

第 2 節 Oakmoss と oakmoss から単離した化合物の *Legionella* 属細菌 に対する最小発育阻止濃度 (MICs) と最小殺菌濃度 (MBCs)

2 種類の oakmoss (OM と OMAT) より単離した 20 種の化合物の *L. pneumophila* 及びその他の *Legionella* 属細菌に対する抗菌活性を評価した。

L. pneumophila として、血清型の異なる臨床分離株 2 株 (SG 1 と SG 6) と環境分離株 1 株に対する抗菌活性評価の結果を Table 4 に示した。比較対照物質として、既存の消毒薬である chlorhexidine gluconate (CHG) 及び種々の細菌に対して抗菌活性を示す天然香料として既に報告されている cinnamic aldehyde (CA)^{33, 34, 46, 47)} を用いた。Oakmoss より単離した 20 種の化合物の *L. pneumophila* に対する最小生育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration; MIC) は 0.8 ~ 256.0 µg/mL であり、最小殺菌濃度 (minimum bactericidal concentration; MBC) は 1.7 ~ > 256.0 µg/mL であった。これら 20 種の化合物の中で、didepside 誘導体 (化合物 **5**、**9**、**10**、**16**) と isochromen 誘導体 (化合物 **12**、**14**、**17**、**20**) は、臨床及び環境分離のすべての *L. pneumophila* に対して高い抗菌活性を示し、その MIC 値は CA の MIC 値よりも低い値であった。特に、化合物 **12** と **14** の MIC 値は、CHG のそれと同程度の低い値であった。これらの化合物の MBC 値は、*L. pneumophila* JCM7571 と JBCC005 の 2 菌株に対しては同様の抗菌活性パターン (MIC 値に対して 1 ~ 5 倍の値) を示し、その値は CA のそれよりも低い値であった。*L. pneumophila* GTC00748 に対するそれらの化合物の MBC 値は、didepside 誘導体 (化合物 **5**、**9**、**10**) と isochromen 誘導体 (化合物 **12**、**14**、**20**) では、前述の 2 菌株と同様の抗菌活性パターンを示した。しかし、didepside 誘導体の化合物 **16** と isochromen 誘導体の化合物 **17** の MBC 値は共に > 256.0 µg/mL であり、*L. pneumophila* GTC00748 に対して殺菌活性を示さなかった。

次に、*L. bozemani*、*L. dumoffii*、*L. longbeachae* 及び *L. micdadei* に対する抗菌活性を評価した結果を、Table 5 に示した。これらの菌株は、ヒトに対して病原性を示す臨床分離株であり、*L. pneumophila* に次いで感染者数が多く報告されている菌株である。その結果、単離した 20 種の化合物のこれらの菌株に対する MIC 値と MBC 値は、それぞれ 0.1 ~ 256.0 µg/mL と 0.5 ~ > 256.0 µg/mL であった。*L. pneumophila* に対する抗菌活性と同様に、didepside 誘導体 (化合物 5、9、10、16) と isochromen 誘導体 (化合物 12、14、17、20) は、これらの菌株に対しても CA より低い MIC 値と MBC 値を示し、CHG の活性と同程度の高い抗菌活性を示した。特に、化合物 12 と 14 の MIC 値は、それぞれ 0.1 ~ 1.0 µg/mL と 1.0 ~ 2.0 µg/mL、MBC 値は 0.5 ~ 4.0 µg/mL と 1.3 ~ 2.7 µg/mL であり、両化合物はすべての菌株に対して高い抗菌活性を示した。また、didepside 誘導体である化合物 16 の *L. micdadei* IID3044 に対する MBC 値は > 256.0 µg/mL であり、他の化合物とは異なる抗菌スペクトルを示した。

Oakmoss は、*L. pneumophila* 以外のグラム陰性細菌及びグラム陽性細菌に対して強い抗菌活性を示さないことが報告されている³⁹⁾が、oakmoss より単離した化合物も試験したグラム陰性細菌 (*E. coli* と *P. aeruginosa*) とグラム陽性細菌 (*B. subtilis* と *S. aureus*) に対して抗菌活性を示さないこと (MIC 値が > 256.0 µg/mL) が明らかとなった。

これらの結果より、oakmoss と oakmoss より単離した化合物は、*Legionella* 属細菌に対してのみ特異的に強い抗菌活性を示すことが明らかとなった。

Table 4 Antibacterial activities of compounds isolated from oakmoss against *Legionella pneumophila* strains

	<i>L. pneumophila</i> JCM7571		<i>L. pneumophila</i> GTC00748		<i>L. pneumophila</i> JBCC005	
	MIC ^{a)}	MBC ^{a)}	MIC ^{a)}	MBC ^{a)}	MIC ^{a)}	MBC ^{a)}
Natural fragrance ingredients						
OM	10.7	32.0	16.0	96.0	16.0	24.0
OMAT	10.7	42.7	16.0	96.0	16.0	26.7
Phenol derivatives						
1	213.3	> 256.0	256.0	> 256.0	128.0	213.3
2	213.3	> 256.0	128.0	256.0	96.0	106.7
3	128.0	234.7	128.0	234.7	128.0	170.7
4	106.7	213.3	85.3	234.7	64.0	74.7
6	32.0	64.0	42.7	128.0	32.0	32.0
7	21.3	53.3	26.7	106.7	24.0	32.0
8	26.7	32.0	32.0	85.3	16.0	32.0
11	106.7	> 256.0	> 256.0	n.t. ^{f)}	> 256.0	n.t. ^{f)}
13	16.0	> 256.0	32.0	> 256.0	26.7	53.3
15	8.0	256.0	24.0	256.0	13.3	13.3
18	74.4	192.0	128.0	> 256.0	192.0	256.0
19	32.0	117.2	64.0	234.7	85.3	128.0
Didepside derivatives						
5	8.0	16.0	8.0	42.7	4.0	8.0
9	8.0	16.0	5.3	37.3	1.5	5.3
10	4.0	8.0	4.0	21.3	1.0	1.0
16	8.0	32.0	7.3	> 256.0	2.7	3.3
Isochromen derivatives						
12	1.7	8.0	1.0	8.0	0.1	0.5
14	2.0	3.0	1.5	1.7	1.8	2.7
17	6.7	21.3	42.7	> 256.0	8.0	21.3
20	8.0	17.2	13.3	21.3	8.0	29.3
Reference compounds						
ABPC ^{b)}	4.0	4.0	n.t. ^{f)}	n.t. ^{f)}	n.t. ^{f)}	n.t. ^{f)}
CAM ^{c)}	0.04	3.0	0.02	0.9	0.02	0.1
CHG ^{d)}	0.8	0.8	0.8	0.8	1.0	1.2
CA ^{e)}	48.0	64.0	64.0	96.0	64.0	64.0

^{a)} MIC and MBC values ($\mu\text{g/mL}$) are means obtained from three independent experiments. ^{b)} Ampicillin, ^{c)} Clarithromycin, ^{d)} Chlorhexidine gluconate, ^{e)} Cinnamic aldehyde, ^{f)} n.t.; not tested.

Table 5 Antibacterial activities of compounds isolated from oakmoss against *Legionella* species

	<i>L. bozemanii</i>		<i>L. dumoffii</i>		<i>L. longbeachae</i>		<i>L. micdadei</i>	
	MIC ^{a)}	MBC ^{a)}	MIC ^{a)}	MBC ^{a)}	MIC ^{a)}	MBC ^{a)}	MIC ^{a)}	MBC ^{a)}
		GTC09140		IID3047		IID3046		IID3044
Natural fragrance ingredients								
OM	16.0	24.0	16.0	16.0	16.0	3.3	7.3	26.7
OMAT	16.0	26.7	16.0	16.0	16.0	3.3	5.3	21.3
Phenol derivatives								
1	128.0	213.3	170.7	170.7	170.7	53.3	53.3	213.3
2	96.0	106.7	170.7	170.7	170.7	53.3	53.3	256.0
3	128.0	170.7	106.7	170.7	170.7	53.3	53.3	128.0
4	64.0	74.7	42.7	64.0	64.0	13.3	13.3	64.0
6	32.0	32.0	53.3	53.3	53.3	6.7	13.3	32.0
7	24.0	32.0	21.3	42.7	42.7	6.7	6.7	21.3
8	16.0	32.0	26.7	42.7	42.7	6.7	13.3	32.0
11	> 256.0	n.t. ^{†)}	213.3	> 256.0	213.3	128.0	213.3	> 256.0
13	26.7	53.3	21.3	21.3	21.3	13.3	13.3	128.0
15	13.3	13.3	8.0	10.7	8.0	8.0	8.0	32.0
18	192.0	256.0	106.7	106.7	106.7	26.7	53.3	> 256.0
19	85.3	128.0	42.7	85.3	85.3	53.3	53.3	128.0
Didepside derivatives								
5	4.0	8.0	5.3	10.7	2.0	2.0	8.0	16.0
9	1.5	5.3	5.3	8.0	0.8	0.8	8.0	16.0
10	1.0	1.0	1.0	1.3	0.8	0.8	1.0	10.7
16	2.7	3.3	1.3	2.7	1.0	1.3	64.0	> 256.0

Table 5 continued

	<i>L. bozemani</i>		<i>L. dumoffii</i>		<i>L. longbeachae</i>		<i>L. micdadei</i>	
	MIC ^{a)}	MBC ^{a)}	MIC ^{a)}	MBC ^{a)}	MIC ^{a)}	MBC ^{a)}	MIC ^{a)}	MBC ^{a)}
	GTC09140		IID3047		IID3046		IID3044	
Isochromen derivatives								
12	0.1	0.5	1.0	4.0	0.7	0.8	1.0	1.3
14	1.8	2.7	1.0	1.3	1.7	1.7	2.0	2.0
17	8.0	21.3	8.0	8.0	3.3	8.0	42.7	58.7
20	8.0	29.3	8.0	8.0	10.7	10.7	21.3	24.0
Reference compounds								
ABPC ^{b)}	n.t. ^{f)}	n.t. ^{f)}	n.t. ^{f)}	n.t. ^{f)}	n.t. ^{f)}	n.t. ^{f)}	n.t. ^{f)}	n.t. ^{f)}
CAM ^{e)}	0.02	0.1	0.01	0.02	0.03	0.04	0.1	0.1
CHG ^{d)}	1.0	1.2	0.3	0.3	1.0	1.0	1.0	1.2
CA ^{e)}	64.0	64.0	32.0	53.3	26.7	32.0	58.7	64.0

a) MIC and MBC values are means obtained from three independent experiments. b) Ampicillin, c) Clarithromycin,

d) Chlorhexidine gluconate, e) Cinnamic aldehyde, f) n.t.; not tested.

第 3 節 Oakmoss とその含有成分として見出された新規化合物 9 と 20 の抗菌作用解析

Oakmoss と oakmoss から単離した化合物は、*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した。それらの中で、oakmoss と、特に高い抗菌活性を示した新規 didepside 誘導体 (化合物 9) 及び新規 isochromen 誘導体 (化合物 20) の経時的な抗菌作用を解析するために、*L. pneumophila* JCM7571 を用いて time-kill assay を行った。Figure 7 に示した様に、OM 又は OMAT を *L. pneumophila* に対して $1 \times \text{MIC}$ 又は $2 \times \text{MIC}$ の濃度で暴露した結果、暴露 1 時間後の生菌数は暴露前の生菌数と比べて $10^2 \sim 10^3$ 倍の減少が見られた。 $2 \times \text{MIC}$ の濃度において生菌数は経時的に減少したが、48 時間後においても生菌数は検出限界以下とはならなかった。それに対して化合物 9 の暴露では、 $2 \times \text{MIC}$ の濃度において暴露 1 時間後には生菌数が検出限界以下となった。しかし、 $1 \times \text{MIC}$ の濃度では、生菌数は経時的に減少したが、48 時間後においても生菌数は検出限界以下とはならなかった。また、化合物 20 では、 $1 \times \text{MIC}$ と $2 \times \text{MIC}$ の両濃度の暴露において、暴露 1 時間後で生菌数は急激に減少し、その後生菌数は経時的に減少し、24 時間後では生菌数が検出限界以下となった。

これらの結果から、oakmoss は 48 時間後においても *L. pneumophila* の生菌数が検出限界以下とはならず、*L. pneumophila* に対して静菌的に作用することが明らかとなった。一方、化合物 9 と 20 は、 $1 \times \text{MIC}$ 又は $2 \times \text{MIC}$ の濃度の暴露によって短時間で *L. pneumophila* の生菌数が検出限界以下となったことから、*L. pneumophila* に対して殺菌的な作用を示すことが明らかとなった。

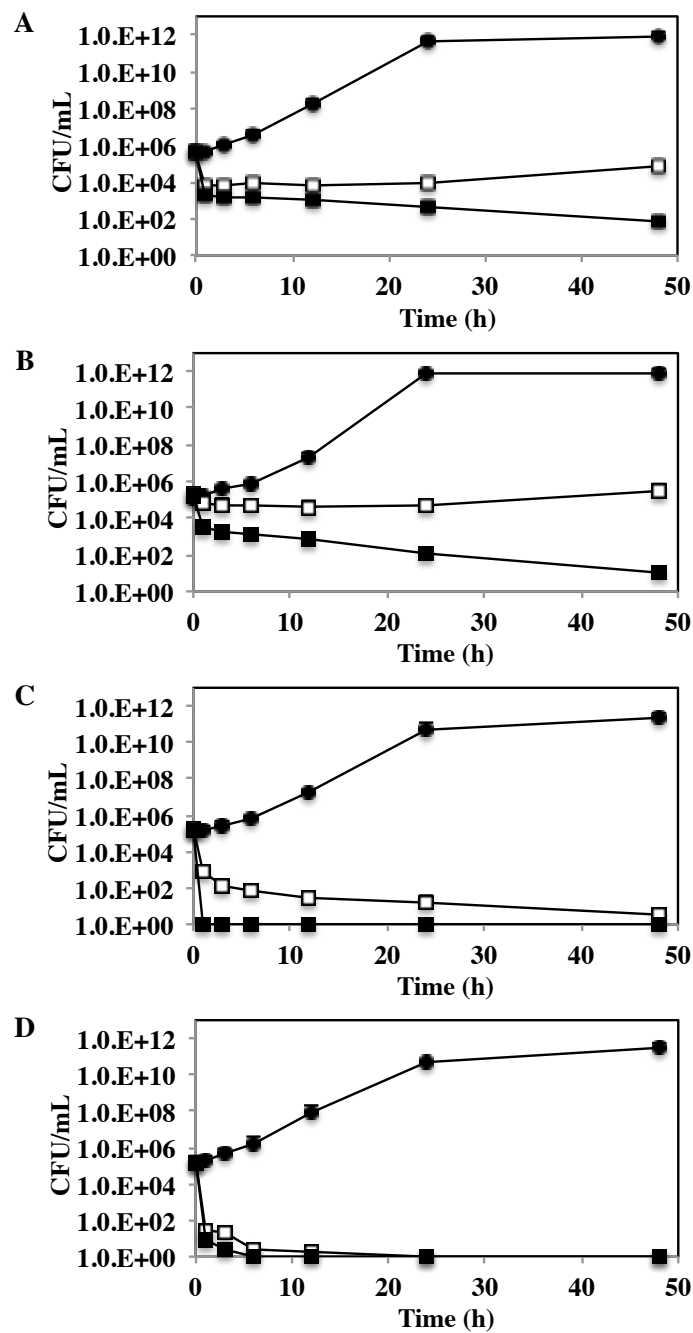


Fig. 7 Time-kill curves for *Legionella pneumophila* JCM 7571 in the presence of 1 × MIC (□) and 2 × MIC (■) (A) OM, (B) OMAT, (C) compound **9**, and (D) compound **20**. Closed circles (●) represent the positive control. The MIC values were OM; 10.7 µg/mL, OMAT; 10.7 µg/mL, compound **9**; 8.0 µg/mL and compound **20**; 8.0 µg/mL.

第 4 節 小括と考察

本章では、*Legionella* 属細菌に対して特異的に抗菌活性を示す天然香料 oakmoss からその含有成分を単離し、それらの構造を明らかにすると共に、*Legionella* 属細菌に対する抗菌活性を評価した。

2 種類の天然香料 oakmoss より、20 種の化合物 (OM より 19 種と OMAT より 1 種の化合物) を単離し、その構造を決定した。その中で、化合物 **9** と **20** はいずれも新規化合物の 3-methoxy-5-methylphenyl 2,4-dihydroxy-6-methyl benzoate と 8-(2,4-dihydroxy-6-(2-oxoheptyl)phenoxy)-6-hydroxy-3-pentyl-1*H*-isochromen-1-one であることを明らかとした。OM より単離した 19 種の化合物の収率の合計は元の試料の 30% 程度であった。OM の LH-20 カラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーによる分画の際、樹脂には茶色の物質が吸着し、methanol と水を用いた洗浄においても完全に溶出することは不可能であった。これらの物質は、tar 等の高分子量物質であると考えられる。Oakmoss には、本研究で単離・同定された化合物以外にも多くの高分子化合物が含まれていると思われる。

Oakmoss より単離した化合物中で、atranol (化合物 **3**)、chloroatranol (化合物 **19**)、atraric acid (化合物 **7**)、everninate (化合物 **11**)、haematommate (化合物 **13**)、orsellinates (化合物 **4**、**6**、**8**) 及び lecanorin (化合物 **5**) は、oakmoss と oakmoss の主原料である *Evernia prunastri* (L.) Arch. 抽出物に含まれることが知られており⁴⁸⁻⁵¹)、これらの化合物がグラム陽性細菌、陰性細菌及び真菌に対して抗菌活性を示すことが報告されている^{52,53})。しかし、これら oakmoss に含まれる成分の *Legionella* 属細菌に対する抗菌活性は報告されていない。本研究において、oakmoss より単離した 20 種の化合物について、臨床及び環境より分離された *Legionella* 属細菌に対する抗菌活性を評価した。Phenol 誘導体は、これまでに

もグラム陰性細菌に対して抗菌活性を示すことが報告されている^{52, 53)}が、*Legionella* 属細菌に対する MIC 値の方が低い値を示しており、*Legionella* 属細菌の方がこれらの化合物に対して高い感受性を示すことが示唆された。Didepside 誘導体 (化合物 **5**、**9**、**10**、**16**) の *Legionella* 属細菌に対する抗菌活性は、oakmoss に含まれる didepside 誘導体の中でグラム陰性細菌及びグラム陽性細菌に対する抗菌活性を示すことが報告されている atranirin⁵¹⁾よりも強いものであった。また、化合物 **16** を除く 3 種の化合物は、すべての *Legionella* 属細菌に対して高い殺菌効果を示したが、化合物 **16** は *L. pneumophila* GTC00748 と *L. micdadei* IID3044 に対して殺菌効果を示さなかった。Fujikawa ら⁵⁴⁾ は、*Parmelia* spp. より単離した atraric acid と orsellinates、*Cetrelia* spp. より単離した olivetonide の *Lactobacillus* spp. に対する抗菌活性を報告している。本研究においても、oakmoss より単離した olivetonide (化合物 **12**) とその他の isochromen 誘導体の 3 種の化合物 (化合物 **14**、**17**、**20**) は、すべての *Legionella* 属細菌に対して強い抗菌活性を示した。しかし、didepside 誘導体の化合物 **16** と同様に、化合物 **17** は *L. pneumophila* GTC00748 に対して殺菌効果を示さなかった。化合物 **16** と **17** の *Legionella* 属細菌に対する抗菌活性の差は、*L. pneumophila* の血清型の違い又は *Legionella* 属細菌の菌種の違いが関係しているものと考えられた。

本研究で用いた 2 種類の oakmoss から単離した 20 種の化合物は、*Legionella* 属細菌以外のグラム陰性細菌とグラム陽性細菌に対して試験した濃度では抗菌活性を示さなかった。グラム陰性細菌は、特殊な外膜を有することで細胞表面が親水性に保たれている。グラム陰性細菌は、外膜に存在する porin proteins (低分子の親水性化合物は通過できる) により疎水性化合物を菌体外へ排出することから、一般的に疎水性化合物に対して耐性を示す。外膜の疎水性の度合いは、タンパク質、リン脂質及び lipopolysaccharides (LPS) などの成分

によって決定され、*Legionella* 属細菌の外膜は他のグラム陰性細菌の外膜よりも疎水性であることが知られている⁵⁵⁻⁵⁸)。特に、*L. pneumophila* (SG O1) の LPS の O-polysaccharide chain は、他のグラム陰性細菌のそれを構成する糖よりも水酸基の数が少ない 5-acetamidino-7-acetamido-8-O-acetyl-3,5,7,9-tetradecoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulosonic acid (legionaminic acid) のホモポリマーからなり、またアセチル化されたコア構造を有することから、より高い疎水性を示すことが報告されている⁵⁹⁻⁶²)。これらのことから、*Legionella* 属細菌の外膜は他のグラム陰性細菌の外膜よりも高い疎水性を有し、このことが oakmoss と oakmoss から単離した化合物に対する *Legionella* 属細菌の高い感受性に関与していることが示唆された。

Oakmoss と、*Legionella* 属細菌に対して高い抗菌活性を示した didepside 誘導体及び isochromen 誘導体の中で新規化合物 **9** と **20** について、Time-kill assay による抗菌作用解析を行った。その結果、oakmoss (OM と OMAT) は、短時間の暴露により急激な生菌数の減少が起こった後、48 時間後まで緩やかに生菌数は減少したが、最終的に生菌数は検出限界以下とはならなかった。また、新規化合物 **9** と **20** は、短時間の暴露で生菌数が急激に減少した後、24 時間後には生菌数は検出限界以下となった。このことから、どちらの化合物も *L. pneumophila* に対して殺菌的な作用を有することが示された。Oakmoss は、化合物 **9** と **20** をはじめとした殺菌的な作用を有する化合物を複数含んでいるが、その含有量は極めて少なく、oakmoss の示した抗菌活性は単離した 20 種の化合物及びその他の未知の化合物の複合的な作用によるものであることが示唆された。

第 2 章 Oakmoss と oakmoss から単離した化合物の *L. pneumophila* の biofilm 形成に対する影響と biofilm 内 *L. pneumophila* に対する抗菌活性評価

Legionella 属細菌は、自然及び人工環境中において biofilm を形成し、成熟した biofilm 中に生息する菌体は消毒薬に対して抵抗性を示す⁶³⁻⁶⁵。このことから、レジオネラ症防止対策を目的とした消毒薬は、*Legionella* 属細菌の biofilm 形成を抑制すること、さらに biofilm に対する高い透過性を有し、biofilm 内に生息する *L. pneumophila* に対する抗菌活性を発揮することが求められる。そこで、oakmoss とその含有化合物の *L. pneumophila* の biofilm 形成に対する影響及び biofilm 内 *L. pneumophila* に対する抗菌活性を評価した。

第 1 節 *L. pneumophila* の biofilm 形成に対する影響

Oakmoss と oakmoss から単離した化合物の *L. pneumophila* JCM7571 の biofilm 形成に対する影響を評価し、その結果を Fig. 8~11 に示した。

比較対照物質として clarithromycin (CAM)、CHG 及び CA を用いた。CAM をはじめとしたマクロライド系抗生物質、CHG 及び CA は、低濃度で細菌を処理すると細菌の biofilm の形成を抑制することが報告されている⁶⁶⁻⁷¹。*L. pneumophila* に CAM を 0.0625 ~ 0.5 × MIC の濃度で暴露した結果、濃度依存的に biofilm 形成を抑制し、0.5 × MIC の濃度を暴露した場合、その biofilm 形成率は未処理の場合と比較して 47.0 ± 8.5% に減少した (Fig. 8)。しかし、*L. pneumophila* に対して高い抗菌活性を示し、かつ他の細菌での biofilm 形成抑制効果が報告されている CHG と CA は、試験したすべての濃度において *L. pneumophila* の biofilm 形成に対して影響を示さなかった。*L. pneumophila* に対

して特異的な抗菌活性を示す oakmoss (OM と OMAT) を暴露した結果では、予想に反して濃度依存的に *L. pneumophila* の biofilm 形成率は増加し、 $0.5 \times \text{MIC}$ の濃度を添加した時の biofilm 形成率は未処理の場合と比較して $136.8 \pm 18.9\%$ と $132.9 \pm 15.9\%$ に増加した。

一方、oakmoss の成分である didepside 誘導体を暴露した結果、化合物 **9**、**10** 及び **16** が濃度依存的に *L. pneumophila* の biofilm 形成を抑制した (Fig. 9)。特に、化合物 **9** と **16** を $0.5 \times \text{MIC}$ の濃度で添加した場合、その biofilm 形成率は未処理の場合と比較して $23.6 \pm 8.7\%$ と $17.8 \pm 2.1\%$ に減少し、biofilm 形成抑制効果は CAM の抑制効果よりも強いことが示された。さらに、phenol 誘導体 (化合物 **2**、**4**、**6**、**7**、**8**、**11**) を暴露した結果、濃度依存的に *L. pneumophila* の biofilm 形成を抑制した (Fig. 10)。特に、化合物 **2**、**4**、**8** 及び **11** を $0.5 \times \text{MIC}$ の濃度で暴露した場合、その biofilm 形成率は未処理の場合と比較してそれぞれ $27.2 \pm 16.3\%$ 、 $34.9 \pm 11.1\%$ 、 $45.9 \pm 5.4\%$ 及び $31.3 \pm 18.6\%$ であり、その biofilm 抑制効果は CAM の抑制効果と同程度又はそれ以上であった。これとは対照的に、化合物 **3**、**13**、**15** 及び **19** を暴露した結果、濃度依存的に biofilm 形成率は増加した。これらの化合物を $0.5 \times \text{MIC}$ の濃度で添加した場合、その biofilm 形成率は未処理の場合と比較して $144.3 \pm 6.6\% \sim 167.4 \pm 34.0\%$ に増加した。特に化合物 **3** は *L. pneumophila* の biofilm 形成に対して強い増強作用を示した。しかし、*L. pneumophila* に対して強い抗菌活性を示した didepside 誘導体の化合物 **5** と isochromen 誘導体は、biofilm 形成に対しては影響を示さなかった (Fig. 8 & 11)。

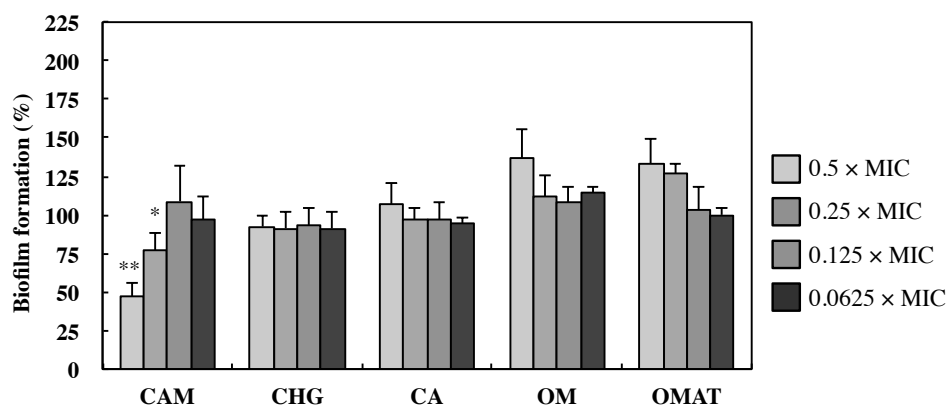


Fig. 8 Effects of CAM, CHG, CA, OM and OMAT on *Legionella pneumophila* biofilm formation (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$). The MIC values were CAM; 0.042 $\mu\text{g/mL}$, CHG; 0.8 $\mu\text{g/mL}$, CA; 48.0 $\mu\text{g/mL}$, OM; 10.7 $\mu\text{g/mL}$ and OMAT; 10.7 $\mu\text{g/mL}$.

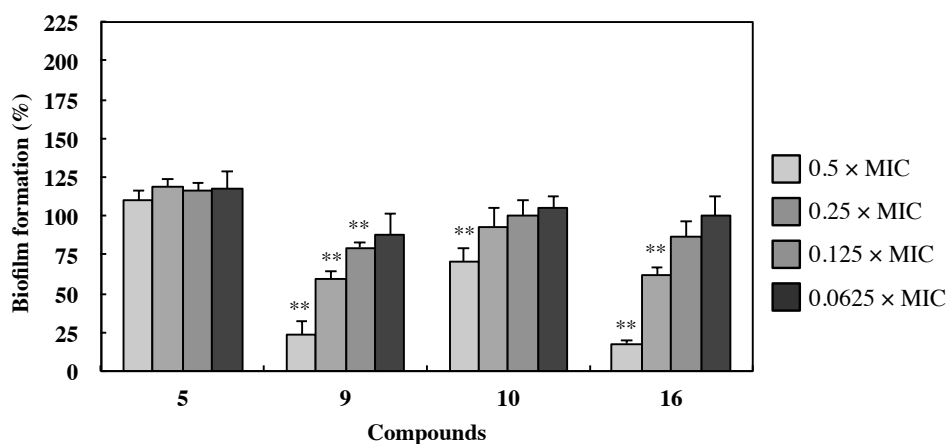


Fig. 9 Effects of didepside derivatives on *Legionella pneumophila* biofilm formation (** $p < 0.01$). The MIC values were compound **5**; 8.0 $\mu\text{g/mL}$, compound **9**; 8.0 $\mu\text{g/mL}$, compound **10**; 4.0 $\mu\text{g/mL}$ and compound **16**; 8.0 $\mu\text{g/mL}$.

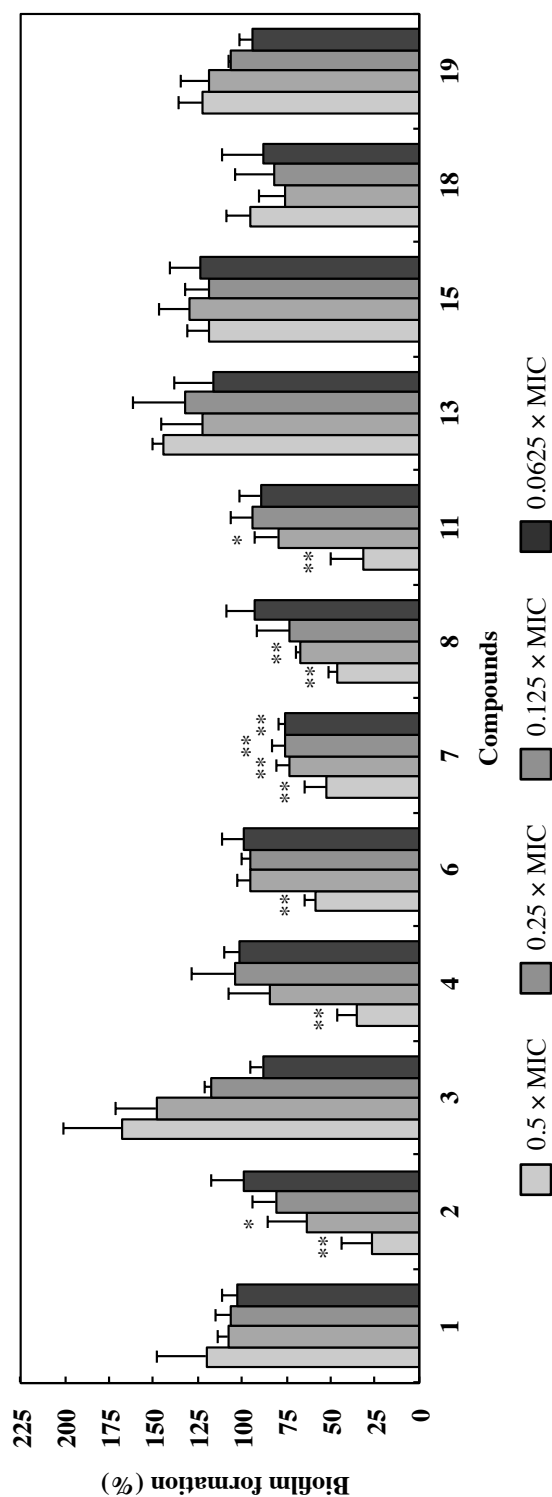


Fig. 10 Effects of phenol derivatives on *Legionella pneumophila* biofilm formation (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$). The MIC values compound **1**; 213.3 $\mu\text{g/mL}$, compound **2**; 213.3 $\mu\text{g/mL}$, compound **3**; 128.0 $\mu\text{g/mL}$, compound **4**; 106.7 $\mu\text{g/mL}$, compound **6**; 32.0 $\mu\text{g/mL}$, compound **7**; 21.3 $\mu\text{g/mL}$, compound **8**; 26.7 $\mu\text{g/mL}$, compound **11**; 106.7 $\mu\text{g/mL}$, compound **13**; 16.0 $\mu\text{g/mL}$, compound **15**; 8.0 $\mu\text{g/mL}$, compound **18**; 74.4 $\mu\text{g/mL}$ and compound **19**; 32.0 $\mu\text{g/mL}$.

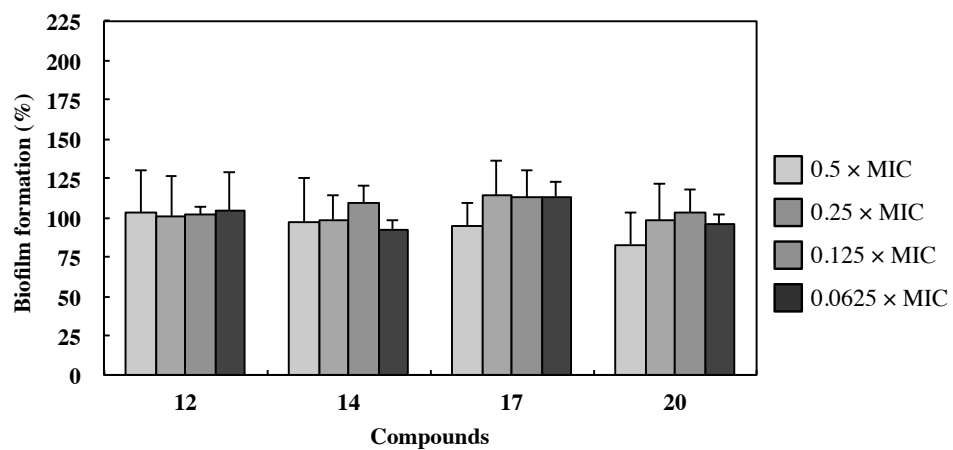


Fig. 11 Effects of isochromen derivatives on *Legionella pneumophila* biofilm formation. The MIC values were compound **12**; 1.7 $\mu\text{g/mL}$, compound **14**; 2.0 $\mu\text{g/mL}$, compound **17**; 6.7 $\mu\text{g/mL}$ and compound **20**; 8.0 $\mu\text{g/mL}$.

第 2 節 Biofilm 内 *L. pneumophila* に対する抗菌活性評価

Oakmoss より単離した化合物の中で、浮遊 *Legionella* 属細菌に対して特に強い抗菌活性を示した didepside 誘導体 (化合物 **5**、**9**、**10**、**16**) と isochromen 誘導体 (化合物 **12**、**14**、**17**、**20**) について、biofilm 内 *L. pneumophila* に対する抗菌活性を最小殺菌濃度 (MBCs) として評価し、その結果を Table 6 に示した。

1 時間の暴露では、oakmoss を含むすべての試験化合物は biofilm 内 *L. pneumophila* に対して殆ど抗菌活性を示さなかった。24 時間と 48 時間の暴露では、didepside 誘導体の 3 化合物 (化合物 **5**、**9**、**10**) と isochromen 誘導体の 1 化合物 (化合物 **12**) が biofilm 内 *L. pneumophila* に対して比較的低い濃度で殺菌的作用を示した。これらの化合物の biofilm 内 *L. pneumophila* に対する MBC 値は、24 時間の暴露では 32.0 ~ 74.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、48 時間の暴露では 32.0 ~ 64.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、その値は CAM と CHG の MBC 値 (24 時間; 64.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 58.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、48 時間 ; 42.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と同程度であった。また、これらの化合物の 24 時間と 48 時間の暴露における MBC 値には、大きな差は認められなかった。浮遊 *L. pneumophila* に対して強い抗菌活性を示した oakmoss (OM と OMAT) と CA は、すべての時間において biofilm 内 *L. pneumophila* に対しては殆ど抗菌活性を示さなかった。

Table 6 Bactericidal activities of oakmoss and its components against *Legionella pneumophila* JCM7571 in biofilm

	MBC ($\mu\text{g/mL}$)		
	1 h	24 h	48 h
Natural fragrance ingredients			
OM	> 256.0	> 256.0	\geq 256.0
OMAT	> 256.0	> 256.0	\geq 256.0
Didepside derivatives			
5	256.0	74.7	64.0
9	256.0	58.7	37.3
10	213.3	32.0	32.0
16	> 256.0	> 256.0	> 256.0
Isochromen derivatives			
12	\geq 256.0	53.3	42.7
14	> 256.0	\geq 256.0	256.0
17	> 256.0	> 256.0	> 256.0
20	> 256.0	\geq 256.0	213.3
Reference compounds			
CAM ^{a)}	> 256.0	64.0	42.7
CHG ^{b)}	> 256.0	58.7	42.7
CA ^{c)}	> 256.0	> 256.0	234.7

MBC values are means obtained from three independent duplicated experiments. ^{a)} Chlorhexidine gluconate, ^{b)} Clarithromycin, ^{c)} Cinnamic aldehyde.

第 3 節 小括と考察

本章では、自然環境中で *Legionella* 属細菌の形成する biofilm に着目し、oakmoss と oakmoss から単離した化合物の *L. pneumophila* 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。

本研究において比較対照物質として用いた CAM^{63, 64)}、CHG⁶⁸⁾ 及び CA⁶⁹⁻⁷¹⁾ は、これまでに様々な細菌の biofilm 形成に対して抑制効果を示すことが報告されている。CAM を *L. pneumophila* JCM7571 に暴露した結果、biofilm 形成率は大幅に減少し、その抑制効果は濃度依存的であった。低濃度の CAM は、biofilm 構造を変化させ、さらに菌体外成分 (EPS) の分泌を抑制すると考えられており^{72, 73)}、同様のメカニズムにより *L. pneumophila* の biofilm 形成も抑制したものと考えられる。しかし、CHG と CA は *L. pneumophila* の biofilm の形成を抑制せず、CAM とは異なる作用機序により他の細菌の biofilm 形成を抑制することが示唆された。これまでに細菌の biofilm 形成抑制効果の作用機序として、細胞膜への傷害^{71, 74)}、swimming motility の抑制⁷¹⁾、細菌接着の抑制⁷⁵⁾及び twitching motility の抑制⁷⁶⁾ 等が報告されている。本研究では、didepside 誘導体の 2 化合物 (化合物 **9** と **16**) が、未処理の場合と比較して 50% 以上も *L. pneumophila* の biofilm 形成を抑制した。Didepside 誘導体は、それぞれ構造中に有する水酸基の数が異なり、水酸基の数の少ない化合物 **16** が最も強い biofilm 抑制効果を示した。このことから、biofilm 形成に対する作用の差は、水酸基の数による物理化学的性状に関係すると考えられたが、本研究においてその作用機序の解明には至らなかった。また、phenol 誘導体の 6 化合物 (化合物 **2**、**4**、**6**、**7**、**8**、**11**) が、*L. pneumophila* の biofilm 形成を抑制した。これらの化合物は、化合物 **2** を除き構造中にエステル基を有することから、エステル基の存在が biofilm 形成抑制に影響することが示唆されたが、didepside 誘

誘導体と同様にその作用機序の解明には至らなかった。一方、すべての isochromen 誘導体は *L. pneumophila* の biofilm 形成に影響を示さなかった。Isochromen 誘導体は、分子量が大きく、かつ構造中にアルキル基を有することから他の化合物よりも疎水性が高いと考えられ、このことが biofilm 形成に影響を示さなかったことに関与することが示唆された。Oakmoss は biofilm 形成抑制作用を有する多くの化合物を含む一方で、oakmoss (OM と OMAT) そのものを暴露させた場合、*L. pneumophila* の biofilm 形成は増強された。同様に、phenol 誘導体の化合物 **3**、**13**、**15** 及び **19** を暴露した結果、その biofilm 形成率は有意に高い値であった。これらの化合物は、2 個の水酸基の間にアルデヒド基を共通構造として有することから、アルデヒド基の存在が *L. pneumophila* の biofilm 形成増強に影響することが予想されたが、詳細な作用の解析には至らなかった。上述の様に、oakmoss 中には *L. pneumophila* の biofilm 形成を増強する複数の化合物が含まれていることが示された。しかし、それらの化合物の含有量は極めて少なく、oakmoss の *L. pneumophila* の biofilm 形成増強作用の主成分であるとは考えにくい。Ofek ら⁷⁵⁾と Sandasi ら⁷⁶⁾は、高分子化合物が biofilm 形成の前段階である菌体の表面接着に関与することを報告しており、oakmoss の biofilm 形成増強も oakmoss に含まれる未知の高分子化合物が関与していることが示唆された。

浮遊 *L. pneumophila* に対して高い抗菌活性を示した diepside 誘導体及び 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結果、didepside 誘導体の 3 化合物 (化合物 **5**、**9**、**10**) と isochromen 誘導体の 1 化合物 (化合物 **12**) が、biofilm 内 *L. pneumophila* に対して CAM と CHG の結果と同程度の高い抗菌活性を示した。しかし、48 時間の暴露における biofilm 内 *L. pneumophila* に対する化合物 **5**、**9** 及び **10** の MBC 値は、浮遊 *L. pneumophila* に対する MBC 値よりも約 4 倍高い値であり、biofilm の

存在がこれらの化合物に対して障壁となっていることが示された。Didepside 誘導体の中で、化合物 **16** のみが biofilm 内 *L. pneumophila* に対して抗菌活性を示さなかったが、化合物 **16** は水酸基の数が少ないことから他の didepside 誘導体よりも疎水性が高く、菌体外多糖をはじめとした親水性の物質を多く含む biofilm 中への透過性が低いためであると考えられる。また、biofilm 内 *L. pneumophila* に対して抗菌活性を示さなかった isochromen 誘導体の化合物 **14**、**17** 及び **20** は、isochromen 誘導体の基本骨格である 6-hydroxy-3-pentyl-1*H*-isochromen-1-one の 8 位に 6-pentylphenoxy 基が結合している。これらの化合物は、分子量も大きく、アルキル基の数も多いことから、化合物 **12** よりもさらに疎水性が高く、biofilm 内への化合物の透過性が低いため biofilm 内 *L. pneumophila* に対して抗菌活性を示さなかったものと考えられる。Oakmoss 自体は、浮遊 *L. pneumophila* に対しては高い抗菌活性を示したが、biofilm 内 *L. pneumophila* に対しては抗菌活性を示さなかった。Oakmoss は、biofilm 内 *L. pneumophila* に対して高い抗菌活性を示す化合物を複数含むが、その含有量は微少であることから、浮遊状態と biofilm 内で生息状態の菌体に対する抗菌活性に大きな差が生じたものと考えられる。一般的な消毒薬の CHG も、biofilm 内 *L. pneumophila* に対して抗菌活性を示した。その MBC 値は浮遊 *L. pneumophila* に対する MBC 値よりも 50 倍以上高い値であり、biofilm 内への CHG の透過性が低いことが示唆された。

本研究において試験した化合物の中で、didepside 誘導体が *L. pneumophila* の biofilm 形成を抑制し、かつ biofilm 内 *L. pneumiphila* に対して高い抗菌活性を示したことから、*L. pneumophila* に対する消毒剤への応用に最も有用であることが示唆された。

第 3 章 Oakmoss と oakmoss から単離した化合物の *Acanthamoeba castellanii* に対する殺アメーバ活性と *A. castellanii* 内への *L. pneumophila* の取込みに対する影響

前述の様に、自然環境中において *Legionella* 属細菌は biofilm 内での生息だけではなく、アメーバ等の原虫を宿主として生息しており、水環境中からの *Legionella* 属細菌の検出とアメーバの検出の間には相関があることが知られている^{28,29)}。また、アメーバ等に寄生した *Legionella* 属細菌は消毒剤に対して抵抗性を示すこと^{20,30)}、さらにアメーバから遊出した *Legionella* 属細菌は消毒剤に対して抵抗性を獲得していること³¹⁾が知られている。つまり、*Legionella* 属細菌の宿主アメーバを除去し、かつアメーバ内への *L. pneumophila* の取込みを抑制することは、極めて有効なレジオネラ症防止対策の手段となる。そこで、oakmoss と oakmoss から単離した化合物の *A. castellanii* に対する殺アメーバ活性と *A. castellanii* 内への *L. pneumophila* の取込みへの影響を評価した。

第 1 節 *A. castellanii* に対する殺アメーバ活性評価

Legionella 属細菌の宿主アメーバとして一般的な *A. castellanii* ATCC30234 を用い、alamarBlue 法により殺アメーバ活性を評価した。Table 7 に示した様に、phenol 誘導体の 6 化合物 (化合物 **6**、**7**、**8**、**13**、**15**、**19**)、didepside 誘導体の化合物 **5** 及び isochromen 誘導体の 2 化合物 (化合物 **12** と **20**) が、24 時間と 48 時間の暴露において殺アメーバ活性を示した。これらの化合物の中で、特に化合物 **5**、**8**、**12** 及び **19** は強い殺アメーバ活性を示し、24 時間の暴露における IC₅₀ 値は、それぞれ 29.6 ± 3.0、34.4 ± 4.1、22.8 ± 4.6 及び 34.9 ± 6.0 µg/mL であり、48 時間の暴露では 16.3 ± 4.0、26.7 ± 2.6、17.5 ± 2.8 及び 24.7

$\pm 2.9 \mu\text{g/mL}$ であった。特に化合物 **5** と **12** の殺アメーバ活性は、これまでに殺アメーバ活性を示すことが報告されている CHG⁷⁸⁾ の活性と同程度であった。2 種類の oakmoss (OM と OMAT) も *A. castellanii* に対して殺アメーバ活性を示したが、48 時間の暴露における OMAT の IC_{50} 値 ($10.5 \pm 2.3 \mu\text{g/mL}$) は OM の IC_{50} 値 ($24.8 \pm 4.9 \mu\text{g/mL}$) よりも有意に低い値 ($p < 0.01$) を示した。また、48 時間の暴露における OMAT の殺アメーバ活性は、CHG の活性と同程度に強い活性であったが、24 時間の暴露においては OMAT の殺アメーバ活性は、CHG よりも弱いものであった ($p < 0.05$)。また、その他の phenol 誘導体、didepside 誘導体及び isochromen 誘導体は、 $100 \mu\text{g/mL}$ の濃度においても殺アメーバ活性を示さなかった。

Table 7 Amoebicidal activities of oakmoss and its components against *Acanthamoeba castellanii* ATCC30234 trophozoites

	IC ₅₀ (µg/mL)	
	24 h	48 h
Natural fragrance ingredients		
OM	81.3 ± 5.8	24.8 ± 4.9
OMAT	69.3 ± 16.9	10.5 ± 2.3
Phenol derivatives		
1	>100.0	>100.0
2	>100.0	>100.0
3	>100.0	>100.0
4	>100.0	>100.0
6	>100.0	21.1 ± 8.8
7	91.0 ± 0.7	23.9 ± 1.6
8	34.4 ± 4.1	26.7 ± 2.6
11	>100.0	>100.0
13	>100.0	30.5 ± 12.9
15	65.8 ± 7.6	30.5 ± 2.9
18	>100.0	>100.0
19	34.9 ± 6.0	24.7 ± 2.9
Didepside derivatives		
5	29.6 ± 3.0	16.3 ± 4.0
9	>100.0	>100.0
10	>100.0	>100.0
16	>100.0	>100.0
Isochromen derivatives		
12	22.8 ± 4.6	17.5 ± 2.8
14	>100.0	>100.0
17	>100.0	>100.0
20	82.9 ± 6.9	47.8 ± 3.1
Reference compounds		
ABPC ^{a)}	>100.0	>100.0
CHG ^{b)}	31.4 ± 1.2	13.2 ± 4.8

IC₅₀ values are means ± SD obtained from three independent duplicated experiments. ^{a)} Ampicillin, ^{b)} Chlorhexidine gluconate.

第 2 節 *A. castellanii* 内への *L. pneumophila* の取込みに対する影響

Oakmoss と oakmoss から単離した化合物の *A. castellanii* 内への *L. pneumophila* JCM7571 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、didepside 誘導体の化合物 **5** 及び isochromen 誘導体の化合物 **12**、さらに浮遊 *L. pneumophila* に対して高い抗菌活性を示した didepside 誘導体の化合物 **10** と isochromen 誘導体の化合物 **14** を用いた。Oakmoss を含むすべての化合物は、 $0.25 \times \text{MIC}$ の濃度となるように調整し、予め *L. pneumophila* 又は *A. castellanii* に暴露した。比較対照物質として、前培養の段階で *L. pneumophila* に sub-MIC の濃度で暴露することで、*L. pneumophila* の *A. castellanii* 内への取込みを抑制する効果が報告されている ABPC⁷⁹⁾を用いた。

前培養の段階で *L. pneumophila* に $0.25 \times \text{MIC}$ の濃度となるように試験化合物を暴露した後、回収した菌体を *A. castellanii* と 1 時間接触させた時の *A. castellanii* 内に取り込まれた *L. pneumophila* の生菌数の測定結果を Fig. 12-A に示した。OMAT と didepside 誘導体の化合物 **5** を暴露した結果、未処理の場合と比較して *A. castellanii* 内への *L. pneumophila* の取込みは明らかに抑制された ($p < 0.05$)。その時の *L. pneumophila* の生菌数は、 $4.5 \times 10^1 \pm 5.5 \times 10^1$ CFU/mL (OMAT) と $2.7 \times 10^1 \pm 1.8 \times 10^1$ CFU/mL (化合物 **5**) であり、未処理の場合 ($2.1 \times 10^4 \pm 9.5 \times 10^3$ CFU/mL) に比べて大幅に減少した。これらの活性は、ABPC の *L. pneumophila* の取込みに与えた影響 ($3.1 \times 10^1 \pm 3.2 \times 10^1$ CFU/mL) と同程度であった。また、didepside 誘導体の化合物 **10** と isochromen 誘導体の化合物 **14** は、OMAT と化合物 **5** の取込み抑制効果よりは弱いながら、*A. castellanii* 内への *L. pneumophila* 取込み抑制した。その時の *L. pneumophila* の生菌数は、 $1.3 \times 10^3 \pm 1.7 \times 10^3$ CFU/mL (化合物 **10**) と $1.6 \times 10^3 \pm 2.6 \times 10^3$

CFU/mL (化合物 **14**) であり、未処理の場合 ($2.1 \times 10^4 \pm 9.5 \times 10^3$ CFU/mL) と比べて減少した。一方、この結果とは対照的に、殺アメーバ活性や浮遊及び biofilm 内 *L. pneumophila* に対して高い抗菌活性を示した isochromen 誘導体の化合物 **12** は、*A. castellanii* 内への *L. pneumophila* 取込みに対して影響を示さなかった。

さらに、*L. pneumophila* と *A. castellanii* の共培養時に試験化合物を暴露した場合と、予め *A. castellanii* に試験化合物を暴露した場合の異なる 2 種類の条件で *A. castellanii* 内への *L. pneumophila* 取込みを評価し、その結果をそれぞれ Fig. 12-B と 12-C に示した。試験したすべての試験化合物は、どちらの条件下においても *A. castellanii* 内への *L. pneumophila* 取込みに対して影響を示さなかった。

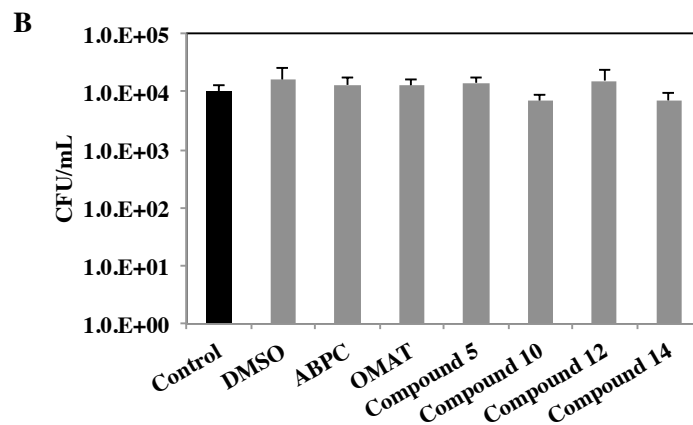
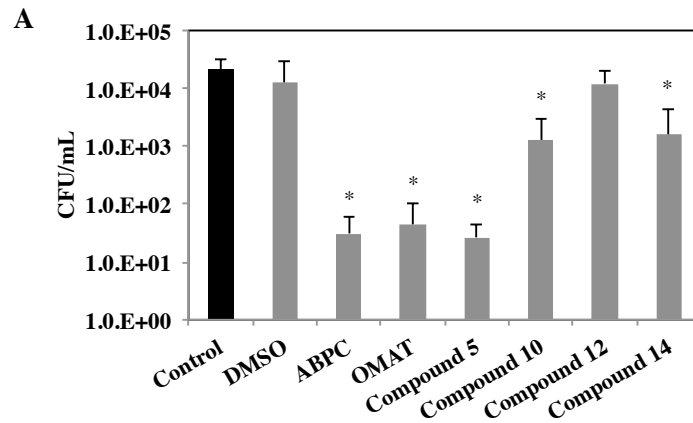


Fig. 12 continued.

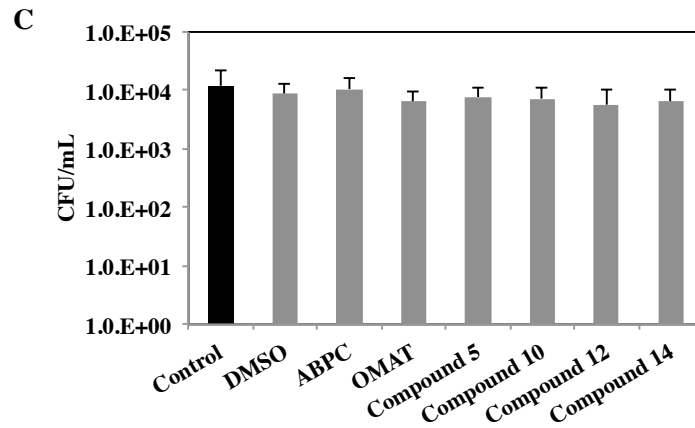


Fig. 12 Effects of oakmoss and its components on uptake of *Legionella pneumophila* JCM7571 (ATCC33152) into *Acanthamoeba castellanii* ATCC30234 at subinhibitory concentrations. A) *A. castellanii* was added to *L. pneumophila*, which was cultured in the presence of each sample. B) *A. castellanii* was added to *L. pneumophila* and each sample at the same time. C) *A. castellanii*, followed by incubation with the addition of each sample, was added to *L. pneumophila*. Each plate was incubated at 37°C for 1 h. The MIC values were ABPC; 2.0 µg/mL, OMAT; 10.7 µg/mL, compound **5**; 8.0 µg/mL, compound **10**; 4.0 µg/mL, compound **12**; 1.7 µg/mL and compound **14**; 2.0 µg/mL. Values were analyzed using Student's *t*-test and data were presented as the mean ± standard deviation of three separate observations (**p* <0.05 compared to the control sample).

第 3 節 小括と考察

前述の様に、*Legionella* 属細菌のアメーバ等の原虫への寄生は、その増殖のみならず、消毒薬に対する耐性獲得の点からも重要な意味をもつ。従って、*Legionella* 属細菌の宿主であるアメーバ等の原虫の除去と *Legionella* 属細菌の原虫内への取込みを抑制することは、レジオネラ症防止対策にとって有効な手段となり得る。

Oakmoss と oakmoss から単離した化合物の *A. castellanii* ATCC30234 に対する殺アメーバ活性を評価した結果、比較対照物質として用いた CHG⁷⁸⁾ と同様に、栄養体 *A. castellanii* に対して強い殺アメーバ活性を示す化合物が存在することが明らかとなった。Phenol 誘導体の 6 化合物 (化合物 6、7、8、13、15、19)、didepside 誘導体の 1 化合物 (化合物 5) 及び isochromen 誘導体の 2 化合物 (化合物 12、20) が *A. castellanii* に対して殺アメーバ活性を示し、その中で化合物 5 と 12 の IC₅₀ 値は、CHG の IC₅₀ 値と同程度の値を示した。Phenol 誘導体の化合物 4、6、8 及び 11 は、6-methylbenzoic acid を共通の構造としており、これらの化合物の殺アメーバ活性の差は、エステル基の側鎖及び 4 位のメトキシ基の存在に関係することが示唆された。化合物 4、6 及び 8 は、エステル基の側鎖の炭素数が 1 個ずつ増えており、炭素数が増えるごとに殺アメーバ活性が強くなっていることから、エステル基の側鎖の長さが殺アメーバ活性に関与していると考えられた。同様に、化合物 3、13、15 及び 19 は、methylbenzaldehyde を共通の構造としており、これらの化合物の殺アメーバ活性の差は、エステル基の側鎖又はエステル基が塩素に置換されたことが関係することが示唆された。Gomes ら^{53,80)} は、これらの化合物のエステル基の側鎖の長さによる疎水性の違いが抗菌活性と細胞毒性の強弱の差に影響することを報告しており、本研究における殺アメーバ活性の違いも、同様の作用機序によ

と思われる。Didepside 誘導体の 4 種の化合物中 3 化合物 (化合物 9、10、16) は、*A. castellanii* に対して殺アメーバ活性を示さなかった。これらの化合物の *A. castellanii* に対する活性の差は、水酸基がメトキシ基に置換された数とその位置による物理化学的性状の変化が、化合物の *A. castellanii* の細胞膜に対する相互作用に影響することにより生じると考えられた。このことは、isochromen 誘導体についても同様のことであると推察される。Oakmoss 自体は、*A. castellanii* に対して試験化合物の中で最も強い殺アメーバ活性を示した。本研究で oakmoss から単離した化合物の中で、殺アメーバ活性を示す化合物の含有量は低いことから、これらの成分の相乗的効果、もしくは強い殺アメーバ活性を有する未知の成分の存在が示唆された。

Lück ら⁷⁹⁾ は、sub-MIC 濃度の ABPC、imipenem、CPFX、erythromycin 及び rifampicin と共に *L. pneumophila* を前培養した場合、*A. castellanii* 内への *L. pneumophila* の取込みが減少することを報告している。これらの抗菌薬の中で β -lactam 系抗生物質 (ABPC 及び imipenem) は、D-alanin transpeptidase を阻害することでムレイン合成を抑制し、細胞壁外膜の構造を変化させることで、*Legionella* 属細菌の宿主細胞への接着や細胞内侵入に影響すると推察されている。Didepside 誘導体の化合物 5 は、ABPC と同程度に *A. castellanii* 内への *L. pneumophila* 取込みを抑制したが、化合物 5 は β -lactam 系抗生物質ではなく、この抑制作用機序は ABPC とは異なるものと考えられる。前述の様に、*Legionella* 属細菌の LPS は疎水性の糖より構成されており、他のグラム陰性細菌よりも外膜が疎水性となっている⁵⁹⁻⁶²⁾。このことから、化合物 5 は両親媒性の性質により 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* の宿主細胞への接着又は細胞内侵入に関与する細胞表面や外膜構造を変化させていると思われる。また、取込み抑制効果を示した化合物 5 と示さなかった化合物 10 は、構造中の水酸基の数 (化合物 5 ; 3 個、化合物 10 ;

2 個) が異なり、*A. castellanii* 内への *L. pneumophila* 取込み抑制効果には化合物の疎水性/親水性のバランスが重要であることが示唆された。*Oakmoss* 自体も強い *A. castellanii* 内への *L. pneumophila* 取込み抑制効果を示した。しかし、化合物 **5** をはじめとした取込み抑制効果を示した化合物の含有率は低いことから、本研究では単離されなかった未知の化合物による影響が示唆された。さらに、*isochromen* 誘導体の化合物 **12** と **14** は浮遊 *L. pneumophila* に対して強い殺菌効果を示したが、*A. castellanii* 内への *L. pneumophila* 取込み抑制効果は示さなかった。このことから、これらの化合物の有する抗菌作用機序は、*A. castellanii* 内への *L. pneumophila* 取込みとは関係のない部位であることが示唆された。

上記の結果より、*oakmoss* から単離した化合物の中で *didepside* 誘導体は強い殺アメーバ活性を示し、かつ *A. castellanii* 内への *L. pneumophila* の取込み抑制効果を示したことから、レジオネラ症防止対策としての消毒剤への応用に有用であることが示唆された。

総括

Legionella 属細菌は、自然環境や人工環境等の身近な環境水中に生息すると共に、これらの環境水中において biofilm の形成や自然界宿主であるアメーバ等に寄生することにより、塩素系消毒薬に対して抵抗性を示す。そのため、*Legionella* 属細菌によるレジオネラ症防止のための新規消毒薬の開発が求められている。そこで、本研究では *L. pneumophila* に対して特異的に強い抗菌活性を示す天然香料 oakmoss に着目し、oakmoss とそれから単離した化合物の浮遊 *Legionella* 属細菌に対する抗菌活性、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を評価した。

2 種類の oakmoss (OM と OMAT) を使用し、OM から phenol 誘導体 12 種、didepside 誘導体 4 種及び isochromen 誘導体 3 種と、OMAT から OM には含まれていない isochromen 誘導体 1 種の計 20 種の化合物を単離した。それらの中で、didepside 誘導体の化合物 **9** と isochromen 誘導体の化合物 **20** は、いずれも新規化合物の 3-methoxy-5-methylphenyl 2,4-dihydroxy-6-methyl benzoate と 8-(2,4-dihydroxy-6-(2-oxoheptyl)phenoxy)-6-hydroxy-3-pentyl-1*H*-isochromen-1-one であることを明らかにした。

Oakmoss と oakmoss から単離した 20 種の化合物は、臨床又は環境分離株の *L. pneumophila* 3 菌株とその他の *Legionella* 属細菌 4 菌種の浮遊状態の菌体に対して特異的に高い抗菌活性を示すことを明らかにした。また、*Legionella* 属細菌に対して高い抗菌活性を有する oakmoss の抗菌作用は静菌的であったが、一方で新規化合物 **9** と **20** の抗菌作用は殺菌的であることを示した。

Oakmoss と oakmoss から単離した 20 種の化合物の中には、*L. pneumophila*

の biofilm 形成を抑制する 3 種の didepside 誘導体 (化合物 9、10、16) と 6 種の phenol 誘導体 (化合物 2、4、6、7、8、11) が含まれることを見出した。また、biofilm 内 *L. pneumophila* に対しては、3 種の didepside 誘導体 (化合物 5、9、10) と 1 種の isochromen 誘導体 (化合物 12) が強い抗菌活性を示し、この活性は既存の消毒薬である CHG と同程度の活性であることを明らかにした。

さらに、*Legionella* 属細菌の自然環境水又は人工環境水中での増殖抑制を目的として、*Legionella* 属細菌の宿主である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。その結果、6 種の phenol 誘導体 (化合物 6、7、8、13、15、19)、1 種の didepside 誘導体 (化合物 5) 及び 2 種の isochromen 誘導体 (化合物 12、20) が *A. castellanii* に対して殺アメーバ活性を示し、特に化合物 5 と 12 の活性は CHG と同程度の殺アメーバ活性を示すことを明らかにした。さらに、oakmoss、2 種の didepside 誘導体 (化合物 5、10) 及び 1 種の isochromen 誘導体 (化合物 12) は *L. pneumophila* の *A. castellanii* 内への取込み抑制効果も示すことを明らかにした。

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多くの生活環を阻害することを明らかにし、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。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました城西大学薬学部病原微生物学講座 近藤誠一 教授に謹んで御礼申し上げます。

また、数々の有益かつ適切な御助言、御指導を賜りました城西大学薬学部病原微生物学講座 一色恭徳 准教授に心より感謝致します。

Oakmoss をはじめ貴重な香料試料を御分与下さいました小川香料株式会社 フレグランス事業本部兼フレグランス研究開発部 作田圭亮 氏ならびに同機能研究所 佐久間克也 氏に心より感謝致します。

本学位論文の作成にあたり、御閲覧と御教示を賜りました主査 城西大学薬学部薬物療法学講座 津田整 教授、副査 生物有機化学講座 杉田義昭 教授ならびに副査 医薬品化学講座 坂本武史 教授に深く感謝致します。

最後に、実験遂行に際して終始御協力頂いた城西大学薬学部病原微生物学教室の諸氏に感謝すると共に、NMR スペクトル及び EI-MS 解析の労をとられました城西大学実験センターの諸氏に深く感謝致します。

実験の部

第 1 章 実験の部

1. 使用菌株

本研究には、*Legionella* 属細菌 7 菌種とその他の細菌 4 菌種を用いた。*Legionella* 属細菌は、*L. pneumophila* JCM7571 (Philadelphia 1、SG 1)、*L. pneumophila* GTC00748 (SG 6)、*L. pneumophila* JBCC005 (environmental isolate)、*L. bozemanii* GTC09140、*L. dumoffii* IID3047、*L. longbeachae* IID3046 及び *L. micdadei* IID3044 を用いた。その他の細菌は、代表的なグラム陽性細菌として *Bacillus subtilis* NBRC3134 と *Staphylococcus aureus* JCM2413、グラム陰性細菌として *Escherichia coli* JCM5491 と *Pseudomonas aeruginosa* JCM6119 を用いた。*L. pneumophila* JCM7571、*S. aureus* JCM2413、*E. coli* JCM5491 及び *P. aeruginosa* JCM6119 は、理化学研究所バイオリソースセンターより購入した。*L. pneumophila* GTC00748 と *L. bozemanii* GTC09140 は、岐阜大学医学部病原微生物遺伝資源センターより購入した。*L. dumoffii* IID3047、*L. longbeachae* IID3046 及び *L. micdadei* IID3044 は、東京大学医科学研究所感染症国際研究センターより購入した。*L. pneumophila* JBCC005 は、東京医科歯科大学医学部 岡村登 博士より分譲して頂いた。*B. subtilis* NBRC3134 は、発酵研究所より購入した。

2. 培地と培養条件

Legionella 属細菌は、Buffered Charcoal Yeast Extract Agar supplemented with α -ketoglutarate containing L-cysteine (BCYE- α 寒天培地、pH 6.85、Becton Dickinson and Company、MJ、USA) を用いて、37°C、72 時間培養したものを用いた。試験用の液体培地として、BCYE- α 寒天培地より活性炭と寒天を除いた BYE- α 液体培地 (pH 6.85) を使用した。BCYE- α 寒天培地と BYE- α 液体培地の組成を Table 8 に示した。

その他の細菌は、Trypticase Soy Agar 培地 (TSA 培地、BD) を用い、37°C、24 時間培養したものを試験に用いた。試験用の液体培地として、Meuller Hinton II Broth cation adjusted 培地 (MHB、BD) を用いた。

Table 8 Compositions of BCYE- α agar and BYE- α broth

	BCYE- α agar	BYE- α broth
Yeast extract	1.0%	1.0%
ACES	1.0%	1.0%
Charcoal	0.15%	–
Iron(III) diphosphate, soluble	0.025%	0.025%
α -Ketoglutarate potassium salt	0.1%	0.1%
L-Cysteine hydrochloride	0.04%	0.04%
Agar	1.7%	–

3. 使用香料と抗菌物質

天然及び合成香料として、小川香料株式会社より分与された Absolute Mousse De Chene Selecta (OM、Charabot、France)、Oakmoss Absolute AT 086 (OMAT、H. Reynaud & Fils、France) 及び cinnamic aldehyde を用いた。比較対照物質として、chlorhexidine gluconate (CHG、Wako、Osaka、Japan)、ampicillin (ABPC、Wako) 及び clarithromycin (CAM、Wako) を用いた。香料と oakmoss から単離した化合物は、dimethylsulfoxide (DMSO、Wako) で適宜溶解して用いた。

4. Oakmoss に含まれる抗菌活性成分の単離精製

OM (2.24 g) は、ゲルろ過クロマトグラフィーにより粗分画した。Sephadex LH-20 (GE Healthcare Japan、Tokyo、Japan) を充填した 30 × 500 mm のカラムを用い、溶出溶媒； acetonitrile : methanol = 10 : 1、流速； 2 mL/min、分画方法； 10 mL/5 min/tube の条件で分画した。その後、各試験管の 280 nm における吸

光度 (SPD-2A, Shimadzu, Kyoto, Japan) を測定し、1~7 の画分に分画した (Fig. 13)。粗分画した各画分の収量を Table 9 に示した。

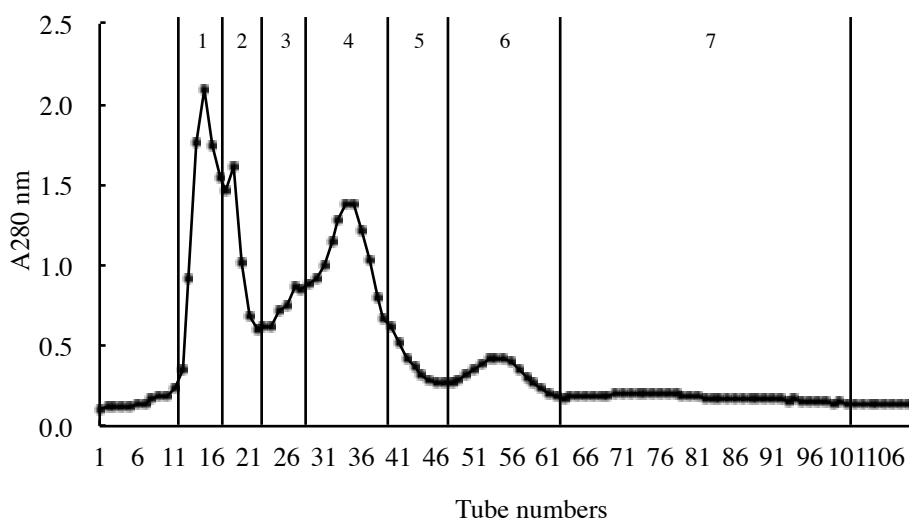


Fig. 13 Gel filtration chromatographic profiles of OM.

Table 9 Yield of fraction separated from OM by Gel filtration chromatography

Fraction numbers	Tube numbers	Weight (mg)
1	12 ~ 17	514.4
2	18 ~ 22	315.6
3	23 ~ 29	218.4
4	30 ~ 39	259.8
5	40 ~ 47	72.9
6	48 ~ 63	311.4
7	64 ~ 101	116.5

各画分は、固層抽出カートリッジである Sep-pak octadecylsilica (ODS) cartridge (0.5 g, classic, Waters Corporation, MA, USA) 又は Bond Elut phenyl cartridge (0.5 g, Agilent Inc., CA, USA) を用いて粗精製を行った。固層抽出カートリッジの溶出溶媒として、20、40、60、80 及び 100% methanol を用いた。最終的に、HPLC を用いて精製を行った。HPLC は、LC-6A HPLC system

(Shimadzu) を用い、カラム ; Capcell Pak C18 MG II (10 × 250 mm、Shiseido、Tokyo、Japan)、溶出溶媒 ; acetonitrile/water、流速 ; 4 mL/min、検出 ; 280 nm の条件を用いた。

画分 1 は、Sep-pak ODS cartridge を用い、20、40、60、80 及び 100% methanol により再度分画した。20% と 40% methanol 溶出画分の 25% acetonitrile 条件下での HPLC を用いた精製により、化合物 **2** を得た。また、60%、80% 及び 100% methanol 溶出画分より、60% acetonitrile 条件下での HPLC を用いた精製により、化合物 **11**、**14**、**15** 及び **16** を得た。

画分 2 は、Bond Elut Phenyl cartridge を用い、20、40、60、80 及び 100% methanol により再度分画した。20% methanol 溶出画分の 35% acetonitrile 条件下での HPLC を用いた精製により、化合物 **3**、**6** 及び **7** を得た。また、40% methanol 溶出画分の 45% acetonitrile 条件下での HPLC を用いた精製により、化合物 **6**、**7** 及び **8** を得た。さらに、60% と 80% methanol 溶出画分の 65% acetonitrile 条件下での HPLC を用いた精製により、化合物 **10**、**11**、**13**、**15** 及び **17** を得た。

画分 3 は、Sep-pak ODS cartridge を用い、20、40、60、80 及び 100% methanol により再度分画した。20% と 40% methanol 溶出画分の 38% acetonitrile 条件下での HPLC を用いた精製により、化合物 **2**、**3**、**6** 及び **7** を得た。また、60% と 80% methanol 溶出画分からは 45% acetonitrile 条件下での HPLC を用いた精製により、化合物 **6**、**7**、**8** 及び **9** を得た。

画分 4、5 及び 7 は、それぞれ 35% acetonitrile/35 min 後に 65% acetonitrile/15 min (画分 4)、35% acetonitrile/35 min 後に 75% acetonitrile/25 min (画分 5) 及び 50% acetonitrile/15 min 後に 80% acetonitrile/15 min (画分 7) の条件下での HPLC を用いた精製により、化合物 **1**、**2**、**3**、**4**、**5**、**6**、**7**、**8**、**9**、**12**、**14**、**17**、**18** 及び **19** を得た。

画分 6 からは、70% acetonitrile 条件下での HPLC を用いた精製により、化合物 **1** と **14** を得た。

OMAT (210 g) は、シリカゲルクロマトグラフィーにより粗分画した。OMAT (30 g) を、Silica Gel 60 (Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan) を充填した 47 × 360 mm のカラムを用い、溶出溶媒; hexane : ethyl acetate = 10 : 1、chloroform : methanol = 100 : 0、10 : 1 及び 0 : 100 (各 3000 mL) の条件で分画した。上記の条件による分画を 7 回 行った。OM には検出されなかった化合物を含むことが予想された chloroform : methanol = 10 : 1 画分 (87 g) を再度シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画した。Chloroform : methanol = 10 : 1 溶出画分 (12 g) を、Silica Gel 60 を充填した 57 × 350 mm のカラムを用い、溶出溶媒 ; chloroform : ethanol = 50 : 1、25 : 1 及び 0 : 100 (各 3500 mL) の条件下で分画した。上記の条件による分画を 7 回 行った。その中で、chloroform : ethanol = 25 : 1 溶出画分 (23.7 g) を 60% acetonitrile 条件下での HPLC を用いて精製し、化合物 **20** を得た。

5. 理化学的性状と構造解析

単離した化合物の分子量は、EI-MS を用いて測定した。EI-MS の測定には、JMS-700 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) を用いた。UV スペクトルの測定には V-530 UV/VIS (Jasco Co., Tokyo, Japan) 及び RI スペクトルの測定には FTIR-410 (Jasco Co.) を用いた。UV スペクトルの測定は、試料を acetonitrile に溶解させて行った。IR スペクトルの測定には、KBr を用いた。また、NMR スペクトル測定には、JEOL α -500 (JEOL Ltd.) 又は Varian NMR System 400 (Varian Technologies, CA, USA) を用いた。化合物は、acetone- d_6 、chloroform- d_1 又は methanol- d_4 を用いて溶解した。

6. 試験菌懸濁液の調製

最小発育阻止濃度 (Minimum inhibitory concentration、MIC) と最小殺菌濃度 (Minimum bactericidal concentration、MBC) の測定及び Time-kill assay には、いずれも下記により調製した試験菌懸濁液を原液とし、その原液を液体培地で適宜希釈して用いた。*Legionella* 属細菌は BCYE- α 寒天培地で培養した後、培地上に直接 4 mL の滅菌生理食塩水を加え、コマゴメピペットで菌体を回収した。その後、滅菌試験管に菌液を移し、攪拌して均一な懸濁液とした。その他の細菌は、TSA 斜面培地で培養した後、直接 4 mL の滅菌生理食塩水を加え、コマゴメピペットで菌体を回収した。*Legionella* 属細菌とその他の細菌の菌体回収液を 600 nm における吸光度が 0.1 ($OD_{600\text{ nm}} = 0.1$) となるように滅菌生理食塩水で希釈し、それを試験菌懸濁原液とした。各細菌懸濁原液の濃度 (colony forming unit (CFU)/mL を Table 10 に示した。

Table 10 Concentrations of bacterial suspensions adjusted of $OD_{600\text{ nm}} = 0.1$

Bacterial name	Concentration (CFU/mL)
<i>Legionella</i> spp.	
<i>L. pneumophila</i> JCM7571	} 1.7×10^8
<i>L. pneumophila</i> GTC00748	
<i>L. pneumophila</i> JBCC005	
<i>L. bozemanii</i> GTC09140	
<i>L. dumoffii</i> IID3047	
<i>L. longbeachae</i> IID3046	
<i>L. micdadei</i> IID3044	
Other bacteria	
<i>B. subtilis</i> NBRC3134	5.4×10^7
<i>S. aureus</i> JCM2413	6.3×10^7
<i>E. coli</i> JCM5491	1.5×10^8
<i>P. aeruginosa</i> JCM6119	2.1×10^8

7. *Legionella* 属細菌とその他の細菌に対する抗菌活性評価

MIC の測定は、CLSI 基準法⁸¹⁾の微量液体希釈法に基づく武田らの変法³⁸⁾に準じて行った。しかし、*Legionella* 属細菌は試験香料の分散剤として用いられる Tween 80 に対して感受性を示すことから⁸²⁾、Tween 80 を使用することなく香料と化合物の希釈を行った。試験化合物は、BYE- α 液体培地又は MHB 培地で希釈して溶解液とし、512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 2 倍希釈列を作成した。試験菌懸濁液は、試験菌懸濁原液を濃度が 6.0×10^5 CFU/mL となる様に BYE- α 液体培地又は MHB 培地で希釈して調製した。それぞれの試験化合物の希釈液 50 μL と試験菌懸濁液 50 μL を 96 穴マイクロプレート (Sumitomo Bakelite Co., Ltd., Tokyo, Japan) の各ウェルに分注した後、プレートシール (Sanko Junyaku Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて各ウェルを密閉した。攪拌・混合後、37°C、48 時間 (*Legionella* 属細菌) 又は 20 時間 (その他の細菌) 培養した。試験化合物の MIC は CLSI 基準法⁸¹⁾に基づき、培養後に増殖して沈降又は浮遊する菌体の有無を目視で観察した。MBC の測定は、MIC 判定後に 96 穴マイクロプレートから BCYE- α 寒天培地又は TSA 培地上に試験液を 5 μL スポットし、37°C、72 時間又は 24 時間培養した後、増殖の有無を観察した。試験は、同一試験を 3 回繰り返して行い、その平均値を求めた。

8. Time-kill assay

Oakmoss と oakmoss から単離した化合物の *L. pneumophila* JCM7571 に対する経時的抗菌効果は、time-kill assay により評価した。Time-kill assay は、CLSI 基準法⁸³⁾に基づく Baltch ら⁸⁴⁾の方法に準じて行った。試験菌懸濁液は、試験菌懸濁原液を最終濃度が 3.0×10^5 CFU/mL となる様に BYE- α 液体培地 30 mL で希釈して調製した。試験菌懸濁液をロータリーシェーカー (NR-3、TITEC、Saitama, Japan) で振盪下 (150 rpm)、37°C、12 時間前培養した後、試験化合物

を $1 \times \text{MIC}$ と $2 \times \text{MIC}$ の濃度となるように添加した後、再び 37°C で攪拌 (150 rpm) した。試験化合物を添加する直前 (0 時間) と、添加後 1 、 3 、 6 、 12 、 24 及び 48 時間後に培養液を採取し、試験原液とした。試験原液は、直接又は Buffered saline supplemented with 0.01% gelatin (BSG) によって適宜希釈した後、希釈液 $100 \mu\text{L}$ を 3 枚の BCYE- α 寒天培地上に塗布し、 37°C 、 72 時間培養した。培養後、形成されたコロニー数を計測し、試験原液中の *L. pneumophila* の濃度 (CFU/mL) を算出した。試験は、同一試験を 3 回繰り返して行い、合計 9 枚の BCYE- α 寒天培地から得られた結果について、平均値 \pm 標準偏差 (Mean \pm S.D.) を算出した。

第 2 章 実験の部

1. 使用菌株

L. pneumophila の biofilm 形成に対する影響と biofilm 内 *L. pneumophila* に対する抗菌活性評価には、*L. pneumophila* JCM7571 (Philadelphia 1、SG1) を用いた。

2. 培地と培養条件

第 1 章 実験の部 2. に示した方法に従った。

3. 使用香料と抗菌物質

香料は、第 1 章 実験の部 3. に示した oakmoss と cinnamic aldehyde を用いた。また、試験には oakmoss より単離した 20 種の化合物を用いた。比較対照物質として、CAM と CHG を用いた。

4. 試験菌懸濁液の調製

Biofilm 形成に対する影響と biofilm 内 *L. pneumophila* に対する抗菌活性評価には、いずれも下記により調製した試験菌懸濁液を用いた。*Legionella* 属細菌は BCYE- α 寒天培地で培養した後、培地上に直接 4 mL の滅菌生理食塩水を加え、コマゴメピペットで菌体を回収した。その後、滅菌試験管に菌液を移し、攪拌して均一な懸濁液とした。*Legionella* 属細菌の菌体回収液を $OD_{600\text{ nm}} = 0.1$ となるように滅菌生理食塩水で希釈した。

5. *L. pneumophila* の biofilm 形成に対する影響評価

Oakmoss と oakmoss から単離した化合物の *L. pneumophila* JCM7571 の

biofilm 形成に対する影響を評価した。試験菌懸濁液は、試験菌懸濁原液を最終濃度が 3.0×10^5 CFU/mL となる様に BYE- α 液体培地 15 mL で調製した。試験菌懸濁液は、ロータリーシェーカーで振盪下 (150 rpm)、37°C、72 時間前培養した後、 2.0×10^3 CFU/mL となる様に BYE- α 液体培地で希釈した。試験菌懸濁液と *L. pneumophila* に対して $1 \times \text{MIC} \sim 0.125 \times \text{MIC}$ の濃度となるように希釈した試験化合物を 96 穴マイクロプレートに 50 μL ずつ分注し (最終濃度 ; $0.5 \sim 0.0625 \times \text{MIC}$)、37°C、96 時間培養した。培養後、培養液を吸引除去し、マイクロプレートを BYE- α 液体培地で 2 回洗浄した。その後、1% crystal violet 溶液を 100 μL ずつ分注し、室温で 15 分間 biofilm を染色した。余分な crystal violet を除去し、蒸留水で 3 回洗浄した後、33% 酢酸を 200 μL ずつ分注し、室温で 10 分間攪拌しながら crystal violet を溶解した。遠心分離 (3220 $\times g$ 、25°C、5 分) 後、新しい 96 穴マイクロプレートに crystal violet 溶解液を 125 μL ずつ移し、マイクロプレートリーダー (Model 550、Bio-Rad Laboratories、CA、USA) を用いて 570 nm ($A_{570 \text{ nm}}$) における吸光度を測定した。Blank として、*L. pneumophila* を添加していない培地のみのもを同様の方法で染色して用いた。Biofilm 形成率 (%) は、下記の計算式により算出した。

Biofilm formation (%)

$$= \frac{A_{570 \text{ nm}} \text{ of sample-treated wells} - A_{570 \text{ nm}} \text{ of blank}}{A_{570 \text{ nm}} \text{ of 0.5\% DMSO-treated wells} - A_{570 \text{ nm}} \text{ of blank}} \times 100$$

試験化合物の 1 つの濃度について 6 ウェルを用い、同一試験を 3 回繰り返して行い、平均値 \pm 標準偏差 (Mean \pm S.D.) を算出した。さらに、Student's *t*-test を用いて *p* 値を求め、有意差を評価した。

6. Biofilm 内 *L. pneumophila* に対する抗菌活性評価

Oakmoss と oakmoss から単離した化合物の biofilm 内 *L. pneumophila*

JCM7571 に対する抗菌活性は以下の方法によって評価した。試験菌懸濁液は、試験菌懸濁原液を最終濃度が 3.0×10^5 CFU/mL となる様に BYE- α 液体培地 15 mL で希釈して調製した。試験菌懸濁液は、ロータリーシェーカー (NR-3、TITEC) で振盪下 (150 rpm)、37°C、72 時間前培養した後、 1.0×10^3 CFU/mL となる様に BYE- α 液体培地で調製した。試験菌懸濁液を 96 穴マイクロプレートに 100 μ L ずつ分注し、37°C、96 時間培養した。培地の除去及び BYE- α 液体培地で 2 回洗浄後、BYE- α 液体培地で試験化合物の 2 倍希釈列 (256 μ g/mL ~ 各試験化合物の MIC) を作成し、biofilm を形成させた 96 穴マイクロプレートに 100 μ L ずつ分注し、37°C で 1、24 及び 48 時間培養した。培養後、培養液を除去して BYE- α 液体培地で 2 回洗浄し、PBS を 100 μ L ずつ分注して激しく攪拌することで biofilm を破壊した。Biofilm 及び菌体を含む懸濁液を BCYE- α 寒天培地に 5 μ L ずつスポットし、37°C、48 時間培養した後、増殖の有無を確認した。同一試験は、3 回繰り返して行った。

第 3 章 実験の部

1. 使用菌株とアメーバ

試験菌株として、*L. pneumophila* JCM7571 (Philadelphia 1、SG 1) を用いた。
L. pneumophila の宿主アメーバとしては、American Type Culture Collection より購入した *Acanthamoeba castellanii* ATCC30234 を用いた。

2. 培地と培養条件

-80°C で凍結保存された *A. castellanii* は、解凍後、Peptone Yeast Glucose (PYG 培地、pH 6.5) を用いて、25°C、10 日間培養した。各種試験に用いる *A. castellanii* は、PYG 培地で 25°C、4 日間培養後、*Acanthamoeba* buffer (Ac buffer、pH 6.5) を用いて懸濁液を作成した。PYG 培地及び Ac buffer の組成を Table 11 に示した。

Table 11 Compositions of PYG medium and Ac buffer

	PYG medium	Ac buffer
Proteose peptone No. 3	2.0%	–
Yeast extract	0.1%	–
Glucose	1.8%	1.8%
Sodium citrate · 2H ₂ O	0.1%	0.1%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	4.0 mM	4.0 mM
CaCl ₂	0.5 mM	0.5 mM
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6H ₂ O	0.05 mM	0.05 mM
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	2.5 mM	2.5 mM
KH ₂ PO ₄	2.5 mM	2.5 mM

3. 使用香料と抗菌物質

香料は、第 1 章 実験の部 3. に示した oakmoss と cinnamic aldehyde を用

いた。また、抗菌物質として oakmoss より単離した 20 種の化合物を用いた。比較対照物質として、ABPC と CHG を用いた。

4. *L. pneumophila* と *A. castellanii* の懸濁液の調製

L. pneumophila のアメーバ内への取込みに対する影響評価においては、菌体回収液を $OD_{600\text{ nm}}=0.4$ となるように滅菌生理食塩水で希釈したものをを用いた。

A. castellanii は、PYG 培地で培養後、遠心分離 (250 × g、25°C、5 分) し、Ac buffer で 3 回洗浄した。Ac buffer に再懸濁後、一部を 0.4 %(w/v) trypan blue 溶液 (Wako) で染色し、ノイヴァウエル改良型血球計算盤 (C-Chip、Digital Bio、Korea) を用いて、栄養体アメーバ数を計測した。栄養体アメーバ濃度を算出した後、後述の各試験のアメーバ濃度となるように、Ac buffer で適宜希釈した。

5. *A. castellanii* に対する殺アメーバ活性評価

Oakmoss と oakmoss から単離した化合物の *A. castellanii* に対する殺アメーバ活性を評価した。Oakmoss を含む試験化合物は、100 mg/mL の濃度となるように DMSO に溶解した。CHG 及び ABPC は、滅菌蒸留水に溶解した。これらの試験化合物は、200、20 及び 2 µg/mL となるように Ac buffer で希釈した。DMSO は、アメーバの生育及び形態に影響を示さない濃度 (最終濃度 ; 0.1%) で用いた。殺アメーバ活性は、McBride ら⁸⁵⁾と Martin-Novarro ら⁸⁶⁾の方法を参考に、amarBlue 法を用いて評価した。*A. castellanii* 懸濁液 (4×10^6 cells/mL) 50 µL を 96 穴マイクロプレート (Greiner Bio-One Co. Ltd、Frickenhausen、Germany) に分注後、37°C で 3 時間培養し、アメーバをプレートの底に付着させた。その後、Ac buffer で希釈した試験化合物を 50 µL ずつ添加し、37°C で 24 又は 48 時間培養した。培養終了 6 時間前に amarBlue[®]

reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を 10 μ L/well ずつ添加し、遮光条件下で再度 37°C で 6 時間培養した。培養後、蛍光プレートリーダー (SpectraMax M5, Molecular Devices Japan, Tokyo, Japan) を用い、励起波長 560 nm/蛍光波長 590 nm で還元された alamarBlue 量を蛍光強度として測定した。各試験化合物の殺アメーバ活性は、50% 生育阻害濃度 (IC₅₀ 値) として評価した。また、試験は同一試験を 3 回繰り返して行い、平均値 \pm 標準偏差 (Mean \pm S.D.) を算出した。

6. *A. castellanii* 内への *L. pneumophila* の取込みに対する影響評価

Oakmoss と oakmoss から単離した化合物の *L. pneumophila* の *A. castellanii* 内への取込みに対する影響を評価した。評価方法は、Lück ら⁷⁹⁾と Moffat ら⁸⁷⁾の方法を参考にして新たに確立し、A) 予め *L. pneumophila* を試験化合物で処理する方法、B) *L. pneumophila* と *A. castellanii* の共培養時に試験化合物を処理する方法、C) 予め *A. castellanii* に試験化合物を処理する方法、の 3 つの方法を用いて評価した。

A) *L. pneumophila* の各試験化合物による前処理は以下の様に行った。最終濃度が 0.25 \times MIC となるように ABPC、OMAT、化合物 **5**、**10**、**12** 及び **14** を添加した BYE- α 液体培地 15 mL で *L. pneumophila* 懸濁原液を 3 \times 10⁶ CFU/mL の濃度となるように希釈し、ロータリーシェーカー (NR-3、TITEC) で振盪下 (150 rpm)、37°C、24 時間培養した。その後、3220 \times g で 5 分間遠心分離して回収した菌体を滅菌生理食塩水で 1 \times 10⁷ cells/mL に調製したものを試験菌懸濁液とした。一方、*A. castellanii* 懸濁液 (1 \times 10⁵ cells/mL) は、100 μ L ずつ 96 穴マイクロプレート (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) に分注後、37°C で 1 時間培養し、アメーバをプレートの底に付着させた。このマイクロプレートの各ウェルに前述の様に調製した *L. pneumophila* 懸濁液を 10 μ L ずつ添加し

た (multiplicity of infection (MOI) of 10)。

B) *L. pneumophila* は、 3×10^6 CFU/mL の濃度になる様に BYE- α 液体培地 15 mL で希釈し、ロータリーシェーカー (NR-3、TITEC) で振盪下 (150 rpm)、37°C、24 時間培養した。その後、 $3220 \times g$ で 5 分間遠心分離して回収した菌体を滅菌生理食塩水で 1×10^7 cells/mL に調製したものを試験菌懸濁液とした。一方、*A. castellanii* は 2.0×10^5 cells/mL となる様に Ac buffer で希釈し、*A. castellanii* 懸濁液とした。*A. castellanii* 懸濁液 50 μ L を 96 穴マイクロプレートに分注後、37°C で 1 時間培養し、アメーバをプレートの底に付着させた。このマイクロプレートの各ウェルに、上記の *L. pneumophila* 懸濁液を 10 μ L ずつ添加し、さらに最終濃度が $0.25 \times \text{MIC}$ となるように Ac buffer で希釈した ABPC、OMAT、化合物 **5**、**10**、**12** 及び **14** を 40 μ L ずつ添加した (MOI 10)。

C) *A. castellanii* の各試験化合物による前処理は以下の様に行った。*A. castellanii* を最終濃度が $0.1 \times \text{MIC}$ の ABPC、OMAT、化合物 **5**、**10**、**12** 及び **14** を含む PYG 培地で 25°C で 4 日間培養し、 $250 \times g$ で 5 分間分離遠心して *A. castellanii* を回収した。回収した *A. castellanii* は、Ac buffer で 1×10^5 cells/mL の濃度になるように希釈した後、96 穴マイクロプレートに 100 μ L ずつ分注し、37°C で 1 時間培養してアメーバをプレートの底に付着させた。このマイクロプレートの各ウェルに B) と同様に調製した *L. pneumophila* 懸濁液を 10 μ L ずつ添加した(MOI 10)。

A)~C) で調製した全てのプレートは、 $250 \times g$ で 20 分間遠心加圧することで *L. pneumophila* と *A. castellanii* を接触させた後、37°C で 1 時間培養して *A. castellanii* に *L. pneumophila* を細胞内に取込ませた。取込み終了後、*A. castellanii* は Ac buffer で 3 回洗浄し、gentamicin 100 μ g/mL 含有 Ac buffer を 100 μ L ずつ分注し、37°C で 1 時間培養することで細胞外菌体を除去した。再度、Ac buffer で 3 回洗浄した後、0.04% TritonX-100 含有 Ac buffer を 100

μL ずつ分注し、室温で 10 分間攪拌して *A. castellanii* を破壊した。*A. castellanii* 破壊液は、BSG で適宜希釈して BCYE- α 寒天培地に塗布し、37°C で 72 時間培養した後、形成されたコロニー数を計測し、*A. castellanii* 内の *L. pneumophila* の濃度 (CFU/mL) を算出した。全ての試験は、1 つの濃度について 3 ウェルずつ使用し、同一試験を 3 回繰り返して行った。*A. castellanii* 内 *L. pneumophila* の濃度は、平均値 \pm 標準偏差 (Mean \pm S.D.) を算出し、Student's *t*-test で有意差を解析した。

参考文献

1. Diederer BMW., *Legionella* spp. and Legionnaires' disease, *J. Infect.*, **56**; 1–12 (2008).
2. 国立感染症研究所感染症研究センター, 感染症発生動向調査 [IDWR], (<http://www.nih.go.jp/niid/ja/idwr-dl.html>).
3. World Health Organization, *Legionella* and the prevention of legionellosis, ISBN 92 4 156297 8 (2007).
4. Gomez-Valero L., Rusniok C. and Buchrieser C., *Legionella pneumophila*: Population genetics, phylogeny and genomics, *Infect. Genet. Evol.*, **9**; 727–739 (2009).
5. Joseph CA., Legionnaires' disease in Europe 2000-2002, *Epidemiol. Infect.*, **132**; 417–424 (2004).
6. Amemura-Maekawa J., Kura F., Helbig JH., Chang B., Kaneko A., Watanabe Y., Isobe J., Nukina M., Nakajima H., Kawano K., Toda Y., Watanabe H. and the Working Group for *Legionella* in Japan, Characterization of *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan according to serogroups, monoclonal antibody subgroups and sequence type, *J. Med. Microbiol.*, **59**; 653–659 (2010).
7. Yu VL., Plouffe JF., Pastoris CP., Stout JE., Schousboe M., Widmer A., Heath CM., Paterson DL. and Cheresky A., Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey, *J. Infect. Dis.*, **186**; 127–128 (2002).
8. 鈴木 敦子, 市瀬 正之, 松江 隆之, 天野 祐次, 寺山 武, 泉山 信司, 遠藤 卓郎, 各種生活環境水からのレジオネラ属菌検出状況—1996 年 4 月から

- 2000年11月まで一, *感染症学雑誌*, **76**; 703–710 (2002).
9. 古畑 勝則, 原 元宣, 古田 真一, 福山 正文, 温泉水からのレジオネラ属菌の分離状況, *感染症学雑誌*, **78**; 710–716 (2004).
 10. 烏谷 竜哉, 黒木 俊郎, 大谷 勝実, 山口 誠一, 佐々木 美江, 齋藤 志保子, 藤田 雅弘, 杉山 寛治, 中島 洋, 村上 光一, 田栗 利紹, 蔵元 勉, 倉 文明, 八木田 健司, 泉山 信司, 前川 純子, 山崎 利雄, 縣 邦雄, 井上 博雄, 掛け流し式温泉におけるレジオネラ属菌汚染とリスク因子, *感染症学雑誌*, **83**; 36–44 (2008).
 11. 藪内 英子, 縣 邦雄, 日向市の新設温泉施設を感染源とするレジオネラ症集団発生, *感染症学雑誌*, **78**; 90–98 (2003).
 12. 国立感染症研究所感染症研究センター, 病原微生物検出情報 [IASR], **34**; 155–186 (2013).
 13. 財団法人ビル管理教育センター, レジオネラ症防止指針第3版, 2009年3月.
 14. Rowbotham TJ., Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae, *J. Clin. Pathol.*, **33**; 1179–1183 (1980).
 15. Declerck P., Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*, *Environ. Microbiol.*, **12**; 557–566 (2010).
 16. Murga R., Forster TS., Brown E., Pruckier JM., Fields BS. and Donlan RM., Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system, *Microbiol.*, **147**; 3121–3126 (2001).
 17. Lau HY. and Ashbolt NJ., The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water, *J. Appl. Microbiol.*, **107**; 368–378 (2009).

18. Wingender J. and Flemming HC., Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens, *Int. J. Hyg. Environ. Health.*, **214**; 417–423 (2011).
19. Cooper IR. and Hanlon GW., Resistance of *Legionella pneumophila* serotype 1 biofilms to chlorine-based disinfection, *J. Hosp. Infect.*, **74**; 152–159 (2010).
20. Kim BR., Anderson JE., Mueller Sa., Gaines WA. and Kendal AM., Literature review—efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water system, *Water Res.*, **36**; 4433–4444 (2002).
21. Bitar DM., Molmeret M. and Kwaik YA., Molecular and cell biology of *Legionella pneumophila*, *Int. J. Med. Microbiol.*, **293**; 519–527 (2004).
22. Molmeret M., Bitar DM., Han L. and Kwaik YA., Cell biology of the intracellular infection by *Legionella pneumophila*, *Microbes Infect.*, **6**; 129–139 (2004).
23. 八木田 健司, 泉山 信司, レジオネラ属菌とアメーバ, *Bokin Bobai*, **38**; 167–179 (2010).
24. Hoffmann C., Harrison CF. and Hilbi H., The natural alternative: protozoa as cellular models for *Legionella pneumophila*, *Cell Microbiol.*, **16**; 15–26 (2014).
25. Fields BS., Sanden GN., Barbaree JM., Morrill WE., Wadowsky RM., White EH. and Feeley JC., Intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in amoebae isolated from hospital hot water tanks, *Curr. Microbiol.*, **18**; 131–137 (1989).
26. Wadowsky RM., Butler LJ., Cook MK., Verma SM., Paul MA., Fields BS., Keketi G., Sykora JL. and Yee RB., Growth-supporting activity for *Legionella pneumophila* in tap water cultures and implication of *Hartmannellid* amoebae as growth factors, *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**; 2677–2682 (1988).
27. Wadowsky RM., Wilson TM., Kapp NJ., West AJ., Kuchta JM., States SJ., Dowling JN. and Yee RB., Multiplication of *Legionella* spp. in tap water

- containing *Hartmannella vermiformis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**; 1950–1955 (1991).
28. 黒木 俊郎, 佐多 辰, 山井 志朗, 八木田 健司, 勝部 泰次, 遠藤 卓郎, 循環式浴槽における自由生活アメーバと *Legionella* 属菌の生息状況, *感染症学雑誌*, **72**; 1056–1063 (1998).
 29. Yamamoto H., Sugiura M., Kusunoki S., Ezaki T., Ikedo M. and Yabuuchi E., Factors stimulating propagation of *Legionella* in cooling tower water, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**; 1394–1397 (1992).
 30. Garcia MT., Jones S., Pelaz C., Millar RD. and Kwaik YA., *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection, *Environ. Microbiol.*, **9**; 1267–1277 (2007).
 31. Barker J., Scaife H. and Brown MRW., Interphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**; 2694–2688 (1995).
 32. Koller J., Baumer U., Kaup Y., Schmid M. and Weser U., Analysis of a pharaonic embalming tar, *Nature*, **425**; 75–80 (2005).
 33. Kalemba D. and Kunicka A., Antibacterial and antifungal properties of essential oils, *Curr. Med. Chem.*, **10**; 813–829 (2003).
 34. Ravishankar S., Jaroni D., Zhu L., Olsen C., McHugh T. and Friedman M., Inactivation of *Listeria monocytogenes* on ham and bologna using pectin-based apple, carrot, and hibiscus edible films containing carvacrol and cinnamaldehyde, *J. Food. Sci.*, **77**; M377–M382 (2012).
 35. Morita Y., Matumura E., Okabe T., Fukui T., Shibata M., Sugiura M., Tsujido H., Ohe T., Ishida N. and Inamori Y., Biological activity of α -thujaplicin, the isomer of hinokitiol, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**; 899–902 (2004).

36. Morita Y., Matumura E., Okabe T., Fukui T., Ohe T., Ishida N. and Inamori Y., Biological activity of β -dolabrin, γ -thujaplicin, and 4-acetyltropolone, hinokitiol-related compounds, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**; 1666–1669 (2004).
37. May J., Chan CH., King A., Williams L. and French GL., Time-kill studies of tea tree oil on clinical isolates, *J. Antimicrob. Chemother.*, **45**; 639–643 (2000).
38. Takeda Y., Isshiki Y., Sakuda K., Sakuma K. and Kondo S., Improved methods for estimation of antimicrobial activities of volatile and hydrophobic fragrance ingredients, *J. Jpn. Cosmet. Sci. Soc.*, **32**; 10–17 (2008).
39. Mizobuchi T., Takeda Y., Isshiki Y., Sakuda K., Sakuma K. and Kondo S., Evaluation of antimicrobial activities of fragrance ingredients, *J. Jpn. Cosmet. Sci. Soc.*, **32**; 95–111 (2008).
40. Shimizu I., Isshiki Y., Nomura H., Sakuda K., Sakuma K. and Kondo S., The antibacterial activity of fragrance ingredients against *Legionella pneumophila*, *Biol. Pharm. Bull.*, **32**; 1114–1117 (2009).
41. 日本香料協会編, 香りの百科, 朝倉書店, 56–58 (1985).
42. Nardelli A., Arnau GE., Bernard G., Lepoittevin JP. and Goossens A., Is a low content in atranol/chloroatranol safe in oak moss-sensitizes individuals? *Contact Derm.*, **60**; 91–95 (2009).
43. Johansen JD., Heydorn S. and Menné T., Oak moss extracts in the diagnosis of fragrance contact allergy, *Contact Derm.*, **46**; 157–161 (2002).
44. Scientific Committee on Consumer Products (SCCP). Opinion on oak moss/ tree moss (sensitization only). European Commission. Health & Consumer Protection Directorate-General. Adopted by the SCCP during the 2nd plenary meeting 7 December 2004. Brussels, SCCP (2004).
45. Scientific Committee on Consumer Products (SCCP). Opinion on atranol and

- chrooatranol present in natural extracts (e.g. oak moss and tree moss extract).
European Commission. Health & Consumer Protection Directorate-General.
Adopted by the SCCP during the 15th plenary meeting 15 April 2008. Brussels,
SCCP (2008).
46. Suppakul P., Miltz J., Sonneveld K. and Bigger SW., Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging, *J. Agric. Food Chem.*, **51**; 3197–3207 (2003).
 47. Burt S., Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review, *Int. J. Food Microbiol.*, **94**; 223–253 (2004).
 48. Joulain D. and Tabacchi., Lichen extracts as raw materials in perfumery. Part 1: oakmoss, *Flavour Fragr. J.*, **24**; 49–61 (2009).
 49. Bernard G., Arnau GE., Rastogi SC., Heydorn S., Johansen JD., Menne T., Goossens A., Andersen K. and Lepoittevin JP. Contact allergy to oak moss: search for sensitizing molecules using combined bioassay-guided chemical fractionation, GC-MS, and structure–activity relationship analysis, *Arch Dermatol. Res.*, **295**; 229–235 (2003).
 50. Caccamese S., Compagnini A., Toscano RM. and Casio O., Methyl- β -orcinolcarboxylate and atranol from the lichen *Stereocaulon vesuvianum*, *J. Nat. Prod.*, **49**; 1159–1160 (1986).
 51. Rankovic B., Misic M. and Sukdolak S., The antimicrobial activity of substances derived from the lichen *Physcia aipolia*, *Umbilicaria polyphylla*, *Parmelia caperata* and *Hypogymnia physodes*, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **24**; 1239–1243 (2008).
 52. Ingolfsdottir K., Bloomfield SF. and Hylands PJ., *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of lichen metabolites as potential preservatives, *Antimicrob.*

- Agents Chemother.*, **28**; 289–292 (1985).
53. Gomes AT., Junior AS., Seidel C, Smania EFA., Honda KN., Roses FM. and Muzzi RM., Antibacterial activity of oresellinates, *Braz. J. Microbiol.*, **34**; 194–196 (2003).
 54. Fujikawa F., Hirayama T., Nakamura Y., Suzuki M., Doi M. and Niki C, Studies on orsellinic acid and ester, β -orcinolcarboxylic acid ester and olivetonide as a preservative for sake, *Yakugaku Zasshi*, **90**; 1517–1519 (1970).
 55. Hindahl MS. and Iglewski BH., Isolation and characterization of the *Legionella pneumophila* outer membrane, *J. Bacteriol.*, **159**; 107–113 (1984).
 56. Miller RD., *Legionella pneumophila* cell envelope: Permeability to hydrophobic molecules, *Curr. Microbiol.*, **9**; 349–354 (1983).
 57. Pohlod DJ., Saravolatz LD., Quinn EL. and Somerville MM., The effect on inoculum, culture medium and antimicrobial combinations on the in-vitro susceptibilities of *Legionella pneumophila*, *J. Antimicrob. Chemother.*, **7**; 335–341 (1981).
 58. Shevchuk O., Jager J. and Steinert M., Virulence properties of the *Legionella pneumophila* cell envelope, *Front. Microbiol.*, **2**; 1–12 (2011).
 59. Knirel YA., Rietschel ET., Marre R. and Zähringer U., The structure of O-specific chain of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide, *Eur. J. Biochem.*, **221**; 239–245 (1994).
 60. Zähringer U., Knirel YA., Linder B., Helbig JH., Sonesson A., Marre R. and Rietschel ET., The lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 (strain Philadelphia 1): chemical structure and biological significance, *Prog. Clin. Biol. Res.*, **392**; 113–139 (1995).
 61. Kooistra O., Herfurth L., Lüneberg E., Frosch M., Peters T. and Zähringer U.,

- Epitope mapping of the O-chain polysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide by saturation-transfer-difference NMR spectroscopy, *Eur. J. Biochem.*, **269**; 573–582 (2002).
62. Knirel YA., Moll H. and Zähringer U., Structural study of a highly O-acetylated core of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide, *Carbohydr. Res.*, **293**; 223–234 (1996).
63. Stewart PS., Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms, *Int. J. Med. Microbiol.*, **292**; 107–113 (2002).
64. Morton LHG., Greenway DLA., Gaylards CC. and Surman SB., Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides, *Int. Biodeter. Biodegr.*, **41**; 247–259 (1998).
65. Lewis K., Riddle of biofilm resistance, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**; 999–1007 (2001).
66. Carter G., Young LS. and Bermudez LE., A subinhibitory concentration clarithromycin inhibits *Mycobacterium avium* biofilm formation, *Antimicrob. Agents Chrmother.*, **48**; 4907–4910 (2004).
67. Wozniak DJ. and Keyser R., Effects of subinhibitory concentrations of macrolide antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa*, *Chest*, **125**; 62S–69S (2004).
68. Houari A. and Di-Martino P., Effects of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilm formation, *Lett. Appl. Microbiol.*, **45**; 652–656 (2007).
69. Nuryastuti T., Van-Der-Mei HC., Busscher HJ., Iravati S., Aman AT. and Krom BP., Effect of cinnamon oil on *icaA* expression and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**; 6850–6855 (2009).
70. Amalaradjou MAR. and Venkitanarayanan K., Effect of tans-cinnamaldehyde on inhibition and inactivation of *Cronobacter sakazakii* biofilm on abiotic surfaces, *J.*

- Food Prot.*, **74**; 200–208 (2011).
71. Niu C. and Gilbert ES., Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure, *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**; 6951–6956 (2004).
 72. Yasuda H., Ajiki Y, Koga T., Kawada H. and Yokota T., Interaction between biofilms formed by *Pseudomonas aeruginosa* and clarithromycin, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **37**; 1749–1755 (1993).
 73. Yasuda H., Ajiki Y, Koga T. and Yokota T., Interaction between clarithromycin and biofilms formed by *Staphylococcus epidermidis*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**; 138–141 (1994).
 74. Soumya EA., Saad IK., Hassan L., Gheizlane Z., Hind M. and Adnane R., Carvacrol and thymol components inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* adherence and biofilm formation, *African J. Microbiol. Res.*, **5**; 3229–3232 (2011).
 75. Ofek I., Hasty DL. and Sharon N., Anti-adhesion surfaces, *Arch Microbiol.*, **75**; 374–381 (2003).
 76. Packiavathy IASV., Agilandeswari P., Musthafa KS., Pandian SK. and Ravi AV., Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of *Cuminum cyminum* and its secondary metabolite methyl eugenol against gram negative bacterial pathogens, *Food Res. Int.*, **45**; 85–92 (2012).
 77. Sandasi M., Leonard CM. and Viljoen AM., The *in vitro* antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*, *Lett. Appl. Microbiol.*, **50**; 30–35 (2010).
 78. Borazjani RN., May L., Noble JA., Avery SV. and Ahearn DG., Flow cytometry for determination of the efficacy of contact lens disinfecting solutions against *Acanthamoeba* spp., *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**; 1057–1061 (2000)

79. Lück PC., Schmitt JW., Hengerer A. and Helbig JH., Subinhibitory concentrations of antimicrobial agents reduce the uptake of *Legionella pneumophila* into *Acanthamoeba castellanii* and U937 cells by altering the expression of virulence-associated antigens, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**; 2870–2876 (1998)
80. Gomes AT., Honda NK., Roese FM. and Muzzi RM., Cytotoxic activity of orsellinates, *Z Naturforsch C*, **61**; 653–657 (2006)
81. CLSI Document M7-A5, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard-fifth edition, Wayne, PA (2000)
82. 猿渡克比孔, 伊藤直美, 長沢正夫, 中里博子, 古賀宏延, 渡辺講一, 田中光, 藤田紀代, 重野芳輝, 山口恵三, 泉川欣一, 齊藤厚, 原耕平, 界面活性剤 (Tween) の *Legionella* 属の生存・発育および Esterase 産生能におよぼす影響, *感染症学雑誌*, **58**; 1161–1169 (1984)
83. CLSI Document M26-A, Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; Approved guideline, Wayne, PA (1999)
84. Baltch AL., Smith RP. and Ritz W., Inhibitory and bactericidal activities of levofloxacin, ofloxacin, erythromycin, and rifampin used singly and in combination against *Legionella pneumophila*, *Antibicrob. Agents Chemother.*, **39**; 1661–1666 (1995)
85. McBride J., Ingram PR., Henriquez FL. and Roberts CW., Development of colorimetric microtitier plate assay for assessment of antimicrobials against *Acanthamoeba*, *J. Clin. Microbiol.*, **43**; 629–634 (2005)
86. Martin-Novarro CM., Lorenzo-Morales J., Cabrera-Serra MG., RancelF., Coronado-Alvarez NM., Pinero JE. and Valladares B., The potential

pathogenicity of chlorhexidine sensitive *Acanthamoeba* strains isolated from contact lens cases from asymptomatic individuals in Tenerife, Canary Islands, Spain, *J. Med. Microbiol.*, **57**; 1399–1404 (2008)

87. Moffat JF. and Tompkins LS., A quantitative model of intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii*, *Infect. Immun.*, **60**; 296–301 (1992)