茶およびカテキンのマイコプラズマに対する抗菌・殺菌作用

[1]昭和大学医学部細菌学教室，[2]三井農林株式会社食品総合研究所
帖佐　浩[1]　戸田眞佐子[1]　大久保幸枝[1]
原　征彦[2]　島村　忠勝[1]

（平成3年12月9日受付）
（平成3年12月17日受理）

Key words: *Mycoplasma pneumoniae*, tea, catechin, microbicidal

要　旨

Mycoplasma に対する茶エキスおよびカテキンの抗菌・殺菌作用を検討した．緑茶エキスおよび紅茶エキスは *Mycoplasma pneumoniae* に対して，抗菌作用を示した．緑茶エキスおよび紅茶エキスは *M. pneumoniae* と *M. orale* に対して顕著な殺菌作用を示した．2％紅茶エキスは *M. salivarium* に対しても殺菌作用を示したが，緑茶エキスの *M. salivarium* に対する殺菌作用は弱かった．プアール茶エキスの三菌種に対する殺菌作用は弱かった．緑茶から精製した（－）エピガロカテキンガレート（EGCg）および紅茶から精製したテアフラビンジガレート（TF3）は三菌種に対して殺菌作用を示し，*M. pneumoniae* に対しては特に強い殺菌作用を示した．以上の結果，茶およびカテキンは殺マイコプラズマ作用を有することが明らかになった．

序　文

ヒト口腔から分離されるマイコプラズマは *Mycoplasma pneumoniae* をはじめ *M. salivarium, M. orale, M. buccale, M. hominis* など十数種が知られている．このうちヒトに病原性を有するのは *M. pneumoniae* であり，飛沫感染する．*M. pneumoniae* は表面に存在する P_1 蛋白で気道粘膜細胞上のレセプターに吸着し，増殖してマイコプラズマ肺炎をおこす．この肺炎は4年の周期で流行し，肺炎中に占める割合はかなり高い．

われわれは，茶およびカテキンが多くの腸管感染症起因菌[1)~3)]やMRSA[4)]，白癬菌[5)]などに広く抗菌スペクトルを示すこと，コレラトキシン[3)]，腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒や黄色ブドウ球菌 α 毒素などの毒作用を阻害すること[6)~8)]について既に報告した．また茶はインフルエンザウイルスの細胞内感染を阻止しその有効量はきわめて微量であること，また市販のうがい薬に比べてその効果が顕著であることについても報告した[9)10)]．

今回，マイコプラズマ肺炎の起因菌である *Mycoplasma pneumoniae* のほか，口腔から分離した *M. salivarium* および *M. orale* に対する茶およびカテキンの抗菌・殺菌作用を検討した．

材料と方法

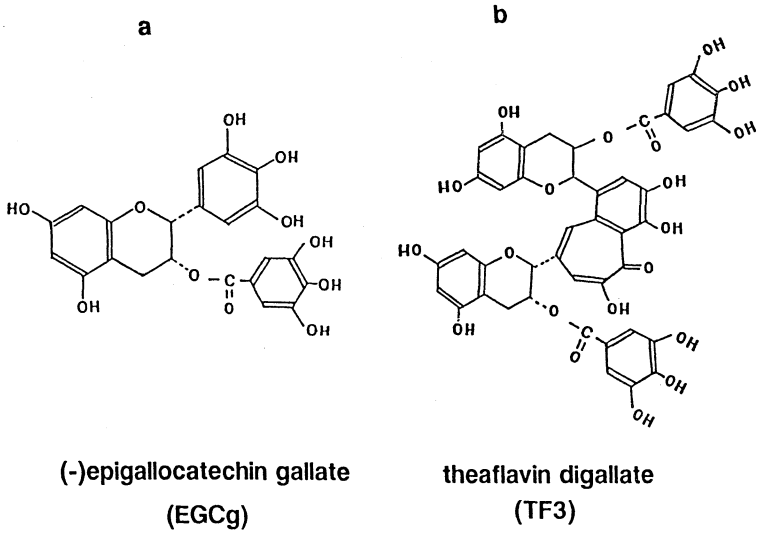
使用菌株：*Mycoplasma pneumoniae* IID 817, *M. orale* IID 880および *M. salivarium* IID 878を実験に用いた．

培地と培養法：Hayflick 培地[11)]（馬血清；20 ml, 25％イースト抽出液；10ml, 3.4％PPLO 寒天培地；70ml）を用いた．*M. orale* および *M. salivarium* は37℃，4～5日間，ガスパック法で炭酸ガス培養を行った．また *M. pneumoniae* は37℃，5～6日間好気的に培養を行った．これらを13,000rpm で50分間遠心して得た沈渣に PBS を加え菌液とした．

物質：茶は緑茶（煎茶，宇治山田），紅茶（Lipton®）およびプアール茶（中国茶）を用いた．茶20g を80ml の PBS を用いて室温で3時間浸出した

別刷請求先：（〒142）東京都品川区旗の台1－5－8
昭和大学医学部細菌学教室　島村　忠勝

Fig. 1　Structures of catechins. a：(－) Epigallocatechin gallate, b：Teaflavin digallate



後ガーゼで濾過し，2.5M　NaOH または2.7M HCl で pH を7.0に修正した．これを15,000rpm, 10分間遠心して得た上清をメンブレンフィルター（Mini-sart NML 0.2）で濾過して得た茶の20%（W/V）溶液を茶エキスとした．これを用いて0.4%，4%，20%希釈液を作成し検液とした．カテキンのうち（－）エピガロカテキンガレート（EGCg：緑茶より精製[12]）およびテアフラビンジガレート（TF3：紅茶より精製[13]）（Fig. 1）をPBS に溶解して2μg/ml, 20μg/ml, 100μg/ml 溶液を作成し検液とした．

抗菌作用の測定：metabolic inhibition（MI）test[4]

M. pneumoniae の培養液を12,500rpm で50分間遠心して集菌後，PBS で1回洗浄した．この菌液を10^{-1}～10^{-5}まで希釈し，各濃度の茶エキス0.3 ml と菌液0.3ml を混和した．これに1%ブドウ糖とフェノール赤を加えた Hayflick の液体培地1.8 ml を加え，37℃で7日間培養を行った．抗菌作用は pH の色調の変化で判定した．すなわち黄変したもの（酸性）は菌が増殖したものと判定（抗菌作用なし）し，変化のないものは菌の増殖に影響を与えたもの（抗菌作用あり）と推定した．しかし *Mycoplasma* は通常菌数が10^3CFU/ml 以下の培養菌数では糖分解能の活性が弱く，培地の色調に変化を生じない．そこでさらに，各試験管から10μl の培養液をとり，Hayflick の寒天培地に滴下し37℃で培養した．7日後に発育した集落を数え，CFU/ml で示し抗菌作用を再評価した．

殺菌作用の測定：茶エキス，EGCg および TF3 の各希釈液に同量の菌液をそれぞれ加えた．この混和液を10^{-1}～10^{-4}まで希釈し，直後および37℃に3時間保温した後，Hayflick の寒天培地に10μl ずつ滴下して培養した．培養7日後に生じた集落を顕微鏡下（×40）でカウントして CFU/ml で表わし，殺菌作用を評価した．

成　績

茶エキスの抗菌作用

茶エキスの抗菌作用をみるために，代謝阻止試験すなわち MI test を行った．10%緑茶エキスまたは10%紅茶エキスに *M. pneumoniae* の菌液を混和したものを Hayflick の液体培地に加えて7日間培養した場合，ブドウ糖の分解による pH の変化は見られなかった．2%緑茶エキスの場合には，菌が発育して培地の pH は酸性となった．さらに培地中の *M. pneumoniae* が10^3CFU/ml 以下であるかを確認するためにこれらの液を10μl とり Hayflick の寒天培地に滴下して培養を行った．

平成4年5月20日

Table 1に示したように，10%緑茶エキスおよび紅茶エキスでは菌の発育が見られなかった．2%緑茶エキスではコントロールとほぼ同程度の発育がみられ抗菌作用はみられなかった．

茶エキスの殺菌作用

MIテストでは高濃度の茶エキスには抗菌作用が認められたが，低濃度では効果がなかった．しかしHayflick培地には馬血清が20%含まれているので，茶成分が血清に吸着されてしまった可能性が考えられる．そこで血清や培地成分を含まない条件で実験を行うことにして，PBSを用いて殺菌作用を検討した．その結果0.2%緑茶エキスは*M. pneumoniae*および*M. orale*をすみやかに殺菌したが，*M. salivarium*は10%でもほとんど殺菌されなかった(Fig. 2)．0.2%紅茶エキスは*M. pneumoniae*および*M. orale*を緑茶エキス同様すみやかに殺菌した．しかし*M. salivalium*に対しては2%および10%で混和直後に菌数の減少が見られたが，3時間後には再び菌の増殖が観察された．0.2%ではほとんどコントロールと同じ増殖を示し殺菌効果はみられなかった(Fig. 3)．プアール茶エキスは緑茶エキスおよび紅茶エキスに比べて殺菌力が弱く，混和直後では10%でもほとんど殺菌作用を示さなかった．しかし37℃で3時間保温した場合には*M. pneumoniae*および*M. orale*には殺菌作用を示した．*M. salivarium*に対してはほとんど殺菌作用は示さなかった(Fig. 4)．

Table 1　Antimicrobial activities of tea and catechins against *Mycoplasma pneumoniae*

No. of bacteria	Materials added			
	PBS (control)	green tea 10%	green tea 2%	black tea 10%
6.6×10^{7} a)	2.0×10^{7} b)	0*	7.7×10^{7}	0
6.6×10^{6}	3.7×10^{7}	0	1.9×10^{7}	0
6.6×10^{5}	1.4×10^{7}	0	1.8×10^{5}	0
6.6×10^{4}	9.2×10^{6}	0	6.6×10^{5}	0
6.6×10^{3}	7.8×10^{6}	0	2.3×10^{4}	0

Serial 10-fold dilutions of mycoplasmal suspension were mixed with green tea or black tea repectively, and incubated at 37℃. Seven days after, 10 μl of culture were inoculated onto Hayflick agar plate for counting viable cell numbers.

a) Inoculum doses of bacteria.

b) Viable cell numbers after incubation with materials added.

カテキンの殺菌作用

EGCg 50μg/mlは*M. pneumoniae*に対して混和直後から顕著な殺菌作用を示した．また10μg/mlの場合，3時間保温した後には菌は死滅したが，1μg/mlでは3時間後でも効果は弱かった．また*M. orale*および*M. salivarium*に対しては50μg/mlで弱い殺菌効果が認められたが10μg/mlでは効果がなかった(Fig. 5)．TF3の場合，*M. pneumoniae, M. orale*および*M. salivarium*の三菌種に対する殺菌効果は，EGCgのそれとほとんど同じ成績であった(Fig. 6)．

Fig. 2　Microbicidal activity of green tea. ○：Control, ●：0.2%Green tea, ▲：2%Green tea, ■：10%Green tea

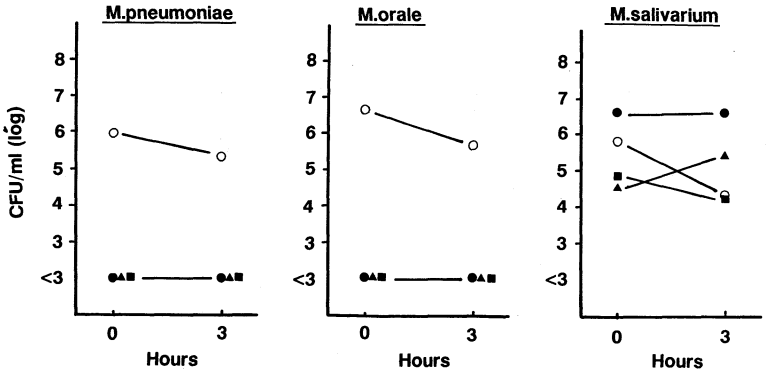


Fig. 3 Microbicidal activity of black tea. ○ : Control, ● : 0.2%Black tea, ▲ : 2%Black tea, ■ : 10%Black tea

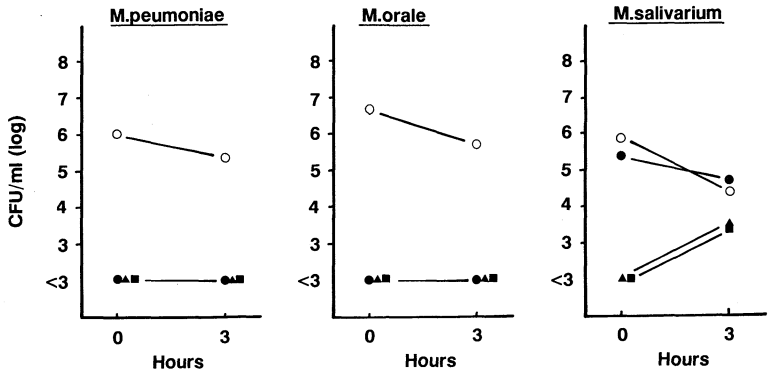


Fig. 4 Microbicidal activity of pu-erh tea. ○ : Control, ● : 0.2%Pu-erh tea, ▲ : 2%Pu-erh, ■ : 10%Pu-erh tea

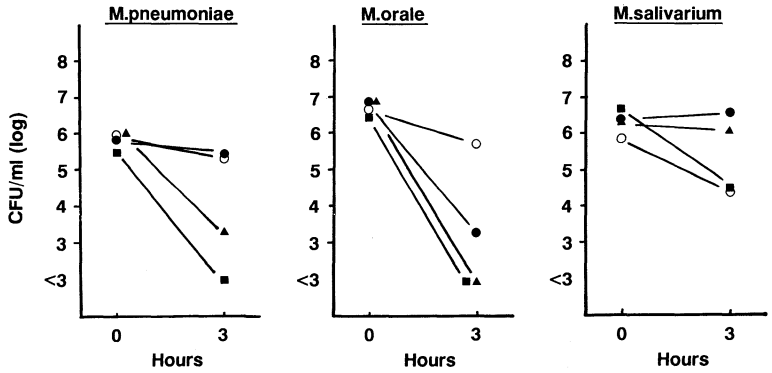
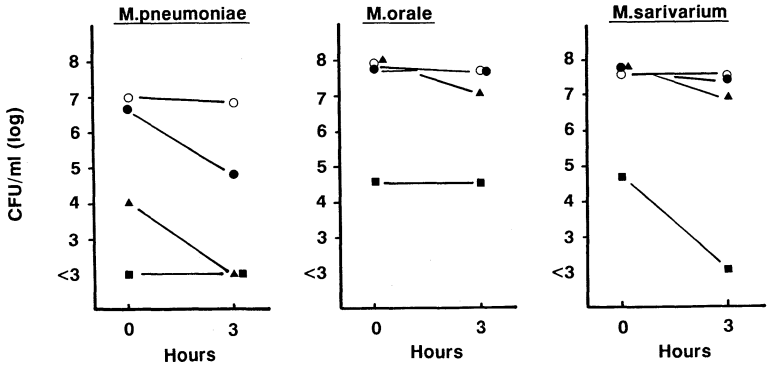


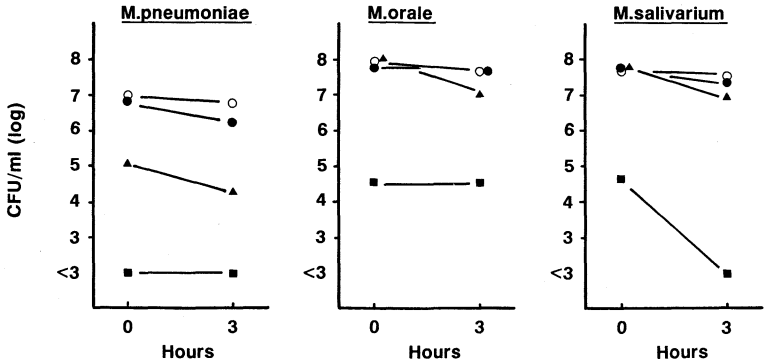
Fig. 5 Microbicidal activity of EGCg. ○ : Control, ● : 1μg/ml EGCg, ▲ : 10 μg/ml EGCg, ■ : 50μg/ml EGCg



考　察

茶は古来より養生の仙薬といわれてきた．しかし，その多彩な生理活性が科学的に解明されるようになったのは最近のことである．茶にはカフェイン，テアニン，カテキン，ビタミン類など二百種以上の成分が含まれている．殺菌作用を示すの

Fig. 6 Microbicidal activity of TF3. ○：Control, ●：1μg/ml TF3, ▲：10μg/ml TF3, ■：50μg/ml TF3



はこのうち主にカテキンである[7]．カテキンはフラバン誘導体で茶の渋味や苦味の成分である．茶葉にはEGCg（MW；458）のほか（－）エピカテキン（EC），（－）エピカテキンガレート（ECg），（－）エピガロカテキン（EGC），（＋）カテキン（C）などが含まれており，そのうち約半分がEGCgで占められている．カテキンのなかでもEGCgの殺菌作用は最も強い[7]．また細菌性毒素に対して阻害作用を示す[7)8)]．TF3（MW；869）は紅茶に含まれており，カテキン二分子が酸化縮合したものである．EGCg同様に抗菌・毒素阻害作用をもっている[4)5)8)]．

今回，*Mycoplasma*に対する茶エキスおよびカテキンの殺菌作用を調べた結果，緑茶エキスおよび紅茶エキスは，*M. pneumoniae*および*M. orale*に対して顕著な殺菌作用を示した．*M. salivarium*に対しては弱い殺菌作用しか示さなかった．プアール茶エキスの殺菌作用は緑茶エキスや紅茶エキスに比べて弱かった．プアール茶は茶の製造過程で，茶を長時間堆積して微生物の作用を受けさせるため，カテキン量が極度に少ないことと一致する[15]．茶やカテキンの*Mycoplasma*に対する殺菌作用は*Vibrio cholerae* O1, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*に対するよりも強いが[1)~3)]，この差はcell wallの有無に依存するのかもしれない．しかし*Mycoplasma*の間でもその感受性が異なったが，その理由は現在のところ不明である．

嗜好飲料として広く全世界で飲用されているコーヒー（UCC®）について行った実験では，*M. pneumoniae* IID 817, *M. orale* IID 880, *M. salivarium* IID 878のいずれに対しても弱い殺菌作用しか示さなかった（未発表）．*M. pneumoniae*は通常飛沫感染によりマイコプラズマ肺炎をおこす．家族内や集団生活者での発生が多く見られる．今回の実験では，口腔内の常在菌である*M. salivarium*に対する茶エキスやカテキンの殺菌作用は弱く，病原性の*M. pneumoniae*に殺菌作用を示したことから，緑茶や紅茶で日常的にうがいをすることはマイコプラズマ肺炎の予防のために役立つものと考えられる．

文　献

1) Toda, M., Okubo, S., Hiyoshi, R. & Shimamura, T.: The bactericidal activity of tea and coffee. Let. Appl. Microbiol., 8: 123—125, 1989.
2) 戸田真佐子，大久保幸枝，大西玲子，島村忠勝：日本茶の抗菌作用および殺菌作用について．日細菌誌，44: 669—672, 1989.
3) Toda, M., Okubo, S., Ikigai, H., Suzuki, T., Suzuki, Y. & Shimamura, T.: The protective activity of tea against *Vibrio cholerae* 01. J. Appl. Bacteriol., 70: 109—112, 1991.
4) 戸田真佐子，大久保幸枝，原　征彦，島村忠勝：Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*に対するカテキン抗菌・殺菌作用．日細菌誌，46: 839—845, 1991.
5) 大久保幸枝，戸田真佐子，原　征彦，島村忠勝：白癬菌に対するカテキンおよびテアフラビンの抗菌・殺菌作用．日細菌誌，46: 509—514, 1991.
6) Okubo, S., Ikigai, H., Toda, M. & Shimamura, T.: The anti-heamolysin activity of tea and

coffee. Let. Appl. Microbiol., 9 : 65—66, 1989.
7) 戸田真佐子，大久保幸枝，生貝　初，島村忠勝：茶カテキン類およびその構造類似物質の抗菌作用ならびに抗毒素作用．日細菌誌，45： 561—566, 1990.
8) 生貝　初，戸田真佐子，大久保幸枝，原　征彦，島村忠勝：カテキンおよびテアフラビンの構造と溶血毒素阻害作用．日細菌誌，45 : 913—919, 1990.
9) Nakayama, M., Toda, M., Okubo, S. & Shimamura, T.: Inhibition of influenza virus infection by tea. Let. Appl. Microbiol., 11 : 38—40, 1990.
10) 中山幹夫，鈴木健之，戸田真佐子，大久保幸枝，島村忠勝：カテキンおよびテアフラビンのインフルエンザウイルスに対する感染阻止活性．感染症誌，64 : 1089, 1990.
11) Chanock, R.M., Hayflick, L. & Barile, M.F.: Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO. Proc. Natl. Acad. Sci., 48 : 41—49, 1962.
12) 原　征彦，松崎妙子，鈴木建夫：茶成分のアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害能について．日本農芸化学会誌，61 : 803—808, 1987.
13) 松崎妙子，原　征彦：茶カテキン類の抗酸化作用について．日本農芸化学会誌，59 : 129—134, 1985.
14) 日本細菌学会教育委員会編：ヒト・動物および植物マイコプラズマの分離と同定．細菌学技術叢書，2 : 30—31, 1981.
15) 池ケ谷賢次郎：茶の科学．（村松敬一郎 編），p. 88—89, 朝倉書店，東京，1991.

Antimicrobial and Microbicidal Activities of Tea and Catechins against *Mycoplasma*

Hiroshi CHOSA[1)], Masako TODA[1)], Sachie OKUBO[1)],
Yukihiko HARA[2)] & Tadakatsu SHIMAMURA[1)]
[1)]Department of Microbiology and Immunology, Showa University School of Medicine
[2)]Food Research Laboratories, Mitsui Norin Co.

We examined tea extracts, (−) epigallocatechin gallate (EGCg) and theaflavin digallate (TF3) for their antimicrobial and microbicidal activities against *Mycoplasma*. Green tea and black tea showed antimicrobial activities against *M. pneumoniae*. At a concentration of 0.2% green tea and black tea showed microbicidal activities against *M. pneumoniae* and *M. orale* but not against *M. salivarium*. Extracts of pu-erh tea showed a slight microbicidal activity against *M. pneumoniae* and *M. orale*. EGCg purified from green tea and TF3 from black tea markedly showed microbicidal activities against *M. pneumoniae*. *M. orale* and *M. salivarium*. These results suggest that tea and catechins can be used as prophylactic agents against *Mycoplasma pneumoniae* infection.

平成4年5月20日