

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 12 日現在

機関番号：34516

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21500806

研究課題名（和文）抗結核作用を有するポリフェノールの探索と同定および作用機作の解析

研究課題名（英文）Screening and Identification of anti-mycobacterial compounds from polyphenols.

研究代表者

尾関 百合子 (OZEKI YURIKO)

園田学園女子大学・健康科学部・教授

研究者番号：00169301

研究成果の概要（和文）：

結核菌に対するポリフェノールの抗菌作用を検討した。興味深いことに、試験管内の結核菌の増殖に対しては抑制効果がないものの、細胞内の結核菌に対しては比較的低濃度で顕著に増殖を抑制する数種のポリフェノールを同定した。本結果はこれらのポリフェノールが宿主細胞の免疫能活性化を介して結核菌の増殖を抑制することを示している。結核菌が細胞内増殖菌であることから、これらのポリフェノールは結核の発症予防や治療に応用できる可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：

We carried out screening of anti-mycobacterial compounds from polyphenols. Some polyphenols suppressed proliferation of *Mycobacterium tuberculosis* growing in macrophages at lower concentrations than those suppressed in 7H9 culture medium. These facts indicate that these polyphenols possess bacteriostatic effects against *M. tuberculosis* via activation of host immunity. These data suggest use of the polyphenols for prevention and treatment of tuberculosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：細菌学、栄養

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：結核、ポリフェノール、免疫

## 1. 研究開始当初の背景

結核（症）は年間約 200 万人の死を招く最大級の細菌感染症である。成人型肺結核の 70% 以上は世界人口の 1/3 に潜伏感染している結核菌の再増殖（内因性再燃）により発症する。結核発病者には複数の結核薬が長期に

わたって投薬されるため、結核薬は副作用の低いものでなければならない。われわれは放線菌産生物質から抗結核作用を有する物質の探索システムをすでに立ち上げていた。結核発症者の血中抗酸化物質濃度が低いことに着目し、抗結核作用を有するポリフェノー

ルの探索を試みた。

## 2. 研究の目的

抗結核作用を有するポリフェノールを探索し、その作用機作を明らかにする。

## 3. 研究の方法

牛型結核菌弱毒株 BCG、結核菌実験室株 (H37Rv)、超多剤耐性結核菌臨床分離株 (XDR) を 7H9 培地で液体培養し、市販のポリフェノールを添加して増殖抑制作用を観察した。これらは遅発育菌であるため、迅速発育菌である *Mycobacterium smegmatis* を用いたスクリーニングも実施した。また、H37Rv を感染させたマウス骨髄由来マクロファージの培養系に、ポリフェノールを添加して細胞内増殖結核菌に対する増殖抑制効果を検討した。7H9 液体培地中での菌の増殖は ATP 量で測定した。マクロファージ内の結核菌については細胞を破碎し、7H11 寒天培地に接種して約 4 週間後に CFU をカウントした。

## 4. 研究成果

### (1) BCG に対するポリフェノールの抑制効果

15 種類のポリフェノールのうち、ATP 測定で 50 % 以上増殖抑制が見られるポリフェノールの濃度はクマリンが 20 mM、イソフラボン、クロロゲン酸、ミリセチンは 2.5 mM、カテキン、クルクミン、ケンフェロールは 1.25 mM、ルテオリン、フラボン、レスベラトール、ケルセチンは 250  $\mu$ M、アピゲニン、ピロカテコールは 100  $\mu$ M 以下であった。一方、ルチン、ヘスペリジン、ナリンギンは 20 mM 以上でも増殖抑制効果が見られなかった (図 1 a, b)。

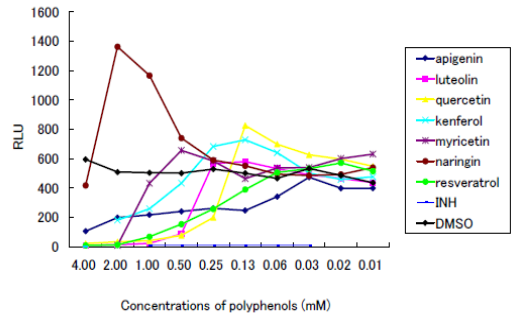
### (2) *M. smegmatis* に対する増殖抑制効果

ルチン、ヘスペリジン、クロロゲン酸は 20 mM の濃度で加えても *M. smegmatis* に対する抑制効果は見られなかった。また、BCG に対しては 1 mM で抑制効果が見られていたルテオリン、ケルセチン、アピゲニン、ケンフェロールに対しては 4 mM の高濃度でも増殖抑制が見られず、菌に対する感受性に違いがあることが判明した。

### (3) 結核菌に対する増殖抑制効果

H37Rv, XDR に対し、1 mM までの濃度で増殖抑制効果がみられたポリフェノールはフラボン、ルテオリン、ピロカテコールのみであった。マウスの骨髄由来マクロファージに H37Rv を感染させ、ポリフェノールを添加して培養したところ、数種類のポリフェノールで結核菌の増殖抑制活性がみられ、しかもその作用は直接菌に対する濃度よりもはるかに低濃度であった。また、細胞毒性もほとんどのポリフェノールは微弱であった (図 2、図 3)。これらの結果はポリフェノールが菌に対する直接的な増殖抑制作用をもつ以上に細胞の活

a



b

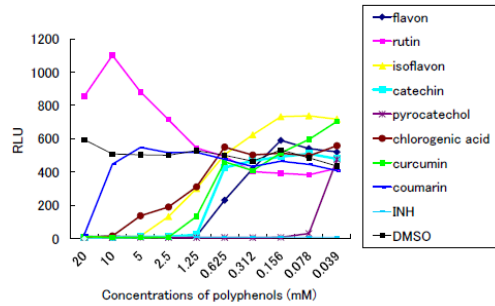


図 1. BCG に対するポリフェノールの増殖抑制効果  
ポリフェノールを添加して4日間培養

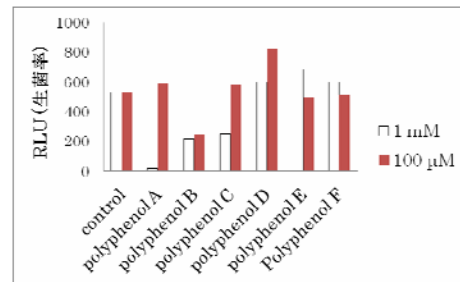


図 2. 結核菌に対する直接的なポリフェノールの増殖抑制作用

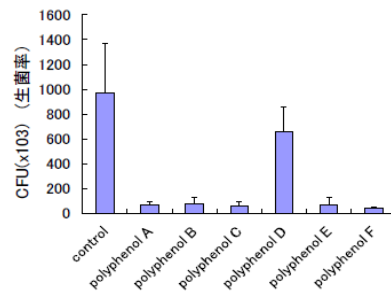


図 3. マウス骨髄由来マクロファージに感染した結核菌に対するポリフェノールの増殖抑制作用  
ポリフェノールを添加して7日間培養

性を介した増殖抑制作用の方が顕著であることを示している。食品成分由来の安全なポ

リフェノールが結核予防や治療に有用である可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

- 1) Niki, M., Niki, M., Tateishi Y., Ozeki Y., Kirikae T, Lewin A., Inoue Y, Matsumoto M., Dahl JL., Ogura H., Kobayashi K., and Matsumoto S., 2012, A novel mechanism of growth phase-dependent tolerance to isoniazid in mycobacteria. J Biol Chem in press. (査読有り)
- 2) 松本 壮吉、尾関 百合子、小林 和夫。新しい結核ワクチン開発の展望。臨床と微生物、Vol139 2号、P131-136、2012. (査読無し)
- 3) Ozeki, Y., Y. Hirayama, T. Takii, S. Yamamoto, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. Loss of anti-mycobacterial efficacy in mice over time following vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. 2011. Vaccine 29:6881-6887. (査読あり)
- 4) Takatsuka M, Osada-Oka M, Satoh EF, Kitadokoro K, Nishiuchi Y, Niki M et al. A histone-like protein of mycobacteria possesses ferritin superfamily protein-like activity and protects against DNA damage by Fenton reaction. 2011. PLoS One 6 e20985. (査読有り)
- 5) Naka T, Nakata N, Maeda S, Yamamoto R, Doe M, Mizuno S, Niki M et al. Structure and Host Recognition of Serotype 13 Glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. 2011. J Bacteriol 93:5766-5774. (査読有り)
- 6) Yuki take H., M. Naito, K. Sato, M. Shoji, N. Ohara, M. Yoshimura et al. Effects of non-iron metalloporphyrins on growth and gene expression of *Porphyromonas gingivalis*. 2011. Microb Immun 55:141-153.(査読有り)
- 7) Naka T, Maeda S, Niki M. Ohara N, Yamamoto S, Yano I, Maeyama J et al. The Lipid Phenotype of two Distinct Subpopulations of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin Tokyo 172 Substrain. 2011. J Biol Chem 286: 44153-44161. (査読有り)
- 8) Usui T., T. Yoshikawa, K. Orita, SY. Ueda, Y. Katsura, S. Fijimoto, and M. Yoshimura. Changes in salivary antimicrobial peptide, immunoglobulin A and cortisol after prolonged strenuous exercise. 2011. Eur J Appl Physiol 111:2005-2014. (査読有り)
- 9) 仁木 満美子、仁木 誠、尾関 百合子、岡 真優子、松本 壮吉。結核研究の新たな展開-潜在性結核と結核菌: 休眠現象の分子メカニズム。最新医学、Vol166 3号、P149-155、2011. (査読無し)
- 10) Ozeki, Y., I. Sugawara, T. Udagawa, T. Aoki, M. Osada-Oka, Y. Tateishi, H. Hisaeda, Y. Nishiuchi, N. Harada, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. Transient role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in mycobacterial infection in mice. 2010. Int Immunol 22:179-189. (査読有り)
- 11) Kondo Y., N. Ohara, K. Sato, M. Yoshimura et al. Tetratricopeptide repeat protein-associated proteins contribute to the virulence of *Porphyromonas gingivalis*. 2010. Infect Immun 78: 2846-2856. (査読有り)
- 12) Nakajima C, Rahim Z, Fukushima Y, Sugawara I, Zanden A G, Tamaru A, Suzuki Y. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Bangladesh by a species distinguishable multiplex PCR. 2010. BMC Infect Dis 10:118-124. (査読有り)
- 13) Fukasawa T, Oda N, Wada Y, Tamaru A, Fukushima Y, Nakajima C, Suzuki Y. A novel method for the purification of DNA by capturing nucleic acid and magnesium complexes on non-woven fabric filters under alkaline conditions for the gene diagnosis of tuberculosis by loop-mediated Isothermal amplification (LAMP). 2010. Jpn J Infect Dis 63:246-25. (査読有り)
- 14) Hirayama, Y., M. Yoshimura, Y. Ozeki, I. Sugawara, T. Udagawa, S. Mizuno, N. Itano, K. Kimata, A. Tamaru, H. Ogura, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. Mycobacteria Exploit Host Hyaluronan for Efficient Extracellular Replication. 2009. PLoS Pathog 5:e1000643. (査読有り)
- 15) Tateishi, Y., Y. Hirayama, Y. Ozeki, Y. Nishiuchi, M. Yoshimura, J. Kang, A. Shibata, K. Hirata, K. Kitada, S. Kitada, R. Maekura, H. Ogura, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. Virulence of *Mycobacterium avium* complex

strains isolated from immune-competent patients. 2009. *Microb Pathog* 46:6-12.

(査読有り)

- 16) Nishiuchi, Y., A. Tamura, S. Kitada, T. Taguri, S. Matsumoto, Y. Tateishi, M. Yoshimura, Y. Ozeki, N. Matsumura, H. Ogura, and R. Maekura. *Mycobacterium avium* complex organisms predominantly colonize in the bathtub inlets of patients' bathrooms. 2009. *Jpn J Infect Dis* 62:182-186. (査読有り)

[学会発表] (計 20 件)

- 1) 尾関百合子、平山幸雄、岡真優子、立石善隆、瀧井猛将 他. マウスモデルにおける BCG ワクチン効果の減衰に関する研究. 第 85 回日本細菌学会総会 2012 年 3 月 27-29 日 長崎
- 2) 仁木満美子、仁木誠、小林和夫、休眠時における抗酸菌の遺伝子発現解析. 第 85 回日本細菌学会総会 2012 年 3 月 27-29 日 長崎
- 3) 岡真優子、合田亘人、曾我朋義、尾関百合子、小林和夫、松本壮吉、岩尾洋. マクロファージのグルコース代謝と宿主内結核菌の増殖. 第 85 回日本細菌学会総会 2012 年 3 月 27-29 日 長崎
- 4) 井上学、岡真優子、仁木満美子、尾関百合子、一瀬休生、小林和夫、松本壮吉. ケニアの学生における、結核菌タンパク質に対する免疫応答の分析. 第 85 回日本細菌学会総会 2012 年 3 月 27-29 日 長崎
- 5) 立石義隆、小倉義俊、平山幸雄、尾関百合子、西内由紀子ほか. 高病原性 *Mycobacterium intracellulare* 臨床分離株のドラフトゲノム解析. 第 85 回日本細菌学会総会 2012 年 3 月 27-29 日 長崎
- 6) 松本壮吉、岡真優子、西内由紀子、仁木満美子、尾関百合子他. *Mycobacterium* DNA-binding protein 1 (MDP1)に見出された Ferritin-super family 蛋白質様活性. 第 85 回日本細菌学会総会 2012 年 3 月 27-29 日 長崎
- 7) Ozeki, Y., Hirayama, Y., Osada-Oka M., Takii, T., Yamamoto S. et al. Loss of anti-mycobacterial efficacy in mice over time following vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Gérin.

第64回日本細菌学会関西支部総会  
2011年11月19日 大阪

- 8) Y.Ozeki, Y.Hirayama, T.Takii, S. Yamamoto et al. Loss of anti-mycobacterial efficacy in mice over time following vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 9-10, 2011.
- 9) 田丸亜貴、和田崇之、岩本朋忠、吉田志緒美、野尻孝子. 患者年齢構成の異なる地域間での結核菌地域分子疫学比較. 第86回日本結核病学会総会 2011年 6 月2-3日 東京
- 10) Y. Ozeki, I. Sugawara, T. Udagawa, H. Hisaeda, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. Transient role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, Kobe, Japan, August 22-27, 2010.
- 11) Y. Ozeki, I. Sugawara, T. Udagawa, T. Aoki, M. Osada-Oka, Y. Tateishi, et al. Transient role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. 45th US-Japan, Cooperative Medical Science Program, Cambridge, USA July 13-17, 2010.
- 12) 田丸亜貴、和田崇之、長谷篤、岩本朋忠、吉田志緒美、前田伸司、松本智成. 大阪府における多発性広域感染株について. 第 85 回日本結核病学会総会 2010 年 5 月 20-21 日 京都
- 13) 尾関百合子、菅原勇、岡真優子、小林和夫、松本壮吉. 結核菌感染における制御性 T 細胞の関与. 第 83 回日本細菌学会総会 2010 年 3 月 27-29 日 横浜
- 14) 尾関百合子、菅原勇、小林和夫、松本壮吉. 結核菌感染における制御性 T 細胞の役割. 第 62 回日本細菌学会関西支部会. 2009 年 11 月 14 日 大阪
- 15) 平山幸雄、吉村満美子、尾関百合子、田丸亜貴、小倉壽、小林和夫、松本壮吉. 抗酸菌は宿主ヒアルロン酸を利用して細胞外増殖を行う. 第 62 回日本細菌学会関西支部総会 2009 年 11 月 14 日 大阪
- 16) Mayuko Osada-Oka, Masaki Takatsuka, F Eisuke Sato, Yuriko Ozeki, Mamiko Yoshimura, Masayasu Inoue, Kazuo Kobayashi, Sohkiichi Matsumoto. A ferritin superfamily-like protein in mycobacteria.

THE9TH AWAJI INTERNATIONAL  
FORUM 2009年9月8-11日 淡路島

- 17) 田丸亜貴、尾関百合子。大阪における多剤耐性・超多剤耐性結核の疫学とその制圧に関する研究。第42回関西抗酸菌研究会。2009年6月26日 大阪
- 18) 平山幸雄、吉村満美子、尾関百合子、菅原勇、小林和夫、松本壮吉。結核菌の増殖に対するヒアルロン酸の作用。第82回日本細菌学会総会 2009年3月12-14日 名古屋
- 19) 立石善隆、平山幸雄、尾関百合子、西内由紀子、吉村満美子、小林和夫、松本壮吉。急速な臨床経過に合致した高病原性 *Mycobacterium avium-intracellulare* complex 菌株の同定。第82回日本細菌学会総会 2009年3月12-14日 名古屋
- 20) 尾関百合子、原田誠、西内由紀子、山本三郎、小林和夫、松本壮吉。抗結核菌薬スクリーニング系の確立と実践。第82回日本細菌学会総会 2009年3月12-14日 名古屋

〔図書〕(計1件)

- 1) Takii T, Maeyama J, Yamamoto S, Niki M et al. JATA(公益財団法人 結核予防会)BCG-Vaccine and Adjuvant. 2012. 272

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

尾関 百合子(OZEKI YURIKO)  
園田学園女子大学・健康科学部・教授  
研究者番号：00169301

### (2) 研究分担者

仁木 (吉村) 満美子(NIKI MAMIKO)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：20438229

### (3) 研究分担者

田丸 亜貴 (TAMARU AKI)  
大阪府立公衆衛生研究所・感染症部・主任研究員  
研究者番号：70270767