

カリン (*Chaenomeles sinensis*) 果実より単離された トリテルペン及び β -sitosterol の抗菌活性及び抗溶血活性

大澤 謙二^{*a}, 安田 英之^a, 森田 博史^b
竹谷 孝一^b, 糸川 秀治^b

^a(株)ロッテ中央研究所, ^b東京薬科大学薬学部

Antibacterial and Antihemolytic Activity of Triterpenes and β -Sitosterol Isolated from Chinese Quince (*Chaenomeles sinensis*)

KENJI OSAWA,^{*,a} HIDEYUKI YASUDA,^a HIROSHI MORITA,^b
KOICHI TAKEYA^b and HIDEJI ITOKAWA^b

^a Department of Basic Research, Lotte Central Laboratory Co., Ltd.,
3-1-1 Numakage, Urawa, Saitama 336, Japan

^b Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Tokyo University of
Pharmacy and Life Science, 1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-03, Japan

(Received September 26, 1996)

An ethanolic extract of Chinese Quince (*Chaenomeles sinensis* KOEHNE) was found to have an antibacterial activity on *Streptococcus pyogenes* (group A streptococcus haemolyticus) and an antihemolytic activity on streptolysin O known, a pathogenic factor of *S. pyogenes*. Chromatographic separation of the extract gave six triterpenes and β -sitosterol, some showing a potent antibacterial activity on *S. pyogenes* and an antihemolytic activity. The biological activities of the compounds isolated from Chinese Quince, and authentic triterpene and sterol samples were compared, and their structure-activity relationship was investigated.

Keywords—*Chaenomeles sinensis*; triterpene; β -sitosterol; antibacterial activity; *Streptococcus pyogenes*; streptolysin O

カリン (*Chaenomeles sinensis* KOEHNE) は中国原産の落葉高木であり、その果実は漢方では木瓜 (モッカ) と呼ばれ、鎮痙、鎮咳、整腸、利尿などに用いられている¹⁾。我が国においても古くより民間療法的に用いられており、カリンの果実を焼酎につけ込んだものをカリン酒と称して、鎮咳、去痰を目的として利用している。しかしその薬理活性成分はほとんど明らかにされていない。カリンの成分に関しては、清水²⁾がその香気成分として *cis*- α -farnesene, *trans*- α -farnesene, β -farnesene の存在を明らかにしている。また、阿部ら³⁾はエーテル可溶部より β -sitosterol, 1-hexadecene, ursolic acid, palmitic acid を、酢酸エチル可溶部より quercetin, quercitrin を単離、同定している。

本研究ではカリンの鎮咳、去痰作用に着目し、喉に対する有効成分を明らかにすることを目的として、咽頭に常在し組織に化膿性炎症を引き起こす *Streptococcus pyogenes* に対する抗菌活性及び本菌の産生する溶血毒 (ストレプトリジン O) に対する阻害活性を指標にして成分の検討を行った。その結果、得られた7種類の成分中 oleanolic acid, pomolic acid, 2-oxopomolic acid, uvaol などのトリテルペン化合物に抗菌活性を、また β -sitosterol, 2-oxopomolic

acid に溶血毒阻害活性を見出したので報告する。

実験の部

1. 実験材料

材料：カリン (*Chaenomeles sinensis* KOEHNE) 果実は中国産市場品 (乾物) を用いた。

試薬：Ursolic acid (6), cholesterol (12) は Sigma 社製を、oleanolic acid methyl ester (2), ursolic acid methyl ester (7), α -amylin (8), β -amylin (3) は Extrasynthese 社製を用いた。

2. 試験菌株及び使用培地

S. pyogenes 12348, 19615 および *Streptococcus mutans* Ingbritt は brain heart infusion broth (DIFCO) を、*Staphyrococcus aureus* IID671, IID975 は酵母エキス 1%, グルコース 0.2% を添加した nutrient broth (DIFCO) を用い、好氣的に培養した。

3. 抗菌活性試験

96穴マイクロプレートを用いた液体培地希釈法により評価した⁴⁾。2%エタノール溶液を用いて試料の2倍希釈系列を調製し、その100 μ l を各ウエルに添加した。コントロ

TABLE I. Antibacterial Activity of Triterpenes and Sterols Isolated from *C. sinensis* and Related Compounds

Compound	Origin	Minimum inhibitory concentration (MIC) ($\mu\text{g/ml}$)				
		S.p ^{a)} 12348	S.p ^{a)} 19615	S.a ^{b)} IID671	S.a ^{b)} IID975	S.m ^{c)} Ingbritt
1	c.s. ^{d)}	6.25	6.25	>400	>400	25
2	a.s. ^{e)}	25	25	>400	>400	>400
3	a.s.	>400	>400	>400	>400	>400
4	c.s.	>400	>400	>400	>400	>400
5	c.s.	>400	>400	>400	>400	>400
6	a.s.	6.25	6.25	>400	>400	25
7	a.s.	12.5	25	>400	>400	100
8	a.s.	>400	>400	>400	>400	>400
9	c.s.	25	25	25	50	25
10	c.s.	50	50	50	200	200
11	c.s.	50	200	>400	>400	>400
12	a.s.	>400	>400	>400	>400	>400
13	c.s.	>400	>400	>400	>400	>400

Antibacterial activity was determined by broth dilution method.

^{a)} *Streptococcus pyogenes*, ^{b)} *Staphylococcus aureus*, ^{c)} *Streptococcus mutans*, ^{d)} isolated from *C. sinensis*,

^{e)} authentic sample.

ールは2%エタノール溶液を用い、以下同様に試験した。試験菌は37°Cで24時間前培養を行った後、2倍濃度に調製した液体培地に接種し(10⁶ CFU/ml程度)、その100 μl を各ウエル中の試料溶液に添加した。37°Cで24時間培養し、各ウエルにおける菌の増殖をマイクロプレートリーダーを用いて550 nmの吸光度の変化により判定した。菌の増殖を抑制した試料の最低濃度を、最小発育阻止濃度(MIC)とした。

4. 溶血毒(ストレプトリジンO)阻害試験

試験方法は、伊藤らの方法⁵⁾に準じて行った。試料は2%エタノールを含むリン酸緩衝食塩水(pH 6.5)(栄研化学)で溶解し、試料溶液とした。試料を含まない同緩衝液をコントロールとして用いた。ストレプトリジンO(栄研化学)は1 unit/mlになるように精製水で希釈し、ストレプトリジンO溶液とした。試料溶液600 μl 及びストレプトリジンO溶液300 μl を37°Cで10分間作用させた後、リン酸緩衝食塩水(pH 6.5)で3回洗浄した5%ウサギ赤血球浮遊液300 μl を添加し、さらに37°Cで45分間作用させた。遠心分離(1,500 rpm, 1分間)により赤血球を沈下させ、上清の吸光度(550 nm)をコントロールと比較することにより試料のストレプトリジンO阻害活性を求め、50%阻害濃度(IC₅₀)を算出した。

5. 成分の抽出と単離

カリン(*C. sinensis*)の乾燥果実780 gをエタノール(5 l)で還流抽出し、エタノールエキス60 gを得た。水(2 l)を加えて懸濁後、*n*-ヘキサン(2 l)、酢酸エチル(2 l)および*n*-ブタノール(2 l)で分配し、*n*-ヘキサン画分(4.4 g)、酢酸エチル画分(12.7 g)、*n*-ブタノール画分(20.3 g)および水画分(23.2 g)を得た。各画分を*S. pyogenes*に対する抗菌活性及び溶血毒阻害試験に供したところ、*n*-ヘキサ

ン画分[最小発育阻止濃度(MIC) 50 $\mu\text{g/ml}$, 溶血毒50%阻害濃度(IC₅₀) < 10 $\mu\text{g/ml}$]、酢酸エチル画分(MIC 100 $\mu\text{g/ml}$, IC₅₀ 227 $\mu\text{g/ml}$)に活性が認められた。*n*-ヘキサン画分はシリカゲルカラムクロマトグラフィー[*n*-ヘキサン-酢酸エチル(50:1→0:1)]を用いて10フラクションに分画した。抗菌もしくは溶血毒阻害活性の高いフラクションについては、さらにシリカゲル-HPLC[*n*-ヘキサン-酢酸エチル(83:17, 4:1, 3:1)], ODS-HPLC[MeOH-H₂O(19:1, 1:0), CH₃CN 100%]で精製し、5種類の化合物を単離した。各種ケミカルデータを文献値と比較することにより oleanolic acid (1, 52.3 mg)⁶⁾, 3-acetyloleanolic acid (4, 13.9 mg)⁷⁾, erythrodiol (5, 3.5 mg)⁸⁾, uvaol (11, 5.1 mg)⁹⁾, β -sitosterol (13, 54.4 mg)³⁾と同定した。

酢酸エチル画分は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー[ジクロロメタン-メタノール(1:0→0:1)]を用いて10フラクションに分画した。同様に活性の高いフラクションについては、さらにシリカゲル-HPLC[ジクロロメタン-酢酸エチル(9:1)], ODS-HPLC[MeOH-H₂O(19:1, 1:0), CH₃CN 100%]で精製し、3種類の化合物を単離した。各種ケミカルデータを文献値と比較することにより oleanolic acid (1, 1,577 mg)⁶⁾, pomolic acid (9, 80.8 mg)⁹⁾, 2-oxopomolic acid (10, 13.7 mg)¹⁰⁾と同定した。

結果と考察

1. 抗菌活性

カリンより単離したトリテルペン化合物(1, 4, 5, 9, 10, 11), β -sitosterol (13)及びその関連化合物標品(2, 3, 6, 7, 8, 12)を用いてA群溶血性連鎖球菌(*S. pyogenes*), 黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)及び齶蝕誘発細菌(*S. mutans*)に対する抗菌活性試験結果をTABLE Iに示した。カリン成

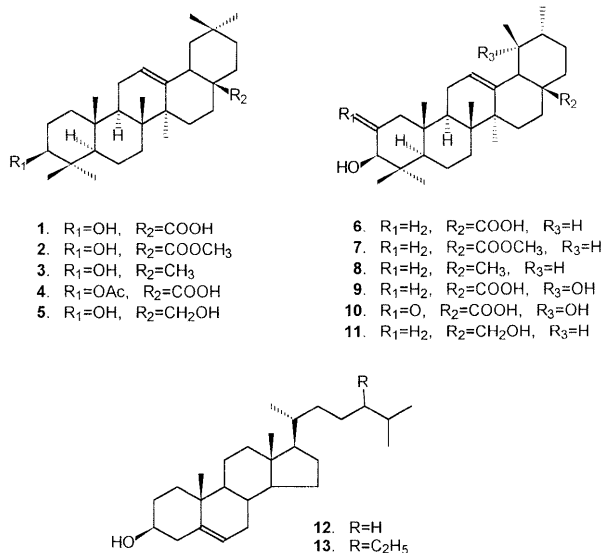


Chart 1.

分の中では、oleanolic acidが *S. pyogenes* に対して最も強い抗菌活性を示し、MICは6.25 $\mu\text{g/ml}$ であった。Oleanolic acidは *S. mutans* に対してはMIC 25 $\mu\text{g/ml}$, *S. aureus* に対しては>400 $\mu\text{g/ml}$ であることから、本物質は *S. pyogenes* に対して特に高い抗菌活性を示すことがわかった。Oleanolic acidはカリンのトリテルペン成分の中では最も含有量が高く、局所において *S. pyogenes* の生育阻害物質として作用していることが示唆された。その他のカリン成分では、pomolic acid, 2-oxopomolic acid, uvaolが比較的強い抗菌活性を示した。これらのトリテルペン化合物の構造と抗菌活性との比較を行ったところ、オレアナン型トリテルペン (1~5)、ウルサン型トリテルペン (6~11) いずれの骨格においても、3位に水酸基、28位にカルボキシル基を有する oleanolic acid (1), ursolic acid (2) が最も強い抗菌活性を示した。これらの28位のカルボキシル基のメチルエステル体 (2, 7) では活性はやや低下し、28位がメチル基となった3, 8では活性がない。また oleanolic acidの3位の水酸基がアセチル化された4も活性がないことから、3位の水酸基及び28位のカルボキシル基が抗菌活性発現に重要であることが示された。

2. 溶血毒 (ストレプトリジン O) 阻害活性

カリンより単離された成分及びその関連化合物標品のストレプトリジン O 阻害活性を TABLE II に示した。ストレプトリジン O は分子量6万の蛋白質であり、赤血球膜に作用し、 α 型溶血を引き起こす。カリン成分では β -sitosterol に強いストレプトリジン O 阻害活性がみられ、50%阻害濃度 (IC₅₀) は1.2 $\mu\text{g/ml}$ であった。ストレプトリジン O が赤血球膜に作用するためには、その第一段階として膜上のコレステロールに結合することが必要であり、cholesterol や

TABLE II. Inhibitory Effect of Triterpenes and Sterols Isolated from *C. sinensis* and Related Compounds on Hemolysis with Streptolysin O

Compound	Origin	IC ₅₀	
		$\mu\text{g/ml}$	μM
1	c.s. ^{a)}	67.8	148.7
2	a.s. ^{b)}	12.8	27.2
3	a.s.	9.1	21.4
4	c.s.	54.9	110.2
5	c.s.	>100	>226.2
6	a.s.	98.5	216.0
7	a.s.	9.9	21.1
8	a.s.	10.6	24.9
9	c.s.	23.1	48.9
10	c.s.	4.2	8.6
11	c.s.	>100	>226.2
12	a.s.	0.5	1.3
13	c.s.	1.2	2.9

^{a)} isolated from *C. sinensis*, ^{b)} authentic sample.

β -sitosterol等のステロール類が共存する場合にはストレプトリジン O の作用が阻害されることが知られている¹¹⁾。今回の試験結果においても β -sitosterol は非常に強いストレプトリジン O 阻害作用を示し、これらの報告と一致する結果となった。トリテルペン化合物においても β -amylin, ursolic acid methylester, 2-oxopomolic acid にも比較的強い溶血毒阻害活性がみられ、IC₅₀は9.1, 9.9, 4.2 $\mu\text{g/ml}$ であったほか uvaol, erythrodiol 以外のすべてのトリテルペン化合物が100 $\mu\text{g/ml}$ 以下のIC₅₀であった。これらのトリテルペン化合物に溶血毒阻害活性が見出されたのは今回がはじめてである。ストレプトリジン O は上皮細胞の膜破壊に関与し、局所での炎症を惹起することが知られていることから、これらのカリン成分による溶血毒阻害効果は喉の炎症に対する有効性のひとつと考えられる。

引用文献

- 1) 難波恒雄, “原色和漢薬図鑑”, 保育社, 大阪, 1980, pp. 195-196.
- 2) 清水純夫, 飯田女子短期大学紀要, **10**, 40 (1990).
- 3) 阿部豪友, 安田高明, 上田條二, 大沢啓助, 岩淵久克, 東北薬科大学研究年報, **37**, 107 (1990).
- 4) S. Kawabata, M. Torii, T. Minami, T. Fujiwara, S. Hamada, *J. Med. Microbiol.*, **38**, 54 (1993).
- 5) 伊藤政之, 牧村政治, 日大口腔科学, **18**, 45 (1992).
- 6) S. B. Mahato, A. P. Kundu, *Phytochemistry*, **37**, 1517 (1994).
- 7) D. E. Burke, P. W. LeQuesne, *Phytochemistry*, **10**, 3319 (1971).
- 8) W. D. Nes, M. Benson, E. Heftmann, *Phytochemistry*, **20**, 2299 (1981).
- 9) D. L. Cheng, X. P. Cao, *Phytochemistry*, **31**, 1317 (1992).
- 10) M. S. Kemp, P. J. Holloway, R. S. Burden, *J. Chem. Res. (M)*, 1846 (1985).
- 11) K. C. Watson, E. J. C. Kerr, *Biochem. J.*, **140**, 95 (1974).