槐花フラボノイドの相互作用による *Propionibacterium* に対する抗菌活性¹⁾

木村雅行,* 山田弘生
(株)ヤクルト本社中央研究所

Interaction in the Antibacterial Activity of Flavonoids from *Sophora japonica* L.
to *Propionibacterium*¹⁾

MASAYUKI KIMURA* and HIROMI YAMADA
Yakult Institute for Microbiological Research,
1796 Yaho, Kunitachi Tokyo, 186, Japan

(Received September 1, 1983)

Since proliferation of *Propionibacterium* is thought to play a significant role in inflammation of acne vulgaris, the antibacterial activities of several crude drugs to this bacteria were examined by agar diffusion method using paper disc, and it was found that the ethanol extract of flower buds of *Sophora japonica* L. shows a remarkable antibacterial activity against *Propionibacterium acnes*, *P. avidum*, *Staphylococcus aureus* under weak acidic conditions.

After purification of active component(s) of the extract, the activity was found to be attributed to the result of the interaction caused by such three components as quercetin (I), rutin (II) and isorhamnetin-3-rutinoside (III).

When I, II and III were applied singly, only I shows very weak activity, but others do not show at all. By mixing I and II, or I and III, 50% or 70% activity of the ethanol extract appeared, respectively. Moreover, after mixing the three flavonoids, the full activity of the extract was recovered.

A small amount of kaempferol-3-rutinoside was also obtained from this extract. This compound was found to have a similar effect to that III has, though weaker than the latter.

The examination of this interaction by use of liquid culture system, showed that the antibacterial activity of the system increased with an increase in the solubility of I caused by II. That is to say, the true principle of the activity is I, and by the addition of II to it, the solubility of I increased to increase apparent activity.

A similar increase in activity by the addition of III is thought to be based on the same mechanism as II.

Keywords—*Sophora japonica*; *Propionibacterium*; antibacterial; rutin; quercetin; isorhamnetin-3-rutinoside; kaempferol-3-rutinoside; solubility

緒 言

ヒトの皮膚には常在菌として, *Propionibacterium* が多数存在し,²⁾ この菌の増殖が尋常性痤瘡(にきび)の炎症による悪化に関係していると考えられている。³⁾ そこで, *Propionibacterium* に対する抗菌物質を探す目的で, 生薬のスクリーニングを行ったところ, エンジュの蕾で, rutin (Ru) の採取生薬として知られる⁴⁾ 槐花のエタノール抽出物が, pH 5.5 で, 本菌に対し強い抗菌作用を有することを見いだした。ヒトの皮膚の pH は弱酸性であり, この pH での活性は望ましいものと言える。槐花中には, Ru および, quercetin (Qu) の存在が知られており,⁵⁾ pH 7.2—7.4 において, Ru が 1—1.5% の濃度で *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri* に対して強く生育を阻害し, Qu は, 同 pH において, 前記 2 菌種を含む広い抗菌スペクトルを有し, 特に嫌気性菌に対して石炭酸と同程度の抗菌作用を有するとの報告がある。⁶⁾ また, 槐花エタノール抽出物が, pH 7.0—7.2 において 0.1% で, *S. aureus* に対して抗菌力を有するとの報告もある。⁷⁾ しかし, これらは何れも pH 7.0—7.4 の領域におけ

る活性であり、弱酸性での抗菌活性については報告がない。我々の調べた系でも pH 7.5 にて、Ru に、確かに活性を有することが、認められたが、弱酸性の領域では、Qu に非常に弱い活性があるのみで、Ru は全く抗菌作用を示さなかった。そこで、弱酸性における槐花エタノール抽出物の強い抗菌作用について検討し、興味ある結果を得たので報告する。

実験材料および方法

材料 生薬：槐花 (*Sophorae Flos*)、紫根 (*Lithospermi Radix*)、地骨皮 (*Lycii Radix Cortex*)、艾葉 (*Artemisia argyi Folium*)、紫蘇葉 (*Perillae Folium*) (以上、ウチダ和漢薬)。試薬：rutin (東京化成)、quercetin (和光)、kaempferol (Sigma)、カラムクロマトグラフ用試薬：Sephadex LH-20 (Pharmacia)、ポリアミド (和光 C-200)、Kieselgel 60 (Merck, mesh 230—400)。菌株：Table II に示したものをを用いた。尚、*Propionibacterium* の増殖、保存には GAM 培地 (ニッスイ) を用い、他の菌種には、普通寒天 (栄研) を用いた。酵素：aryl- β -glycosidase (当研究所西宮分室より分与)。

抗菌活性の測定 試験菌——スクリーニングには、Table II に示されたものをを用い、それ以外には *Propionibacterium avidum* を用いた。

スクリーニング、活性物質の精製および活性の性質の検討——ペーパーディスク (直径 8 mm) を用いた寒天拡散法によった。培地には GAM を用い、pH は HCl 又は NaOH にて pH 5.5 に調節した。試験菌は、約 10^8 /プレートに soft agar (0.075% 寒天) と一緒に基層寒天上にまいた。試料はメタノール溶液とし、生薬の粗抽出物および精製の各段階においては、1 ml あたり生薬 1 g 相当分の濃度になるように調節した。試料液は、25 μ l をディスクに添加し、溶媒を乾燥除去した後、ディスクをプレート上にのせた。35°C で 18—20 h 培養後、生じた阻止円の直径 (mm) を測定して抗菌活性とした。尚、複数の試料混合物を用いる場合には、初めの試料の溶媒を乾燥除去した後に、次の試料をディスクに添加した。成績は 2 回の試験の平均値で示し、S. E. はすべて 10% 以内であった。

相互作用の検討——比濁法によった。HCl にて pH 5.5 に調節した GAM ブイヨン 4 ml を滅菌し、フラボノイドのメタノール溶液 0.1 ml を加え、35°C にて一晚静置した。遠心後その上澄みを無菌的にクレットチューブに移し、試験菌を接種し、35°C で一晚培養した。培養の前後の濁度を、Klett-Summerson 比色計 (660 nm フィルター使用) で測定し、以下の式より生育阻害率 (%) を算出した。対照には、メタノール 0.1 ml を加えたものをを用いた。

$$(1 - A/C) \times 100 = \text{生育阻害率 (\%)}$$

A: 試料の濁度の増加分, C: 対照の濁度の増加分。

抽出・精製 最初のスクリーニングにおいては、各生薬 50 g をミキサーにて粉碎し、10 倍量のエタノールにて 2 回、還流抽出した。濾過後、エタノールを留去しエタノール抽出物を得、メタノール 50 ml に溶解して抗菌活性を測定した。また、槐花の活性物質の精製の際には、槐花 280 g を用いて同様に抽出し、エタノール抽出物 93 g を得、抗菌活性を確認しながら、Chart 1 に示した図に従って活性物質の精製を行った。

構造解析用測定 Ultraviolet spectrum (UV)⁸⁾: 日立 557 型分光光度計、溶媒—MeOH, NaOMe, AlCl₃, AlCl₃-HCl, NaOAc, NaOAc-H₃BO₃; Electron Impact Mass Spectrum (EIMS): 島津 LKB 9000, 70 eV, DI 法; ¹H nuclear magnetic resonance (¹H-NMR): (フラボノールの TMS 体) JEOL-FX-100, 溶媒—CDCl₃, 内部標準—TMS; ガスクロマトグラフィー (GC): (糖の TMS 体) 3% SE52-Chromosorb W 3×2 m, N₂ 40 ml/min, CT 225°C (二糖), 170°C (単糖); 薄層クロマトグラフィー (TLC): Kieselgel 60 F₂₅₄, Kieselgel 60 F₂₅₄ silianised, Polyamide 11 F₂₅₄ (以上 Merck), 溶媒系—(1) CHCl₃: MeOH: EtOAc=2:1:1, (2) CH₃CN: H₂O=9:1, (3) BuOH: AcOH: H₂O=4:5:1 の上層, (4) CHCl₃: MeOH: メチルエチルケトン (MEK): アセチルアセトン (AcAc)=16:10:5:1, 検出—UV ランプ, *p*-アニスアルデヒド-硫酸による呈色 (糖); 加水分解: 検体 20 mg を 0.025 M 酢酸 buffer 中, aryl- β -glycosidase にて 50°C 1 h 作用させ、アグリコンを EtOAc で抽出した。得られたアグリコンにつき、UV, EIMS, ¹H-NMR を行い、水相の糖につき、シリカゲル TLC [溶媒系—(3)], GC を行った。

Qu の溶解度の測定 GAM 培地 (pH 5.5) 100 ml に Qu のメタノール溶液 (8 mg/ml) の 1.25 ml を加え、

さらに Ru のメタノール溶液 (80 mg/ml) の 1.25 ml 又はメタノール 1.25 ml を加え, 35°C にて一晩静置した. 遠心後上澄みを濾過し, 等量の酢酸エチルで 2 回抽出した. (この条件で Qu は 100% 抽出される) 続いて, 酢酸エチルを留去した後メタノールに溶解し, このメタノール溶液について 373 nm での吸光度により Qu 濃度を求めた. 尚, 373 nm の 362 nm に対する吸光度の比を Qu の標品のものと比較した結果, Ru は抽出されていないことを確認した.

結 果 と 考 察

1. 生薬の抗菌活性

数種の生薬のエタノール抽出物の *Propionibacterium* に対する, pH 5.5 における抗菌活性を Table I に示した. 槐花がこの属の 3 菌種に対して強い活性を有することが示された.

2. 槐花のエタノール抽出物の抗菌活性

pH 5.5—7.5 の間における, 槐花のエタノール抽出物の, 数種の菌に対して示す抗菌活性を Table II に示した. ヒト皮膚 pH である 5.5 において, 本抽出物は, 3 種の *Propionibacterium* 以外にも, *S. aureus* に対して活性を有するが, *E. coli* や *P. aeruginosa* に対しては活性は弱い. pH 6.8 では, 何れの菌に対しても活性は弱い, pH 7.5 にて *Propionibacterium* に対して強い活性が見られた. pH 7.5 では, 槐花の主成分である Ru が 40 mg/ml で 18—20 mm (阻止円直径) の活性を示し, この pH における活性は Ru によるものであると推察された. しかし, 槐花の pH 5.5 における強い活性については報告もなく, また, 我々が調べたところ Ru は, pH 5.5 では全く活性を示さず, 槐花の成分で抗菌活性の報告のある Qu も同 pH では極弱い活性 (阻止円直径 9

TABLE I. Antibacterial Activity of Crude Drugs against *Propionibacterium* at pH 5.5

Crude drugs	Test organism		
	<i>Propionibacterium acnes</i> (ATCC 11828)	<i>Propionibacterium acnes</i> (ATCC 11829)	<i>Propionibacterium avidum</i> (ATCC 25577)
Sophorae Flos	18.5 ^{a)}	15.0	18.0
Lithospermi Radix	12.0	9.0	14.5
Lycii Radix Cortex	8.0 ^{b)}	8.0	8.0
Artemisia argyi Folium	10.0	(10.0) ^{c)}	11.5
Perillae Folium	10.0	8.0	10.5

Agar diffusion method was used. Ethanol extract equivalent to 25 mg crude drug was applied to paper disc in each experiment.

a) Diameter of inhibitory circle (mm).

b) No apparent inhibitory zone was observed because the diameter of disc is 8 mm.

c) A small number of colony of the test organism was present in the inhibitory zone.

TABLE II. Antibacterial Activity of EtOH Extract of Flower Buds of *Sophora japonica* L.

Bacteria (strain)	pH of medium		
	5.5	6.8	7.5
<i>Propionibacterium acnes</i> (ATCC 11828)	18.5 ^{a)}	11.0	18.5
<i>Propionibacterium acnes</i> (ATCC 11829)	15.0	10.0	12.0
<i>Propionibacterium avidum</i> (ATCC 25577)	18.0	12.5	20.5
<i>Escherichia coli</i> (K-12)	(13.0) ^{b)}	(9.5)	n.d. ^{c)}
<i>Staphylococcus aureus</i> (FDA 209P)	13.5	9.5	n.d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (strain K-A)	(9.0)	8.7	n.d.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (strain K-B)	10.7	9.5	n.d.

A method of measurement for activity was explained in Table I.

a) Diameter of inhibitory circle (mm).

b) A small number of colony of the test organism was present in the inhibitory zone.

c) Not done.

mm) しかなかった。そこで、この活性物質を精製するべく、試験菌に *P. avidum* を用い、pH 5.5 にて以下検討を行った。

尚、エタノール抽出物の濃度と活性の関係 (Fig. 1) より、活性物質の濃度が 2 倍になると、阻止円が約 3.5 mm 増すことがわかった。

3. 活性物質の精製

精製過程および画分の抗菌活性を Chart 1 に示した。

まず、EtOH 抽出物 93 g を Sephadex LH-20 クロマトグラフィーで処理し、溶出液をシリカゲル TLC [溶媒系一(1)] にて確認し、次の 5 つに分画した。A (Ru 以前に溶出する区, 21.2 g), B (Ru 溶出区, 55.0 g), C (B と D の間, 1.4 g), D (*R_f* 0.62 の one spot, 0.6 g), E (*R_f* 0.51 の one spot, 2.3 g)。活性は E のみにわずかに見られるのみで、他の 4 つの画分には認められず、抽出物の活性が消失してしまったかのように思えた。ところが、E と B を混合すると、

活性は粗抽出物のその 100% 発現された。E は TLC, UV にて標品の Qu と一致し、E の代わりに Qu を用いて、活性が同様に発現し得ることも確認された。この結果より、B 中に Qu と協同して抗菌作用を示す成分の存在が明らかであり、この成分につき検討した。以後、バイオアッセイは常に Qu を共存させて行った。

B を水に懸濁させ、10% MeOH クロロホルム溶液で溶媒抽出し、クロロホルム画分 F (7 g) を分離したところ、活性は水溶性画分 G (48 g)に残った。

G には Ru が多量含まれていると予想されたので、希 MeOH より析出せしめ、析出物 H (22 g) および上清 I (26 g) を得る。H は TLC, UV にて標品の Ru と一致した。H と Qu との混合によって、活性は Qu 単独の場合より増加したが、元の粗抽出物の 50% にしか達しなかった。一方 I は、Qu との混合で、100% の活性を再現できた。この結果より、Ru にも活性はあるが、それ以外にもより強力な協同作用を示す成分が I 中に存在することが示唆された。

そこで、さらに I をポリアミドでカラムクロマトグラフィーを行い、溶出液をシリカゲル TLC [溶媒系一(2)] およびポリアミド TLC [溶媒系一(4)] にて成分確認し、J (K 以前の溶出区, 2 g), K (シリカゲル TLC で *R_f* 0.59, ポリアミド TLC で *R_f* 0.52 の one spot, 4 g), L (Ru, 22 g) の 3 つに分画した。活性は Qu+K で Qu+Ru より強い活性が得られたが、粗抽出物の約 70% の活性に留まった。そこで、Qu, J, K, L について再度組み合わせを試みたところ、Qu+K+L の 3 者混合にて、100% の活性が発現した。さらに、L の代わりに標品の Ru を用いて上記の活性を確認し、その抽出液の活性が Qu+K+Ru にて得られることが判った。K は、溶媒系 (2), (4) の TLC では one spot であるが、溶媒系を変えたシリカゲル TLC [溶媒系一(3)] では、2 成分を示した。そこで、K をシリカゲルクロマトグラフィーで分離し、M (2.8 g), N (0.3 g) を得た。粗抽出物の活性は、Qu+Ru+M にて 100% 再現でき、Qu+Ru+N では、Qu+Ru (粗抽出物の 50%) と変わらなかった。この結果より活性に N は関与しないことが判った。

M は呈色反応、UV パターン、糖反応によりフラボノイド配糖体であることが示唆され配糖体およびアグリコンの UV, EIMS, ¹H-NMR さらに糖の GC を測定して、標品又は文献値と比較し、isorhamnetin-3-rutinoside (I-r) と同定した。また、N は M と同様に測定して、kaempferol-3-rutinoside (K-r) と同定した。尚、このものは粗抽出物中の濃度では活性を有しないが濃度を増加して調べた実験により、I-r より程度は弱い、Qu+Ru との混合による抗菌活性増強作用を有することが確認された。

以上のことより、槐花 EtOH 抽出物の抗菌作用は、Qu, Ru, I-r の 3 成分による協同作用によることが判った。尚、エンジュの花のフラボノイド配糖体については、I-r, K-r の存在は新知見である。

Fig. 1. Relationship between Activity and Concentration of EtOH Extract of Flower Buds of *Sophora japonica* L.

Concentration of 1/1 is 332 mg of extract/ml.

Chart 1. Purification Procedure and Activity

Qu, quercetin; Ru, rutin; MEK, methyl ethyl keton; AcAc, acetylacetone.

a) Agar diffusion method was used. The amount of each sample applied to paper disc was as follows: ethanol extract and fractions A—N, equivalent to 25 mg crude drug; Qu, 0.2 mg (equal to the content in fraction E); Ru, 2 mg (equal to the content in fraction L).

b) Diameter of inhibitory circle (mm).

c) No apparent inhibitory zone was observed because the diameter of disc is 8 mm.

4. pH と活性の増強作用

培地 pH と活性の関係は Table III のようになり、pH 5.0—8.0 の広い範囲にわたって、3 成分混合による活性増強が認められたが、特に酸性度が強くなる程その効果は著しかった。

5. 相互作用のメカニズムの解析

活性の発現増強には、Qu が必須であること、弱酸性では Qu のみが弱い活性を有すること、また、TLC の結果からは 3 成分 (或いは 2 成分) の混合によって新しい物質が生成している様子がないこと等を考え合わせて、

TABLE III. Antibacterial Activity of Flavonoids at Various pH Conditions

Flavonoids (mg/ml)	pH						
	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
Quercetin (0.2)	11 ^{a)}	9	8 ^{b)}	8	8	8	10
Rutin (1)	8	8	8	8	8	12	14
Isorhamnetin-3-rutinside (0.5)	8	8	8	8	8	8	8
Mixture ^{c)}	23	16	10	9	10	12	15

a) Diameter of inhibitory circle (mm).

b) No apparent inhibitory zone was observed because the diameter of disc is 8 mm.

c) Quercetin (0.2)+rutin (1)+isorhamnetin-3-rutinoside (0.5).

TABLE IV. Enhancement of Antibacterial Activity of Quercetin by the Addition of Rutin in Liquid Culture Media

Quercetin added ($\mu\text{g/ml}$)	Rutin added ($\mu\text{g/ml}$)	Bacterial growth (Δ turbidity)	Inhibition (%)
25	0	141 ^{a)}	46
50	0	142	45
100	0	136	48
25	500	131	50
50	500	53	79
100	500	34	87
0	500	262	0
Control (no addition)		262	—

The flavonoid was added to culture medium (GAM), kept overnight at 35°C, and then insoluble material was removed by centrifugation. *Propionibacterium avidum* was inoculated to the supernatant, and the growth was measured by Klett-Summerson Colorimeter for turbidity (using 660 nm filter) after 18 h.

a) The reading of Klett-Summerson Colorimeter.

また、この時の培地中の Qu 濃度を測定したところ、Table V に示したように、Ru 添加によって Qu 濃度が約 5 倍増加していることが示された。

以上の結果より、Qu と Ru の相互作用による抗菌活性増強は、Ru によって Qu の溶解度が増し、Qu 量が増加したことによるものであることが判った。

また、I-r についても構造の類似性から見て Ru と同様の作用があると思われ、Qu と Ru と I-r の 3 者による活性増強も同様の機作によって起こっていると考えられる。

謝辞 Isorhamnetin, isorhamnetin-3-rutinoside の標品を分与下さった東京薬科大学 糸川秀治教授並びに押田喜昭博士に深謝致します。また、御鞭撻いただいた当研究所長務台方彦博士、aryl- β -glycosidase を分与下さった当研究所西宮分室の山地チカ子氏、¹H-NMR および EMIS の測定をそれぞれして下さいました当研究所の野方健一郎、木村一雅両氏に感謝いたします。

引用文献および注

- 1) 第 26 回日本薬学会関東支部会にて発表、東京、1982 年 11 月。
- 2) 朝田康夫，“臨床細菌学，講義編，”小沢 敦，坂崎利一，玉熊正悦，波岡茂郎，松本文夫編，講談社，1977，pp. 71—84；徳田安章，皮膚と美容，8，1256 (1976)；T. B. Fitzpatrick, A. Z. Eisen, K. Wolff, I. M. Freedberg, K. F. Austen (ed.), “Dermatology in General Medicine,” McGraw Hill Inc., New York, 1979, p. 1416.

TABLE V. Increase in Solubility of Quercetin by the Addition of Rutin

Quercetin added ($\mu\text{g/ml}$)	Rutin added ($\mu\text{g/ml}$)	Concentration of quercetin in the culture medium ($\mu\text{g/ml}$)
100	0	4.03 $\pm$ 0.09
100	1000	19.87 $\pm$ 0.56

The flavonoid (excess amount) was added to culture medium (GAM), kept overnight at 35°C, and then insoluble material was removed by centrifugation. The content of quercetin in the supernatant was determined by the absorbance at 373 nm after extraction with ethyl acetate.

Qu の活性発現を Ru, I-r がなんらかの形で助長していると推察された。

そこで、液体培地においても同様の結果が得られるか否かを、Qu と Ru による相互作用をモデルにして検討した。その結果、Table IV に示したようにペーパーディスク法と同様、Qu のみに活性が現れ、Ru の添加によって活性が増強されることが判った。

- 3) N. B. Esterly, N. L. Furey, *Pediatrics*, **62**, 1044 (1978); A. M. Kligman, *J. Invest. Dermat.*, **62**, 268 (1974); 安田利顯, 皮膚病診療, **1**, 296 (1979); K. T. Holland, E. Ingham, W. J. Cunliffe, *J. Appl. Bact.*, **51**, 195 (1981).
- 4) 難波恒夫, “原色和漢藥図鑑 (下),” 保育社, 1980, p. 111; 江蘇医学院 (編), “中藥大辭典,” 上海人民出版社, 下冊, 1977, p. 2433.
- 5) 稲垣 勲, 嶋田玄彌, 嶋野 武, 長沢元夫, “生薬学,” 南江堂, 1974, p. 122.
- 6) 鈴木良夫, 岐阜医科大学紀要, **10**, 123 (1963).
- 7) H. C. Yang, H. H. Chang, T. C. Weng, *J. Formosan, Med. Assoc.*, **52**, 109 (1953) [*C.A.*, **47**, 8175b (1953)].
- 8) T. J. Mabry, K. R. Markham, M. B. Thomas, “The Systematic Identification of Flavonoids,” Springer, Berlin, 1970.