U. D. C. 615.762.1-092.257:577.164.14

274. 後藤 実：生物試験法による生薬ならびに生薬方剤の研究 その7** 王乳中の
ニコチン酸ならびにパントテン酸様因子（有用天然物成分の研究 第8報*）

Minoru Goto: Studies on Useful Components in Natural Sources. VIII.
Studies on Crude Drugs and Oriental Crude Drug Preparations by
Bioassay. (7). Niacin and Pantothenic Acid in Royal Jelly.

(Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.***)

Nicotinic acid and pantothenic acid-like factor in royal jelly were examined by paper chromatography and microbiological assay. Nicotinic acid-like factor in royal jelly was found to be composed of 70 γ /g. of nicotinamide-like factor and 18 γ /g. of free nicotinic acid by the differential assay using *Lactobacillus arabinosus* and *Lact. fructosus* 353, which cannot utilize nicotinic acid for growth but requires nicotinamide. This nicotinamide-like factor was further observed to be composed of nicotinamide and some other nicotinamide-like factor that gives about the same activity as nicotinamide to these two kinds of microorganisms. Examination of the pantothenic acid-like factor in royal jelly by the foregoing method using *Lact. arabinosus* showed that this factor gives a spot on a paper chromatogram with the same Rf value as that of standard pantothenic acid. The rate of recovery calculated from the amount spotted was about 90%. The presence of a conjugated pantothenic acid and phosphatase activity in royal jelly were not indicated respectively by digestion with diastase and examination with T.D.P.

(Received July 5, 1956)

王乳はミツバチの女王蜂の発育に重要な役割をもつものであるが、幼虫期における飼料としての王乳の栄養的意義ならびに医薬品としての応用は多くの人々によつて研究されている。

王乳中の VB 群に関しては極めて多くの報告が見られるが、これらビタミンの定量成績の大部分は遊離型ビタミンを標準として試験した換算値が示されているにすぎない。

しかしながら天然物にはこれらと類似の作用を示す類縁物質または他の異なつた物質が混在する可能性も考えられる。著者は日本産王乳中のニコチン様因子をいろいろの方法でしらべ、本品が従来報告されているニコチンそのものではないことを明らかにしたり、いろいろの新しい試験法を応用することによつて、生薬中の微量成分あるいはその組成をより詳細に知ることが生薬の効果を探究する上に重要であると考え、本報では新しく発見された乳酸菌 (*Lactobacillus fructosus* 353) と paper chromatography (以下 PPC) とを併用して王乳中のニコチン酸様因子およびパントテン酸様因子についてしらべた成績を報告する。

I. 王乳中のニコチン酸様因子 ニコチン酸およびニコチン酸アミドは diphosphopyridine nucleotide (D PN) あるいは triphosphopyridine nucleotide (TPN) の構成要素として広く天然物中に存在する。そこで両者の天然物中に存在する割合を検討することは生化学上意義があり興味あることである。また微生物では、あるものはニコチン酸を、他のものはニコチン酸アミドを生育のため必要とすることが知られている。例えば *Staphylococcus aureus*, *Bacillus dysenteriae* 等は同じ濃度ではニコチン酸よりもニコチン酸アミドによつてよりよく発育するが、他方 *Leuconostoc mesenteroides* 9135 はある濃度ではニコチン酸に感じるが、同濃度のニコチン酸アミドでは発育し得ない。

王乳中のニコチン酸様因子については Cheldelin, Haydak, Kitzes, Vivino 等²⁾の報告が見られ、これらはすべてニコチン酸としてその試験値を示している。著者は王乳中にこの種の因子がどのような状態で含まれるか

* 本研究は立岡末雄：有用天然物成分の研究 (Sueo Tatsuoka: Studies on Useful Components in Natural Sources) の一部である。第7報：武田研究所年報 14, 92(1955)。

** その6：本誌 76, 429(1956)。

*** Jnso-nishino-cho, Higashiyodogawa-ku, Osaka.

1) 後藤：本誌 76, 423, 426(1956)。

2) Tage S.K. JoHansson: Bee World 36, 1(1955)。

† 当研究所においても *L. arabinosus* を用いてニコチン酸およびパントテン酸様因子をしらべ報告した。

渡辺：本誌 75, 90(1955)。

をより明らかにしようとした。ニコチン酸およびニコチン酸アミドの分離定量には種々の方法があるが、ニコチン酸では発育せずニコチン酸アミドを発育に要求する菌は少なく、微生物試験の操作はかなり繁雑である。最近児玉³⁾は乳酸菌の1新株を分離し、本菌がニコチン酸では発育せず、かつある濃度ではニコチン酸アミドの量に対応して発育することを報告した。著者はこの菌 (*Lactobacillus fructosus* 353) と、ニコチン酸、ニコチン酸アミドおよび DPN 等の結合型をも発育に利用し得る *Lactobacillus arabinosus* とを用いて王乳中のニコチン酸およびニコチン酸アミド群の分離定量を行つた。すなわち王乳の水溶液を検液とし、ニコチン酸およびニコチン酸アミドを標準として *L. arabinosus* ならびに *L. fructosus* でしらべ、前者の菌によるニコチン酸換算値 88 γ /g、後者の菌によるニコチン酸アミド換算値 70 γ /g を得た。前者の菌による試験値には後者の試験値も含まれている。従つてこの試験成績から考えると従来ニコチン酸として報告されている王乳中の因子中遊離型ニコチン酸として含まれるものは少なく、むしろ大部分がニコチン酸アミド様因子として存在している。本実験において、*L. arabinosus* でしらべた王乳中のニコチン酸換算値は文献²⁾に記載されている外国産王乳中のニコチン酸含量とはほぼ等しい値を示している。*L. fructosus* に活性を示す因子がニコチン酸誘導体であるかどうかを確かめるため、王乳を HCl で加水分解した後この溶液について *L. arabinosus* ならびに *L. fructosus* に対する活性をしらべたところ、後者の菌には全く活性を示さず、前者の菌に対しては加水分解する以前とほぼ等しい活性を示した。すなわち王乳中のニコチン酸アミド様因子が大部分ニコチン酸に変化したものと考えられる。

PPC と microbiological assay とによるニコチン酸様因子の検討 以上の実験成績から王乳中のニコチン酸様因子がニコチン酸と、より多量のニコチン酸アミド様の活性を *L. fructosus* に与える因子とからなることをうかがい得る。著者はこれらの因子をさらに明らかにする目的で PPC と microbiological assay とを併用してしらべた。すなわち一定量の王乳を沓紙帯に塗布し、1.5 N NH₃ を飽和したブタノールを展開溶剤として常法により PPC を行つた後、*L. arabinosus* ならびに *L. fructosus* を用い、これらの菌に活性を示す因子をしらべた。同時に標準のニコチン酸ならびにニコチン酸アミドを同一条件で PPC にかけて、これらのビタミンの R_f 値をしらべた。これらの試験で得られた成績を Fig. 1 に示す。この成績が示す通り、標準のニコチン酸およびニコチン酸アミドはそれぞれ R_f 0.2~0.3, 0.6~0.8 に活性を示し、原点ならびにその他の部分には全く発育部を認めない。また *L. fructosus* ではニコチン酸を展開した沓紙上に発育部を認めない。PPC と microbiological assay とによつて、これら標準ビタミンの沓紙からの回収率は塗布した量に対し 75~85% を示した。他方王乳を塗布した沓紙からは、*L. arabinosus* に対する3つの発育部が、*L. fructosus* では2つの発育部が認められた。これらのうち R_f 値の大きいものはニコチン酸アミドと一致した。*L. arabinosus* に活性を示し、*L. fructosus* には発育を示さない部分はニコチン酸の R_f 値と一致する。他の1つは本実験に用いた溶剤では移動せず、*L. arabinosus*、*L. fructosus* の両者に活性を示すものである。これらの成績から王乳中にはニコチン酸、ニコチン酸アミドならびに他のニコチン酸アミド様因子が存在することになる。PPC で展開後試験した値からそれぞれの含量比を求め

Fig. 1. Paper Chromatograms of Niacin, Niacinamide, and Royal Jelly

Test Org. (a) : *L. arabinosus*
(b) : *L. fructosus*

3) 児玉：農化 30, 219 (1956).

ると、ニコチン酸は約 13%，ニコチン酸アミドは約 45%，原点にとどまる因子のニコチン酸アミド換算値約 42% となる。すなわち王乳中の遊離型ニコチン酸は少なく、ニコチン酸アミド群が大部分である。原点にとどまる因子はおそらく DPN, TPN の部類に属するものであらうと推察されるが、本因子の詳細はさらに研究中である。

II. 王乳中のパントテン酸様因子 王乳中にパントテン酸が豊富に含まれることはかなり古くから注目されており、微量試験法でしらべた多くの報告が見られる^{2,4)}。著者は日本産王乳中のパントテン酸様因子を *L. arabinosus* を用いて試験したパントテン酸換算値として 200 γ /g を得た。すでに述べた通り王乳中のビオチンならびにニコチン酸では直接水溶液を検液としてしらべた換算値が必ずしも標準として用いたビタミンとは一致しない。パントテン酸ではどうかをしらべるため、標準パントテン酸 Ca 塩ならびに王乳の一定量をそれぞれの濾紙帯に塗布し、酢酸：水：ブタノール (1:5:4) で PPC を行つた後 *L. arabinosus* を用いて試験し Fig. 2 に示す成績を得た。すなわち王乳中のパントテン酸様因子は標準パントテン酸と同じ Rf 値を示し、この部分以外には発育因子の存在を認めない。また PPC 後の濾紙から得られるパントテン酸はいずれも塗布した量から算出して約 90% である。

Fig. 2. Paper Chromatograms of Standard Pantothenic Acid and Royal Jelly

III. 王乳中の Co-A[†] および Phosphatase 様因子の検討 以上の実験成績から王乳中には多量の遊離型パントテン酸が含まれる。他方王乳中の Co-A については Kaplan 等⁵⁾ の報告があり Co-A は含まれないと報告している。最近 Pellegrini 等⁶⁾ はタカジアスターゼとパバインとを用いて試験し、人乳中に Co-A が含まれると報告した。著者はタカジアスターゼで王乳を消化し、消化の前後におけるパントテン酸を *L. arabinosus* でしらべ結合型パントテン酸の有無を検討し Table I の成績を得た。

Table I. Behavior of Pantothenic Acid Activity by Taka-diastase Digestion

	Royal jelly 5 mg./cc.	Takadiastase (0.2%)		H ₂ O	Pantothenic acid	Recovery : Obtained by addi- tion of standard pantothenic acid
		pH 4.5	pH 7.5			
Royal jelly	1 (cc.)	— (cc.)	—	1 (cc.)	0.86 (γ)	103 (%)
Royal jelly + Takadiastase	1	1	—	—	0.88	102
"	1	—	1	—	"	102
Takadiastase	—	1	—	1	$\pm$	ca. 110
"	—	—	1	1	$\pm$	ca. 95

Table I の成績によれば王乳中には、この種の条件で消化される結合型パントテン酸は含まれない。従つて王乳中のパントテン酸はすべて遊離型で存在することとなる。この成績と関連して王乳中に conjugase の作用を

4) P. B. Pearson, C. J. Burgin : Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **48**, 415 (1941).

† Co-A : Coenzyme A.

5) N. O. Kaplan, F. Lipmann : J. Biol. Chem. **174**, 37 (1948).

6) U. Pellegrini, G. Chiari : Intern. Z. Vitaminforsch. **26**, 32 (1955).

する因子が存在しないかと考え、まず phosphatase が含まれるかどうかをしらべるため、その1例として thiamine diphosphate (TDP) の加水分解をチオクローム法でしらべ Table II の成績を得た。

Table II.

TDP 10 mg./cc.	Royal jelly 100 mg./cc.	1M Acetate-buffer pH 4.6	Takadiastase 10 mg./cc.	H ₂ O	Readings of fluorimeter		
					1 hr.	3 hrs.	19 hrs.
1 (cc.)	5 (cc.)	4 (cc.)	— (cc.)	10 (cc.)	6.0 (Blind 2.5)	6.5	10.0
"	0.5	"	—	14.5	5.0	4.5	5.0
"	—	"	2	13	62.5	64.5	65.0
"	—	"	—	15	5.5 (Blind 2.0)	—	4.0

この成績によれば TDP は王乳の添加によつて殆んど加水分解されない。従つて王乳中にはこの種の phosphatase は存在しないものと考えられる。以上の実験により王乳中のパントテン酸は、先にのべたピオチンあるいはニコチン酸の場合と異なり、水溶液についてしらべた換算値の大部分が、パントテン酸そのものであると見て大差なく、かつ Co-A あるいはある種の phosphatase が共存する可能性は少ない。

幼虫の飼料である王乳中に遊離型パントテン酸が極めて豊富に存在することは興味のあることである。

終りに終始御指導御鞭撻を賜つた研究所長桑田 智博士に謹謝する。また有益な示唆と助言を与えられた主任研究員渡辺 武博士、同田中邦喜博士、同大村栄之助博士および *L. fructosus* を恵与された児玉礼次郎氏ならびに鈴置二郎氏に謝意を表する。本研究に終始熱心に協力された野口友昭氏、堀内信枝嬢ならびに王乳採集に協力された木方、岸野、松原、森島の諸氏に深謝する。

実 験 の 部

試 料 王乳：1955 年5月岐阜市近辺で採集し（主な蜜源植物 ナタネナ、レンゲソウ）、採集直後ドライアイスで凍結し、以後氷室内に保存した。本品 100 mg を蒸留水にとかし全量 100 cc (pH 6.8) としたものを検液とした。

***L. arabinosus* と *L. fructosus* による microbiological assay** *L. arabinosus* によるニコチン酸様因子の試験は前記⁷⁾の方法を用いた。*L. fructosus* によるニコチン酸アミド群の試験は次の方法で行つた。

接種菌種：*L. fructosus* Strain No. 353.

培養液の組成 (double strength 100 cc)

Casamino acid (vitamin-free)	1 g	Fumaric acid	100 mg	V. B ₆ -CHO	400 γ
Fructose	4 "	Adenine	2 "	V. B ₆ -NH ₂	80 "
Glucose	2 "	"	"	Ca pantothenate	200 "
Na acetate	1 "	Guanine	"	PABA	100 "
Cysteine	40 mg	Uracil	"	Biotin	1 "
Tryptophan	"	Xanthine	"	Folic acid	100 "
Asparagine	20 "	V. B ₁	200 γ	Tween-80	3 滴
Methionine	"	V. B ₂	"	A 液, B 液 ⁺	各 1 cc
Ascorbic acid	100 "	V. B ₆	400 "	pH	6.8

標準曲線：標準ニコチン酸アミドの添加量 0, 0.01, 0.02, 0.04, 0.07, 0.1, 0.15, 0.2 (γ/tube).

培養温度と時間：35° で 42 時間。

測定法：Coleman spectrophotometer (650 mμ) で濁度を測定。その他の操作は microbiological assay の常法を用いた。

王乳中のニコチン酸アミド様因子の加水分解：王乳 100 mg に 2 N HCl 5 cc を加え、15 lbs., 1 時間処理し、NaOH 溶液を加えて pH 6.8 とした後蒸留水を加えて全量を 100 cc とした。

PPC による分離ならびに発育因子の検出 標準ニコチン酸、ニコチン酸アミドならびに新鮮な王乳の一定量をそれぞれの濾紙帯（東洋濾紙 No. 131, 3×45 cm）に塗布、1.5 N NH₃ を飽和したブタノールを展開溶剤とし、常法で PPC を行つた（下降法、室温 17 時間）。濾紙を乾燥後 10 等分し（ただし試料を塗布した部分は 10 等分した後別に切りとる）、塗布したビタミン量（王乳の場合には水溶液についてしらべた換算値から塗布した試料中の含量を算出する）を考慮し、各切片に蒸留水を加えて抽出、抽出液中のビタミン含量が 0.05~0.2 γ/cc になるようにし、これらの検液について microbiological assay を行い、発育因子の部位ならびにビタミン換算値を算出。パントテン酸の試験には展開溶剤として酢酸：水：ブタノール（1：5：4）を用い、前記の方法であらかじめ発育部位をしらべた後さらに発育部位を 7 等分し各切片の抽出液について試験した。

7) 渡辺、後藤：本誌 73, 422 (1953)。

⁺ A 液, B 液の組成は渡辺、後藤：本誌 73, 419 (1953) と同じである。

タカジアスターゼによる消化試験および phosphatase の検討 タカジアスターゼ (M. GJ 631) の 0.2% 溶液 (pH 4.5 および pH 7.5) に王乳溶液を加え 37° で 20 時間放置した後, 溶液を pH 6.8 とし, 常法により microbiological assay でしらべた. phosphatase 活性因子の試験には Table II に示す各溶液を 37° にそれぞれの時間放置した後 2 cc をとり, 20% メタリン酸溶液 1 cc を加え, その混液から 0.5 cc をとり, 水 2 cc, BrCN 液 3 cc, 30% NaOH 2 cc を加えた混液にブタノール 6 cc を加えて振りまぜた後ブタノール層の螢光度をしらべた.

武田薬品工業株式会社研究所

U. D. C. 547.659.2'435'532 : 615.782

275. 藤村 一, 杉井通泰, 菅 敬二郎, 石川正昭, 浅井一夫: テトラリン誘導体の
合成並びに薬理学的研究 (第2報¹⁾)

Hajime Fujimura, Michiyasu Sugii, Keiji Suga, Masaaki Ishikawa, and
Kazuo Asai: Studies on Syntheses and Pharmacological Action
of Tetralin Derivatives. II.

(Institute for Chemical Research and Department of Pharmacology, Medical Faculty,
University of Kyoto*)

Four kinds of dialkylaminoethyl ether and thioether derivatives of β -tetralylphenylmethane were prepared for use in pharmacological test. None of these compounds offered better activities as compared to diphenhydramin hydrochloride in the point of toxicity, analgesia, etc., but their local anesthetic activity was quite marked, showing stronger action than that of cocaine. However, local irritation was also observed at the same time.

(Received July 10, 1956)

第1報¹⁾に引き続き, 著者等は phenyl (α - β -tetralyl) ketone (I) を出発原料として, β -dimethylaminoethyl α -(α - β -tetralyl) benzyl ether $\cdot$ HCl (III), β -diethylaminoethyl α -(α - β -tetralyl) benzyl ether $\cdot$ HCl (IV), β -dimethylaminoethyl α -(α - β -tetralyl) benzyl sulfide $\cdot$ HCl (VII), β -diethylaminoethyl α -(α - β -tetralyl) benzyl sulfide $\cdot$ HCl (VIII) を合成した. これら 4 種の誘導体は, 抗ヒスタミン剤として既知のベナドリン β -dimethylaminoethyl benzhydryl ether $\cdot$ HCl (以下塩酸ジフェンヒドランミン) の構造の一部を修飾したも

* Yoshidakonoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto.

1) 本誌 74, 954(1954).