薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
97 (11) 1240-1245 (1977)

UDC 547.29.02.05 : 615.276.011.5 : 576.852.1.098

Streptomyces sp. の菌体から抗炎症成分としての脂肪酸類の分離と同定¹⁾

三村 務, 大西 昇, 豊田 繁, 武藤徳男, 青沼 繁
大阪大学薬学部²⁾

Separation and Identification of Fatty Acids as Anti-inflammatory Principle from Mycelium of *Streptomyces* sp.¹⁾

TSUTOMU MIMURA, NOBORU ONISHI, SHIGERU TOYODA,
NORIO MUTO and SHIGERU AONUMA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University²⁾

(Received May 11, 1977)

Erythrocyte membrane stabilizing fraction (EMSF) was purified from the acetone extract of the mycelium of *Streptomyces* sp. F4818 by the combination of chromatography on silica gel and preparative thin-layer chromatography on silica gel.

1) Heat-induced hemolysis was significantly inhibited by EMSF at a concentration of 2 µg/ml and the hypotonic hemolysis was also inhibited by about 50% at a concentration of 12 µg/ml of EMSF.

2) EMSF showed high anti-inflammatory activity for carrageenin-induced edema in the hind paw of rats at the oral dose of 50 mg/kg.

3) It was proved that EMSF was a fatty acid mixture, consisting of C_{14:0}, iso- or anteiso-C_{14:0}, C_{15:0}, iso C_{15:0}, C_{16:0}, iso-C_{16:0}, iso- or anteiso-C_{17:0}, C_{18:0}, and C_{18:1} from the result of gas chromatography-mass spectra (GC-MS) analysis on their methyl esters.

4) Palmitic acid, the main fatty acid component in EMSF, markedly suppressed the heat-induced, hypotonic hemolysis *in vitro* and carrageenin-induced edema *in vivo*.

Keywords—*Streptomyces* sp.; anti-inflammatory effect; fatty acids; hypotonic hemolysis; heat-induced hemolysis; anti-carrageenin edema; GC-MS; palmitic acid; iso fatty acids; anteiso fatty acids

著者らは放線菌の産生する生理活性物質として、これまでに *Streptomyces bottropensis* から胃液分泌抑制物質 (GIS)^{3,4)} *Streptomyces aureomonopodialus* から細胞膜溶解作用を示す monopodialysin⁵⁾ を単離し報告した。

放線菌の産生する抗炎症作用物質としては現在までに leupeptin,⁶⁾ chymostatin,⁷⁾ antipain,⁸⁾ pepstatin⁹⁾ のような酵素阻害物質, bradykinin 水解活性をもつ中性プロテアーゼとして kinonase,¹⁰⁾ ritikinonase¹¹⁾ などが知られている。著者らはこれらの既知物質とは性質の異なる抗炎症活性成分を得る目的で, ラット赤血球膜安定

1) 第一回天然薬物の開発と応用シンポジウム, 東京, 1976 年 8 月。

2) Location: 133-1 Yamadakami, Suita-shi, Osaka.

3) 三村 務, 武藤徳男, 出口悦子, 大藪和子, 近藤繁美, 青沼 繁, 薬誌, **96**, 621 (1976)。

4) T. Mimura, N. Muto, J. Tanaka, H. Oshita, N. Onishi, S. Aonuma, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **25**, 897 (1977)。

5) T. Mimura, Y. Oda, E. Miyamoto, N. Onishi, S. Aonuma, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 投稿中。

6) T. Aoyagi, S. Miyata, M. Nanbo, F. Kojima, M. Matsuzaki, M. Iskizuka, T. Takeuchi, H. Umezawa, *J. Antibiot.*, **22**, 558 (1969)。

7) H. Umezawa, T. Aoyagi, H. Morishima, S. Kunimoto, M. Matsuzaki, M. Hamada, T. Takeuchi, *J. Antibiot.*, **23**, 425 (1970)。

8) H. Ikezawa, Y. Yamada, T. Aoyagi, T. Takeuchi, H. Umezawa, *J. Antibiot.*, **25**, 738 (1972)。

9) T. Aoyagi, S. Kunimoto, H. Morishima, T. Takeuchi, H. Umezawa, *J. Antibiot.*, **24**, 687 (1970)。

10) S. Nakamura, Y. Marumoto, H. Yamaki, T. Nishimura, T. Tanaka, H. Umezawa, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **17**, 714 (1969), **17**, 2044 (1969)。

11) S. Nakamura, M. Hamada, M. Ishizuka, H. Umezawa, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **18**, 2112 (1970)。

化作用を指標として 45 株の放線菌をスグリーニングし、その内の数株が有効成分を産生することを見出した。そしてこの内の一株 *Streptomyces* sp. F 4818 株の菌体から有効成分を単離し、その作用成分が脂肪酸であることを見出した。さらに、その主成分であるパルミチン酸がラット足蹠カラゲニン浮腫抑制活性を有することを見出したので報告する。

実験の部

使用菌株および培養条件 *Streptomyces* sp. F 4818 株、本菌株は大阪府下の土壌より分離された放線菌である。

1 l の振盪フラスコに次の組成の培地 (バレイショ澱粉 2.0%, ブドウ糖 1.0%, ポリペプトン 2.0%, 酵母エキス 0.2%, KH_2PO_4 0.2%, MgSO_4 0.001% in H_2O , pH 7.2) を 250 ml ずつ分注し、滅菌後 *Streptomyces* sp. F 4818 株の一白金耳を植菌して 30°, 125 rpm で 2 日間前培養し、得られた培養液の一定量を以下の培地 (バレイショ澱粉 2.0%, 乾燥酵母 [エビオス] 1.0%, pharmedia 1.0%) に植菌して 30°, 125 rpm で本培養を行なった。

赤血球膜安定化成分の産生 2—9 日間培養した各培養液を遠心分離して菌体と培養液に分離し、菌体はアセトン抽出し、抽出液は濃縮乾燥した。一方、液は *n*-BuOH で抽出し、抽出液を濃縮して検体とした。各日数の培養液からの各検体について以下に述べる方法でラット赤血球加熱溶血阻止活性を測定した。

活性分画の抽出、精製 本培養 4 日目の菌体を集め、菌体の約 3 倍量のアセトンを加えてワーリングブレンダーでホモゲナイズした後、加熱抽出した。この操作を 3 回くり返し、得られたアセトン抽出液を減圧下に溶媒を留去し、これを CHCl_3 抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけた (Wakogel C-200)。 CHCl_3 -アセトン系で段階的に溶出したところ 10% アセトン溶出液に赤血球加熱溶血阻止活性がみられたのでこれを濃縮し、以下の展開溶媒系 i) 石油エーテル: エーテル: AcOH (90: 10: 1) ii) 石油エーテル: エーテル: AcOH (90: 20: 1) で調製用 thin-layer chromatography (TLC) を行なった。この精製過程における生物活性はラット赤血球加熱溶血阻止活性を指標とした。調製用 TLC の結果得られた活性分画を赤血球膜安定化分画 erythrocyte membrane stabilizing fraction (EMSF) と命名した。EMSF の収量は菌体湿重量 400 g から約 100 mg であった。

ラット赤血球加熱溶血抑制試験 体重 200—300 g の Sprague-Dawley 系雄性ラットから得た新鮮な赤血球を用い、中西らの方法¹²⁾ にしたがって 0.15 M リン酸緩衝液に懸濁し、53°, 20 min 加熱し、検体なしの対照に対する阻止率を求めた。

ラット赤血球低張圧溶血抑制試験 体重 200—300 g の同系雄性ラットからの新鮮な赤血球を用い、Inglotらの方法¹³⁾ Fujii らの方法¹⁴⁾ に準じて測定した。

ラット赤血球に対する結合性の測定 各検体とラット赤血球を 0°, 20 min, incubate 後遠心分離し、その上清について残存している加熱溶血阻止活性を測定した。

ラット足蹠カラゲニン浮腫抑制試験 Van Arman¹⁵⁾ および Winter の方法¹⁶⁾ に従い行なった。すなわち各検体は生理食塩水に懸濁しカラゲニン注射 30 分前に経口投与した。カラゲニン (Picnin-A, Pasco International Corp.) は 1% 生理食塩水溶液とし各足蹠に 0.1 ml ずつ投与 (皮下注射) した。ラットは Sprague-Dawley 系、体重 120—150 g のものを用い、カラゲニン注射前の足容積に対する浮腫強度 (%) を求めた。

機器分析 Nuclear magnetic resonance (NMR) スペクトルは Parkin-Elmer R-22 (90 MHz) で測定、ケミカルシフトは TMS (tetramethylsilane) を内部標準とした。Infrared (IR) スペクトルは Hitachi EPI-G3 で測定した。Gas chromatography (GC) は Parkin-Elmer 800、カラムは 1.5% SE-52, 0.125 inch×6 ft、カラム温度 160° で測定した。分取ガスクロマトグラフィーは Varian-Aerograph Model 700 を用い、カラムは 10% SE-32, 0.375 inch×10 ft, 195° で行なった。Gas chromatography-massspectra (GS-MS) は Shimadzu LKB 9000 を用い、カラムは 1% OV-1, 3 mm×2 m, 170° で行なった。High resolution mass spectrum は JEOL-model JMS-01 SG で double focus で測定した。

EMSF のメチルエステル化とケン化 EMSF のメチル化は CH_3N_2 により行ない、反応成績物は IR, NMR, TLC (50% H_2SO_4 噴霧後加熱により検出) により確認した。EMSF メチルエステルのケン化は 10% KOH-MeOH で 60°, 30 min 行ない、未反応物をエーテル抽出して除き水層を HCl 酸性でエーテル抽出し、EMSF を得た。

12) 中西美智夫, 今村 博, 後藤一洋, 薬誌, **90**, 548 (1970).

13) A.D. Inglot, E. Wolna, *Biochem. Pharmacol.*, **17**, 269 (1968).

14) M. Murofushi, T. Sato, T. Fujii, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **21**, 1364 (1973).

15) C.G. Van Arman, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **150**, 328 (1965).

16) C.A. Winter, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **111**, 544 (1962).

結 果

***Streptomyces* sp. F 4818 による活性成分の産生パターンとその精製**

1—6 日間振盪培養した各菌体からのアセトン抽出物のラット赤血球加熱溶血阻止活性成分の産生パターンを Fig. 1 に示した。活性および収量ともに 3—4 日目にピークに達した。そこで以後の抽出原料として 4 日目の菌体を用いた。一方、培養液の *n*-BuOH 抽出物中には 1—6 日間を通じて活性成分はほとんど見出されなかった。

4 日目の菌体のアセトン抽出物から Chart 1 に示すごとき操作で精製を行ない、活性分画 erythrocyte membrane stabilizing fraction を得た。

Erythrocyte Membrane Stabilizing Fraction (EMSF) の性質

EMSF は以下の 4 種の展開溶媒系で TLC (Wakogel B-5 和光純薬製) にかけたところ単一のスポットを与えた。

i) CHCl_3 : MeOH (1:1 v/v), ii) CHCl_3 : MeOH: アセトン (75:25:5 v/v), iii) アセトン, iv) CHCl_3 : アセトン (1:1 v/v)。

また Sephadex LH-20 カラムによるゲル濾過でも単一のピークを与えた。

(1) EMSF の生物学的性質 EMSF のラット赤血球加熱溶血阻止活性は Fig. 2 に示したが多くの非ステロイド抗炎症剤が示すように低濃度で阻止効果, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で溶血促進という二相性作用を示した。

ラット赤血球低張圧溶血に対しても EMSF は強い阻止作用を示した (Table I)。さらにラット赤血球への結合性に関して検討した結果, 0.75—6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の EMSF とラット赤血球を preincubate 後, 遠心分離した上清中には加熱溶血阻止活性は全く残存していなかった。

次に *in vivo* での抗炎症効果をしらべるため, ラット足蹠カラゲニン浮腫抑制効果について検討を加えた。その結果, Fig. 3 に示したように, 経口投与で抑制活性がみられた。

EMSF はメチルエステル化されると加熱溶血阻止および低張圧溶血阻止活性は完全に消失し, ケン化すると再び活性を回復した。

(2) EMSF の化学的性質 EMSF は CHCl_3 , アセトン, エーテル, AcOEt, EtOH, に可溶で水に難溶, TLC プレート上で I_2 vapor, 50% H_2SO_4

mycelium (wet weight; 400 g)
| extraction with acetone
acetone extract
| chromatography on silica gel column
(solvent; chloroform/acetone)
10% acetone eluate
| preparative TLC
1) petroleum ether/ether/AcOH (90:10:1 v/v/v)
2) petroleum ether/ether/AcOH (90:20:1 v/v/v)
erythrocyte membrane stabilizing fraction (EMSF)
ca. 100 mg

Chart 1. Separation of Erythrocyte Membrane Stabilizing Fraction from Mycelium of *Streptomyces* sp. F 4818

Fig. 1. Productive Pattern of Active Principle by *Streptomyces* sp. F 4818

a) Inhibitory activity was determined on acetone extract (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, final conc.) from mycelium.
b) mg/mycelium from 250 ml of culture broth.

Fig. 2. Effect of EMSF on Heat-induced Hemolysis

TABLE I. Inhibitory Effect of EMSF on Hypotonic Hemolysis of Rat Erythrocyte *in Vitro*

Sample	Final concentration (μg/ml)	Inhibition of hemolysis ^{a)} (%)
EMSF	12	50.2±0.4
	6	32.4±4.4
	3	18.9±4.2
Phenylbutazone	4000	48.1±6.8
	2000	26.9±3.1
	1000	19.0±1.8
Acetylsalicylic acid	2000	38.8±9.8
	1000	26.0±3.5
	500	14.0±1.4

a) Mean±s.e. (n=3).

Fig. 3. Effect of EMSF by Oral Administration on Carrageenin-induced Hind Paw Edema in Rat

—○—: control (n=6), —●—: 50 mg/kg (n=6).
a) $p < 0.05$. b) $p < 0.01$.

Fig. 4. Gas-Liquid Chromatographic Separation of Methyl Ester of EMSF

Varian Aerograph.
Column size: 0.38 inch×10 feet.
Column packing: 10% SE-30 on 30/60 mesh Chromosorb W.
Flow rate: (H) 35 ml/min.
Column temp.: 195°.
Injection temp.: 200°.

TABLE II. Fatty Acids Containing in EMSF

Methyl ester	Mol. wt.	Mass fragment	Fatty acid
EMSF-Me-1	242	74, 87, 143, M-43, M-31, M-29	C _{14:0} Iso or Anteismyristic acid
EMSF-Me-2	242	74, 87, 143, M-43, M-31, M-29	C _{14:0} Myristic acid
EMSF-Me-3	256	74, 87, 143, M-43, M-31, M-29	C _{15:0} Isopentadecanoic acid
EMSF-Me-4	256	74, 87, 143, M-43, M-31, M-29	C _{15:0} Pentadecanoic acid
EMSF-Me-5	270	74, 87, 143, M-43, M-31, M-29	C _{16:0} Isopalmitic acid
EMSF-Me-6	270	74, 87, 143, M-43, M-31, M-29	C _{16:0} Palmitic acid
EMSF-Me-7	284	74, 87, 143, M-43, M-31, M-29	C _{17:0} Iso or Anteismargaric acid
EMSF-Me-8	296	55, 74, 87, M-116, M-74, M-32	C _{18:1} Oleic acid
EMSF-Me-9	298	74, 87, 143, M-43, M-31, M-29	C _{18:0} Stearic acid

Fig. 5. Inhibitory Effects of Palmitic Acid on Heat-induced Hemolysis and Hypotonic Hemolysis of Rat Erythrocyte

a) Heat-induced hemolysis.

b) Hypotonic hemolysis.

Fig. 6. Effect of Palmitic Acid by Oral Administration on Carrageenin-induced Hind Paw Edema in Rat

—○—: control ($n=20$). —□—: 100 mg/kg ($n=12$).
—△—: 50 mg/kg ($n=12$). —●—: 200 mg/kg ($n=12$).
a) $p<0.05$, b) $p<0.01$, c) $p<0.001$.

IR cm^{-1} (KBr): 2929, 2842, 1735, 1467, 1437, 1172. NMR (in CDCl_3) δ : 0.90, 1.30, 2.30, 3.70. UV_{max} (in MeOH) 225 nm. すなわち fr. d は palmitic acid methyl ester と同定された。

(2) 他の脂肪酸成分の同定 Palmitic acid 以外の脂肪酸成分については GC-MS により分析・同定した。EMSf メチルエステルは EMSf-Me 1—9 と表示した 9 成分よりなり、これらの成分の MS による分析結果を Table II に示した。C_{14:0} は myristic acid およびその iso あるいは anteiso 体であり、C_{15:0} は pentadecanoic acid および isopentadecanoic acid, C_{16:0} は palmitic acid とその iso 体, C_{17:0} は iso あるいは anteisomargaric acid であることを GC で明らかにした。なおこれらの isomer を含む脂肪酸の同定は標品と GC で retention time を比較し、同定を行なった。

で検出される。 UV_{max} : 225 nm; IR $\nu_{\text{CHCl}_3}^{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$ 2960, 2870, 1690, 1630; NMR スペクトルで 1.22 ppm に C₁₆₋₁₈ のメチレン, 0.85 ppm に末端メチル, 2.32 ppm にカルボキシル隣接メチレン (triplet) 5.33 ppm にオレフィニックプロトンの存在が認められ, D₂O 変換で -OH の存在が予測されたことから不飽和酸を含む低分子の脂肪酸混合物と考えられた。そこで GC 分析, GC-MS 分析を容易化するため, 常法に従いジアゾメタンでメチル化を行なった。EMSf メチルエステルは IR $\nu_{\text{CHCl}_3}^{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$ 2930, 2860, 1735 であり GC 分析の結果 Fig. 4 の如く少くとも 6 成分以上の存在が明らかとなった。

EMSf メチルエステルの GC による分離

そこで EMSf メチルエステルを分取ガスクロマトグラフィーにかけ, 主成分と考えられる fr. d について以下検討を加えた。

(1) fr. d の構造 分取した fr. d についてガスクロマトグラフィーを行ない, 夾雑物のないことを確認した後, 各種の機器による分析を行ない次のような結果を得た。High resolution mass spectrum Calcd. C₁₇H₃₄O₂: 270.25588, Found: 270.25604.

Palmitic Acid の生物活性

主成分である palmitic acid は加熱溶血阻止活性および低張圧溶血阻止活性を示し (Fig. 5), また経口投与で明らかにラット足蹠カラゲニン浮腫抑制活性を示した (Fig. 6).

考 察

抗炎症薬物のスクリーニング系として, 生体膜安定化を指標とした系を放線菌産生物質に適用した. その結果, *Streptomyces* sp. F 4818 株菌体のアセトン抽出物中に強いラット赤血球加熱溶血阻止, 低張圧溶血阻止活性成分が見出された. その活性分画 EMSF はまたラット足蹠カラゲニン浮腫法でも抑制活性を示した. この EMSF の化学的本体については palmitic acid を主成分とする脂肪酸類であることが明らかになった. これまでに微生物から次のような奇数炭素数および分枝脂肪酸が単離・同定されている. すなわち *Bacillus subtilis* からは iso C_{15:0}, iso C_{17:0} が斉藤ら¹⁷⁾ により, *Staphylococcus aureus* から iso C_{14:0}, anteiso C_{15:0}, C_{15:0}, C_{17:0}, C_{19:0} が植田ら¹⁸⁾ により報告されている他, MacLeod ら¹⁹⁾ により C_{13:0}, C_{15:0}, C_{19:0} が *Streptococcus lactis* から, Panos ら²⁰⁾ により C_{15:0}, C_{17:0} が *Streptococcus pyrogenes* から単離, 同定されている. また放線菌からは Ballio ら^{21,22)} により C_{14:0}, C_{15:0}, C_{16:0} の iso 体および anteiso 体が, 菊池ら²³⁾ によって iso C_{14:0}, iso C_{15:0}, anteiso C_{15:0}, iso C_{16:0}, iso C_{17:0}, anteiso C_{17:0}, C_{17:0} が単離・同定されている. しかし, これらの脂肪酸の膜安定化作用, 抗炎症効果についてはこれまで全く検討されていない.

一般に脂肪酸類は生体組織中で Glyceride あるいはリン脂質の component として存在するが, その生体膜との interaction の機構としては膜構成蛋白質との結合による安定化が考えられる. 水島ら²⁴⁾ によると phenylbutazone のような酸性抗炎症剤による赤血球膜安定化は膜の構成蛋白質と結合し, その熱変性を阻止することがその機構であるとしている. EMSF についていえば EMSF が methyl ester 化されるとその活性を消失するので, 活性発現には遊離のカルボキシル基が必要であると思われる. EMSF が加熱溶血阻止活性において示した作用の二相性については, Glenn,²⁵⁾ Seemann ら²⁶⁾ によってトランキライザーや抗ヒスタミン剤で同様な現象が報告されており, 高濃度の非ステロイド系抗炎症剤でも報告されているこのような作用の二相性の機構については, 高濃度の薬物がかえって生体膜を不安定にすると考えられているが直接的な証明はない.

主成分である palmitic acid については単独でも膜の安定化, カラゲニン浮腫抑制効果を有することを明らかにしたが, このような天然に広く分布する生体構成成分が薬理活性を示すことは興味深い. 今回単離・同定された脂肪酸類の炭素鎖数の長さと抗炎症効果との構造活性相関については, 続報に報告する予定である.

謝辞 本研究において貴重な iso 脂肪酸の標品を御恵与賜った富山大学和漢薬研究所 菊池徹教授, 脂肪酸の同定に関して GC-MS を測定して頂いた関西医科大学 斎藤国彦教授, また高分解能 MS の測定をして頂いた神戸女子薬科大学 伊藤允好助教, 齋木加代子講師に深く感謝します.

17) K. Saito, *J. Biochem.*, **59**, 186 (1966).

18) 植田伸夫, 平原義治, 山川民夫, “脂質生化学研究,” 1966, p. 31.

19) P. Macleod, J.P. Brown, *J. Bacteriol.*, **85**, 1056 (1963).

20) C. Panos, M. Cohen, G. Fagan, *Biochemistry*, **5**, 1461 (1966).

21) A. Ballio, S. Barcellona, L. Boniforti, *Biochem. J.*, **94**, 11c (1965).

22) A. Ballio, S. Barcellona, *Ann. Inst. Pasteur*, **114**, 121 (1967).

23) 菊池 徹, 三村鉄太郎, 森脇祥寿, 根来健一郎, 中沢昭三, 小野尚子, 薬誌, **93**, 658 (1973).

24) Y. Mizushima, S. Sakai, *J. Pharm. Pharmacol.*, **21**, 327 (1969).

25) E.M. Glenn, B.J. Bowman, J.C. Koslouske, *Biochem. Pharmacol.*, Supplement **1968**, 27.

26) P. Seemann, T. Weinstein, *Biochem. Pharmacol.*, **15**, 1737 (1966).