

プロポリス中の抗ヘリコバクター・ ピロリ活性物質について

伊藤 紀久夫・天宮 一郎
池田 修一・小西 正隆

プロポリスは、ミツバチが樹木のつぼみや樹脂とハチ自身のろう分を混ぜ合わせて作るもので、ハチヤニとも呼ばれ巣板の補強や防水のために使われている。プロポリスには、抗潰瘍、抗炎症、抗腫瘍、抗菌、血圧降下、免疫賦活など様々な作用が報告され、また活性物質の単離も行われている(水野ら, 1987; 清水, 1987; 松野, 1992)。

今回、プロポリスの抗潰瘍作用に関連し、胃炎・胃潰瘍などへの関与が示唆されているヘリコバクター・ピロリに対する抗菌活性を指標として、プロポリス中の活性物質の探索を行い、3種のフラボノイドを単離したので報告する。

方法

プロポリスは、中国産1種、アルゼンチン産1種およびブラジル産2種について調査した。分離に用いたシリカゲルは、Kieselgel 60 (70-230mesh) を Merck 社より購入した。

抗ヘリコバクター・ピロリ活性は、寒天平板希釈法により最小発育阻止濃度(MIC)を求めた(石井ら, 1987)。即ち、培地に7%ウマ脱繊維素血液加ブルセラ寒天培地を用い、約 2×10^7 CFU/ml に調整した *Helicobacter pylori* ATCC 43526 (NCTC 11916) 株の菌液をマイクロプランター(佐久間)で $5\mu\text{l}$ 接種した。培養はガスパックジャー(BBL)を用い、CampyPak ガス発生袋(BBL)により CO_2 15%、 O_2 5%の微好気とし、高湿度を維持し 37°C で4日間培養後、発育の有無により測定した。

分離フラクション等の抗ヘリコバクター・ピロリ活性は、阻止円法により比較した。即ち、サンプル50または $500\mu\text{g}$ を吸着させた $\phi 8\text{mm}$ の

ペーパーディスクを菌接種平板(菌濃度約 2×10^5 CFU/mlとした軟寒天培地を適量重層)に静置し、寒天平板希釈法と同様に培養後阻止円を判定した。

一般細菌や真菌の抗菌活性は、日本化学療法学会標準法に準じて行った。

結果

4種のプロポリスそれぞれ1.0gを取り、エタノール40mlで11日間室温で抽出し、ろ紙ろ過後、ろ液を減圧濃縮乾燥してエタノールエキスとし、ヘリコバクター・ピロリに対するMICを測定した。その結果、表1に示すようにアルゼンチン産プロポリスに最も強い活性が認められた。

よって、アルゼンチン産プロポリス16.05gをエタノール320mlで11日間室温で抽出し、ろ紙ろ過後、ろ液を減圧濃縮乾燥してエタノールエキス10.26gを得た(収率64.0%)。残査を更にジクロロメタン200mlで2日間室温で抽出し、同様にジクロロメタンエキス4.58gを得た(収率28.5%)。これらのエキスの抗ヘリコバクター・ピロリ活性を阻止円法で調べた結果、エタノールエキスは、 $50\mu\text{g}$ で直径21mmの阻止円を示したのに対して、ジクロロメタンエキスは、 $500\mu\text{g}$ で14mmの阻止円を示したが、 $50\mu\text{g}$

表1 プロポリス EtOH エキスの抗ヘリコバクター・ピロリ活性

| 産地 | 収率(%) | MIC($\mu\text{g}/\text{ml}$) |
|---------|-------|--------------------------------|
| 中国産 | 81.9 | 100 |
| アルゼンチン産 | 79.9 | 50 |
| ブラジル産A | 88.7 | >200 |
| ブラジル産B | 48.1 | 200 |

菌数: 2×10^7 CFU/ml

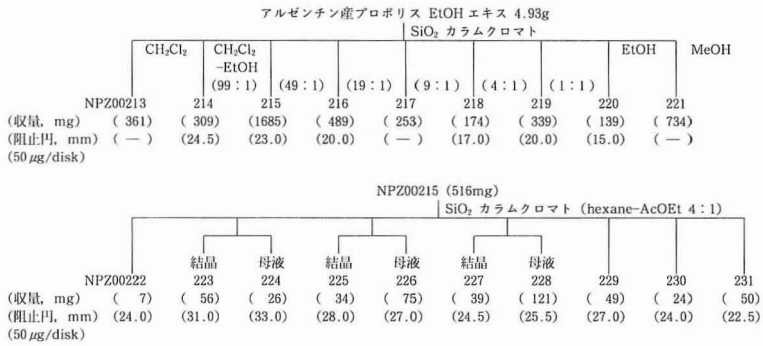


図1 プロポリスエキスの分画と抗ヘリコバクター・ピロリ活性

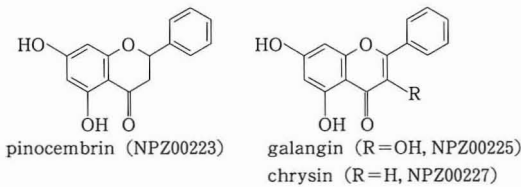


図2 プロポリスから単離した抗ヘリコバクター・ピロリ活性物質の構造

では阻止円は形成されなかった。

そこで、エタノールエキス 4.93g をシリカゲルカラムクロマト (CH₂Cl₂-EtOH) により、9 画分に分画し、これらを阻止円法で調べたところ、比較的低極性の画分 (NPZ00214~216) がエキスよりやや大きい阻止円 (50µg で 20~24 mm) を示し、また高極性画分 (NPZ00218~220) もエキスと同等かやや小さい阻止円 (50 µg で 15~20mm) を示した。この活性の強かった低極性画分の中で最も重量の多く活性も高かった画分 (NPZ00215, 50µg で阻止円 23mm) を、更にシリカゲルカラムクロマト (hexane-AcOEt) により 7 画分に分画したところ、3 画分から結晶性物質が得られた。これらの画分濃縮物の活性を阻止円法で調べた結果、全画分が

表2 プロポリスから単離した化合物の抗ヘリコバクター・ピロリ活性

| | MIC(µg/ml) |
|--------------|------------|
| pinocembrin | 12.5 |
| galangin | 25 |
| chrysin | 25 |
| Amoxicillin | 0.20 |
| Lansoprazole | 12.5 |

菌数: 2×10⁷CFU/ml

50µg で 23mm以上の阻止円を示し、特に結晶析出画分の結晶、母液が高い活性を示した。結晶性物質は、機器分析の結果、既知化合物でプロポリスからも既に得られている pinocembrin, galangin および chrysin と同定された (Mabry et al., 1970)。これらの分画表を図1に、同定した化合物の構造式を図2に示した。これらの化合物のヘリコバクター・ピロリに対する MIC 値は、表2に示すとおりで、最も活性の高い pinocembrin の値は、同時に測定したランソプラゾールと同等であった。また、pinocembrin は、*Trichophyton* 属や *Cryptococcus* 属に対して弱い抗菌活性を示した (表3)。

考察

プロポリスから抗ヘリコバクター・ピロリ活性を指標に活性物質の分離を行った結果、既知成分である pinocembrin, galangin および chrysin といったフラボノイドが得られた。フラボノイドはプロポリスの主要成分であり、既に30種以上の化合物が各地のプロポリスから単離されている (水野ら, 1987)。上記の3フラボノイド分画の他、抗ヘリコバクター・ピロリ活性を示した他のフラクション中にも、その化学性状から構造の類似したフラボノイドが含まれると予想されている。またエキスに比べ分画した試料の阻止円の大きさがあまり大きくならないことから、プロポリスの抗ヘリコバクター・ピロリ活性は、多種のフラボノイドの集積によるものと考えられる。これらプロポリスのフラボノイドは、枯草菌や黄色ブドウ球菌、カンジダ、皮膚糸状菌の *Trichophyton* などに抗菌活

表3 プロポリスから単離した化合物 pinocembrin の抗菌活性

| | MIC($\mu\text{g/ml}$) | | |
|--|-------------------------|-------------|------------|
| | pinocembrin | Amoxicillin | Miconazole |
| <i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P | 100 | 0.20 | |
| <i>Enterococcus faecalis</i> RIMD 3336001 | 200 | 0.78 | |
| <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341 | 200 | ≤ 0.05 | |
| <i>Bacillus subtilis</i> PCI 219 | 100 | 0.20 | |
| <i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2 | >200 | 6.25 | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> PC1 602 | 100 | 100 | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3445 | >200 | >100 | |
| <i>Candida albicans</i> IAM 4888 | 100 | | 12.5 |
| <i>Candida albicans</i> MTU 12001 | 100 | | 6.25 |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> MTU 13001 | 50 | | 3.13 |
| <i>Aspergillus niger</i> NHL 5088 | >200 | | 3.13 |
| <i>Trichophyton mentagrophytes</i> IFM 40769 | 25 | | 0.78 |
| <i>Trichophyton rubrum</i> IFM 46037 | 25 | | 0.39 |

性が報告されているが (Metzner et al., 1979), 今回得られたフラボノイドの pinocembrin は抗菌活性が弱く, ヘリコバクター・ピロリに対して比較的強い活性が認められた。これらを総合すると, プロポリスの抗潰瘍作用の要因の一つとして, pinocembrin のようなフラボノイドによる抗ヘリコバクター・ピロリ活性が考えられる。

(〒178 練馬区大泉町 2-33-7

全薬工業(株) 中央研究所)

参考文献

- 石井宮次ら. 1987. 感染症学雑誌 61:668-675.
 松野哲也. 1992. ミツバチ科学 13(2): 49-54.
 Mabry, T. J. et al. 1970. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag, New York. pp. 354.
 Metzner, J. et al. 1979. Pharmazie 34:97-102.
 水野瑞夫ら. 1987. フレグランスジャーナル 83:20-28.
 清水公博. 1987. フレグランスジャーナル 83:40-43.
 ITOH, K., I. AMAMIYA, S. IKEDA and M. KONISHI. Anti-*Helicobacter pylori* substances in propolis. *Honeybee Science* (1994) 15(4):171-173. Zen-yaku Kogyo Co., Research Institute. Ohizumi-machi 2-chome, Nerima-ku, Tokyo, 178 Japan.

Propolis (honeybee glue) has been shown to exhibit multifunctional biological activities including anti-ulcer, anti-inflammation, antitumor, antibacterial, hypotensive and immunopotential

activities.

Helicobacter pylori, a microaerobic Gram-negative bacterium living in stomach, was recently identified as the main causative factor of gastritis and gastric and duodenal ulcer and thus various antibacterial agents are now used for eradication of *Helicobacter* in gastritis and ulcer patients. In view of the well-recognized anti-ulcer and antibacterial activities, we have investigated anti-*Helicobacter* activity in Chinese, Brazilian and Argentine propolis and found that the extract of Argentine propolis exhibited the most potent activity. The extract was fractionated following the activity to result in isolation of three active flavonoids, pinocembrin, galangin and chrysin. Several other related flavonoids with weaker activity were deduced to be contained in the extract.

These three flavonoids showed anti-*Helicobacter* activity (MIC: 12.5-25 $\mu\text{g/ml}$) comparable to that of lansoprazole, an anti-ulcer drug with anti-*Helicobacter* activity. The main active component pinocembrin exhibited very weak growth inhibitory activity against *Trichophyton* and *Cryptococcus* species but no activity against other fungi and bacteria.

Since propolis is known to contain many flavonoids with some antibacterial and antifungal activity and some of them were now shown by us to have significant anti-*Helicobacter* activity, the known anti-ulcer activity of propolis may be attributed to the anti-*Helicobacter* effect of its flavonoid components.