

プロポリス中の抗 MRSA 活性物質について

中野 真之・渋谷 孝・杉本 利行・
福田 恵温・栗本 雅司

プロポリス (propolis) は、蜂脂と呼ばれ蜜蜂が種々樹木から採集してきた樹脂状物を唾液と混ぜ、巣内に塗り付けている物質であり、フラボノイドをはじめとして多種類の植物成分を含有しており、抗菌性、鎮痛性など多くの薬理活性を有することが古くから知られ、東ヨーロッパを中心に今日まで長いこと民間伝承薬として用いられてきた。最近、プロポリスには、抗菌、抗潰瘍、抗腫瘍、マクロファージ活性化、癌転移抑制など様々な作用を有することが報告され、また活性物質の単離も行われている (新井ら, 1994; 阿賀ら 1992; 松野, 1992)。

我々は院内感染が問題となっているメチシリン耐性の黄色ブドウ球菌 (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) に対する抗菌活性を指標としてブラジル産プロポリス中の抗 MRSA 活性物質の検索を行い、活性物質を単離したので報告する。

I 材料および方法

プロポリスはブラジル産プロポリス原塊を用いた。カフェ酸、クマル酸、桂皮酸、ガラングン、ケンフェロールは市販試薬を用いた。Art-epillin C は当研究所で調製した (阿賀ら, 1994)。メチシリン耐性の黄色ブドウ球菌は、*Staphylococcus aureus* (JCM8702) を使用した。シリカゲル 60 K 650 は片山化学製、Sephadex LH-20 は Pharmacia 製、シリカゲル ODS FS-1801 はオルガノ製の製品を用いた。

抗 MRSA 活性は、日本化学療法学会の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法に準じて行った。最高試験濃度は、固形分として 800 μ g/ml と

し、順次 2 倍の段階希釈を行って試験寒天平板を作製した。感受性測定用寒天培地として、感性ディスク用培地-N「ニッスイ」を用いた。試験寒天平板培地に約 1mm ϕ の白金耳で画線し、37 $^{\circ}$ C で 20 時間培養し生育が完全に阻止された最低濃度を求めた。

II 結果

1. プロポリスからの抗 MRSA 物質の単離

プロポリス原塊をトリオブレンダーで粉碎し、これに 90% または 50% エタノール水溶液および脱イオン水を加え、60 $^{\circ}$ C で 2 時間 (時々攪拌)、次いで室温に一夜静置した後ラジオライト #600 を用いて濾過しエキスを得た。このエキスの抗 MRSA 活性と固形分収率を測定した結果を表 1 に示した。90% エタノールで抽出したエキスに最も強い活性 (200 μ g/ml) が認められ、固形分収率も高かった。

そこで抗 MRSA 物質の単離を目的に、プロポリス原塊 150g を 90% エタノールで同様に抽出し、エバポレーターでエタノールを留去した後酢酸エチルに溶解しエキス (54g) を調製した。これをシリカゲル 60K650 を用いたカラムクロマトグラフィーに供し、ヘキサン/酢酸エチルの濃度を変えて 5 画分に分画した。ヘキサン/酢酸エチルの 60/40 の溶出画分 (Fr.2) に高い活性 (MIC 100 μ g/ml) が認められた

表 1 プロポリスエキスの抗 MRSA 活性

抽出法	MIC(μ g/ml)	収率(%)
90%エタノールエキス	200	43.7
50%エタノールエキス	400	38.0
脱イオン水	>800	8.1

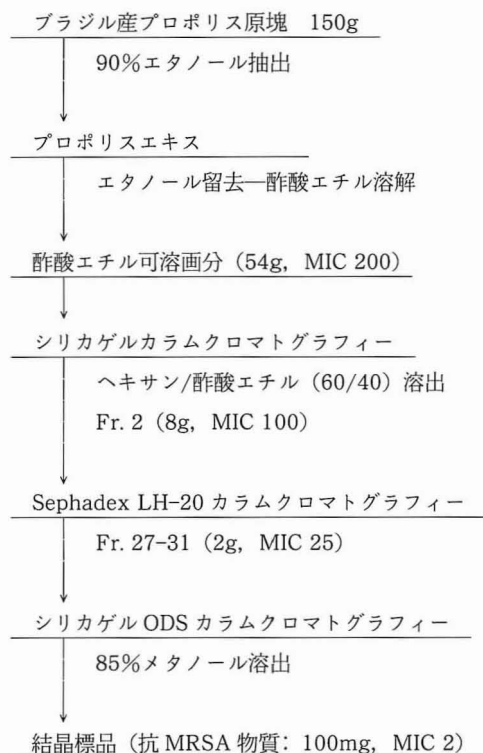


図1 抗 MRSA 活性物質の単離スキーム

ので、この画分を回収 (8g) した。この画分を次に Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーに供し、メタノールで溶出し 70 画分に分け高活性画分 (Fr. 27-31, MIC 25 μ g/ml, 2g) を回収した。さらにこの画分をシリカゲル ODS FS-1801 に供し、85%メタノール溶出画分を回収した。この画分から MIC 2 μ g/ml を示す成分を結晶で 100mg 得た。この単離スキームを図1に示した。

2. 同定

本物質は融点 107 $^{\circ}$ C を示し、FD-MS 分析により分子量 364 をあたえ、元素分析により分子式 $C_{23}H_{24}O_4$ で表され、¹H-NMR および ¹³C-NMR 解析により、3-prenyl-4-dihydrocinnamoloxy-cinnamic acid と同定され、その構造式を図2に示した。この物質は HPLC 分析により、90%エタノールエキス固形分中に約 1% 存在することが分かった。多成分が存在するプロポリスエキス中で本物質は、プロポリスエキスの抗 MRSA 活性 (MIC 200 μ g/ml) の主要な成分である。

3. プロポリス中に含まれる既知物質の抗 MRSA 活性について

プロポリス中に含まれる既知物質としてカフェ酸、クマル酸、桂皮酸、ガラランギン、ケンフェロールおよび Artepillin C (3, 5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid) の抗 MRSA 活性を測定し、その結果を表2に示した。カフェ酸、クマル酸、桂皮酸およびガラランギン、ケンフェロールには抗 MRSA 活性が認められなかった。試験した中で、今回単離した 3-prenyl-4-dihydrocinnamoloxy-cinnamic acid が最も強い活性を示し、次いで、Artepillin C (MIC 200 μ g/ml, 構造式を図2に示した) であった。

III 考察

プロポリスから抗 MRSA 活性を指標に活性物質の検索を行ったところ、3-prenyl-4-dihydrocinnamoloxy-cinnamic acid を抗 MRSA 活性物質として単離した。この物質は既に阿賀ら (1992) によりブラジル産プロポリスから抗菌成分 (*Bacillus cereus*: MIC 31.3 μ g/ml, *Enterobacter aerogenes*: 62.5 μ g/ml) として単離されていたが、抗 MRSA 活性は知られていなかった。これまでプロポリスエキスの抗

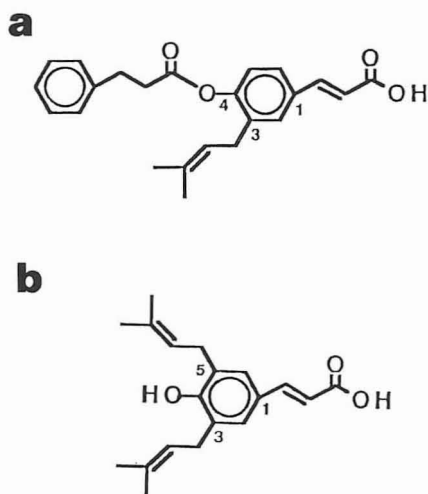


図2 抗 MRSA 活性物質
a: 3-prenyl-4-dihydrocinnamoloxy-cinnamic acid
b: Artepillin C

表2 プロポリス成分の抗MRSA活性

薬 剤	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
プロポリスエキス	200
カフェ酸	>800
クマル酸	>800
桂皮酸	>800
ガラングン	>800
ケンフェロール	>800
Artepillin C	200
3-prenyl-4-dihydro-cinnamoxycinnamic acid	2

MRSA 活性については、Grange ら (1990) によりフランスのプロポリスエキスに比較的強い活性があることを報告している。今回我々が用いたブラジル産プロポリスエキスにも同程度の活性が認められた。プロポリスの抗MRSA活性は、多くの成分の相乗効果であると思われるが、単離操作において 3-prenyl-4-dihydrocinnamol-oxycinnamic acid を含む画分の活性が最も強かったことより、本物質が、抗MRSA活性の主要な成分であると考えられる。

(〒710 岡山市天瀬南町 7-7

(株)林原生物化学研究所 天瀬研究所)

参考文献

- 新井成之ら. 1994. ミツバチ科学. 15(4): 155-162.
 新井成之ら. 1992. Med. Biol. 124(2): 67-70.
 阿賀創ら. 1994. Biosci. Biotech. Biochem. 58 (5): 945-946.
 阿賀創ら. 1992. Med. Biol. 124(5): 205-209.
 Grange J.M. et al. 1990. J. Royal Soc. Med. 83: 159-160.
 松田 忍. 1994. ミツバチ科学 15(4): 145-154.
 松野哲也. 1992. ミツバチ科学 13(2): 49-54.

NAKANO, M., T. SHIBUYA, T. SUGIMOTO, S. FUKUDA and M. KURIMOTO. Anti-MRSA compounds in Brazilian propolis. *Honeybee Science* (1995) 16 (4) : 175-177. Amase Institute, Hayashibara Biochem. Labs., Inc., 7-7 Amase-minami, Okayama 700, Japan.

Antimicrobial compound against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) was isolated from Brazilian propolis by silica gel column chromatography, sephadex LH-20 column chromatography, and silica gel ODS column chromatography. This compound was identified as 3-prenyl-4-dihydro-cinnamoxycinnamic acid (1). Antimicrobial activity (MIC) of compound (1) on MRSA was $2\mu\text{g/ml}$. Compound (1) was very likely to be one of the major antimicrobial compound against MRSA in Brazilian propolis.