

天然物の抗菌性

(I) ハラン根茎の抗菌性について

高野三郎

Antimicrobial Activity of Natural Substance Part 1. Antimicrobial Activity of the Root-stock obtained from the Cast Iron Plant.

Saburo Takano

緒 言

ハラン(*Aspidistra elatior* Blume)はユリ科植物に属し、中国原産の常緑多年生草本であり、ヒマラヤ、台湾、琉球、中国、日本などにみられる。日本では暖地に多く、しかも湿地で、余り肥沃でない所に適すとされ、屋敷の庭や寺の境内、公園などの陰地に栽培されている。ハランは葉、根、種子いずれの部位も薬用とされ、葉が食品の包装材料や料理用装飾品と観賞用としても利用され、また根や種子は漢方薬では主に利尿剤、強心剤、鎮咳剤などとして用いられている¹⁾。しかし、ハランの如何なる成分が鎮咳剤などに有効であるかは不明である。ここでは、従来の抗菌剤研究の主なテーマであるアミノ酸誘導体²⁾をより広めて、天然物のハランに着目し、その抗菌性と成分の解明を試みたところ、若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 供試試料

ハランは千葉県長生郡一宮町の寺の境内で採取したものを使用した。

2. 試料調整法

採取したハランはよく洗浄し、細断し、根茎部を凍結乾燥粉末として用いた。

まず、根茎粉末をメタノールで抽出し、濃縮乾固した。しかし、この乾固物は粘性を帯び以後の操作を困難にした。そこで根茎粉末をエタノール抽出し、その抽出液を濃縮する際に白色物質を生じるので、この白色物質を生じる時点で -20°C 一夜放置した。次に白色物質を濾過して集め、白色物質の単離精製をワコーゲルC-100を用いたカラムクロマトグラフィで行った。クロロホルム：メタノール：水(65：25：4)で溶出し、得られた0~110mlの画分をC-1、110~190mlの画分をC-2、190~210mlの画分をC-3とした。これらを濃縮後、バナナの炭そ病菌で抗菌性を検討する一方、抗菌性の強いC-2画分をキーゼルゲル60Gを用いた薄層クロマトグラフィで精製し、得られた活性画分をTとした。分析や抗菌試験の際は、このTをメタノールで再結して用いた。

3. 糖とステロイドの定性分析

Tを水に溶解して攪拌すると、泡だつのが観察されたところから、植物の根などに含まれるステロイド系のサポニンが考えられた。そしてこれらは配糖体として存在が知られている

ので、糖とステロイドの反応を行った。糖はアンスロン反応⁴⁾を、ステロイドはリーベルマン・ブルハルト反応⁵⁾によって調べた。

4. Tの加水分解

試料のTは2N硫酸-50%エタノール溶液で水解し、クロロホルムで抽出されるアグリコンの部分(T')とクロロホルム不溶の糖部分に分けた(T'')。

5. 融点測定

融点は島津製作所KK製MM-2で測定した。

6. 抗菌試験

凍結乾燥粉末をメタノールで抽出したものについては従来の方法で測定した²⁾。エタノール抽出し白色物質を得た画分と、その後のシリカゲルカラムや薄層クロマトグラフィで得たC-1、C-2、TおよびT'画分については、以下の方法で行った³⁾。すなわち、あらかじめペトリ皿で平板培養したバナナ炭そ病菌体を径6mmのコルクボーラーで打ち抜き、これを試料添加したペトリ皿の寒天培地上に接種して試験した。27℃、96時間後のコロニー径を対照(無添加培地)と比較して示した。なお、メタノール抽出での抗菌試験には以下の稲いもち病菌*Pyricularia oryzae*、バナナ炭そ病菌*Gloeosporium musarum*、バナナ軸腐病菌*Fusarium sp.*、キュウリ斑点細菌病菌*Pseudomonas lachrymans*、ソラ豆赤色斑点病菌*Botrytis fabae*、レモン緑かび病菌*Geotrichum candidum*、などの菌株を用いた。

実験結果および考察

1 メタノール粗抽出物の抗菌性

ハランの葉と根茎についてバナナ炭そ病菌による抗菌性を調べたところ、根茎により強い活性がみられたので、根茎を凍結乾燥粉末としてその抗菌性を調べた。稲いもち病菌やレモンの緑かび病菌などに抗菌性が認められた。

特にバナナ炭そ病菌には強い抗菌性がみられた(Table.1)

Table 1. Inhibitory Action of the Methanol Fraction of *Aspidistra elatior* BLUME on Plate Cultures of Fungi and Bacteria

Fungi and Bacteria	Concentration (μg/ml)	Colony diameter compared with the control (%)
<i>Gloeosporium musarum</i>	200	24.4**
<i>Pyricularia oryzae</i>	250	36.7**
	500	18.1**
<i>Fusarium sp.</i>	500	76.9**
	1,000	50.8**
<i>Pseudomonas lachrymans</i>	500	96.4
	1,000	90.8
<i>Botrytis fabae</i>	500	81.0
	1,000	41.3**
<i>Geotrichum candidum</i>	500	82.0**
	1,000	78.9**

** indicates a significant growth inhibitory effect at the 1% level of probability as estimated by *t*-test.

2. 抗菌物質の単離と精製

メタノール抽出物は粘性が強く着色がみられるので、ハラン根茎の粉末をエタノール抽出し、濃縮する際に生じる沈澱(白色物質、W)を-20℃で一夜放置して集めた。この白色物質はワコーゲルC-100によるカラムクロマトグラフィでクロロホルム：メタノール：水(65：35：4)で溶出される0~110mlをC-1、110~190mlをC-2、190~210mlをC-3とし、抗菌性で強い活性を示したC-2を薄層クロマトグラフ(キーゼルゲル60G塗布)で精製しTを得た。(Fig.1) Tは水に溶解し攪拌すると泡立つところから植物の根などに存在するステロイド系サポニンの可能性が示唆されたので、ステロイドの反応をリーベルマン・ブルハルトの反応で調べたところ、紅色→紫色→緑色→暗緑色となり、この反応は陽性であった。一方サポニンは配糖体として存在がいられているので、糖の反応をアンスロン法で調べたところ、緑色の

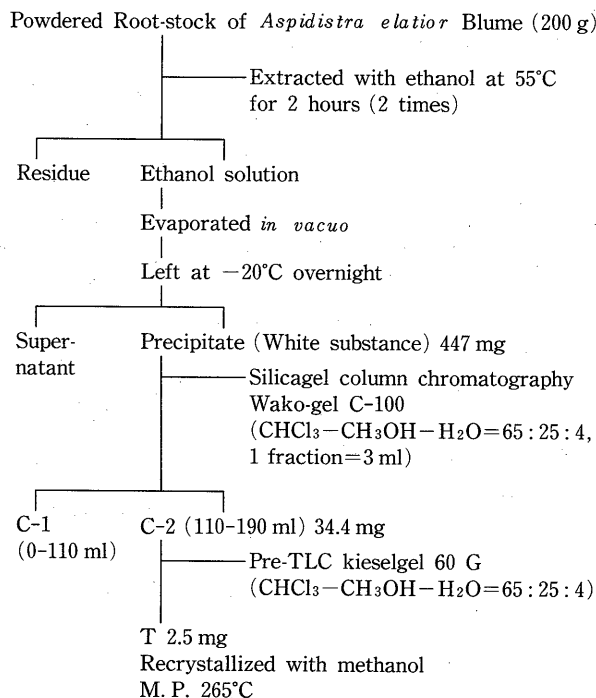


Fig. 1. Isolated Procedure of Antimicrobial Substance (T) from Root-stock of *Aspidistra elatior* Blume

呈色がみられ、これも陽性を示した。

そこでTはステロイド系サポニン配糖体とすれば、ステロイド系サポニンのアグリコン(非糖部分)はどのようなものか、また配糖体の糖部分は如何なるものか検討することにして、Tの加水分解をすることにした。

3. Tの加水分解と確認

Tを2N硫酸-50%エタノール溶液で水解し、それに含まれるアグリコンをクロロホルムで抽出し(T')、クロロホルム不溶の糖部分(T'')とに分けた。TとT''は薄層クロマトグラフィーをT''は濾紙クロマトグラフィーも行った。抗菌性の強さと薄層クロマトグラフィーの結果より白色物質WはC-1、C-2、C-3のうちC-2に精製され、さらに単一な区分Tとなった。

Tを酸加水分解し薄層クロマトグラフィーでそのアグリコンを調べてみるとショウジョウバ

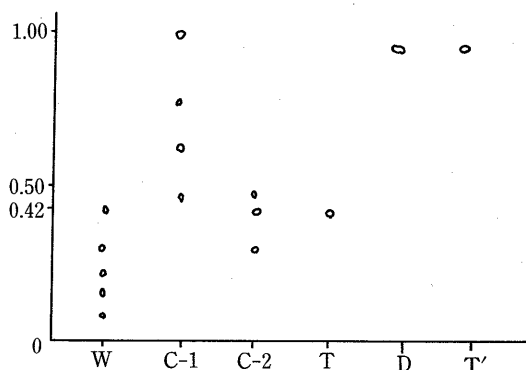


Fig. 2. Thin Layer Chromatogram of Extracts from *Aspidistra elatior* Blume
Kieselgel 60 F₂₅₄
Solvent; CHCl₃-CH₃OH-H₂O=65:25:4
5% H₂SO₄ Sprayed
W; White substance
D; Commercial diosgenin
T'; Extracted diosgenin

カマに存在するアグリコンのジオスゲニン(D)とRfが酷似していた。そこでTとジオスゲニンの融点を調べたところ、Tは204℃でジオスゲニンは204~207℃となり、明らかに似ていることが判った。一方、糖部分については薄層クロマトグラフィーを行った。その結果、D-キシロースのスポットは明確に現れたが、重なり合うスポットはD-グルコ

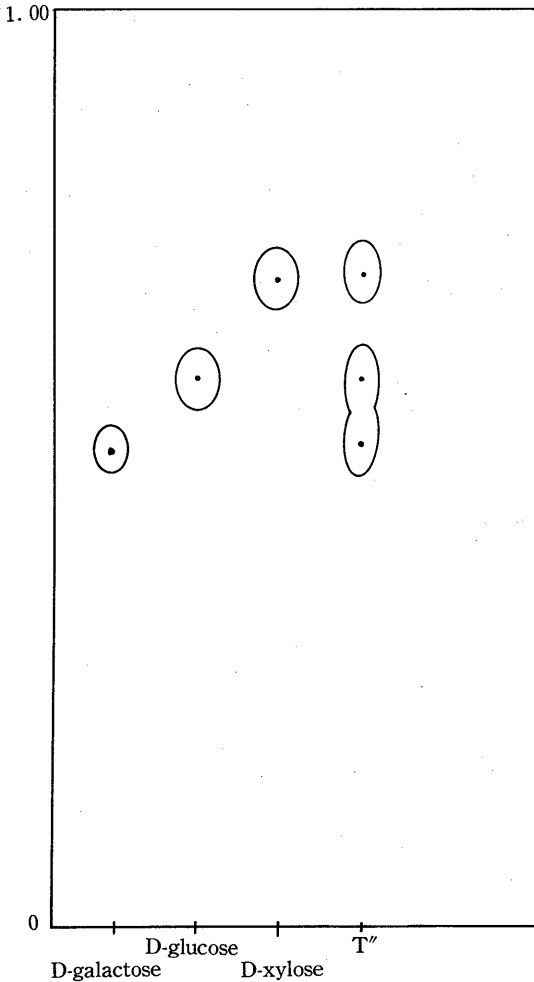


Fig. 3. Thin layer chromatogram of T and Free Sugar

Avicel SF TLC plate
Solvent, Isopropanol : H₂O = 160 : 40 (v/v)
Aniline phthalate Sprayed

ースとD-ガラクトースのものと考えられるが、両者の分離はなされていない。(Fig.2, 第3図)

4. Tの抗菌試験

ハランの凍結乾燥粉末をエタノール抽出し、白色物質を得た。これをカラムクロマトにかけC-1、C-2画分を得、さらにC-2画分を薄層クロマトにて精製したT画分をバナナ炭そ病菌を用いた新しい抗菌試験法で検討したところ、C-2画分とT画分に強い抗菌性が認められた。(Fig.4)

しかもTを加水分解して得られたアグリコンのT'(Diosgenin, ジオスゲニン)には12μg/mlの濃度で抗菌性がみられなかった。(Table.2)

以上より、ユリ科植物ハランの根茎には抗菌物質ステロイド系サポニン配糖体、Tが存在し、このものは12μg/mlでバナナ炭そ病菌に抗菌性を示した。この濃度では、アグリコンのジオスゲニンに抗菌性がみられないことから、アグリコンに糖がつくことより抗菌性が高まるものと考えられた。糖部分については加水分解後の薄層クロマトグラフィーの結果

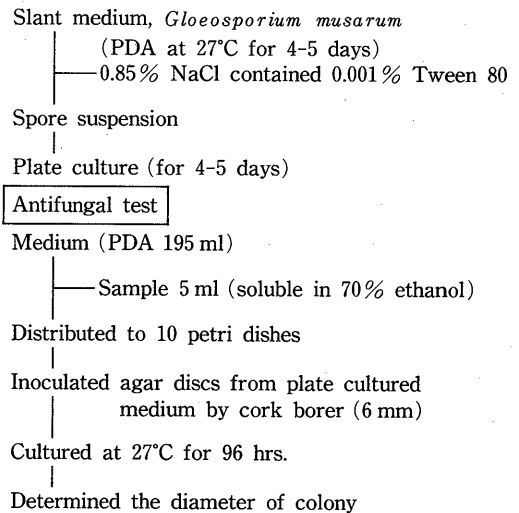


Fig. 4. Bioassay procedure on extracts from *Aspidistra elatior* Blume

Table 2. Antimicrobial Effects of Extracts from *Aspidistra elatior* Blume on the Growth of *Gloeosporium musarum*

	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Diameter of Colony ^{a), b)} (mm)	Colony diameter compared with the control (%)
a) Control		41.4 \pm 0.49	
C-1	30	41.8 \pm 1.32	100.9
C-2	30	7.8 \pm 0.15	18.8**
T	30	7.6 \pm 0.15	18.4**
b) Control		45.6 \pm 0.50	
White substance	12	44.4 \pm 0.24	97.3
Diosgenin	12	44.0 \pm 0.98	96.4
T	12	38.0 \pm 0.76	83.3**

Mean \pm SE, Colonies were cultured at 27°C for 96^{a)} and 120^{b)} hrs.

** Significantly different from the Control ($p < 0.01$)

より、一つはD-キシロースであることが確認された。残りはD-グルコースとD-ガラクトースの存在が示唆されたが確認されていない。今後さらに検討してみたいと考えている。

参考文献

- 1) 刈米達夫、木村康一監修、廣川植物大事典、広川書店、296、(1977)
- 2) 高野三郎、生活科学研究第3集、22、(1981)
- 3) 明日山秀文、向 秀夫、鈴木直治、植物病理実験法、日本植物防疫協会、655、(1965)。
- 4) Hodge J.E. and Hofreiter B.T., "Methodin Carbohydrate Chemistry, Academic Press, 1, 380(1962)
- 5) Burchard.H., Chem. Zentralbl. 61, 25(1890)