

## 蚕糞中の抗菌性物質 I

誌名	日本蠶絲學雜誌
ISSN	00372455
著者	飯塚, 敏彦 小池, 説夫 水谷, 純也
巻/号	44巻2号
掲載ページ	p. 125-130
発行年月	1975年4月

# 蚕糞中の抗菌性物質 I. 単離した Protocatechuic acid と *p*-Hydroxybenzoic acid の抗菌力について

飯塚 敏彦・小池 説夫・水谷 純也

札幌市北区・北海道大学農学部 (〒060)  
(1974年6月3日 受理)

抗生物質無添加の人工飼料育家蚕幼虫の腸内では, *Streptococcus* spp. が異状増殖して起病性を示す(飯塚, 1972)。飯塚(1974)は, *Streptococcus faecalis* AD-4の抑制方法を検討中に, 桑葉由来の抗菌性物質が, 家蚕幼虫の消化液ならびに糞中に存在することを確認した。

本実験では, 蚕糞中より単離した Protocatechuic acid ならびに *p*-Hydroxybenzoic acid の抗菌力について検討したので報告する。また, この2つの物質が, いずれもフェノールカルボン酸であることから, 市販のフェノールカルボン酸とその類縁化合物の *S. faecalis* AD-4 に対する抗菌力をも調べたので報告する。

なお, 本研究の遂行にあたり, 種々ご指導をいただいた北海道大学農学部滝沢義郎教授に厚くお礼申し上げます。

## 材料と方法

本実験での抗菌力試験に供した細菌は, *Streptococcus faecalis* AD-4 である。

抗菌力試験の方法は, ペーパーディスク法とし, 飯塚(1974)の方法に従った。

蚕糞の採取は, 1973年7月 日131号×支131号の5齢幼虫から行なった。蚕糞の乾燥は, 採取と同時に  $60^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$  の乾燥室で行ない, 使用時までシリカゲルの入ったポリバケツ内に保存した。なお, 蚕糞に混入してくる桑葉細片は除去した。蚕糞の使用時には, 保存してあった乾燥糞をボールミルで100メッシュ以下の粉末にして抽出実験を行なった。

蚕糞中の抗菌性物質の抽出方法については, すでに, 飯塚(1974)は, 小原・野崎(1954)の方法による粗クロフィル分画に抗菌力を見出しているが, 本実験では, さらに抗菌性物質の抽出方法を改良し, 抗菌性物質がより濃縮された状態で得ることができた。その方法については Fig. 1 に示した。

## 結 果

抗菌性物質の抽出は, 乾燥糞に78%アセトン(v/v)を加え, 1夜冷浸出した。その後, アセトンを除去し, 残液にヘキサンを加えて可溶部と不溶部にわけ, 不溶部にさらにクロロホルムを加えて可溶部と不溶部にわけた。この結果, クロロホルム不溶部では, クロフィル系統の色素は大部分除かれた。ついで, クロロホルム不溶部に酢酸エチルを加えて可溶部と不溶部にわけたところ, 抗菌力の大部分は酢酸エチル可溶部に移った。各分画の生物検定の結果は Fig. 1 にあわせて示した。

次に, 酢酸エチル可溶部を, シリカゲルを吸着剤とするカラムクロマトグラフィーで分画した。それぞれの溶媒ならびに生物検定については Table 1 に示した。この結果, 抗菌力の大部分は, Benzene: MeOH: AcOH (88: 10: 2, v/v) で溶出する分画(F1)に存在することが明らかとなった。

ついで, この F1 を Polyamide C-200 (和光純薬工業KK) を吸着剤とするカラムクロマトグラフィー (Benzene: MeOH: AcOH; 90: 16: 8, v/v) により分画した。ここでは各分画を等量溶出させ, それぞれの溶出乾物量についての溶離曲線

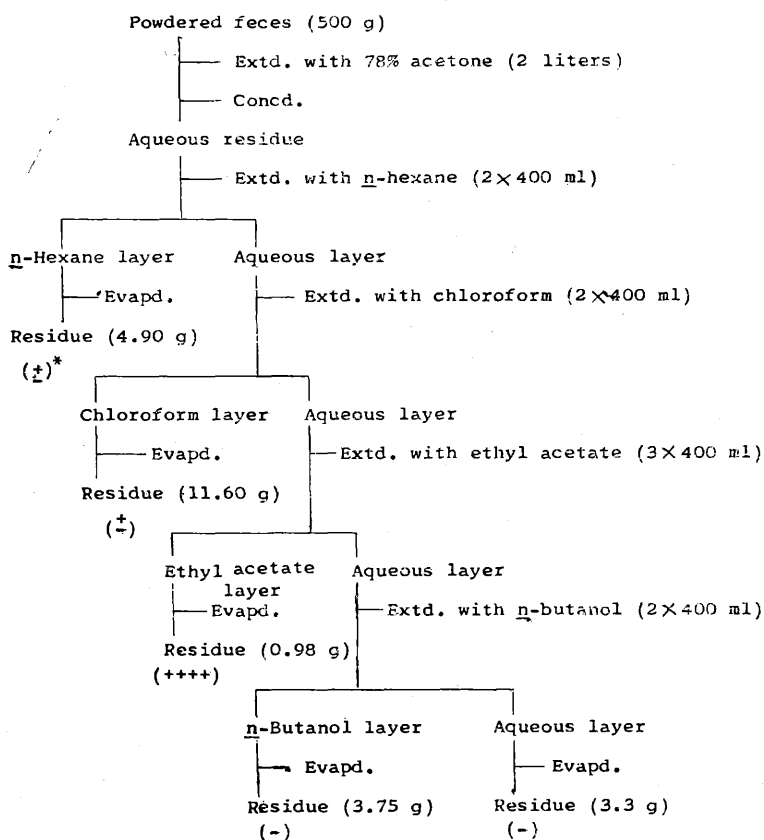


Fig. 1. Procedure for Fractionation of the Feces.

\*: Bioassay. Concentration of the test solutions for bioassay was 500 mg/ml of MeOH and 0.05 ml per disc was applied. (-): Inhibitory zone was not formed, (±): inhibitory zone > 1 mm, (++++): 4~5 mm.

Table 1. Column Chromatography (Silica Gel) of Ethyl Acetate Extractable Fraction. (Weight of Mount: 882 mg)

Fraction	Benzene:MeOH:AcOH	Weight of Dried Matter (mg/2000 ml)	Bioassay*
F 1	88:10:2	539	++
F 2	78:20:2	181	±
F 3	68:30:2	49	-
F 4	48:50:2	46	-
F 5	98:2	20	-

\*: Concentration of the test solutions for bioassay was 100 mg/ml of MeOH and 0.05 ml per disc was applied.

-: Inhibitory zone was not formed, ±: inhibitory zone < 1 mm, ++: 2~3 mm.

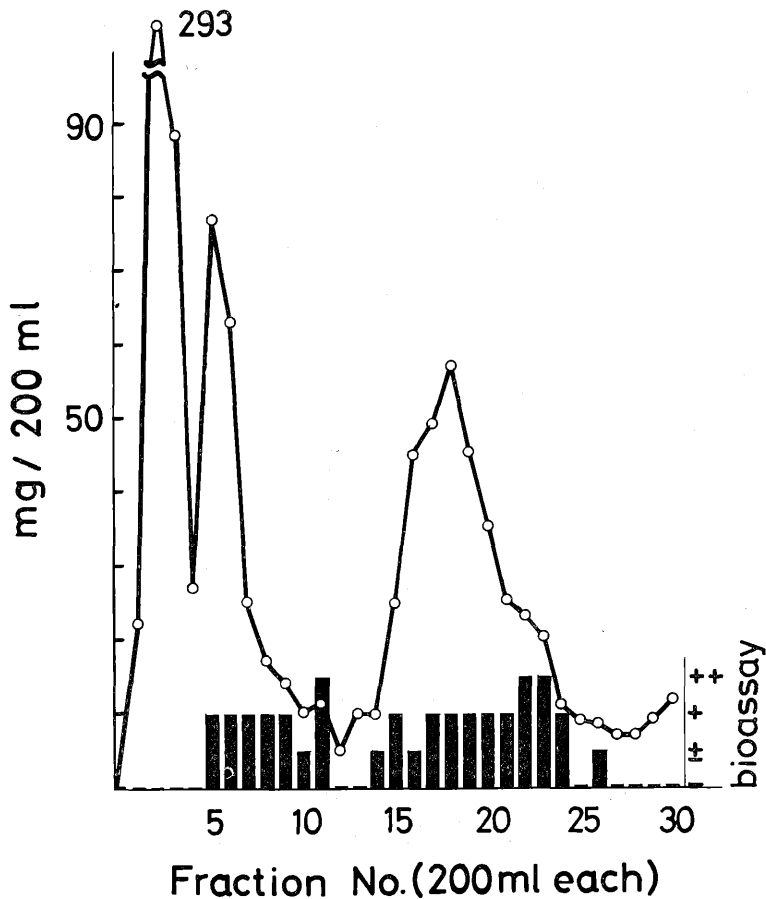


Fig. 2. Column Chromatography (polyamide C-200) of the Biologically Active Fraction (F 1).

—○—○—: Dry matter mg/200 ml of solutions eluted with benzene: MeOH: AcOH (90: 16: 8, v/v). Bioassay was shown as antibacterial activity of the test solutions expressed by solid rods. Concentration of the test solutions for bioassay was 40 mg/ml of MeOH and 0.05 ml per disc was applied. —: Inhibitory zone was not formed, ±; inhibitory zone < 1 mm, +: 1~2 mm, ++: 2~3 mm.

Fig. 2 に示した。なお、それぞれの分画の生物検定の結果もあわせて示した。また、Polyamide B-O (和光純薬工業KK) を吸着剤とする TLC によって F1 分画を展開し、紫外線での発色によって識別される各スポットに記号をつけて以下に記した。すなわち、Fig. 2 の実験より得られた分画番号 No. 5-No. 11 の主成分は V1 であり、分画番号 No. 14-No. 26 の主成分は B1 であった。なお、これらの各分画では抗菌力が認められた。B1 と V1 のほ

かには、さらに 8 コのスポットが認められた。

B1 と V1 は、再度 Polyamide C-200 カラムを通すことにより、いずれも結晶として単離された。この結晶は、さらに再結晶させて純化し、UV, IR, MS, NMR 等の機器によるスペクトル分析を行なった。また、融点、元素分析等も行なって B1 は Protocatechuic acid, V1 は *p*-Hydroxybenzoic acid と同定した。各分析データについては、別に報告した (IIZUKA *et al.*, 1974)。

Table 2. Antibacterial Activity of Authentic Phenol Carboxylic Acid and Related Compounds.

Compounds	Bioassay	Compounds	Bioassay
Hydroquinone	+++++++	<i>o</i> -Coumaric acid	+
<i>o</i> -Vanillin	+++++++	Caffeic acid	+
Pyrogallol	+++++++	Gallic acid	+
Trimellitic acid	+++++	Veratric acid	+
Benzoic acid	++++	Anisic acid	+
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid**	++++	<i>trans</i> -Cinnamic acid	+
Eugenol	++++	Isophthalic acid	+
Phthalic acid	+++	Veratrole	±
Trimesic acid	+++	Resorcin	-
<i>m</i> -Hydroxybenzoic acid	+++	Rutin*	-
Salicylic acid	+++	Esculin	-
$\beta$ -Resorcylic acid	+++	Morin*	-
Vanillin	++	Tannic acid	-
Vanillic acid	++	Umbelliferone*	-
Protocatechuic acid**	++	Guaiacol	-
Syringic acid	++	Benzaldehyde	-
Gentisic acid	++	Chlorogenic acid*	-
Pyrocatechol	++	<i>p</i> -Benzoquinone	-
Phloroglucin	+	Salicylaldehyde	-
Scopolin*	+	Terephthalic acid	-
Coumarin	+	Sulphanillic acid	-
Protocatechaldehyde	+	<i>p</i> -Dimethylaminobenzaldehyde	-
<i>p</i> -Coumaric acid	+	3-Hydroxyanthranilic acid	-

\*: Compounds found in mulberry leaves.

\*\* : Compounds found in feces of silkworm larvae.

Concentration of the test solution for bioassay was 20 mg/ml of MeOH and 0.05 ml per disc was applied.

- : Inhibitory zone was not formed, ± : inhibitory zone < 1 mm, + : 1~2 mm, ++ : 2~3 mm, +++ : 3~4 mm, ++++ : 4~5 mm, +++++ : 5~6 mm, ++++++ : 8~9 mm, ++++++ : 9~10 mm, ++++++ : 10~11 mm.

純化した B1 と V1 は、抗菌力試験の結果でもともに明らかな抗菌力を示した。

蚕糞中より、Protocatechuic acid ならびに *p*-Hydroxybenzoic acid を単離したことから、フェノールカルボン酸および類縁化合物の抗菌力試験もあわせて行なった。その結果は Table 2 に示した。

この結果、フェノールカルボン酸は、いずれも *S. faecalis* に対して抗菌力を有することが明らかとなった。

また、桑葉中に存在することがすでに知られてい

る Umbelliferone (内藤ら, 1963), Rutin, Morin, (HAMAMURA *et al.*, 1962), Chlorogenic acid (内藤・林屋, 1965) にはいずれも抗菌力が認められなかったが、Scopolin (宮内・利根川, 1966) には抗菌力が認められた。

#### 考 察

蚕糞中の抗菌性物質を追求したところ、抗菌力の主成分として、Protocatechuic acid と *p*-Hydroxybenzoic acid が単離された。蚕糞中の抗菌

力を示す分画は、このほかにも Fig. 1 に示したヘキサソル可溶部、クロロホルム可溶部ならびに Table 1 に示した F2 にも認められている。しかし、これらの分画は、いずれも酢酸エチル可溶部の F1 にくらべて抗菌力が弱かったためまず、この F1 から単離、同定を行なったが、こんど、他の抗菌力を有する分画についても追求を行なって行きたい。

ところで、Protocatechuic acid と *p*-Hydroxybenzoic acid を含めて市販のフェノールカルボン酸および類縁化合物の抗菌力試験の結果、Hydroquinone, *o*-Vanillin, Pyrogallol と続いて抗菌力が強かったが、これらの抗菌力の強さが化学構造式といかなる関係にあるかについても考察すると、被検体の中で、フェノールカルボン酸にはいずれも抗菌力が認められた。また、2個の水酸基を有するフェノール性化合物については、その位置が *ortho*-である Hydroquinone がもっとも抗菌力が強く、ついで *meta*-の Pyrocatechol であり、*para*-の Resorcin には抗菌力がなかった。さらに2個のカルボキシル基を有する化合物では、*para*-の位置の Terephthalic acid に抗菌力が認められなかった。しかし、*ortho*-の Phthalic acid, *meta*-の Isophthalic acid ではその順に抗菌力が強かった。ただし、Terephthalic acid の場合、本抗菌力の検定方法が、被検体をメタノールに溶解させてペーパーディスク法により検定しているため、メタノールに溶解しない Terephthalic acid については、別の検定方法によっても検討した上で論じたい。

Table 2 に示したように、*S. faecalis* AD-4 を抑制する多くのフェノールカルボン酸および類縁化合物が見出されたことにより、人工飼料中にこれらの化合物を加えて抗生物質にかわる役割を果し得る可能性が考えられる。この点を考える上で参考になる報告として、三好ら (1972) の人工飼料に数種のフェノール誘導体を加えて幼虫の生育におよぼす効果を調べた報告がある。ただし、この場合の人工飼料の基本組成の中に抗生物質が入っているか否かは不明であるが、その結果によると、蚕に毒性がなく、添加による生育効果の認められる物質として、Terephthalic acid, Isophthalic acid, Gallic acid, Protocatechuic acid をあげている。この4つの物質と Table 2 に示した抗菌力との関連を

みると、Terephthalic acid を除いた他の3つは抗菌力を有する物質となっている。三好ら (1972) の幼虫の生育に有効なこれらの物質が、栄養の面で有効に作用するのか、抗菌力を有しているため *S. faecalis* AD-4 がより効果的に抑制されて有効に作用するのかは結論がだせないで、こんど、さらに人工飼料に添加した飼育実験を行なって解明して行きたい。

Table 2 の桑葉中に含まれるフェノール性化合物の中で、Scopolin だけが抗菌力を示した。このことは、KUSHNER and HARVEY (1962) によっても指摘されているとおり、抽出方法によっては抗菌力を有する物質が単離可能なことを意味している。この点については、Fig. 1 に示した方法等によって確かめる必要があると思われる。

Protocatechuic acid と *p*-Hydroxybenzoic acid が糞中から単離されたことは、これら2つの物質が桑葉中にそのままの形で存在していてそれぞれ糞中に蓄積されたのか、前駆体が蚕体に入って代謝産物として糞中に蓄積してきたのか、のいずれかと思われる。従来、桑葉からはこれら2つの物質が報告されていないことから、前駆体の代謝産物と考える方がより妥当であろう。この場合、その前駆体は何であるか、また、代謝経路はどのようなものであるかについても興味のもたれるところで、この方面の研究もあわせて行ないたい。

## 摘 要

蚕糞中の抗菌性物質の検索を行ない Protocatechuic acid と *p*-Hydroxybenzoic acid を単離した。

単離の方法は Fig. 1 に示した。すなわち、抗菌力の大部分は、酢酸エチル可溶部に認められたので、まず、シリカゲルを吸着剤としてカラムクロマトグラフィーにより分画したところ、Benzene: MeOH: AcOH (88: 10: 2, v/v) 分画に強い活性が認められた。ついで、Polyamide C-200 を吸着剤とするカラムクロマトグラフィーで分画し、2つの主要な活性分画を得た。この分画は、紫色線照射により紫色に発色する V1 (*p*-Hydroxybenzoic acid) と B1 (Protocatechuic acid) である。

蚕糞から単離した2つの物質が、フェノールカル

ボン酸であったことから、関連フェノールカルボン酸および類縁化合物の抗菌力試験も行なった。その結果、Hydroquinone, *o*-Vanillin, Pyrogallol 等は, *S. faecalis* AD-4 に非常に強い抗菌力を有していることが明らかとなった。また、桑葉中のフェノール成分としては、Scopolin にのみ抗菌力が認められた。

#### 文 献

HAMAMURA, Y., K. HAYASHIYA, K. NAITO, K. MATSUURA and J. NISHIDA (1962): *Nature*, 194, 754-755.  
飯塚敏彦 (1972): 日蚕雑, 41, 327-332.  
飯塚敏彦 (1974): 日蚕雑, 43, 89-93.

IIZUKA, T., S. KOIKE and J. MIZUTANI (1974): *Agr. Biol. Chem.*, 38, 1549-1550.  
KUSHNER, D. J. and G. T. HARVEY (1962): *J. Insect Pathol.*, 4, 155-184.  
宮内 潔・利根川和子 (1966): 日蚕雑, 35, 208.  
三好健勝・宮沢福寿・清水 治 (1972): 群馬蚕試報, 45, 53-58.  
内藤謙一・西田 順・浜村保次 (1963): 日農化誌, 37, 449-452.  
内藤謙一・林屋慶三 (1965): 日農化誌, 39, 237-452.  
238.  
小原哲二郎・野崎能孝 (1954): 日農化誌, 26, 246-248.

#### Summary

#### Antibacterial substances in feces of silkworm larvae reared on mulberry leaves I.

#### Antibacterial activity of protocatechuic acid and *p*-hydroxybenzoic acid isolated from feces

Toshihiko IIZUKA, Setsuo KOIKE and Junya MIZUTANI

In this paper, we report on the antibacterial activity of protocatechuic acid and *p*-hydroxybenzoic acid isolated as the main antibacterial substances from feces.

The fractionation of the dried and powdered feces was carried out by the procedure as shown in Fig. 1. A marked antibacterial activity was observed in the ethyl acetate extractable fraction. This fraction was subjected to a silica gel column chromatography. The most of biological activity was concentrated in the effluent from the column with benzene: MeOH: AcOH (88: 10: 2, v/v). The most active eluent was then subjected to a polyamide C-200 column chromatography. Correlation between the elution curve and bioassay was shown in Fig. 2. As the result, two main spots on a polyamide B-O thin-layer chromatography with antibacterial activity were observed. These two substances which gave blue color (B1) and violet color (V1) under UV ray were isolated, and then B1 was protocatechuic acid and V1 as *p*-hydroxybenzoic acid, respectively.

Antibacterial activity of some related phenol compounds including these two substances isolated from feces was tested. In some compounds tested, hydroquinone, *o*-vanillin and pyrogallol strongly disturbed the growth of *S. faecalis* AD-4. Only scopolin out of several phenolic compounds found in mulberry leaves showed antibacterial activity.

(Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 〒060)