



Title	Streptomyces sp. F4818株菌体中の抗炎症作用を有する脂肪酸に関する研究
Author(s)	大西, 昇
Citation	大阪大学, 1978, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32380
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	大西昇
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第4349号
学位授与の日付	昭和53年6月26日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	Streptomyces sp. F4818株菌体中の抗炎症作用を有する脂肪酸に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 青沼繁 (副査) 教授 上原喜八郎 教授 鎌田皎 教授 岩田平太郎

論文内容の要旨

緒論

放線菌の产生する抗炎症作用物質として、現在までに leupeptin¹⁾, chymostatin²⁾, antipain³⁾, pepstatin⁴⁾のごとき酵素阻害物質、ラジキニン水解活性をもつ中性プロテアーゼとして kinonase⁵⁾, ritikinonase⁶⁾などが知られている。

これらの既知物質とは性質の異なる新しい抗炎症活性成分を得る目的で、抗炎症作用の指標として一般に用いられている生体膜安定化作用、ことに未知の天然物中の生理活性物質をスクリーニングするのに有利であると考えられる赤血球膜安定化作用を指標として、放線菌の产生する有効成分を検索した。

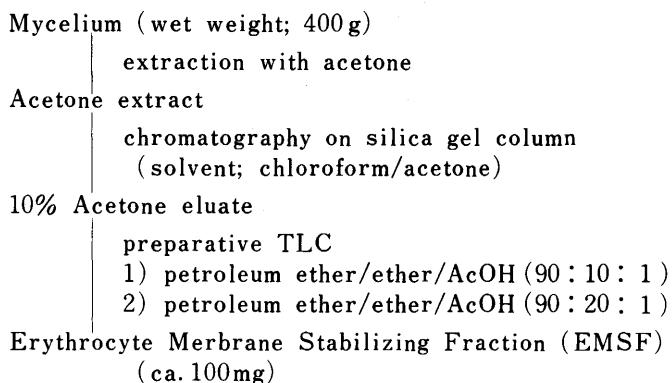
まず45株の放線菌をスクリーニングし、その内の数株が有効成分を产生することを見出した。その内の一菌株、F4818の菌体中からの有効成分の単離と構造決定を行ない、またF4818株の菌学的同定を行なった。さらに、有効成分である脂肪酸類の構造と活性の関係について検討した。

本論

1. Streptomyces sp. F4818株より产生する赤血球膜安定化分画の生物学的、化学的性質、およびF4818株の菌学的同定

Streptomyces sp. F4818株によるラット赤血球膜安定化成分の产生パターンは、活性に関して4日目に、収量は3日目にピークに達した。そこで、4日目の菌体を原料として Chart 1 に示した方法で抽出精製を行ない、赤血球膜安定化分画 erythrocyte membrane stabilizing fraction(EMSFと省略する)を得た。

Chart 1. Separation of Erythrocyte Membrane Stabilizing Fraction from Mycelium of Streptomyces sp. F4818



まずEMSFの生物学的性質について述べる。EMSFはin vitroでの生体膜安定化作用として、Fig. 1に示したようにラット赤血球加熱溶血抑制作用⁷⁾, Table I のようにラット赤血球低張圧溶血抑制作用^{8), 9)}を示した。ラット赤血球との親和性に関して検討した結果、赤血球膜を安定化する濃度では完全に赤血球と結合することが明らかになった。

Fig. 1 Effect of EMSF on Heat-induced Eerolysis

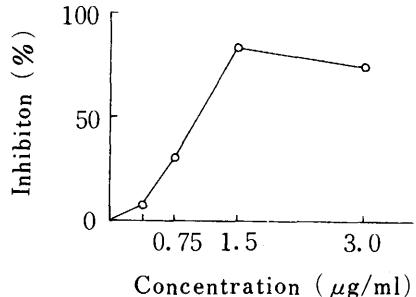


Table I. Inhibitory Effect of EMSF on Hypotonic Hemolysis of Rat Erythrocyte

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)

また、EMSFをメチルエステル化すると赤血球加熱溶血抑制および低張圧溶血抑制作用は完全に消失するが、ケン化すると再び活性が回復した。さらに、Fig. 2に示したように50mg/kgの経口投与で、ラット足蹠カラゲニン浮腫抑制作用¹⁰⁾を示した。

つぎに、EMSFの化学的性質を検討した。EMSFはchloroform, acetone, ether, AcOEt, EtOHに可溶で水に難溶、TLCプレート上でヨウ素蒸気、50% H₂SO₄噴霧後加熱で検出される。UV, IR, NMRの結果から、脂肪酸混合物であると考えられたので、ジアゾメタンでメチルエステル化しGC-MS分析した結果、Table IIに示したように9種の脂肪酸を同定した。

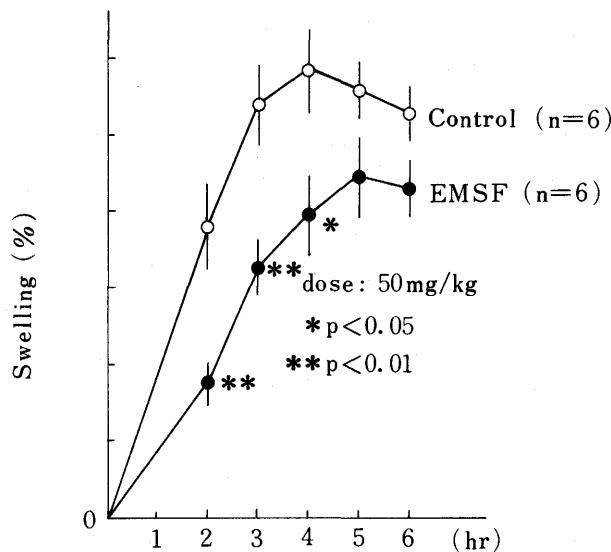


Fig. 2 Effect of EMSF by Oral Administration on Carrageenin-induced Hind Paw Edema in Rat

Table II. Fatty Acids Containing in EMSF

Methylester	Mol. wt.	Mass fragment	Fatty Acid
1	242	74, 87, 143, M-43, M-31, M-29	C _{14:0} Iso or Anteiso Myristic Acid
2	242	74, 87, 143, M-43, M-31, M-29	C _{14:0} Myristic Acid
3	256	74, 87, 143, M-43, M-31, M-29	C _{15:0} Isopentadecanoic Acid
4	256	74, 87, 143, M-43, M-31, M-29	C _{15:0} Pentadecanoic Acid
5	270	74, 87, 143, M-43, M-31, M-29	C _{16:0} Isopalmitic Acid
6	270	74, 87, 143, M-43, M-31, M-29	C _{16:0} Palmitic Acid
7	284	74, 87, 143, M-43, M-31, M-29	C _{17:0} Iso or Anteiso Margaric Acid
8	296	55, 74, 97, M-116, M-74, M-32	C _{18:1} Oleic Acid
9	298	74, 87, 143, M-43, M-31, M-29	C _{18:0} Stearic Acid

Isomyristic Acid: 12-Methyltridecanoic Acid

Anteisomyristic Acid: 11-Methyltridecanoic Acid

Isopentadecanoic Acid: 13-Methyltetradecanoic Acid

Isopalmitic Acid: 14-Methylpentadecanoic Acid

Isomargaric Acid: 15-Methylhexadecanoic Acid

Anteisomargaric Acid: 14-Methylhexadecanoic Acid

主成分である Palmitic acid (C_{16:0}) の生物活性は、EMSFと同程度の赤血球膜安定化作用を有するほか、Fig. 3 に示したように、ラット足蹠カラゲニン浮腫抑制試験でも 50mg/kg, 100mg/kg, および 200mg/kg の経口投与で明らかに有効であった。なお、本菌株についての菌学的検討の結果、Strep-

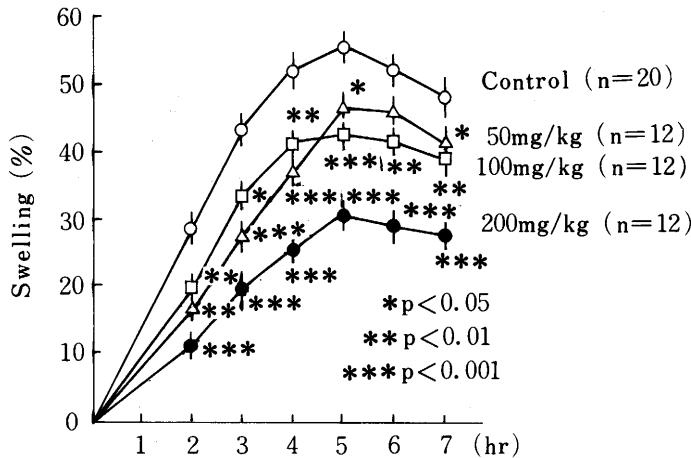


Fig. 3 Effect of Palmitic Acid by Oral Administration on Carrageenin-induced Hind Paw Edema in Rat

tomyces aureomonopodiales F4818と同定した。

2. Streptomyces aureomonopodiales F4818菌体由来の脂肪酸類およびその関連脂肪酸類の抗炎症効果

EMSFから単離同定された直鎖脂肪酸を含む、capric acid ($C_{10:0}$)～arachidic acid ($C_{20:0}$)の各直鎖飽和脂肪酸とmethyl palmitate ($C_{16:0}$ methylester), iso系脂肪酸としてisopentadecanoic acid (isoC_{15:0}), isopalmitic acid (isoC_{16:0}), isomargaric acid (isoC_{17:0})および2-hexyldecanoic acid, さらにC₁₆関連脂肪酸としてpalmitoleic acid, palmitelaidic acidおよび2-hydroxypalmitic acidについて構造と活性の関係をしらべる目的で、赤血球膜安定化作用、牛血清アルブミン (BSA) の加熱変性に対する影響,¹¹⁾ ラット足蹠カラゲニン浮腫抑制作用を検討した。

赤血球膜安定化作用に関してはラット赤血球加熱溶血抑制作用、および低張圧溶血抑制作用について検討した結果、Table III, Table IVに示したようにlauric acid ($C_{12:0}$)～margaric acid ($C_{17:0}$)の各直鎖飽和脂肪酸、iso系脂肪酸、およびC₁₆関連脂肪酸に活性がみられた。このうちC_{17:0}と2-hexyldecanoic acidは低張圧溶血抑制活性を示さなかった。また、BSA熱変性抑制作用についてはC_{16:0} methylesterおよび2-hexyldecanoic acidは活性を示さなかつたが、他の脂肪酸類はすべて抑制活性が認められた。さらに、カラゲニン浮腫抑制作用は、C_{16:0}, isoC_{15:0}およびisoC_{16:0}にのみ活性が認められた。

3. palmitic acidの抗炎症効果

以上の結果からC_{16:0}, isoC_{15:0}およびisoC_{16:0}が試験したすべてのスクリーニング系で有効であった。そこで以下の実験には主成分であり、哺乳動物の常在成分でもあるC_{16:0}を用いた。

Felt pellet法は中村ら¹²⁾の方法を用いて検討した。Table Vから明らかなように100mg/kg day、および200mg/kg/day 5日間の経口投与で、有意に肉芽の重量が減少した。

Table III. Activities of Saturated Fatty Acids in Various Experimental Systems

System	C ₁₀	C ₁₁	C ₁₂	C ₁₃	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆	C ₁₇	C ₁₈	C ₁₉	C ₂₀	C ₁₆ methyl- ester
Heat-induced Hemolysis	—	—	±	+	+	+	+	+	—	—	—	—
Hypotonic Hemolysis	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
BSA Denaturation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Carrageenin Edema ^{a)} (p. o.)	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	+
Felt Pellet							+					
Granuloma Pouch							—					

a) +; significant difference from control group at 4 hr after the injection of carrageenin
200mg/kg, p. o.

Table IV. Activities of C₁₆-and Iso-Fatty Acids in Various Experimental systems

Screening System Sample	Heat-indueed Hemolysis	Hypotonic Hemolysis	BSA Denaturation	Carrageenin- induced Edema*
Palmitic acid	+	+	+	+
Isopentadecanoic acid	+	+	+	+
Isopalmitic acid	+	+	+	+
Isomargaric acid	+	+	+	—
2-Hexyldecanoic acid	+	—	—	—
Palmitoleic acid	+	+	+	—
Palmitelaidic acid	+	+	+	—
2-Hydroxypalmitic acid	+	+	+	—

* 100mg/kg, p. o.

Table V. Effect of Successive Administration of Palmitic acid on Granuloma Formation by Felt Pellet in Rats

Tissue	control	Palmitic acid ^{a)}	
		100mg/kg, p. o.	200mg/kg, p. o.
Granuloma formed by felt pellet ^{b)}	(n=7)	(n=7)	(n=7)
	42.7 ± 2.6mg	34.4 ± 2.0*mg	32.6 ± 1.6** mg

mean ± s. e.

a) oral administration for 5 days

b) dry weight

significance of difference from control group; *p<0.05, **p<0.01

Granuloma pouch法は Selye および Robert ら¹³⁾ の方法を用いて検討した。Table VIにその結果を示したが、本法では対照群との間に有意差は認められなかったが、pouch wallの重量、貯留浸出液量ともやや減少していた。

Table VI. Effect of Successive Administration of Palmitic acid on Granuloma Formation and Other Tissues

Tissue	Control (n=9)	Palmitic acid ^a (100mg/kg, p. o.) (n=8)
Pouch wall (dry wt.)	0.91±0.06g	0.82±0.06g
Exudate	17.80±1.90ml	16.00±1.60ml
Thymus	0.27±0.03 ^b	0.25±0.02 ^b
Adrenal	0.02±0.00 ^b	0.02±0.01 ^b

mean ± s. e.

a) Oral administration for 7 days

b) tissue weight/100g b. w.

なお、この際同時に piliero ら¹⁴⁾ の方法で測定したラット血清の加熱変性は、C_{16:0}を100mg/kg/day, 200mg/kg/day 5日間の経口投与で30%以上抑制することが認められた。

副腎摘出ラットのカラゲニン浮腫抑制作用は、Fig. 4 のように正常ラットに対するのと同様の抑制活性を示し、C_{16:0}の作用は副腎を介さない一次作用であると考えられる。

C_{16:0}のメチルエステルは in vitro の系では全く活性を示さないが、抗カラゲニン浮腫作用については経口投与で有効、腹腔内投与で無効であった。経口投与されたメチルエステルは、腸管から吸収され加水分解されて遊離のカルボン酸が作用を発揮したものと考えられる。また、C₁₆脂肪酸類についてはTable IVに示したように、2重結合およびC 2位に水酸基の導入によって、カラゲニン浮腫抑制作用は全く認められなくなった。

4. palmitic acidの抗炎症作用の機構に関する検討

C_{16:0}がラット足蹠カラゲニン浮腫法で有効であり、他の直鎖脂肪酸類は赤血球膜安定化、蛋白質熱変性抑制作用があるにも拘らず、カラゲニン浮腫抑制作用が無効であることの原因解明への手がかりを得る目的で、1-¹⁴C-palmitic acidと対照薬物として1-¹⁴C-myristic acidを用い、正常ラットにおける生体内分布と、granuloma pouch ラットにおける炎症組織への分布について比較検討した。

Table VIIにgranuloma pouch ラットにおける分布の比較を示したが、各組織ならびに炎症部位での浸出液中にはC_{16:0}の分布が多く、pouch wallではC_{14:0}の分布が多いという結果を得た。一般にgranuloma pouch法による肉芽形成抑制効果は、pouch wallの重量抑制よりも、浸出液量の抑制が

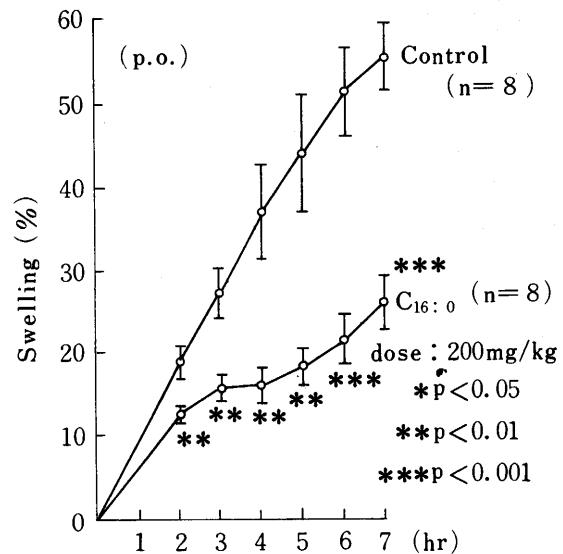


Fig. 4 Effect of Palmitic Acid on Carrageenin-induced Hind Paw Edema in Adrenalectomized Rat

重要な指標とされており,¹⁵⁾ C_{16:0} と C_{14:0} の肉芽組織と浸出液間の分布濃度の差が抗炎症効果を発現する際の機構に関係があるのかもしれない。

Table VII. Comparison of Distribution of 1-¹⁴C-Palmitic acid with that of
A) 1-¹⁴C-Myristic acid in Rats with Granuloma Pouch

Tissue	% of dose/g tissue or ml 2 hr		% of dose/g tissue or ml 24 hr	
	Palmitic acid (n=4)	Myristic acid (n=5)	Palmitic acid (n=4)	Myristic acid (n=5)
Adrenal	0.617±0.037 ^a	0.241±0.122	1.079±0.062 ^a	0.828±0.051
Thymus	0.023±0.007	0.019±0.009	0.051±0.007	0.060±0.009
Pouch wall	0.040±0.010 ^b	0.229±0.095	0.048±0.009	0.102±0.026
Exudate	0.013±0.003 ^a	0.006±0.001	0.009±0.006	0.001±0.000
Plasma	0.021±0.004	0.017±0.003	0.002±0.000	0.002±0.000

B)

Tissue	% of dose in tissue 2 hr		% of dose in tissue 24 hr	
	Palmitic acid (n=4)	Myristic acid (n=5)	Palmitic acid (n=4)	Myristic acid (n=5)
Adrenal	0.020±0.004	0.009±0.005	0.034±0.003	0.028±0.003
Thymus	0.009±0.001	0.005±0.002	0.021±0.002	0.023±0.004
Pouch wall	0.054±0.012	0.288±0.098	0.088±0.017 ^a	0.225±0.032
Exudate	0.023±0.014	0.014±0.007	0.018±0.017	0.005±0.002

All values represent mean±s.e.

Significance of difference from Myristic acid administered group; a) p<0.05, b) p<0.01

以上のようにC_{16:0}は炎症部位にかなりの分布を示すことが明らかとなったが、その抗炎症作用の機構は不明である。

通常、脂肪酸は血清アルブミンと強い親和性を有することが知られ、それによって蛋白質の熱変成を抑制すると考えられるが、この蛋白質との結合作用と抗炎症効果発現との関係を知るため、蛋白質として炎症に関係があり、それ自体生物活性を有している酵素をモデル蛋白として選び、脂肪酸が蛋白質と結合することが活性発現に如何なる影響を与えるかをしらべた。なお、酵素として現在炎症過程に何らかの関係が考えられている pepsin, trypsin, α -chymotrypsin, kallikrein および plasmin を選び、これらに対する阻害活性を C_{14:0}, C_{16:0}, C_{18:0} (stearic acid), C_{16:0} methylester および対照薬物として酸性抗炎症剤である phenylbutazon (PB) を用いて検討した。

その結果を Table VIII にまとめたが、C_{16:0}は kallikreine を除く他のすべての酵素に対して阻害効果

Table VII. Inhibitory Effects of Myristic Acid, Palmitic Acid, Methyl Palmitate, Stearic Acid and Phenylbutazone in Various Experimental Systems

Screening system	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{16:0} methyl	C _{18:0}	PB
Heat-induced Hemolysis	+	+	-	-	+
Hypotonic Hemolysis	+	+	-	-	+
BSA Heat Denaturation	+	+	-	+	+
Carrageenin-induced Paw Edema					
(p. o.)	-	+	+	-	+
(s. c.)	-	+	-	-	+
Felt Pellet method	+				
Granuloma Pouch method		-			
Pepsin	+	+	-	+	+
Trypsin (protease)	±	+	+	+	-
(esterase)	±	+	+	+	+
α-Chymotrypsin	+	+	+	+	+
Kallikrein (esterase)	-	-	-	-	+
Plasmin (protease)	+	+	-	+	±
(fibrinolysis)	+	+	-	+	±

を示した。これに対し、C_{14:0}はC_{16:0}に比して全般的に阻害活性が弱く、C_{18:0}はC_{16:0}とほぼ同程度の活性を示した。しかし、C_{18:0}は赤血球膜の安定化作用が認められず、脂肪酸のin vivoでの抗炎症効果発現には、膜の安定化作用も重要な要因であると考えられる。また、C_{16:0} methyl esterはtrypsinとα-chymotrypsinを阻害した。けれども酵素活性の測定 mediumのpHがほぼ同じ plasminでは阻害活性がみられず、このことは trypsinと plasminでは、遊離のカルボン酸残基の存在以外に、脂肪酸との結合様式、および結合による酵素の活性中心への影響の差が考えられ、各酵素に対する阻害活性が一定でない酸性抗炎症剤である phenylbutazonについても同様に理解されよう。しかし、以上の知見はin vitroでのモデル実験に基くものであり、実際に炎症組織でも同様な阻害反応がおきているかどうかを直接的に証明するものではない。ただC_{16:0}の生体内での作用発現機構の一部は、炎症過程で上記酵素のような生理活性をもつ蛋白質との相互作用によって、生じていることが推察される。また、これらの結果はin vivoにおける C_{16:0}と C_{14:0}の効果の差とよく一致し、C_{16:0}と C_{18:0}の作用の比較から、生体膜安定化作用も脂肪酸の抗炎症効果発現にとって要因の一つであると考えられる。

結論

1) 赤血球膜安定化作用を指標として、Streptomyces SP. F4818株菌体から活性成分の抽出を行い、赤血球膜安定化分画 erythrocyte membrane stabilizing fraction (EMSF)を得た。このEMSFは分析の結果、palmitic acid (C_{16:0})を主成分とする9種の脂肪酸混合物であることを明らかにした。なお、Streptomyces SP. F4818株は菌学的検討の結果 Streptomyces aureomonopodiales F4818と同定した。

2) EMSFから単離同定された脂肪酸を含む直鎖およびiso系脂肪酸類について構造と活性の関係をしらべる目的で、赤血球膜安定化作用、蛋白質の加熱変性に対する影響、および抗カラゲニン浮腫作用を検討した。その結果、以上のすべてに有効性を示したのは、 $C_{16:0}$, $isoC_{15:0}$, および $isoC_{16:0}$ の各脂肪酸であった。

3) さらに、 $C_{16:0}$ はfelt pellet法で有意な肉芽形成抑制作用を示し、granuloma pouch法でも抑制の傾向を示した。また、同時に測定したラット血清蛋白の加熱変性を抑制した。 $C_{16:0}$ はメチルエステル化するとin vitroの系での活性を消失するが、in vivoにおける抗カラゲニン浮腫作用は経口投与で有効、腹腔内投与で無効であった。また、二重結合および2-hydroxy基の存在する C_{16} 脂肪酸は抗カラゲニン浮腫作用を全く示さなかった。

4) $1^{-14}C$ -palmitic acidと $1^{-14}C$ -myristic acidを用い、正常ラットにおける生体内分布とgranuloma pouchラットにおける炎症組織への分布について比較検討した。その結果、全般的に各臓器ならびに炎症部位での浸出液中に $C_{16:0}$ の分布が多く、pouch wallでは $C_{14:0}$ の分布が多い結果を得た。

5) Pepsin, trypsin, α -chymotrypsin, kallikrein, およびplasminに対するin vitroでの酵素活性を、 $C_{16:0}$ はkallikreinを除いてすべて阻害した。

参考文献

- 1) T. Aoyagi, S. Miyata, M. Nanbo, F. Kojima, M. Matsuzaki, M. Ishizuka, T. Takeuchi, H. Umezawa, J. Antibiot., **22**, 558 (1969).
- 2) H. Umezawa, T. Aoyagi, H. Morishima, S. Kunitomo, M. Matsuzaki, M. Hamada, T. Takeuchi, J. Antibiot., **23**, 425 (1970).
- 3) H. Ikezawa, Y. Yamada, T. Aoyagi, T. Takeuchi, H. Umezawa, J. Antibiot., **25**, 738 (1972).
- 4) T. Aoyagi, S. Kunimoto, H. Morishima, T. Takeuchi, H. Umezawa, J. Antibiot., **24**, 687 (1970).
- 5) S. Nakamura, Y. Marumoto, H. Yamaki, T. Nishimura, T. Tanaka, H. Umezawa, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), **17**, 714, (1969), **17**, 2044 (1969).
- 6) S. Nakamura, M. Hamada, M. Ishizuka, H. Umezawa, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), **18**, 2112 (1970).
- 7) 中西美智夫, 今村 博, 後藤一洋, 薬誌, **90**, 548 (1970).
- 8) A. D. Inglot and E. Wolna, Biochem. Pharmacol., **17**, 269 (1968).
- 9) M. Murofushi, T. Sato, T. Fujii, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), **21**, 1364 (1973).
- 10) C. A. Winter, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **111**, 544 (1962).
- 11) Y. Mizushima and H. Suzuki, Arch. Int. Pharmacodyn., **157**, 115 (1965).
- 12) H. Nakamura and M. Shimizu, Eur. J. Pharmacol., **27**, 198 (1974).
- 13) 藤村 一, 医薬品開発基礎講座V・薬効の評価(1)薬理試験法(上), 地人書館, 1971, P. 271.
- 14) S. J. Piliero and C. Colombo, Clin. Pharmacol., **7**, 197 (1967).
- 15) G. R. Bobalik and J. W. Bastian, Arch. intern. Pharmacodyn., **166**, 466 (1967).

論文の審査結果の要旨

赤血球膜安定化作用を指標として、*Streptomyces* sp株菌体から活性成分の分離を行い、9種の成分を明らかにした。さらに、それらの生体内分布と代謝の研究を行い、その薬としての役割を解明した。よって薬学博士としての価値ある論文と認める。