

## ブラジル産「レッドプロポリス」の 起源植物と主な化学成分

Andreas Dausch, Cleber S. Moraes,  
Patricia Fort, Yong K. Park

プロポリスとはミツバチ（セイヨウミツバチ）によって種々の植物から集められた成分の樹脂様混合物である。ミツバチはプロポリスで巣の穴をふさぎ、また巣門の防御などにも利用している (Ghisalberti, 1979; Greenaway et al., 1990)。プロポリスの持つ幅広い生理活性に基づいて、人々は戦傷を癒すための軟膏などの形で古くから活用してきており (Thomsom, 1990)、伝統的民間薬としての利用は紀元前約3000年から続いている。プロポリスについては、その多くの生理活性、例えば、細胞毒性 (Matsuno et al., 1997)、抗ヘルペス効果 (Vynograd et al., 2000)、抗腫瘍作用 (Kimoto et al., 1998)、膿の除去 (Basnet et al., 1997)、抗微生物活性 (Park et al., 1998)、抗真菌活性 (Ota et al., 2001) や抗エイズウイルス活性 (Ito et al., 2001)、さらにはダイオキシン毒性に対する抑制効果 (Park et al., 2005) などが報告されている。このように広域な生理活性を持っていることから、今日プロポリスは健康食品（サプリメント）

や飲料としての利用が拡大し続けている (Burdock, 1998)。

これまでに私たちはブラジルのプロポリスを、その物理化学的な性質から12の種類（北部の6種、中部の1種、南部の5種）に分類する報告を行った。またそこで、その中の第3グループのものはヤナギ科のポプラ類 *Populus* spp. の樹脂を起源とし、第6グループと第12グループのものはシソ科のイガニガクサ属の一種 *Hyptis divaricata* とキク科のアレクリン=ド=カンボ *Baccharis dracunculifolia* の新芽の滲出液を起源としていると報告した (Park et al., 2002)。

プロポリスは通常、暗黄色か褐色の樹脂状の物質である。近年、私たちはブラジル北部の海岸や河岸沿いに設置された巣箱内で赤色のプロポリス（以下、レッドプロポリス）があることを発見した。

すでに Trusheva et al. (2006) がレッドプロポリスに含有される生理活性成分について報告

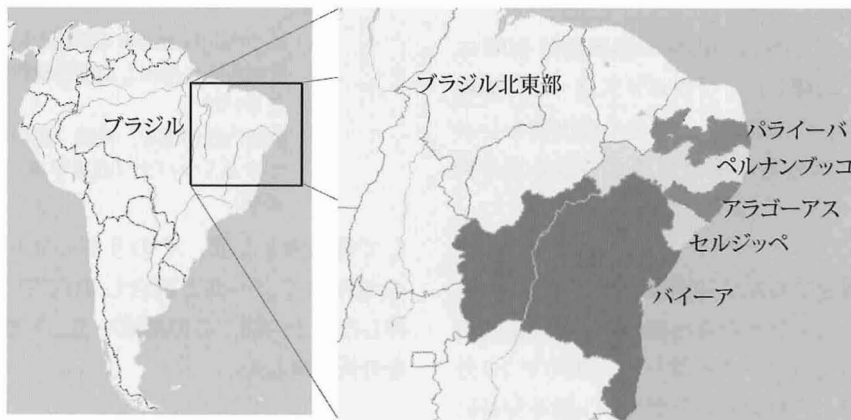


図1 「レッド・プロポリス」の産地はブラジル北東部  
今回の実験サンプルは右図の5州から集められた。

を行っているが、起源植物については言及していなかった。私たちはレッドプロポリスを産する地方のミツバチが、マメ科ツルサイカチ属の一種 *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. (以下エカストフィラム) 表面の赤い滲出液 (Donnelly et al., 1973; Matos et al., 1975) を集めていることを観察し、おそらくそれがレッドプロポリスの起源植物であろうと推察していた。そこでその証明のため、今回私たちはレッドプロポリスと植物滲出液成分を分析、比較することにした。

### 材料および方法

#### プロポリスと起源植物

最初に述べたとおり、レッドプロポリスは、ブラジル北東部に位置するバイーア州、セルジッペ州、アラゴアス州、ペルナンブコ州、パライーバ州の5か所で、海岸および川岸沿いの永年灌木林の近くに置かれたミツバチの巣箱から採集した。エカストフィラムからの赤色の滲出物は、図2Aに示すように昆虫によって穿けられた穴から滲出したものを直接採集した。ミツバチがエカストフィラムの表面や穴からの滲出液を集めている様子も同時に観察された(図2B)。ミツバチは穴からの滲出物を集めては後肢につけていた(表紙参照、図2C)。

このようにしてエカストフィラムから集められた赤色の滲出物を分析し、同じ地域でミツバチの巣箱から採集されたレッドプロポリスの分析結果と比較した。

エカストフィラムの赤色の滲出物は80%エタノールに溶解した。プロポリスは一つの巣箱から約50gずつ採取し、赤色の滲出物もレッドプロポリスも各産地で6種ずつ集めて分析に供した。

#### 赤色滲出物とプロポリス溶液調製

エカストフィラムの赤色滲出物500mgを5mLの80%エタノールと混合し、70℃で10分間振盪した。それを遠心分離後、上清を分析に供した。プロポリスサンプル(約50g)は冷凍庫で冷凍したのち速やかにブレンダーで粉碎

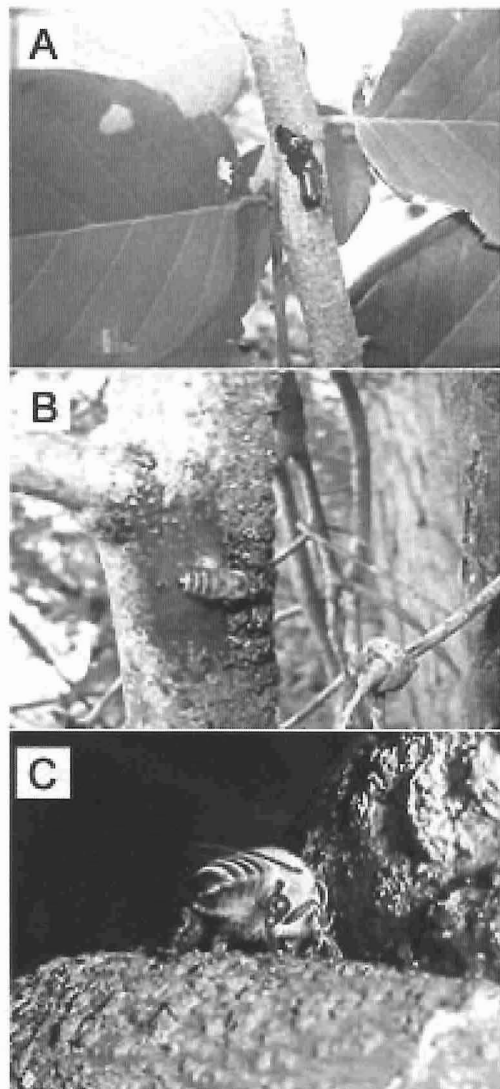


図2 *Dalbergia ecastophyllum* (エカストフィラム) から赤色の滲出物を集めるアフリカ蜂化ミツバチ

- A 枝の穴から滲出する赤色の樹脂様物質
- B 枝の表面に滲出した赤色樹脂を集めるミツバチ
- C 集めた滲出物を、後肢(花粉カゴ)につけたミツバチ(表紙写真にて色彩を参照)

して微粉末とした。そのうちの2gを25mLの80%エタノールと混合し70℃で30分間攪拌した。その後、この溶液を遠心分離して上清を分析に供した。

#### 逆相高性能薄層クロマトグラフィ

3  $\mu$ L のプロポリスおよび滲出物のエタノー

ル抽出液を逆相高性能薄層クロマトグラフィ用のシリカゲル RP-18F<sub>254</sub>S を塗布したプレートにスポットし、メルク社の方法にしたがって、エタノール:水 (55:45, v/v) を展開溶媒として展開した。フラボノイドは、366 nm の UV で検出した。

### 逆相高速液体クロマトグラフィ

プロポリスおよび滲出物のエタノール抽出液中のフラボノイドや他のフェノール化合物は、YMC 社の ODS-A カラム (RP-18, 4.6 × 250 mm, 粒径 5 μm) を用いて分離し、島津社製の DAD (SPD-M10A) で検出した。移動相は水 (A ポンプ) とメタノール (B ポンプ) の 2 ポンプによるグラジエント条件とし、分析開始から 15 分間はメタノール濃度を 30% に保ち、その後 75 分間で 90% まで上昇させ、そのまま 20 分間保持した。その後 10 分間で再び 30% まで戻した。流量は 1 mL/min, UV 検出波長は 268 nm とした。フラボノイド標準品は Extrasynthese 社 (フランス) 製のものを用いた。

### プロポリスおよび滲出物エタノール抽出液の抗菌活性

黄色ブドウ状球菌 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 に対するプロポリスの抗菌活性は、Isla et al. (2005) による方法に準じて行った。黄色ブドウ状球菌培養液を、滅菌したスワブで寒天培地へ塗布し、プロポリスおよび滲出物の抽出液をしみこませたディスクとともに 37°C で一晚培養した。ディスクは、φ5 × 1 mm のワットマン濾紙 No.3 に抽出液 10 μL を含ませて、室温で減圧乾燥を一晚行ったのち、さらに 60°C で 4 時間放置して調製した。

## 結果

### レッドプロポリスとその起源植物

図 2 に示したように、ミツバチがエカストフィラムの表面から赤色の滲出液を集めてプロポリスの原料として持ち帰ることが観察された。そこで次にプロポリス、滲出液から調製されたサンプルを逆相高性能薄層クロマトグラフィお

よび逆相高速液体クロマトグラフィで分析を行った。

逆相高性能薄層クロマトグラフィの結果においては、プロポリスの薄層プレート上の展開パターン (図 3a) が、植物から得られた赤色の滲出液の展開パターン (図 3b および 3c) と一致していた。このことからレッドプロポリスの起源植物はエカストフィラムであることが示唆された。

図 4 にプロポリスとエカストフィラムの滲出物の、逆相高速液体クロマトグラフィによるフラボノイドを含む化学成分の定性的および定量的比較結果を示した。各成分の同定は、標準物質の保持時間と吸収波長特性との比較、および標準物質添加試験を行うことによって行った。図 4 および表 1 に示すように、レッドプロポリスとエカストフィラム滲出物のクロマトグラムは完全に一致していた。この結果からも、レ

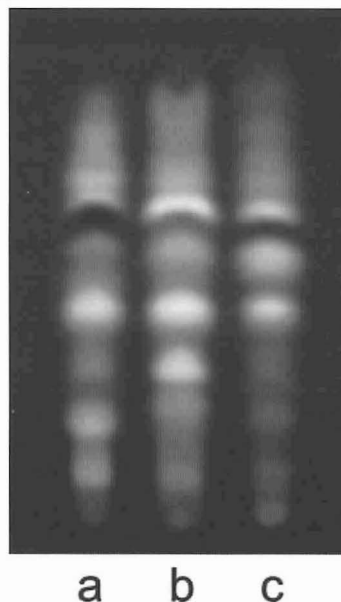


図 3 プロポリスおよびエカストフィラムの滲出物のエタノール抽出液の逆相高性能薄層クロマトグラフィ。それぞれ 3 μl を展開。  
A プロポリスのエタノール抽出液  
B エカストフィラムの赤色滲出物のエタノール抽出液 (図 1A に示した同一サンプル)  
C エカストフィラムの赤色滲出物のエタノール抽出液 (図 1B に示した同一サンプル)

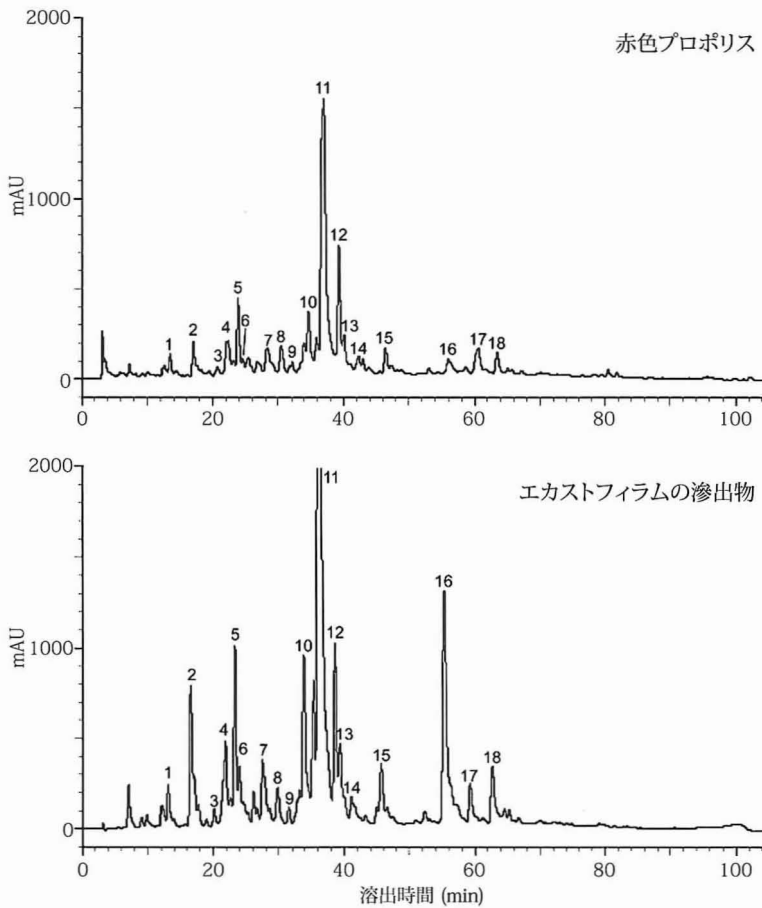


図4 プロポリスおよびエカストフィラムの滲出物のエタノール抽出液の逆相高速液体クロマトグラフィ。ピーク番号は表1および2に詳細を示した

表1 赤色プロポリスとエカストフィラム滲出物に含まれるフラボノイドおよびその他の成分

ピーク	溶出時間 (min)	成分名または最大吸収波長	含有量 (mg/g)	
			プロポリス	エカストフィラム
1	13.42	ルチン	0.7	1.3
2	16.99	リキリチゲニン	1.8	7.1
3	20.63	ダイゼイン	0.3	4.3
4	22.35	ピノバンクシン	1.7	6.0
5	23.84	$\lambda_{\max}$ UV 251, 292 nm*	+	+
6	24.59	ケルセチン	0.5	1.9
7	28.40	ルテオリン	1.2	2.1
8	30.46	$\lambda_{\max}$ UV 241, 272, 282 nm*	+	+
9	32.15	ダルベルジン	0.4	0.9
10	34.62	イソリキリチゲニン	4.8	12.1
11	36.97	フォルモノネチン	10.2	19.5
12	39.28	$\lambda_{\max}$ UV 235, 263 nm*	+	+
13	40.08	ピノセンブリン	3.3	7.1
14	42.30	ピノバンクシン-3-酢酸	1.7	2.6
15	46.45	ビオカニン A	0.5	1.5
16	55.96	$\lambda_{\max}$ UV 238, 260, 269 nm*	+	+
17	60.53	$\lambda_{\max}$ UV 233, 249, 329 nm*	+	+
18	63.43	$\lambda_{\max}$ UV 233, 256 nm*	+	+

\*+ は含有を示す。ただし定量はしていない

\* 未同定成分 (紫外外部最大吸収波長のみ測定)

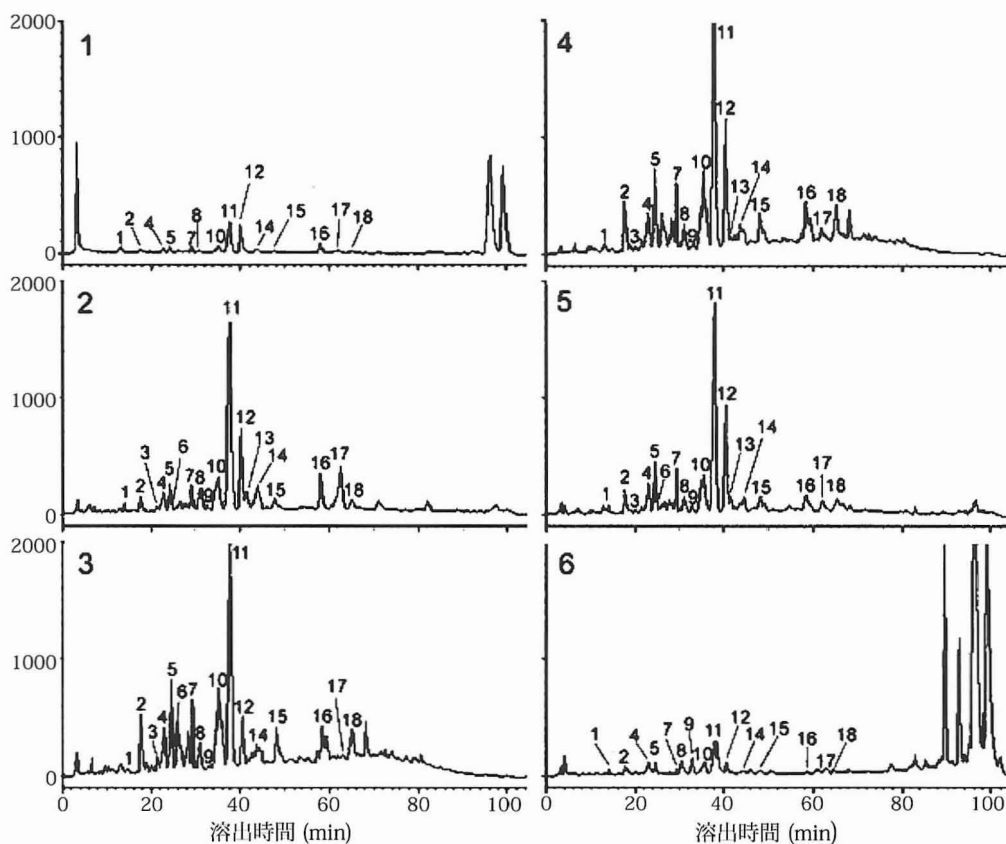


図5 アラゴアス州で採取された6サンプル(サンプル/巣箱)のプロポリスエタノール抽出液の逆相高速液体クロマトグラフィパターン

表2 赤色プロポリス中に含まれるフラボノイドとその他の成分

ピーク	溶出時間 (min)	成分名または 最大吸収波長	赤色プロポリス中の含有量 (mg/g)			
			2	3	4	5
1	13.42	ルチン	0.7	1.1	0.9	0.6
2	16.99	リキリチゲニン	1.8	5.7	5.0	2.2
3	20.63	ダイゼイン	0.3	0.6	0.5	0.2
4	22.35	ピノバンクシン	1.7	5.7	4.9	3.3
5	23.84	$\lambda_{\max}$ UV 251, 292 nm*	+	+	+	+
6	24.59	ケルセチン	0.5	3.0	4.5	2.6
7	28.40	ルテオリン	1.2	2.5	2.4	1.5
8	30.46	$\lambda_{\max}$ UV 241, 272, 282 nm*	+	+	+	+
9	32.15	ダルベルジン	0.4	2.4	2.5	1.4
10	34.62	イソリキリチゲニン	4.8	9.9	8.3	5.5
11	36.97	フォルモノネチン	10.2	10.7	10.9	10.5
12	39.28	$\lambda_{\max}$ UV 235, 263 nm*	+	+	+	+
13	40.08	ピノセンブリン	3.3	9.8	8.3	7.3
14	42.30	ピノバンクシン-3-酢酸	1.7	3.6	2.4	2.3
15	46.45	ピオカニン A	0.5	2.1	1.7	0.4
16	55.96	$\lambda_{\max}$ UV 238, 260, 269 nm*	+	+	+	+
17	60.53	$\lambda_{\max}$ UV 233, 249, 329 nm*	+	+	+	+
18	63.43	$\lambda_{\max}$ UV 233, 256 nm*	+	+	+	+

\* "+" は含有を示す。ただし定量はしていない

\* 未同定成分 (紫外最大吸収波長のみ測定)

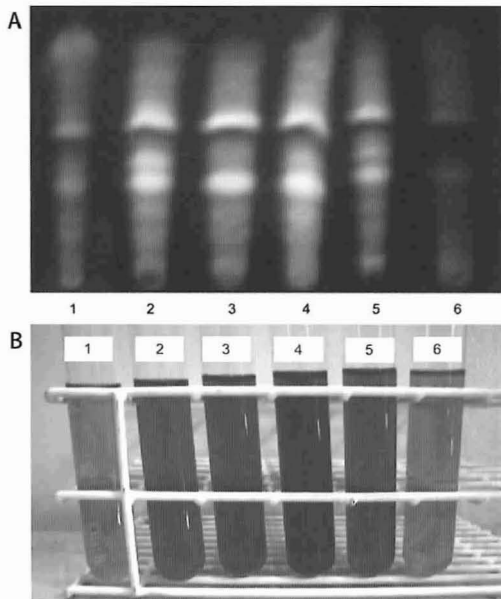


図6 アラゴアス州から採取された6種（一つのサンプルは一つの巣箱から採取されている）のプロポリスエタノール抽出液の逆相高性能薄層クロマトグラフィパターン (A) と溶液の濃度を示す (B)。サンプル1および6では薄層のスポットパターンが異なり、また溶液の色が薄い。(サンプル番号は図5と共通)

ッドプロポリスの起源植物がエカストフィラムであることが示された。

私たちは他の地方から採集した各6種類のレッドプロポリスについても分析を行ったが、すべての採集地のレッドプロポリスが似たようなクロマトグラムを示した。そのうちのアラゴアス州のプロポリスの分析結果を図5および6に示す(サンプル番号は図7を含めて共通)。図6Bに6種プロポリス溶液の色を比較して示したが、サンプル1と6は、他のサンプルに比べて赤色度が薄い。図6Aでもサンプル2から5の逆相高性能クロマトグラフィのスポットパターンは同一であるが、1と6は若干異なっている。図5aの逆相高速液体クロマトグラフィの結果においても、サンプル2から5のプロポリスで質的、量的に一致した特徴がみられており(表2)、同一の起源植物から生成されたものであることはまちがいない。

サンプル1と6は、他のサンプルにも共通に含まれている化学成分の濃度が、他のサン

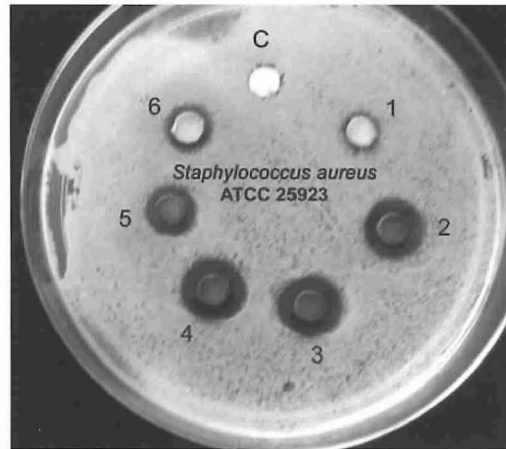


図7 各プロポリスのエタノール抽出液の、黄色ブドウ球菌 ATCC25923 に対する生長阻止円。10  $\mu$ L の抽出液を含むろ紙ディスクを調整して、培地に置いた(サンプル番号は図5および図6と共通)

ルと比べて全体的に低い結果となっている。その一方で、他のサンプルには含まれていない成分(溶出時間 80 ~ 100 分)が含まれている。この成分は、エカストフィラム以外の起源植物由来するものであると推察される。

### プロポリスの抗菌性

6種サンプルの黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性を測定した結果を図7に示す。サンプル2から5は、サンプル1および6と比べて高い抗菌活性を示していた。

サンプル1および6は、エカストフィラム由来の化学成分を他のサンプルに比べて少ししか含んでいない代わりに、他の起源植物由来の成分を含んでいるが、それらの成分の抗菌活性はエカストフィラムのものよりも小さいと考えられる。

### 考察

これまでに報告されてきたように、ブラジル産プロポリスはその物理化学的性質からは12種類に分類される(Park et al., 2002; 2004)。その中の3種については植物の芽、未展開の葉をミツバチが訪れて樹脂様物質を集め、プロポリスの原料として持ち帰ることが確認されている(Thomsom, 1990; Kimoto et al., 1998;

Burdock, 1998).

近年, 私たちは, ブラジル北東部の海岸および河岸付近に設置されたミツバチの巣箱から, 赤色のプロポリス (いわゆる「レッドプロポリス」) が産生されることを見いだした. ブラジル産レッドプロポリスには, リキリチゲニン, ダイゼイン, ダルベルジン, イソリキリチゲニン, フォルモノネチン, ビオカニン A が含まれていることが明らかになっている. これら成分のうち3種 (ダイゼイン, フォルモノネチン, ビオカニン A) はイソフラボノイドである. すでにキューバ産のレッドプロポリスがイソフラボノイドを含んでいることが報告されている (Piccinelli et al., 2005). イソフラボノイドは, 植物界では非常に限られた植物種にしか含まれておらず, ほぼマメ科のダイズ, ヒヨコマメ, レンズマメなどにしか含まれていないといっても過言ではない (Piccinelli et al., 2005). 興味深いことに, エカストフィラムの植物体にもイソフラボノイドが含まれていることが報告されている (Donnelly et al., 1973).

イソフラボノイドが食物や添加物に含まれて摂取されると, 閉経後の骨粗鬆症, ホルモン産生器官の腫瘍, 前立腺癌等の症状緩和に効果があるということが知られている.

南米産のエカストフィラムの抽出液には, リキリチゲニン, ダイゼイン, ダルベルジン, イソリキリチゲニン, フォルモノネチン, ビオカニン A が含まれている (Donnelly et al., 1973). このうち, イソリキリチゲニンは, 前立腺癌の生長を抑制するという報告があり (Kanazawa, 2003), またリキリチゲニンおよびイソリキリチゲニンにはキサンチンオキシダーゼの活性を阻害するという報告もある. キサンチンオキシダーゼ活性を阻害することは, 肝臓癌や脳の腫瘍 (これらは体液中のキサンチンオキシダーゼ濃度を上げるものである) に対して効果があるとされている (Kong et al., 2000).

今回分析したアラゴアス州のサンプル 1 と 6 でもこれらの成分は確認されたが, 他のサンプルに比べて低い濃度であり, 未同定の, エカストフィラム滲出物には含まれていない成分も

確認された. この2つのサンプルはエカストフィラムの少ない場所に置かれた巣箱から採集されており, そのためミツバチは他の植物からもプロポリスの原料を集めたのであろう. 私たちはさらに他のレッドプロポリスの起源植物を探索, 同定していく予定である.

## まとめ

ブラジル産レッドプロポリスの代表的なものとして, ブラジル北東部5州の海岸および河岸にある, 永年灌木群の付近に設置された巣箱から採集されたプロポリスサンプルについて, 得られた各州につき6サンプルずつの分析を行った. 現地では, ミツバチがエカストフィラム *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. の表面から赤色の滲出液をプロポリスの原料として集めているのが観察された. 逆相高性能薄層クロマトグラフィおよび逆相高速液体クロマトグラフィの分析結果からは, すべてのレッドプロポリスおよび赤色滲出液でよく似た成分特性を持っていることが確認された.

レッドプロポリスの主要起源植物は, エカストフィラムであることが確認されたが, エカストフィラムがあまり生育していない場所にある巣箱から採集されたプロポリスは, エカストフィラム由来の化学成分の含有量が少なく, 代わりに異なった未知の成分 (高速液体クロマトグラフィでの溶出時間が80~100分) が含まれていた. またそのようなプロポリスでは, 抗菌活性が他の主な起源植物をエカストフィラムとしているプロポリスと比較して低かった. 抗菌活性の低いプロポリスは, 異なった植物から集められた樹脂を含んでおり, レッドプロポリスの品質に関しては, 起源植物であるエカストフィラムの豊富さが重要であることが示唆された.

(著者の住所は下記参照 翻訳 中村 佳子)

## 引用文献

- Basnet, P., T. Matsuno and R. Z. Neidlein. 1997. Z. Naturforsch. 52c: 828-833.  
Burdock, G. A. 1998. Food Chem. Toxicol. 36: 347-363.

- Donnelly, D. M. X., P. J. Keenan and J. P. Prendergast. 1973. *Phytochemistry* 12: 1157-1161.
- Ghisalberti, E. L. 1979. *Bee World* 60: 59-84.
- Greenaway, W., T. Scaysbrook and F. R. Whatley. 1990. *Bee World* 71: 107-118.
- Isla, M. I., J. F. Paredes-Guzman, M. I. Nieva-Moreno, H. Koo and Y. K. Park. 2005. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1166-1172.
- Ito, J., F. R. Chang, H. K. Wang, Y. K. Park, M. Ikegaki, N. Kilgore and K. H. Lee. 2001. *J. Nat. Prod.* 64: 1278-1281.
- Kanazawa M., Y. Satomi, Y. Mizutani, O. Ukimura, A. Kawauchi, T. Sakai, M. Baba, T. Okuyama, H. Nishino and T. Miki. 2003. *Eur. Urol.* 43: 580-586.
- Kimoto, T., S. Arai, M. Kohguchi, M. Aga, Y. Nomura, M. J. Micallef, M. Kurimoto and K. Mito. 1998. *Cancer Detect. Prev.* 22: 506-515.
- Kong, L. D., Y. Zhang, X. Pan, R. X. Tan and C. H. K. Cheng. 2000. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 500-505.
- Matos, F. J. A., O. R. Gottlieb and C. H. S. Andrade. 1975. *Phytochemistry* 14: 825-826.
- Matsuno, T., Y. Matsumoto, N. Saito and J. Morikawa. 1997. *Z. Naturforsch.* 52c: 702-704.
- Ota, C., C. Unterkircher, V. Fantinato and M. T. Shimizu. 2001. *Mycoses* 44: 375-378.
- Park, Y. K., I. Fukuda, H. Ashida, S. Nishiumi, K. Yoshida, A. Dausch, H. Sato and Pastore Glaucia, M. J. *J. Agric. Food Chem.* 2005;53:10306-10309.
- Park, Y. K., J. F. Paredes-Guzman, C. L. Aguiar, S. M. Alencar and F. Y. Fujiwara. 2004. *J. Agric. Food Chem.* 52: 1100-1103.
- Park, Y. K., M. H. Koo, J. A. S. Abreu, M. Ikegaki, J. A. Cury and P. L. Rosalen. 1998. *Curr. Microbiol.* 36: 24-28.
- Park, Y. K., S. M. Alencar and C. L. Aguiar. 2002. *J. Agric. Food Chem.* 50: 2502-2506.
- Piccinelli, A. L., M. C. Fernandes, O. Cuesto-Rubio, I. M. Hernandez, F. de Simone and L. Rastrelli. 2005. *J. Agric. Food Chem.* 53: 9010-9016.
- Thomsom, W. M. 1990. *Med. J. Aust.* 153: 654.
- Trusheva, B., M. Popova, V. Bankova, S. Simova, M. C. Marcucci, P. L. Miorin, F. D. R. Pasin and I. Tsvetkova. 2006. *ECAM* 3: 249-254.
- Vynograd, N., I. Vynograd and Z. Sosnowski. 2000. *Phytomedicine* 7: 1-6.
- ANDREAS DAUGSCH, CLEBER S. MORAES, PATRICIA FORT, YONG K. PARK. Botanical origin of Brazilian reddish propolis and its major chemical constituents. *Honeybee Science* (2006) 27(2): 55-62. Department of Food Science, College of Food Engineering, State University of Campinas, P.O. Box 6177, Campinas, SP, Brazil.

Propolis contains resinous substances collected by honey bees from various plant sources and has been used as a traditional folk medicine since ca. 3000 BC. Nowadays, the use of evidence-based complementary and alternative medicine (CAM) is increasing rapidly, and so is the use of propolis in order to treat or support the treatment of various diseases. Much attention has been focused on propolis from *Populus* sp. (Salicaceae) and *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), but scientific information about the numerous other types of propolis is still sparse. We gathered six samples of red propolis in five states of Northeastern Brazil. The beehives were located near woody perennial shrubs along the sea and river shores. The bees were observed to collect red resinous exudates on *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. (Leguminosae) to make propolis. The flavonoids of propolis and red resinous exudates were investigated using RPHPLC and RPHPTLC. It was concluded that the botanical origin of the reddish propolis is *D. ecastophyllum*. In areas where this source (*D. ecastophyllum*) was scarce or missing, bees were collecting resinous material from other plants. Propolis, which contained the chemical constituents from the main botanical origin, showed higher antimicrobial activity.