

ミツバチ花粉の抗酸化作用 —他のミツバチ生産物との比較—

池野 久美子・柿本 佳名子・中村 正・
池野 武行・篠原 力雄

ミツバチ生産物として知られるハチミツ、ローヤルゼリー、プロポリスおよび花粉は、それぞれ様々な機能を有し(Burdock, 1998; Molan, 2002; Stangaciu, 2002; Simuth and Bilikova, 2004), 古くから利用されている。ハチミツ、ローヤルゼリー、プロポリスについては比較的よく研究されているが、花粉に関する報告はそれほど多くない。

ミツバチが集めた花粉(ミツバチ花粉)は、タンパク質、特に遊離アミノ酸を豊富に含み、炭水化物、脂質をはじめ、ビタミン、ミネラルも多く含まれる(越後ら, 1986; Campos et al., 1996)。栄養成分が豊富に含まれることから家畜や実験動物の生育に及ぼす影響が検討され、体重増加や成長促進が報告されている(石黒ら, 1964)。また、健康食品として、栄養補給、食欲増進、疲労回復に利用されている。花粉を摂食した際の機能については、ミツバチ花粉の利用としてまとめられている(Donadieu, 1983; 松香, 1991)。そのうち、前立腺炎や前立腺肥大に対する効果は、いくつかの詳細な報告がなされている(Yasumoto et al., 1995; Campos et al., 1996; 浅川ら, 2001; Shoskes, 2002)。実験的に性ホルモン誘発非細菌性の前立腺炎モデルを用いて、花粉エキスの炎症性サイトカインに対する作用が検討された。その結果、炎症性サイトカイン、特にインターロイキン-6および腫瘍壊死因子(TNF- α)の増加が抑制され、抗炎症作用を示す一つの作用機序と推定している(浅川ら, 2001)。抗菌作用や抗酸化作用があるという報告もある(Campos et al., 1996; Dudov et al., 1994)。

ミツバチ花粉には微量成分として、フラボ

ノイド類やフェノール化合物が含まれている(Campos et al., 1996; Serra Bonvehi, 2001)。ミツバチ生産物の中でも、プロポリスにはフラボノイド類をはじめ多くのポリフェノール等が含まれ(Greenaway et al., 1990; Tazawa et al., 1998; Bankova et al., 2000; 熊澤ら, 2001; Popova et al., 2003)、強力な抗酸化作用を有する(Scheller et al., 1990; Yamauchi et al., 1992; Matsushige et al., 1995, 1996; Banskota et al., 2000; Moreno et al., 2000; 熊澤ら, 2001)。また、ローヤルゼリーにも抗酸化作用があり(桑原ら, 1996)、ローヤルゼリーの抗ストレス作用との関わりが示唆されている(鷺塚ら, 1996; 池田ら, 1996)。さらに、ハチミツの抗酸化作用についても報告されている(Gheldof et al., 2002)。

そこで今回、著者らは、ミツバチ花粉の作用の一つとして抗酸化作用について検討し、他のミツバチ生産物、ハチミツ、ローヤルゼリー、プロポリスと比較した。これまでこうしたミツバチ生産物の抗酸化活性は、それぞれ測定方法や試料により異なり、統一的に理解しにくい現状であったので、花粉の抗酸化作用を測定した方法と全く同じように調製し、同じ測定方法を用いて検討した。

材料および方法

試料の調製

ミツバチ花粉は産地や地域の異なる5検体(1. スペイン産, 2. 台湾産, 3. 中国産①, 4. 中国産②, 5. 中国産③)を1.00 g秤取し、80%エタノールで3回抽出し(15 mLずつ、各10分)、それぞれ遠心分離した上清を合わせて

50.0 mL に定容し試料とした。

プロポリスは産地の異なる3検体(1. ブラジル産(ミナス=ジェライス州), 2. 中国産, 3. ニュージーランド産)を1.00 g用いて, 花粉と同様に調製し試料とした。

ローヤルゼリーは中国のそれぞれ異なった地域で採取した3検体(中国産①~③)を5.00 g秤取し, 上記材料と同様に調製した。

ハチミツは中国産で, 蜜源の異なる3検体(1. ソバ, 2. アカシア, 3. レンゲ)を5.00g秤取し, 同様に調製した。

抗酸化作用の測定法

抗酸化作用の測定は, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ラジカル補足活性を吸光度法で評価した(篠原ら, 2000)。すなわち, 各試料溶液 2.5 mL に, 0.5 mmol/L DPPH エタノール溶液 0.5 mL を加え, 室温に 30 分間放置した後, 520 nm の吸光度を測定した。対照として, 試料の代わりに溶媒のみ(80% エタノール)を添加し, 対照の吸光度から試料の吸光度を減じて, 対照の吸光度に対する割合を求め, DPPH ラジカル補足活性とした。

グラフから 50% の DPPH ラジカル補足活性を示す濃度 (EC₅₀) を算出した。標準として, カフェ酸を用いて同様の評価をした。

過酸化脂質生成抑制効果の測定は, リノレン酸 (5 mg/mL) を 0.2 mL 採取し, 上記方法で調製した各試料の希釈液に加えて攪拌し, ろ紙に全量を塗抹した。70°C で 90 分加熱し, 生成した過酸化脂質を Fe³⁺-TBA 法により測定した。すなわち, ろ紙を細切し, エタノール 5.0 mL で抽出した。その抽出液に精製水を加え, 1 mmol/L 塩化第二鉄 3.0 mL および TBA (チオバルビツール酸) 試薬 1.0 mL を添加混合した後, 100°C で 90 分加熱した。冷却後, n-ブタノール 4.0 mL を加えて振盪抽出し, 遠心分離した上層を採取し, 励起波長 515 nm, 蛍光波長 553 nm で蛍光強度を測定した。標準として, テトラエトキシプロパン (5 nmol/mL) を用い, 生じたマロンジアルデヒド量で表した (Shinohara et al., 1991)。

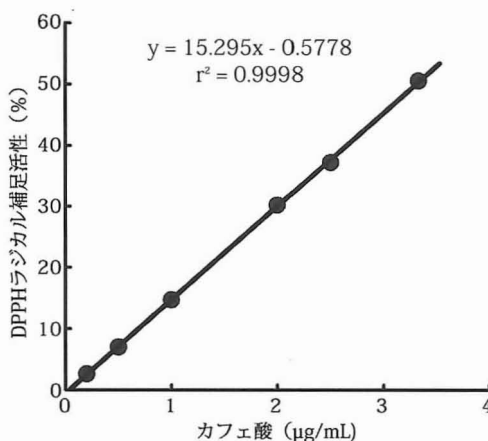


図1 カフェ酸のDPPHラジカル捕捉活性

フラボノイド量の測定

80% エタノール 4.3 mL に試料の希釈液を 0.5 mL 加え, 1 mol/L 酢酸カリウム 0.1 mL および 10% 硝酸アルミニウム 0.1 mL を加えてよく攪拌し, 室温に 40 分放置後, 415 nm で吸光度を測定した。標準としてケルセチン 0.05 mg/mL を用いて同様に操作し算出した。

結果および考察

抗酸化作用を表す方法として, DPPH ラジカル補足活性を測定した。標準としてカフェ酸を用いた結果を図1に表した。直線性を示す

表1 DPPHラジカル捕捉活性

被検体	DPPHラジカル捕捉活性 (EC ₅₀)
花粉	
1 スペイン産	0.708 ± 0.063
2 台湾産	0.691 ± 0.036
3 中国産①	0.207 ± 0.002
4 中国産②	1.602 ± 0.067
5 中国産③	1.042 ± 0.028
プロポリス	
1 ブラジル産	0.032 ± 0.006
2 中国産	0.034 ± 0.008
3 ニュージーランド産	0.018 ± 0.003
ローヤルゼリー	
1 中国産①	78.4 ± 3.38
2 中国産②	79.1 ± 2.57
3 中国産③	66.2 ± 3.96
ハチミツ	
1 中国産ソバ蜜	14.7 ± 5.46
2 中国産アカシア蜜	316.0 ± 139.1
3 中国産レンゲ蜜	140.6 ± 33.5

(単位は mg/mL, n=3)

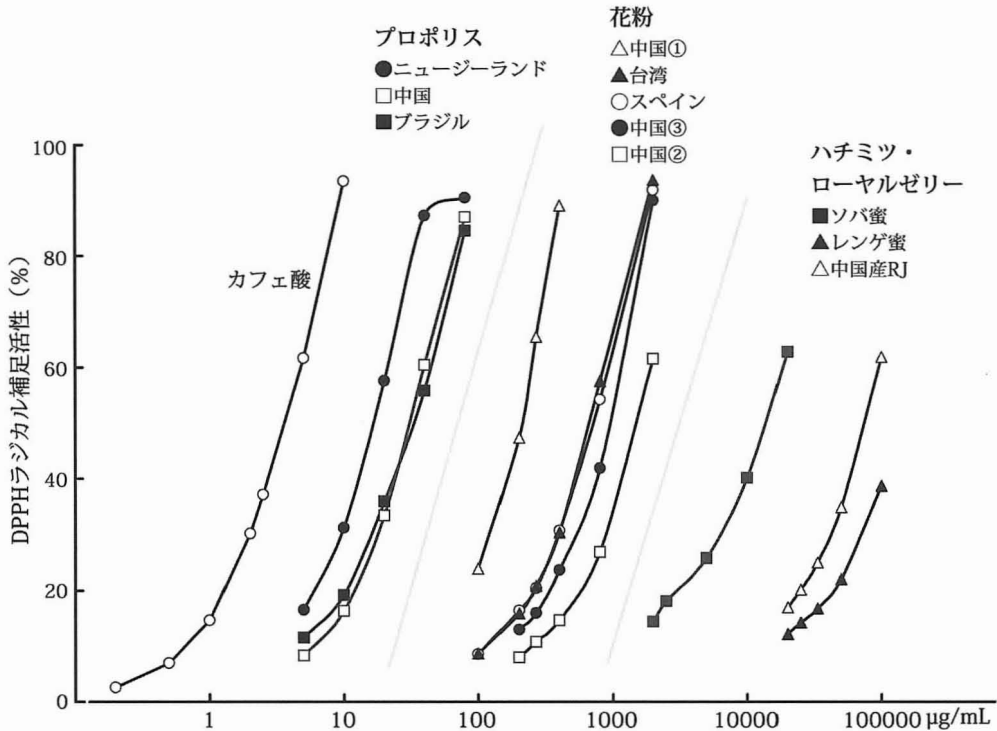


図2 ミツバチ生産物のDPPHラジカル捕捉活性

ラフより求めたEC₅₀は3.31 µg/mLであった。

花粉および他のミツバチ生産物のDPPHラジカル捕捉活性を測定した。EC₅₀を求め、表1に示した。花粉はかなり強い活性を示し、他のミツバチ生産物と比較すると、プロポリスよりは低かったが、ローヤルゼリーより100倍ほど高い活性を示した。ミツバチ生産物の中では、プロポリスが一番高い活性を有し、花粉が続いた。ハチミツでは、アカシアやレンゲ蜜は、ほとんど活性を示さなかったが、ソバ蜜はローヤルゼリーよりも強い活性を示した。

花粉のDPPHラジカル捕捉活性が他のミツバチ生産物に比べどの程度かをわかりやすくするため、DPPHラジカル捕捉活性を図示した(図2)。プロポリスは産地間で大きな差は認められなかったが、ニュージーランド産が最も活性が高かった。花粉ではスペイン産と台湾産は同じくらいであったが、中国産①が一番活性が高く、逆に中国産②および③は活性が低かった。プロポリスは花粉の10倍以上活性が高かった。花粉に比べ、ソバ蜜は10倍以上低く、ローヤ

ルゼリーはさらに10倍近く低かった。図示することにより、ミツバチ生産物間のDPPHラジカル捕捉活性のオーダーの違いが明らかになった。

抗酸化作用のもう一つの効果として、過酸化脂質生成抑制効果を検討し、その結果を表2に示した。花粉は比較的高い過酸化脂質生成抑制効果を示し、産地間の差はそれほど明らかではなかったが、中国産①が一番高かった。プロポリスの添加では、過酸化脂質生成量が最も少なく、非常に高い過酸化脂質生成抑制効果を示した。ブラジル産、中国産、ニュージーランド産のいずれの産地のプロポリスも高かった。用量を変えて調べた結果(図3)、ニュージーランド産がやや高い効果を示した。花粉やプロポリスには過酸化脂質生成抑制効果があることが判明し、DPPHラジカル捕捉活性と一致していた。ローヤルゼリーおよびハチミツではそれほどの効果は得られなかった。DPPHラジカル捕捉活性については、他のハチミツに比べ、ソバ蜜が高い活性を示したが(図2)、過酸化脂質生成

表2 過酸化脂質生成抑制効果

被検体	添加量	過酸化脂質生成量 nmol/mL	生成抑制率 %
対照	---	74.97	
花粉			
1 スペイン産	100 µg	30.07	59.89
2 台湾産	100 µg	29.97	60.02
3 中国産①	100 µg	21.07	71.90
4 中国産②	100 µg	33.81	54.90
5 中国産③	100 µg	33.56	55.24
プロポリス			
1 ブラジル産	10 µg	2.78	96.29
2 中国産	10 µg	7.86	89.52
3 ニューゼーランド産	10 µg	4.95	93.40
ローヤルゼリー			
1 中国産①	500 µg	54.82	26.88
2 中国産②	500 µg	60.16	19.75
3 中国産③	500 µg	58.69	21.72
ハチミツ			
1 中国産ソバ蜜	500 µg	59.99	19.98
2 中国産アカシア蜜	500 µg	65.12	13.14
3 中国産レンゲ蜜	500 µg	60.56	19.22

抑制効果についてはいずれのハチミツもその効果は低く、蜜源による差はほとんど見られなかった。ソバ蜜はレンゲ蜜と余り変わらなかった(表2)。

プロポリスには、フェノール酸類やフラボノイド類など多くのポリフェノールが含まれ、強い抗酸化作用を有することから、それぞれのフラボノイド量を測定した(表3)。花粉のフラボノイド量は0.5～3.5 mg/g (0.05～0.35%)であったが、プロポリスはどの産地のものでも25 mg/g原塊(2.5%)以上を示し、花粉の約10倍以上であった。ローヤルゼリーやハチミツでは測定できなかった。

今回、抗酸化作用を測定する方法として、DPPHラジカル捕捉活性と過酸化脂質生成抑制効果について検討したが、DPPHラジカル捕捉活性が強いプロポリスおよび花粉に過酸化脂質生成抑制効果が見られ、フラボノイド量も測定された。すなわち、プロポリスには強力な抗酸化作用があり、花粉にも強い抗酸化作用が認められた。また、フラボノイド量とも関連があるように思われた。

Serra Bonvehi et al.(2001)は、スペイン産のミツバチ花粉(11検体)に含まれるポリフェノール化合物やフラボノイド類を調べ、比色定量法による総フラボノイド量は $0.51 \pm 0.16\%$ であり、また、グラジエント逆相HPLCにより15個の化合物を分離し、そのうち13個を同定した。主にルチン($29.00 \pm 7.98\text{mg}\%$)、ケルセチン($6.60 \pm 1.96\text{mg}\%$)、ミリセチン($3.34 \pm 3.76\text{mg}\%$)、ケンフェロール、桂皮酸、p-クマ

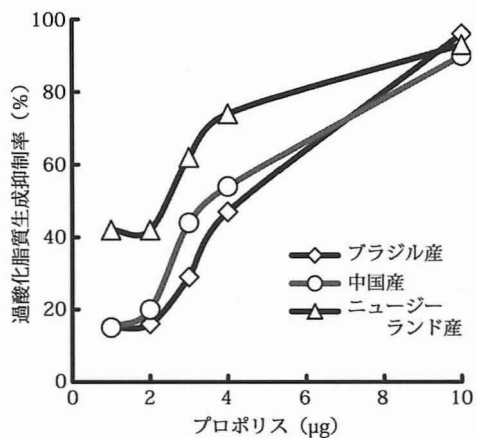


図3 プロポリスの過酸化脂質生成抑制

表3 フラボノイド量

被検体	フラボノイド量
花粉	
1 スペイン産	3.13 ± 0.04
2 台湾産	0.58 ± 0.02
3 中国産①	2.47 ± 0.07
4 中国産②	3.53 ± 0.14
5 中国産③	0.58 ± 0.01
プロポリス	
1 ブラジル産	32.3 ± 1.05
2 中国産	30.9 ± 2.55
3 ニュージーランド産	27.6 ± 1.06

(単位は mg/g, n=3)

ル酸などを含むと報告した。特にルチンが非常に多く含まれていた。これらのフラボノイドはプロポリス中にも含まれる成分で、こうした成分が主に抗酸化作用を示すものと思われる。今回測定したスペイン産の花粉中のフラボノイド量は $0.313 \pm 0.004\%$ で, Serra Bonvehi et al.(2001) の値と比較的よく似ていた。

ハチミツ中には花由来の花粉が含まれ、ソバ蜜にはルチンが多く含まれている。ハチミツの中で、ソバ蜜に DPPH ラジカル捕捉活性が認められたのはそのためと思われる。Cheldof et al.(2002) も、いくつかの蜜源から得たハチミツの抗酸化作用とフェノール総量が相関関係にあること、また、色の暗いハチミツ、たとえばソバ蜜には高い抗酸化作用があることを報告しており、今回のデータとよく合致する。

Campos et al. (2003) によると、ミツバチ花粉のフリーラジカル消去活性は、花粉に含まれるフラボノイド類やフェノール酸誘導体に影響されるが、それだけによるものでない。

また、花粉のフリーラジカル消去活性は、高いラジカル消去活性を有する花粉（ユウカリ）では、新鮮な花粉ほど活性が高く、その後経年的に減少し、3年以上経過すると50%まで活性が減少すると報告している。今回実施した花粉は、スペイン産がワイルドフラワー、台湾産はお茶、中国産①はナタネ、と花の種類が異なっていた。中国産①は活性が高く、スペイン産、台湾産も比較的高い活性を示したが、中国産②および③は活性が低かった。使用した花粉の花粉採取後の時間的経過は明らかでないが、

今後、経年的な変化についても検討を要すると思われる。花粉の種類、採取時期、保存期間と抗酸化作用の関係についてさらに検討する必要がある。

ミツバチ生産物の中で、プロポリスが一番高いフリーラジカル消去活性を示したが、プロポリスの抗酸化作用については報告も多く、熊澤ら(2001)は産地別プロポリスの総ポリフェノール含量と DPPH ラジカル捕捉活性を調べ、おおむね相関があると報告している。抗酸化作用を示す成分としてポリフェノールだけでなく、Matsushige et al.(1996) は、ブラジル産プロポリスから分離したジカフェオイルキニン酸誘導体が、強力なフリーラジカル消去活性を示したと報告している。

花粉をはじめ、プロポリスやローヤルゼリーなどに抗酸化作用を示す報告があるが、それぞれ異なった方法でなされている。今回、花粉の抗酸化作用がどの程度なのかを調べたが、かなり高い抗酸化作用を示し、全く同じ方法で他のミツバチ生産物、プロポリス、ローヤルゼリー、ハチミツについても同様に DPPH ラジカル捕捉活性および過酸化脂質生成抑制効果を検討した。その結果、一番強力な抗酸化作用を示したのはプロポリスで、花粉がそれに続いて強い活性を有し、ローヤルゼリーやハチミツの抗酸化作用はそれほど強くなかった。ハチミツの中では、ソバ蜜がやや強い DPPH ラジカル消去活性を有した。

(〒500-8471 岐阜市加納富士町 1-2 日本養蜂株式会社 (池野久, 柿本, 中村), 〒491-0938 一宮市日光町 6 一宮女子短期大学生活文化学科 (池野武), 〒468-8503 名古屋市天白区八事山 150 名城大学薬学部臨床化学教室 (篠原))

引用文献

- 浅川清司・南達信代・佐藤茂・本間雅人・波方庄平・石井誠・安本亮二・西阪誠泰・榎田周佳・岸本武利. 2001. 泌尿紀要 47:459-465.
- Bankova, V., S. L. DeCastro and M. C. Marcucci. 2000. Apidologie 31: 3-15.
- Banskota, A. H., Y. Tezuka, I. K. Adnyana, K. Midorikawa, K. Matsushige, D. Message, A. A. G. Huertas and S. Kadota. 2000. J. Ethnopharmacol. 72: 239-246.

- Burdock, G. A. 1998. *Food Chem. Toxicol.* 36: 347-363.
- Campos, M. G., A. Cunha and K. R. Markham. 1996. *IN Bee Products* (Mizrahi and Lensky eds). Plenum Press, New York. pp. 93-100.
- Campos, M. G., R. F. Webby, K. R. Markham, K. A. Mitchell and A. P. Cunha. 2003. *J. Agric. Food Chem.* 51(3): 742-745.
- Donadieu, Y. 1983. *IN Pollen in natural therapeutics* (Maloine S. A. ed.). La Faculte de Medicine, Paris.
- Dudov, I. A. and N. F. Starodub, 1994. *Ukr. Biokhim. Zh.* 66(6): 94-96.
- 越後多嘉志・八並一寿. 1986. *ミツバチ科学* 7(3): 97-100.
- Gheldof, N. and N. J. Engeseth. 2002. *J. Agric. Food Chem.* 50(10): 3050-3055.
- Greenaway, W., T. Scaysbrook and F. R. Whatley. 1990. *Bee World.* 71(3): 107-118.
- 池田勇五・鷲塚昌隆・古市浩康・福田陽一・桑原優. 1996. *ミツバチ科学* 17(3): 103-110.
- 石黒伊三雄・内藤純子・野口路子・青木尚恵. 1964. *岐阜薬大紀要* 13: 31-34.
- 桑原優・堀裕子・米田智幸・池田勇五. 1996. *薬理と治療* 24(7): 1463-1467.
- 熊澤茂則・中山勉. 2001. *ミツバチ科学* 22(1): 1-8.
- 松香光夫. 1991. *ミツバチ科学* 12(1): 34-38.
- Matsushige, K., I. T. Kusumoto, Y. Yamamoto, S. Kadota and T. Namba. 1995. *J. Trad. Med.* 12(1): 45-53.
- Matsushige, K., P. Basnet, S. Kadota and T. Namba. 1996. *J. Trad. Med.* 13(3): 217-228.
- Molan, P. C. 2002. *ミツバチ科学* 23(4): 153-160.
- Moreno, M. I. N., M. I. Isla, A. R. Sampietro and M. A. Vattuone. 2000. *J. Ethnopharmacol.* 71: 109-114.
- Popova, M., V. Bankova, D. Butovska, V. Petkov, B. Damyanova, A. G. Sabatini, G. L. Marcazzan and S. Bogdanov. 2003. *ミツバチ科学* 24(2): 61-66.
- Scheller, S., T. Wilczok, S. Imielski, W. Krol, J. Gabrys and J. Shani. 1990. *Int. J. Radiat. Biol.* 57(3): 461-465.
- Serra Bonvehi, J., M. S. Torrento and E. C. Lorente. 2001. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1848-1853.
- 篠原和毅・鈴木建夫・上野川修一. 2000. *食品機能研究法*. 光琳, 東京. pp. 218-220.
- Shinohara, R., K. Tokunaga., Y. Ohta., T. Urata and I. Ishiguro. 1991. *Jpn. J. Clin. Chem.* 20: 18-23.
- Shoskes, D. A. 2002. *Urology* 60:35-37.
- Simuth, J. and K. Bilikova. 2004. *ミツバチ科学* 25(2): 53-62.
- Stangaciu, S. 2002. *ミツバチ科学* 23(3): 97-104.
- Tazawa, S., T. Warashina, T. Noro and T. Miyase. 1998. *Chem. Pharm. Bull.* 46(9): 1477-1479.
- Yamauchi, R., K. Kato, S. Oida, J. Kanaeda and Y. Ueno. 1992. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56(8): 1321-1322.
- Yasumoto, R., H. Kawanishi, T. Tsujino, M. Tsujita, N. Nishisaka, A. Horii and T. Kishimoto. 1995. *Clinical. Therapeut.* 17(1): 82-87.
- 鷲塚昌隆・古市浩康・泉順吉・吉長幸嗣・田中芳明・池田勇五. 1996. *薬理と治療* 24(7): 1469-1473.

KUMIKO IKENO¹⁾, KANAKO KAKIMOTO¹⁾, TADASHI NAKAMURA¹⁾, TAKEYUKI IKENO²⁾, RIKIO SHINOHARA³⁾. Antioxidative activity of honeybee pollen. Comparison with other bee products. *Honeybee Science* (2004) 25(3): 113-118. 1)Japan Beekeeping Co., Ltd., 1-2 Kanofujicho, Gifu, 500-8471, 2)Department of Nutritional Science, Ichinomiya Women's Junior College, 6 Ninkocho, Ichinomiya, 491-0938, 3)Department of Clinical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Meijo University, 150 Yagotoyama, Tenpaku, Nagoya, 468-8503 Japan.

Antioxidative activities of honeybee pollen were assayed by DPPH free radical scavenging activity and the inhibitory effect on the formation of lipid peroxides. Honeybee pollen had strong antioxidative activity. These activities of other bee products were also assayed in the same method. Propolis was one of the best scavenger of DPPH free radical among bee products. Royal jelly and honey had a little inhibitory activity of DPPH free radical, respectively. Antioxidative activity of buckwheat honey is the highest in the examined honeys.