

プロポリスに含まれるポリフェノール成分と抗酸化性

熊澤 茂則, 中山 勉

過酸化水素・スーパーオキシド・ヒドロキシルラジカルなどを総称して活性酸素と呼んでおり、一般にも広く知られるようになった。活性酸素による生体成分の酸化反応が長期間蓄積することが、循環器系疾患・がん・老化などの一因になると考えられている (Sies, 1987)。これに対抗するため、生体は様々な酸化防止のメカニズムを持っている。例えば、活性酸素を消去する酵素や酸化された DNA を修復する酵素などは、酸化傷害を防ぐために進化の過程で生まれたと考えられている。一方、ビタミン C やビタミン E は抗酸化作用を持ち、ヒトにとって不可欠なことのできない栄養成分である。

このような状況のもとで、世界中の研究者が注目しているのが、植物性食品に含まれるポリフェノールと呼ばれる一連の物質群である。ポリフェノールは様々な生理機能を持つが、抗酸化作用はその代表的なものであり、酵素やビタミンとは異なる役割も報告されている。

ポリフェノールとは

ポリフェノールとは自然界に生育している植物に含まれている色素や苦みの成分であり、化学的にはベンゼン環に水酸基を 2 つ以上持っているフェノール類の総称である。最近になって、このポリフェノールの抗酸化作用が注目されるようになり、ポリフェノールを多く含んでいる食品によって、いろいろな疾病が予防できるのではないかと考えられるようになってきた (吉川ら, 1997)。ポリフェノールには多くの種類が知られているが、フラボノイドとフラボノイド以外 (ノンフラボノイド) のポリフェノールに大きく分けることができる。図 1 に主なポ

リフェノールと、それらが含まれている食品を示した。

フラボノイドとは、ベンゼン環 2 個 (A 環と B 環) を炭素元素 3 個がつなぐ化学構造を有するフェノール化合物の総称である。この基本的な構造に加え、さらに C 環の構造の違いや水酸基の結合の有無などで、フラバン、フラバノン、フラボン、フラバノール、フラバノノール、フラバノールなどに分類することができる (図 2)。このうち、フラバノールはカテキンとも呼ばれ、特に緑茶に多く含まれることが知られている。緑茶には、構造式の異なるエピカテキン、エピガロカテキン、エピカテキンガレート、エピガロカテキンガレートなどのカテキン類が含まれているが、これらのカテキン類はがん予防や治療にも効果を示すことが考えられ、脚光を浴びている (牛谷ら, 1999; 大久保, 2000)。

赤ワインにも多くのポリフェノールが含まれており、近年、赤ワインが健康に良いという話題が沸騰したが、そのきっかけは、フランス人は喫煙率が高く、動物性脂肪の摂取量が多いのに、心疾患による死亡率が低いという「フレンチ・パラドックス」にある。すなわち、赤ワインを飲むことで LDL (低密度リポタンパク質) の酸化が抑制され、動脈硬化が予防できるのではないかと考えられている。赤ワイン中のポリフェノールとしてはカテキン類の他、ぶどう種皮中に存在するアントシアニンや、ぶどう種子中に存在するレスベラトロールなどが重要な役割を演じている (佐藤, 1999)。

一方、フラボノイド以外のポリフェノールとしては、クロロゲン酸、フェルラ酸、没食子酸などの桂皮酸類や、香辛料に含まれるクルクミ

フラボノイド

フラバノール	— カテキン	<ul style="list-style-type: none"> エピカテキン エピガロカテキン エピカテキンガレート エピガロカテキンガレート 	緑茶, ワイン
フラバノン	—	<ul style="list-style-type: none"> ナリンジン タキシフォリン 	柑橘類 (果実果皮)
フラボノール	—	<ul style="list-style-type: none"> ケンフェロール ケルセチン 	ブロッコリー, ダイコン, グレープフルーツ タマネギ, ソバ, オリーブ
フラボン	—	<ul style="list-style-type: none"> クリシン アピゲニン 	果実果皮 セロリ, パセリ
イソフラボン	—	<ul style="list-style-type: none"> ダイゼイン ゲニステイン 	大豆
アントシアニジン	—	<ul style="list-style-type: none"> アントシアニン アピゲニジン デルフィニジン 	<ul style="list-style-type: none"> マルビジン シアニジン ぶどう, 赤ワイン ぶどう, いちご 果実果皮 ぶどう種皮

ノンフラボノイド

クロロゲン酸	大豆, コーヒー豆
セサミノール	ゴマ
クルクミン	香辛料 (ターメリック)

図1 食品中に存在する主なポリフェノール

ンなどが代表的なものである。これらのポリフェノールも抗酸化活性をはじめとして、様々な研究が行われている (西澤・グエン, 2000; 中谷, 1999)。

プロポリスと抗酸化性

現在, 日本において健康食品の素材としても注目されているプロポリスは, ミツバチが周辺の植物の芽や浸出物を集めて作った樹脂状物質である。プロポリスの主な成分は, 樹脂, ろう質, 花粉, その他ミネラル類などであるが, 実際の組成は原塊の採取地や蜂が利用する植物源に左右される。プロポリスは, 世界各地で民間伝承薬として利用されており, 近年, 抗菌作用, 抗ウイルス作用, 抗炎症作用, 抗腫瘍作用などの数多くの薬理学的効果が報告されている (Burdock, 1998)。プロポリス中には, 桂皮酸やp-クマル酸などのフェノール酸類, フラボノイドなど, 多くのポリフェノールが含まれているため (Bankova et al., 2000), 生体内における抗酸化作用が期待できる。

プロポリスの抗酸化作用に関しては, 以前からいくつかの研究が報告されており (Scheller

et al., 1990; Volpert and Elstner, 1993), 岐阜大の山内らは中国産のプロポリスから抗酸化物質としてカフェ酸誘導体である benzyl caffeate (図3) を単離している (Yamauchi et al., 1992)。また, 富山医科薬科大のグループはブラジル産プロポリスより, 抗酸化活性を有するいくつかのキナ酸誘導体を単離したことを報告している (Matsushige et al., 1996)。ブラジル産プロポリスからは, propol と名付けられた桂皮酸誘導体, 3-[4-hydroxy-3-(3-oxobut-1-enyl)-phenyl]-acrylic acid (図3) も見つけられており, propol はビタミンCやビタミンEよりも強いDPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ラジカル捕捉活性を持っていることが明らかにされている (Basnet et al., 1997)。また, キューバ産プロポリスの抗酸化作用についても報告されている (Pascual et al., 1994; Gonzalez et al., 1994; Rodriguez et al., 1997)。in vivoにおける研究例としては, 奈良女子大の小城らが酸化ストレスを与えたラットにブラジル産プロポリスを経口投与し, プロポリスは腸から吸収され, 水溶性抗酸化剤と同様の活性を示すことを報告している

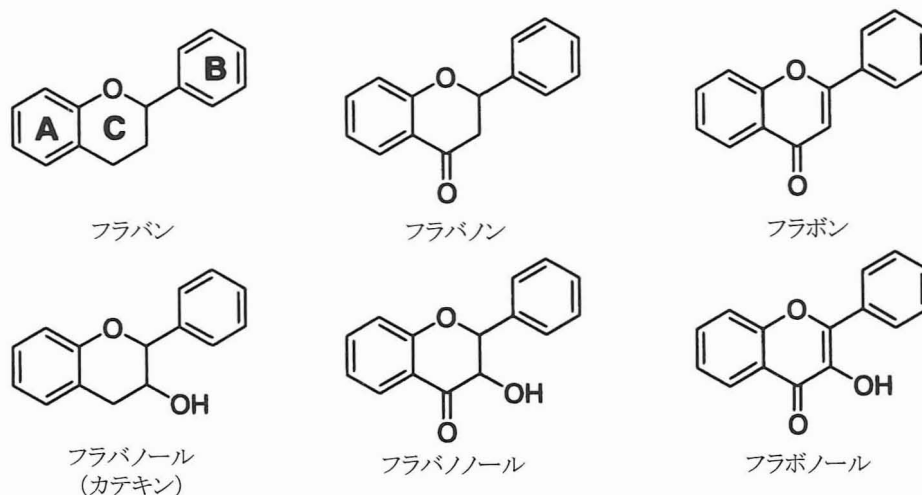


図2 各フラボノイドの基本骨格

(Sun et al., 2000).

このように、近年プロポリスの抗酸化活性の報告は増えてきているが、プロポリスは産地や採取時期によって、大きく成分組成が異なるため (Bankova et al., 2000), 試料によって抗酸化活性が異なっても不思議ではない。しかし、産地別によるプロポリスのポリフェノール含量や抗酸化活性を比較した研究例はそれほど多くない。小柳津らは、ブラジル、中国、オーストラリア、ニュージーランド、日本産のプロポリスの抗酸化活性を調べ、どの産地のプロポリスでも抗酸化活性があり、プロポリス中には α -トコフェロール (ビタミン E) が多く含まれることを報告している (Oyaizu, 1999)。一方、Moreno らは、同じアルゼンチン内でも採取地

域が異なるプロポリスは、抗酸化活性が異なり、抗酸化活性はプロポリス中のフラボノイド含量が関係していることを報告している (Moreno et al., 2000)。

産地別プロポリスのポリフェノール含量と抗酸化活性

多くの研究者が報告しているように、プロポリスにはポリフェノールが多く含まれており、抗酸化活性があることも間違いのないことである。しかし、どの産地のプロポリスのポリフェノール含量が高く、抗酸化活性が高いのかということに関しては、研究者によって用いている試料や実験方法が異なっていることもあり、混雑としている。そこで我々は、産地が異なるプロポリスに関して、それらのポリフェノール含量と抗酸化活性の違いを改めて比較してみることにした。まず、日本プロポリス協議会などから提供された世界各地のプロポリスの中から、産地が明確に特定できる試料を選んだ。用いた試料の産地は、ブラジル (サンパウロ州 (SP), ミナスジェライス州 (MG)), ウクライナ, 日本 (福島, 岡山, 鳥取), ウズベキスタン, ハンガリー, ウルグアイ, 中国 (河北省, 湖北省), オーストラリア, ブルガリア, ニュージーランド, 南アフリカ, 北米産の計 16 種類である。これらの試料を、まったく同じ条件で溶媒抽出し、ポリフェノール含量と抗酸化活性を調べた。試

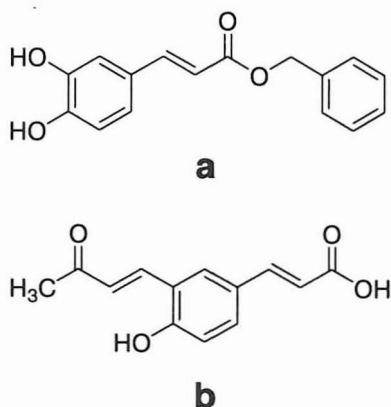


図3 プロポリスより単離されている抗酸化物質
(a) benzyl caffeate (b) propol

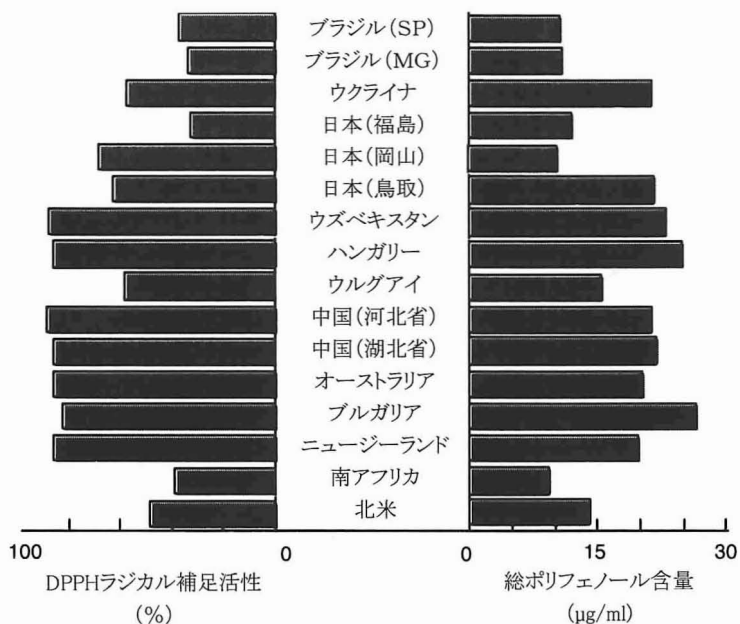


図4 産地別プロポリスの総ポリフェノール含量と DPPH ラジカル捕捉活性

料は原塊 100 mg に対して 2 ml (1: 20) の割合でエタノールを加え、密栓、よく攪拌し、1 時間超音波をかけた後、10 分間遠心分離 (10000 rpm) し、エタノール可溶部を集めた。この操作を数回繰り返し、徹底的に溶媒抽出を行った。エタノール可溶部は、エタノールを蒸発させて、良く乾燥させ、乾燥固形分を正確に秤量した後、ヘキサンにより脱脂したものを評価試料として用いた。

試料中の総ポリフェノール含量を測定するためには、様々な方法が報告されている (木村ら, 1995)。今回、プロポリス試料の総ポリフェノール含量の測定は、Folin-Denis 法を用いた (Slinkard and Singleton, 1977)。この方法は、アルカリ性でのフェノール性水酸基の還元反応を利用した比色法である。この方法は、AOAC (Association of Official Analytical Chemists) のタンニン定量法であるが、ポリフェノール量の公定法がないために、本測定法が代替法として良く用いられている。すなわち、一定濃度に調製したプロポリス試料溶液 1 ml に、10 倍に希釈した市販のフェノール試薬 (関東化学社製) を 1ml を加え、3 分後に 1ml の 10%炭酸ナトリウムを加えて、1 時間後に

760nm の吸光度を測定した。検量線は、(+)-カテキン (シグマ社製) を用いて作成し、検液中の総ポリフェノール物質含量として表した。

試料の抗酸化活性を調べる方法も、いろいろな測定法が考案されている (五十嵐・島崎, 1995)。今回のプロポリス試料の抗酸化活性測定は、DPPH ラジカルの捕捉活性を調べる方法を用いた (篠原ら, 2000)。DPPH は、517nm に極大吸収を持つ紫色の安定ラジカルであり、 α -トコフェロールの定量試薬として用いられている。DPPH は水素を得ることによって、無色のヒドラジンになるため、この呈色反応を利用して簡便なラジカル捕捉活性試験法、すなわち抗酸化活性測定方法として現在広く使われている。今回、一定濃度に調製したプロポリス試料溶液 2.5ml に、0.5mM の DPPH のエタノール溶液 0.5ml を加えて激しく振とうし、室温に 30 分間放置した後、517nm の吸光度を測定した。対照としては、溶媒のみを添加したものを測定した。DPPH ラジカル捕捉活性は、以下の式によって算出した。

$$\text{ラジカル捕捉活性} = \{(B-A)/B\} \times 100$$

A: 試料の吸光度 B: 対照溶液の吸光度

このようにして、様々な産地のプロポリスの

総ポリフェノール含量と抗酸化活性（DPPH ラジカル捕捉活性）を調べた結果を、図4に示した。棒グラフが長いほど、ポリフェノール含量が高く、抗酸化活性が高い試料である。その結果を見ると、総ポリフェノール含量と抗酸化活性とは、概ね相関があることがわかる。今回、使用した試料は、ブラジル産以外は「ヨーロッパタイプ」または「中国タイプ」と呼ばれるプロポリス（松香光夫，2000）であるが、ヨーロッパタイプのプロポリスの方がブラジル産プロポリスよりも抗酸化活性が高いものが多かった。しかし、ブラジル産プロポリスの抗酸化活性は、まったくないわけではなく、ヨーロッパパ

イプのプロポリスよりも活性が高いものも見受けられた。

プロポリス中の抗酸化成分は何か？

図4に示したように、ヨーロッパタイプのプロポリスのポリフェノール含量及び抗酸化活性が、ブラジル産のものよりも高かった。図5には、HPLC（高速液体クロマトグラフィー）を用いて各プロポリスの溶出パターンを比較した結果の一部を示したが、ヨーロッパタイプのプロポリスは共通の含有成分も多いことが明らかになった。ヨーロッパタイプのプロポリスに関する構成成分の分析研究については、いくつか

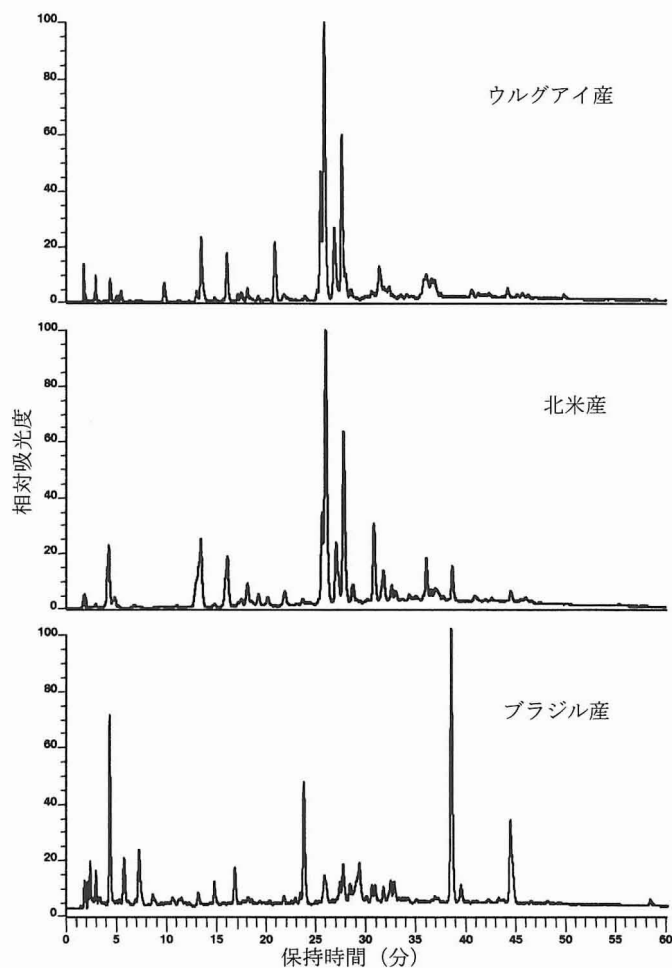


図5 産地別プロポリスのHPLCクロマトグラム

カラム：資生堂 Capcel Pak C18 UG120（内径 2.0mm，長さ 150mm），溶離液：A 液，水（2%酢酸）；B 液，アセトニトリル（2%酢酸），グラジエント条件：0～60 分，B 液 20%→80%，流量：200 μ l/分，検出：UV 280 nm

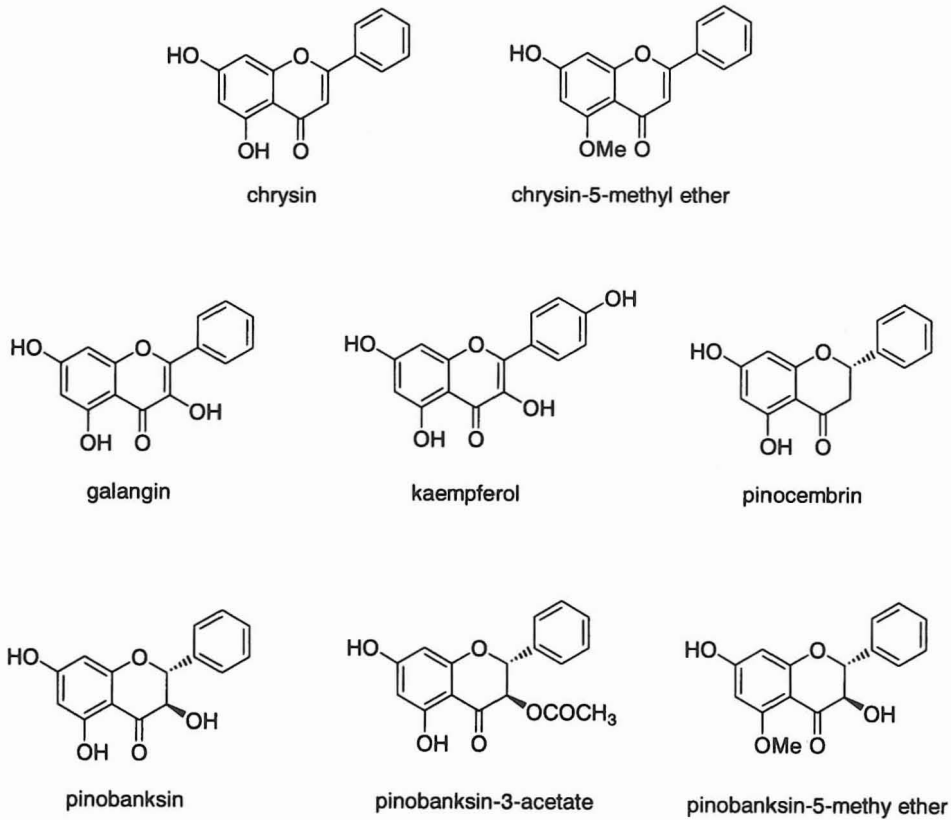


図6 ウルグアイ産プロポリスより単離した抗酸化活性を有するポリフェノール

のプロポリスについての研究報告があり、特徴的な成分も明らかにされている (Markham et al., 1996; Hegazi et al., 2000). 我々は、ヨーロッパタイプのプロポリスの中でもウルグアイ産のプロポリスに着目して、抗酸化成分の研究を行うことにした。その理由は、ウルグアイ産のプロポリスに関する研究報告がほとんどなく、未知成分が見つけられる可能性が期待できたからである。

当初、ウルグアイ産プロポリスの抽出物を各種クロマトグラフィーにより分画して抗酸化活性を指標に活性成分の単離・精製を進めた。しかし、活性はあらゆる区分に分散し、単一の成分が抗酸化活性を持っているわけではないことが判明した。このことは多くの研究者が、プロポリスより様々な抗酸化成分の単離を報告していることから理解できる。既に述べたように、ポリフェノールなら大なり小なり抗酸化活性があることは当然のことである。そこで、

我々はウルグアイ産プロポリスに含まれるあらゆるポリフェノール成分を先に単離・精製して構造決定し、その後各成分についての活性を詳しく評価することにした。詳しい成分研究の結果は別稿に譲るが、ポリフェノール成分は少なくとも数十種類以上、プロポリス中に存在し、それらのうちほとんどが抗酸化活性を有していると考えられた。すなわち、プロポリス中の抗酸化成分は多種類存在するのである。こうして単離、構造決定したポリフェノール成分の一部を図6に示したが、ガランギン (galangin) やケンフェロール (kaempferol) などのフラボノール類に特に高い抗酸化活性が認められた。ウルグアイ産プロポリスの成分研究は、現在も続けているが、成分組成が同じようなヨーロッパタイプのプロポリス間でも、抗酸化活性に差があるのは、このような抗酸化活性の高いフラボノールのようなポリフェノール成分の含有量が異なっていることが予想される。

まとめ

現在、日本において、プロポリスを原料とした製品は、チンキ、顆粒、カプセルなどの健康食品だけでなく、飴やドリンクなどへ添加したのも市場に出ている。これらの製品の広告を見ると、“高濃度のポリフェノールを含んだ良質のプロポリスを使用”などと書かれたものもある。このように、“ポリフェノール”が注目されるようになったのは、近年の疫学調査から疾病予防におけるポリフェノールの有効性を示唆する結果が得られているからに他ならない。自然界に生育する植物は、酸素や紫外線に常にさらされており、絶えず発生する活性酸素から身を守らなければならない。そのために、植物は自らの生命を維持するため、否応なくポリフェノールを産生しているものと考えられる。プロポリスは、ミツバチが巣の周辺の植物から集めてくる成分から成る物質であるため、ポリフェノールが豊富に含まれていることは当然のことかもしれない。

最近、多くの研究者が指摘しているように、プロポリスにはヨーロッパタイプとブラジルタイプが存在する。我々が調べたところ、概ねヨーロッパタイプのプロポリスの方がポリフェノール含量も抗酸化活性も高かった。このことは、ヨーロッパタイプのプロポリスは、ブラジルタイプのものよりもフラボノイドを豊富に含んでいるためであると考えられる。しかし、この結果だけから、ヨーロッパタイプのプロポリスの方がブラジルタイプのプロポリスよりも優れているとも断言できない。プロポリスは非常に多様性に富むため、今回の我々のデータが、あらゆるプロポリスに対しても同様に当てはまるとは必ずしも言えないからである。事実、ブラジル産プロポリスからも、抗酸化活性物質が単離されている(図3)。

我々は、ウルグアイ産プロポリスを対象に、そこに含まれる抗酸化活性を有するポリフェノール成分の研究を続けているが、抗酸化活性を有する成分は多種類存在することを明らかにした。これまでにプロポリスからはいくつかの抗

酸化成分が単離されているが、特定の成分だけでプロポリスの抗酸化性を説明することはできない。すなわち、何らかの成分が含まれていたからといって抗酸化性が高いとはいえないところに、プロポリスを評価する上での難しさがある。特にフラボノイドの場合、成分同士の活性相乗効果も予想される。抗酸化活性は、プロポリスが持つ多種多様な生理活性の一面を見ているに過ぎないとも言えるが、プロポリスの特徴的な活性の一つであるとも言える。今後もプロポリスの研究が進み、新たな生理活性も明らかになっていくことが予想される。また、プロポリスの種類もますます広がっていくことも考えられるが、それらを適切に使用していくためには、それぞれのプロポリスの特性を明らかにしていくことが必要であろう。

謝辞

本研究は、日本プロポリス協議会の委託により行われたものです。また、プロポリス試料の一部をご供与いただき、プロポリスに関する情報をご提供いただいた静岡県立大学大学院生活健康科学研究科野呂忠敬教授、田澤茂実博士に対し、あわせてここに深謝します。

(〒422-8526 静岡市谷田 52-1

静岡県立大学食品栄養科学部)

引用文献

- Bankova, V. S., S. L. Castro and M. C. Marcucci. 2000. *Apidologie* 31: 3-15.
- Basnet, P., T. Matsuno and R. Neidlein. 1997. *Z. Naturforsch.* 52c: 828-833.
- Burdock, G. A. 1998. *Food Chem. Toxicol.* 36: 347-363.
- Gonzalez, R., D. Ramirez, S. Rodriguez and A. Gonzalez. 1994. *Phytotherapy Res.* 8: 228-232.
- Hegazi, A. G., F. K. Abd El Hady and F. A. M. Abd Allah. 2000. *Z. Naturforsch.* 55c: 70-75.
- 五十嵐脩・島崎弘幸. 1995. 過酸化脂質・フリーラジカル実験法. 学会出版センター, 東京.
- 木村進・中林敏郎・加藤博通. 1995. 食品の変色の化学. 光琳, 東京. pp. 66-71.
- Markham, K. R., K. A. Mitchell, A. L. Wilkins, J. A. Daldy and Y. Lu. 1996. *Phytochem.* 42: 205-211.
- 松香光夫. 2000. みつばち健康読本. 東洋医学会, 東京. pp. 32.

- Matsushige, K., P. Basnet, S. Kadota and T. Namba. 1996. *J. Trad. Med.* 13: 217-228.
- Moreno, M. I. N., M. I. Isla, A. R. Sampietro and M. A. Vattuone. 2000. *J. Ethnopharmacol.* 71: 109-114.
- 中谷延二. 1999. 老化予防食品の開発. シーエムシー, 東京. pp. 178-187.
- 西澤千恵子・グエン・ヴァン・チュエン. 2000. *Food Style* 21 4 (1) : 65-67.
- 大久保勉. 2000. *Food Style* 21 4 (1) : 45-51.
- Oyaizu, M., H. Ogihara and Y. Fujimoto. 1999. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* 48: 135-138.
- Pascual, C., R. Gonzalez and R. G. Torricella. 1994. *J. Ethnopharmacol.* 41: 9-13.
- Rodriguez, S., O. Ancheta, M. E. Ramos, D. Ramirez, E. Rojas and R. Gonzalez. 1997. *Pharmacol. Res.* 35: 1-4.
- 佐藤充克. 1999. *New Food Industry* 41: 55-64.
- Scheller, S., T. Wilczok, S. Imielski, W. Krol, J. Gabrys and J. Shani. 1990. *Int. J. Radiat. Biol.* 57: 461-465.
- 篠原和毅・鈴木建夫・上野川修一. 2000. 食品機能研究. 光琳, 東京.
- Sies, H. (井上正康 訳). 1987. 活性酸素と疾患—分子論的背景と生物の防衛戦略—. 学会出版センター, 東京.
- Slinkard, K., V. L. Singleton. 1977. *Am. J. Ecol. Vitic.* 28: 49-56.
- Sun, F., S. Hayami, S. Haruna, Y. Ogiri, K. Tanaka, Y. Yamada, K. Ikeda, H. Yamada, H. Sugimoto, N. Kawai and S. Kojo. 2000. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1462-1465.
- Volpert, R. and E. F. Elstner. 1993. *Z. Naturforsch.* 48c: 851-857.
- 牛谷公郎・海野知紀・良辺文久. 1999. *New Food Indust.* 41: 49-54.
- Yamauchi, R., K. Kato, S. Oida, J. Kanaeda and Y. Ueno. 1992. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 1321-1322.
- 吉川敏一, 五十嵐脩, 糸川嘉則 編. 1997. フリーラジカルと疾病予防. 建白社, 東京.
- SHIGENORI KUMAZAWA and TSUTOMU NAKAYAMA. Polyphenols in propolis and their antioxidant activity. *Honeybee Science* (2001) 22 (1): 1-8. School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka 52-1 Yada, Shizuoka 422-8526, Japan

Naturally occurring polyphenols which are generally able to scavenge active oxygen species and related free radicals have been shown to be good antioxidants in vitro and in vivo studies. The polyphenols in food and beverages are thus expected to help reduce the risk for various life diseases including cancer and cardiovascular diseases, which have been linked to the formation of active oxygen species. In this context, some beverages and foodstuffs rich in polyphenols, e.g. green tea, red wine and cacao, have been attracting interest in recent years due to their potent antioxidant properties and possible preventive effects against cancer, coronary heart disease and other chronic pathologies. The scientific term "polyphenols" is applied to any aromatic compound with more than two phenolic hydroxyl groups and includes flavonoids and phenylpropanoids. Propolis, the honeybee hive product, contains many kinds of polyphenols, thus it possesses antioxidant activity. We collected various kinds of propolis samples from Europe, Asia and Brazil to analyze their total polyphenol content and antioxidant activity. The total polyphenol content was estimated by the Folin-Ciocalteu method, and the antioxidant activity was determined by analyzing against DPPH radical scavenging activity. European type propolis mostly had higher contents of polyphenols and antioxidant activity than those of Brazilian propolis. We investigated the antioxidant compounds in Uruguayan propolis (European type propolis) and isolated several compounds from it.