

プロポリス;民間療法薬から現代の調合薬へ

| | |
|-------|---|
| 誌名 | ミツバチ科学 = Honeybee science |
| ISSN | 03882217 |
| 著者 | Bankova, V. Popova, M. Trusheva, B. Bogdanov, S. Sabatini, A.G. Marcucci, M. |
| 巻/号 | 27巻2号 |
| 掲載ページ | p. 63-70 |
| 発行年月 | 2007年2月 |

プロポリス：民間療法薬から現代の調合薬へ

V. Bankova, M. Popova, B. Trusheva,
S. Bogdanov, A.-G. Sabatini, M. Marcucci

プロポリスは、その驚異的な治癒力のため古くから薬として利用されてきた。過去30年以上にわたり、多様な薬理活性は多くの研究者の関心を惹きつけ、その結果、新しい多くの有用な知見が見いだされてきている。一方で、プロポリスの化学的性質についての基本的概念も、この10年の間に急速に変化してきたことには注目したい。

1960年代にはプロポリスは複雑な組成ではあるが、蜂ろうや蜂毒と同様に、ある程度一定の化学的性質をもつ物質であると考えられていた。しかしその後、地球上のさまざまな地域から集められた膨大な数のプロポリスサンプルの分析が行われ、一口にプロポリスといっても、その化学的組成は多様を極めることが、Popravka(1978)や Ghisalberti(1978)のような経験豊かな化学者によって解明されてきた。

それにもかかわらず、プロポリスの生理活性を研究する大多数の人々は、その後も、ちょうどある薬草の学名をあげれば、そこに含まれる化学成分の組成は必ずから一定であることが期待できるというように、「プロポリス」という名前は、一定の化学組成をもつ物質を指すとの前提にたって研究を行っていた。

近年になり、植物化学者と薬理学者の協力で進められた膨大な研究に基づいて、プロポリスは極めて多様であり、その化学組成と生理活性もそれぞれまったく異なる可能性があるとの見方が定着しつつある。世界の異なる地域から、例えばブルガリアとブラジルから集められたプロポリスサンプルを比較することは、まったく別種の2つの植物の抽出物を比較するのと同じことだと、ようやく理解されるに至っている。

こうした展開を受けて、今後のプロポリス研究について新たに2つの方向性が示されている。まずひとつは薬理的に十分に定義されたプロポリス調合薬の臨床利用をめざす研究であり、もうひとつはプロポリスを新たな生理活性成分の資源としてとらえて、主にその抗腫瘍作用、抗微生物作用、抗酸化作用を担う成分の探索に焦点を合わせて進む研究である。

私たちの研究機関ではその2方向の研究を並行して進めており、その中から、プロポリスの規格基準および品質管理基準の策定と、多様なプロポリスタイプそれぞれで行われている新たな生理活性化合物の探索について、特にここでは新素材でもあるブラジル産の「レッドプロポリス」に関して、最新の成果を述べたい。

プロポリス規格基準の策定

プロポリスの有用な生理活性が、広範囲に立証されている点については疑いようがないが、その臨床における利用についてみると、医学界の主流から注目されているとはいえないのが実情である。医療現場での利用が進まないその主な理由は、プロポリスの品質、安全性、薬理効果を保証する、化学成分の規格基準がまだ確立できていないためと考えられる。有効成分の含有濃度を基準とする世界共通の規格基準がなぜ確立しにくいのか、その原因は異なる生態環境に生育する異なる起源植物に由来するプロポリスの化学成分の変動性、多様性にある。プロポリスの規格基準を策定するためには、それぞれの起源植物に対応し、それぞれの化学成分プロファイルと関連づけられた、いくつかのタイプ別規格を整えることが必要となるだろう。

ポプラを起源植物とするヨーロッパ産プロポリス（ポプラタイププロポリス）が、これまでのところ最も広く研究され、化学的にも、薬理的見地からも、よく理解されたプロポリスタ입といえそうである。最近、私たちはポプラタイププロポリスの主要活性成分である化合物3群の定量法として、再現性がよく、迅速で、さらに低コストな分光分析による測定法を開発し、その有効性を確認した (Popova et al., 2004)。測定項目としては、総フェノール化合物量、総フラボンおよびフラボノール量、それに総フラバノンおよびジヒドロフラボノール量である。異なる地域から集められた大量のポプラタイププロポリスサンプルについて、この一連の物質群の測定が行なわれた。サンプル数は合計114で、上記の3項目に加えてバルサム（芳香性含油樹脂）含有量も測定した（プロポリスの成分抽出には医療現場で最も一般的に使われている70%エタノールを用いた）。バルサム含有量は原料プロポリスの特徴をあらわす重要なポイントとなる。つまりバルサムの割合が多ければ、反対にワックスや不溶物質は少ないことになる。これらの結果をもとに、私たちはポプラタイププロポリスの典型的な特徴を、生理活性成分の含有量として表現することを可能とした。さらにこれらのデータをプロポリスで最もよく活用される特徴である抗微生物活性（ここでは黄色ブドウ状球菌に対する最小阻止濃度MICで表した）と関係づけて示すこともできるので、あるポプラタイププロポリスについて、求められる品質基準をクリアするには最低限これだけの量が必要であるというように明示することができるようになる。プロポリスの規格基準という観点からみれば、この開発は大きな成

果といえよう。

分析した全サンプルがポプラ起源であることは、私たちの研究室で開発した薄層クロマトグラフィ分析でまず確認された。ポプラの若芽から出る滲出物の成分組成は比較的安定しているが、地域によって、あるいは植物個体ごとでも、各成分の含有率には有意な差が認められる。この変異が表1および図1に示したプロポリスの成分組成の変動に反映されている。

各測定項目について、シャピロ・ウイルクス法によって正規性の検定を行った。図1のヒストグラムを見てもわかるように、データは正規分布にしたがってはいなかった。このため私たちは、基準値として、20パーセンタイル値をバルサムと生理活性成分群の最低含有量とし、MICには80パーセンタイル値を使用するのがよいと判断した。最低含有量として10パーセンタイル値を選ぶと、生理活性成分含有量が少なすぎるものが含まれるし、MICに90パーセンタイル値を採用すると、500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ （表1）のような、非現実的な値になってしまうからである。

ポプラが起源植物であると判定されているプロポリス全114サンプルの生理活性成分群の含有量のデータを統計処理し、各特性について表1にまとめた。この表には抗微生物活性のデータ（バルサム乾重換算のMIC値）も含まれる。ここで得られた結果に基づき、表2に示す値をポプラタイププロポリスの典型的な特性として提示し、これをプロポリスの規格基準値、品質管理基準の試案とすることを提案したい。

集められたデータについて、階層的クラスタ分析を行ったが、得られた結果には特に地理的パターンとの関連が見られなかった。この点

表1 114サンプルの分析結果に基づくポプラタイププロポリスの特性

| 項目 | 平均値 | 中央値 | 最小値 | 最大値 | P90 | P80 | P20 | P10 |
|---|-----|------|------|------|-----|-----|-----|------|
| バルサム (%) | 57 | 58 | 18 | 82 | 71 | 67 | 45 | 36 |
| フェノール類 (%) | 28 | 27.6 | 7.9 | 46 | 40 | 38 | 21 | 17 |
| フラボン+フラボノール類 (%) | 8 | 8.2 | 1.3 | 17.9 | 13 | 12 | 4 | 3 |
| フラバノン+ジヒドロフラボノール類 (%) | 6 | 6 | 1.5 | 15.2 | 9 | 8 | 4 | 3 |
| 最小阻止濃度 MIC ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | 210 | 188 | 31.2 | 500 | 500 | 250 | 125 | 62.5 |

*P90～P10はパーセンタイル値

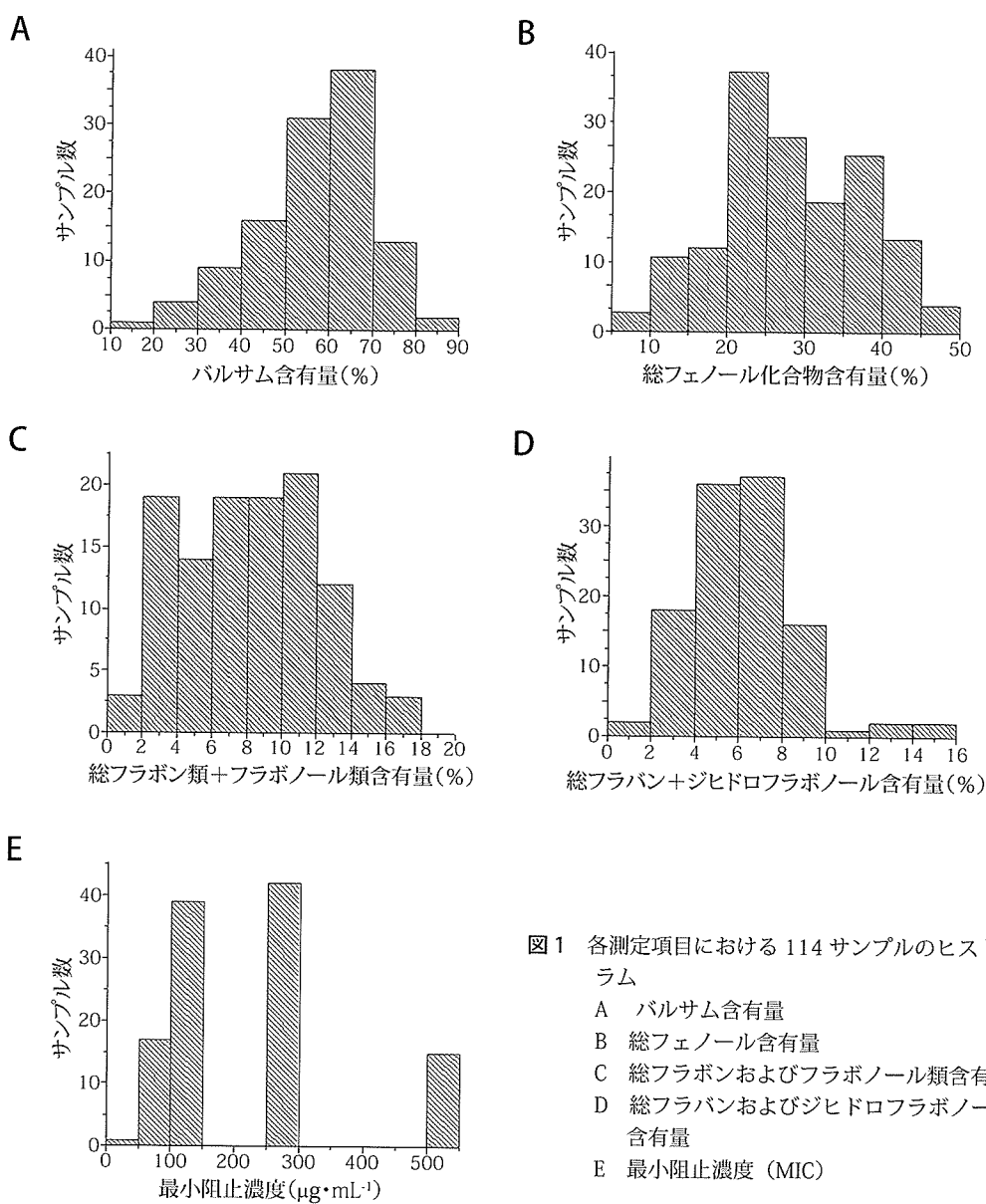


図1 各測定項目における114サンプルのヒストグラム

- A バルサム含有量
 B 総フェノール含有量
 C 総フラボンおよびフラボノール類含有量
 D 総フラバンおよびジヒドロフラボノール含有量
 E 最小阻止濃度 (MIC)

表2 ポプラタイププロポリスの規格基準

| 測定項目 | 規格基準 |
|--------------------|---|
| バルサム | 45%以上 |
| 総フェノール類 | 21%以上 (プロポリス原塊中) |
| 総フラボン類+フラボノール類 | 4%以上 (プロポリス原塊中) |
| 総フラバン類+ジヒドロフラボノール類 | 4%以上 (プロポリス原塊中) |
| MIC (黄色ブドウ球菌に対して) | 最大 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (バルサム乾重換算) |

は規格基準の観点からはよい結果といえよう。つまり、ポプラタイププロポリスは、産地が異なる地域のものであっても、成分的には共通性が高いことを示しているのである。

もう一つの重要な発見は、プロポリスバルサム中の総フェノール類濃度と MIC とに有意な負の相関が認められたことである。つまり、総フェノール濃度が高いほど MIC 値は小さく（抗菌活性は強く）なっている ($p=0.003$)。これまでのところ、このような相関関係は統計的には立証されていなかった。Bonvehi et al. (1994) は MIC と多様なプロポリスの活性成分の濃度との間に相関関係があるかを調べているが、個々のいずれの化合物についても、高い相関係数を得ることができなかった。そこで総フェノール化合物量の測定がプロポリスの品質規格基準では極めて重要ということになる。なお、総フラボン類+フラバノール類濃度、および総フラバノン類+ジヒドロフラボノール類の濃度と MIC との間には統計的に有意の相関関係は見られなかった ($p>0.1$)。

上記の結果から、私たちがこれまで想定してきたように、プロポリス中の化合物濃度は個々の成分について測定するのではなく、活性成分群ごとにまとめて扱う測定するという方法の方が正しいことが支持された。またプロポリス中の多様な成分による複合的な相乗効果があることも明らかになっているので、MIC 測定も品質管理の必須項目として取り入れられるべきであろう。

今回の研究で選定した測定項目はポプラタイププロポリスの品質評価に適していることがわかった。しかし、プロポリスには様々なタイプがあり、その化学成分も多様である (Bankova, 2005) ことを忘れてはならない。したがって、ここまで述べてきた結論や判定基準は、あくまでポプラタイプにのみ適用されるものであり、決して他のタイプのプロポリス、例えばブラジル産のグリーンプロポリスや、キューバ産、ブラジル産のレッドプロポリスにそのまま適用すべきではない。

プロポリス成分の化学的多様性はその規格基

準という面からいえば困難な問題である。しかし、この特徴こそが植物化学研究者に多数の価値ある研究の糸口を提供したのである。地球上のどのような環境下でも、ミツバチはプロポリスの起源植物として、抗微生物活性、抗酸化性、細胞毒性などの特徴を持つと知られている植物を選んでいる。ミツバチにとってもプロポリスは自分たちの巣を守る上での重要な化学的防御物質となっている。私たちはプロポリスを研究することにより、それまで植物の二次的代謝物としては知られていたが、それ以上特に評価もされていなかった物質の薬理学的特性を解明していき、多数の有効な植物成分を発見するに至った。これらはプロポリス研究がなかったら決して見いだされることはなかったであろう。ポプラタイプ以外のプロポリスが生産されている熱帯、亜熱帯、さらに北方の亜寒帯地域からのプロポリスサンプルの分析が進むと、さらに重要な薬理効果をもつ、新規の生理活性物質が発見される可能性は大きいと予想される。

ブラジル産レッドプロポリス

この可能性の一例として、私たちが、最近、研究を進めているブラジル産のレッドプロポリスがある。ブラジルでは地域によりプロポリスの化学組成が異なり、これはその採集地域の植物相の違いに由来している。そのなかで最も多く見られ、研究が進んでいるのは一般にグリーンプロポリス、あるいはアレクリンプロポリスといわれるタイプで、キク科のアレクリン=ド=カンボ *Baccharis dracunculifolia* がその起源植物である。ブラジル産レッドプロポリスはブラジル北東部で採集されるが、その化学成分データは報告されていなかった。また同様の赤い色のプロポリスは、キューバやベネズエラでは一般的にみられるものであり、そこでの起源植物はオトギリソウ科に属する数種の *Clusia* spp. であると報告されている。

ブラジル北東部のアラゴアス州で採集されたレッドプロポリス(本号 55 ページ参照)から、私たちは 4 種の化合物を単離し、ほかに 2 種の複雑な混合物と 1 種の分離不能な 2 つの異性体

混合物を分離することができた。

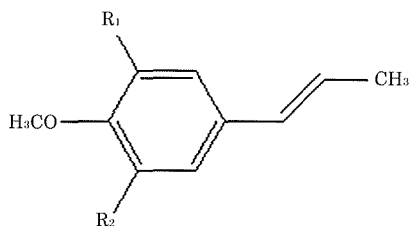
最も極性の低い分画をGC-MSで分析したところ、以下のようなフェニルプロペン誘導体類であった(図2:1~5)。trans-anethol(アネソール), methyl eugenol(メチルユーゲノール), trans methyl isoeugenol(メチルイソユーゲノール), elemicin(エレミシン), trans-isoelemicin(イソエレミシン)。このうちエレミシンが最も多く含まれていた。これらの化合物のうち、メチルユーゲノール、メチルイソユーゲノール、エレミシン、イソエレミシンはプロポリス中では初めて確認された物質である。またこの分画の組成がフェニルプロペン誘導体であることは、このブラジル産レッドプロポリスサンプルに特有なアニス様の香りの裏付けともなる。

二つめの混合物分画には以下のようなトリテルペンアルコール類が含まれることがGC-MS分析により判明した(図3:8~11)。α-amyrin(α-アミリン), β-amyrin(β-アミリン), cycloartenol(シクロアルテノール),

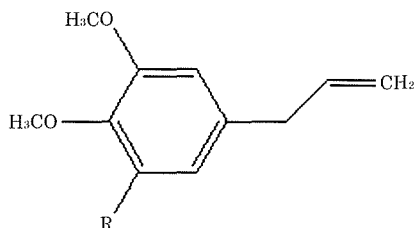
lupeol(ルペオール)。このうちβ-アミリンが最も多く含まれていた。トリテルペンアルコール類はブラジル産プロポリスの典型的な成分でもある。

単離された化合物の中にもトリテルペン骨格を持つケトン、20(29)-lupen-3-one(ルペノン)があった(図2:6)。この化合物は、これもプロポリス中では初めて確認された化合物であるが、バクテリア、真菌に対して抗菌活性を持つこと、さらに抗酸化作用もトコフェロール(ビタミンE)と同じ程度に持っていることが最近の研究で判明している(Kim et al., 2001)。

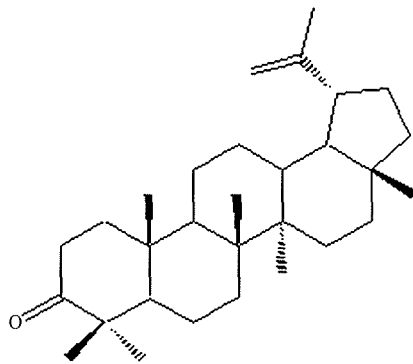
また特に注目すべき化合物も見つかった(図2:7)。その構造は質量分析(MS)、赤外分光(IR)、核磁気共鳴分析(¹H-and ¹³C-NMR)から、2,3-epoxy-2-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthalenedioneであった。この化合物が天然物中から分離されたのはこれが最初である。従来は化学合成物質としてのみ確認されていた(Perry et al., 1991)。私たちが確認した化合物は公表されているこの物質のデータ(¹³C-NMRのデー



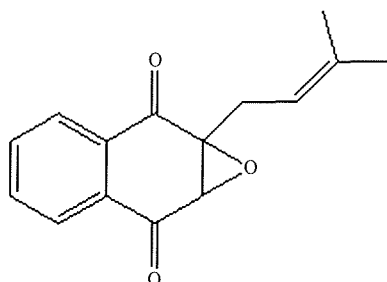
1. R₁=R₂=H trans-anethol
3. R₁=OCH₃, R₂=H trans-methyl isoeugenol
5. R₁=R₂=OCH₃ trans-isoelemicin



2. R=H methyl eugenol
4. R=OCH₃ elemicin



6. 20(29)-lupen-3-one



7. 2,3-epoxy-2-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthalenedione

図2 ブラジル産レッドプロポリスから単離された成分(1~7)

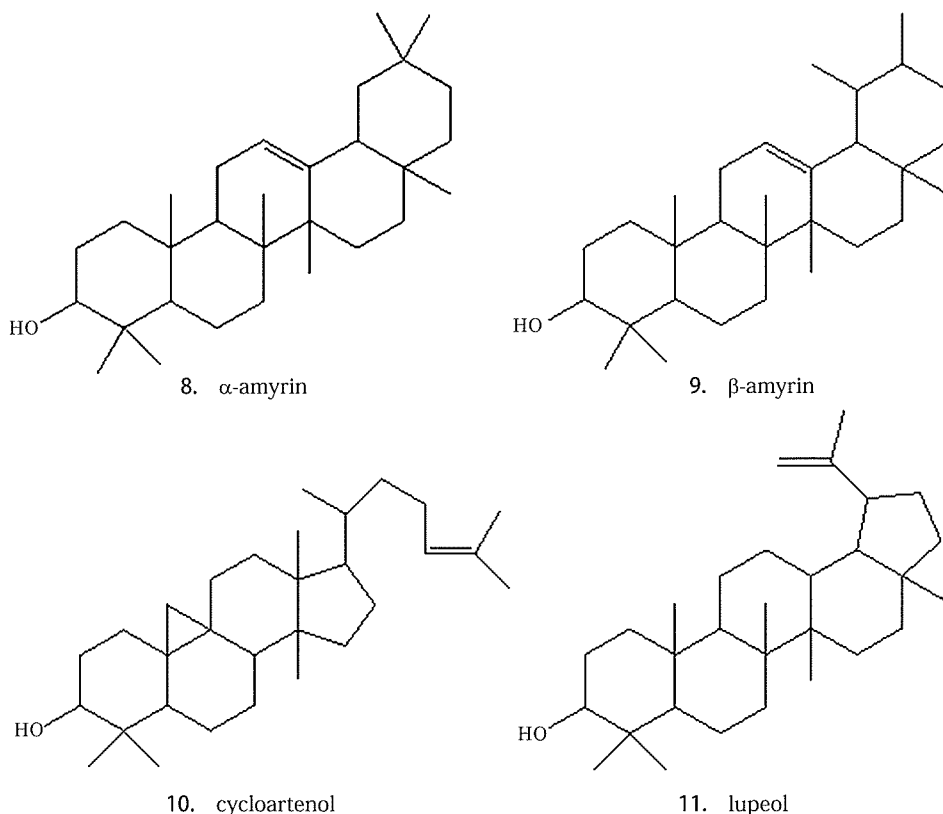


図3 ブラジル産レッドプロポリスから単離された成分 (8～11)

タは未公表)と合致していた。天然物から合成されたこの物質については、抗細菌、抗真菌、細胞毒性といった活性があることが報告されている (Perry et al., 1991)。

2種のイソフラボノイド類も分離され同定された(図4:12～13)。イソフラバンである *isozativan* (イソサチバン) と *プテロカルパン* の *medicarpin* (メディカルピン) で、化合物の分光特性を文献値と照合して同定された。イソフラボノイド類は、プロポリス中からは、これまでキューバ産のものからだけ確認されており、キューバ産以外ではこれが最初の報告となる。キューバ産とブラジル産のレッドプロポリスが共通の起源植物をもつ可能性が考えられるが、今のところ、外分泌液中にイソフラボノイド類を含む植物はまだ見つかっていない。マメ科の植物が可能性として考えられるが、確認のためのさらなる研究が待たれる。特に *メディカルピン* (図4:13) は興味深い成分といえる。というのは、この物質は有力なフィトアレキシ

ン(病原菌などに冒されたとき、植物組織によって産出される抗菌性物質)で、特に抗真菌作用を持つことで知られているからである。

図4の化合物14および15は二重結合の位置異性体で分離不能であった。しかしその構造は混合物の分光特性を文献値と照合することによって推定された。混合物の ^1H と ^{13}C -NMRのマススペクトルは化合物14および15のマススペクトルと合致し、二次元NMR法によって得られたすべてのHMBC相関からもそれぞれ同等と認められた。Gustafson et al. (1992)はオトギリソウ科の *クルシア* *Clusia rosea* の葉から分離不能な混合物としてこれを抽出し、その抗HIV活性を確認している。

キューバ産レッドプロポリス(クルシアの花の樹脂が起源)からは微量成分としてこれらの物質が検出されているが、これに対して私たちは、化合物14および15の混合物は、今回のプロポリスの主要成分として検出した。したがって、今回、私たちが分析したプロポリスの起

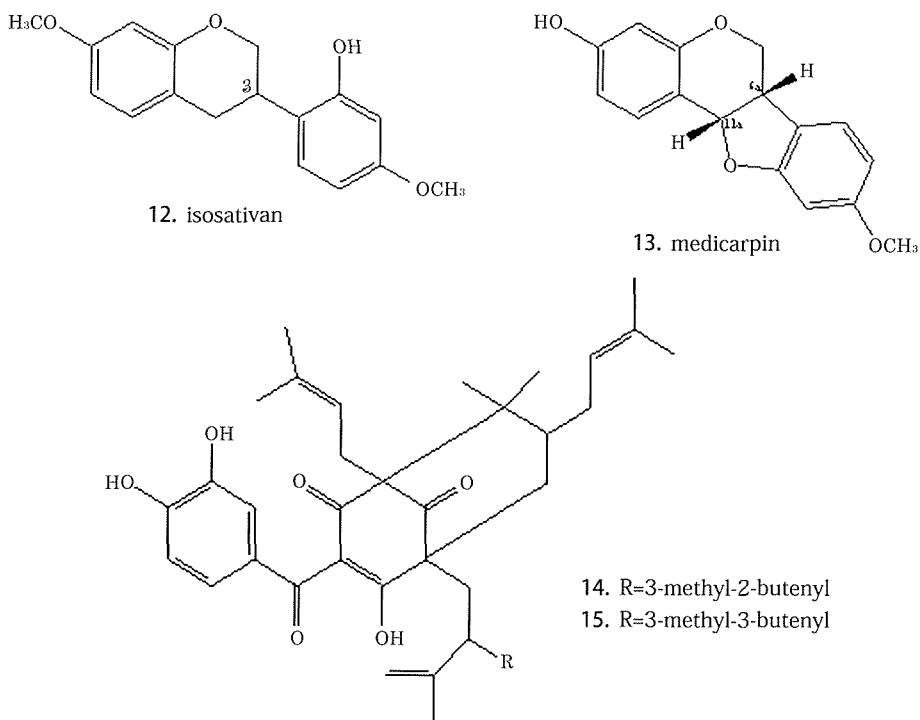


図4 ブラジル産レッドプロポリスから得られた成分 (12～15)

源植物は、仮に *Clusia* 属であったとしても既報のものとは別種の可能性が高い。さらにイソフラボノイド類が含まれていたことも、私たちの分析したプロポリスには別の起源植物が含まれている可能性を示唆している。というのは、イソフラボノイド類は、これまでマメ科にだけ見つかっていて、オトギリソウ科植物の樹脂に含まれているという報告はないからである。

ブラジル産レッドプロポリス中の化合物の抗微生物、抗酸化活性

分離された化合物3種の抗菌活性と、DPPHラジカルに対する抗酸化活性を調べ、その結果を表3に示した。これをみるとレッドプロポリスの抗菌活性成分として重要なのはイソフラ

ボノイド類 (図3: 12～13) であり、特に真菌であるカンジダ菌 *C. albicans* に対する抗菌活性が認められた。プテロカルパン類がもつ抗真菌活性はすでによく知られており、多くの植物で防御物質としての役割を果たしている。それを考えればここでイソフラボノイド類の活性が認められるのも当然といえる。

プレニル化したベンゾフェノン類の混合物 (図3: 14～15) は黄色ブドウ球菌 *S. aureus* に対して良好な抗菌活性を示した。また DPPH ラジカルに対する抗酸化活性も有意に認められ、レッドプロポリス抽出液が持つ抗酸化性を裏付ける、有力な成分であることが明らかになった。

ブラジル産レッドプロポリスに含まれる新し

表3 ブラジル産レッドプロポリスに含まれる化合物の抗微生物、抗酸化活性

| 化合物 | 抗微生物活性 (阻止円直径 ± SD, mm) | | | DPPH ラジカル 捕捉作用 抑制率 (%) |
|-------|-------------------------|------|-------|------------------------------|
| | 黄色ブドウ球菌 | 大腸菌 | カンジダ菌 | |
| 12 | 14+0 | 0 | 15+1 | 4.5 |
| 13 | 23+1 | 14+0 | 26+0 | 0.7 |
| 14/15 | 19+1 | 12+0 | 0 | 49 |
| カフェ酸 | - | - | - | 85.6 |

データは各3反復の平均

いプロポリス成分を同定し、その主要成分が抗細菌、抗真菌、抗酸化活性を持つことは明らかになった。これはさまざまなタイプのプロポリスが、それぞれ起源植物は異なっている、常に抗微生物活性、抗酸化活性は有しているものであるという、従来の私たちの主張をさらに強めるものといえる。

しかしプロポリスのタイプが異なれば、有効な活性を裏付ける化学成分はそれぞれ変わってくるだろう。プロポリスはこれからも私たちが探求を進めていかなければならない、魅力的な対象であることは明らかである。

(著者の住所は下記参照 翻訳：榎本ひとみ)

※編集部注：本稿は2006年10月にギリシャで開催された国際会議 APIMEDICA の講演原稿から、著者の同意を得て作成されたものである。

引用文献

- Bankova, V. 2005. Evid-based. Compl. Alt. Med. 2: 29-32.
- Ghisalberti, E. L. 1978. Bee World 60: 59-84.
- Gustafson, K. R., J. W. Blunt, M. H. G. Munro, R. W. Fuller, T. C. McKee, J. H. Cardellina, J. B. McMahon, G. M. Cragg and M. R. Boyd. 1992. Tetrahedron 48: 10093-10102.
- Kim, E.-M., H. -R. Jung and T. -J. Min. 2001. Bull. Korean Chem. Soc. 22: 59-62.
- Perry, N. B., J. W. Blunt and M. H. G. Munro. 1991. J. Nat. Prod. 54: 978-985.
- Popova, M., V. Bankova, D. Butovska, V. Petkov, B. Nikolova-Damyanova, A. G. Sabatini, G. L. Marcuzzan and S. Bogdanov. 2004. Phytochem. Anal. 15: 235-240.
- Popravko, S. A. 1978. *IN A remarkable hive product: propolis. Apimondia, Bucharest.* pp. 15-18.
- V. BANKOVA¹, M. POPOVA¹, B. TRUSHEVA¹, S. BOGDANOV², A.-G. SABATINI³, M. MARCUCCI⁴. Propolis: from folk medicine to modern preparations. *Honeybee Science* (2006) 27(2): 63-70. 1) Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry, Bulgarian Academy of Sciences, 1113 Sofia, Bulgaria, 2) Swiss Bee Research Centre, FAM, Liebefeld, 3003 Bern, Switzerland, 3) National Institute of Beekeeping, 80 Via di Saliceto, Bologna, Italy, 4) Faculdade de Farmacia, Universidade Bandeirante de São Paulo, Rua Maria Candida, 1813, Vila Guilherme, Campus MC, 02071-013 São Paulo, SP., Brazil.

Propolis has been used as a remedy since ancient times, because of its remarkable healing properties. It attracts the attention of modern scientists with its diverse pharmacological activities and low toxicity. At present, there are two main directions in propolis research. One is aimed to the use of propolis in well defined pharmaceutical preparations, and the other one is based on propolis as a source of new biologically active molecules, mainly anticancer, antibacterial and antioxidative agents.

Concerning the first line of research, chemical variability of propolis is a serious obstacle to its standardization and respectively, to its official acceptance into the main stream of the health care system. For standardization to be achieved, it is very important to realize that comparing propolis samples from different regions of the world might be the same as comparing extracts of two plants that belong to different plant families. We have proposed a reliable standardization procedure for poplar propolis, a propolis type which contains mainly flavonoids and phenolics. The application of this procedure to a number of samples (over 100) enabled us to describe the typical characteristics of poplar propolis in terms of bioactive components percentage; to search for a correlation between them and the most often used propolis activity, antibacterial; and to formulate minimum requirements to a poplar propolis sample that are needed for an acceptable quality. Following the other line of research, searching for new bioactive compounds, we have investigated a sample of Brazilian red propolis, a propolis type that has not yet been chemically studied. In this sample, fourteen compounds were identified (six of them new for propolis), among them simple phenolics, triterpenoids, isoflavonoids, prenylated benzophenones and a naphthoquinone epoxide (isolated for the first time from a natural source). Three of the major components demonstrated significant antimicrobial activity, and two (obtained as inseparable mixture) possessed radical scavenging activity against DPPH.

Our research proves that both lines of propolis research are fruitful and promising. The approach based on typification according to the plant source gives good results in the field of propolis standardization. On the other hand our results on red Brazilian propolis demonstrate that propolis from different geographic regions remains a fascinating subject for further studies.