

プロポリスの香りを活かした生活向上製品の開発(第4報)

今泉茂巳、加島隆洋、水谷恵梨、田澤茂実*、須蒲千晶**、日置裕介**、光永徹**

Development of Product for Quality Life Utilizing Propolis Aroma (IV)

Shigemi IMAIZUMI, Takahiro KASHIMA, Eri MIZUTANI,
Shigemi TAZAWA*, Chiaki SUGAMA**, Yuhsuke HIOKI** and Tohru MITSUNAGA**

プロポリスのエタノールエキス製造時に発生するエタノール抽出滓(副次原料)を原料として直接蒸留法で精油を試作した。その際、一部の芳香蒸留水も採取した。採油率は0.14%(w/w)であった。精油は過去の試作と同様、フルーティーで刺激的な香りであった。一方、芳香蒸留水はプロポリス様の香りもするが、焦げたような不快なおいもした。芳香蒸留水は精油に比べてGC-O/MS分析において多くのにおいを感知し、芳香蒸留水の方が ethyl hydrocinnamate 以外の様々な香気成分が香りに寄与していることが示唆された。精油のラット副交感神経活動に対する効果を調べた結果、嗅覚刺激中と嗅覚刺激後に胃枝迷走神経GVNAが増加する傾向が見られ、精油が副交感神経活動を亢進するとともに交感神経活動を抑制し、興奮状態を押さえリラックス効果を与える可能性が示唆された。しかし、精油や芳香蒸留水の主成分である ethyl hydrocinnamate はラットの交感神経活動を亢進した。このことから、ethyl hydrocinnamate 以外の成分が交感神経活動の抑制に寄与していると考えられる。精油や芳香蒸留水について歯周病菌、大腸菌、黄色ブドウ球菌を対象とした抗菌活性評価を行った結果、これらの菌に対して抗菌活性は見られなかった。

1. はじめに

プロポリスは、ミツバチが植物の樹脂、特に新芽やつぼみ、植物が分泌する分泌物などを集めて巣に持ち帰り、巣の隙間に詰めた物質であり¹⁾、起源植物由来成分を基本とする多種多様の成分を含んでいる。プロポリスは経験的にその抗菌効果や防腐効果が知られ、古代エジプトではミイラの腐食防止に利用されていた¹⁾。現在では、主にヨーロッパや南米の一部の国で皮膚の外傷治療や口腔ケアなどにもプロポリスが利用されており、日本でも健康食品素材として利用され、20~30年ほど前から関連商品が世の中に出回るようになった¹⁾。

プロポリスは通常、エタノールや水で抽出したエキスの形で摂取される。特にエタノールエキスは独特で強いにおいと苦味・辛味を持ち、従来は水に数滴たらしめて飲用していたため、そのにおいと味がプロポリスの摂取しにくさの要因となっていた。しかし、近年はタブレットやカプセルの商品が市場に出回るようになり、以前より摂取しやすくなっている。

健康食品素材としての長い歴史と上述の商品開発に支えられ、プロポリスの市場規模は300億円程度で安定している¹⁾。しかし、更なる市場の拡大はなかなか難しく、いかにしてプロポリスを我々の生活により身近なものにし、市場を活性化していくかということに業界は苦心している。

本研究では従来着目されてこなかったプロポリスの香気成分を活用した新たな製品への展開を目的として、プロポリスの精油を開発する。なお、その際、現在廃棄されてい

るエタノールエキス製造工程で発生する副生物(未利用資源)を原料とすることにより、プロポリス資源の有効活用を図る。前報²⁾ではエタノール抽出滓を原料とした精油を試作し、その精油がラットの交感神経活動を抑制することを見出した。本報では、抽出滓精油のラット副交感神経活動に及ぼす影響ならびに主成分である ethyl hydrocinnamate の交感神経活動抑制機能について評価した。また、新たな機能性として抗菌活性の評価を行った。精油試作時に得られる芳香蒸留水についても香気成分分析や抗菌活性評価を行った。

2. 実験方法

2.1 精油の試作

ブラジル産グリーンプロポリスのエタノール抽出滓を原料とし、ピュアスティラースタンダードM((株)黄河)を使用して、直接蒸留法により精油を試作した。

抽出滓(Lot. No. 180406)約1kgを25Lステンレス製蒸留釜に採り、蒸留水を10L加えた。加熱強さ“最強”で加熱を始め、蒸留釜内が沸騰し溜出液が溜まり始めたところで加熱強さを“中+1”に落とした。時折芳香蒸留水を排出しながら5時間蒸留を行い、最終的に芳香蒸留水上に溜まった精油を採取した。上記操作を10回を行い、全ての精油を合わせて精油EO-201902とした。なお、6回目の試作時には芳香蒸留水も採取した(ADW-201902-06)。

それとは別に、同抽出滓を原料として同じ方法で7回試作を行い、精油EO-201903とした。なお、6回目の試作時には芳香蒸留水も採取した(ADW-201903-06)。

2.2 香気成分分析

精油EO-201903について、既報²⁾と同様にSE-FEDHS

*アピ株式会社

**国立大学法人岐阜大学応用生物科学部

法で分析した。ただし、試料には精油をジエチルエーテルで10,000倍に希釈したものを30 μ L 使用した。

また、芳香蒸留水ADW-201903-06について、FEDHS法³⁾により分析した。主成分である ethyl hydrocinnamate のTICピーク高さが精油と同程度となるように、試料10 μ L を10 mL ヘッドスペースバイアルに採取した。バイアルを80°C、Tenax TA 捕集管を40°Cに加温した後、バイアル内に2本のニードルを挿入した。一方のニードルから窒素ガスを流速100 mL/min で30分間パージし、他方のニードルの窒素ガス出口にセットされた捕集管に成分を捕集すると同時に水分を除去した。分析条件については既報²⁾に従った。

2.3 動物実験

動物実験は国立大学法人岐阜大学動物実験委員会の承認のもと、「国立大学法人岐阜大学動物実験取扱規程」に準拠して行った。

2.3.1 精油のラット副交感神経活動に対する評価試験

精油EO-201902について評価を行った。精油を蒸留水で100倍に希釈し、よく振ってエマルジョンにしたものを試料溶液として使用した。

ウレタン麻酔下ラットの腹部を大きく切開し、食道に沿って胃につながる迷走神経を取り出した。取り出した迷走神経を金属プレート上で銀線電極にかけ、流動パラフィンワセリン混合液で包み、ノイズや乾燥を防いだ。

神経を電極に掛けたまま嗅覚刺激を行った。はじめに30分間何も刺激を行わない状態でスパイクヒストグラムのデータを採取した(コントロール)。続いて、キムワイプを入れた紙コップに試料溶液1 mL を染み込ませたものをラットの鼻先に呈示して嗅覚刺激を開始し、10分毎に新しく調製した試料溶液と交換して、合計60分間嗅覚刺激を行った。この間も引き続きデータを採取し、さらに、嗅覚刺激終了後も測定を継続した。スパイクヒストグラムの5分毎のスパイク数をもとに胃枝迷走神経活動(GVNA: Gastric Vagus Nerve Activity)を評価した。

2.3.2 Ethyl hydrocinnamate のラット交感神経活動に対する評価試験

既報²⁾において、精油にラットの交感神経活動を抑制する効果があることが明らかになっている。そこで、主成分である ethyl hydrocinnamate の交感神経活動抑制効果について試験した。

精油EO-201902 10 mL をシリカゲルカラムオープンクロマトグラフィー(20 mm ϕ \times 500 mm)に供した。展開溶媒として n-hexane : CHCl₃ = 8 : 1 \rightarrow 5 : 1 \rightarrow 3 : 1 を用い、100 mL ずつ三角フラスコで回収した。溶出液のTLC分析より、145本目(Fr. 8)に目的化合物(ethyl hydrocinnamate)を単離し、試験に供した。試験方法は既報²⁾に従った。

2.4 抗菌活性評価

精油EO-201902と上記の ethyl hydrocinnamate について、歯周病菌(*Porphyromonas gingivalis* ATTC 33277)を対象とした微量液体希釈法による抗菌活性評価を行った。

ポジティブコントロール(P. C.)には hinokitiol を使用した。

精油は78.1 - 5,000 μ g/mL に、ethyl hydrocinnamate と hinokitiol は78.1 - 5,000 μ M に調製した。*P. gingivalis* の培養液は、ブレインハートインフュージョン(BHI)培地を用いて菌数が 1×10^5 cells/mL になるように希釈し、添加した。37°Cで48時間培養後、660 nm の吸光度から濁度を求め、生育阻害率を計算した。

精油EO-201902と芳香蒸留水ADW-201902-06について、大腸菌(*Escherichia coli* ATCC 25922)および黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 29213)を対象とした微量液体希釈法による抗菌活性評価を行った。

精油および芳香蒸留水は31.3 - 4,000 μ g/mL に調製した。*E. coli* および *S. aureus* の培養液は、乾燥ブイヨン培地(ニッスイ)を用いてそれぞれ1/1,000倍、1/200倍に希釈し、添加した⁴⁾。37°Cで24時間培養後、塩化ヨードテトラゾリウム(INT)試薬を用いて菌の生育を視覚的に観察し、最小発育阻止濃度(MIC)を決定した。ポジティブコントロール(P. C.)は、hinokitiol および chlorhexidine を用いた。

3. 結果と考察

3.1 精油及び芳香蒸留水の試作

精油EO-201902の試作において、1回の蒸留で1.10 - 1.61 mL の精油を得ることができ、10回の操作を合わせると抽出率10.007 kg から15.00 mL の精油が得られた。比重は0.956で、採油率は0.14%(w/w)であった。6回目の蒸留の際に2.4 L の芳香蒸留水(ADW-201902-06)を採取した。

精油EO-201903の試作において、1回の蒸留で1.37 - 1.57 mL の精油を得ることができ、7回の操作を合わせると抽出率7.086 kg から10.32 mL の精油が得られた。比重は0.961で、採油率は0.14%(w/w)であった。6回目の蒸留の際に2.5 L の芳香蒸留水(ADW-201903-06)を採取した。

3.2 精油と芳香蒸留水の香気成分

試作した精油は以前試作した精油と同様、フルーティーで刺激的な香りがした。一方芳香蒸留水は、一瞬プロポリス様の香りもしたが、焦げた感じがわずかに混ざったくさいにおいて、不快なにおいであった。

香気成分分析の結果を表1に示す。精油では26成分の、芳香蒸留水では47成分のにおいを感じた。ともに ethyl hydrocinnamate が香りへの寄与が最も大きい成分ではあるが、精油ではにおい強度4が1成分、におい強度3が6成分であるのに対し、芳香蒸留水ではにおい強度4が4成分、におい強度3が8成分であり、芳香蒸留水の方が他の香気成分の寄与が大きいと言える。また、芳香蒸留水はfruity や green (metallic) 系のトップノート成分を多く感じ、中でも1-hexen-3-one は臭気強度4で非常に強かった。これらの成分は先述の orthonasal aroma (鼻で直接嗅いだ時の香り)の違いに寄与していると考えられる。なお、これらの成分が芳香蒸留水のみに含まれる成分であるの

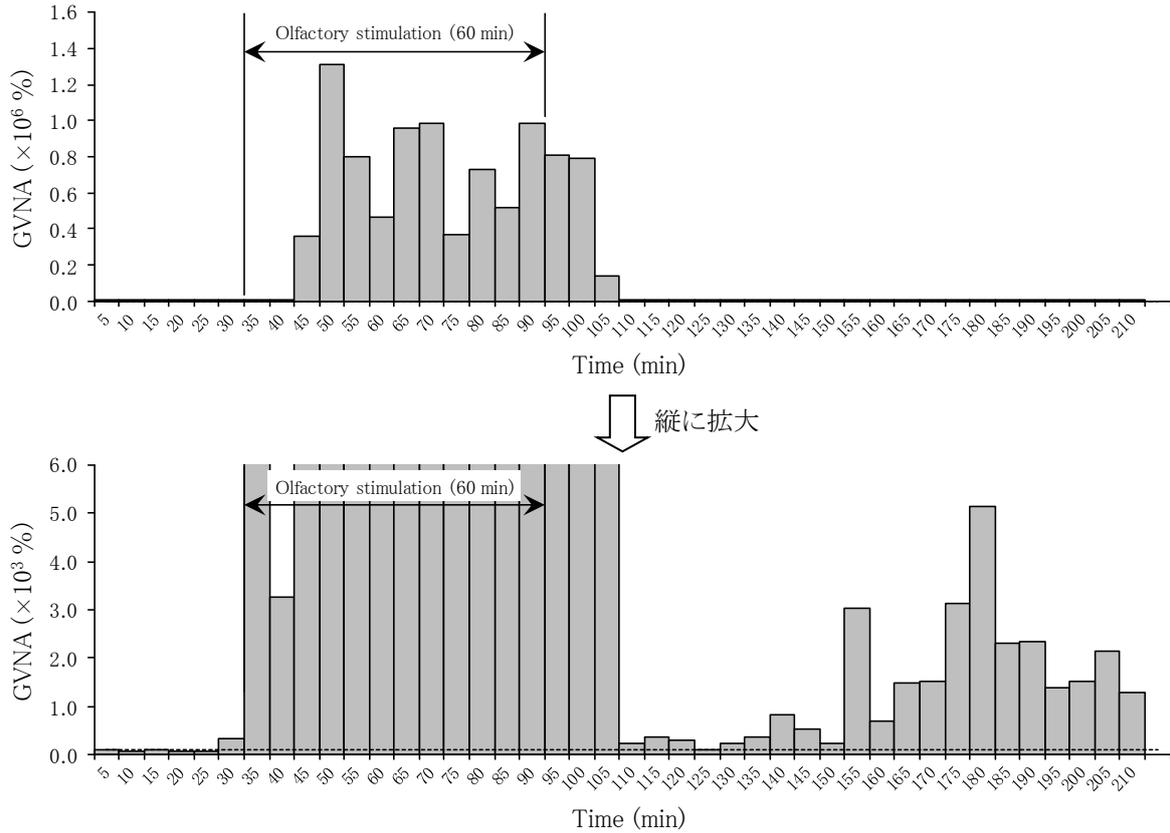


図1 精油EO-201902の嗅覚刺激による副交感神経活動の変化

副交感神経活動を亢進することが明らかになった。

過去の評価試験により精油にラットの交感神経活動を抑制する効果があることが確認されており²⁾、今回の結果をあわせると、プロポリスのエタノール抽出液精油が興奮状態を押さえリラックス効果を与える可能性があると言える。

3.4 Ethyl hydrocinnamate のラット交感神経活動に及ぼす効果

単離した ethyl hydrocinnamate のにおいをラットに嗅がせた時のBAT-SNAの変化を図2に示す。その結果、嗅覚刺激中に徐々に交感神経活動が亢進し、嗅覚刺激開始後 55 - 60 min にBAT-SNAが350%に達した。そこで嗅覚

刺激を止めるとBAT-SNAは低下し、試験終了までコントロールより少し高い値を維持した。精油全体の嗅覚刺激を与えた場合、嗅覚刺激中から、または、嗅覚刺激終了後に交感神経活動が抑制される傾向があることを既に報告している²⁾。よって、精油や芳香蒸留水の主成分である ethyl hydrocinnamate はラット交感神経活動の抑制に寄与せず、より弱い香りしか感じない(あるいは、全く香りを感じない)他の成分が寄与しているか、あるいは複数成分による相乗効果などの可能性が考えられる。

3.5 抗菌活性

精油と ethyl hydrocinnamate の *P. gingivalis* に対する生

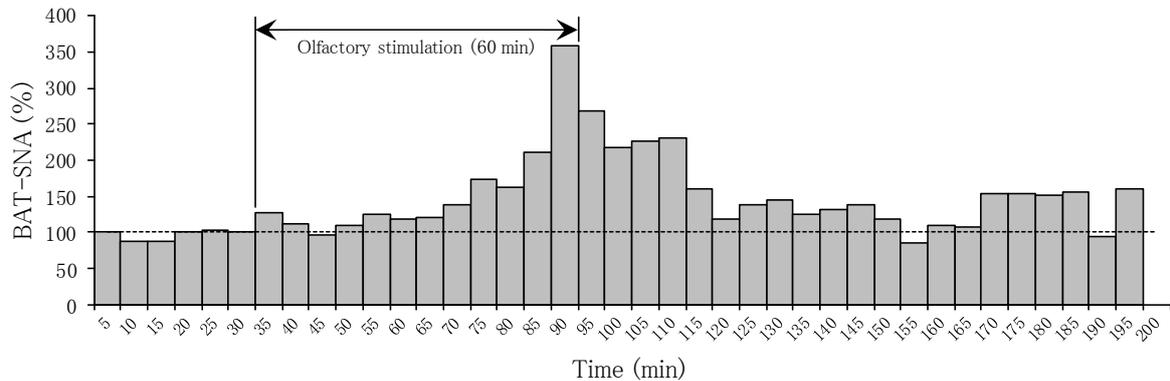


図2 Ethyl hydrocinnamate の嗅覚刺激による交感神経活動の変化

表2 精油および ethyl hydrocinnamate の *P. gingivalis* に対する生育阻害率

濃度 (µg/mL)		生育阻害率 (%)		
精油 EO-201902		濃度 (µM)	ethyl hydrocinnamate	
		hinokitiol (P.C.)		
5,000	-100.6	5,000	-6.1	75.5
2,500	-108.2	2,500	-3.3	86.9
1,250	-66.1	1,250	-3.5	87.1
625	-29.9	625	-1.8	56.3
312.5	-7.6	312.5	1.5	42.4
156.3	-0.7	156.3	3.4	23.0
78.1	0.2	78.1	2.3	18.8

生育阻害率を表2に示す。ポジティブコントロールとして使用した hinokitiol はヒバ材などに含まれる広い抗菌スペクトルを示す物質であり、1,250 µM 以上の濃度で良好な抗菌活性を示している。それに対し、ethyl hydrocinnamate では 625 µM 以上の濃度で、精油では 156.3 µg/mL 以上の濃度で生育阻害率がマイナスの値になった。これは試料の培地への溶解性が極端に低下したためである。結果として、いずれの試料についても *P. gingivalis* に対する抗菌活性はほぼ無いと言える。

精油と芳香蒸留水について、*E. coli* と *S. aureus* に対する抗菌活性評価を行った結果を表3に示す。ポジティブコントロールの hinokitiol は MIC が 62.5 µg/mL (*E. coli*) および 125 µg/mL (*S. aureus*) であった。また、chlorhexidine では MIC がどちらの菌に対しても 31.3 µg/mL であった。それに対して、精油と芳香蒸留水の MIC はいずれも >4,000 µg/mL であり、大腸菌と黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性はほぼ無いという結果になった。

以上より、プロポリスのエタノール抽出液を原料とした精油、芳香蒸留水、それらの主成分 ethyl hydrocinnamate について、今回のすべての評価対象菌に対する抗菌活性はほぼ無いことが明らかになった。

4. まとめ

プロポリスのエタノールエキス製造時に発生する抽出液を原料として直接蒸留法により精油および芳香蒸留水を試作した。

精油のラット副交感神経活動に対する生理活性評価を行ったところ、嗅覚刺激中に副交感神経活動が亢進し、嗅覚刺激終了後一度活動は元に戻るが、その後再び亢進し

た。以前の試験結果とあわせると、ラットに精油の香りを嗅がせると副交感神経活動が亢進し、交感神経活動は抑制される。このことは、抽出液精油が興奮状態を抑え、リラックス効果を与える可能性を示唆している。

精油から単離した ethyl hydrocinnamate についてラット交感神経活動の抑制効果を試験した結果、逆に交感神経活動を亢進する傾向が見られた。これより、ethyl hydrocinnamate は交換神経活動の抑制に寄与していないことが明らかになった。他の成分が寄与していると思われるため、においを感知しなかった成分も含めて再解析し、可能性のある成分を探索する必要がある。一方、交感神経の活性化は、肥満抑制作用や抗うつ作用改善等に影響することがすでに言われており、ethyl hydrocinnamate の新規生理機能を示す結果となった。

精油および芳香蒸留水について抗菌活性の評価を行ったが、今回対象とした菌に対しては抗菌活性が見られなかった。よって、リラックス効果以外の機能性を求めていくのであれば、新たな機能性をターゲットにすることも視野に入れていかなければならない。

【参考文献】

- 1) 熊澤茂則, ぶんせき 2018(5), pp. 193, 2018
- 2) 今泉茂巳ら, 岐阜県産業技術センター研究報告, 13, pp. 33-36, 2019
(印刷物は図に誤植あり, 以下のURLを参照。http://www.food.rd.pref.gifu.lg.jp/pdf/reports/2018_13.pdf)
- 3) 落合伸夫, アジレント/ゲステル食品中香気分析セミナー2015テキスト, pp. 57-88, 2015
- 4) E. Şerban *et al.*, *Farmacía* 59(3), pp.440-446, 2011

表3 精油および芳香蒸留水の *E. coli*, *S. aureus* に対する最小発育阻止濃度 (µg/mL)

Sample	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
EO-201902	>4,000	>4,000
ADW-201902-06	>4,000	>4,000
hinokitiol (P.C.)	62.5	125
chlorhexidine (P.C.)	<31.3	<31.3