

ロイヤル・ゼリー酸の生物化学

篠田 雅人, 中 陳 静 男

星薬科大学 生化学教室

Chemical and Biological Aspects
of Royal Jelly Acid

MASATO SHINODA and SHIZUO NAKAJIN

Department of Biochemistry, Hoshi
College of Pharmacy

ミツバチの社会は、1匹の女王蜂と数万匹の働き蜂に、繁殖期だけに出現する数百匹の雄蜂で構成されている。雄蜂は無精卵から生まれるが、女王蜂と働き蜂は有精卵から生まれる。同じ有精卵から生まれながら、働き蜂の寿命が約1カ月であるのに対して、女王蜂は発育が速く、体も大きく、産卵期には1日2千個以上もの卵を生みながら、2~4年も長く寿命を保っている。このように女王蜂には他に見られない、桁はずれの生理作用が認められるが、この神秘的とも思える生命力の根源としては、女王蜂が幼虫の時期から成熟して産卵を続ける期間を通して餌として与えられるRoyal Jelly (RJ, 王乳と和訳されている) が与えられる。有精卵からの幼虫が、女王蜂になるか、働き蜂になるかの決め手となるものもRJである。従ってRJは古くより神秘的な健康食品として珍重され、愛用されている。

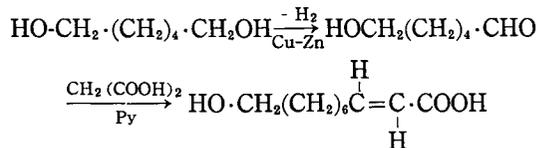
RJはミツバチ(主にヨウシュミツバチ *Apis mellifera*)の羽化後3~12日の若い働き蜂(育児蜂)の下咽頭腺 hypolaryngeal gland および大腮腺 mandibular gland から分泌される乳白色、不透明のクリーム状の物質である。甘味はまったくなく、かなり強い酸味があり、ハチミツとは異なる。

RJの成分の化学的組成については、Planta¹⁾以来、多くの研究者によって報告されているが、これらは総括して紹介しているので、²⁾ここでは省略

して、RJの成分の中で特徴あるものと考えられる脂肪酸、特にロイヤル・ゼリー酸を中心に、その化学的性状、定量法と、現在までに知られている薬理効果について紹介する。

RJ 中の脂肪酸

RJにはエーテル可溶性成分が10~15%含まれているが、その80~85%が酸性物質(有機酸)であるといわれている。この中から、1957年 Butenandt, Rembold³⁾により、不飽和脂肪酸である10-hydroxy-*Δ*²-decanoic acid [I] (以下10-HDAと略す)が証明された。10-HDAは“Royal Jelly Acid”ともいわれている。10-HDAには立体異性が存在するが、天然のRJ中のものはtrans型(E型)であることが明らかにされている。⁴⁾ (E)-10-HDAはエーテル:石油エーテル(1:1)から再結晶され、mp 63.5~64.5°Cである。⁵⁾ 10-HDAの合成については多くの報告があるが、最近では1,6-hexanediolを原料とし、銅-亜鉛触媒による減圧下脱水素反応により6-hydroxyhexanalを製り、さらにピリジン中マロン酸と縮合させて10-HDAが合成されている。⁶⁾



Brawn一派^{4,6)}により、エーテル可溶性成分からさらに, sebacic acid [II], *Δ*²-decendioic acid [III], 10-hydroxy decanoic acid [IV] が分離されており, また, Callow, Johnston⁷⁾ は 9-oxo-*Δ*²-decenoic acid [V] の存在を認めている. [V] の mp は 52~53°C⁸⁾ あるいは 53~54°C⁹⁾ と報告されている. [V] は働き蜂の卵巣の発育を止め, 女王蜂になることを阻害する作用があり,⁹⁾ “Queen Substance” ともいわれている. 以上はいずれも炭素数 10 個の脂肪酸であり, RJ 中にはこのような脂肪酸が多いが, その他にも adipic acid [VI], pimelic acid [VII], suberic acid [VIII] の存在も報告されている.¹⁰⁾ Boch et al¹¹⁾ も RJ の揮発性部分から hexanoic acid (n-caproic acid) [IX], octanoic acid (caprylic acid) [X], (E)-oct-2-enoic acid [XI] を認めている.

- [I] $\text{HO-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_8\text{-CH=CH-COOH}$
10-Hydroxy-*Δ*²-decenoic acid
- [II] $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_8\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$
Sebacic acid
- [III] $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_8\text{-CH=CH-COOH}$
*Δ*²-Decendioic acid
- [IV] $\text{HO-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_8\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$
10-Hydroxy decanoic acid
- [V] $\text{CH}_3\text{-CO-(CH}_2\text{)}_7\text{-CH=CH-COOH}$
9-Oxo-*Δ*²-decenoic acid
- [VI] $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_4\text{-COOH}$
Adipic acid
- [VII] $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_5\text{-COOH}$
Pimelic acid
- [VIII] $\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_6\text{-COOH}$
Suberic acid
- [IX] $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-COOH}$
Hexanoic acid
- [X] $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-COOH}$
Octanoic acid
- [XI] $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-CH=CH-COOH}$
Oct-2-enoic acid

10-HDA の定量

10-HDA は RJ の特有成分と考えられるので “Royal Jelly Acid” とも呼ばれている所以である. 近年, RJ 中の 10-HDA を定量することにより, RJ の定量あるいは品質の評価をしようとする試みが見受けられる. RJ の多くは輸入されているが, RJ が単味の場合, RJ に他のものが添加されている場合, 他のもに RJ が添加されている場合等で関税率が異なるため, 税表分類上からもこれらの鑑別の必要が生じるといわれている.¹²⁾ RJ は種々の成分を含有しており, その測定値が研究者によってかなり異なるため, 信頼性のある定量法がまだ定められていない.

定量を行なう場合にはその成分に特異性があるか, 生物学的活性の本態であることが望ましい. 現在までの報告では 10-HDA が RJ に特異的に含有されているものと考えられるので, 評価の指標として 10-HDA の定量が考えられるのは当然である.

10-HDA の定量には脂肪酸の定量によく用いられるガスクロマトが応用されている. ガスクロマトにより脂肪酸を定量する場合に, C₆以下の低級脂肪酸ならばそのまま測定が可能であるが, C₆以上の高級脂肪酸の場合には一般に前処置としてカルボキシル基の極性を封じて, 低沸点化するためにメチルエステル化が行なわれている. 脂肪酸およびそのエステルは鎖状炭素数の増加にともなって Tr 値が大きくなるが, メチルエステルにすると, 同一鎖長の脂肪酸よりも炭素数で約 7 個少ない脂肪酸に相当する位置に検出されるようになるという.

ガスクロマトを目的とした脂肪酸のメチルエステル化の方法は種々報告されているが, 早川ら¹³⁾ は RJ 中の有機酸を抽出し, 硫酸メタノール法によりメチルエステル化し, ガスクロマトにかけたところ, RJ とその含有製品に特徴あるパターンを認め (Fig. 1), nonadecanoate に相当するピーク F に定量性があると報告し (Fig. 2), これが公

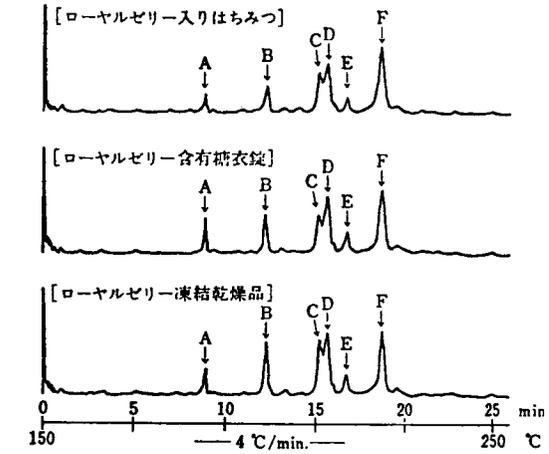
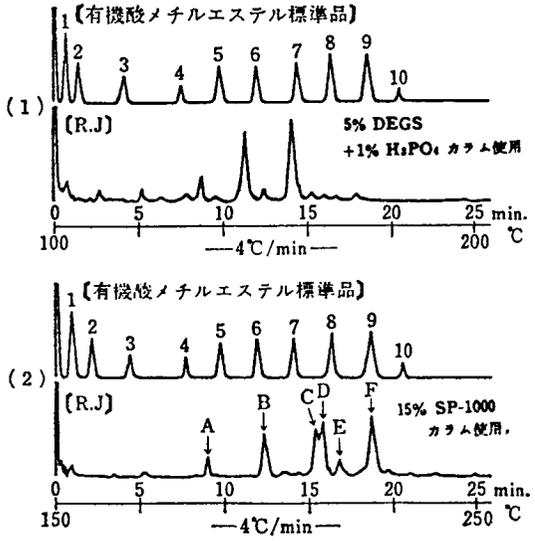


Fig. 1. RJ と有機酸メチルエステル標準品のガスクロマト (早川ら)¹³⁾
 有機酸メチルエステル標準品: 1 Caprylate, 3 laurate, 4 Myristate, 5 Pentadecanate, 6 Palmitate, 7 Heptadecanate, 8 Stearate, 9 Nonadecanoate, 10 Arachidate.

正競争規約に採用されている。なお、Fig. 1 に示されている標準有機酸の構造は次の通りである。

1. n-Caprylic acid $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$ (octanoic acid)
2. n-Capric acid $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_8-\text{COOH}$ (decanoic acid)

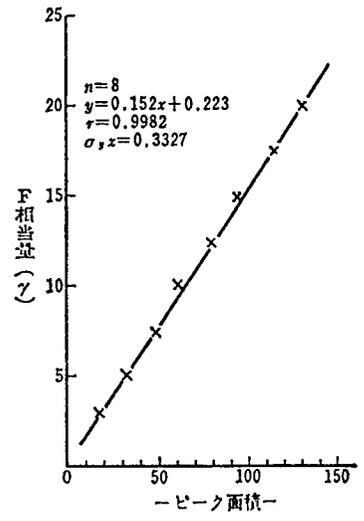


Fig. 2. ピークFの検量線 (早川ら¹³⁾)

3. Lauric acid $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{COOH}$ (dodecanoic acid)
4. Myristic acid $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{COOH}$ (tetradecanoic acid)
5. Pentadecanoic acid $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{13}-\text{COOH}$
6. Palmitic acid $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$ (hexadecanoic acid)
7. Heptadecanoic acid $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{15}-\text{COOH}$
8. Stearic acid $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{16}-\text{COOH}$ (octadecanoic acid)
9. Nonadecanoic acid $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{17}-\text{COOH}$
10. Arachidic acid $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{18}-\text{COOH}$

早川らの報告では10-HDAについては示されていない。また、米山ら¹⁴⁾はこの方法は再現性に問題のあることを指摘している。著者らはメチル化剤としてphenyltrimethylammonium hydroxide (PTAH)のメタノール溶液を用い、10-HDAのメチルエステル化による定量を試みた。10-HDAとPTAHの量的な比率、反応処理方法の比較などから種々の条件を検討したが、この方法によっては単一のピークを示さない場合が多く、定量法としては不適當であると考えられる。¹⁵⁾

試料化合物がOH基を有する場合にはトリメチ

ルシリル化 (TMS 化), アセチル化, トリフロロアセチル化 (TFA 化), その他の方法が行なわれるが, 代表的なものは TMS 化であると考えられる。ヒドロキシ酸の分析には, OH 基が遊離のままでも可能であるが, アセチル化, TMS 化するとメチルエステル体よりも保持時間が短縮される。TMS 化誘導体の保持時間がもっとも短いことが知られている。¹⁶⁾ また, ヒドロキシ酸の TMS 化と TFA 化とを比較すると, 後者の方が分離能がすぐれているが, 熱分解の可能性があるのに対して, 前者の方が安定であるといわれる。¹⁷⁾

米山ら¹⁴⁾ は TMS 化剤として N,O-bis(trimethylsilyl) acetamide と trimethylchlorosilane の 2:1 混合物を用い, 10-HDA の 0.2-1.0mg/ml の範囲で検量線が直線性を示す方法を報告し, さらに, 13 種の台湾産 RJ の 10-HDA 含量を測定し, 無水物換算で 4.22~6.64%, 平均 4.83% であると報告している。石黒¹²⁾ もこの方法を追試し, 米山らの結果を確認し, 国内および国外の生 RJ 7 種の 10-HDA 含量が, 1.68~1.75%, 平均 1.731 ± 0.021 であることを報告し, RJ 添加ハチミツ中の 10-HDA 量をも測定している。

著者ら¹⁸⁾ も, 米山ら¹⁴⁾ に準じて TMS 化による

方法を検討し, 同様の直線性と検出感度を確認した, しかし RJ 含有製剤中の 10-HDA 含量の測定から RJ 含有量を推定しようとしたが, 製剤加工工程中に添加される基剤中の成分が影響するためか, 錠剤の場合に未知のピークが現われ, 測定値に定量性が得られなかった。

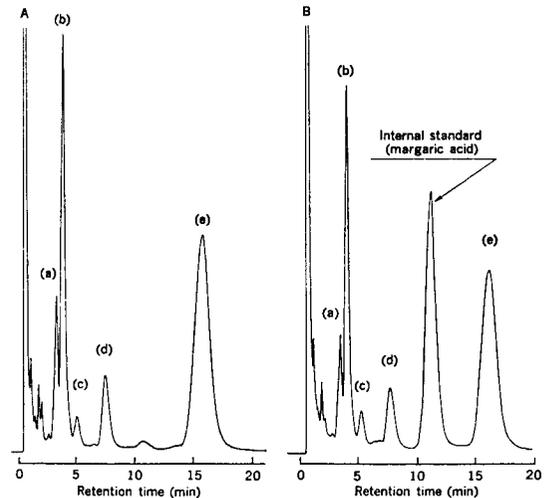


Fig. 3. Gas Chromatograms of TMS Derivatives of CH_2Cl_2 Extract from Tablets Containing RJ

A, TMS derivatives of CH_2Cl_2 extract; B, TMS derivatives of CH_2Cl_2 extract and internal standard.

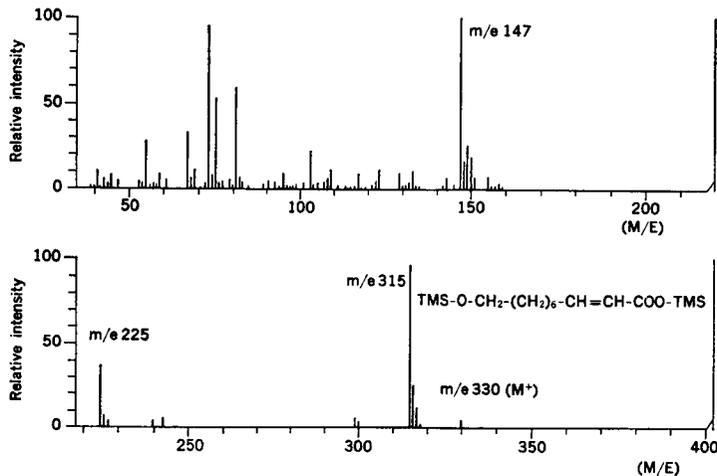


Fig. 4. Mass Spectrum of TMS Derivative of 10-HDA Separated from Tablets Containing RJ by Gas Chromatography

そこで、試料の抽出溶媒、ガスクロマトの測定時に添加する内部標準物質の選択をも含めて定量条件を検討した結果、試料の抽出溶媒としてはジクロルメタンが適当であり、TMS化した試料のガスクロマトグラムは Fig. 3 の如くであり、TMS-10-HDA に相当するピーク (b) を GC-MS 分析し、Fig. 4 に示すようにこのピークが 10-HDA であることを同定した、また内部標準物質としては margaric acid が最適であることも明らかにした。この方法により生 RJ のみならず、各種の RJ 含有製剤中の RJ 含有量を推定することが可能となった。

脂肪酸の分離、定量法として、最近ではガスクロマトと同様に高速液体クロマトグラフィー (HPLC と略す) の適用が研究されるようになってきた。著者ら¹⁹⁾も RJ および RJ 含有製剤中の 10-HDA の定量に HPLC の適用を検討した。抽出溶媒にはガスクロマトの場合と同様にジクロルメタンを

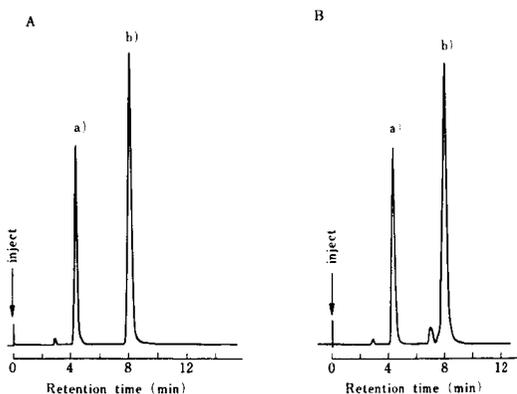


Fig. 5. Chromatograms of 10-HDA by HPLC

A: an artificial mixture of suberic acid and 10-HDA.

B: a mixture of suberic acid and extract of RJ.

Peak assignment: a=suberic acid, b=10-HDA.

Column: LiChrosorb RP-18(0.4×25cm), flow rate: 0.75ml/min, mobile phase: 55% methanol in dist. water (pH 2.5), temperature: 50°C.

用い、溶媒を除去した抽出物をエタノールに溶解し、LiChrosorb RP-18 カラムの HPLC を行うと、Fig. 5 のようなクロマトグラムが得られ、さらにピーク (b) を TMS 化して GC-MS 分析の結果 Fig. 4 と同様のマススペクトルが得られ、これが 10-HDA であることを確認した。内部標準物質としては suberic acid が適当であった、この方法はガスクロマト法の場合と比較すると、より鋭敏であり、TMS 化のような前処理を必要とせず、簡便かつ迅速に定量できることを認めた。

10-HDA の生物学的活性

RJ には種々の生物学的活性が報告されているが、含有されている生理活性物質も多いため、すでに明らかにされている生物学的活性で有効因子がどれであるか決定していないものも少なくない。そこで 10-HDA に基因すると考えられる生物学的活性を文献的にまとめると次の如くである。

抗菌作用 RJ は室温に放置しておいても急激には変敗し難いことから、RJ 中に抗菌性を有する成分が含まれていることが予想されていたが、McCleskey, Melampy²⁰⁾により各種の菌に対する作用が検討され、Staphylococcus aureus, Bacillus metiens などのグラム陽性菌に対して発育を阻止する作用が発見され、さらに pH により殺菌力が変化し、pH 4.4~4.6 の範囲が有効であることが報告されて以来、Escherichia coli, Eberthella typhosa, Mycobacterium tuberculosis, Proteus vulgaris など種々の細菌に対しても有効であることが続々と報告された。²¹⁾ Blum et al²²⁾は RJ 中の抗菌作用を示す成分の化学的性質を検討し、エーテル可溶部分の脂肪酸フラクションから有効因子を結晶状に取り出し、これが 10-HDA であることを証明した。さらに 10-HDA の抗菌作用を他の抗生物質と比較し、Micrococcus pyrogenes に対しては penicillin の 1/4, E. coli に対しては chlortetracycline の 1/5 程度の作用を示し、数種のカビの成長を遅延させるという。Barker et al²³⁾

も 10-HDA を精製し, bacteria や fungi には有効であるが, *Streptococcus pyogenes*, *Tricophyton rubrum* には弱いことを報告している. なお, Thornton et al²⁴⁾は微生物に対する飽和脂肪酸の抗菌作用を炭素鎖の長さによって比較し, *G. Tra-beum* に対しては C₆~C₁₀ の酸が, また soft rot microorganism には C₆~C₇ が有効であり, 炭素鎖がこれより長くなると活性が低下または無効になるといっている.

抗腫瘍作用 Tounsend et al²⁵⁾はマウスに白血病細胞あるいは腹水ガンを移植し, これに対して RJ あるいは 10-HDA に抑制効果のあることを発見した. この報告によれば, 5~6 週令の AKR 系雌マウスを用い, 白血病で死んだマウスの脾から採取したガン細胞のサスペンションに RJ あるいはその分画物を投与前に混合して皮下注射し, 延命効果をみると, RJ 30 mg または 10-HDA 1.5 mg の混合により, 白血病の発生が抑制された. さらに, マウスの腹水から採取した 6C3 HED lymphosarcoma についても RJ 100 mg あるいは 10-HDA 1.0 mg で有効であることを認めている.

しかし, これらの効果は腫瘍細胞に混合して投与することが必要であり, 細胞が移植されてから投与しても無効である. また, RJ あるいは 10-HDA は酸性溶液であることが必要であり, pH が 6.1 より高いと効力が発現しないという.

発芽抑制作用 Iwanami et al²⁶⁾は植物の花粉の発芽を抑制する物質を研究して, 10-HDA が *Camellia japonica* の花粉の発芽および花粉管の発育を抑制する作用のあることを認め, この場合にも 10-HDA 溶液の液性が問題であり, pH 4 では有効であるが, pH 6 では活性が著しく減退することを報告している.

おわりに

最近, 多種多様の健康食品が世に氾濫しているが, その多くは科学的根拠が示されていない, その中で RJ は古くから欧米をはじめとして各地で広く愛用され, また科学的検討も進められている. RJ に特有の成分である ローヤル・ゼリー酸の定量法の進歩にともない, 今後は品質の確保された RJ 製剤の供給されることが期待される.

注

- 1) V. Planta: Z. Physiol. Chem., **12**, 327 (1888).
- 2) 篠田雅人, 中陳静男: 化学と薬学の教室, **59**, 15 (1978).
- 3) A. Butenandt, H. Rembold: Z. Physiol. Chem., **308**, 284 (1957).
- 4) W. H. Brawn, R. J. Freure: Can. J. Chem., **37**, 2042 (1959).
- 5) 横井勝美, 松原義治: 日化, **1978**, 1415 (1978).
- 6) W. H. Brawn, E. E. Felauer, R. J. Freure: Can. J. Chem., **39**, 1086 (1961).
- 7) R. D. Callow, N. C. Johnston: Bee World, **41**, 152 (1960).
- 8) H. J. Bestmann, R. Kustmann, H. Schulz: Ann., **699**, 33 (1966).
- 9) C. G. Butler, R. D. Callow, N. C. Johnston: Nature, **184**, 1871 (1959).
- 10) J. Pain, M. Barbier, D. Bogdanovsky, E. Lenderer: Comp. Biochem. Physiol., **6**, (1962).
- 11) R. Boch, D. A. Shearer, R. W. Shuel: J. Apicult. Res., **18**, 250 (1979).
- 12) 石黒昌孝: 関税中央分析所報, **18**, 77 (1978).
- 13) 早川幸男, 平林達郎, 渡辺長男: 食品工誌, **21**, 604 (1974).
- 14) 米山智, 荒木恵美子, 山下太郎: 食品工誌, **23**, 490 (1976).
- 15) 篠田雅人, 北御門邦子, 田口光江: 未発表
- 16) R. D. Wood, P. K. Raju, R. Reiser: J. Am. Oil Chemists Soc., **42**, 81 (1965).
- 17) B. Freedman: J. Am. Oil Chemists Soc., **44**, 113 (1967).
- 18) 篠田雅人, 田口光江, 沖山邦子, 中陳静男, 山下三郎, 秋山義郎, 生薬誌, **36**, 315 (1982).
- 19) 中陳静男, 田口光江, 秋山義郎, 篠田雅人, 薬誌, **102**, 549 (1982).
- 20) C. S. McCleskey, R. M. Melampy: J. Bacteriol., **36**, 324 (1938); J. Econ. Entomol., **32**, 581 (1939).

- 21) H. Hinglais, M. Hinglais, J. Gautheries, M. Langlade: *Ann. Inst. Pasteur*, **89**, 684 (1955); H. Hinglais, J. Gautheries, M. Hinglais: *ibid*, **91**, 127 (1956). C. Helleu: *ibid*, **91**, 231 (1956); H. Langlade, M. Hinglais: *ibid*, **93**, 272 (1957); I. Emanuilov, P. Velcheva, L. Nachev, A. Toshkov, L. Shirova: *Izu. Mikrobiol. Inst., Burgar. Acad. Nauk*, **15**, 89 (1963). [Chem. Abstr., **60**, 16253 (1964)]; 飯塚広, 小山洋之介: *栄養と食糧*, **17**, 203 (1964).
- 22) M. S. Blum, A. F. Novak, S. Taber: *Science*, **130**, 452 (1959).
- 23) S. A. Barker, A. B. Foster, D. C. Lamb, N. Hodgson: *Nature*, **183**, 996 (1959).
- 24) J. D. Thornton, P. J. Robinson, J. R. J. French: *Int. Biodetn. Bull.*, **13**, 108 (1977).
- 25) G. F. Townsend, J. F. Morgan, B. Hazlett: *Nature*, **183**, 1270 (1959).
- 26) Y. Iwanami, I. Okada, M. Iwamatsu, T. Iwaware: *Cell Structure and Function*, **4**, 135 (1979).