

明 細 書

発明の名称： マヌカ蜂蜜に含まれる新規化合物及びその利用

技術分野

[0001] 本明細書は、マヌカ蜂蜜に含まれる新規化合物及びその利用に関する。

背景技術

[0002] マヌカ蜂蜜はニュージーランドにのみ生息するマヌカ (*Leptospermum scoparium*) の花の蜜に由来するニュージーランド特有の蜂蜜であり、高い抗菌活性やその他の生理機能を有することが知られている。ただし、オーストラリアにマヌカの亜種 (*Leptospermum polygalifolium*) が存在し、そこからもマヌカ蜂蜜 (ジェリーブッシュ蜂蜜) が採取されている。

[0003] マヌカ蜂蜜は、例えば胃がんの元となるピロリ菌を高い抗菌活性で除菌できる可能性があるとされている。こうした抗菌活性などの生理活性は、マヌカ蜂蜜でも変動が大きいとされている。

[0004] そこで、マヌカ蜂蜜の抗菌活性などの生理活性の一つの指標として、フェノール活性に換算された抗菌活性に基づく「ユニークマヌカファクター」 (Unique Manuka Factor, UMF) が用いられている。また、マヌカ蜂蜜の抗菌活性成分がメチルグリオキサール (Methylglyoxal, MGO) というアルデヒドであるという報告 (非特許文献 1、2) がある (図 9 参照)。この報告に基づいて、マヌカ蜂蜜の生理活性の指標として MGO 量が用いられる場合もある。

[0005] さらに、マヌカ蜂蜜には以下に示すメチルシリケート (MSYR) が含まれており、活性酸素の消去能を有していることも報告されている (非特許文献 3) (図 9 参照)。このメチルシリケートは、マヌカ蜂蜜以外にも、イタリアサルディニア島で得られたアスフォデル蜂蜜にも大量に含まれていることが知られている (文献 4)。加えて、メチルシリケートに 1 つの糖が結合した配糖体がアニスードから単離同定されている (文献 5)。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1: Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. Adams CJ, Boulton CH, Deadman BJ, Farr JM, Grainger MN, Manley-Harris M, Snow MJ. Carbohydrate Res. 2008; 343(4): 651-659.

非特許文献2: Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. Mavric E, Wittmann S, Barth G, Henle T, Mol Nutr Food Res. 2008; 52(4): 483-489.

非特許文献3: Identification of phenolic compound in manuka honey as specific superoxide anion radical scavenger using electron spin resonance (ESR) and liquid chromatography with coulometric array detection. Koichi Inoue, Shinho Murayama, Fumie Seshimo, Kazue Takeba, Yoshihiro Yoshimura, and Hiroyuki Nakazawa. J. Sci. Food Agric. 85, 872-878, 2005.

非特許文献4: Methyl syringate: a chemical marker of asphodel (*Asphodelus microcarpus* Salzm. Et Viv.) monofloral honey. Tuberoso CI, Bifulco E, Jerković I, Caboni P, Cabras P, Floris I. J Agric Food Chem. 2009, 57(9): 3895-3900.

非特許文献5: Aromatic compound glucosides, alkyl glucoside and glucide from the fruit of anise. Fujimatu E, Ishikawa T, Kitajima J. Phytochemistry. 2003, 63(5): 609-616.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] しかしながら、UMFの評価には、抗菌活性を測定することが必要であり簡易性や迅速性に問題があった。また、MGO量の測定も、一旦、キノキサリン誘導体とした後に高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で測定するなど、迅速な評価が困難であるという問題があった。

[0008] また、マヌカ蜂蜜には、抗菌活性のほか各種の効能があるとされている。

その有効成分の一つとして上記したMGOやMSYRが知られているものの、さらに他の有効成分が存在する可能性もある。そして、その化合物がより有効なマヌカ蜂蜜の抗菌活性等の生理活性の有効な指標となる可能性もある。

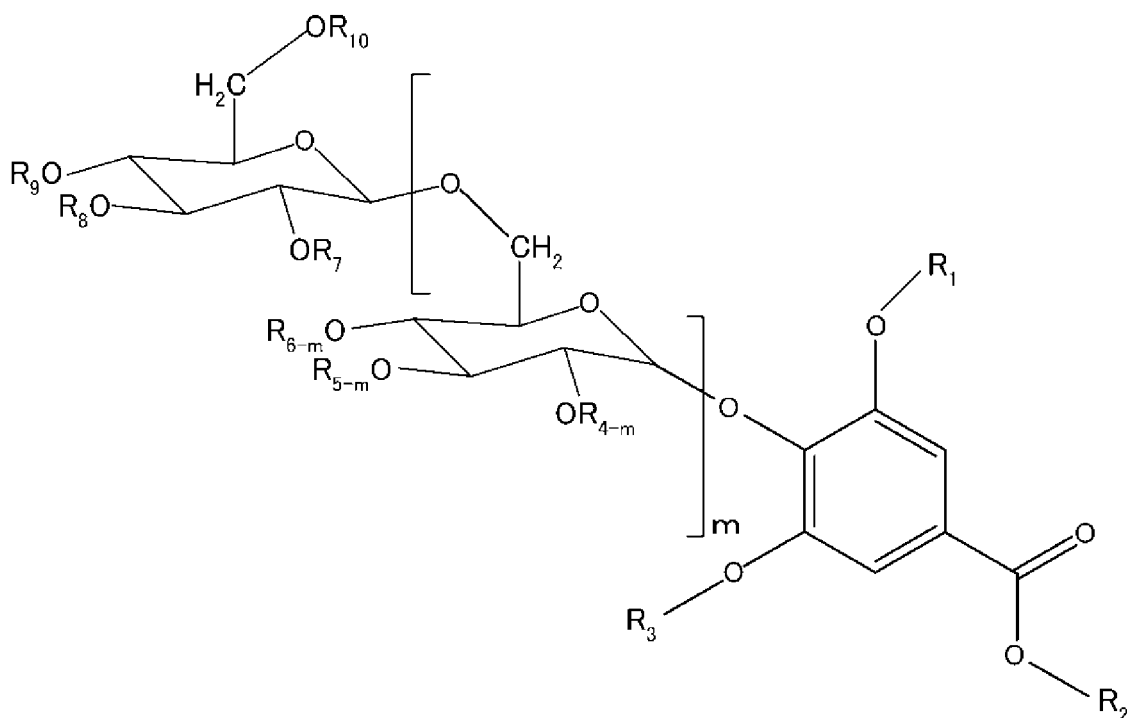
[0009] そこで、本明細書は、マヌカ蜂蜜の生理活性有効成分を見出すことを一つの目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者は、マヌカ蜂蜜について新規な有効成分を、抗炎症作用活性に基づきミエロペルオキシダーゼ(MPO)阻害活性評価系を用いてスクリーニングすることに着目した。そして、スクリーニングの結果、高いMPO阻害活性を示す化合物を見出し、当該化合物をMSYRに二糖(ゲンチオビオース)が配糖した新規化合物である Methyl 4-O- [β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranosyl] -3,5-dimethoxybenzoate (メチル-4-O [β -D-グルコピラノシル(1-6)- β -D-グルコピラノシル]-3, 5-ジメトキシベンゼン酸(MGGD)と同定し、新規化合物であることを見出した。また、同時に3糖体及び4糖体も見出した。さらに、本発明者は、MGGDがマヌカ蜂蜜の指標であるUMFと相関していることを見出し、抗菌活性等の指標にもなりうるという知見を得た。本明細書の開示によれば、以下の手段が提供される。

[0011] (1) 以下の式で表される、化合物。

[化1]



(上記式中、 R_1 、 R_2 及び R_3 は、それぞれ独立して水素原子又は炭素数1～4の置換されていてもよいアルキル基を表し、 m は、1～3の整数を表し、 R_{4-m} 、 R_{5-m} 及び R_{6-m} は、それぞれ独立に水素原子又は炭素数1～4の置換されていてもよいアルキル基を表し、 R_7 、 R_8 、 R_9 及び R_{10} は、それぞれ独立して水素原子又は炭素数1～4の置換されていてもよいアルキル基を表す。)

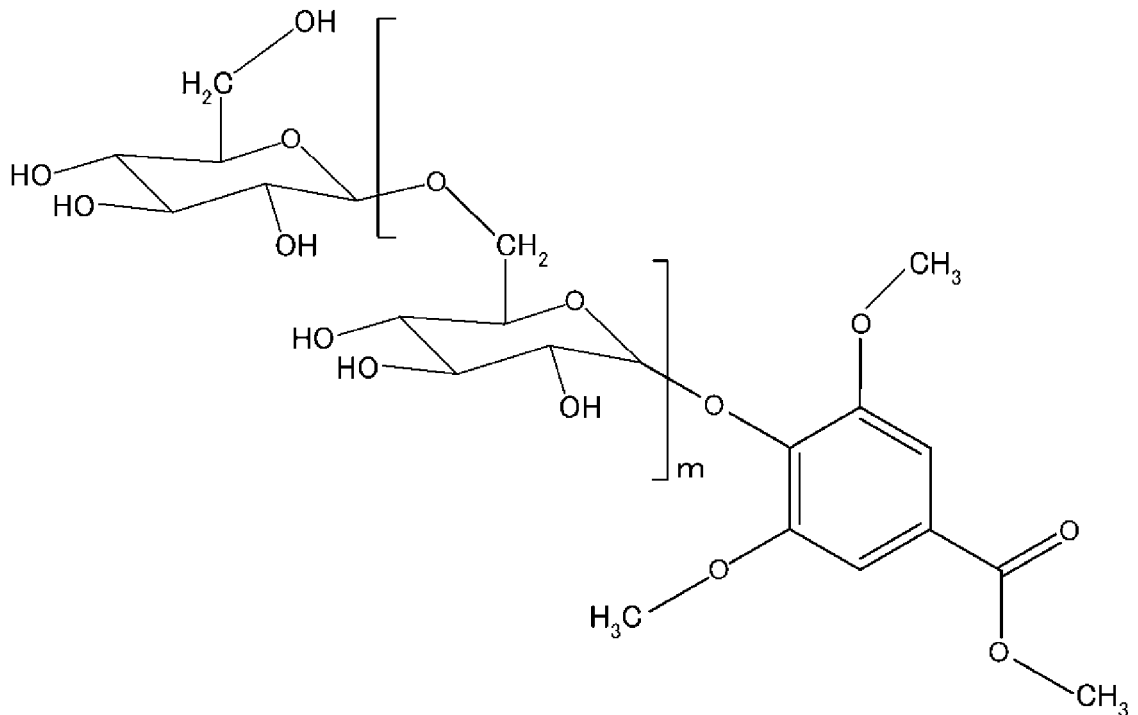
(2) 前記式中、 R_1 、 R_2 及び R_3 は、いずれも水素原子である、(1)に記載の化合物。

(3) 前記式中、 R_{4-m} 、 R_{5-m} 及び R_{6-m} は、いずれも水素原子である、(1)又は(2)に記載の化合物。

(4) 前記式中、 R_7 、 R_8 、 R_9 及び R_{10} は、いずれも水素原子である、(1)～(3)のいずれかに記載の化合物。

(5) 以下の式で表される、(1)～(4)のいずれかに記載の化合物。

[化2]



(6) (1) ~ (5) のいずれかに記載の化合物を有効成分とする、ミエロペルオキシダーゼ活性阻害剤。

(7) さらに、メチルシリリングートを含む、(6) に記載のミエロペルオキシダーゼ活性阻害剤。

(8) (1) ~ (5) のいずれかに記載の化合物を含む、蜂蜜の評価用マーカー。

(9) (1) ~ (5) のいずれかに記載の化合物と、
メチルシリリングートと、
を含む、蜂蜜評価用マーカーキット。

(10) (1) ~ (5) のいずれかに記載の化合物の製造方法であって、
マヌカ又はその亜種に属する植物体を蜜採取植物とする蜂蜜の水性溶液を
水・低級アルコール混液で溶出される画分を回収する第1のクロマトグラフィー工程を、備える、製造方法。

(11) 前記第1のクロマトグラフィー工程は、スチレンージビニルベンゼン系樹脂材料からなる固相を用いる工程である、(10) に記載の製造方法

。

(12) 前記第1のクロマトグラフィー工程は、水～低級アルコールの傾斜組成又は段階組成を有する移動相を用いたクロマトグラフィー工程である、

(10) 又は (11) に記載の製造方法。

(13) さらに、前記画分を酸性移動相で溶出される画分を回収する第2のクロマトグラフィー工程を備える、(10)～(13)のいずれかに記載の製造方法。

(14) 前記第2のクロマトグラフィー工程は、逆相液体クロマトグラフィー工程である、(3)に記載の製造方法。

(15) さらに、前記第1のクロマトグラフィー工程に先立って、

マヌカ又はその亜種に属する植物体を蜜採取植物とする蜂蜜の水性溶液から、より親水性の第1の画分と、前記化合物を含みより疎水性の第2の画分と、を分離する工程と、

前記第2の画分から、メチルシリリングートを含みより疎水性の第3の画分と前記化合物を含みより親水性の第4の画分とを分離する工程と、を備える、(10)～(14)のいずれかに記載の製造方法。

(16) マヌカ又はその亜種に属する植物体を蜜採取植物とする蜂蜜から(1)～(5)のいずれかに記載の化合物を取得するための処理方法であって、

マヌカ又はその亜種に属する植物体を蜜採取植物とする蜂蜜の水性溶液から、より親水性の第1の画分と、前記化合物を含みより疎水性の第2の画分と、を分離する工程と、

前記第2の画分から、メチルシリリングートを含みより疎水性の第3の画分と前記化合物を含みより親水性の第4の画分とを分離する工程と、を備える、方法。

(17) 蜂蜜中の(1)～(5)のいずれかに記載の化合物の測定方法であって、

蜂蜜の水性溶液を酸性移動相で溶出される画分を回収するクロマトグラフ

イー工程、

を備える、製造方法。

(18) 蜂蜜中の(1)～(5)のいずれかに記載の化合物の量を測定する工程を、備える、蜂蜜の評価方法。

(19) さらに、蜂蜜中のメチルシリリングート量を測定する工程を、備える、(18)に記載の評価方法。

(20) 蜂蜜中の抗菌活性及び抗炎症活性から選択される作用を評価する、(18)又は(19)に記載の評価方法。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]配糖体MGGD のNMR相関(HMBC) Key HMBC correlations

[図2]配糖体MGGD の赤外スペクトFT-IRチャート

[図3]Q1マスキングによる配糖体MGGD の質量分析スペクトルMSチャート

[図4]プロダクトスキニングによる配糖体MGGD の質量分析スペクトルMSチャート

[図5]マヌカ蜂蜜の高速液体クロマトグラフィー分析図

[図6]UMF 値とメチルシリリングートMSYR 及び配糖体MGGD 量の相関(縦軸は蜂蜜グラムあたりのモル数) アスフォデル蜂蜜の高速液体クロマトグラフィー分析図(メチルシリリングートMSYR)

[図7]マヌカ蜂蜜とアニスシードにおける配糖体MGGDの検出(LC/MS/MS質量分析器)

[図8]MGGDのMPO阻害活性を評価した結果を示す図である。

[図9]メチルグリオキサールとメチルシリリングートの構造を示す図である。

発明を実施するための形態

[0013] 本明細書の開示は、マヌカ蜂蜜中の抗炎症活性等に関連する新規配糖体化合物及びその利用に関する。本発明の新規配糖体(以下、単に本新規配糖体という。)は、MPO阻害活性を有する。マヌカ蜂蜜中に含まれるMSYRは、本新規配糖体と同様にMPO阻害活性を有しており、本新規配糖体、若

しくはこれに加えてMSYRは、MPO活性阻害剤として用いることができる。

[0014] また、マヌカ蜂蜜中の本新規配糖体量は、マヌカ蜂蜜の抗菌活性の指標とされるUMFと相関しており、マヌカ蜂蜜等の蜂蜜の評価用マーカーとしても有用である。さらに、本新規配糖体は、液体クロマトグラフィーなどにより簡便かつ短時間での定量が可能である。これにより、従来のように、煩雑かつ時間のかかる抗菌活性を測定することなく、UMFと同等の評価が可能となる。

[0015] さらに、マヌカ蜂蜜中のMPO阻害活性を有するMSYR量が、UMFと逆相関することも新たに見出した。MSYRも本新規配糖体と同様に、簡易に抽出測定ができる。したがって、MSYRによっても、マヌカ蜂蜜を評価できることがわかった。

[0016] 本新規配糖体は、優れたMPO活性を有するのみならず、マヌカ蜂蜜における生理活性の指標となる。さらには、蜂蜜中の本新規配糖体を簡易にかつ迅速に測定できる。したがって、本新規配糖体は、マヌカ蜂蜜等の蜂蜜の生理活性を簡易にかつ迅速に評価できる有利なマーカーとして利用できる。本新規配糖体は、マヌカ蜂蜜に含まれる他の指標性化合物であるMGOよりも優位である。MGOは、誘導体化後にHPLCで測定するなど、煩雑な操作を要するからである。

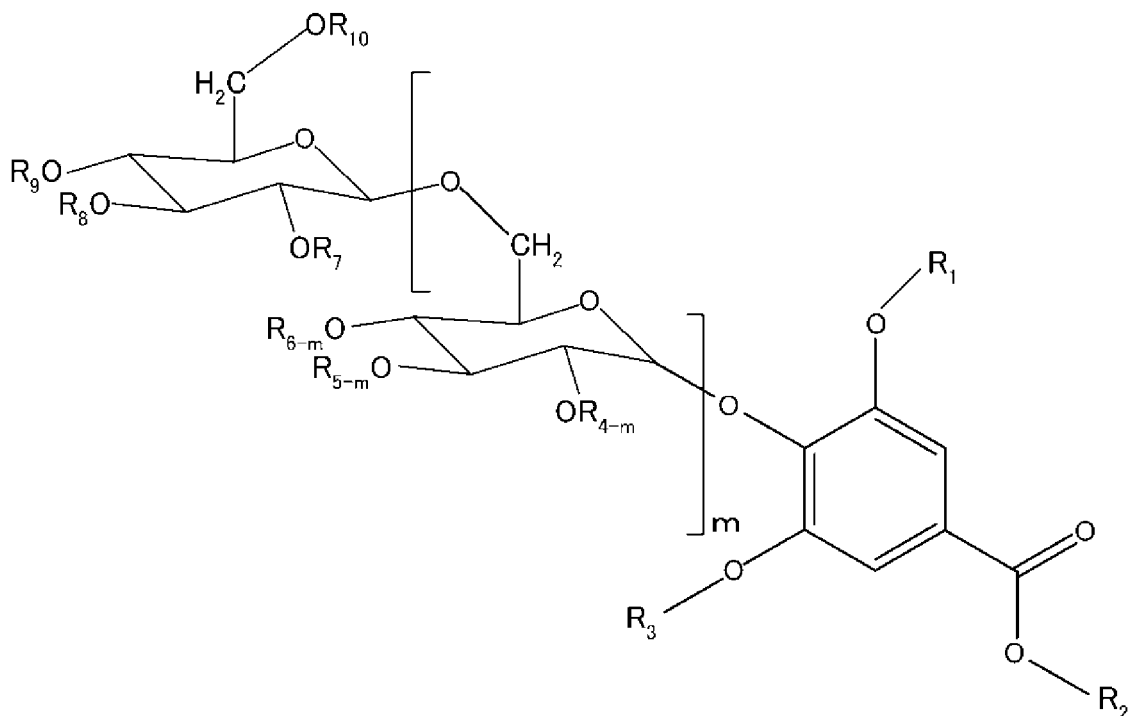
[0017] 以下、本明細書の開示に関する実施形態について詳細に説明する。

[0018] (本新規配糖体)

本新規配糖体は、以下の式で表される。

[0019]

[化3]



[0020] 本新規配糖体は、上記式で表されるように、MSYR誘導体に2～4個のグルコースが配糖した配糖体である。この化合物は、本発明者が、マヌカ蜂蜜の抗炎症活性に着目し、MPO活性を有する化合物をスクリーニングをする過程で見出した新規化合物である。

[0021] 本新規配糖体は、上記式中、 R_1 、 R_2 及び R_3 は、それぞれ独立して水素原子又は置換されていてもよい炭素数1～4のアルキル基で表される化合物を含む。炭素数1～4のアルキル基は、直鎖状であってもよいし、分枝状であってもよい。より具体的には、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基が挙げられる。これらのアルキル基における1又は2以上の水素原子は置換されていてもよい。例えば、水酸基、ハロゲン原子、ヒドロキシアルキル基等が挙げられる。本新規配糖体は、好ましくは、 R_1 、 R_2 及び R_3 は、いずれもメチル基である。

[0022] 本新規配糖体は、上記式中、 m は、1～3の整数を表す化合物を含む。 m が1のとき、2つのグルコース誘導体が配糖した配糖体(MGGD)となり

、 m が2のとき、グルコース誘導体が3個配糖した配糖体となり、 m が4のとき、グルコース誘導体が4個配糖した配糖となる。本発明者は、MSYRにグルコースが3個及び4個配糖した配糖体も同時にマヌカ蜂蜜からスクリーニングしている。

[0023] 本新規配糖体は、上記式中、 R_{4-m} 、 R_{5-m} 及び R_{6-m} が、それぞれ独立に水素原子又は置換されていてもよい炭素数1～4のアルキル基を表す化合物を包含する。炭素数1～4のアルキル基については、 R_1 、 R_2 及び R_3 におけるアルキル基と同義である。また、置換基も R_1 、 R_2 及び R_3 におけるアルキル基の置換基と同義である。

[0024] なお、上記式において、 m が1のとき、 R_{4-1} 、 R_{5-1} 及び R_{6-1} は、それぞれ独立に水素原子又は置換されていてもよい炭素数1～4のアルキル基を表し、 m が2のとき、 R_{4-1} 、 R_{5-1} 及び R_{6-1} 並びに R_{4-2} 、 R_{5-2} 及び R_{6-2} は、それぞれ独立に水素原子又は置換されていてもよい炭素数1～4のアルキル基を表す。さらに、 m が3のとき、 R_{4-1} 、 R_{5-1} 及び R_{6-1} 、 R_{4-2} 、 R_{5-2} 及び R_{6-2} 、並びに R_{4-3} 、 R_{5-3} 及び R_{6-3} は、それぞれ独立に水素原子又は置換されていてもよい炭素数1～4のアルキル基を表す。

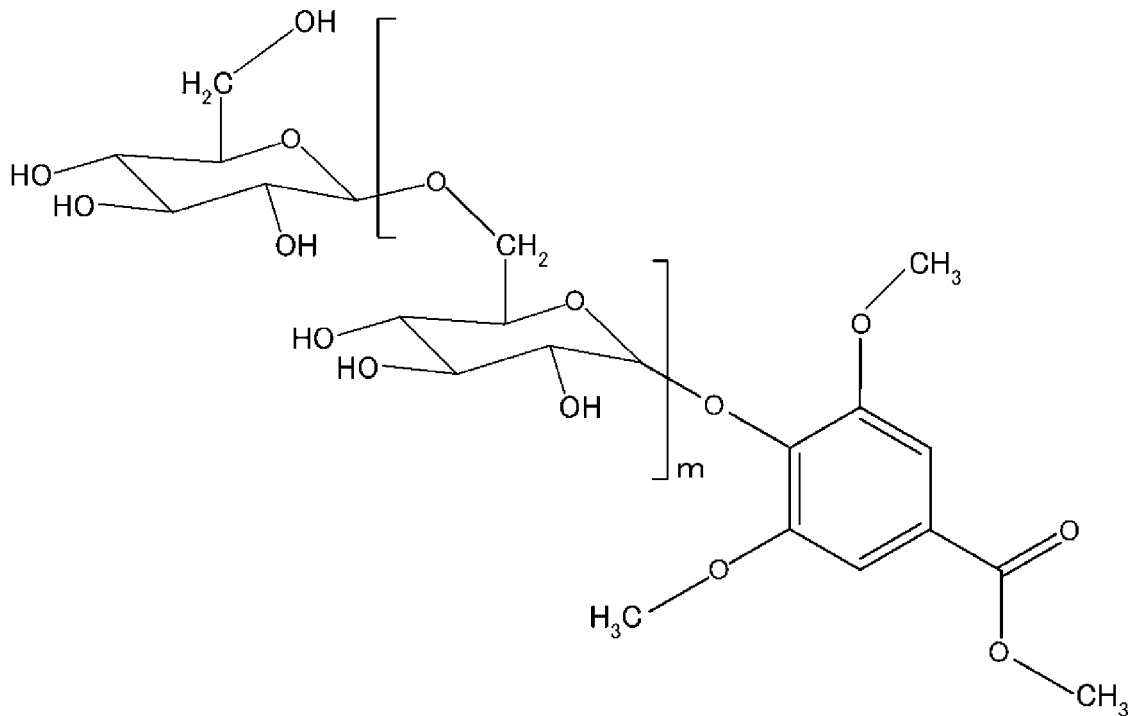
[0025] 本新規配糖体は、 R_{4-m} 、 R_{5-m} 及び R_{6-m} が、水素原子がこれらにおいて優性であることが好ましい。より好ましくは、 R_{4-m} 、 R_{5-m} 及び R_{6-m} のいずれもが水素原子である。

[0026] 本新規配糖体は、上記式中、 R_7 、 R_8 、 R_9 及び R_{10} が、それぞれ独立に水素原子又は置換されていてもよい炭素数1～4のアルキル基を表す化合物を包含する。炭素数1～4のアルキル基については、 R_1 、 R_2 及び R_3 におけるアルキル基と同義である。また、置換基も R_1 、 R_2 及び R_3 におけるアルキル基の置換基と同義である。本新規配糖体は、 R_7 、 R_8 、 R_9 及び R_{10} が、いずれも水素原子であることが好ましい。

[0027] 本新規配糖体の一例として、以下の式で表される化合物（ m は1～3の整数）が挙げられる。典型的には、以下の式において m が1である、Methyl 4-O- [β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranosyl] -3,5-dimethoxyben

zoate (メチル 4-O- [β -D-グルコピラノシル (1-6) - β -D-グルコピラノシル] -3, 5-ジメトキシベンゼン酸) (MGGD) が挙げられる。

[0028] [化4]



(式中、mは1～3の整数を表す。)

[0029] (MPO活性阻害剤)

本発明のMPO活性阻害剤は、本新規配糖体を有効成分とすることができる。本新規配糖体は、MPO阻害活性を有する。本発明者らは、MGGDにつきMPO阻害活性を見出しているが、MSYRについてMPO阻害活性があること及び1-6 β グリコシド結合を切断する酵素の普遍的な存在を考慮すると、MGGDを含む本新規配糖体は、MPO阻害活性を有するかあるはその前駆体であるといえ、新規配糖体はいずれも、MPO阻害活性剤として機能するといえる。

[0030] 本新規配糖体についてMPO阻害活性は、例えば、文献 (Biosci. Biotechnol. Biochem. 2003, 67(5), p1136-1139) に記載の方法で測定することができる。すなわち、L-チロシンを基質とし、リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解し、これに酵素ミエロペルオキシダーゼ、阻害物質候補化合物を加えておき

、これに、過酸化水素を添加して酵素反応を開始させ、15分間、37℃で保温した後、カタラーゼを添加し、残存した過酸化水素を除去することで反応を停止させる。遠心式限外濾過膜により低分子のみ取り出し、逆相HPLC（ODS系のカラムの使用）によりジチロシンに由来する蛍光を励起波長300nm、蛍光波長400nmで検出する。ジチロシンに由来するピークの増減を測定することで、MPO阻害活性の評価が可能となる。

[0031] ミエロペルオキシダーゼ（MPO）は、主として好中球に存在する酵素であって、バクテリア感染における生体防御に深く関わりとされている。MPOは、過酸化水素とハロゲンの共存下で、次亜塩素酸や次亜臭素酸といった強力な活性種を生成することで、生体内に侵入した微生物を排除することが報告されている。また、MPOはアテローム性動脈硬化病変、肺がん、アルツハイマー、多発性硬化症と関連することも報告されている。さらに、MPOは、アテローム性動脈硬化病変部位に存在し、炎症と心血管疾患の発症メカニズムに関わっていることが報告されている。したがって、MPO阻害活性は、抗炎症作用や例示した疾患を含む各種疾患に関連（予防、治療等）するといえる。MPO阻害活性を有する化合物に抗炎症作用を期待できる。

[0032] マヌカ蜂蜜に由来してMSYR（メチルシリリングート）もMPO阻害活性があることが既に報告されている。MSYRは、MGGDと同時にマヌカ蜂蜜から分取できる。これらの双方を含むMPO活性阻害剤は、有用である。

[0033] （蜂蜜の評価用マーカー、キット及び蜂蜜の評価方法）

（蜂蜜の評価用マーカー）

本明細書に開示される蜂蜜の評価用マーカー（以下、単に本マーカーともいう。）は、本新規配糖体を含んでいる。本新規配糖体は、マヌカ蜂蜜の生理活性等の既知の評価指標であるUMFと相関している。すなわち、UMFが高値であるマヌカ蜂蜜は、本新規配糖体も高値である。したがって、本新規配糖体を指標とすることで、UMFの評価が可能となる。なお、本発明者らによれば、本新規配糖体は、いわゆるマヌカ蜂蜜の他にはほとんど見出されていない。マヌカ蜂蜜は、ニュージーランドにのみ生息するマヌカ（*Lepto*

spermum scoparium) やこの亜種 (Leptospermum polygalifolium) 以外に由来する蜂蜜においては、ニュージーランド産の蜂蜜に微量に存在する場合があるのみである。したがって、本新規配糖体の含有の有無及びその量を測定することにより、蜂蜜の生理活性、品質等を評価することができる。また、マヌカ蜂蜜か否かの判定のほか、新たに本新規配糖体を含む蜂蜜をスクリーニングするのにも用いることができる。

[0034] 本マーカーは、本新規配糖体が特に抗菌活性の指標であるUMFと相関することから、抗菌活性評価用として用いることができる。また、本マーカーは、本新規配糖体がMPO阻害活性を有することから、蜂蜜のMPO阻害活性に代表される抗炎症活性評価用として用いることもできる。

[0035] 本新規配糖体をマーカーとして用いるには、蜂蜜から本新規配糖体を分離し、本新規配糖体を同定又は定量する。蜂蜜からの本新規配糖体の分離ないし同定、定量については、後段にて説明する。本新規配糖体を同定するには、実施例等を開示する公知の分析装置を用いた方法を適用できるほか、標準物質として本新規配糖体を準備して、クロマトグラフィー等を用いて対比してもよい。本新規配糖体の定量にも各種方法が適用できる。なお、MSYRもマーカーとして用いる場合においても、MSYRは、本新規配糖体と同様の態様で分離、同定、定量が可能である。

[0036] (評価用キット)

本明細書に開示される蜂蜜の評価用キットは、本新規配糖体と、メチルシリリングートと、を含むことができる。本発明者は、メチルシリリングート(MSYR)量が、マヌカ蜂蜜のUMFと逆相関していることも見出した。したがって、UMFと相関する本新規配糖体とUMFと逆相関するMSYRとを組み合わせることで、より特異性の高い評価が可能となる。

[0037] (蜂蜜の評価方法)

本明細書に開示される蜂蜜の評価方法は、蜂蜜中の本新規配糖体を同定又は本新規配糖体の量を測定する工程を、備えることができる。上記したように、本新規配糖体は、蜂蜜の生理活性の評価用として有用であるからである

。また、MSYRを同定又はその量を測定する工程を備えていてもよい。より特異性の高い評価が可能になるからである。本評価方法は蜂蜜の抗菌活性や抗炎症活性などの生理活性を評価できる。

[0038] (本新規配糖体の製造方法)

本新規配糖体の製造方法は、マヌカ又はその亜種に属する植物体を蜜採取植物とする蜂蜜の水溶性溶液を水・低級アルコール混液で溶出される画分を回収する第1のクロマトグラフィー工程を備えることができる。本製造方法によれば、容易に、本化合物を得ることができる。

[0039] (第1のクロマトグラフィー工程)

水・低級アルコール混液において、水は、酸性液であってもよい。酸は、酢酸やギ酸、トリフルオロ酢酸などの有機酸及び無機酸であってもよい。また、水は、酸アンモニウム、酢酸アンモニウムなどの塩を含んでいてもよい。低級アルコールは、水と相溶するアルコールであることが好ましく、具体的には、炭素数1～4の直鎖及び分枝アルコールを用いることができる。メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール、n-ブタノール、2-ブタノール、tert-ブタノールが挙げられる。

[0040] 第1のクロマトグラフィー工程におけるクロマトグラフィーの形態は特に限定しない。カラム状のクロマトグラフィーに限定しないで各種形態を採用する。また分離用材としては、一般的に低分子化合物を分画できる担体を用いることができる。典型的には、芳香族系及び／又は鎖状炭化水素系の構造を有する疎水性（逆相）の担体を用いることができる。例えば、スチレンージビニルベンゼン系樹脂材料からなる担体を用いることができる。なお、担体は、適当な細孔を有していてもよい。また、その外形形状も特に限定しない。

[0041] 本新規配糖体は、水・低級アルコール混液によって溶出ないし抽出される画分に含まれている。その比率は、担体の種類によっても異なるが、本新規配糖体を水・低級アルコール混液の比率を適宜変更しつつ回収することで、本新規配糖体を溶出等するのに適当な比率を決定できる。また、必要に応じ

て、分離精製が可能であるし、粗分画であっても有利である場合もあるので、粗精製であってもよい。

[0042] 例えば、典型的な疎水性担体（例えば、スチレンージビニルベンゼン系樹脂材料）を用いた場合であって、水とメタノールなどの低級アルコールの経時的な傾斜組成を有する移動相（グラジェント）ないし組成比を段階的に異ならせた移動相による溶出（ステップワイズ）を用いてクロマトグラフィーを行うとき、水・低級アルコール混液の体積比が7：3～4：6の画分に本新規配糖体が分画されやすい。より具体的には、同体積比が7：3～5：5であり、さらに具体的には同体積比が7：3～6：4であり、一層具体的には同体積比が6：4の画分である。

[0043] （第2のクロマトグラフィー工程）

さらに、前記画分を酸性移動相で溶出される画分を回収する第2のクロマトグラフィー工程と、を備えることができる。こうすることで、より純度の高い本新規配糖体を得ることができる。また、本化合物の同定や検出も同時に可能である。

[0044] こうした第2のクロマトグラフィー工程は、逆相液体クロマトグラフィーを用いることが好ましい。担体としては、炭素数が8以上20以下程度のアルキル基を備える逆相担体を用いることが好ましい。また、移動相も担体に応じて適宜設定できるが、配糖体であることから、水を含有する移動相が好ましく、本新規配糖体の構造を考慮すると、酸性の移動相により溶出されやすくなることが推測される。したがって、移動相としては、酸性の水相と有機相との混液あるいはグラジェントが好ましく用いられる。移動相のための水相としては、トリフルオロ酢酸、酢酸、ギ酸などの酢酸酸性の水等が挙げられ、有機相としては、アセトニトリル、メタノール、ブタノール、DMSO、DMF等が挙げられる。

[0045] また、第2のクロマトグラフィー工程は、親水性基を固相に保持しており親水性化合物を保持するように構成された親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）を用いることができる。

[0046] 本新規配糖体を分取するには、溶出される画分につき、本新規配糖体の含有を適当な検出手段を用いて検出し、本新規配糖体含有画分を同定し、必要に応じて、当該画分から本新規配糖体を分離し、必要に応じてさらに精製する。本新規配糖体のような配糖体を、クロマトグラフィーを用いて分画した際の、さらなる精製方法等は当業者において周知である。

[0047] 本新規配糖体の検出手段は特に限定しない。一般的な紫外吸収検出器を用いることができるほか、本新規配糖体の構造に応じた検出手段（例えば、MS等など）を用いることができる。検出波長は特に限定しないが、本新規配糖体に特徴的な波長262nm及びその近傍（±20～50nm程度）を好ましく用いることができる。

[0048] 第2のクロマトグラフィー工程は、高精度で本新規配糖体を検出し、同定し、さらには定量することも可能である。高速液体クロマトグラフィーを用いることにより、溶出画分を、経時的に適当な検出手段で本新規配糖体やMSYRを検出し分取し、標準物質等を用いて同定し、定量することができる。

[0049] 以上の本新規配糖体の製造方法においては、MSYRも蜂蜜から分取できる。第1のクロマトグラフィー工程において、本新規配糖体と同時に、あるいは水・低級アルコール混液の比率を本新規配糖体よりも低級アルコールより多くする、例えば、水・低級アルコール混液の体積比率を6：4から4：6又はそれに近づけていくことにより、本新規配糖体と同時にあるいはよりMSYRを高濃度に分離できる。そして、さらに、本新規配糖体と同様に第2のクロマトグラフィーを適用することで、本新規配糖体が共存していても、MSYRを分離して検出し、同定し、定量することができる。典型的な第2のクロマトグラフィーでは、MSYRは、本新規配糖体と良く分離される。

[0050] なお、第1のクロマトグラフィー工程に蜂蜜の水溶解液を適用するのに先だって、以下の工程を採用することもできる。すなわち、マヌカ又はその亜種に属する植物体を蜜採取植物とする蜂蜜の水溶性溶液から、より親水性の第

1の画分と、新規配糖体を含みより疎水性の第2の画分とを分離する第1の分離工程と、第2の画分から、メチルシリケートを含みより疎水性の第3の画分と新規配糖体を含みより親水性の第4の画分とを第2の分離する工程と、を備える、ようにすることもできる。こうした前処理を行うことで、スケールアップが可能となり、また、後段の第1のクロマトグラフィー工程や第2のクロマトグラフィー工程での分離性等を向上させることができる。さらに、第2のクロマトグラフィー工程を省略あるいはスピード化合物させることができる。

[0051] 第1の分離工程は、第1の画分に蜂蜜水性溶液中の水溶性化合物及び糖分を分離し、第2の画分に本新規配糖体を分離できる。第1の分離工程における手法は特に限定しないで、本新規配糖体と蜂蜜中の糖分やその他の水溶性化合物の極性等を考慮して適宜実施できる。例えば、以下の方法を採用できる。

[0052] 第1の分離工程は、例えば、第1のクロマトグラフィー工程で用いる担体に当該溶解液を適用して実施できる。適用の形態は特に問わないで、カラムクロマトグラフィー形態であってもよいし、適当な容器内で担体と溶解液とを接触混合させてもよい。こうすることで、本新規配糖体やメチルシリケートは、疎水性の担体（第2の画分）に分配されるが、より親水性の水溶性化合物や糖分は水相（第1の画分）に分配される。水相を洗浄・除去することで、担体に本新規配糖体やメチルシリケートを保持させて水溶性化合物及び糖分を効率的に除去できる。なお、水相による水溶性化合物及び糖分の除去は、必要に応じて適回数繰り返される。担体からの本新規配糖体及びメチルシリケートは、担体をメタノールで洗浄溶出することで回収し、これを第2の画分とすることができる。

[0053] 第2の分離工程では、第2の画分から、メチルシリケートを含むより疎水性の第3の画分と本新規配糖体を含むより親水性の第4の画分とを分離する。第2の分離工程における手法は特に限定しないで、本新規配糖体と蜂蜜中の糖分やその他の水溶性化合物の極性等を考慮して適宜実施できる。例え

ば、以下の方法を採用できる。

[0054] 第2の分離工程は、例えば、第2の画分からメタノール等の溶媒を蒸発等により除去し、濃縮したものに、酢酸エチルなどのMSYRを溶解するMSYR親和性溶媒及び水などの当該MSYR親和性溶媒と相溶しないで相分離するとともに本新規配糖体を溶解する本新規配糖体親和性溶媒とを加えて分液ロート等を用いて液液分配を行う。本新規配糖体は水層（第4の画分）に分配されMSYRは酢酸エチル層（第3の画分）に移動するため、これによりMSYRと本新規配糖体の分離を行うことができる。

[0055] なお、MSYR親和性溶媒や本新規配糖体親和性溶媒は、一般的に液液分配に用いられる公知の溶媒から、MSYRと本新規配糖体の溶解性、溶媒の相溶性等を考慮して適宜決定できる。

[0056] これらの分離工程は、第1のクロマトグラフィーに準じたクロマトグラフィーの形態で行ってもよいが、バッチ式に、適当な容器内で行うこともできる。

[0057] なお、第2の分離工程後、第3の画分からMSYRは、適宜疎水性担体を用いた第2のクロマトグラフィー工程に準じたクロマトグラフィー等でさらに分離精製できる。こうすることで、MSYRを回収、検出、定量等することができる。また、第2の分離工程後、本新規配糖体は、第1のクロマトグラフィー工程、必要に応じて第2のクロマトグラフィー工程を実施してさらに分離精製を行うことができる。なお、第4の画分を第1のクロマトグラフィー工程に適用するときには、適宜濃縮してもよい。

[0058] 以上説明した第1の分離工程及び第2の分離工程は、本新規配糖体及び／又はメチルシリリングートを取得するための前処理方法としても独立して実施できる。

[0059] （蜂蜜中の本新規配糖体の測定方法）

本明細書に開示される蜂蜜中の本新規配糖体の測定方法は、蜂蜜の水性溶液をクロマトグラフィーを用いて、酸性移動相で溶出される画分を回収する工程、を備えることができる。本測定方法によれば、本新規配糖体を蜂蜜か

ら簡易に分離して検出同定することができる。本新規配糖体の回収、検出及び定量に関しては、本新規配糖体の第2のクロマトグラフィーに関する内容をそのまま適用することができる。すなわち、酸性移動相を溶出される画分を適用な検出手段を用いることにより検出し定量できる。

[0060] 本新規配糖体は、上記したように、マヌカ及びその亜種を蜜採取植物体とする蜂蜜以外からは見出されていない。このため、本新規配糖体の検出・定量がマヌカ蜂蜜のマーカー、すなわち産地証明や混合比の確認として有用と考えられる。

実施例

[0061] 以下に実施例を挙げて、本明細書の開示について更に詳細に説明を加えるが、本開示が、かかる実施例のみに限定されないことは言うまでもない。

実施例 1

[0062] 市販マヌカ蜂蜜を用いて配糖体を精製した。市販マヌカ蜂蜜（UMF 値が高い製品ほど望ましい）40g を200 ml の水に加え、温めて溶解した。ガラス製オープンカラムに三菱化学のイオン交換樹脂 Diaion Sepabeads HP20 を詰め（膨潤した状態で300 ml 程度を使用）、次いで溶解したマヌカ蜂蜜をカラムに通し、さらに水500 ml を流した。さらに、水／メタノール＝8／2、6／4、4／6、2／8、メタノールのみの溶液をそれぞれ500 ml ずつ流し、水／メタノール＝6／4、4／6 のみを回収して合わせてロータリーエバポレーターにより濃縮し、再度、少量の水メタノール混合液に溶解して以下のHPLC 条件に従い、分取精製を行った。

[0063] HPLC 分取条件

カラム Combi-RP (20×100 mm)

流速 5 ml/min

溶出溶媒 0.1%酢酸／アセトニトリル＝85／15

検出波長 262 nm

[0064] 得られた精製物質を濃縮し、各種機器分析に用いることでMGGDを確認した。マヌカ蜂蜜63.5 g（湿重量）より30 mg 得られ、収率0.047%であった

。

[0065] NMRの結果を図1に示し、FTIRの結果を図2に示す、質量分析の結果を図3及び図4に示す。その他、得られた物質の物性値は以下の通りであった。

$[\alpha]_D = -30.1$ ($c=0.69$, MeOH)

ESI-MS m/z 535 $[M-H]^-$, 分子量 536

λ_{max}

262 nm

[0066] 図1～図4に示す結果から、得られた化合物を、Methyl 4-O- $[\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranosyl]-3,5-dimethoxybenzoate (メチル 4-O- $[\beta$ -D-グルコピラノシル(1-6)- β -D-グルコピラノシル]-3, 5-ジメトキシベンゼン酸) (MGGD) と特定することができた。

実施例 2

[0067] 実施例1で得た新規配糖体MGGD及び市販MSYRを標品として用い、マヌカ蜂蜜に含まれる2種の化合物を定量した。また、MGGDが大量に含まれているとの報告(非特許文献4)があるアスフォデル蜂蜜(イタリアサルディニア島)についても、同様に定量した。さらに、UMFが異なる複数のマヌカ蜂蜜についても、MGGD及びMSYRの各量を定量した。具体的には、以下の通りとした。

[0068] 蜂蜜を量って水に溶解し(約100 mg/ml)、一部(約5 μ l)を紫外吸収検出器(UV 検出器)を備えるHPLCに注入する。分析条件を以下に示す。結果を図5及び図6に示す。

[0069] (HPLC 分析条件)

カラム Develosil ODS-HG-5 (4.6 $\times$ 150 mm)

流速 0.8 ml/min

溶出溶媒 A: 0.1%酢酸、B: アセトニトリル

検出波長 262 nm

[0070] (グラジエント条件)

[表1]

Time. min	A 溶媒%
0	100
30	70
35	100
50	100

[0071] 図5上段のクロマトグラムには、マヌカ蜂蜜の結果を示す。この図に示すように、MGGDとMSYRとは、クロマトグラム上明確に分離することができた。また、図5下段のクロマトグラムには、アスフォデル蜂蜜の結果を示す。配糖体MGGDは基本骨格にMSYRを有していることから、MSYRが大量に含まれているアスフォデル蜂蜜には、MGGDが全く含まれていないことがわかった。したがって、MGGDはマヌカ蜂蜜に特異性が高く、その生理活性と強く結びついていることがわかった。また、MSYRが大量に含まれているからといってMGGDも同様に含まれていることは必ずしもいえないことがわかった。

[0072] さらに、UMFの異なるマヌカ蜂蜜についてのMGGDとMSYRについて測定した結果を図6に示す。図6に示すように、MGGDの含量とUMF値との間に高い相関性が認められた。その一方、MSYRの量とUMF値とは、逆相関であった。

実施例 3

[0073] MGGDは、MSYRにゲンチオビオースという二糖が結合したものであるが、単糖が結合したMSYRの存在が、アニスシードにおいて報告されている（非特許文献5）。このため、アニスシードにもMGGDが含まれている可能性が有る。そこで、マヌカ蜂蜜とアニスシードについて、LC/MS/MS 質

量分析器を用いてMGGDについて測定を行った。分析条件は以下の通りとした。結果を図7に示す。

[0074] (LC/MS/MS 分析条件)

質量分析器

API3000

カラム Develosil ODS-HG-5 (2×150 nm)

流速 0.2 ml/min

溶出溶媒 A: 0.1%酢酸、B: アセトニトリル

インジェクション5 μ l

モード: Negative electrospray ionization, Multiple Reaction Monitoring
535.1/211.1

[0075] (グラジエント条件)

[表2]

Time. min	A 溶媒 (%)
0	100
18	70
18.4	100
30	100

[0076] 図7に示すように、LC/MS/MS 質量分析器を用いた高感度解析において、マヌカ蜂蜜には、MGGDを検出できたが、アニスシードには、全く見つけることが出来なかった。以上のことから、MGGDはマヌカ蜂蜜に特異性が高く、その生理活性と強く結びついていることがわかった。また、MSYRが大量に含まれているからといってMGGDも同様に含まれていることは必ずしもいえないことがわかった。

[0077] なお、マヌカ蜂蜜については、LC/MSにおいては、MSYRの3配糖体及び

4 配糖体にそれぞれ対応する分子量 697.2 及び 859.2 のピークを確認した。したがって、マヌカ蜂蜜には、MSYR の 2 配糖体である MGGD ほか、同 3 配糖体及び 4 配糖体が含まれることがわかった。なお、他のマヌカ蜂蜜についても調べたところ、3 配糖体及び 4 配糖体は、2 配糖体に比べて少なくマヌカ蜂蜜によっては検出できないかあるいは含まれていない場合もあることもわかった。

実施例 4

[0078] 単離した MGGD 及びそのアグリコンである MSYR について、MPO 阻害活性を測定した。測定法はビオチン標識したタンパク質（ウシ血清アルブミン）のチロシン残基のハロゲン化の阻害を評価するものであり、MPO 酵素そのものの阻害活性、あるいは酵素から生じる次亜臭素酸（HOBr）などの活性種の消去・捕捉能を測定することができる。

[0079] 反応に必要な溶液等は、以下のように調製した。

（１）ヒト由来 MPO は、0.5 μ M とした。

（２）キサンチンオキシダーゼ（XOD）（Sigma X4500-25UN）は水で 100 倍希釈して使用した。

（３）アセトアルデヒド（ALD）（Merck A4907704 746）は 5.61 μ l を 1 ml の水に溶かして 100 mM とした。

（４）Biotin-BSA（Sigma A6043-10MG）は、200 μ M NaBr 及び 200 mM NaCl を予め加えた 0.1 M リン酸緩衝液に対し 1 mg / ml となるように溶かし、それを冷凍保存したものを、使用前に 0.4 mg / ml に希釈した。

（５）試料は、5 mM となるように調製した。

（６）陽性コントロールとして、還元型グルタチオン（GSH）（Sigma G-6529）を使用した。（７）L-メチオニンは、水に溶かし、10 mM に調製した。

[0080] 反応は、エッペン管に、Biotin-BSA 50 μ l 及び試料、MPO 及び XOD をそれぞれ 10 μ l ずつ加えて、水を加えて全量を 100 μ l とし、ALD

を $10\mu\text{l}$ 加えることで開始した。コントロールとして試料を加えないものを準備し、同様に反応を開始した。 37°C で30分間反応させた後、マイクロスピナラム (BioRad) に反応液 $75\mu\text{l}$ を加えて、 1000g で4分間遠心することにより、Biotin-BSAを回収し、上清には、L-メチオニン $75\mu\text{l}$ を加えて反応を停止させた。

[0081] マイクロプレートに一次抗体として、ジハロゲン化チロシンを認識する3A5抗体 (日研ザイル社) $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を $50\mu\text{l}$ ずつコーティングし、 4°C で一晩静置した。 0.05% Tween20含有PBS (TPBS) で3回洗浄し、水に溶かした $200\mu\text{l}$ の 1% スキムミルク水溶液 (ブロックエース粉末、雪印株式会社) でブロッキングした。 37°C で30分間放置した後洗浄し、試料 (回収したBiotin-BSA) をTPBSで5倍希釈後、その $100\mu\text{l}$ を加えて、 37°C で45分間静置した。その後、洗浄し、二次抗体として、Streptavidin-Ultraselective, Polymer (HRP) (Sigma) をTPBSで7500倍希釈して $100\mu\text{l}$ を加えた。その後、再度 37°C で45分間静置し、洗浄後TMB ($3,3'$ - $5,5'$ -tetramethylbentidine) 発色試薬 (A液/B液 = $1/1$) $100\mu\text{l}$ を加え、約10分マイクロプレートリーダーで 450nm / 550nm における吸光度を測定した。結果を図9に示す。

[0082] 図9に示すように、抗酸化物質を加えなかった対照 (no Anti) の発色 (ハロゲン化チロシンの生成量) に比べてMGGDにMPO酵素阻害能があることがわかった。

実施例 5

[0083] 本実施例では、市販のマヌカ蜂蜜からMSYR及びMGGDの精製を行った。まず市販マヌカ蜂蜜 500g に水 500ml を加えて、よく攪拌した蜂蜜液を、実施例1で用いたHP20樹脂 400ml (水で膨潤) とよく混合後、ブフナー漏斗に入れて水で良く洗浄した。その後、メタノールをブフナー漏斗内のHP20樹脂に供給して、メタノール溶出液を採取した。メタノール溶出液を乾固させた。乾固物を、水 50ml に溶解して分液漏斗に移して、分液漏斗内に酢酸エチル・水混液 ($1:1$) (体積比) 100ml とな

るように、分液漏斗に酢酸エチルと水と加えてよく混合し、酢酸エチル層を捨て、さらに、酢酸エチル50mlを加えて、同様によく混合して酢酸エチル層を捨てるこぶとを2回繰り返した。酢酸エチル層には、MSYRがよく分配されていることをクロマトグラフィーで確認した。また、水層には、MGGDが分配されていることも確認した。なお、HPLC条件は、以下の通りとした。

(HPLC分析条件)

カラム: Chromolith HR (4.6×100mm)

流速: 1.0ml/min

溶出溶媒: A: 0.1%ギ酸、B: アセトニトリル

検出波長: 262nm

プログラム: 0min, A90%, 10min, A70%, 11min, A90%, 20min, A90%

[0084] 次いで、分液漏斗内の水層を遠心エバポレーターにより濃縮後、HP20樹脂を充填したオープンカラムに適用し、水及び水・メタノール混液(8:2)で洗浄後、水・メタノール混液(1:1)でMGGDを溶出させて回収した回収液に、MGGDがよく分配されていることをクロマトグラフィーで確認した。なお、HPLC条件は、以下の通りとした。

(HPLC分析条件)

カラム: Chromolith HR (4.6×100mm)

流速: 1.0ml/min

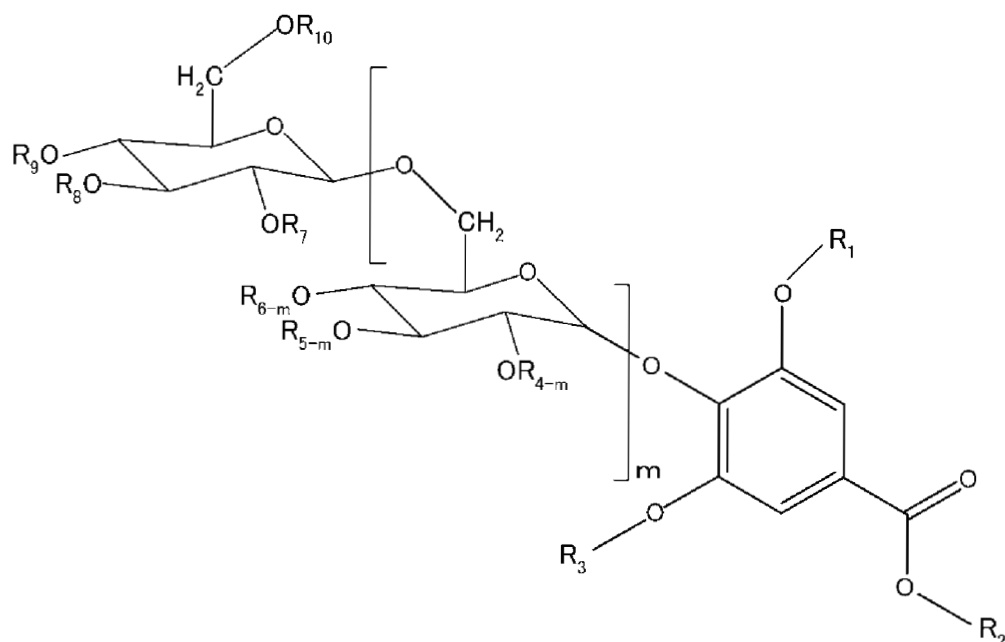
溶出溶媒: 0.1%ギ酸・アセトニトリル(7:3)

検出波長: 262nm

請求の範囲

[請求項1] 以下の式で表される、化合物。

[化5]



(上記式中、 R_1 、 R_2 及び R_3 は、それぞれ独立して水素原子又は炭素数1～4の置換されていてもよいアルキル基を表し、 m は、1～3の整数を表し、 R_{4-m} 、 R_{5-m} 及び R_{6-m} は、それぞれ独立に水素原子又は炭素数1～4の置換されていてもよいアルキル基を表し、 R_7 、 R_8 、 R_9 及び R_{10} は、それぞれ独立して水素原子又は炭素数1～4の置換されていてもよいアルキル基を表す。)

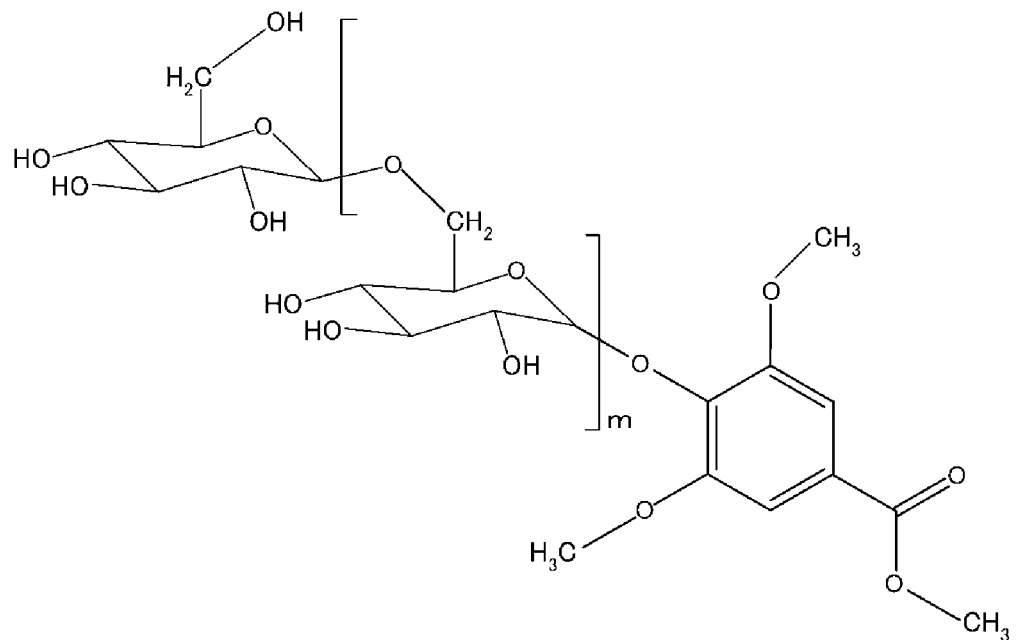
[請求項2] 前記式中、 R_1 、 R_2 及び R_3 は、いずれも水素原子である、請求項1に記載の化合物。

[請求項3] 前記式中、 R_{4-m} 、 R_{5-m} 及び R_{6-m} は、いずれも水素原子である、請求項1又は2に記載の化合物。

[請求項4] 前記式中、 R_7 、 R_8 、 R_9 及び R_{10} は、いずれも水素原子である、請求項1～3のいずれかに記載の化合物。

[請求項5] 以下の式で表される、請求項1～4のいずれかに記載の化合物。

[化6]



(式中、mは1～3の整数を表す。)

- [請求項6] 請求項1～5のいずれかに記載の化合物を有効成分とする、ミエロペルオキシダーゼ活性阻害剤。
- [請求項7] さらに、メチルシリケートを含む、請求項6に記載のミエロペルオキシダーゼ活性阻害剤。
- [請求項8] 請求項1～5のいずれかに記載の化合物を含む、蜂蜜の評価用マーカー。
- [請求項9] 請求項1～5のいずれかに記載の化合物と、
メチルシリケートと、
を含む、蜂蜜評価用マーカーキット。
- [請求項10] 請求項1～5のいずれかに記載の化合物の製造方法であって、
マヌカ又はその亜種に属する植物体を蜜採取植物とする蜂蜜の水性溶液を、水・低級アルコール混液で溶出される画分を回収する第1のクロマトグラフィー工程を、備える。製造方法。
- [請求項11] 前記第1のクロマトグラフィー工程は、スチレンージビニルベンゼン系樹脂材料からなる固相を用いる、請求項10に記載の製造方法。

- [請求項12] 前記第1のクロマトグラフィー工程は、水～低級アルコールの傾斜組成及び段階組成を有する移動相を用いたクロマトグラフィー工程である、請求項10又は11に記載の製造方法。
- [請求項13] さらに、前記画分を酸性移動相で溶出される画分を回収する第2のクロマトグラフィー工程を、備える、請求項10～12のいずれかに記載の製造方法。
- [請求項14] 前記第2のクロマトグラフィー工程は、逆相液体クロマトグラフィー工程である、請求項10～13のいずれかに記載の製造方法。
- [請求項15] さらに、前記第1のクロマトグラフィー工程に先立って、
マヌカ又はその亜種に属する植物体を蜜採取植物とする蜂蜜の水性溶液から、より親水性の第1の画分と、前記化合物を含みより疎水性の第2の画分と、を分離する工程と、
前記第2の画分から、メチルシリリングートを含みより疎水性の第3の画分と前記化合物を含みより親水性の第4の画分とを分離する工程と、
を備える、請求項10～14のいずれかに記載の製造方法。
- [請求項16] マヌカ又はその亜種に属する植物体を蜜採取植物とする蜂蜜から請求項1～5のいずれかに記載の化合物を取得するための処理方法であって、
マヌカ又はその亜種に属する植物体を蜜採取植物とする蜂蜜の水性溶液から、より親水性の第1の画分と、前記化合物を含みより疎水性の第2の画分と、を分離する工程と、
前記第2の画分から、メチルシリリングートを含みより疎水性の第3の画分と前記化合物を含みより親水性の第4の画分とを分離する工程と、
を備える、方法。
- [請求項17] 蜂蜜中の請求項1～5のいずれかに記載の化合物の測定方法であって、

蜂蜜の水溶性溶液を酸性移動相で溶出される画分を回収するクロマトグラフィー工程、
を備える、製造方法。

[請求項18] 蜂蜜中の請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の化合物の量を測定する工程を、備える、蜂蜜の評価方法。

[請求項19] さらに、蜂蜜中のメチルシリケート量を測定する工程を、備える、請求項 18 に記載の評価方法。

[請求項20] 蜂蜜中の抗菌活性及び抗炎症活性から選択される作用を評価する、請求項 18 又は 19 に記載の評価方法。