ピーター・モーラン：国立ワイカト大学生物科学研究所教授・元蜂蜜調査研究所所長

研究

NPA(非過酸化物抗菌作用)とメチルグリオキサール濃度の真の関係性

マヌカハニーの異なるレベルの抗菌作用の関係性には、大きな誤解があります。例えば、NPA 20 は、NPA 10 の 2 倍の非過酸化物抗菌作用を持つと思われていますが、それは間違いです。

その間違いは、検出可能な NPA レベルの最低値が 0 ではなく 8 であることが考慮されていない為に起こります。これは、華氏温度目盛で図る温度と同じ状態です。
摂氏温度目盛は 0℃から始まるので、100℃は単純に 50℃の 2 倍の温かさですが、華氏温度目盛は 0°F ではなく 32°F から始まる(Figure1 参照)為、100°F(38℃)は単純に 50°F(10℃)の 2 倍の温かさではありません。

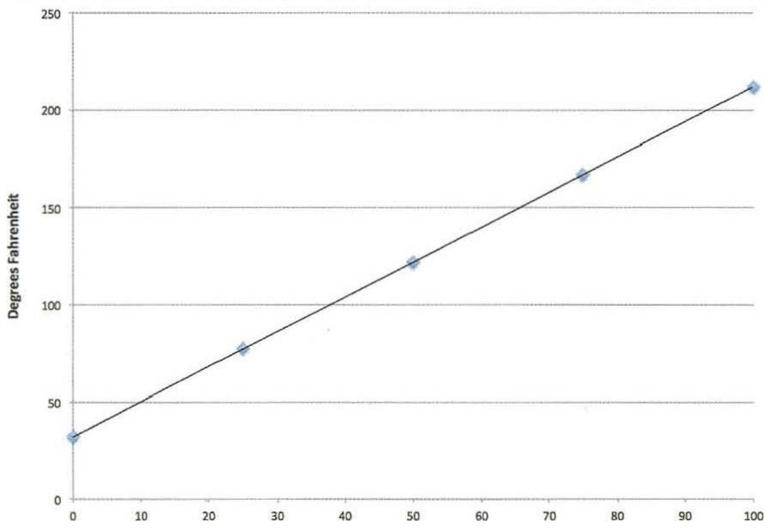

Figure1 華氏温度と摂氏温度で測定する温度の関係性のグラフ

わたしは、はちみつ産業をよく知らないある人物に、希望する NPA レベルの得る為に、はちみつの調合を計算したい場合、NPA(非過酸化物抗菌作用)かメチルグリオキサール、どちらの割合に従って調合するべきかという単純な質問をされました。直観的に、わたしは他の製品のケースと同様に活性成分(この場合はメチルグリオキサール)に従って調合するように言いましたが、その方法では、希望する抗菌レベルのマヌカハニーを得られないことを知りました。それから、なぜそうなるのかを調べる為に考え始めました。

問題の一部は、NPA 評価が抗菌作用の直接的な測定方法ではないことです。その数値は、はちみつのサンプルが検査方法の中で示した抗菌作用と同じ抗菌レベルを持つ参照基準の消毒薬(フェノール)濃度(%)で表しています。

独自の研究で開発されたこの検査方法は、はちみつの抗菌作用をどのように他の抗菌物質と比較するかを示す最良の方法でした。
しかし、華氏温度目盛が 0℃ではなく 32°Fから始まり、使用される検査方法のフェノールの抗菌レベルは 0 ではなく 8 から始まります。全ての抗菌物質は、それぞれに”最小阻止濃度”があり、それ以下の濃度は細菌に影響しませんが、フェノールは 7%かそれ以下の濃度では検査で抗菌レベルは測定できません。NPA 評価は、それぞれのはちみつの抗菌レベルより高いか低いかを示し、それらの関係性は正比例ではありません。100°F(38℃)が実際 50°F(10℃)の 2 倍ではなく 4 倍の温かさなのですが、それはそれぞれの数値を見る前に、華氏温度目盛の始まりの温度である 32°Fを引かなくてはならないからです。(すなわち、100° -32° =68° と 50° -32° =18° を比較する)NPA 30 のはちみつは、NPA 15 のはちみつの 2 倍の抗菌レベルではなく、3 倍を少し超える抗菌レベルと同じです。(すなわち、30-8=22 と 15-8=7 を比較)この考えは、活性成分であるメチルグリオキサールの割合にも当てはまります。(すなわち、1,600 mg/kg は、500 mg/kg の 3 倍を少し超える大きさである) よって、メチルグリオキサールの濃度は、消費者が市販のマヌカハニーの抗菌レベルの関係性を確認するのに、NPA 評価より優れた指標になります。

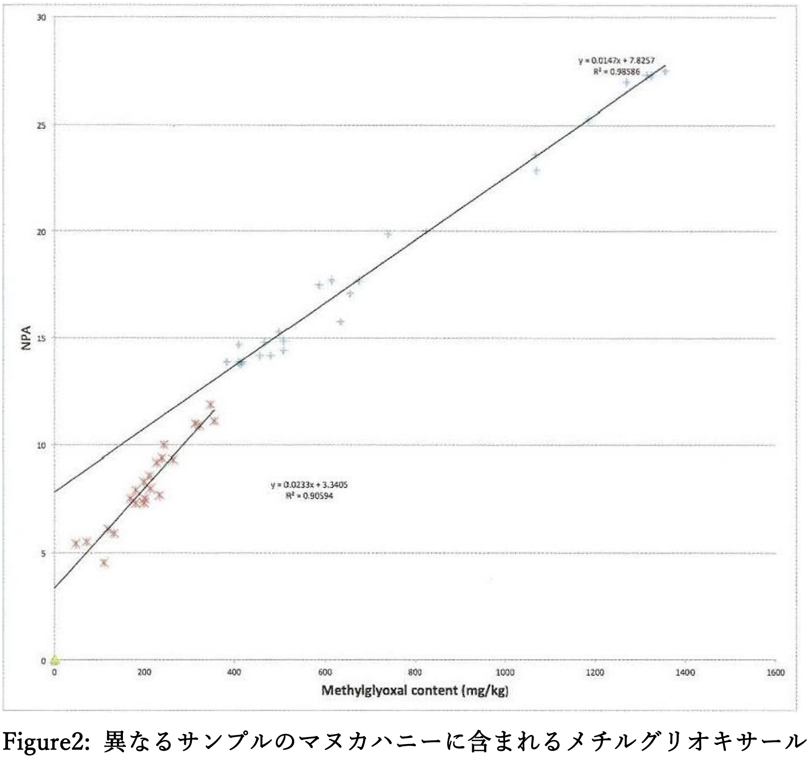

Figure2: 異なるサンプルのマヌカハニーに含まれるメチルグリオキサールと NPA(非過酸化物抗菌作用)

の相関性を示すグラフ(The data is from Adams, C. I, et al. (2008), Carbohydrate Research, 343(4): 651-659, corrected in accordance with the Erratum by Adams, C. 1., et al. (2009), Carbohydrate Research,

メチルグリオキサール評価も 0 から始まりませんが、標準検査方法を使い実験室で測定したときの最小阻止濃度は低いものでした(約 50mg/kg)この数値を引くことは 1,000mg/kg 以上の数値を測定する際、数値の割合に殆ど影響がありません。

別の問題の一つは、NPA(非過酸化物抗菌作用)とメチルグリオキサール濃度の相関性のグラフがカーブしており、直線ではないと考えられていることです。(例として Figure3 参照)わたしが初めにワイカト大学の化学学部の同僚が作成したこのグラフを見たとき、データの値を 2 つの別の直線で示し、全ての値を合わせて曲線にするべきではないと意見を言いました。(Figure2 参照)NPA 評価が 0 から始まらないという現在の認識は、グラフが 2 つの別の直線にするべきという考えを明確にしました。

高い NPA レベルは、正式に公表された方法(Alien, Molan, & Rerd, 1991)ではちみつを分析することにより得られ、これが国際的に使われるデファクトスタンダード(標準)になりました。この方法では、はちみつは、正確な測定の為の最適な活動水準を得る為に 25%濃度に薄められます。この方法で測定できる一番低い抗菌レベルは 8%濃度のフェノール同等の抗菌レベルですが、通常、はちみつのサンプルは NPA11 以下の濃度では、細菌の成長を一部しか阻止できないので、その抗菌レベルは測定できません。1 部しか阻止できないそれらの抗菌レベルや NPA 8 以下の低い抗菌レベルを測定する為には、検査プレートで高い抗菌作用を持たせる為に更に濃い濃度のはちみつで検査する必要があります。
これらは 50%濃度のはちみつ溶液により測定でき、検出可能最小値が 4%濃度のフェノールと同等のレベルになります。これは、50%濃度のはちみつによる検査レベルは、標準分析方法と同じ NPA 8 ではなく NPA 4 から始まるということです。これは、Figure 2 ではっきりと確認でき、メチルグリオキサール(約 50mg/kg)が持つ一番低い抗菌レベルは、標準分析方法の 25%濃度のはちみつ溶液で測定された高い抗菌レベルのデータでは 8%濃度のフェノールと同等のレベルで、50%濃度のはちみつ溶液で測定された低い抗菌レベルのデータでは 4%濃度のフェノールと同等レベルいうことです。

相関性のグラフの各データに一致する線が曲線ではなく、直線になるべき別の理由は、メチルグリオキサールとフェノールどちらも、それぞれの抗菌作用との関係が直線である為、メチルグリオキサールとフェノールの関係性も直線になるはずであるからです。試験用の寒天ゲル拡散法による発育阻止円の大きさは、抗細菌作用の直接的な測定方法です。(すなわち、参照した標準分析方法とは関係ありません;それは抗細菌作用のレベルに直接比例しています)これは、すべての抗菌物質に適用できる原理です。何種類かの抗菌物質の抗菌作用は上昇曲線か下降曲線になるかもしれませんが、わたしたちが行ったたくさんの分析から無作為に選んだ発育阻止円の大きさの調査によると、広範囲の抗菌レベルにおいてフェノ

ールとメチルグリオキサール両方が完全な直線を示します。

メチルグリオキサールと NPA の相関性のグラフが曲線でないという確定は、商業的に実施されたメチルグリオキサールの分析による NPA レベルの評価が、間違った結果を出したということを意味しています。NPA の抗菌作用は、NPA 15 以下で著しく低いです。これより上のレベルで、曲線と直線がグラフ上でほぼ重なります。これらの値の不一致は、特に同じ測定方法を使用せずに出された NPA 8 以下のデータで顕著です。（すなわち、50%濃度のはちみつ溶液を使って測定されたデータ）

また、低いレベルの抗菌作用を測定する為に 2 倍の濃度のはちみつ溶液(すなわち、標準の25%ではなく 50%を使用)により試験したとき、得られた結果の抗菌作用は 2 倍ではなく、おおよその正確な値を得る為に調整因子が使用されている為、この範囲には大きな誤りがあります。しかし、無作為に集めた 25%と 50%両方の溶液のマヌカハニーのサンプルの分析により、各サンプルによって調整因子が全く異なることを見つけました。

他に考えられるのは、標準分析方法(25%溶液で検査)が国際的に認められた分析方法であるのに対し、50%濃度の溶液での検査が、確立された実施要項もないその場しのぎの方法だからです。（その分析方法は、単純に生産者に、低いレベルのはちみつは高いレベルのはちみつと混合する為に保管する価値があるのか、または、保管することで 8 より高いレベルの抗菌作用になるのかを示す為に作成され、決してはちみつを売る為の評価に使う目的ではありません。）

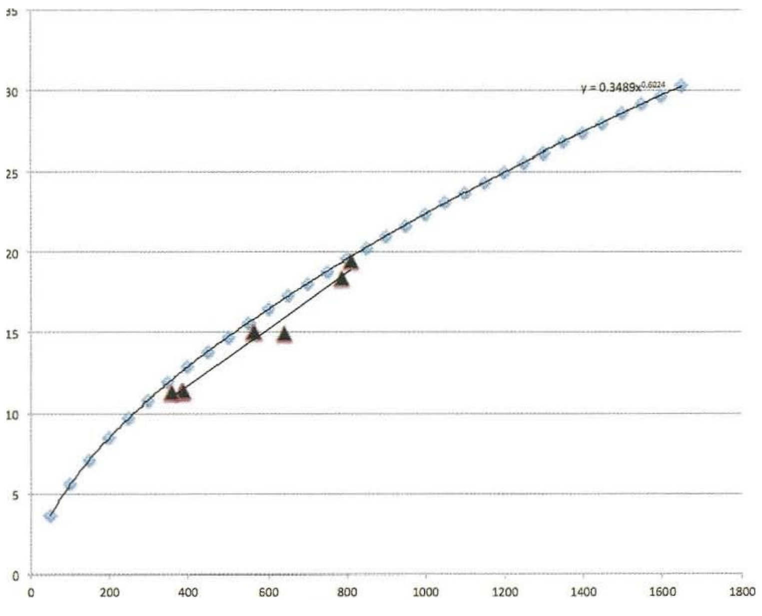

Figure3: マヌカハニーに含まれるメチルグリオキサールと NPA(非過酸化物抗菌作用)の相関性を曲線で示したグラフ。 このグラフは UMFHA＊のウェブサイトに最近まで載せてあったメチルグリオキサールと NPA を変換する為に計算機により出されたデータを描いたグラフ。この計算機は Adams et al. (2008)により発表された散乱したデータを Figure2 で示されるように修正してから合わせて滑らかな曲線にしたものを基にしている。重ねられた(▲マークのついた)線は、”Global Proficiency” により 2013 年から 2014 年に行われた実験室間での比較演習により得られた結果の平均値

（UMFHA＊は UMF はちみつ協会

緑と紫のハイライト部分は重要関連部分

広く使用されている全ての値を集合させた相関性の評価は、いずれにしても間違っていると思われます。Figure3 は、Figure2 に示される Adams らにより得られた正しい結果をもとにした相関性の曲線です。Figure3 に重ねて載せられた結果(▲マークの)は、”Global Proficiency” によって実験室間での比較演習の為に送られたはちみつの標準セットの NPA とメチルグリオキサールの含有量の分析をした様々な国の試験機関により提供された値の平均値です。

［編集者メモ：Global Proficiency のウェブサイトは、Global Proficiency が”熟練された検査、参照試料、および関連サービスの専門的プロバイダーである“と述べています。］

Figure3 の相関性の曲線の示す NPA の値は、実験室間での比較演習(▲マークの)の一致するメチルグリオキサールレベルより約 2 レベル (2%濃度のフェノールと同等)高いことが分かります。過去 2、3 年で、信頼性を上げる為にメチルグリオキサールの分析に変化があったことは、驚くべきことではありません。わたしの意見は、はちみつ産業が、10 より上の広い範囲の NPA レベルのハチミツを使った新しい相関性のグラフを提供する為に、証明された信頼できる方法でメチルグリオキサール分析を実施する、”Global Proficiency”やはちみつ製品基準協議会(BPSC)のような独立した組織を頼るべきだということです。

“The New Zealand BeeKeeper” (Molan, 2008)に載ったわたしの書いた記事の中で、わたしは直線上の NPA レベルが対応するメチルグリオキサールの抗菌作用より約 8 レベル(8%濃度のフェノール同等)高い抗菌作用になるのは、単独では抗菌作用を持たないが、メチルグリオキサールの作用を促進する相乗剤がマヌカハニーの中に存在するからという仮説を立てました。

わたしはメチルグリオキサールが不安定な物質ということにそのころ気が付いておらず、そのよりこの誤った考えを導いていました。その記事にわたしが載せたグラフは、水に溶かしたメチルグリオキサール (すなわち、はちみつの中のではない)は、同じ濃度のメチルグリオキサールであっても、はちみつの中にメチルグリオキサールよりかなり低い抗菌作用

であることを示しました。後に、わたしが使用した試薬の溶液中の実際のメチルグリオキサールの濃度は、ラベルに示されたグレードよりかなり低かったことを見つけました。（使用された参照標準の中身を分解するメチルグリオキサールの不安定さを考慮できなかったことが、実験室間での比較演習の為の初めのいくつかのメチルグリオキサールの分析で一貫性のある結果を出せなかった原因です。）

わたしはまた、異なる濃度のはちみつに、様々な量のメチルグリオキサールを加えその後の実験を行った結果により、更なる誤った考えに導かれました。実際に追加したメチルグリオキサールの量は思っていたよりもかなり少ないことに気が付かず、わたしはそれらの結果を誤って解釈していました。わたしは、追加したメチルグリオキサールが Figure2 で示されたグラフのラインまで NPA が上昇することを期待しましたが、そうはなりませんでした。代わりに、メチルグリオキサールを追加したどのレベルでも、NPA はゆっくり上昇しました。わたしは、メチルグリオキサールを加えた異なる抗菌レベルのはちみつの中に、異なる量の相乗剤が存在する為だと仮説を立てました。高い NPA レベルのはちみつは、はちみつに含まれるマヌカハニーの花蜜の割合が高いので、相乗剤の量も多いという間違った見方をしました。

わたしたちはその後、新しく購入したメチルグリオキサールを使用して、はちみつサンプルに含まれるメチルグリオキサールの量を分析すると同時に、同じ分析機関の分析により購入したメチルグリオキサールの濃度を検証し、実験を繰り返しました。この実験で、メチルグリオキサールの持つ抗菌作用から予測できる通りに、はちみつの NPA レベルがゆっくりと上昇しました。これらの結果は Figure4 に示されています。それぞれのはちみつサンプルのグラフは、相関性の曲線グラフに一致していませんが、それらは、より正しい結果を示す”Global Proficiency”の実験室間での比較演習により得られた相関性の値を示す Figure 3 で示されたラインの位置に近いです。

はちみつの中ではなく、水の中に異なる濃度のメチルグリオキサールを加えたときの方がより低い NPA レベルの結果を示すことが Figure 4 のグラフから読み取れ、はちみつに含まれる相乗作用を起こす物質の存在を確認できます。他の研究者たちも、メチルグリオキサールは、水の中よりもはちみつの中で高い抗菌作用を示すことを報告しています。
わたしたちはこの差が起きる理由を寒天平板ではなく栄養培養液内でメチルグリオキサールの細菌の最小阻止濃度を測定する実験を行った際に見つけました。メチルグリオキサールが培養液に接触する時間によって、結果がかなり変化しました。

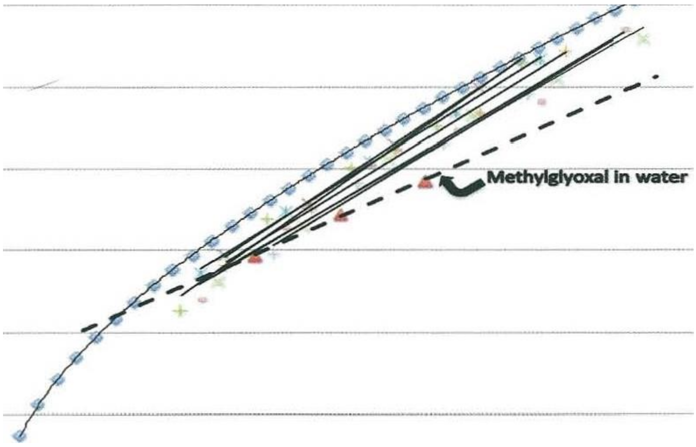

Figure4: 無作為に選んだ異なる濃度のメチルグリオキサールを含む7つのマヌカハニーのサンプルに様々な量のメチルグリオキサールを追加して得たメチルグリオキサールとNPA(非過酸化物抗菌作用)のレベルを表すグラフ。重なっている曲線は Figure3 の相関曲線からのコピー。また、点線は、はちみつではなく水に様々なレベルのメチルグリオキサールを追加して得られた結果。

メチルグリオキサールは終末糖化産物(AGEs)として知られる付加化合物を形成する為にプロテインとペプチドと反応する反応性化学物質です。細菌培養液の中のペプチドと反応することで、メチルグリオキサールの濃度が減少します。(寒天ゲル拡散法では、新鮮な液体は栄養培地に作った穴から常に発散される為にメチルグリオキサールが栄養培地に接触する時間が短くなります。)

抗酸化物質がメチルグリオキサールから終末糖化産物(AGEs)が形成されるのを防ぐことはよく知られています。はちみつの中の抗酸化物質は、メチルグリオキサールを保存する為にこの方法で働きます。一定範囲のはちみつにメチルグリオキサールを加えて得た Figure4 の直線が、違いは大きくないですが、全く同じ値にならないのは、様々なはちみつサンプルの抗酸化物質の量が異なることで説明できます。

わたしたちは、マヌカ以外の様々なタイプのはちみつを調査し、全てのはちみつが抗酸化物質を含むことから予測できるように、この協力作用を全てのはちみつで見つけました。最も高い協力作用のレベルは、最も低いものより 28%も高いことが分かりました。心にとめておくべき重要なポイントは、抗酸化物質の協力作用が NPA(非過酸化物抗菌作用)を上昇するということは、マヌカハニーの抗菌作用は過酸化水素を除いて分析したときにマヌカハニーに含まれるただ一つの重要な抗菌物質であるメチルグリオキサールによるものであるということです。

NPA 評価は、はちみつの抗菌作用が、それぞれのレベルがより高いか低いかを示しており、

それぞれのレベルの抗菌作用が正比例ということを示してはいません。

結論

わたしの意見は、これまでの全てのポイントを考慮して、産業全体が、第一次産業省(MPI)により独自に提唱されたガイドラインの中にある、メチルグリオキサールの濃度のみを示す方法によりマヌカハニーの抗菌作用を示すのが最良の方法だと思います。
この方法は単純に、抗菌作用はメチルグリオキサールの濃度の割合に比例するということを消費者へ知らせることのみが必要です。

ニュージーランドとオーストラリアでは、販売会社が抗菌作用の言及することは禁止されていますが、わたしのような非営利教育者によって提唱されることは可能です。他の国では、"オーストラリア・ニュージーランド食物基準(ANZFS)"は適用されないので、抗菌作用を言及することは制限されていません。メチルグリオキサールの量による評価は、販売会社が実際のNPAではない紛らわしい数値を使用する問題を乗り越えることができます。(MPIガイドラインは、販売会社が抗菌作用を意味する数値を使用することを認めておらず、NPAは使用できません)それは、実際の NPA レベルより高いレベルの数値を示すことにより、消費者を誤解させる販売会社の自由を抑制できます。
更に、消費者が、メチルグリオキサールのレベルが800から1200で売られているマヌカハニーに対しての"MGO80"のはちみつの実際の価値を理解することができます。そして、マヌカハニーのメチルグリオキサールの評価することは、NPA 5 (83 mg/kg methyl glyoxal)のはちみつがNPA 20 (830 mg/kg methylglyoxal)の十分の一の抗菌作用しかないことを消費者に理解させることができます。

謝辞

この記事に記載された実験の実施の為の研究アシスタントとしてStacey Meyerを雇うことを許可する為の資金を提供して下さったWatson & Sonに感謝します。また、NPAとメチルグリオキサールの関係性について考えるきっかけになった配合に関する明敏な質問をしてくれたBrenda Tahiにも感謝します。Stacey MeyerとKerry Alienにより実施された熟練された実験研究を有難く承認します。

参照

Adams, C. J. Boult, C. H. . Deadman, B J. Farr, J. M., Grainger, M. N. c., Manley-Harris, M.,

et al. (2008). Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (Leptospermum scoparium) honey. Carbohydrate Research, 343(4).651-659.
Adams, C. J, Boult, C. H, Deadman, B. J, Farr. J. M., Grainger, M. N. e, Manley- Harris, M., et al. (2009). Corrigendum to "Isolation by HPLC and characterization of the bioactive fraction of New Zealand manuka (Leptospermum scoparium) honey" [Carbohydr. Res. 343 (2008) 651]. Carbohydrate Research. 344(18), 2609.
Alien, K. L., Molan, P c.. & Reid. G. M. (1991). A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. Journal of Phormacy and Pharmacology, 43, 817-822.
Molan, P (2008, May). An explanation of why the MGO level in manuka honey does not show the antibacterial activity. The New Zeo/andBeeKeeper, /6(4), 11-13.