

## マウスにおけるブラジル産プロポリス エタノール抽出物の抗浮腫効果

N. Paulino, C. E. Okuyama, C. da Silva,  
A. Scremin, M. C. Marcucci, J. B. Calixto

プロポリスはミツバチによって生産される自然の樹脂であり、ウイルス (Debiaggi et al., 1990), 細菌 (Dimov et al., 1992), 真菌 (Crisan et al., 1995) などの感染による病気の治療や、抗腫瘍 (Scheller et al., 1989), 活性酸素除去 (Pascual et al., 1994; Basnet et al., 1997), anti-hyperalgesy (de Campos et al., 1998), 抗炎症 (Ledn et al., 1997; Park et al., 1996) などの効果を期待する, 種々の治療に広く用いられている。

化学的な研究によって, プロポリスには, 広い活性スペクトルを示す複雑な多くの化合物, すなわちフラボノイド類, テルペン類, 桂皮酸類, フェノール酸類, カフェ酸やそれらのエステル類などが混合されていることが明らかになっている (Banskota et al., 1998; Martos et al., 1997; Aga et al., 1994)。

本研究では, マウスにおいてカラギーナン, ヒスタミン, ブラジキニンやプロスタグランジン E2 や F2 $\alpha$  (PG<sub>E2</sub> と PG<sub>F2 $\alpha$</sub> ) によって誘発された浮腫に対する, ブラジル産プロポリスのエタノール抽出物の効果を評価することを目的とした。

### 材料および方法

#### 実験動物

絶食させていないスィスマウスの成体 (体重 18-30g) を実験に用いた。マウスは温度 (21 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C) を制御した環境で飼育し, 食物や水は自由に与え, 午前 6 時から午後 6 時までの間は自然光および電灯を補助光として明るくしていた。マウスは Zimmermann (1983) の実験動物管理要項およびガイドラインにしたがって

実験期間中, 飼育管理された。

#### 実験手順

##### 1) 足の浮腫

今回は, Calixto et al. (1991) の方法を若干改善して行った。トリプロモエタノール (0.12 g/kg) による少量の麻酔下で, スィスマウス (オス) の後肢に浮腫を誘導する物質としてカラギーナン (Cg, 300  $\mu$ g/足), ブラジキニン (BK, 3 nmol/足), プロスタグランジン E2 (PG<sub>E2</sub>, 30 nmol/足), プロスタグランジン F2 $\alpha$  (PG<sub>F2 $\alpha$</sub> , 30 nmol/足), ヒスタミン (50  $\mu$ g/足) を含むリン酸緩衝食塩水 (生理食塩水) (PBS, 組成: NaCl 137, KCl 2.7, リン酸緩衝液 10, 各 mmol/L) を 50 $\mu$ L 注入した。反対側の足には 50 $\mu$ L の生理食塩水を注入し, 対照区として用いた。

浮腫は誘導物質を注入後, 数回体積測定器 (Ugo Basile, Italy) を用いて測定した。実験区と対照区の足の体積の差から浮腫を  $\mu$ L レベルで表示した。BK (ブラジキニン) を用いるすべての実験においては, キナーゼの作用を防ぐために, マウスを 30 分前にカプトプリル (5 mg/kg, 腹腔内) で処理した。ほとんどの実験で, マウスの腹腔を通して, 炎症誘導剤の注入 30 分前に, ブラジル産プロポリスのエタノール抽出物 (P1) (1, 3 または 10 mg/kg), あるいはインドメタシン (10mg/kg) を処理した。対照区には同じ量の生理食塩水を注入した。

##### 2) 耳の浮腫

実験日に, オスメス両方のマウス (18-30g) の体重を測定して平均体重を求め, 個別にアクリル板ケースの中に入れて飼育した (4 $\times$ 4 $\times$ 5

in.). マウスには異なる量のプロポリス (1, 3 または 10 mg/kg, i.p.) を事前に与え (30 分間), 引き続いてカプサイシン (250 $\mu$ g/耳) を片耳の内側および外側の表面に局部的に処理した. もう一方の耳には 20 $\mu$ l の生理食塩水を注入し, 対照区として用いた. カプサイシンの処理後 30 分に, 頸椎脱臼によってマウスを殺し, 耳を金属製のパンチで打ち抜いて 6 mm のディスクを得た. カプサイシンで誘発された浮腫の大きさは, 右耳と左耳の重量 (mg) の差から求めた.

### 薬物と試薬

ブラジル産プロポリスのエタノール抽出物 (P1) はブラジル南部で一般に販売されているもの (Prodapys, Produtos Naturais Ltda, Araranguá, SC, Brasil) を用い, ブラジキニン, プロスタグランジン E2, プロスタグランジン F2 $\alpha$ , ヒスタミン, ラムダカラギーナングレード 5, カプサイシン, カプトプリルと生理食塩水 (PBS-pH 7.6) は Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA から入手した.

### 統計解析

すべてのデータは 6 匹の平均 $\pm$ 標準誤差で表した. 実験グループ間の統計的有意差は一元配置の ANOVA, あるいは Dunnett's post-test あるいは Student's unpaired "t" test を用いて検定を行った. 有意水準は  $P < 0.05$  あるいはそれ以下とした. ID50 値を求められそうなきには最小二乗法によって求め, 幾何平均とその 95%信頼限界で表わした.

### 結果

ブラジル産プロポリスのエタノール抽出物 (P1) (1, 3 または 10 mg/kg) のマウスへの事前 (30 分前) 処理はいくつかの炎症誘発物, すなわちカラギーナン (300 $\mu$ g/片足), BK (3 nmol/片足) または, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (30 nmol/片足) によって誘発された足の浮腫を有意に抑制した (図 1A, B, C). ID<sub>50</sub> 値 (mg/Kg) (95%の限界信頼度) は, カラギーナンでは 0.68 (0.50-

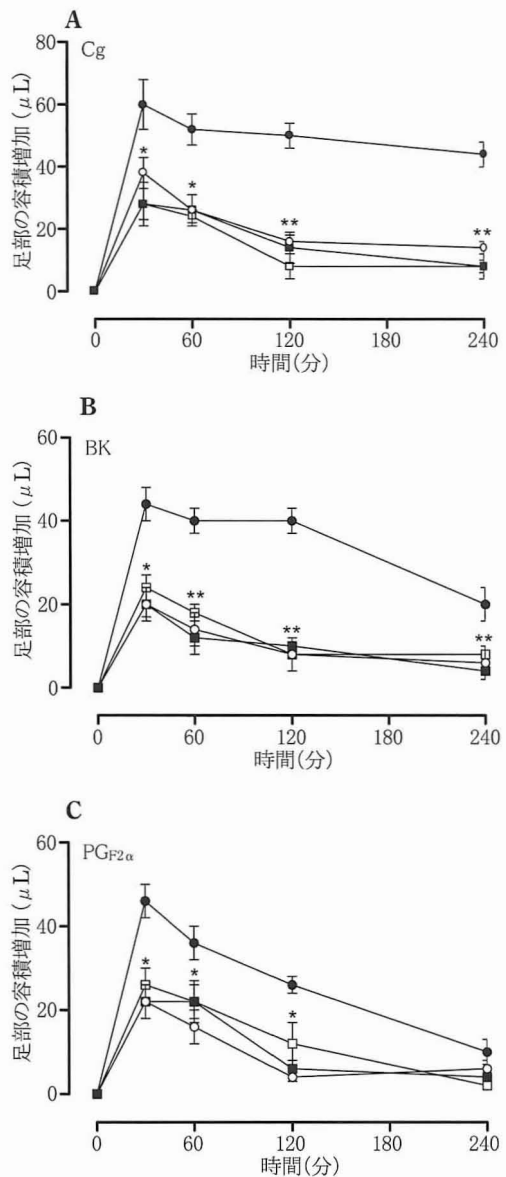


図 1A カラギーナン, B ブラジキニン, C プロスタグランジン F2 $\alpha$  による足の浮腫に対するプロポリスの効果. プロポリス投与区○1mg/kg, ■3mg/kg, □10mg/kg, 対照区●生理食塩水のみ. 各プロットは 6 匹の平均と標準誤差を, \*は対照区に対しての有意差 ( $p < 0.05$ ) を示す.

0.85) (120 分), BK では 0.80 (0.54-1.05) (60 分), PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  では 0.72 (0.27-1.17) (120 分) であった. ブラジル産プロポリスのエタノール抽出物 P1 は PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (30 nmol/片足) あるいはヒスタミン (50 $\mu$ g/片足) による浮腫には抑制効果を示さなかった (図中に結果は示していない).

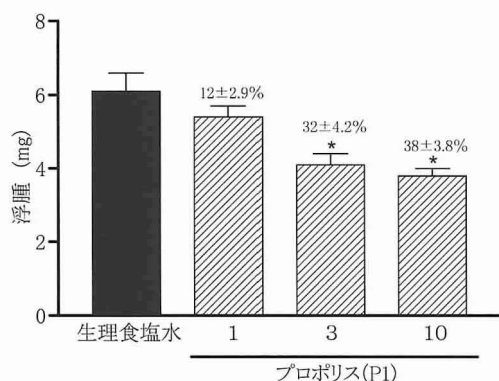


図2 カプサイシンによる耳の浮腫に対するプロポリス (各 mg/kg) の効果。グラフはそれぞれ 6 匹の平均と標準誤差を、エラーバーの上の数字は対照区に対する抑制率の平均と標準誤差、\*は対照区 (生理食塩水) との有意差 ( $p < 0.05$ ) を示す。

ブラジル産プロポリスのエタノール抽出物 P1 (1, 3 or 10 mg/kg) はカプサイシン (250  $\mu\text{g}$ /耳) によって誘発された耳の浮腫を有意 ( $P < 0.05$ ) に抑制した (図 2)。プロポリス量による抑制効果の差があり、投与量 1, 3 または 10 mg/kg で、それぞれ 12 ( $\pm 2.9$ ), 32 ( $\pm 4.2$ ), 38 ( $\pm 3.8$ ) % の抑制となっている。

### 考察

ブラジル産プロポリスのエタノール抽出物を定量的に投与し、いくつかの炎症誘発剤、特に足に処理したプロスタグランジンや、耳に処理したカプサイシンなどによって誘発された浮腫に対して、有意な抗浮腫効果があることが証明された。

この研究の中で使用した濃度範囲のプロポリスエタノール抽出物に、一貫した抗浮腫効果があり、これは、痛覚過敏症や炎症関連化学物質による痛み、あるいは炎症性の痛みモデル (De Campos et al., 1998) に示される痛みの軽減になっていることを証明した。Malmberg and Yaksh (1995) や Doak and Sawynok (1997) は、ホルマリンをマウスの足に皮下注射した場合の浮腫の形成や痛みの生成に、タキキニン類を除く (Santos and Calixto 1997)、キニン類、セロトニン、興奮性アミノ酸類、プロスタノイド類のような炎症関連物質が一定の役割を果たしていることを報告している。それゆ

え、ブラジル産プロポリスのエタノール抽出物に含まれる抗浮腫作用機作は、おそらく、キニンやプロスタノイドの生成や作用におけるいくつかの相互作用の中で働く二次的な抗炎症作用であると考えられる。この仮説は、Mirzoeva and Calder (1996) が報告している、プロポリスのエタノール抽出物およびその中の数種の成分が、生体外でマウスの腹腔マクロファージによるプロスタグランジンやロイコトリエンの生成を抑制することや、生体内でゼイモサン誘導性の急性腹腔内炎症を抑制することによっても支持される。

以前、プロポリスのエタノール抽出物がカリウムチャンネルに対する直接または間接的な活性化を含むいくつかの作用メカニズムによって、分離したモルモットの気管において弛緩薬的な効果を示したことを報告した (Paulino et al., 2002)。これとは別に、カリウムチャンネルの活性化因子が抗炎症効果を誘発することも実証されたている (Lu et al., 1999; Liu et al., 2002)。またプロポリスから単離されたいくつかの化合物は核因子  $\kappa\text{B}$  の化学変成を伴う抗炎症効果を示している (Fitzpatrick et al., 2001)。

プロポリスのエタノール抽出物による、キニン類やプロスタノイド系に敏感な化学物質誘導性の浮腫に対する実験系での抗浮腫性が見られないことから、抽出物がこれらの化学物質と何らかの相互作用を起こすこと、あるいはプロポリスの抗浮腫効果は、プロポリス抽出物が本来持っている抗炎症作用の延長線上にあるものだと示している。

生体内外でプロポリス抽出物を用いたいくつかの研究はこれまでも多くあったが、本研究が、低濃度のプロポリス抽出物を用いて、マウスにおいてブラジキニンやプロスタグランジン  $\text{F}2\alpha$  で誘導した浮腫に対する抗浮腫効果を確認した最初の研究であることはまちがいない。

モルモットの気管の抑制に関連する物質群については今のところ完全にはわかっていない。しかしながら、この効果はフェノール化合物やフラボノイド類の存在に関係しているようであ

る (Marcucci et al 200). 現在, そのような効果を示す化合物を単離し, 化学的な特性を確かめるための, 化学的あるいは薬理学的な研究を進めているところである。

(著者の住所は下記参照

翻訳 笠原麗美)

#### 引用文献

- Castro, S. L., A. P. Dantas, P. H. Valente, and N. Paulino. 2001. *J. Ethnopharmacol.* 74:105-112.
- Martos, I., M. Cossentini, F. Ferreres, and F. A. Tomas-Barberan. 1997. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 2824-2829.
- Mirzoeva, O. K. and P. C. Calder. 1996. *Essent. Fatty Acids.* 55: 441-449.
- Park, E., S. Kim, and S. Park. 1996. *Archiv. Pharmacol. Res.* 5: 337-341.
- Pascual, C., R. Gonzalez, and R. G. Torricella. 1994. *J. Ethnopharmacol.* 41: 9-13.
- Paulino, N., F. M. Scremin, L. B. Raichaski, M. C. Marcucci, A. Scremin, and J. and B. Calixto. *J. Pharm. Pharmacol.* (in press)
- Santos, A. R. and J. B. Calixto. 1997. *Neurosci. Lett.* 235:73-76.
- Scheller, S., W. Krol, J. Swiacik, S. Owczarek, J. Gabrys, and J. Shani. 1989. *Z. Naturforsch. C* 44: 1063-1065.
- Zimmermann, M. 1983. *Pain* 16: 109-110.

NIRALDO PAULINO<sup>1</sup>, CRISTINA EUNICE OKUYAMA<sup>1</sup>, CRISTIANI DA SILVA<sup>1</sup>, AMARILIS SCREMIN<sup>1</sup>, MARIA CRISTINA MARCUCCI<sup>2</sup>, JOAO BATISTA CALIXTO<sup>3</sup>. Anti-oedematogenic effect of a standardized ethanol extract of Brazilian propolis in mice. *Honeybee Science* (2002) 23(1): 23-26. 1) Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Biofarmacos (BIOFAR), Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarao/SC, Brazil, 2) Departamento de Pesquisa e Extensao, Universidade Bandeirantes de Sao Paulo-Sao Paulo/SP, Brazil, 3) Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina-Florianopolis / SC, Brazil.

This study evaluate the anti-oedematogenic effect of standardised sample of Brazilian propolis (P1) on oedema induced by flogistic agents in the paw and ear of mice.

Intraperitoneal injection of ethanolic extract of propolis (P1) (1, 3 or 10 mg/kg) produced an anti-oedematogenic effect in mice. In the paw oedema induced by carrageenan model, the ID<sub>50</sub> was 0.68 (0.50-0.85) mg/kg (in 120 min). In the paw oedema induced by bradykinin, the ID<sub>50</sub> was 0.80 (0.54-1.05) mg/kg, and in the paw oedema induced by prostaglandin F<sub>2</sub>, the ID<sub>50</sub> was 0.72 (0.27-1.17) mg / kg. Furthermore, ethanolic extract of propolis did not produce a significant anti-oedematogenic effect, when assessed in the paw oedema induced by prostaglandin E<sub>2</sub> and histamine. In the similar way, the ethanolic extract of propolis (P1) (1, 3 or 10 mg/kg) produce respectively inhibition of 12 (±2.9), 32 (±4.2) and 38 (±3.8)%, in the ear oedema induced by topical application of capsaicin in mice.

Our results suggest that the standardised sample of Brazilian propolis extract used in this experiments, have a potent anti-oedematogenic effect in the oedema induced kinins and prostaglandin systems, and can explain, at least in part, its effect in the inflammatory disease.