

プロポリスの脳保護作用

荒木 博陽, 金 春玉, 五味田 裕,
土井 志真, 杉本 広之, 山田 英生

脳はとくに低酸素状態あるいは虚血状態に弱い臓器といわれている。それは脳のエネルギー要求度が極めて高いことに起因する。脳への酸素あるいはグルコースの供給が不十分であると、脳はエネルギー不足に陥り機能が果たせなくなり生命維持すら危うくなる。臨床的には低酸素あるいは脳虚血状態は心停止、脳腫瘍、脳血管攣縮、脳卒中等によって惹起されるが、動物実験によるとバルビツール酸麻酔が低酸素あるいは脳虚血に対して防御作用があることが知られている。バルビツール酸の脳保護作用の機序は十分に解明されているわけではないが、脳のエネルギー代謝抑制、脳血流量の減少、脳圧の減少、脳浮腫の抑制作用などに基づくと報告されている。また、最近では脳卒中急性期の治療法として低温療法が取り入れられており、これも上記と同様の機序を期待してのことと考えられている。

脳保護作用を評価するにはいくつかの脳虚血モデルが提唱されており、完全脳虚血のモデルとして断頭後のあえぎ行動 (gaspings)、低酸素負荷あるいはエネルギー不足モデルとしてシアニ化カリ (KCN) による致死などがある。断頭による完全脳虚血による gasping は心血管系への薬物の影響を除外できる点で評価される。一方、急性の KCN 致死は主にシアナイドオキシダーゼ (cyanide oxidase) の阻害により細胞の代謝 (とくにミトコンドリアにおける電子伝達系によるエネルギー産生) が抑制されたためにおこると考えられる。したがって、エネルギー源である ATP 産生経路が抑制され、結果的に解糖作用が促進されることになる。

完全虚血と KCN 致死による評価法の関連性

については、種々の向精神薬、脳循環代謝改善薬、睡眠薬等で検討されており、抗うつ薬、抗精神病薬、トランキライザーは断頭法および KCN 致死法における gasping 時間および致死時間を延長する。また、キサンチン誘導体はいずれも著明に短縮する。一方、脳代謝改善薬としてのビンカミンおよびその誘導体は著明に KCN 致死時間を延長し、極めて特徴的である。これまでの報告結果を総合すると脳保護作用は脳のエネルギーの利用度に依存することが考えられる。すなわち脳の活動性を抑制、つまりエネルギーを使わなければ gasping および KCN 致死時間は延長する。一方、逆に脳の活動性を落とさずに、エネルギー利用率を向上させることによっても、特に KCN 致死時間は延長する。

プロポリスはミツバチが集めた植物の新芽や木の樹液などが花粉や蜂ろうなどと混じり合ったもので、天然物としては強力な殺菌・抗菌作用を有する。現在、ドイツ、デンマークなどでは医薬品として使用されているが、本邦では総合的栄養素が多く含まれることから健康食品として使用されている。プロポリスエキスの摂取により免疫力や抗菌力が高まり、結果として細胞の働きが活性化するといわれている。また、皮膚疾患 (火傷など)、潰瘍 (胃潰瘍、十二指腸潰瘍)、悪性腫瘍、肝臓疾患、糖尿病、アレルギー、膠原病、自己免疫疾患などに有効性が報告されているが、民間療法的な使用での報告が多く、学術レベルでの研究は少ない。

プロポリスが高齢者の滋養的な意味合いで使われることがあり、また民間療法としてアルツハイマー病や気力・体力強化を目的とした使

用もあることから、私たちはプロポリスが脳エネルギー代謝系に対してどのような作用があるのかを知る目的で KCN 致死法を用いて検討することとした。

実験材料と実験方法

実験動物

実験時の体重 20-25g の BALB/C 系雄性マウス（チャールスリバー）を使用した。実験期間中は一定温度および湿度環境下（ $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ，70%）で飼育し、餌および水は自由に摂取させた。

実験試薬

KCN（和光純薬）、プロポリス液（ブラジル産アレクリンプロポリス；プロポリス原塊を高濃度エタノールでエキスを抽出後、プロポリスエキス 55 重量%（プロポリス有効成分の固形分割）に濃縮したプロポリス原液：（株）山田養蜂場より提供）を使用した。KCN は生理食塩水にて体重 10g 当たり 0.1mL となるように調整し、尾静脈より注射した。アレクリンプロポリスは 5% アラビアゴム溶液に懸濁し、体重 10g 当たり 0.1mL となるように調製し、経口投与した。

実験方法

実験 1

マウスに 5% アラビアゴム溶液を経口投与し、KCN の量を 1，2，3 および 5mg/kg と変えて、致死時間に対する影響をストップウォッチで計測し、検討した。

実験 2

アレクリンプロポリスおよび溶媒である 5% アラビアゴム懸濁液をマウスに経口投与し、その 30 分後に KCN5mg/kg を静脈内投与し、マウスの致死時間をストップウォッチで計測した。アレクリンプロポリスは 137.5，275 および 550mg/kg で検討した。

実験 3

マウスの運動量を Animex 装置（MK-ANIMEX；室町器械，東京）を用いて測定した。マウスを Animex 装置に入れ、1 分間の運

動量を計測した。運動量に差がないように動物を 3 グループ（対照群，アレクリンプロポリス 275 および 550mg/kg 投与群）に分けた。翌日より、それぞれの群に薬物を 1 日 1 回 15 日間経口投与した。対照群には 5% アラビアゴム懸濁液を投与した。14 日目の投与 30 分後に自発運動量を同様に 1 分間測定した。また、その翌日には最終的に上記薬物および 5% アラビアゴム溶液を投与し、その 30 分後に KCN5mg/kg を静脈内投与し、マウスの致死時間をストップウォッチで計測した。

実験 4

アレクリンプロポリスおよび溶媒である 5% アラビアゴム懸濁液をマウスに経口投与し、その 30 分後に KCN3mg/kg を静脈内投与し、マウスの致死時間をストップウォッチで計測した。アレクリンプロポリスは 550mg/kg で検討した。

実験 5

アレクリンプロポリス 550mg/kg を経口投与し、その 15，30 および 60 分後に KCN3mg/kg を静脈内投与し、マウスの致死時間に対する影響を検討した。

統計解析

実験成績は 2 群間の比較は Student's t-test を用い、3 群間以上は、分散分析後 Tukey 法にて有意差を検定した。有意差 $p < 0.05$ 以下を有意差ありと判定した。

実験結果

1. KCN 致死時間に対する KCN 用量の影響

KCN の用量を 1，2，3 および 5mg/kg とし、致死時間について検討した。その結果、KCN 1mg/kg 静脈内投与では全例がまったく痙攣発作も起こすことなく、生存した。2mg/kg 投与群では全例で痙攣は惹起されたものの死亡例はまったくみられなかった。3mg/kg 投与群では全例で痙攣を起こし死亡した。死亡までの時間は 39.9 ± 2.5 （平均 \pm S.E.）秒であった。5mg/kg 投与群でも同様に全例死亡し、死亡までの時間は 27.8 ± 0.7 秒であった。

2. KCN5mg/kg 静脈内投与による致死時間に対するアレクリンプロボリスの影響

KCN5mg/kg 静脈内投与による致死時間に対するアレクリンプロボリスの影響を表1に示した。アレクリンプロボリスでは550mg/kg 経口投与30分後において有意なKCN致死時間延長作用が認められた。

3. 自発運動量およびKCN致死時間に及ぼすアレクリンプロボリス連続投与の影響

自発運動量はアレクリンプロボリス275および550mg/kg投与群においてまったく影響されなかった(表2)。また、KCN致死時間に対してもまったく影響を示さなかった(表3)。

4. KCN3mg/kg 静脈内投与による致死時間に対するアレクリンプロボリスの影響

表1 KCN5mg/kg 注射後の致死時間に及ぼすアレクリンプロボリスの影響

| 薬物名 | 用量 (mg/kg) | 匹数 | KCN致死時間 (秒) |
|-------|---------------|----|----------------|
| 溶媒 | — | 16 | 27.8 ± 0.7 |
| アレクリン | 137.5 | 7 | 26.7 ± 0.3 |
| プロボリス | 275 | 8 | 27.3 ± 0.5 |
| | 550 | 10 | 30.5 ± 0.7* |

* $p < 0.05$ ANOVA followed by Tukey

表2 自発運動量に及ぼすアレクリンプロボリス14日間連続投与の影響

| 薬物名 | 用量 (mg/kg) | 匹数 | 自発運動量 (カウント) |
|-------|---------------|----|-----------------|
| 溶媒 | — | 12 | 35.3 ± 3.3 |
| アレクリン | 275 | 11 | 32.8 ± 2.5 |
| プロボリス | 550 | 10 | 26.5 ± 3.6 |

表3 KCN5mg/kg 注射による致死時間に及ぼすアレクリンプロボリス14日間連続投与の影響

| 薬物名 | 用量 (mg/kg) | 匹数 | KCN致死時間 (秒) |
|-------|---------------|----|----------------|
| 溶媒 | — | 11 | 26.7 ± 0.9 |
| アレクリン | 275 | 11 | 25.7 ± 0.7 |
| プロボリス | 550 | 10 | 26.3 ± 1.6 |

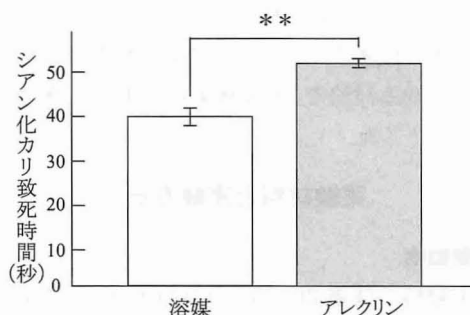


図1 KCN3mg/kg 注射による致死時間に及ぼすアレクリンプロボリスの影響。アレクリンプロボリスは550mg/kgを経口投与し、その30分後にKCN3mg/kgを尾静脈から注射し、死亡までの時間を測定した。

** $p < 0.01$ 溶媒群との比較 (Student's t-testにて有意差を検定)

KCN3mg/kg 静脈内投与による致死時間に対して、アレクリンプロボリスの550mg/kgは有意な致死時間延長作用を示した(図1)。

5. KCN3mg/kg 静脈内投与による致死時間に対するアレクリンプロボリスの効果発現時間の検討

アレクリンプロボリス550mg/kgを腹腔内投与し、その15、30および60分後にKCN3mg/kgを静脈内投与し、致死時間を測定したところ、15および60分後ではまったく致死時間に影響がなかったが、30分後では1例が痙攣やあえぎ行動は出るものの死亡までは至らず、生存した。残りのマウスでも致死時間は有意に延長した(表4、5)。

考察

プロボリスの脳保護作用についてKCN致死時間を指標として検討した。KCNの用量は3mg/kg注射は全例が死亡する最低濃度であり、5mg/kg注射は強力な致死作用を示す用量であると考えられる。アレクリンプロボリスはKCN3および5mg/kg静脈内投与による致死時間を有意に延長した。また、3mg/kgでの検討では1例ではあったが、死に至らず、回復が認められた。本結果はアレクリンプロボリスに脳保護作用を示す成分が含まれることを期待させる。

表4 KCN3mg/kg 注射による致死時間に及ぼす
アレクリンプロボリス作用発現時間の検討

| 薬物名 | 作用発現 時間(分) | 匹数 | KCN 致死時間 (秒) |
|---------------------------|---------------|----|-----------------|
| 溶媒 | — | 11 | 38.7 ± 2.2 |
| アレクリンプロボリス (550 mg/kg) | 15 | 8 | 45.5 ± 2.4 |
| アレクリンプロボリス (550 mg/kg) | 30 | 5 | 51.4 ± 4.7*# |
| アレクリンプロボリス (550 mg/kg) | 60 | 7 | 41.1 ± 2.3 |

* p<0.05 ANOVA followed by Tukey

1例は死に至らなかったために計算値から除外した

表5 KCN3mg/kg 注射による致死率に及ぼす
アレクリンプロボリスの影響

| 薬物名 | 作用発現 時間(分) | KCN 致死率 (致死数/実験匹数) |
|---------------------------|---------------|-----------------------|
| 溶媒 | — | 100% (11/11) |
| アレクリンプロボリス (550 mg/kg) | 15 | 100% (8/8) |
| アレクリンプロボリス (550 mg/kg) | 30 | 83% (5/6) |
| アレクリンプロボリス (550 mg/kg) | 60 | 100% (7/7) |

これまでの KCN に関する報告ではビンカミンおよびビンカアルカロイド誘導体が自発運動に影響しない用量で特異的に KCN5mg/kg による致死時間を延長することが報告されており、本作用にはビンカミンおよびビンカアルカロイド誘導体の脳循環改善作用に依るところが大きいと推察されている。また一般に KCN 致死時間は中枢抑制作用を有する抗うつ薬、抗精神病薬、睡眠薬等では延長し、テオフィリン、アミノフィリン c-AMP など中枢興奮作用を有する薬剤では短縮する。アレクリンプロボリスに脳循環改善作用があるかどうかについては不明であるが、少なくとも自発運動量に最高用量の 550mg/kg で全く影響しなかったことから、中枢神経抑制作用に基づく KCN 致死時間延長作用とは考えにくい。少なくとも脳循環改善作用の有無については検討の余地があるものと考えられた。

しかし、アレクリンプロボリスの作用は

KCN3 および 5mg/kg で認められたものの、最高用量である 550mg/kg の結果であること、また連続投与によりその作用が増強されなかったこと、さらに作用発現時間は投与 30 分後に明らかに認められるのみで、60 分後には消失していたことから考えると作用としては比較的弱いものと考えられた。

脳保護作用の作用機序については依然として不明な点が多い。脳卒中後の低温療法が脚光を浴びているが、これは脳のエネルギー要求度を低下させることにより脳の機能を温存させようという考え方である。KCN 致死に関するこれまでの報告では中枢神経系抑制薬が脳エネルギーの要求が少ないために、また中枢興奮薬が脳のエネルギー要求度が高いことを反映しているものと考えられている。脳循環改善作用が KCN 致死時間を延長する可能性については明らかに脳循環を改善するカルシウム拮抗薬（ニカルジピン、ニモジピン等）等を用いて今後さらに検討する必要がある。

脳保護作用を有していると如何なるメリットが有るかについては、医療用医薬品では脳卒中急性期の極めて重篤な時期に脳保護作用を有する薬物を投与することにより脳虚血による細胞死を抑制することが期待されている。最近の脳保護作用の考え方は細胞死を如何に抑制するかという観点で研究が行われており、ラジカル消去薬、グルタミン酸受容体拮抗薬、NO 産生抑制薬、免疫抑制薬等に注目が集まっている。一般薬や健康食品として使用されているものにそのような作用があることの利点については明確な見解はない。しかし、老化に伴う細胞死を含めて何らかの脳障害が生じた際に、その障害が拡大することを最小限に抑える薬物としての可能性につながるものと期待されている。また、脳機能改善に必要な酸素やグルコースを有効利用する作用がある薬物が KCN 致死時間延長作用を有していることからすれば、高齢者の脳の働きには少なくともマイナス要因ではないと考えられる。以前、私たちは天馬といわれるキノコに共生する蜜環菌が KCN 致死に対して有効であることを報告している。天馬は中国で民間

薬として高齢者において元気が出る（滋養強壮）として愛用されている。しかし、天馬がなかなか手に入りにくいことから、それに共生している蜜環菌を培養して製品化したものが現在用いられている。私たちはKCN致死などの結果をもとに成分の同定を行い、新規のアデノシン誘導体が本作用の主成分であることを見出している。したがって、今回のアレクリンプロポリスにも高齢者の滋養強壯的な作用は期待できるかもしれない。今後、いかなる成分が本作用に寄与しているかを検討することは興味深いところである。

プロポリスが民間療法としてアルツハイマー病等に用いられている例もあるが、中枢神経系における脳保護作用に対する作用については今回の結果を見る限りそれほど強い作用ではない。しかし、そのような重篤な病態ではなく健康食品として使用される上では、とくに高齢者の使用には健康維持、滋養等に期待ができるのではないかと考えられる。今後はアレクリンプロポリスに有効性が認められたことより、アレクリンプロポリスに含まれる有効成分を単離精製し、中枢神経系に対するその他の作用をさらに詳細に検討する必要があるものと思われた。

（荒木、金、五味田：〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1 岡山大学医学部附属病院薬剤部；土井、杉本、山田：〒708-0393 岡山県苫田郡鏡野町市場194（株）山田養蜂場）

主な引用文献

- Araki, H., Y. Karasawa, M. Nojiri and H. Aihara. 1988. *Meth. Find. Exptl. Clin. Pharmacol.* 10: 349-356.
- 平井俊作. 2000. *臨床と研究* 76:93-97.
- Ibayashi, S., M. Fujishima, S. Sadoshima, F. Yoshida, O. Shiokawa, J. Ogata and T. Omae. 1986. *Stroke* 17:261-266.
- Junhau, H., Y. Dechao, C. Xianyu, H. Zemin, F. Xiaozhang, H. Araki, K. Tsuchida, Y. Asami, H. Aihara, M. Tamai and N. Watanabe. 1990. *Fitoterapia* 61:207-214.
- Lowry, O. H., J. V. Passonneau, F. X. Hasserberger and D. W. Schulz. 1964. *J. Biol. Chem.* 239:18-30.
- Michenfelder, J. D., J. H. Milde and T. M. Sundt, Jr. 1976. *Arch Neurol.* 33:345-350.

- Natale, J. E., S. M. Stante and L. G. D' Alecy. 1990. *Resuscitation* 19:271-289.
- Pulsinelli, W. A., D. E. Levy, B. Sigsbee, P. Scherer and F. Plum. 1983. *Am. J. Med.* 74: 540-544.
- Raichle, M. E. 1983. *Ann. Neurol.* 13:2-10.
- Rehncrona, S., I. Rosen and B. K. Siesjo. 1981. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* 1:297-311.
- 渋谷肇, 林成之. 2000. *臨床と研究* 76:102-105.
- Siemkowicz, E. and A. J. Hansen. 1978. *Acta. Neurol Scandinavica* 58:1-8.
- Siesjo, B. K. 1988. *Neurochem. Pathol.* 9:31-88.
- Smith A. L., J. T. Hoff and S. L. Nielson. 1974. *Stroke* 5:1-7.
- Yatsu F. M., I. Diamond and C. Gradiano. 1972. *Stroke* 3:726-732.
- Watanabe, N., T. Obuchi, M. Tamai, H. Araki, S. Omura, Y. Jun-Shan, Y. De-Quan, L. Xiao-Tian and H. Jun-Hua. 1990. *Planta Medica* 56:48-52.
- HIROAKI ARAKI¹, JIN CHUNYU¹, YUTAKA GOMITA¹, SHIMA DOI², HIROYUKI SUGIMOTO², HIDEO YAMADA². The effect of Alecrim propolis on cyanide intoxication in mice. *Honeybee Science* (2001) 22 (2): 62-66. 1) Department of Pharmacy, Okayama University Medical School, 2-5-1 Shikata-cho, Okayama 700-8558, Japan, 2) Yamada Apiculture Center, Inc. 194 Ichiba, Kagamino-cho, Tomata-gun, Okayama Pref. 708-0393, Japan.

The brain is particularly sensitive to hypoxia because of its high energy demands. Acute toxicity of cyanide (KCN) is largely due to the inhibition of cyanide oxidase and the subsequent breakdown of cellular metabolism. Improving the energy metabolism in anoxic brain (KCN survival time) has been one of the commonly accepted method for treating cerebro-vascular diseases. Particularly, aging of brain is also related with metabolic deficit. The purpose of this study was to define the protective effect of Alecrim propolis on brain damage induced by anoxia. Alecrim propolis was supplied by Yamada Apiculture Center. Alecrim propolis solution at a dose of 550 mg/kg p.o. showed significant protective effect on KCN-induced anoxia. The mechanism of this effect is unknown, but the cerebral protecting effect is primarily related to the cerebral energy demand. It is necessary to examine in detail what kind of component of Alecrim propolis is related to the remarkable effect on KCN survival time.