

物性, 化学的特性および生理活性からみた ブラジル産プロポリスの評価

Y. K. Park, M. Ikegaki, S. M. Alencar, F. F. Moura

プロポリスはセイヨウミツバチによって様々な植物から集められる樹脂状物質の総称である。プロポリスは強い粘着性を持った樹脂状物質で、ミツバチはこれを用いて巣箱内の隙間を塞ぎ、内壁を滑らかにし、外敵が侵入する巣門を守る。ミツバチは樹木の樹皮の亀裂や葉の芽から樹脂を集める。この樹脂はミツバチが咀嚼することによって唾液が加わり、部分的に消化された原料は蜂ろうと混合され巣内で用いられる (Ghisalberti, 1979)。プロポリスは樹木由来で、これまで渗出物を出すのは温帯原産の様々なポプラ類とされてきたが、これではポプラが存在しない熱帯地域でなぜミツバチがプロポリスを生産できるのかを説明することができない。Johnson et al. (1994) はオハイオ州の巣から集められたプロポリスはジョージア州南部のものより化学的に多様であることを発表した。同様に Rudzki and Grzywa (1983) はワルシャワ地域から集められたプロポリスに互いに少なくとも若干のちがいがあつたことを見つけた。プロポリスのチンキから分離される化合物の中で最も大きなグループはフラボノイド色素である。フラボノイドは植物界に広範囲に分布し、ミツバチがプロポリス原料を集める植物に含まれるフラボノイド類が当然のようにプロポリスから分離されることになる。このようにプロポリス中の化学物質組成は植生によって異なる。そこで、私たちはアフリカ蜂化ミツバチがブラジルの南部、南東部、中央部、西部、北東部で採集した 400 余りのプロポリスを入手した。各サンプルをエタノールで抽出し、エタノール抽出液 (EEP と略す) を物理化学的な方法で分析、さらに生物学的活性を評価した。

材料および方法

プロポリスのエタノール抽出液 (EEP) の準備乾燥したプロポリスを粉碎し、各サンプル (2 g) を 80% エタノール水溶液 (25 mL) に溶解、70°C で 30 分振盪した。抽出後、遠心分離をして上清を取り、これをエタノール抽出液 (EEP) とした。

UV 分光光度計による EEP の吸収スペクトルの測定

プロポリス抽出液の紫外吸収スペクトルの測定には、25 μ L の EEP と 30 mL の 96% エタノールを混合したものを用いた。この混合液について紫外分光光度計によって 200~600 nm の波長範囲の吸収を得た。

EEP の逆相高性能薄層クロマトグラフィー (RP-HPTLC)

RP-HPTLC にはシリカゲル RPF₂₅₄S プレート (Merck) を用いた。EEP 3 μ L をスポットし、展開溶媒はエタノール:水 (55:45) を用いた。フラボノイド類は紫外線 366 nm 照射下で検出した。

プロポリス抽出液の逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC)

フラボノイド類の定量分析には YMC PACK ODS-A カラムを用いて行った。移動相は酢酸:メタノール:水 (5:75:65)、流速は 1 mL/min、検出はダイオードアレイ検出器で行った。クロマトグラムは 254 nm で記録した。EEP 中のフラボノイド類の定量には標準

品 (Extrasynthes A. A. 社製) を使用した。

抗酸化活性の測定

抗酸化活性は β カロチンの酸化結合とリノール酸の測定 (Hammerschmidt and Pratt, 1978; Pratt and Paula, 1979; Pratt and Watts, 1964; Park and Ikegaki, 1998) によって定量した。60 mg のリノール酸, 200 mg の Tween 40, 5 mg の β カロチンを 5 mL のクロロホルムに溶解し, 50°C のロータリーエバポレーターで濃縮した。クロロホルム除去後, 残留物に酸素添加脱イオン水 50 mL を加えて強振盪下で溶解した。得られた 5 mL の懸濁液を 0.5 mL の EEP サンプルを含んだ試験管に移し, 470 nm での吸収を分光光度計ですぐ読みとった。酸化反応を進めるため試験管を 40°C に加温し, その後 60 分間隔で吸光度を読みとった。

病原性細菌に対する抗菌活性

ブロス培地で活発に成長している黄色ブドウ球菌と連鎖球菌を, ブロス培地に浸漬した滅菌綿棒で寒天培地に移植した。移植した培養皿には EEP を含ませたディスクをおき, 37°C で一晚培養した。EEP ディスクは濾紙 (Whatman No.3 ($\phi 5 \times 1$ mm)) をプロポリス抽出液中に浸漬し, 室温で一晚中低真空下で乾燥させ, さらに 60°C に 4 時間放置して作製した (Blair et al., 1997; Park et al., 1998)。

EEP によるヒアルロニターゼ活性の抑制

ヒアルロニダーゼ活性の抑制は Park and Ikegaki (1998), Aronson et al. (1967), Reissig et al. (1955) にしたがって測定した。各 EEP 50 μ L と, 0.5 mL のヒアルロン酸カリウム溶液 (0.6 mg を pH 3.6 の 0.1 M 酢酸緩衝液・0.15 M 塩化ナトリウム溶液に溶解してあるもの), ヒアルロニダーゼ (タイプ IV-S: 牛精巢由来品, Sigma 社) を 350 ユニット含んでいる同じ緩衝液 50 μ L) の混合液を 37°C で 40 分培養した。培養後 0.8 M カリウムホウ酸塩 0.1 mL を加え, 3 分煮沸し, さらに 3 mL の p-ジメチルアミノベンズアルデヒドを加えた。

37°C で 20 分反応させた後, すべて試験管は水を対照区として 585 nm で吸光度を測定した。

細胞毒性の分析

実験下で細胞毒性の分析は Rubinstein et al. (1990) の方法にしたがった。20 μ g/mL での EEP の細胞毒性はマイクロタイタープレート上のヒト腫瘍培養細胞株 (HTCL) のスルホローダミン B 染色で調べ, 反応終点での 562 nm の吸収を測定した。培養細胞株には以下のようなものが使われた。KB (鼻咽頭の癌腫), HCT-8 (回盲の腺腫: ATCC CCL244), MCF-7 (乳房腺腫: ATCC HTB22) と CAKI-1 (腎臓腺腫: HTB46)。細胞毒性試験では抗ガン剤のエトポシド (VP-16) を細胞毒性測定の陽性対照として使った。この試験はアメリカの Chapel Hill にある North Carolina 大学の Bastow 博士によって行われた。

ヒト免疫不全症ウイルス (HIV) に対する増殖抑制の分析

抗 HIV 活性の試験は Chen et al. (1996) にしたがって行った。サンプルはまず DMSO (ジメチルスルホキシド) に溶解した。サンプルの調整中に, T 細胞株 HS1 の一定量を HIV-1 (IIIB 分離) に感染させ, 一方を培養培地で偽感染させた。偽感染した方は毒性を判定するために使われた。使用したウイルスの系統は標準で 104 感染ユニット/mL の TCID₅₀ 値を示す。さらに, AZT についても陽性対照として各実験で分析した。この実験はアメリカ, メリーランド州の Biotech Research Laboratory の Mark Cosentino 博士によって行われた。

結果および考察

エタノール抽出のプロポリスの分析

400 のプロポリスのサンプルは抽出物の視認 (色), 紫外部分光光度計 (紫外部吸収スペクトルのパターン), 逆相薄層クロマトグラフィーによって分析され, 表 1, および図 1, 2 に示すように, 12 のグループに分類された。このうち

表1 ブラジル産プロポリスのグループ分け

グループ (代表サンプル)	EEPの特徴		産地(州名)
	色彩	可溶分(%)	
1 BG1	黄色	63.0	南部バジェ(リオ・グランデ・ド・スール)
2 RS1	淡褐色	57.5	南部(リオ・グランデ・ド・スール)
3 PR7	濃褐色	65.0	南部(パラナー)
4 PR8	淡褐色	54.5	南部(パラナー)
5 PR9	緑褐色	58.7	南部(パラナー)
6 BA11	赤褐色	45.9	北東部(パーイア)
7 BA51	緑褐色	43.8	北東部(パーイア)
8 PE5	濃褐色	41.3	北東部(ペルナンブッコ)
9 PE3	黄色	46.7	北東部(ペルナンブッコ)
10 CE3	濃褐色	24.1	北東部(セアラ)
11 PI1	黄色	23.1	北東部(ピアウイー)
12 SP12	緑色～緑褐色	61.0	南西部(サンパウロ)

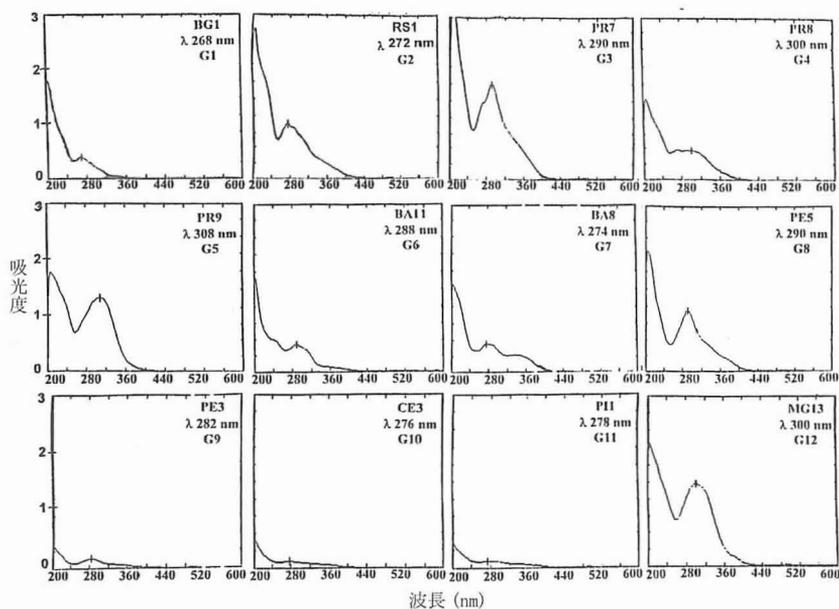


図1 ブラジル産プロポリス(EEP)の紫外外部吸収スペクトルのパターン

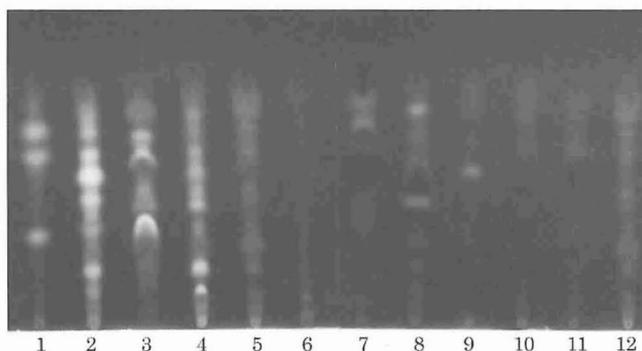


図2 RP-HPTLCによる成分展開パターン 第6グループ(G6)はBA11であるが、フラボノイド化合物がほとんど含まれていないのがわかる

表2 EEPによる抗微生物活性

グループ	阻止円直径(mm)		
		黄色ブドウ球菌	連鎖球菌
1	BG1	陰性	痕跡
2	RS1	痕跡	陰性
3	PR7	2.0	2.8
4	PR8	1.0	痕跡
5	PR9	3.0	痕跡
6	BA11	6.0	9.0
7	BA51	6.0	0.5
8	PE5	2.0	1.0
9	PE3	痕跡	陰性
10	CE3	痕跡	陰性
11	PI1	痕跡	陰性
12	SP12	3.0	1.0

5つのグループはブラジル南部産であり、6つのグループのプロポリスはブラジル北東部産のものである(表1)。表中のサンプル名は採集地とサンプル番号で示してある。また別の1グループがブラジル南西部のものである。これらの結果はブラジル南部と北東部からのプロポリスは異なっていることを示す。プロポリスの多様性は植生によるが、まれに例外的なプロポリスが地位置とは無関係に見つかる。今回はこのような例外的なプロポリスは含めて扱わなかった。エタノール可溶成分についても地理的な差異が反映されている。グループ10, 11を除くすべてのグループは41.3%から63%のエタノール可溶成分を含むが、グループ10とグループ11はそれぞれ24.1%と23.1%というようにエタノール可溶画分が非常に少なかった。

エタノール抽出プロポリスの抗菌活性

全プロポリスグループの抗菌活性は病原性黄色ブドウ球菌と連鎖球菌変異株で確かめられた。この結果を表2に示す。グループ1のプロポリスは黄色ブドウ球菌の成長を抑制しなかった。グループ2, 9, 10, 11はわずかに抑制を示し、グループ3, 4, 5, 8, 12が中程度の、グループ6, 7は強度の生長抑制効果を示した。グループ6のプロポリスは連鎖球菌に対しても強い抗菌活性を示したが、グループ1, 4, 5, 7, 8, 12の活性は最小であった。

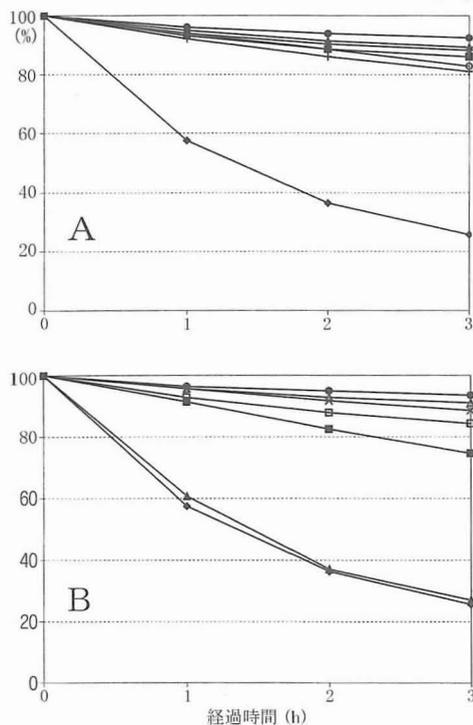


図3 ブラジル産プロポリスの抗酸化活性

A : ■G1(BG1), ▲G2(RS1), ○G3(PR7), *G4(PR8), ●G5(PR9), +G6(BA11), ◆対照区
B : △G7(BA51), ×G8(PE5), ▲G9(PE3), ■G10(CE3), □G11(PI1), ●G12(SP12), ◆対照区

表3 抗炎症活性

グループ	ヒアルロニダーゼ 活性阻止率 (%)	
1	BG1	16.1
2	RS1	11.8
3	PR7	37.9
4	PR8	17.1
5	PR9	36.4
6	BA11	40.8
7	BA51	48.6
8	PE5	40.8
9	PE3	10.6
10	CE3	20.1
11	PI1	2.4
12	SP12	38.3

抗酸化と抗炎症性活性

抗酸化活性の結果を図3に示した。グループ9, 10を除くすべてのグループが80%以上の

表4 ヒト腫瘍培養細胞株に対する細胞毒性

グループ		20 μ g/mL で阻止された細胞株の割合			
		鼻咽頭癌腫	回盲腺腫	腎臓腺腫	乳房腺腫
1	BG1	68	19	15	未検査
1	RS1	50	48	9	37
1	PR7	53	45	12	31
1	PR8	50	47	13	33
1	PR9	14	39	8	18
2	BA11	75	32	16	未検査
2	BA51	34	9	陰性	未検査
6	PE5	88	79	72	77
6	PE3	85	77	74	80
7	CE3	97	95	94	96
8	PI1	43	31	12	43
10	SP12	37	22	12	31
	VP-16*	90	46	25	41

*制癌剤 (Etoposide), 2 μ g/mL での活性

抗酸化活性, グループ 10 は 80% 以下の活性を示した. グループ 9 は抗酸化剤として作用しなかった. 抗炎症性については, グループ 3, 5, 6, 7, 8, 12 のプロポリスがグループ 1, 2, 4, 9, 10, 11 と比較して活性が高かったことが証明された (表 3).

細胞毒性の分析

材料および方法で述べたプロポリスの粗抽出物は表 4 に示した EEP を除いて培養細胞株試験では一般に細胞毒性が弱い, あるいはまったく示されなかった. 表 4 にあげた EEP は成長の速いがん細胞株の成長を抑制率 14~97% の範囲で抑制していた. 抗がん剤のエトポシド (VP-16) はこれらと比較すると約 10 倍も低い濃度 (2 μ g/mL) で同様の細胞株に対して活性を示した. しかしながら細胞毒性のスペ

クトルは EEP のものとは異なり, プロポリスは新しい種類の細胞毒性活性に富んでいるともいえる. 今後, 分画や単離した成分での研究が望まれる. グループ 1, 2, 7, 6 は興味深い結果であった. それらは 50% あるいはそれ以上の高い抑制効果を KB 細胞 (鼻咽頭の癌腫) に対して示した. さらにグループ 7 と 6 も HCT-8 (回盲の腺腫), CAKI-1 (腎臓の癌腫), MCF-7 (胸部の腺腫) 腫瘍培養細胞株にも高い活性がある. 最終的に細胞毒性活性の見られたすべてのプロポリスサンプルは産地別グループで比較検討を行った. グループ 6 と 7 からのプロポリスは 4 種の腫瘍細胞に高い活性があったが (表 4), HPTLC のパターンはまったく異なっていた.

表5 抗 HIV 活性

グループ		IC ₅₀ (μ g/mL)	EC ₅₀ (μ g/mL)	治療指数 (TI)
1	RS5	5.95	1.23	4.83
2	PR9	17.9	2.83	6.32
3	PR9	18.8	2.53	7.42

IC₅₀: 50% 阻害濃度 = 偽感染 H9 細胞に較べて 50% の細胞毒性が見られた試料濃度
 EC₅₀: 50% 抑制値 = HIV の増殖を 50% 抑制した試料濃度
 治療指数 TI が 5.0 を超えたものについて再試験を行った.

抗 HIV の分析

いくつか選抜した EEP のサンプルについて実験下で H9 リンパ球の中での HIV 複製に対する抑制効果を調べた。結果は表 5 の通りである。EEP サンプルの中で、グループ 1 と 5 に含まれるプロポリスで EC50 値がそれぞれ 2.83, 2.53, 1.23 μ g/mL で抗 HIV 活性を示し、治療指標 (TI) は 6.32, 7.42, 4.83 であった。抗 HIV 活性はいずれもグループ 1 と 5 に属し、また活性の強さはグループ 1 においてグループ 5 よりもやや高いといえる。これはプロポリスが選択的な抗 HIV 活性を示すことを報告した最初の実験データである。さらに精製の上、有効成分の同定が望まれる。

(著者の住所は下記参照)

(翻訳 笠原 麗美)

引用文献

- Aronson, N. N. and E. A. Davidson. 1967. *J. Biol. Chem.* 242: 437-440.
- Blair, J. E., E. K. Borman, E. T. Bynoe, E. L. Updyke, and R. E. O. Williams. Hospital acquired staphylococcal disease, recommended procedures for laboratory investigation, Atlanta, Ga., United States, Department of Health, Education and Welfare, Public Health Services.
- Chen, D. F., S. X. Zhang, K. Chen, B. N. Zhou, P. Wang, L. M. Cosentino and K. H. Lee. 1996. *J. Nat. Prod.* 59: 1066-1068.
- Ghisalberti, E. L. 1979. *Bee World* 60: 59-84.
- Hammerschmidt, P. A. and D. E. Pratt. 1978. *J. Food Sci.* 43: 556-559.
- Johnson, K. S., F. A. Eischen and D. E. 1994. *J. Chem. Ecol.* 20: 1783-1792.
- Park, Y. K. and M. Ikegaki. 1998. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 62: 2230-2232.
- Park, Y. K., M. H. Koo, J. A. S. Abreu, M. Dcegaki, J. A. Cury and P. L. Rosalen. 1998. *Current Microbiol.* 36: 24-28.
- Pratt, D. E. and M. B. Paula. 1979. *J. Food Sci.* 44: 1720-1722.
- Pratt, D. E. and B. M. Watts. 1964. *J. Food Sci.* 29: 27-31.
- Reissig, J. L., J. L. Strominger and L. F. Leioir. 1955. *J. Biol. Chem.* 217: 959-966.
- Rubinstein, L. V., R. H. Shoemaker, K. D. Paull, R. M. Simon, S. Tosini, P. Skehan, D. A. Scudiero, A. Monks and M. R. Boyd. 1990. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 1113-1118.
- Rudzki E. and Z. Grzywa. 1983. *Cont. Denna-titis* 9: 40-45.
- YONG KUN PARK, MASAHARU IKEGAKI, SEVERINO MATIAS DE ALENCAR and FABIANA FONSECA DE MOURA. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. *Honeybee Science* (2000) 21(2): 85-90. Biochemistry Laboratory, College of Food Engineering, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil.

We have collected 400 propolis samples which were collected by Africanized *Apis mellifera* in Southern, Southeastern, Central western, and Northeastern Brazil. The respective samples were extracted with ethanol. The ethanolic extracts of propolis (EEP) were analyzed by physicochemical methods such as appearance of EEP, measurement of absorption spectra by UV-spectro-photometry, Reversed phase-thin layer chromatography (RP-HPTLC), Reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and then the EEPs were evaluated their physiological activities such as Antioxidant activities, Anti-microbial activities, Assay of cytotoxic activity to cancer cells, and HIV-Growth inhibition assays. In accordance with results of EEP appearance, UV-absorption spectra, RP-HPTLC, and RP-HPLC, the propolis were classified as 12 groups. Among 12 groups of propolis, five groups of propolis were collected from Southern Brazil, whereas six groups of propolis were collected from Northeastern Brazil. Furthermore, one group of propolis was found in Southeastern Brazil. It was found that the variety of propolis is depending on plant ecology. Although rarely exceptional propolis was found in spite of geographic locations, these propolis were not included in this study. Physiological activities for 12 groups of propolis were also variables, depending on geographical location. This is due to fact that the compositions of propolis are depending on the compositions in plants.