

## ブラジル産水溶性プロポリスから得られた免疫活性画分の 抗癌剤との併用による抗腫瘍作用

鈴木 郁功・高井 英之・小出 元紀・山本 肇

プロポリス (Propolis) とはミツバチが巣を外敵や雑菌から防御するために壁などに付着させる物質のことで、日本ではハチヤニとも呼ばれている。ブラジル産のプロポリスは樹木 (主にユーカリ系) の葉や木の芽などから集めた樹脂状物質を素材としてミツバチの唾液などと混ぜ合わせて作ったもので、1つは巣の内壁を補強すること、もう1つは巣の中を殺菌し清潔に保つ働きがあり、民間薬として繁用されてきた。プロポリスの薬理作用は、抗菌作用 (川井ら, 1987)、鎮痛抗炎症作用 (酒井ら, 1994)、抗腫瘍作用 (松野, 1992)、免疫能増強作用 (杉谷ら, 1994)、抗ウイルス作用 (中村, 1995)、毛再生促進作用 (中村, 1995) 等の多種多様な薬効が知られている。従来のプロポリスは主にアルコールで抽出後熟成 (1~2年) した物が多く、服用しにくい点と時に大量適用する場合にはアルコールによる障害が問題となる等の欠点があるのが現状であった。今回、プロポリス原塊から水抽出法で得た上澄液を凍結乾燥し、ゲル濾過等により、リンパ球対多形核白血球比増加作用 (L/P 活性) を指標にして部分精製した (小出ら, 1994)。これらの水溶性プロポリスおよびゲル濾過画分の Ehrlich Carcinoma を用いた固型癌による抗腫瘍作用および抗癌剤 Mitomycin C (MMC) による副作用 (白血球数減少症) の防御作用および MMC との併用による相乗効果について検討した (高井ら, 1995)。

### 材料ならびに方法

ブラジル産プロポリス原塊 500g を微粉末と

して、水 3l を加え水浴上、50℃で2時間攪拌抽出後、遠心分離 (15000rpm, 10min) し上澄液を得た。この沈殿に水 3l を加え同様な抽出操作を行い、上澄液を合わせて濾過し、濾液を凍結乾燥物 (収量 51g, 収率 10.2%) とした。タンパク質の定量は Lowry et al. (1951) が改良した方法で行った。Sephadex G-50 よるゲル濾過は、水溶性プロポリス 1.64g を 5.8×3.1cm のカラムに添加後、M/15 リン酸緩衝液 pH6.98 で溶出させ、20ml/tube ずつ分取し、4つの画分 (G-I, 14.1%, G-II, 5.5%, G-III, 5.9%, G-IV, 4.9%) に分画した。

### 1) リンパ球対多形核白血球比増加作用 (L/P 活性) の測定

Metcalf (1975) に基づいて改変した Hand et al. (1967) の方法を用いた。免疫未熟な生後 6~12 時間以内のスイス系マウスの同腹の新生仔を二群に分け、一方に検体群として試料の生理食塩水溶液を腹腔内注射し、他方には対照群として生理食塩水を同様に注射した。注射前、注射後 6 日、10 日、14 日に尾静脈から採血し、薄層血液塗抹標本を作成し、Wright 染色法 (日野, 1972) により測定した。効力の判定は、Suzuki et al. (1975) の方法に従い、t 検定により危険率 5% 以下で有意になった場合を有効とした。

### 2) 抗腫瘍作用の測定

ICR 系マウス (日本 SLC (株) 生産, 雄性, 6 週令) 1 群 6 匹を用い、Ehrlich Carcinoma 腹水癌を右鼠蹊部皮下に 4~8×10<sup>6</sup> cells 移植した。腫瘍の増殖は毎週皮膚の上から Calliper

で最大直径の径を測る方法により調べ、移植後35日目に摘出し、腫瘍の大きさ(直径×短径×厚さ mm<sup>3</sup>) および腫瘍重量(g)を量った。対照の生理食塩水投与群に対する腫瘍抑制率(以下、IR と略す)は次式により求めた(Mizutani et al., 1978)。

$$I.R.(\%) = \frac{(Cw - Tw) \times 100}{Cw}$$

Cw: 対照群の平均腫瘍重量

Tw: 検体群の平均腫瘍重量

### 3) 抗癌剤 MMC による白血球数減少症に対する回復効果

ICR 系マウス(6週令, 雄性)1群6匹を用い、Ehrlich Carcinoma 腹水癌を右鼠蹊部皮下に4~8×10<sup>6</sup>cells 移植し、24時間後、抗癌剤 MMC を1.0mg/kg/day×34 腹腔内注射し、白血球数減少症を起こさせた。対照群は MMC を単独腹腔内注射し、検体群は水溶性プロポリス、ゲル濾過画分 G-I, G-II および G-III 等を皮下注射して抗癌剤と併用させた。血球数の測定は、移植開始後5日毎にマウス尾の末梢血 20μl ずつ経時的に採血し、自動血球計数

装置 Sysmex F-820(東亜医用電子(株)製)を用いて白血球数、赤血球数および血小板数を測定した。

## 結果

### 1) リンパ球対多形核白血球比増加作用(L/P 活性)

表1に示したように水溶性プロポリス 50μg~200μg/mouse の用量範囲内で6日, 10日, 14日といずれも有意な L/P 活性を示した。又、ゲル濾過画分 G-I および G-II は 12.5μg/mouse の用量でいずれも有意な L/P 活性を示した。しかしゲル濾過画分 G-III および G-IV は同用量で無効であった。対照実験としてローヤルゼリーおよびハチミツを各々 80μg/mouse を用いたが、ほとんど対照群と同じで有意な変化は見られなかった。抗腫瘍作用は、図1に示したように水溶性プロポリスを毎日 200μg/mouse の用量単独投与した10日間連続皮下注射した場合、移植3週目より対照の生理食塩水投与群に比べほとんど腫瘍の増殖が見られず、明らかに腫瘍増殖抑制作用が認

表1 リンパ球対多形核白血球比増加作用

試料	用量 μg/mouse	動物数 n	平均±標準誤差	上段: 検体群		下段: 対照群
			6日	10日	14日	
水溶性プロポリス	200	5	1.95±0.14 <sup>a)</sup>	2.55±0.09 <sup>a)</sup>	4.36±0.35 <sup>a)</sup>	
		5	0.67±0.02	1.54±0.05	1.76±0.09	
水溶性プロポリス	50	5	1.64±0.03 <sup>a)</sup>	1.93±0.03 <sup>a)</sup>	2.36±0.17 <sup>a)</sup>	
		5	0.80±0.03	1.20±0.03	1.52±0.07	
ゲル濾過画分 G-I	12.5	5	1.09±0.03 <sup>a)</sup>	1.39±0.03 <sup>a)</sup>	1.81±0.07 <sup>b)</sup>	
		5	0.71±0.03	1.16±0.04	1.54±0.07	
ゲル濾過画分 G-II	12.5	5	1.15±0.04 <sup>a)</sup>	1.40±0.03 <sup>a)</sup>	1.85±0.07 <sup>b)</sup>	
		5	0.74±0.02	1.18±0.02	1.59±0.03	
ゲル濾過画分 G-III	12.5	5	0.74±0.03	1.22±0.05	1.73±0.07	
		5	0.73±0.02	1.19±0.05	1.69±0.05	
ローヤルゼリー	80	5	0.84±0.04	1.24±0.04	1.64±0.07	
		5	0.77±0.04	1.21±0.03	1.61±0.06	
ハチミツ	80	5	0.61±0.04	1.21±0.05	1.61±0.07	
		5	0.63±0.05	1.23±0.06	1.65±0.09	

a) 生理食塩水の対照群に対して1%の危険率で有意 P<0.01

b) 生理食塩水の対照群に対して5%の危険率で有意 P<0.05

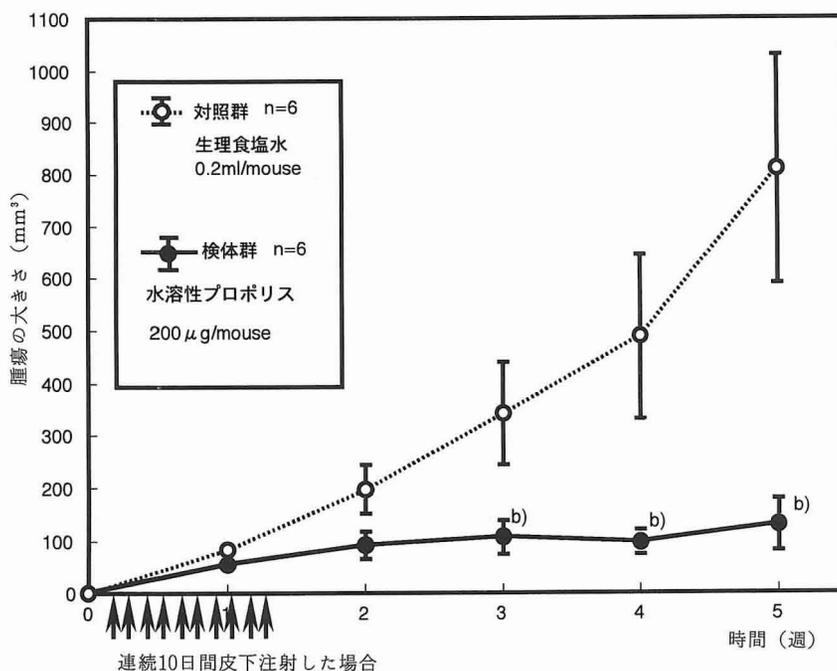


図1 マウスにおける水溶性プロポリスの腸瘍増殖への影響  
b) 生理食塩水の対照群に対して5%の危険率で有意

められた ( $P < 0.05$ ).

## 2) 抗腫瘍作用

表2に Ehrlich 癌を移植したマウスにおける水溶性プロポリスおよびゲル濾過画分の抗腫瘍作用の結果を示した。水溶性プロポリスを毎日

200 $\mu\text{g}/\text{mouse}$  の用量を10日間連続皮下注射した場合、対照の生理食塩水投与群に比べ、5週間後には6匹中2匹に腫瘍消失がみられ、抑制率93.1%で有意 ( $P < 0.01$ ) に抗腫瘍作用を示した。ゲル濾過画分G-Iを毎日200

表2 ICR系マウスのエールリッヒ癌における水溶性プロポリス及びゲル濾過画分の抗腫瘍作用

試料	用量 ( $\mu\text{g}/\text{mouse}$ × day SC)	投与日数	マウス数 n	腫瘍の大きさ 平均±標準誤差(g)	抑制率 (%)	腫瘍消失
水溶性プロポリス	50×10	+1~10	5	9.49±1.55	27.0	0/5
生理食塩水	0.2×10	+1~10	6	13.00±1.31	/	0/6
水溶性プロポリス	200×10	+1~10	6	0.69±0.32 <sup>a)</sup>	93.1 <sup>a)</sup>	2/6
生理食塩水	0.2×10	+1~10	6	10.01±2.94	/	0/6
水溶性プロポリス	400×34	+1~34	6	1.19±0.56 <sup>a)</sup>	85.0 <sup>a)</sup>	3/6
ゲル濾過画分G-I	200×34	+1~34	6	0.54±0.34 <sup>a)</sup>	93.2 <sup>a)</sup>	4/6
ゲル濾過画分G-II	200×34	+1~34	6	1.35±0.58 <sup>a)</sup>	83.0 <sup>a)</sup>	1/6
生理食塩水	0.2×34	+1~34	6	7.95±0.52	/	0/6
ゲル濾過画分G-III	200×34	+1~34	6	8.09±1.52	27.3	0/6
ゲル濾過画分G-IV	200×34	+1~34	6	5.14±1.99	53.8	0/6
生理食塩水	0.2×34	+1~34	6	11.13±2.67	/	0/6

腫瘍細胞  $4\sim 8 \times 10^6$  個をマウスの右鼠蹠部皮下に移植した日を0日とし、移植35日目に摘出した平均腫瘍重量を求め対照群との比較より腫瘍抑制率を算出した。

a) 生理食塩水の対照群に対して1%の危険率で有意  $P < 0.01$

表3 担癌マウスにおける水溶性プロポリス及びゲル濾過画分と抗癌剤との併用による抗腫瘍効果

試料	用量(mg/kg× day SC)	投与日数	動物数 n	腫瘍重量 平均±誤差(g)	抑制率 (%)
対照群 生理食塩水	(0.1 ml/mouse /day×34)	+1~34	6	13.73±3.99	—
MMC	1.00×34	+1~34	6	3.80±1.35 <sup>b)</sup>	72.3
MMC+水溶性プロポリス	13.33×34	+1~34	6	1.12±0.43 <sup>b)</sup>	91.8
MMC+ゲル濾過画分 G-I	3.33×34	+1~34	6	1.65±0.77 <sup>b)</sup>	88.0
MMC+ゲル濾過画分 G-II	3.33×34	+1~34	6	2.47±0.68 <sup>b)</sup>	82.0
MMC+ゲル濾過画分 G-III	3.33×34	+1~34	6	1.32±0.54 <sup>b)</sup>	90.3

腫瘍細胞  $4\sim 8 \times 10^6$  個をマウスの右鼠蹠部皮下に移植した日を0日とし、移植35日目に摘出した平均腫瘍重量を求め対照群との比較より腫瘍抑制率を算出した。

b) MMC 単独投与群に対して5%危険率で有意  $P < 0.05$

た場合、5週目には6匹中4匹に腫瘍消失がみられ、抑制率93.2%で有意 ( $P < 0.01$ ) な抗腫瘍作用を示した。ゲル濾過画分 G-II は毎日  $200\mu\text{g}/\text{mouse}$  の用量を34日間連続皮下注射した場合、5週目で6匹中1匹に腫瘍消失がみられ、抑制率83%で有意 ( $P < 0.01$ ) に抗腫瘍作用を示した。これらに対してゲル濾過画分 G-III と G-IV については共に同じ用量の毎日  $200\mu\text{g}/\text{mouse} \times 34$  回皮下注射した場合、それぞれ対照の生理食塩水投与群に比べ、抑制率は27.3%と53.8%となり、共に有意性は認められなかった。

### 3) 腫瘍抑制率

表3に Ehrlich 癌を移植したマウスに抗癌剤 MMC と水溶性プロポリスを併用した場合で5週間後に摘出した腫瘍の重量および抑制率を示した。抗癌剤 MMC ( $1\text{mg}/\text{kg}/\text{day} \times$

34回) 単独投与した場合、腫瘍重量3.80g、抑制率72.3%で有意 ( $P < 0.05$ ) であった。水溶性プロポリス ( $13.33\text{mg}/\text{kg}/\text{day} \times 34$ 回) と併用した場合は、腫瘍重量1.12g、抑制率91.8%で有意 ( $P < 0.05$ ) であった。ゲル濾過画分 G-I ( $3.33\text{mg}/\text{kg}/\text{day} \times 34$ 回) と併用した場合は、腫瘍重量は1.65g、抑制率88.0%で有意 ( $P < 0.05$ ) であった。ゲル濾過画分 G-II ( $3.33\text{mg}/\text{kg}/\text{day} \times 34$ 回) と併用した場合は、腫瘍重量2.47g、抑制率82.0%で有意 ( $P < 0.05$ ) であった。ゲル濾過画分 G-III と併用した場合は、腫瘍重量は1.32g、抑制率90.3%で有意 ( $P < 0.05$ ) であった。以上のように、水溶性プロポリス並びにゲル濾過画分 G-I、G-II および G-III と併用した場合、MMC 単独群に比べ腫瘍抑制の増強する傾向が認められた。

### 4) 抗癌剤 MMC による白血球減少症に対する

表4 担癌マウスの水溶性プロポリス及びゲル濾過画分と抗癌剤との併用による白血球数減少症の回復効果

試料	用量(mg/kg× day SC)	投与日数	動物数 n	白血球 ( $\times 10^2/\mu\text{l}$ )	赤血球 ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	血小板 ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )
対照群 生理食塩水	(0.1 ml/mouse /day×34)	+1~34	6	208±36	866±47	132±10
MMC	1.00×34	+1~34	6	71±7	589±47	60±9
MMC+水溶性プロポリス	13.33×34	+1~34	6	119±10 <sup>b)</sup>	703±49	91±7 <sup>b)</sup>
MMC+ゲル濾過画分 G-I	3.33×34	+1~34	6	95±8	670±56	93±10 <sup>b)</sup>
MMC+ゲル濾過画分 G-II	3.33×34	+1~34	6	117±13 <sup>b)</sup>	686±57	104±10 <sup>a)</sup>
MMC+ゲル濾過画分 G-III	3.33×34	+1~34	6	84±9	621±45	75±7

腫瘍細胞  $4\sim 8 \times 10^6$  個をマウスの右鼠蹠部皮下に移植した日を0日とし、移植35日目にマウス尾の末梢血より採血し、血球数を自動血球計数装置より測定した。

a) MMC 単独投与群に対して1%危険率で有意  $P < 0.01$

b) MMC 単独投与群に対して5%危険率で有意  $P < 0.05$

## 回復効果

白血球数減少症に対する回復効果を検討した結果を表4にまとめた。MMC (1mg/kg/day×34回)と水溶性プロポリス(13.33mg/kg/day×34回)とを併用した場合、白血球数および血小板数の減少を有意( $P<0.05$ )に抑制した。MMCとゲル濾過画分G-I(3.33mg/kg/day×34回)と併用した場合、血小板数減少を有意( $P<0.05$ )に抑制し、ゲル濾過画分G-IIと併用した場合は、白血球数減少症( $P<0.05$ )並びに血小板数減少症( $P<0.01$ )をいずれも回復させる効果が認められた。

## 考察

水溶性プロポリスおよびそのゲル濾過画分G-IとG-IIに抗腫瘍作用が認められた。水溶性プロポリスにL/P活性、抗体産生細胞増加作用(PFC活性)等による免疫能力促進作用があることは認められており(杉谷ら, 1994)、抗腫瘍性への賦活には主にリンパ球が関与し、T細胞およびB細胞を増加させ、免疫反応を活性化することによって2次的に腫瘍を抑制させるものと思われる(Yamamoto et al., 1981)、癌細胞への直接作用のほか宿主を介する作用(Yamamoto et al., 1982)が大きく発現したものである。

抗癌剤の副作用として、造血機能へ影響を及ぼし白血球数が減少することがよく知られている。水溶性プロポリスおよびゲル濾過画分G-I、G-IIには、抗癌剤MMCによる白血球数減少を回復させる効果があった。有効成分および作用機構は不明であるが、水溶性プロポリスには、IL-6、IL-11等のサイトカイン(Nanba et al., 1994; Tuji et al., 1992)を介する造血機能へ関与する賦活作用があることが示唆された。抗癌剤には癌細胞を直接攻撃し死滅させる作用があると共に、副作用として正常細胞へのダメージも大きいのが通例である。水溶性プロポリスと併用することによって、抗癌剤の種々の副作用を軽減し、さらに腫瘍抑制を活性化させる賦活作用を併せた相乗効果が期待出来るも

のと思われる。

今後、水溶性プロポリスを精製し、有効成分を特定し、抗腫瘍作用並びに白血球数減少症の回復効果への作用機構を明らかにして、この不思議とも思われるプロポリスの多様な生理作用が種々なる疾病に役立つものを期待して研究を進めて行きたいと考えている。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、有益なご助言と Ehrlich 種苗をご恵与下さいました名古屋市立大学薬学部薬化学教室、川添豊教授並びに有益なご助言を賜りました三重大学医学部第2外科教室、入山圭二助教授に深謝します。

本文は1995年9月日本プロポリス協議会研修会の講演内容をまとめたものである。

(鈴木, 高井, 小出: 〒510-02 鈴鹿市白子町鈴鹿工業高等専門学校応用物質工学専攻科; 山本: 〒467 名古屋市名古屋市立大学薬学部)

## 引用文献

- Hand, T., et al. 1967. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 26:18-23.
- 日野志郎. 1972. 臨床検査講座. 医歯薬出版. pp. 143-144.
- 川井芳文ら. 1987. *フレグランスジャーナル* 83:29-33.
- 小出元紀ら. 1994. 日本癌学会第53回総会講演要旨集.
- Lowry, O. H., et al. 1951. *J. Biochem.* 193:265-275.
- 松野哲也. 1992. *ミツバチ科学* 13(2):49-54.
- Metcalf, D. 1975. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 73:113-120.
- Mizutani, A., et al. 1975. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 28:220-235.
- Mizutani A., et al. 1978. *Gann.* 69(3):291-297.
- 中村敏. 1995. 日本プロポリス協議会会報10:53-69.
- Nanba, K., et al. 1994. *Blood* 83:2480-2488.
- 酒井達弥ら. 1994. 第7回日本生化学会大会講演要旨集.
- 杉谷毅ら. 1994. 日本薬学会第114年会講演要旨集.
- Suzuki, I., et al. 1975. *J. Biochem.* 78(4):697-703.
- 高井英之ら. 1995. 日本癌学会第54回総会講演要旨集.

Tuji, K. et al. 1992. *Blood* 74: 2855-2860.  
Yamamoto, H., et al. 1981. *Chem. Pharm. Bull.* 29 (11): 3298-3304.  
Yamamoto, H., et al. 1982. *Chem. Pharm. Bull.* 30 (6): 2133-2140.

SUZUKI, I.<sup>1)</sup>, H. TAKAI<sup>1)</sup>, M. KOIDE<sup>1)</sup> and H. YAMAMOTO<sup>2)</sup>. Anti-tumor effect of the immuno-activity fractions obtained from Brazilian water soluble propolis, given in combination with anticancer drug in Ehrlich carcinoma bearing mice. *Honeybee Science* (1996) 17 (1): 1-6.

1) Advanced Applied Chemistry and Material Science Course, Suzuka College of Technology, Mie, 510-02 Japan, 2) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, Nagoya, 467 Japan.

In the case of 400 $\mu$ g/mouse dose injection of water soluble propolis for consecutive 34 days into hypoderm, the inhibition rate was

85% and 3 mice out of 6 showed disappearance of tumor. With 200 $\mu$ g/mouse injection for consecutive 34 days into hypoderm, gel filtration fraction G-I showed 93.2% inhibition and the tumor disappeared in 4 mice out of 6. With fraction G-II the inhibition rate was 85% and 1 mouse out of 6 showed disappearance of tumor. Resisting tumor activity ( $P < 0.01$ ) was admitted in both cases. Recovery effect of leukopenia resulted from the interperitoneal injection of anti-cancer medicine Mitomycin C (MMC, 1mg/kg/day  $\times$  34 times) was examined. Inject MMC together with the water soluble propolis (13.33 mg/kg/day  $\times$  34 times), gel filtration fraction G-I, G-II or G-III (3.33mg/kg/day  $\times$  34 times) into the hypoderm resulted in that numbers of white, corpuscles and platelets were significantly different compared to the control group in which only MMC was injected. Propolis and their fractions showed the recovery effect of leukopenia.

