

生化学的作用からみたプロポリスの品質評価

佐藤 利夫・藤本 琢憲

プロポリスはミツバチが周辺の種々の樹木などから集めてきた樹脂とミツバチ自身の腺分泌物を混ぜて作った天然物質であり、主に巣を作るときの接着剤、あるいは外敵（病原菌・ウィルス・害虫など）からミツバチ自身や巣を守るために使用していると考えられている。このプロポリスと人間の係わりは非常に古く、紀元前300年頃には、すでに皮膚病や感染症の治療に用いられたとの記録がある。特に東ヨーロッパなどでは、今日に至るまで民間薬として重用されてきた。

一方プロポリスの薬理作用に関しては、20世紀以前には、もっぱら使用経験からの伝聞が主なもので、学術的な解明は20世紀後半になってやっと始まったと考えられる。Ghisalberti (1979) の総説にも見られるようにプロポリスには抗菌作用、抗ウィルス作用、抗潰瘍作用、抗アレルギー作用、抗炎症作用、抗癌作用などがあることが明らかにされている。

我国においても最近、プロポリスの持つ様々

な生理活性が注目され、健康食品として数多くの業者から市場に販売され、一大ブームを巻き起こしつつあるように見える。しかしながらプロポリスは、前述したようにミツバチが多様な植物相を背景に収集した混合物質を更に自身の分泌物と混ぜて製したものであり、その成分の不均一性は漢方薬等に用いられている薬用植物の抽出物よりも更に大きいものと考えられる。

製造物責任を求めるPL法が平成7年7月から施行され、製造物の安全性に関する製造者の責任は極めて重いものとなってきたが、こうした中で、プロポリス製品の安全性を確保するための方法論の開発に対する要請の声が高くなってきた。実際これまでプロポリスには様々な薬理活性が言われている中で、プロポリスに起因する毒性と思われる副作用も何例か知られてきた。その主なものは、アレルギーの発症である。プロポリスには抗アレルギー作用があることを考えると一見奇異に感ずることであるが、プロポリスに抗アレルギー活性があるとする文献を

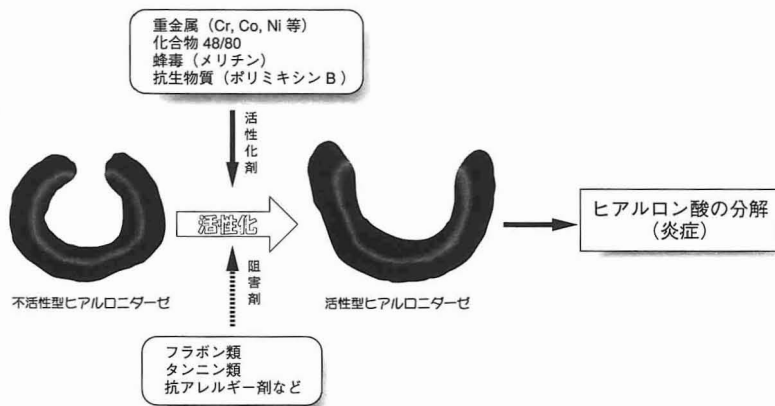


図1 ヒアルロニダーゼの活性化と阻害

よく読んでみると、プロポリスの一成分とされるフラボノイドに抗アレルギー作用が認められることから、プロポリスにその活性があるものと推測したものであって、プロポリスそのものの抗アレルギー活性を調べたものではないことが判明した。

一方筆者らは、これまでにヒアルロン酸加水分解作用があり、起炎作用を示すヒアルロニダーゼが、肥満細胞からアレルギーの原因となるヒスタミンを遊離させることが知られている化合物 48/80 や蜂毒メリチンによって活性化され、かつ、このヒスタミン遊離反応を阻害する

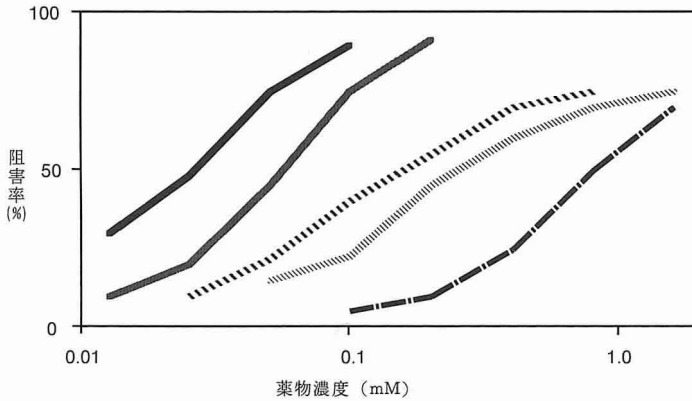
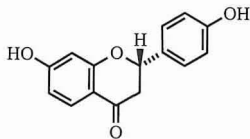
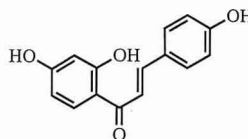


図2 各種天然薬物によるヒアルロニダーゼの阻害

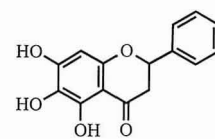
———：インタール - - - - -：イソクイリチゲニン - - - - -：バイカレイン
：トラニラスト - · - · - ·：クイリチゲニン



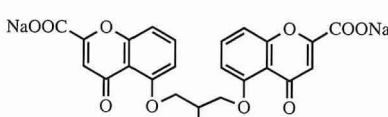
クイリチゲニン



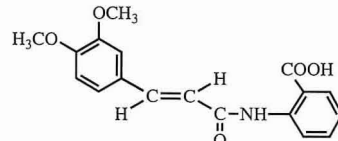
イソクイリチゲニン



バイカレイン



インタール



トラニラスト

	IC ₅₀ (μM)	
	抗原 (1 × 10 ⁻³ g/ml)	化合物 48/80 (1 × 10 ⁻⁶ g/ml)
クイリチゲニン	720	864
イソクイリチゲニン	28	169
バイカレイン	160	217
トラニラスト	680	1000

図3 各種天然化合物によるヒスタミン遊離阻害活性

抗アレルギー剤であるクロモグリク酸ナトリウムやトラニラストによって阻害されることを明らかにしてきた (図 1, 2, 3)。

このようにアレルギー発症性化合物によって活性化され、かつ、抗アレルギー作用を有する化合物によってその活性が阻害されるヒアルロニダーゼに対するプロポリス製剤の作用を調べれば、当該プロポリス製剤の品質をその抗アレルギー作用および副作用であるアレルギー発症の両面からチェックできることになり、プロポリスの品質評価法として適切な方法であると思われる。本報では各種プロポリス製剤について、ヒアルロニダーゼに対する作用を調べると同時に、直接、肥満細胞からのヒスタミン遊離に対する作用も併せて検討することとした。

実験方法

実験材料および試薬

プロポリスは、日本プロポリス協議会から提供されたプロポリス原塊 (ブラジル産のものは、ユーカリ、アレクリン、パラナ松等背景植物相の明らかなもの、中国産のものは、原産省の明らかなもの) を後述の条件でエタノール抽出したものをを用いた。ヒアルロニダーゼ (牛糞丸由来、タイプIV-S)、化合物 48/80 はシグマ社から購入した。

抗アレルギー剤トラニラストは徳島文理大学薬品製造化学教室で合成したものを使用したが、その他の試薬は和光純薬(株)から購入して用いた。

ヒアルロニダーゼ活性の測定

ヒアルロニダーゼ活性の測定はモルガン-エルソン法を一部改変した文理大法によった。この際のヒアルロニダーゼ活性化剤としては化合物 48/80 を用いた。

ヒアルロニダーゼ阻害活性の測定

各種濃度の被験プロポリスとヒアルロニダーゼ (390 単位) を 0.1M 酢酸緩衝液 (pH3.5) に溶解したものを 37°C、20 分間保温しておく。次に化合物 48/80 (0.1mg/ml) を含む酢酸緩

衝液を加え更に 20 分間 37°C で加温した。さらにヒアルロン酸カリウム (0.6mg/ml) を含む酢酸緩衝液を加えて、37°C で 40 分間反応させた。反応停止後、発色させ 585nm における吸光度 (OD) を測定し、酵素活性の指標とした。阻害率は次式に従って算出した。

$$\text{阻害率(\%)} = \frac{\text{コントロールのOD} - \text{サンプルのOD}}{\text{コントロールのOD}} \times 100$$

ラット腹腔浸出細胞の採取

体重 200~250g のウイスター系雄性ラットを断頭致死させ、その腹腔内に 137mMNaCl, 2.7mM CaCl₂, 1.0mMMgCl₂·6H₂O, 5.0mM グルコース、ヘパリン (1 単位/ml) を含む 5 mM リン酸緩衝液 (pH7.2) 20ml を注入した。腹部を 2 分間マッサージした後、腹腔内液を取り出した。この肥満細胞含有液を 300xg で 4°C、5 分間遠心分離し、上記生理塩類溶液で数回洗浄して、肥満細胞液を得た (5×10⁴ 細胞/ml)。

化合物 48/80 により肥満細胞から遊離したヒスタミン量の測定

2.5ml の肥満細胞液と上記生理塩類溶液 0.5 ml に溶解したプロポリスとを混合し、37°C、5 分間加温した。これに 0.5ml の化合物 48/80 溶液 (1×10⁻⁵g/ml) を加えて 37°C、10 分間処理した。その後、4°C に冷却し、2,500×g で遠心分離した。その後上清および沈渣に含まれるヒスタミン量を Shore et al. (1959) の方法により測定し、阻害率を次式に従って算出した。

$$\text{ヒスタミン遊離率(\%)} = \frac{P_s}{P_r + P_s} \times 100$$

P_s: 上清中のヒスタミン量

P_r: 沈渣中のヒスタミン量

$$\text{阻害率(\%)} = 100 - \frac{S - B}{C - B} \times 100$$

S: 供試プロポリスサンプルを使用した場合のヒスタミン遊離率 A

C: プロポリスを使用しない場合のヒスタミン遊離率 A

B: プロポリスおよび遊離剤を使用しない場合のヒスタミン遊離率 A

表1 産地及び抽出条件によるプロポリスのヒアルロニダーゼ阻害作用の差異

プロポリス 試料	産地	抽出条件	阻害率(%)		
			プロポリス濃度(%)		
			0.01	0.05	0.1
A	中国	エタノール 99.5%	0	25	12
B	中国	エタノール 60%	0	26	33
C	中国	ヘキサン処理 エタノール 99.5%	-10	29	32
X	ブラジル	エタノール 99.5%	-10	34	38
Y	ブラジル	エタノール 60%	0	51	80
Z	ブラジル	ヘキサン処理 エタノール 99.5%	-7	52	70

結果および考察

プロポリスのヒアルロニダーゼ阻害作用に基づく品質評価(I)

まず最初にブラジル産(ユーカリ系)および中国産(安徽省)プロポリス原塊を99.5%エタノールで抽出したもの、60%エタノールで抽出したもの、およびヘキサンで前処理した後、99.5%エタノールで抽出したサンプルについてヒアルロニダーゼ阻害活性を調べた。結果を表1に示す。

中国産プロポリスの場合99.5%エタノール抽出物は0.05%濃度で25%の阻害を示したものが0.1%では12%の阻害率で、濃度依存性が見られなかったのに対し、60%エタノールの場合あるいはヘキサン処理エタノール抽出の場合では、0.05%濃度で26~29%、0.1%濃度で32~33%とほぼ同等の活性を示した。

これに対し、ブラジル産の場合では、99.5%エタノール抽出物は中国産のエタノール抽出物と大差がないものの、60%エタノールあるいはヘキサン処理エタノール抽出の場合では、明らかに強い阻害活性が濃度依存的に出ていることが観察された。

プロポリスのヒアルロニダーゼ阻害作用に基づく品質評価(II)

上記結果から60%エタノール抽出物が最も

強い阻害活性を示すことが明らかになったので、この抽出条件を用いてブラジル産12種、中国産7種とコントロールとして日本産1種のプロポリス原塊を抽出し、それぞれのヒアルロニダーゼ阻害活性を求めた。結果を表2に示す。

表2 産地及び植物相によるプロポリスのヒアルロニダーゼ阻害作用の差異

試料	産地	植物相 (地域)	阻害率(%)					
			プロポリス濃度(%)					
			0.01	0.03	0.1	平均		
A	ブラジル	パラナ松系	0	6	23	23		
B	"		0	5	22			
C	"		0	24	88			
D	"		4	31	89			
E	"	ユーカリ系	2	23	88	88		
F	"		1	18	85			
G	"		1	24	88			
H	"		5	24	88			
I	"		4	23	87			
J	"		6	29	88			
K	"		アレクリン系	2	27		89	89
L	"			3	42		90	
M	中国	河北省	0	16	58	52		
N	"	河南省	4	15	42			
O	"	江蘇省	0	10	39			
P	"	四川省	3	14	44			
Q	"	浙江省	5	22	58			
R	"	安徽省	5	20	67			
S	"	湖北省	4	19	55			
T	日本	秋田県	0	12	44		44	

表3 産地及び抽出条件によるプロポリスのヒスタミン遊離阻害作用の差異

試料	産地	抽出条件	抽出率 (%)	比吸光度 ($E_{1cm}^{1\%}$)	阻害率(%)		
					プロポリス濃度(%)	0.01	0.05
プロポリス A	中国	エタノール 99.5%	67	376	64	15	-95
B	中国	エタノール 60%	51	446	51	11	-89
C	中国	ヘキササン処理 エタノール 99.5%	66	308	52	5	-89
X	ブラジル	エタノール 99.5%	44	248	18	84	84
Y	ブラジル	エタノール 60%	33	307	96	91	34
Z	ブラジル	ヘキササン処理 エタノール 99.5%	26	331	30	91	84

各々の平均値でみてみると同じブラジル産でも背景となる植物相によって大巾な変動が見られた。すなわち 0.1%濃度のプロポリスではパラナ松系が 23%、ユーカリ系が 88%、アレクリン系が 89%の阻害率を示し、パラナ松系とユーカリ（またはアレクリン）系とでは、明らかな差異を示した。また個々の植物相が同じ場合にはその阻害活性のバラツキが極めて小さいことも特筆に値すると思われる。この方法を用いれば、パラナ松系ブラジルプロポリスとユーカリ（またはアレクリン）系ブラジルプロポリスの識別も可能であると考えられた。一方中国産プロポリスの場合は、産地により若干のバラツキが見られ、0.1%の阻害率でみると 39~67%の阻害率であったが、この阻害率はブラジル産ユーカリ、アレクリン系に較べてかなり弱い活性であった。また、日本産は検体は一種だけであったが中国産と極めて近い活性を示した。

プロポリスのヒスタミン遊離阻害作用に基づく品質評価(I)

ヒアルロニダーゼ阻害活性を測定した同一サンプルについてヒスタミン遊離阻害活性を検討した(表3)。表3には抽出条件による抽出率および抽出物の 300nm における比吸光度を併記した。まず抽出率では中国産の抽出率は 50~60%であるのに対し、ブラジル産は 30~40%と抽出率が低いことが明らかとなった。一方

300nm における比吸光度は明らかに中国産の方が高かった。プロポリスの含有成分から考えて、この 300nm における吸光物質はフラボノイド（一部カフェ酸誘導体）によるものと考えられるが、この値が中国産の方がブラジル産に較べて大きいことは、前者の方がフラボノイド含量が高いことを示している。これまでプロポリスの主要な生理活性はこれに含まれているケルセチン等のフラボノイドによると考えられてきたが、表3の結果から見ると、この考え方は必ずしも適切ではないと思われる。すなわちヒスタミン遊離阻害活性は中国産では、濃度 0.03%の時に 50~60%とほぼ一定なのに対し、中国産より比吸光度の低いブラジル産プロポリスは 18, 96, 30%とばらつきが見られた。0.1%の濃度では中国産は濃度が 3 倍になっているにもかかわらず活性の低下が見られるのに対し、ブラジル産では 80~90%と高値を示した。さらに 0.3%濃度では、中国産のプロポリスは約 90%の値を示している。このことは対照群に較べてヒスタミン遊離率がほぼ 2 倍に高まることを意味している。したがってここで用いた中国産プロポリスは、明らかにヒスタミン遊離阻害作用とヒスタミン遊離作用という二面性を持ち合わせており、高濃度ではアレルギーを発症させる危険性を示唆するものである。一方本実験に使用したブラジル産はこのような極端な傾向は見られなかったことから、プロポ

表4 植物相の異なるブラジル産プロポリスのヒスタミン遊離阻害作用 (60%エタノール抽出)

試料	産地	抽出条件	抽出率 (%)	比吸光度 ($E_{1cm}^{1\%}$)	阻害率 (%)	
					プロポリス濃度 (%)	
					0.01	0.1
A	ブラジル	パラナ松系	35	216	86	96
B	"	"	38	362	34	100
C	"	ユーカリ系	33	362	71	100
D	"	"	29	317	59	95
E	"	"	38	335	72	99
F	"	"	28	297	43	97
G	"	"	33	338	55	87
H	"	"	41	322	42	98
I	"	"	40	315	52	98
J	"	アレクリン系	39	362	81	96
K	"	"	41	341	44	97
L	"	"	38	406	51	99

リス中にはヒスタミン遊離阻害物質とヒスタミン遊離物質が別々に存在することが推定された。したがって本法を用いれば、アレルギーを発症する危険性を持ったプロポリスをこの段階で見分けることが可能であると考えられる。

プロポリスのヒスタミン遊離阻害作用に基づく品質評価(II)ブラジル産プロポリス

全部で12種のブラジル産プロポリスを検討したが、パラナ松系、ユーカリ系、アレクリン系を問わず抽出率はほぼ一定で30~40%台であった(表4)。ヒスタミン遊離阻害活性はヒアルロニダーゼの場合よりもかなり強く0.01%濃度でも平均60%近い阻害を示し、0.1%ではほぼ完全な阻害活性を示した。特筆すべきこと

は、パラナ松系の試料Aにおいて、比吸光度が低く(したがってフラボノイド含量も低い)ヒアルロニダーゼ阻害活性も著しく低かったにもかかわらず、ヒスタミン遊離阻害活性は0.01%で86%と極めて強い活性が見られたことである。このことは従来言われてきたプロポリスの抗アレルギー活性はフラボノイドによるものとする見解に相反するものであり、プロポリス中にはフラボノイド系以外の強力な抗アレルギー物質が存在していることを示唆している。著者らの研究室で目下この活性化化合物の単離・構造解析を進めているところである。

プロポリスのヒスタミン遊離阻害作用に基づく品質評価(III)中国各省産および日本産プロポリ

表5 中国各省産及び日本産プロポリスのヒスタミン遊離阻害作用の差異

試料	産地	抽出条件	抽出率 (%)	比吸光度 ($E_{1cm}^{1\%}$)	阻害率 (%)	
					プロポリス濃度 (%)	
					0.01	0.1
M	中国	河北省	56	419	0	91
N	"	河南省	36	352	3	90
O	"	江蘇省	50	412	-10	98
P	"	四川省	42	435	-8	98
Q	"	浙江省	48	411	10	99
R	"	安徽省	50	423	-7	95
S	"	湖北省	46	440	-4	95
T	日本	秋田県	57	362	-7	73

表6 プロポリスのヒスタミン遊離阻害作用に基づく品質評価 (総括)

産地	60%エタノール 抽出率(%)	フラボノイド含量 (E _{1cm} ^{1%}) (300nm)	阻害率(%)	
			プロポリス濃度(%) 0.01	0.1
パラナ松系	37	218	60	98
ブラジル産ユーカリ系	36	327	56	96
アレクリン系	39	370	59	97
中国産 (7種平均)	47	413	-2	95
日本産 (1種)	57	424	-7	73

ス

中国産、日本産ともに抽出率40~50%台とブラジル産に較べて高値を示した(表5)。また表3と同じように300nmにおける比吸光度が高いので、フラボノイド含量もブラジル産より高いと思われるが、ヒスタミン遊離阻害作用は、ブラジル産に較べると全般的にやや低い値を示した。ただし、今回の実験に使用した7種の中国産プロポリスには、アレルギー発症の危険性を示唆するヒスタミン遊離増強作用は見られなかった。

プロポリスのヒスタミン遊離阻害作用に基づく品質評価 総括

表6にブラジル産、中国産(日本産)プロポリスの抽出率、フラボノイド含量、ヒスタミン遊離阻害率の平均値を示した。これらとヒアルロニダーゼ阻害活性とを参考にすれば、ブラジル産と中国産の判別は容易であるし、さらに同じブラジル産でもパラナ松系とユーカリ(アレクリン)系との区別も容易に行えるものと思われる。さらに例えばヒアルロニダーゼおよびヒスタミン遊離阻害に対する50%阻害濃度の標準値を設定しておけば、プロポリス製品の生化学的品質評価ができると同時に、アレルギー発症の危険性を持つ製品を未然に除去することも可能であると思われる。

(佐藤: 〒770 徳島市山城町西浜傍示180 徳島文理大学薬学部, 藤本: 〒194 町田市東玉川学園3 昭和薬科大学)

参考文献

- Davidson, E. A. et al. 1969. J. Biol. Chem. 242: 439.
 Ghisalberti, E. L. 1979. Bee World 60:59.
 Satoh, T. et al. 1985. Chem. Pharm. Bull. 33: 642.
 Satoh, T. et al. 1988. Planta Med. 54:385.
 Satoh, T. et al. 1992. Chem. Pharm. Bull. 40: 1439.
 Shore P. A. et al. 1959. J. Exp. Ther. 127:182.
 SATOH, T.¹⁾, and T. FUJIMOTO.²⁾ Biochemical evaluation of propolis for its quality control. *Honeybee Science* (1996) 17 (1):7-13.
 1) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri Univ., Yamashiro-cho, Tokushima, 770 Japan. 2) Showa College of Pharmaceutical Sciences, 3-3165 Higashi-Tamagawa Gakuen, Machida, 194 Japan.

Evaluation of various kinds of Brazilian and Chinese propolis was performed on their inhibitory effects toward hyaluronidase and histamine release from rat peritoneal mast cells.

The Brazilian propolis showed stronger hyaluronidase inhibitory effect than Chinese ones except in the case of the propolis derived from Brazilian Araucaria. On the other hand, all of the Brazilian propolis showed stronger inhibition of histamine release than Chinese ones and one of Chinese propolis even activated histamine release from mast cells. These facts meant these two assay methods could attributable for the evaluation of physiological activity of propolis and detect their adverse side effect simultaneously.