

## プロポリスのマクロファージ活性化作用と 癌転移抑制効果実験について

新井 成之・栗本 雅司

蜂の巣由来の物質プロポリスは民間伝承薬として長い歴史を有し、さまざまな効果も知られている (Debiaggi et al., 1990; Scheller et al., 1989). 我々は、プロポリスを持つ生物学的作用について明らかにすべく、いくつかの方面から研究を進めている。プロポリスを構成する成分、またそれぞれの持つ薬理作用については、これまでかなり明かになっているが、プロポリスとしてとらえてみた場合、その産地によって構成成分が異なり、その生物学的な作用も異なることが考えられる。林原生物化学研究所では、ブラジル産のプロポリスを用い、できるだけ民間で使われるものに近い状態で、プロポリスの持つ生物学的作用を、特に、生体の免

疫機能に関係する面から明かに、強いていえば作用を確認すべくこれまでにいくつかの実験を行ってきたのでここに紹介する。

### I. プロポリスのマクロファージ 活性化作用

#### 1. 実験用プロポリスの調製

ブラジル産プロポリス原塊よりエチルアルコールと蒸留水にてエキスを抽出し、無水結晶マルトース（ファイントース）を用いて粉末散剤化した。本散剤は、プロポリス由来の成分を固形分として 13.75% 含み、培地または蒸留水などに対して分散性が良い。in vitro の実験には、このプロポリス散剤 40mg を正確に計

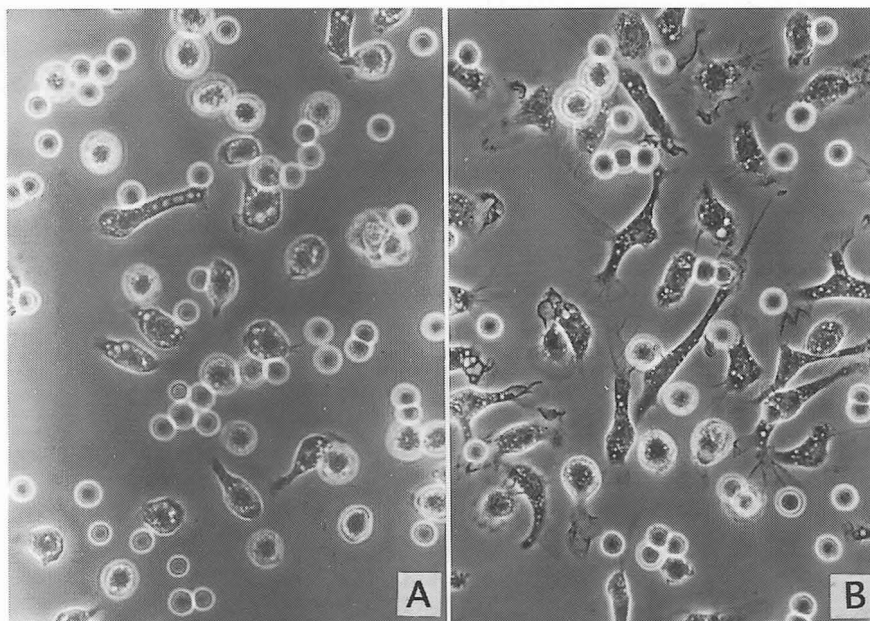


図1 プロポリス散剤によるマクロファージ伸展機能の活性化 (BALB/c マウス)  
A. 対照, B. プロポリス散剤濃度 0.25mg/ml, 3 時間感作

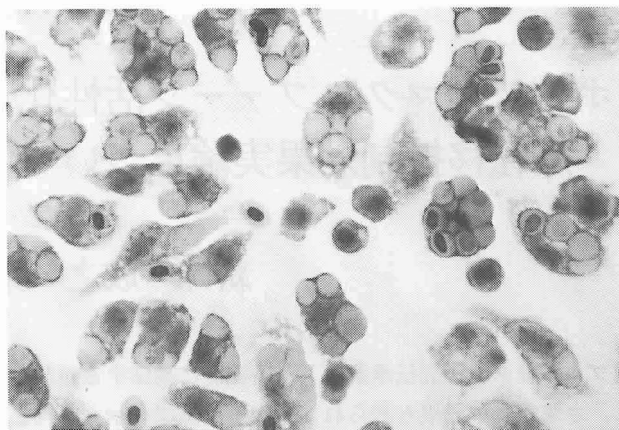


図2 鶏赤血球貪食マクロファージ（ギムザ染色）プロポリス散剤濃度 0.25mg/ml

り、注射用滅菌蒸留水 1ml で分散する。これに RPMI1640 培地（10%FCS 加）9ml を加え混和した後、膜孔径 0.22 $\mu$ m で濾過滅菌したものを実験用プロポリス原液とした。本溶液は LPS（Lipopolysaccharide: 発熱物質）テスト陰性で、試験に際しては散剤濃度でプロポリス用量を表示し、対照には同様に処理した無水結晶マルトースを用いた。

## 2. *in vitro* 試験に用いたマクロファージ

BALB/c および C3H/HeN マウスの 8～9 週齢を日本チャールスリバーより導入、炭酸ガス吸入致死せしめた後、脱血、腹腔を RPMI 1640 培地で洗浄することにより腹腔常在細胞（マクロファージ）を回収した。

## 3. マクロファージの機能測定

プロポリスのマクロファージ機能に及ぼす作用は、伸展、赤血球貪食能、遊走機能とサイトカイン、窒素酸化物（NO）の産生に与える影響を調べた。

### a. マクロファージ伸展能に及ぼす影響

回収した細胞をガラスチャンバー（Nunc 社, Lab teck チャンバー）に播種、1 時間後に、非付着細胞を洗浄により除去し、付着細胞をマクロファージとして試験に用いた。また、これらの細胞はラテックス粒子貪食率 98%以上であることを確認した。これらの細胞に対して、プロポリス散剤の濃度が 0～1.0mg/ml になるように含調製した培地を添加し、継続的に顕微鏡下で形態を観察した。対照には無水結晶マルトースを使用した。

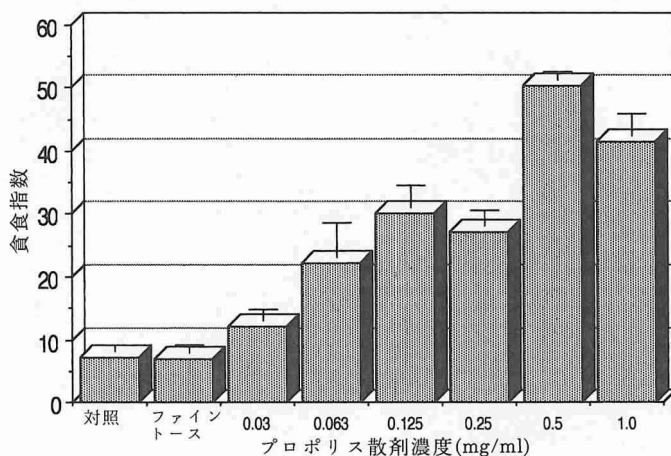


図3 プロポリス散剤のマクロファージ貪食機能に及ぼす影響

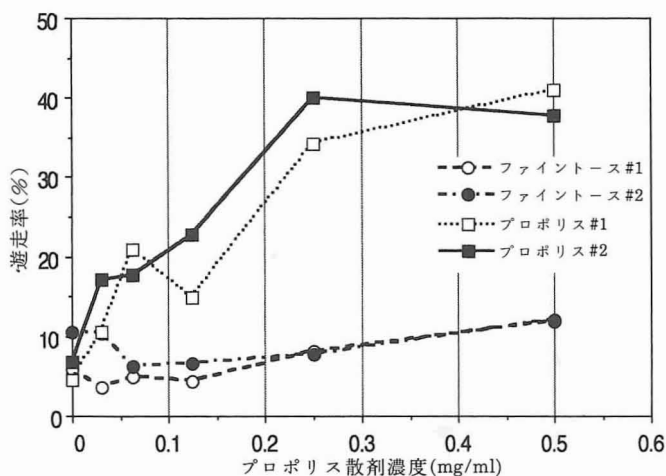


図4 プロポリス散剤のマクロファージ遊走活性に及ぼす影響

プロポリス散剤溶液を感作させたマウス腹腔マクロファージの形態的変化を図1の写真に示した。プロポリス散剤濃度 0.25mg/ml のもので、感作後約 30 分から細胞質の伸展が認められるようになり、3 時間後には写真に示したように、対照に比べ細胞が大きく伸展しているのが明かである。この現象は、プロポリスの濃度と時間に相関し、用量反応関係が認められる。

#### b. マクロファージ貪食機能に及ぼす影響

プロポリス散剤 0~1mg/ml の濃度でガラスチャンバー内で 24 時間感作したマクロファージに対し、鶏赤血球を添加、2 時間後に取り

込まなかった赤血球を洗浄除去した。細胞を固定、ギムザ染色した後、顕微鏡下で赤血球を取り込んだマクロファージをカウントし、赤血球貪食指数を算出した。

活発に鶏赤血球を取り込んだマクロファージを図2に示した。図3にはプロポリス散剤によって活性化したマクロファージの鶏赤血球貪食をグラフにて示した。プロポリス散剤の用量に応じて赤血球の取り込みが上昇している。

#### c. マクロファージ遊走活性に及ぼす作用

腹腔より回収した細胞を膜孔径 8 $\mu$ m のトランスウェルチャンバー（コーニング）内に播種、プロポリス散剤 0~0.5mg/ml の濃度で約 6 時

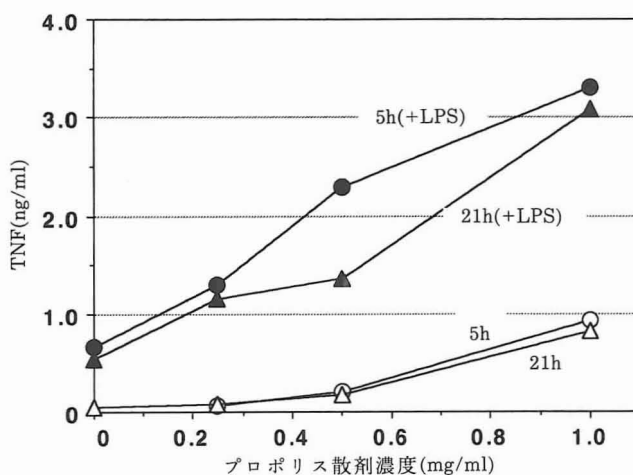


図5 プロポリス散剤のマクロファージ由来サイトカイン (TNF) 産生に及ぼす影響

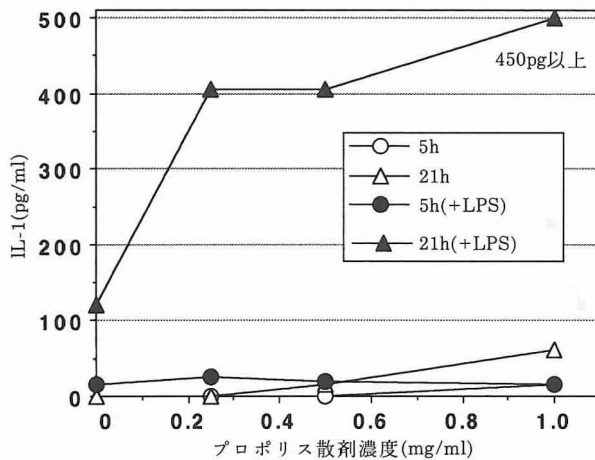


図6 プロポリス散剤のマクロファージ由来サイトカイン (IL-1) 産生に及ぼす影響

間感作した。膜の上面から下面に移動した細胞を顕微鏡下で数え、遊走した細胞の割合を算出した。実験は2度行った。図4に示すように、対照（ファイトース）はどの濃度においても10%以下の遊走率であるのに対し、プロポリス散剤は0.25mg/mlまで濃度依存的に遊走率は上昇し、0.25および0.5mg/mlでは対照の約3倍から4倍の値を示した。

#### d. マクロファージからのサイトカインおよび窒素酸化物産生に及ぼす影響

マウス腹腔マクロファージ ( $1.3 \times 10^5$ /well) に対し、プロポリス散剤 (1.0, 0.5, 0.25mg/ml) および LPS (0.1 $\mu$ g/ml) を添加し、プロポリスまたは LPS 単独刺激 (5, 21 時間)、プロポリスおよび LPS 同時刺激 (5, 21 時間) の条件で培養した後、培養上清を回収した。

培養上清中のサイトカインは、腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ )、インターロイキン-1 (IL-1 $\alpha$ ) をマウス TNF- $\alpha$  ELISA KIT (Genzyme) およびマウス IL-1 $\alpha$  ELISA KIT (Genzyme) を用いて測定した。また、窒素酸化物 (NO) は、酸化物である亜硝酸イオンとして測定するため、Griess 試薬 (1% sulfanilamide, 2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% naphthyl ethylenediamine dihydrochloride) を培養上清に等量添加し、550nm の吸光度を測定した。

マクロファージをプロポリス散剤単独で感作

したときは、TNF- $\alpha$  および IL-1 $\alpha$  の産生はほとんど認められなかった。しかし、プロポリス散剤存在下で LPS 刺激すると、両サイトカインはプロポリス散剤の濃度に依存して増加した。図5に示すように TNF の産生は、刺激後5時間までに終了していた。プロポリス散剤1mg/mlの添加で約900pg/ml、また、LPS 0.1mg/mlで約600pgのTNF産生が認められた。LPSと共にプロポリス散剤を同時添加すると、LPS単独と比べて、相乗的にまたプロポリス散剤濃度依存的にTNF産生が促進された。さらに、プロポリス散剤感作の後、LPS刺激すると、LPS刺激によるTNF産生量は増大した。逆に、LPS刺激の後、プロポリス刺激してもTNF産生量は変わらなかった。

図6には、IL-1産生に及ぼすプロポリス散剤の影響を示した。IL-1は、刺激後5時間目以降、21時間目までに産生されていた。プロポリス単独刺激では、IL-1産生はほとんど認められなかった。LPSとプロポリス散剤を同時に添加するとLPS単独と比べて、相乗的にまたプロポリス散剤の濃度に依存してIL-1の産生が促進された。図7に示すように、NOもプロポリス散剤単独では産生されなかったが、逆にLPS刺激で産生されるNO量をプロポリス散剤は濃度依存的に抑制した。また、この抑制作用はLPSとプロポリスが共存していなくて

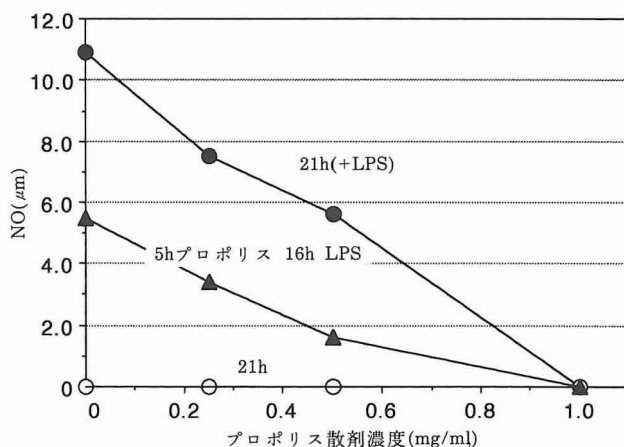


図7 プロポリス散剤のマクロファージ由来細胞傷害性因子 (NO) 産生に及ぼす影響

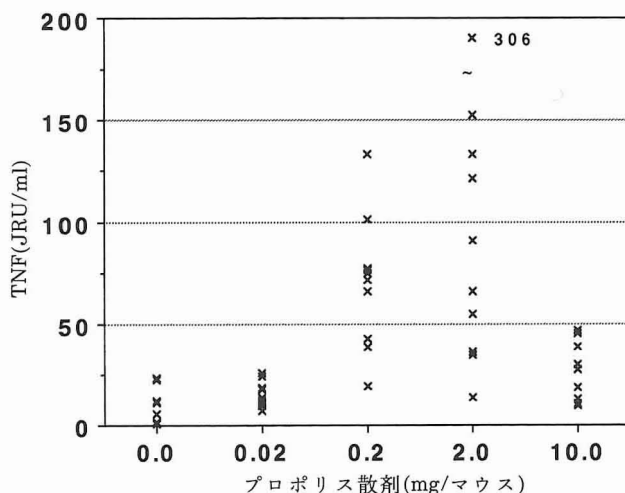


図8 プロポリス散剤のマウス血中サイトカイン (TNF) 産生に及ぼす影響

も、あらかじめプロポリス散剤にて感作した後に洗浄したマクロファージでも認められることから、NO スカベンジャー作用ではなく、産生抑制であることが明かになった。

#### 4. マウス血中サイトカインの産生誘導作用

C3H/HeN マウスに 0.02~10mg/マウスのプロポリス散剤溶液を尾静脈より投与し、3 時間後に LPS を 1.0μg/マウス、投与 (i.v.) する。さらに 2 時間後に採血、血清を分離し、TNF 活性を Bioassay で求めた。あわせて、プロポリス単独投与後 3 および 5 時間目の TNF 活性も測定した。LPS を 1μg の用量で、単独マウスに静脈内投与すると、2 時間後の血清中に  $11.1 \pm 8.8$  JRU/ml の TNF 活性が認め

られた。図 8 に示すように LPS 投与 3 時間前にプロポリスを投与しておくと、対照群と比較して有意に血中 TNF 値の上昇が認められた。血中 TNF 値は、プロポリス散剤を 0.2 および 2.0mg/マウス投与したときに特に有意に上昇し、10mg/マウスでは上昇の割合は低下した。血中 TNF 値の上昇が認められた 0.2 および 2 mg/マウスのプロポリス散剤を単独で静脈投与し 3 および 5 時間後の血中 TNF 活性を測定したところ、TNF 活性は検出されなかった。また、あわせて測定した血中のインターフェロン (IFN) 活性は、LPS 投与 3 時間前にプロポリス散剤を投与しておくと、対照群と比較して用量依存的に上昇する傾向があり 10mg/マウ

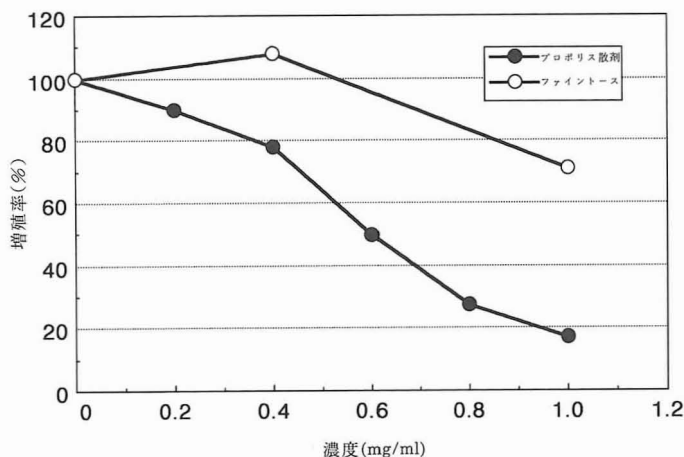


図9 プロポリス散剤のマウス結腸癌 Colon 26 の増殖に及ぼす影響 (*in vitro*)

スで最も高い値を示した。また、IFN 活性は LPS やプロポリス散剤の単独投与では検出されなかった。

## II. プロポリスの癌転移抑制作用

マウス結腸癌細胞 Colon 26 を用いた実験的癌肺転移モデルを使用した。

### 1. *in vitro* 増殖抑制試験

実験に先立ち、*in vitro* における Colon 26 細胞に対するプロポリスの増殖抑制効果を調べた。Colon 26 細胞を RPMI1640 (10%FCS), 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 存在下でプロポリス散剤 0~1.0 mg/ml と共に 5 日間培養し、各プロポリス濃度における腫瘍細胞数をカウントし、無処置対照に対する増殖率 (%) で評価した。

図9にマウス結腸癌細胞株 Colon 26 の *in vitro* における増殖に対するプロポリス散剤の

影響を示した。5 日間の培養条件下においてプロポリス散剤は濃度依存的に Colon 26 細胞の増殖を抑制し、直接的な作用のあることが明らかになった。

### 2. プロポリスの癌転移抑制作用

#### スクリーニング

BALB/c マウス、雌、7 週齢を用い、Colon 26 細胞を尾静脈から移植する実験的肺転移モデルを使用した。移植細胞数を  $3 \times 10^3$  および  $1 \times 10^4$  に設定した実験的肺転移モデルに対して、プロポリス散剤量が 40μg/マウスになるように尾静脈より注射した。実験スケジュールは、プロポリスを 3 日間連日投与した後、Colon 26 を移植、その後、1 日おきに 3 回投与した。移植後 12 日目に肺の転移巣コロニーをカウントした。

表1にプロポリス散剤 0.4mg の用量を用い

表1 プロポリス散剤 (0.4mg) のマウス Colon 26 肺転移抑制作用スクリーニング

群	用 量 i.v. / マウス	肺 転 移 巣 数	
		$3 \times 10^3$ <sup>a)</sup>	$1 \times 10^4$ <sup>b)</sup>
プロポリス散剤	0.4mg/0.2ml	54.3 ± 4.1 (n=13) **	84.3 ± 10.5 (n=20) *
ファイントース	0.4mg/0.2ml	81.7 ± 7.5 (n=13)	117.8 ± 13.3 (n=16)
生 理 食 塩 水	0.2ml	81.9 ± 8.3 (n=15)	127.5 ± 13.0 (n=19)

a), b): 移植した Colon 26 腫瘍細胞数  
 平均値 ± 標準誤差

\*\* ;  $p \leq 0.01$  \* ;  $p \leq 0.05$

表2 プロポリス散剤のマウス Colon 26 肺転移抑制作用

群	用 量 i.v. / マウス	動物数	肺転移巣数 平均値±標準誤差
プロポリス散剤	0.1mg/0.2ml	13	94.7 ± 13.7
	0.2mg/0.2ml	13	66.1*± 9.6
	0.4mg/0.2ml	13	81.0 ± 13.3
ファイントース	0.4mg/0.2ml	13	134.0 ± 6.1
生 理 食 塩 水	0.2ml	13	115.9 ± 15.4

移植 Colon 26 細胞数:  $5 \times 10^3$  個/マウス

\*;  $p \leq 0.05$

て行なった癌転移抑制作用のスクリーニングの結果を示した。移植細胞数を  $3 \times 10^3$  および  $1 \times 10^4$  個で設定したマウス Colon 26 実験的肺転移モデルに対して、プロポリス散剤の 0.4mg を Colon 26 細胞移植前後に計 6 回投与することで、肺転移は対照よりも有意に減少した。

### 3. プロポリス散剤投与量の検討

スクリーニングと同様に BALB/c マウス、雌、7 週齢を使用した。プロポリス散剤 0, 0.1, 0.2, 0.4mg/マウスの群を設定した。3 日間プロポリス散剤溶液を静脈内投与した後、Colon 26 細胞  $5 \times 10^3$  を尾静脈から移植した。その後、さらに 3 日間プロポリス散剤溶液を投与した。Colon 26 細胞から 14 日目に肺の転移巣数をカウントした。

表 2 は Colon 26 細胞を  $5 \times 10^3$  で移植する実験的肺転移モデルにおいてプロポリス散剤の至適用量を求めた結果である。プロポリス散剤 0.1, 0.2 および 0.4mg を移植前 3 日より 6 日間静脈内投与することで、肺転移はプロポリス散剤 0.1mg 群で 80% に、0.2mg 群では 57% に、0.4mg 群では 70% に抑制された。

## Ⅲ. ま と め

プロポリスは古来より天然物質として様々な作用や、ある種の疾患に対し効果を示す民間療法薬として知られてきた。プロポリスは、その産生される地域によって、含有成分が異なることは既に知られ、最近では、各種のプロポリスを構成する成分が単離され効果を試験されているが、既知物質を含め単独では大量でないと作用の認められないものも多い。プロポリスの成

分や様々な作用などについては、松田 (1994a, b) の総説があるのでそれを参照していただきたい。我々は、プロポリスの生物学的作用に興味を持ち、各種方面から実験を進めてきたが、実験に際してプロポリスを使いやすい形にするため無水結晶マルトースを用いてプロポリス抽出エキスを散剤化した (守安ら, 1993, 1994)。ワックス成分は含まず、水に対して分散性の良いものを調製し、既知のマクロファージ活性化物質であるエンドトキシンを測定し、その影響のないことを確認した。最終的にはその目的となる作用を示す物質を単離、同定できればと考えるが、これまで現象の確認を中心に進めてきた。そのなかで生体の免疫機能に関係するマクロファージの活性化現象に気がついた。この現象には、プロポリス散剤の至適用量があり BRM (Biological Response Modifiers) 的な用量反応関係を示した。in vitro 試験管内におけるマクロファージの活性化が生体内でどの現象につながるかは、直接的には言及できないが、in vitro 試験において、注射投与ではあるがある種のサイトカインの産生を促進したりする現象が確認されたことは興味深い。さらに、生体内においてプロポリス単独の作用では、サイトカインの産生は認められなかったが、LPS 刺激によって相乗、相加的に産生が促進されていることから、これらサイトカインを産生する免疫担当細胞の賦活化作用の一端がうかがえる。また、プロポリスの癌転移抑制作用については、今回、モデルとして用いたマウス結腸癌細胞株 Colon 26 に対してプロポリス散剤は in vitro で直接的な増殖抑制作用も示すが、マ



ウス生体に投与したプロポリス散剂量は少なく、生体内で直接増殖を抑さえる用量ではない。我々は、プロポリス散剤を投与しておくことによって、マクロファージを主体とする免疫担当細胞の活性化が起こり、肺組織にとって異物である転移癌細胞の着生の阻害、除去が起こった結果、転移巣の減少が見られたと考えている。現在、プロポリス散剤の投与は注射投与であるが、生体に体し、*in vitro*と同様に至適用量があると推察している。プロポリスは色々な作用を持つが、その成分が多種多様で、効果とその作用発現に関係する物質を一つ一つ明かにするのは、極めて困難なことと考えている。幸い、多くの民間療法薬と同様にプロポリスも、その作用の歴史と共に安全性に関する情報も知られている(金枝・仁科, 1994)。現在、我々の実験は*in vitro*の試験や*in vivo*の場合でも注射投与であるが、プロポリスの経口投与によるこれらの作用の確認を今後行ないたいと考えている。

(〒702 岡山市藤崎 675-1

(株)林原生物化学研究所 藤崎研究所)

#### 参考文献

- Debiaggi, M. et al. 1990. Microbiologica 13:207-214.  
 金枝 純, 仁科 保. 1994. ミツバチ科学 15:29-33  
 松田 忍. 1994a. Foods and Food Ingredients Journal of Japan 160:64-73  
 松田 忍. 1994b. ミツバチ科学 15:145-154.  
 守安純子ら. 1993. Biotherapy 7:364-365.  
 守安純子ら. 1994. Biotherapy 8:346-347.  
 Scheller, S. et al. 1989. Z. Naturforsch. 44:1063-1065.

ARAI, SHIGEYUKI and KURIMOTO, MASASHI. Biological effects of propolis on macrophage function and tumor metastasis. *Honeybee Science* (1994) 15 (4): 155-162 Fujisaki Institute, Hayashibara Biochem. Labs., Inc., 675-1, Fujisaki, Okayama, 702 Japan.

Propolis, bee glue obtained from bee hives, is known as a home remedy because of its antimicrobial and antiviral effects. We prepared propolis powder with anhydrous maltose to facilitate its solubility (propolis content: approximately 13.7%). Murine macrophage functions, such as cell adhesion and the subsequent spreading of the cytoplasm, and the motility and phagocytosis of macrophages were significantly activated *in vitro* with propolis at concentrations of 0.03-1.0 mg/ml. Furthermore, *in vitro* Tumor Necrosis Factor (TNF) and Interleukin 1 production of macrophages stimulated with Lipopolysaccharide (LPS) were significantly enhanced by the propolis treatment. Propolis inhibited NO production of LPS-stimulated macrophages in a dose-dependent manner. Mice i.v. injected with propolis prior to LPS administration showed significant increase of serum TNF and Interferon levels as compared to the control group. *In vitro* dose-dependent growth inhibition of murine Colon 26 tumor cell lines was observed in the presence of 0.03 to 1.0mg/ml of propolis.

Using an experimental metastasis model with the Colon 26 adenocarcinoma cell line, BALB/c mice were given 3 i.v. injections of 0.1-0.4 mg propolis per mouse before and after the transplantation of tumor cells. The results showed that only the group pretreated with 0.2 mg of propolis demonstrated a significant reduction (35%) in lung metastasis compared with that of the control group.

These observations indicate that propolis has Biological Response Modifiers like antitumor activities.