

# プロポリスの安全性 — 急性毒性試験 —

金枝 純・仁科 保

プロポリスの利用の歴史は古代ギリシャに遡るほどに古く、12～15世紀には医学専門書に口腔内消炎剤、虫歯の鎮痛剤の処方成分として記載されている。その後の近似的な学術研究もヨーロッパを中心として進められてきた。

日本におけるプロポリスの利用は1985年名古屋で開かれた第30回国際養蜂会議のミツバチ治療学分会において内外の研究発表があり、プロポリスの成分、効能が紹介され、海外の関連商品の展示が行われたことがきっかけとなった。その後、健康食品の素材として国内の需要が急速に伸び、その市場規模は今や末端価格で年間50億円を超えるといわれる。

日本プロポリス協議会では発足以来プロポリスの成分、効能、安全性に関する資料の収集と分析方法の検討、市場品の成分分析を積極的に行い、その成果を会報、検討会、セミナーを通じて会員に発表し、健康食品としての安全で適正な販売、使用方法について業界を指導して健全なプロポリス市場の育成に努めてきた。

しかし、プロポリスの安全性については、いくつかのプロポリスの総説や報告の中に簡単に述べられているのみでオリジナルな実験報告は数少ないため、プロポリス協議会として基礎的な安全性データを作成する必要であると考えに至った。そこで、急性毒性試験を日本食品分析センターに依頼し、また徳島文理大学薬学部にはプロポリスのアレルギー問題に関連してプロポリス製剤の生物活性評価の研究をお願いした。

今回、日本食品分析センターによる急性毒性試験が終了したので、プロポリスについての簡単な説明を加えながら、試験の結果を報告書に

基づいて紹介する。

## I プロポリスについて

プロポリスはミツバチが植物、特に樹木の芽や樹液を採取し、自らの分泌するミツロウと混練して作る樹脂状物質で、ミツバチはこれを巣の補強、修理のほか、侵入してきた昆虫・小動物の死骸を被覆するなどに使うばかりでなく、女王蜂の産卵前の巣房にコーティングするとも言われている。

プロポリスの成分は極めて多種多様な有機化合物から構成されている。主要な成分としては、フラボノイド化合物、有機酸類、フェノール酸類、芳香族アルコール類とこれらのエステル類などのほかビタミン類やミネラル類が含まれており、また、これらの化合物はそれが採取される付近の植物相、特に樹木の樹液の成分と近似すると報告されている。

## II プロポリスの有用性

プロポリスには抗菌性があるのでミツバチの巣房の中の役割は一種の防腐剤的な効果を果たしているものと考えられる。

ヨーロッパや中国では、プロポリスはミツバチ関連物質が用いられる医療 (apitherapy) の中で鎮痛剤、消炎剤などとして用いられてきた。これらの作用を確認した報告や作用成分を特定した報告も多い。

これらの経験と文献からプロポリスの人体に対する効能として、抗菌作用、沈痛作用、消炎作用があると考えられる。

日本では国立予防衛生研究所の松野哲也博士が日本癌学会で子宮がんの治療例を発表し、さ

らにプロポリス中の殺がん細胞物質として3種類の化合物を特定して報告している。

### Ⅲ プロポリスの安全性

#### 1. 毒性試験

プロポリスの安全性に関しては Donadieu (1987) の総説「自然療法における“プロポリス”」中に「プロポリス(体重1kg当たり10~15g)を経口投与で犬, ラット, モルモットに数か月服用させて, 何らの毒性や病理上の問題は発生してない」と記されている。

この他にもいくつかの経口投与の試験結果の記載文献があり, いずれも毒性はまったく認められないとしているが, 詳細なオリジナルデータを示した文献は見当たらない。

#### 2. がん原性

前記の総説に「プロポリスは動物では発がん性をもたない, 反対に, ある条件下での実験では腫瘍細胞融解の性質, すなわち腫瘍形成を吸収するのに役立つと思われる」と記されている。

プロポリスの成分であるフラボノイドについてはフラボノイドは変異原性はあるが, がん原性はないと報告されている。さらに, 前記の松野博士による子宮がんの治療例とプロポリス中の殺がん細胞物質の特定などの報告から, プロポリスが発がん性の物質である心配は少なく, むしろ抗腫瘍性の物質と考えられる。

#### 3. アレルギー

ミツバチを扱う養蜂家にプロポリス過敏症(接触皮膚炎)が認められることは古くから知られていて, その発生率は0.05%程度と報告されている。これについて, プロポリスの成分と植物成分のアレルゲンとしての比較文献から接触性抗原は植物由来の成分と考えられる。アレルギーの発現には体質, 薬物との接触や摂取の量と方法, 頻度など複雑な要因が関与すること, および一般的な天然食品でも深刻なアレルギーの原因となることがしばしばあることは良く知られていることである。

プロポリスが接触性抗原となる場合がある一方では, プロポリスの消炎効果についても極め

て多くの報告があり, さらにヨーロッパにおける主要な用途は消炎剤であり, 日本においては, 漢方薬と合わせて使用した, 皮膚病, アレルギー性疾患の治療例もあるということも事実である。これらのこと併せて考えると, プロポリスが特別に危険なアレルゲン物質とは考えられない。しかし, 稀にプロポリス過敏症の症状が見られる物質の人がいるが, この起因物質については前述の徳島文理大にて研究中である。

### Ⅳ 急性毒性試験の検体

#### 1. プロポリスの種類について

現在日本に輸入されるプロポリスの主要な産地はブラジルと中国である。この産地の異なるプロポリスはエタノール濃度に対する抽出されるエキス量の挙動が際だって異なっている。これはブラジルと中国のプロポリスの組成がフラボノイド, エステル類やその他成分の構成比に異なった特徴があるためと考えられる。

この抽出挙動の特徴による区別をその他の産地のプロポリスについて当てはめてみると, 上記代表的産地の2種類の特徴のいずれかと共通する結果が得られたので, 今回の試験の検体はブラジル産プロポリスと中国産プロポリスの2種類を使用することとした。

#### 2. 検体の調製について

急性毒性試験の対象とするプロポリスは, 国内での主要な流通形態を考えると, エタノール抽出物を用いることが適切であるが, プロポリスエキスは水に溶けず, 分散もしにくい上に, エタノールを除去する必要がある。そこでエタノール抽出液をデキストリンに吸着させたのち, 乾燥し, これを粉碎して調製した粉末を用いることとした。

プロポリスの毒性が低いことを考慮すると検体のエキス固形分の含量はなるべく高いものを調製する必要がある。高濃度プロポリス調製法を検討して, エクス固形分の含量50%の検体粉末をアピ株式会社総合研究所で調製した。

プロポリス原塊からのエタノールによるエキス分の抽出率を考慮すると, この検体の元の原料プロポリス(原塊)への相当量換算係数はブ

ラジル産が 0.9, 中国産が 0.65 となった。

したがって中国プロポリスの検体 1g は, エキス含量は 50% なのでエキス固形分として 0.5g 相当であるが, プロポリスへの換算係数は, 0.65 であるから, 原料プロポリスとしては 0.65g に相当する。

この換算係数は安全性データとして使用される数値であるという性格から, 幅のある抽出率データの中の最高値から作成した。

## V 急性毒性試験の実験方法

### 1. 依頼試験機関と実施機関

試験機関名 (財)日本食品分析センター

実験機関名 (財)日本科学飼料協会

科学飼料研究センター

### 2. 検体の種類

a. 中国産プロポリス抽出物 (CP)

b. ブラジル産プロポリス抽出物 (BP)

### 3. 投与経路

経口

### 4. 試験動物

日本医科学動物資材研究所株式会社生産の ddY-N 系マウス雄および雌を約 4 週齢で導入し, 1 週間の予備飼育を行って, 健康状態などに異常のないことを確認した後, 約 5 週齢で試験に供用した。

### 5. 試験室温

24±4℃

### 6. 試験期間

BP 平成 5 年 3 月 3 日～17 日

CP 平成 5 年 3 月 4 日～18 日

### 7. 検液の調製方法

胃ゾンデを用いて経口投与できるように, 懸濁液に調製する。検体を約 70℃に熱した非イオン界面活性剤 (ツイン 80) の 20%溶液に加えて, 室温に戻るまでマグネチックスターラーで攪拌し懸濁液を調製した。濃度は 11.6, 13.9, 16.7 および 20.0% (w/v) の 4 段階とした。

濁液に調製する。検体を約 70℃に熱した非イオン界面活性剤 (ツイン 80) の 20%溶液に加えて, 室温に戻るまでマグネチックスターラーで攪拌し懸濁液を調製した。濃度は 11.6, 13.9, 16.7 および 20.0% (w/v) の 4 段階とした。

### 8. 検液の投与方法

#### a. 投与方法

供試マウスを投与前日の午後 5 時から, 当日の午前 10 時までの約 17 時間絶食させた後, 胃ゾンデを用いて, 検液を 1 回強制経口投与した。なお, 投与の際は, ガラス棒を用いて攪拌し, 検液の均一性を保つよう留意した。

#### b. 検体の投与量

検体投与群には, 雄, 雌とも, 各検液をマウスの体重 1kg 当たり 20ml 投与することにより, 検体の最高投与量を 4000mg/kg として, 以下, 3340, 2780, 2320mg/kg の 4 水準 (公比 1.2) 投与した。エキス相当量, プロポリス相当量に換算すると表 1 の通りである。

#### c. 1 群当たりの動物数

雄, 雌各 5 匹

#### d. 中毒症状および死亡例の観察

投与後 5 時間まで継続して中毒症状を観察した後, 投与後 7 および 24 時間に観察した。以後は 24 時間間隔で 2 週間観察を行った。

#### e. 体重測定

投与後, 投与後 3, 7 および 14 日に個体別体重を測定した。

#### f. LD<sub>50</sub> 値の計算方法

プロビット法

表 1 投与水準と相当量 (単位 mg/kg)

投与水準	エキス相当量	プロポリス相当量	
		BP	CP
4000	2000	3600	2600
3340	1670	3010	2170
2780	1390	2500	1800
2320	1160	2090	1510

## VI 急性毒性試験の結果

### 1. LD<sub>50</sub> 値

急性毒性 LD<sub>50</sub> 値に関する試験結果を行なったが、いずれの投与量でも死亡例は見られなかった（14日間観察）。

### 2. 中毒症状

#### a. ブラジル産プロポリス

雄、雌とも、2780mg/kg 以上の投与群では、検体投与後約 10 分から、1 例～全例でわずかに活力が低下し、投与後 30～60 分では、2320 mg/kg 投与群を含むほぼ全例でわずかに活力が低下した。しかし、いずれの個体も、投与後 3～4 時間の間に正常に復した。また、投与後 4 時間から、ほぼ、全例で、褐色泥状便の排泄および排泄に伴う肛門周囲の湿潤ならびに被毛の汚染が観察させたが、いずれも、投与後約 20～24 時間までに消失した。以後、異常は観察されず、死亡例も発生しなかった。

#### b. 中国産プロポリス

雄、雌とも、いずれの投与群においても、検

体投与直後から、全例でわずかに活力が低下した。しかし、いずれの個体も、投与後 3～4 時間のまでに正常に復した。また、投与後 4 時間から、各群の 2～4 例で、褐色泥状便の排泄および排泄に伴う肛門の湿潤ならびに被毛の汚染が観察されたが、いずれも、投与後約 20～24 時間までに消失した。以後、異常は観察されず、死亡例も発生しなかった。

### 3. 剖検所見

すべての供用マウスについて、試験終了時に屠殺し、肉眼的に剖検したが、雄、雌とも、いずれの投与群においても主要臓器などに異常は認められなかった。

### 4. 体重の推移（各水準ごとの平均値）

ブラジル産プロポリスおよび中国産プロポリスの試験において供用マウスの体重の推移は、それぞれ表 2—1、表 2—2 の通りであった。供試マウスの体重と検体添加量との間に一定の傾向は認められず、またいずれの個体も、ほぼ順調な発育を示した。

表 2-1 平均体重の推移（ブラジル産プロポリス）

性	試験群 No.	投与量 (mg/kg)	開始時	3 日後	1 週間後	2 週間後
雄	1	2320	27.6	32.8	35.4	39.6
	2	2780	27.6	33.2	36.2	38.4
	3	3340	27.6	32.4	34.8	37.2
	4	4000	27.6	33.0	36.4	39.2
雌	1	2320	23.2	27.8	30.0	32.4
	2	2780	23.2	27.4	29.0	31.2
	3	3340	23.2	27.6	29.2	31.2
	4	4000	23.2	26.8	28.2	31.0

(kg)

表 2-2 平均体重の推移（中国産プロポリス）

性	試験群 No.	投与量 (mg/kg)	開始時	3 日後	1 週間後	2 週間後
雄	1	2320	22.4	30.4	33.2	38.0
	2	2780	22.4	29.6	32.2	36.2
	3	3340	22.4	30.0	33.2	37.6
	4	4000	22.4	29.6	33.6	37.6
雌	1	2320	20.4	25.6	27.2	30.6
	2	2780	20.4	25.6	26.8	30.8
	3	3340	20.4	26.4	27.8	30.6
	4	4000	20.4	25.0	27.2	30.0

(kg)

表3 エキスおよびプロポリスのLD<sub>50</sub>

検体	エキス相当量	プロポリス相当量
ブラジル産プロポリス	2000mg/kg 以上	3600mg/kg 以上
中国産プロポリス	2000mg/kg 以上	2600mg/kj 以上

## VII 急性毒性試験結果の考察

ブラジル産プロポリスおよび中国産プロポリスの両検体ともに認められた投与後のわずかな活力の低下と褐色泥状便の排泄は、それぞれ4時間後、24時間後に消失し以後異常は観察されず死亡例も発生しなかった。また体重の増加はいずれの個体も順調であった。

以上の結果から、検体の経口LD<sub>50</sub>値は3600mg/kg以上であると推考された。このLD<sub>50</sub>値をエキス固形分相当量またはプロポリス相当量に換算すると表3となる。

健康食品の素材として使用されているプロポリスの摂取量はエキスで多くても1000mg/日以下であり、医療用に試用されている場合でも数千mg/日程度である。1000mg/日の摂取量は体重を仮に50kgとして計算すると20mg/kg以下であり、経口LD<sub>50</sub>値の1/100よりも少ない。

結論として、食品素材としてのプロポリスは経口急性毒性について安全な素材であると考えられる。

(〒550 岐阜市加納桜田町1-1 アビ(株)総合研究所 金枝 純; 〒108 港区高輪2-20-23 高輪中央ビル ナチュラルグループ本社(株)調査室長 仁科保)

## 参考文献

- APIMONDIA. 1987. Propolis. APIMONDIA Publishing House. pp. 249.
- Bunn, M. H. 1968. Br. J. Derm. 80:17-23.
- 第30回国際養蜂会議組織委員会. 1986: 第30回国際養蜂会議総集録. pp. 614
- Donadieu, Y. 1987. ミツバチ科学8(2):67-82.
- 林 健志. 1983. 厚生省がん研究助成金による研究報告集. p. 220-223.
- 広野 巖ほか. 1981. 厚生省がん研究助成金による研究報告集. p. 347-354.
- 井上浩郷. 1988. ミツバチ科学9(3):115-126.
- 松野哲也. 1922. ミツバチ科学13(2):49-54.
- 日本プロポリス協議会. 1988-1993. 日本プロポリス協議会会報. No. 1-7.
- (株)日本食品分析センター. 1993. 試験報告書第46021801-1号, 第46021801-2号.
- 瀬長良三郎ほか. 1987. 和漢医薬学会誌. 4(3):420.
- 瀬長良三郎. 1988. 現代東洋医学和. 9(1):160-161.
- KANEEDA, JUN<sup>1)</sup> and TAMOTSU NISHINA<sup>2)</sup>. Safetiness of propolis. Acute toxicity. *Honeybee Science* (1994) 15 (1):29-33. <sup>1)</sup>Api Co. Ltd., 1-1, Kanou-Sakurada-machi, Giju, 500 Japan; <sup>2)</sup>Naturally Yours Co. Ltd., 2-20-23, Takanawa, Minato-ku, Tokyo, 108 Japan.

Propolis samples originated from Barasil and China. Ethanol extracts were absorbed on dextrin, dried and pulverized. The propolis suspension were given orally to 5-weeks old mice.

Doses were 2.23 to 4.0 g propolis/kg. No mice died within 2 weeks, body weights increased normally, and abnormality was not found by anatomical examination after 2 weeks.