

## 補完代替医療素材としてのプロポリス

### 1. プロポリスの抗腫瘍作用

荻野元平<sup>1)</sup>、荻野珠里<sup>1)</sup>、菅野秀一<sup>2)</sup>、氏部真優子<sup>2)</sup>、石川正明<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>〒152-0004 東京都目黒区鷹番2丁目5番21号 (株) シャブロン

<sup>2)</sup>〒981-4558 仙台市青葉区小松島4-4-1 東北薬科大学癌研二

#### Propolis as a Material for Complementary and Alternative Medicine

##### 1. Antitumor Activity of Propolis

Motohei Ogino, Juri Ogino, Syu-ichi Kanno, Mayuko Ujibe, Masaaki Ishikawa  
*ChatBlanc inc. 2-5-21 Takabann Meguro-ku Tokyo-to*  
*Department of Pharmacology & Toxicology, Institute of Cancer Research,*  
*Tohoku Pharmaceutical Science, 4-4-1 Komatushima, Aobaku, Sendai*

*Received March 31, 2006, Accepted May 29, 2006*

This present study aimed to investigate the effect of propolis on cell growth and apoptosis in human histiolytic lymphoma U937 cells. Exposure of U937 cells to propolis resulted in growth inhibition and the induction of apoptosis in a dose-dependent manner as measured by MTT, fluorescence microscopy, DNA electrophoresis, flow cytometry and comet analysis. This increase in apoptosis was associated with the activation of caspase-3. Primary culture of human peripheral blood mononuclear cells was less sensitive to cytotoxicity relative to U937 cells. Propolis treatment markedly inhibited the activity of telomerase in a dose-dependent fashion. Combined treatment with mitomycin C or 5-fluoro-uracil and propolis resulted to an increase in the life span of ddY mice bearing sarcoma 180 tumor cells, while no obvious effect was seen with just propolis pretreatment. These results indicate that telomerase inhibition may play a role in the propolis-induced apoptosis of U937 cells, and clinical trials of propolis as an adjuvant in cancer chemotherapy of mitomycin C or 5-fluorouracil are highly feasible.

Key words: propolis / cytotoxicity / apoptosis / telomerase / antitumor effect

#### 緒言

プロポリスは、ミツバチが木や植物の芽や樹脂から採取した植物性樹脂成分とミツバチの唾液分泌が混ぜ合わせられた膠状物質で、ミツバチの巣の隙間を塞いで、寒気や寒気の進入を防ぐために用いられている。プロポリスは民間医療薬として、用いられてきた歴史があり、すでに古代エジプト時代に防腐効果あるいは抗菌活性を薬用に利用されていたことは、少なくとも紀元前300年の記録に読みとれる (Ghisalbert, 1976; Raven, 1983)。日本においては、プロポリスは炎症性疾患、心臓病、糖尿病や癌の治療の健康食品あるいは日本特有の民間薬として広く使用されている (滝野、持田 1982; Mateescu, 1999; <http://www.nih.go.jp/eiken>; 中村・松香, 2005)。

〒981-4558  
仙台市青葉区小松島4-4-1 東北薬科大学薬物治療学教室  
石川正明

プロポリスについては、これまでに、抗微生物 (細菌、真菌、原虫、ウイルス) 活性、抗酸化作用、抗炎症作用、抗腫瘍活性など種々の生理活性が報告されている (Marcucci, 1955; Burdock, 1998; Banskota *et al.*, 2001; 中村・松香, 2005)。そして、各活性の本体となる成分の同定、作用機作、またヒトにおける効能についての研究も行われている (Castaldo and Capasso, 2002; 中村・松香, 2005)。

プロポリスの大まかな組成は、樹脂やバルサム 55%、ワックス 30%、油性物質 10%、花粉 5% などという数字がよく引用されており、アルコール類、アルデヒド類、有機酸 (エステル) 類、アミノ酸類、芳香族酸類、芳香族エステル類、カルコン類、フラバノン類、フラボンおよびフラボノール類、炭化水素 (エーテル他) など、脂肪酸類、ケトン類、テルペノイド類、ステロイド類、糖類などを含む。成分については、既報のものだけでも、300種類以上ともいわれるが、抽出法の改良、分析技術の向上あるいは産地 (採取した場所) や起源植物 (材料となる植物) の種類の増加により増え続けて

いる(Walker and Crane, 1987; Marcucci, 1995; 熊沢ら, 2000; Banskota *et al.*, 2001)。いずれにしても、これらの成分全てが一つのプロポリスに含まれているのではなく、産地や起源植物ごとに含まれている成分で異なり、プロポリスは起源植物の採集時期や産地あるいは抽出法により、化学組成と薬理学的効果も異なることになる。

本論文においては、ブラジル産プロポリスからアルコール抽出法により抽出したプロポリス (CB プロポリス<sup>®</sup>) の抗腫瘍作用を補完代替医療素材としての可能性の点から検討した。

## 実験材料および方法

### 化合物と薬物

プロポリスは (CB プロポリス<sup>®</sup>、シャブロン、東京) 0.5%ジメチルスルホキシド(DMSO)で希釈して培養細胞に添加した。対照群の細胞には DMSO のみを添加した。最終 DMSO 濃度は 0.5%(v/v) 以内とした。マウスには、生理食塩液で希釈し、給水ビンで自由摂取させた。Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB はペプチド研究所 (大阪) から購入し、細胞をプロポリスで処置する 1 時間前に 100 μM 添加した。<sup>3</sup>H]thymidine (50 μCi/mmol)、<sup>3</sup>H]uridine (55 μCi/mmol) および <sup>3</sup>H]leucine (60 μCi/mmol) は、NEM 研究用試薬 (米国) から購入した。マイトマイシン C (MMC、協和発酵)、5-フルオロウラシル (5-FU、協和発酵) およびその他の試薬はナカライテスコ (京都) と和光純薬 (大阪) から購入して使用した。

### 腫瘍細胞

HTB-26、A172、T98G および LNCapFGC 癌細胞は American Type Culture Collection (Rockville, MD)、Kato-III、Hep 3B、A549、MCF-7、PC-3、T98G および J774.1 癌細胞はヒューマンサイエンス研究資源 (大阪) から購入した。Hela、Hela-TG、U-937 および EJ-1 細胞は東北大学附属医用細胞資源センターより分与された。細胞 (4x10<sup>6</sup> 細胞/mL) はペニシリン(100 単位/mL)、ストレプトマイシン (100 μg/mL) 及び 10% 加熱不活性化胎児牛血清を含む RPMI 1640 培地 (イワキ) で湿度 95%、二酸化炭素濃度 5%、37°C 下で培養した。細胞数はトリパンブルー法により計測した。

東北大学附属医用細胞資源センターより分与された sarcoma-180 (S-180) 細胞は、ddY 系雄性マウスの腹腔内に 1×10<sup>6</sup> 個を移植して継代維持した。実験には移植後 1 週間経過した細胞を用いた。

### 使用動物

ddY 系雄性マウス (22~24g、5 週令) を日本 SLC (浜松) から購入して使用した。実験期間は実験動物飼育用固型飼料 (日本クレア製、CE-2) と水道水を自由に摂取させ、温度 23±1°C、湿度 50±5%、12 時間周期 (明期 07:00~19:00、暗期 19:00~07:00) の明暗サイクル環境下で飼育した。

### 殺細胞作用

細胞毒性は、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide (MTT) 法により測定した。細胞を 2×10<sup>4</sup> cells/well の濃度

で 96 穴プレートに播種した。24 時間後に種々のプロポリス濃度で処置し、所定の時間に MTT (5 mg/mL) を 10 μL/well 加え、37°C で 2 時間培養し、遠心分離 (300xg、5 min) 後、上清を除き、0.04N HCl を含む塩酸イソプロパノールを 100 μL/well 加えた。攪拌後、590 nm における吸光度を inter-med model NJ-2300 Microplate Reader にて測定した。細胞の生存率 (%) は、コントロール群との比較により算出した (Kanno *et al.*, 2003, 2005)。

### 核の形態学的観察

細胞を培養して所定の時間に、細胞を遠心 (2000 x g、5 分) により集め、細胞のペレットを冷リン酸緩衝生理食塩液で 3 回洗浄して、メタノール中の 25% 酢酸液で 30 分間固定した。それから、細胞を冷リン酸緩衝生理食塩液で 3 回以上洗浄した。細胞を再懸濁後、細胞を細胞遠心用スライドに貼り付け、10 μL のヘキスト 33258 (10 μM) あるいは 5 μM ヨウ化プロピジウム (propidium iodide; PI) で 30 分間室温下で染色した。励起 360 nm および蛍光 420 nm の条件下で蛍光顕微鏡 (ニコン製、Eclipse TE 300) で観察した。アポトーシス細胞数は、濃縮と断片化した核をヘキスト 33258 で染色して観察し、PI 添加により赤色染色される細胞をネクロトーシス細胞とした。各々のサンプルは、少なくとも 300 個の細胞を数え、総細胞数に対する 100 分率で表した (Kanno *et al.*, 2003, 2006)。

### DNA の電気泳動

DNA 断片化は先の報告に従い (Kanno *et al.*, 2003; Ujibe *et al.*, 2005)、電気泳動法により行った。プロポリスを所定の濃度とスケジュールに従い培養した後に、10<sup>6</sup> 細胞を沈殿小球化した。遺伝子 DNA は、1.4%アガロースゲルで泳動し、臭化エチジウム染色で可視化した。ゲルにお遺伝子 DNA の定性的障害を観察するために紫外線蛍光下で画像化した。

### フローサイトメトリー解析

細胞 4×10<sup>5</sup> cells/mL を 2 mL ずつ 35 mm dish に播種し、24 時間後プロポリスを処置した。アポトーシスに特徴的な hypodiploid 細胞 (sub-G<sub>1</sub> peak) の観察により、プロポリスによるアポトーシスを測定した。培養後、遠心分離により細胞のみを回収し、カルシウム・マグネシウムを含まないリン酸緩衝生理食塩液で洗浄した。回収した細胞を 10 μg/mL RnaseA と 0.5% Triton-X 100 を含む 20 μg/mL ヨウ化プロピジウム 染色液 1 mL に細胞を懸濁させ、60 μm のメッシュにて濾過した。懸濁液を室温、30 分間暗所にて放置後、FACScan フローサイトメトリー (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) により測定および解析を行った (Ujibe *et al.*, 2005)。

### コメットアッセイ法

DNA の傷害は、alkaline single cell gel 電気泳動法により行った (Kanno *et al.*, 2006)。

### テロメラーゼ活性の測定

テロメラーゼ活性は Telo TAGGG テロメラーゼ PCR ELISA<sup>PLUS</sup>

キット (Boehringer Mannheim, Germany) を使用しマニュアルに従って測定した。HTERT、TEP-1、hTR、glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の mRNA の抽出と RT-PCR による検出は Dong Il Park らの方法 (2005) により行った。

#### カスパーゼ-3 活性の測定

カスパーゼ-3 活性は colorimetric assay kit (MBL、名古屋) を使用しマニュアルに従って測定した。細胞  $4 \times 10^6$  個に 100  $\mu\text{L}$  の Cell Lysis 緩衝液を加えて溶解し、タンパク質を抽出した。タンパク質に 2.5  $\mu\text{L}$  の DEVD-pNA を加え、37°C で 1 時間反応させ、吸光度を測定した。吸光度は Inter-med model NJ-2300 Microplate Reader にて波長 405 nm で測定した。未処置群との比較により活性を算出した (Kanno *et al.*, 2006)。

#### 抗腫瘍活性の測定

実験には一群 10 匹のマウスを用いた。固形癌:S-180 細胞  $1 \times 10^6$  個をマウスの左大腿部皮下に接種し、24 時間後から 0.1% と 1% プロポリス液は給水ビンで自由摂取あるいは制癌薬を腹腔内に 1 日 1 回 10 日間投与した。腫瘍細胞接種 18 日後に、マウスを頭部脱臼法で殺し、左右両肢の皮膚を剥離した後に大腿部基部から足首まで切断した。左肢の右肢に対する重量差をもって、腫瘍重量とした。各群ごとに、平均重量を求め、同時に実施した対照の生理食塩液投与群の平均重量差を用い、腫瘍抑制率を算出した。腹水癌:S-180 細胞  $1 \times 10^6$  個をマウス腹腔内に接種し、24 時間後から 0.1% と 1% プロポリス液は給水ビンで 55 日自由摂取あるいは制癌薬を腹腔内に 1 日 1 回 5 日間投与した。癌細胞接種後 55 日間にわたり死亡の有無を観察した。平均生存日数と生存引数の比較により、抗腫瘍活性を算出した。(Kanno *et al.*, 2005)。

#### 統計学的処理

平均値と標準誤差を算出し、有意差検定は Student's *t* 検定を用い、危険率 0.05% 未満をもって有意差とした。

#### 実験結果

##### プロポリスの殺細胞作用

プロポリスの抗腫瘍作用は U937 細胞を用いて、MTT 法により測定した。プロポリス (0.05、0.15、0.3、0.5、1.5、3  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) を U937 細胞と 24 時間接触させると、0、37.5、53.6、63.6、78.3、82.1 あるいは 83.8% の細胞増殖抑制作用が認められ、プロポリスは用量に依存した抗腫瘍作用を示した (Fig 1A)。

さらに、プロポリス (0.3  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) を U937 細胞に 1、2、3、4 あるいは 5 日間接触させると、20.0、41.5、64.5、74.9 あるいは 83.3% の抗腫瘍作用が観察され、接触あるいは経過時間に依存した抗腫瘍作用を示した (Fig 1B)。

プロポリスの殺細胞作用を癌細胞と正常細胞で比較検討した時、プロポリス (0.05、0.15、0.3、0.5、1.5、3  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) は U937 細胞に対して 21.2、30.3、61.3、80.3、81.5、95.3

あるいは 98.0%、健康人から得られたヒトリンパ球細胞に対しては、0、0、0、0、58.5、63.3 あるいは 59.3% の殺細胞作用が観察され、プロポリスは正常細胞と比較して癌細胞に対して強い細胞毒性が観察された (Fig. 2)。

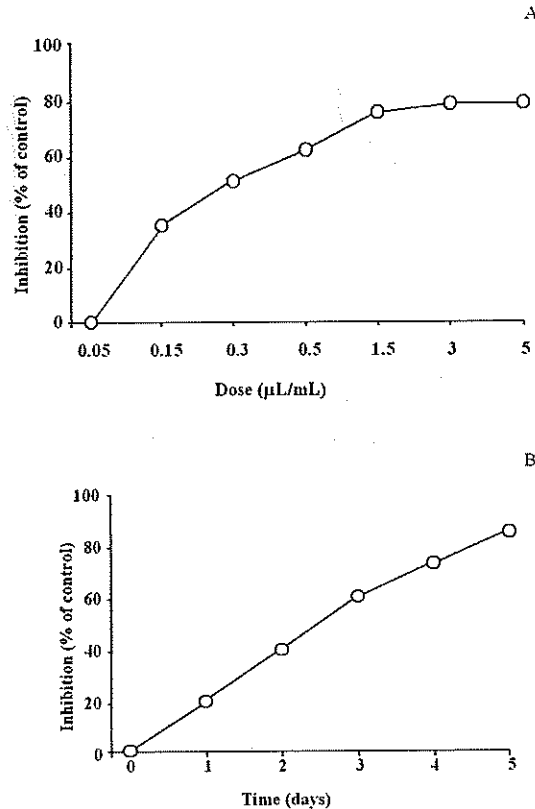


Fig 1 Dose- (A) and time- (B) dependent cytotoxicity of propolis in U-937 cells

The cells were treated for 24 hr with propolis at the indicated doses (A) and treated with 0.05  $\mu\text{L}/\text{mL}$  of propolis at each time point (B). Control cells were treated with DMSO. Cell viability was determined by MTT assay. The results are presented as the percentage of absorbance in DMSO-treated cultures. S.E.M. (not shown) was usually within 1% of the mean value ( $n=6$ ).

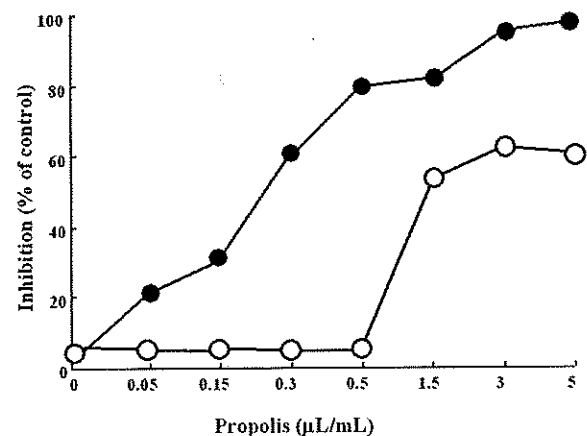


Fig 2 (continued).

Fig. 2  
Cytotoxic effects of propolis on U937 and normal lymphocyte cells

Cells were incubated for 24 hr, with or without propolis, at concentrations from 0.05 to 5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Control cells were treated with DMSO. The experimental condition and analysis are the same as in Fig. 1.  $\bullet$ : U933,  $\circ$ : normallymphocyte cell.

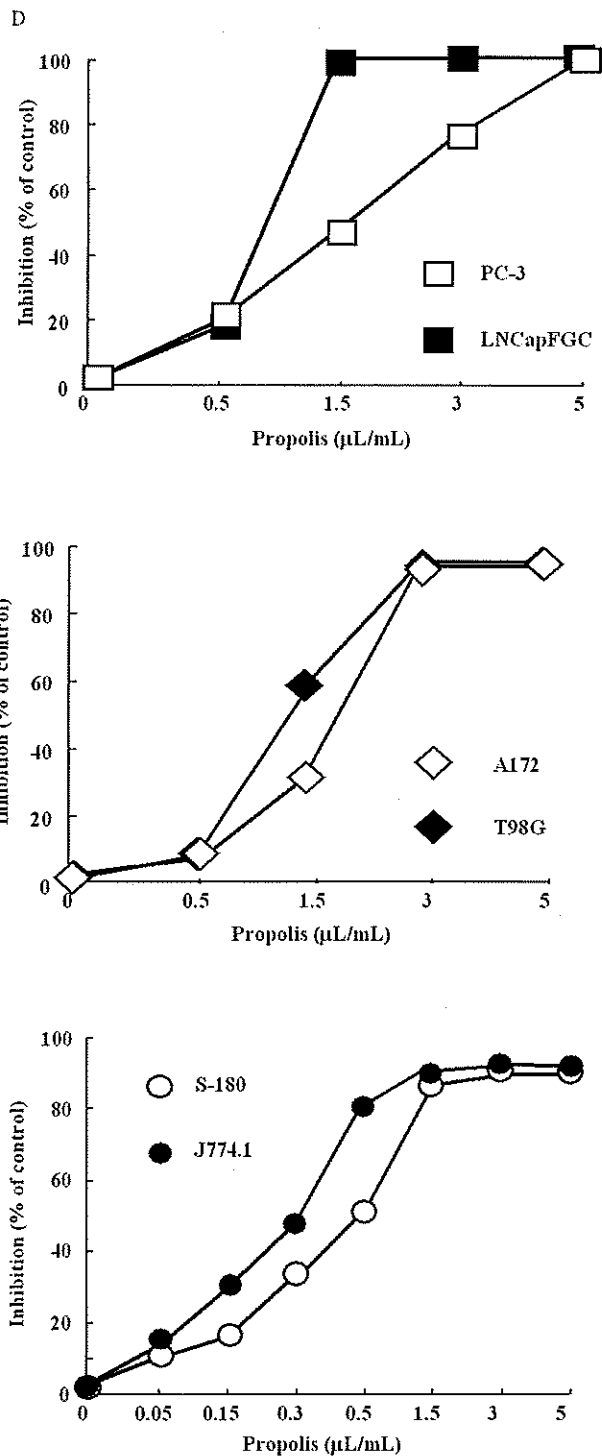
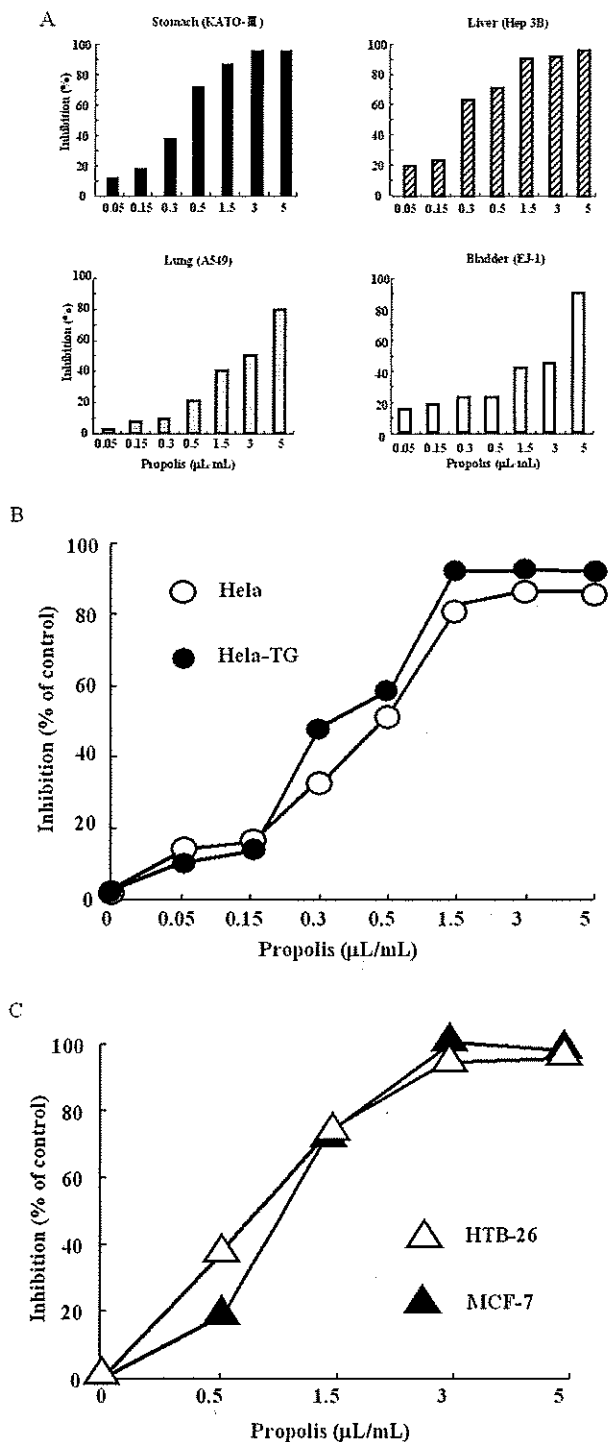


Fig. 3  
Cytotoxic effects of propolis on human tumor cells

Cells (A: Kato-III, Hep 3B, A549, EJ-1, B: HeLa, HeLa-TG, C: HTB-26, MCF-7, D: PC, LNCapFGC, E: A172, T98G) were incubated for 24 hr, with or without propolis, at concentrations from 0.05 to 5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . The experimental condition and analysis are the same as in Fig. 1.

さらに、ヒト癌細胞 (胃癌; KATO III、肝癌; Hep3B、肺癌; A549、膀胱癌; EJ-1、子宮癌; HeLa、HeLa-TG、乳癌; HTB-26、MCF-7、前立腺癌; PC-3、LNCapFGC、脳腫瘍; A172、T98G) あ

るいはマウス癌細胞 (肉腫; Sarcoma-180、白血病; J774.1) でも抗腫瘍作用が観察された (Fig. 3A-F)。子宮癌 Hela と 6-チオグアニン耐性細胞 Hela-TG (Fig. 3B)、乳癌のエストロゲン依存性細胞 MCF-7 と非依存性細胞 HTB-26 (Fig. 3C)、肺癌のA172 と T98G細胞 (Fig. 3E) では同程度の抗腫瘍作用が観察されたが、前立腺癌のエストロゲン依存性細胞 LNCapFGC と非依存性細胞 PC-3 (Fig. 3D) では、PC-3 細胞で強い抗腫瘍作用が観察された。マウス癌細胞では J774.1 に比較して、S-180 細胞で強い抗腫瘍作用が観察された (Fig. 3F)。

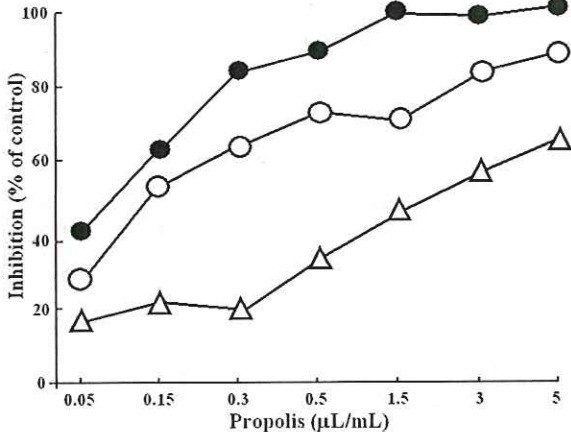


Fig. 4  
Inhibitory effect of propolis on DNA, RNA and protein synthesis in U-937 cells

Cells were incubated with various concentrations of propolis (0.05-5 μL/mL) for 1 hr, after which the incorporation of [<sup>3</sup>H]-labeled thymidine (for monitoring DNA synthesis;●), uridine (for monitoring RNA synthesis;○) or leucine (for monitoring protein synthesis;△) during the following hour was measured. Each point represents the mean of three determinations. S.E.M (not shown) was usually within 10% of the mean value.

#### U937 細胞の DNA、RNA および蛋白質合成に対するプロポリスの効果

プロポリスが U937 細胞において殺細胞作用が観察されたので、その発現機序を検討するために、DNA、RNA および蛋白質合成に対する影響を [<sup>3</sup>H]thymidine、 [<sup>3</sup>H]uridine あるいは [<sup>3</sup>H]leucine の細胞内画分への取り込みを指標として検討した。U937 細胞と 0.05、0.15、0.3、0.5、1.5、3 あるいは 5 μL/mL の濃度のプロポリスを 60 分間培養した時、DNA への [<sup>3</sup>H]thymidine の取り込みは 45、63、82、85、99、96 あるいは 99% 抑制した。RNA への [<sup>3</sup>H]uridine の取り込みは、27、54、63、70、68、83 および 86% 抑制した。蛋白質への [<sup>3</sup>H]leucine の取り込みは、17、20、18、30、43、50 および 60% 抑制した (Fig. 4)。U937 細胞においてプロポリスは DNA と RNA 合成に対して強い阻害作用を示したが、蛋白質合成に対しては軽度であった。

U937 細胞におけるプロポリス (3 μL/mL) による DNA 合成阻害は早期から認められ、培養 30 分後には完全に抑制した。さらに、U937 細胞を 0.005、0.05 および 0.5 μL/mL の濃度のプロポリスと 37°C で 60 分間培養し、リン酸緩衝生理食塩液で 3 回洗浄した後に

細胞を培地に再懸濁し、 [<sup>3</sup>H]thymidine を添加し、DNA 合成を測定した時、DNA 合成における阻害効果は一部非可逆的であった。

#### アポトーシス誘起作用

U937 細胞において、プロポリスの殺細胞作用と DNA、RNA あるいは蛋白質合成阻害作用が認められたので、殺細胞作用の発現機序を検討した。アポトーシスの特徴的な形態変化であるクロマチンの濃縮と核の断片化を、プロポリス存在下で細胞を、37°C で 24 時間培養した後、ヘキスト 33258 で染色し、365 nm の励起条件下で蛍光顕微鏡で観察を行った。抗腫瘍効果が認められたプロポリスの用量 0.05、0.15、0.3、0.5 あるいは 1.5 μL/mL の濃度処置により、用量に依存して 2.1、4.3、25.3、42.3 あるいは 79.1% のクロマチンの濃縮と核の断片化が認められた (Fig. 5)。

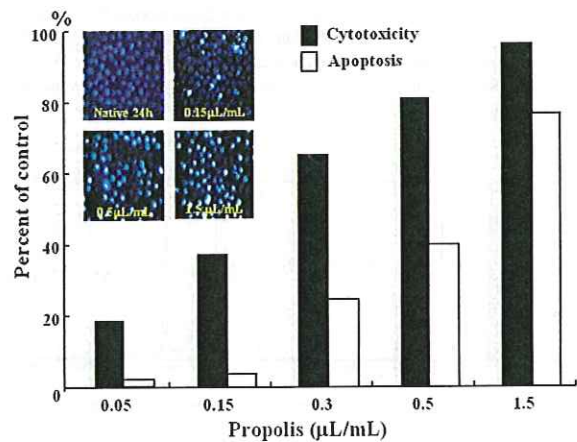


Fig. 5  
Morphological changes of U937 cells treated with propolis

Cells were treated with propolis (0.05-1.5 μL/mL) or 2 μL/mL DMSO for 24 hr, then stained with 10 μL of 10 μM H 33258 for 30 min in the dark, and the apoptotic cells (apoptotic-body formation) were counted under a fluorescence microscope. Typical results from three independent experiments are shown in the figures. Each column represents the mean of three determinations. S.E.M (not shown) was usually within 10% of the mean value.

また、プロポリス (0.5 μL/mL) を処置して 2、4、6、8 あるいは 12 時間後に U937 細胞から DNA を抽出して電気泳動法により検討した。プロポリス処置により、4 時間後から DNA のヌクレオソーム単位 (180 塩基対) でラダー状構造の泳動像が観察された (Fig. 6)。プロポリス処置 (0.3、0.5 および 1.5 μL/mL) によるアポトーシスの誘導はフローサイトメトリーによる解析でも用量に依存して認められた (Fig. 7)。さらに、プロポリスによるアポトーシスに起因する DNA 傷害は、コメットアッセイ法による核のコメットの径と長さの観察においても認められた (Fig. 8)。

アポトーシスのシグナル伝達であるカスパーゼ活性を測定した。U937 細胞にプロポリス (0.5 μL/mL) を処置して、4、8 および 12 時間後にカスパーゼ-3 活性を測定すると、プロポリス処置 4 時間後

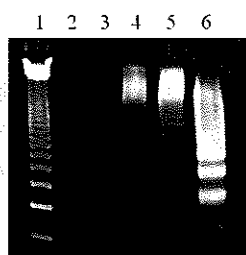


Fig. 6  
Detection of DNA fragmentation in propolis-treated U937 cells by agarose gel electrophoresis

Cells were treated with 2 μL DMSO (control: lane 2) and propolis (0.5 μL/mL), and DNA fragmentation was analyzed by agarose gel electrophoresis and staining with ethidium bromide. *Hae*-III-digested  $\phi$  fragments were used as molecular markers (lane 1). Lane 3-5 show cells treated with propolis for 2, 4, and 12 hr, respectively. Typical results from three independent experiments are shown.

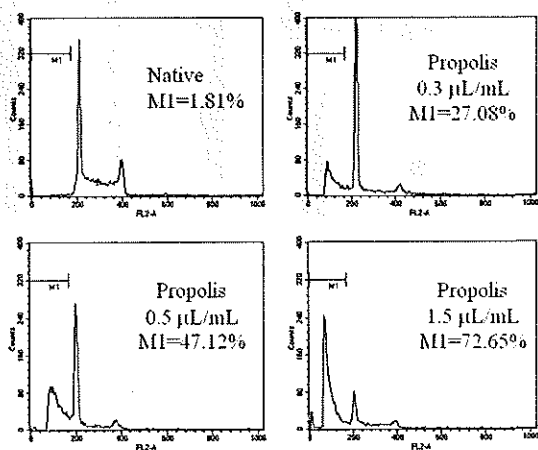


Fig. 7  
Detection of sub-G<sub>1</sub> cells in propolis-treated U937 cells by flow cytometry

Cells were treated with DMSO (native) or propolis (0.3, 0.5, and 1.5 μL/mL) for 24 hr. MI indicates the apoptotic peak representing cells with a sub-diploid content. Cell debris from analysis by conventional gating of forward-scatter versus side-scatter dot plots. Results are from one representative experiment of three. S.E.M. (not shown) were less than ±10%.

から誘導が認められ、8 時間後に最大の誘導効果を示し、12 時間後には元のレベルにまで回復した。このプロポリスによるカスパーゼ-3 活性の誘導はカスパーゼ阻害剤 Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB (100 μM) あるいは c-Jun N-terminal Kinase (JNK) 活性阻害薬の前処理により完全に抑制された (Fig. 9)。プロポリス処置によるアポトーシスとカスパーゼ活性の誘導作用は、J774.1、P388、HL-60 あるいは Jurkat 白血病細胞でも認められた。

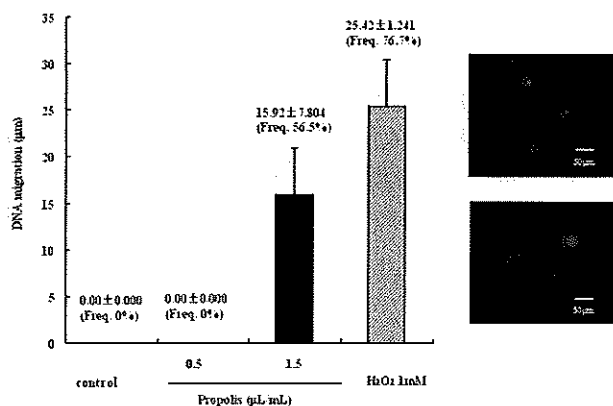


Fig. 8  
Apoptosis-induced DNA double-strand breaks as measured by comet assay

The comet moment is a function of the distance and intensity of DNA from the center of the comet head. Cells were treated with various concentrations of propolis (0.5, and 1.5 μL/mL) for 1 hr. The comet moment was then calculated. Typical results from three independent experiments are shown in the figures. The graph represents the mean mean ± S.E. of three independent experiments.

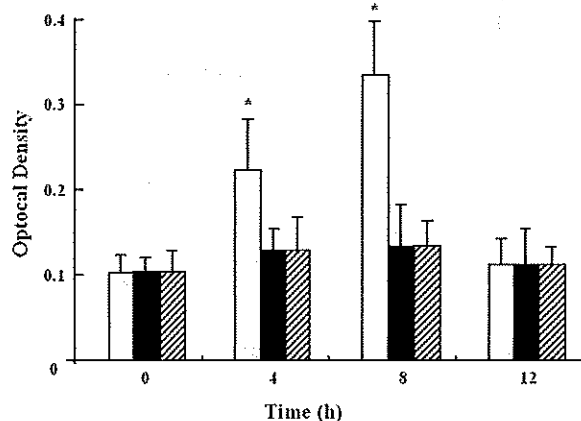


Fig. 9  
Analysis of the activity of caspase-3 protease during apoptosis induced by propolis

Cells were pretreated with DMSO (open column), 100 μM Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB (hatched column) or 20 μM curcumin (solid column) for 1 hr, followed by treatment with 0.5 μL/mL propolis for the indicated times and caspase-3 activity was measured. Data indicate the O.D. values, and are expressed as the mean ± S.E. of three experiments. \* Significantly different from the corresponding control at p < 0.05.

プロポリスが正常細胞よりも癌細胞に対してより強い殺細胞作用が観察されたので、その発現機序を明らかとするために癌細胞において強く認められるテロメラーゼ活性に及ぼす影響を検討した。プロポリス (0.05, 0.1, 0.3 あるいは 0.5 μL/mL) を U937 細胞と 24 時間接触させると低下し、64.5%、48.6%、38.6% あるいは 32.8% のテロメラーゼ活性が認められ、プロポリスは用量に依存した抑制作用を示した (Fig. 10A)。このときプロポリス (0.001, 0.003, 0.01, 0.03 あるいは 0.1 μL/mL) は hTERP1 と hTR の発現に影響を与える

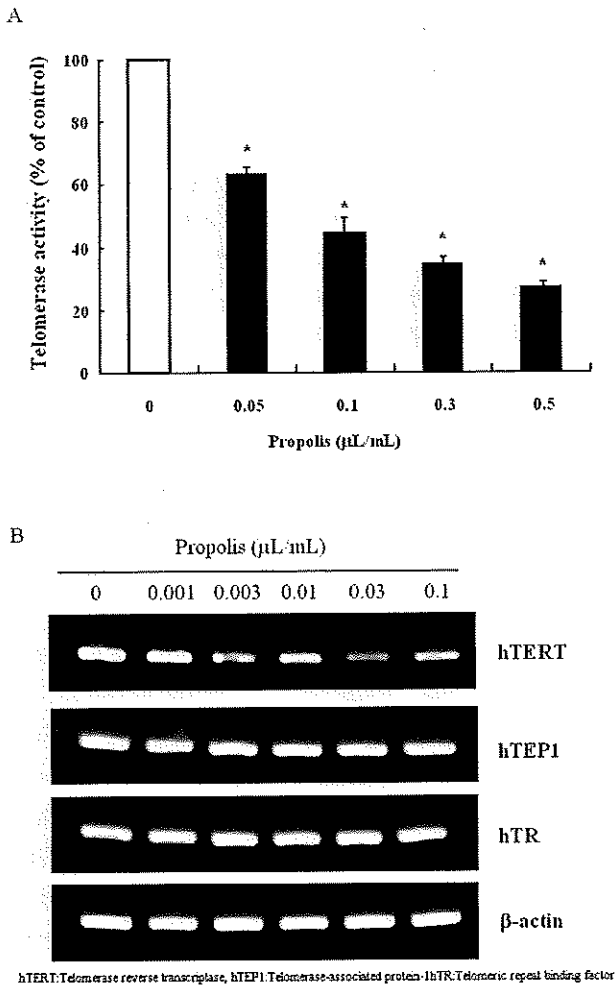


Fig. 10 Inhibition of telomerase activity and down-regulation of hTERT by propolis in U937 cells

A: After 24 hr incubation with various concentrations of propolis (0.05-0.5 μL/mL) for 24 hr, telomerase activity was assayed using a PCR-based telomeric repeat amplification protocol (TRAP) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. The experiments were performed in triplicate and data are presented as a percentage compared with telomerase activity of the control. \*p<0.05 vs. control group. B: After 24 hr incubation with propolis (0.001-0.1 μL/mL), total RNA was isolated using an RNA Zol B reagent and RT-PCR was performed using indicated primers. The amplified PCR products were run on a 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. Typical results from three independent experiments are shown. β-actin was used as a house-keeping control gene

ことなく、hTERT の発現を用量に依存して抑制することが認められた (Fig. 10B)。

**In vivo** における抗腫瘍活性

In vitro において、プロポリスがアポトーシスに起因する殺癌細胞作用が認められたので、in vivo の実験系としてS-180 担癌マウスを用いて抗腫瘍効果を検討した。

S-180を皮下接種した固型担癌マウスに対して、プロポリスを癌

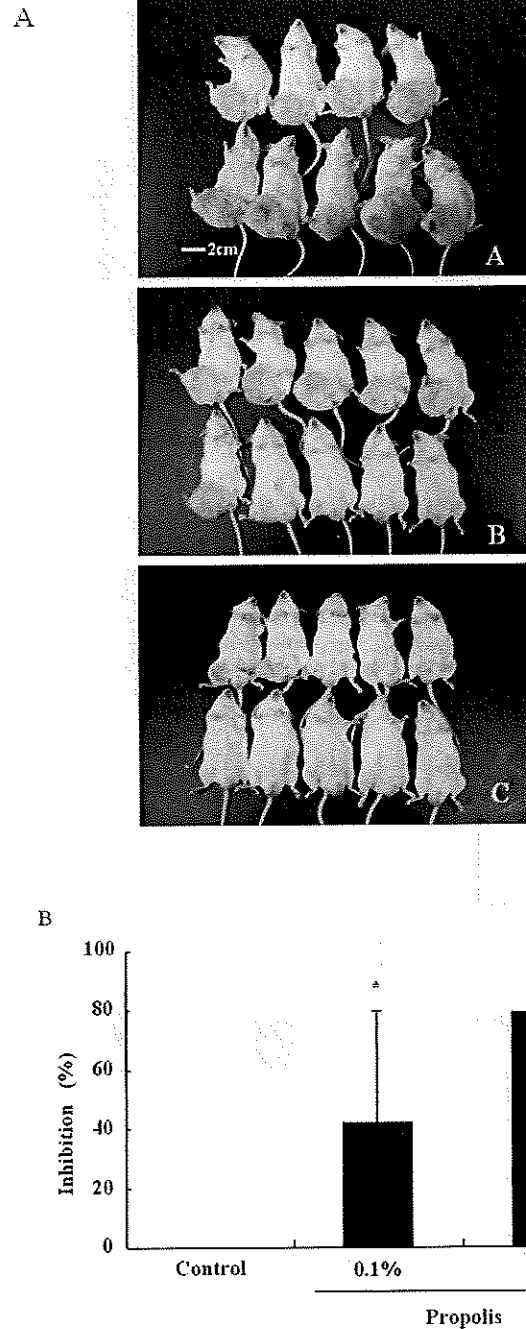


Fig. 11 Antitumor activity of propolis on the growth of Sarcoma-180 solid tumor in mice

The antitumor activity of propolis was examined against solid-types sarcoma-180 in mice. Sarcoma-180 cells suspended in saline were inoculated subcutaneously into the right thigh of 10 mice each (10<sup>6</sup> cells/mouse). After 24 hr, mice were administered propolis (0.1 or 1%) with a bottle *ad libitum* for 18 days. Control mice were administered water with a bottle. On the 18th day after sarcoma-180 cell inoculation, mice were sacrificed, and the tumors were removed and weighed. Results are expressed as the inhibitory percentage compared with the control value and are the mean ± S.E. of 10 mice. \*p<0.05 vs. control group.

細胞接種後から給水ビンで投与して腫瘍増殖に及ぼす影響を検討した。プロポリス 0.1 あるいは 1% 液の投与により、肉眼的観察

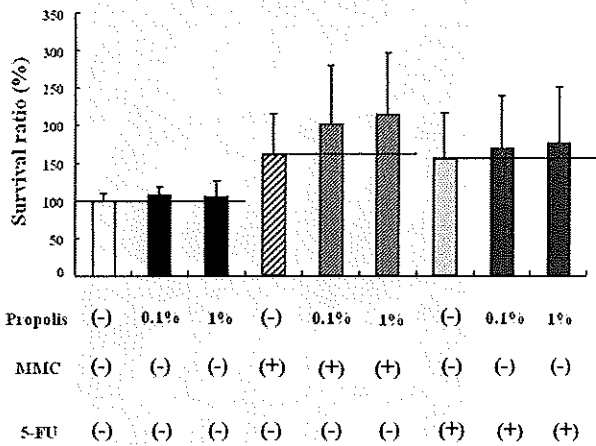


Fig. 12 Antitumor activity of propolis on the growth of sarcoma-180 liquid tumor in mice

The antitumor activity of propolis was examined against liquid-type sarcoma-180 in mice. Sarcoma-180 cells suspended in saline were inoculated intraperitoneally in mice (10<sup>6</sup> cells/mouse). After 24 hr, mice were treated with mitomycin C (0.3 mg/kg, *i.p.*) and 5-fluorouracil (8 mg/kg, *i.p.*) once a day for 5 days or propolis (0.1 or 1%) with bottle *ad libitum* for 55 days. Control mice were administered water with a bottle. Lethality was observed for 55 days. Data are expressed as the mean ± S.E. of 10 mice.

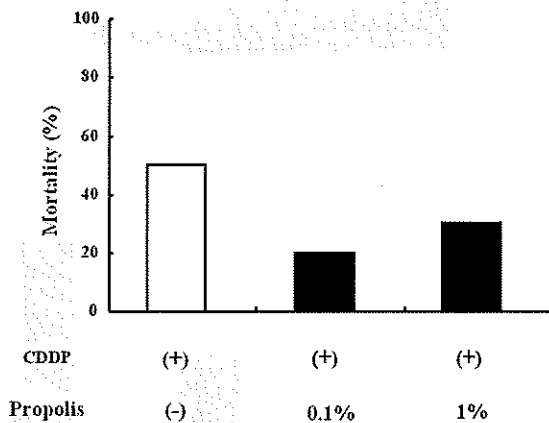


Fig. 13 Protective effect of propolis on cisplatin mortality in mice

Mice received cisplatin (17.5 mg/kg, *i.p.*), and then propolis (0.1 or 1%) was administered with a bottle *ad libitum* for 7 days. Control mice were administered water with a bottle. The number of dead mice was recorded over the succeeding 7 days. Data are expressed as the mean of 10 mice.

において用量に依存した腫瘍増殖抑制作用が観察され (Fig. 11A)、対照群との腫瘍重量の比較において42.1 あるいは80.6%の腫瘍増殖抑制作用が観察された (Fig. 11B)。この実験系において、癌細胞を接種して24時間後から、1日1回10日間腹腔内にマイトマイシンC (0.03 mg/kg)あるいは5-フルオロウラシル (0.5 mg/kg)投与により34.4 あるいは 29.5% の抑制効果が観察された。

S-180を腹腔内に接種した腹水型担癌マウスに対して、プロポリスを癌細胞接種後から給水ビンで生存期間中投与してマウスの生存に及ぼす影響を検討した。プロポリスの0.1あるいは1%投与によ

り延命効果は認められなかった。癌細胞を接種して24時間後から、1日1回5日間腹腔内にマイトマイシンC (0.3 mg/kg) あるいは5-フルオロウラシル (8 mg/kg) 投与により延命効果が認められた。プロポリス0.1あるいは1% とマイトマイシンC あるいは5-フルオロウラシルとの併用により、制がん薬による延命効果に対して増強効果が観察されその程度はマイトマイシンCにおいて著明であった (Fig. 12)。シスプラチン(17.5 mg/kg, *i.p.*) 投与すると1週間以内に50%のマウスで死亡が観察された。プロポリス 0.1 あるいは 1%液を、シスプラチン投与後から給水ビンにより自由摂取させると20 あるいは 30% の死亡率を示し、プロポリによる死亡の抑制が観察された (Fig. 13)。

考 察

プロポリスの抗菌作用は、古代においてミイラの防腐剤あるいはハチの巣の材料として使用され菓が適度の湿気あるいは温度下においても無菌状態であることから予測され、古くから多くの研究がある (Marcucci, 1955; 滝野・持田, 1982; Ghisalbert, 1976; Raven, 1983; Burdock, 1998; Banskota *et al.*, 2001; 中村・松香, 2005)。

細菌では、食中毒の原因菌であるセレウス菌 *Bacillus cereus* やサルモネラ菌 *Salmonella spp.*、胃潰瘍の原因菌であるピロリ菌 *Helicobacter pylori*、歯牙齦蝕(虫歯)の原因となる *Streptococcus mutans* や *S.sobrinus*、歯周病の原因菌である *Pyrevotell spp.* や *Actinobacillus actinomycetemcomitans*、小児咽頭扁桃炎の原因菌としての *Streptococcus pyogenes*、院内感染原因細菌としても知られるMRSA (メシチリン耐性連鎖ブドウ球菌 *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) をはじめ各種抗生物質耐性菌に対して、プロポリスあるいはエタノールや水で抽出した画分、さらには精製された成分でも有効性が報告されている。

真菌では、アフラトキシンを産生する *Aspergillus parasiticus*、カンジダ菌の *Candida spp.*、パラコキシジオイデス症の原因菌である *Paracoccidioides brasiliensis* に抗菌作用が報告されている。

抗原虫効果は膿炎の原因となるトリコモナス *Trichomonas vaginalis*、家畜のコクシジウム感染症の原因である *Eimeria spp.*、ジアルジア症の原因となる腸管寄生性のランブル鞭毛虫 *Giardia lamblia*、シヤーガス病の原因となるトリパノソーマ原虫 *Trypanosoma cruzi* で認められている。

抗ウイルス活性は、インフルエンザウイルス、ニューカッスル病ウイルス、種痘ウイルス、単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス (HSV)、水疱性口内炎ウイルス (VSV) あるいは後天性免疫不全症候群の原因ウイルス (HIV-1) に対して認められている。

プロポリスの抗微生物活性の有効成分として、フラボノイド(フラバノン、フラボン)、フェノール酸類およびそのエステル、桂皮酸誘導体、ラプダン型ジテルペン、リグナンなどが報告されている (Walker and Crane, 1987; Marcucci, 1995; Burdock, 1998; 熊澤ら