

喫煙に対する二種類のブラジル産 Propolis による 肺機能改善と抗酸化効果

具 然和^{1,2,4)}, 田中順子¹⁾, 丸山源司¹⁾, 井上登太¹⁾, 大嶋正己¹⁾, 石田寅夫^{1,4)},
Ki-Mun KANG³⁾, Jung-Sook CHOI⁵⁾, 堤 重敏⁶⁾, Yong K. Park⁷⁾

¹⁾ 鈴鹿医療科学大学大学院保健衛生学研究科

²⁾ Department of Radiation Oncology, Catholic University Medical College, Seoul, Korea

³⁾ Department of Therapeutic Radiology, Gyeongsang National University Hospital, Gyeongsang Institute of Health Sciences, Jinju, Korea

⁴⁾ 鈴鹿医療科学大学東洋医学研究所 (Hi-tech Research Center)

⁵⁾ Gyeongdo provincial college, Kyoungbook, Korea

⁶⁾ アマゾンフード研究所, 東京

⁷⁾ State University of Campinas, College of Food Engineering (UNICAMP), Department of Food Science, Laboratory of Food Biochemistry, SP, Brazil.

キーワード: 喫煙, Propolis, 肺機能改善, 抗酸化効果

要 旨

本研究では、二種類のブラジル産 Propolis を用いて喫煙に対する肺機能改善と抗酸化効果について比較検討を行った。250mg/kg の Propolis を 3 週間、ICR マウスに経口投与した。特殊な空気コントロール飼育環境の中で煙草の煙を吸わせ、その比較検討を行った。観察項目として血液検査、尿検査、肺組織学的実験、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 様活性、2,2-アゾビス (2-アミジノプロパン) 二塩酸塩 (AAPH) 法での測定などによる抗酸化作用を調べた。抗酸化活性では、Propolis 投与により、抗酸化作用が確認された。SOD 様活性による抗酸化活性では、Control 群と比べ、Propolis 投与群で有意に阻害率が高くなった。また、AAPH 法による Propolis の抗酸化作用も認められた。肺組織学的実験においても、Propolis 投与群に組織学的な機能改善が認められた。Propolis の有効成分であるフラボノイド類の抗酸化作用とアルテピリン C などによる体内の SOD 様活性による抗酸化効果が考えられる。また、Propolis のフラボノイドやアミノ酸からの免疫系を介してのストレスも改善されたと考えられる。

緒言

煙草には約 4,000 の物質が含まれており、その中の 200 種類程度は体に対して有害であるといわれている。その 200 種類以上もの有害成分のうち、3つの代表的な有害成分が、「ニコチン」と「タール」と「一酸化炭素」である¹⁾。喫煙は、喘息、重篤な呼吸器疾患である慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、肺癌などのリスクを高めることを明確にする疫学研究が多数発表されている²⁾。

Propolis の強力な殺菌、抗菌力により蜂の巣の中はほとんど無菌状態に保つことができ、生命と環境をバクテリアや細菌から守っている。Propolis の生理活性は抗菌作用、抗炎症作用、抗腫瘍作用、免疫増強作用、鎮痛作用等が報告されている。本研究においてはブラジル産 Propolis の 2 種類を用いて喫煙に対する肺機能改善と抗酸化効果について検討した。

研究方法

本研究で用いた実験動物は、日本 SLC 社において、クローズドコロニーされた ICR マウスである。ICR マウスは、一般的に研究に幅広く用いられているため

である。購入後、本研究の飼育条件に慣らすために、1 週間の予備飼育をし、実験を開始した。日本 SLC 社より購入した生後 5 週齢の雄性 (体重 25 ~ 27g) ICR マウスを用いた。本研究で用いた Propolis の 2 種類 (AFP) は、アマゾンフード研究所 (東京) から提供されたものである。各実験群は、Control (tap water) 群, Propolis1 群 (5 種類混合 Propolis: AF-05, AF-06, AF-07, AF-08, AF-19), Propolis2 群 (PropolisAF-08) の各 10 匹とした。飼育条件は、煙草の煙濃度を維持する装置として次のような仕様で装置を考案した。一酸化炭素濃度の設定を 15ppm に設定するような装置を作成した (煙草 3 本相当)。アクリル透明樹脂で 60cm × 40cm × 30cm (それぞれ縦, 横, 高さ) の寸法で box を作成し、パーミエータ (標準ガス発生装置) を用いて、強制的に box 内に 2 (l/min) の割合で煙草の煙を注入した。具体的には、煙の濃度目標の使用カラムは D-20 (住友林業株式会社製; SR-D-20) とした。これらの環境において 1 日一時間暴露させ、Total 暴露時間は 7 時間である。一つのケージに付き 5 匹ずつ入れ、一週間実験を行った。また設定温度は 25℃ とし、煙草の煙を安定して所定濃度に設定できた。飼育室は、朝 AM6:00 ~ PM6:00

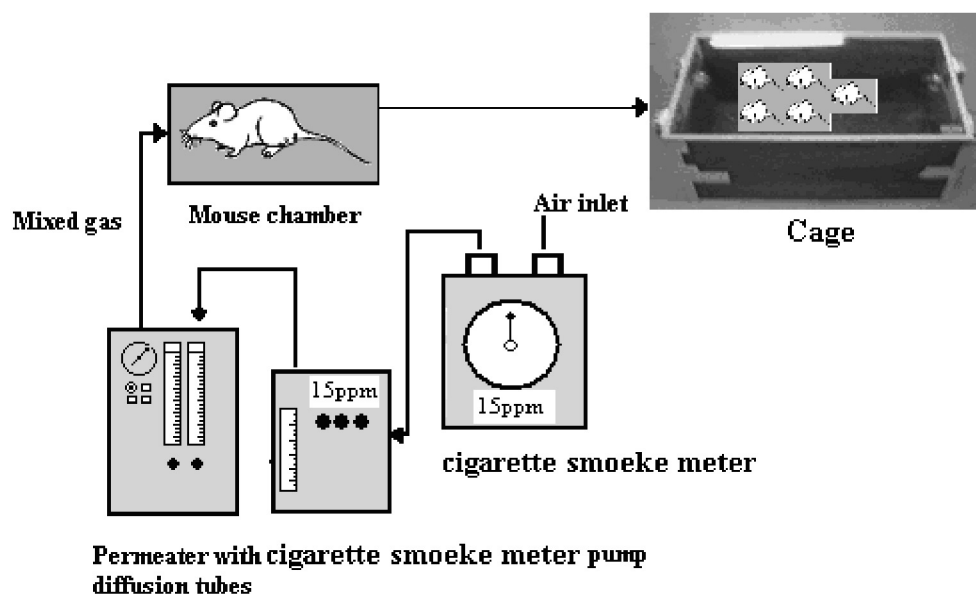


Fig. 1. Schematic emission control system of gaseous smoke of a cigarette.

までライトコントロールした。室温：25 ± 2℃，湿度：60 ～ 65%である。飼料（CA-1，日本 CLEA（株））及び水（tap water）は，自由摂取させた。

肺細胞組織染色方法

各群における肺の HE（hematoxylin eosin）組織染色は，以下の方法で行った。xylene に 3 分間を 2 回，abs. ethanol に 3 分間を 2 回，96%，90%，70% ethanol にそれぞれ 3 分間つけパラフィンを取り除いた。流水洗浄を行い完全にパラフィンが取り除けたことを確認した後，hematoxylin 溶液に 15 分つけ，流水で 30 分洗浄した後，eosin 溶液に 3 分，蒸留水で洗浄し，70%，90%，96% ethanol，abs ethanol につけ脱水を行った。xylene に 3 分間 2 回つけ，スライドガラスに ENTELLAN neu（Merck 社製）を滴下し，翌日観察を行った。

抗酸化測定の使用機器および試薬

スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）様活性（ AOA_{SOD} ：AOA は抗酸化活性）の測定には TOYOSODA 製 Micro plate reader（MBR A4），Wako 社 SOD 測定キット，AAPH（2,2-azobis（2-amidinopropane）dihydrochloride）発光測定（ AOA_{AAPH} ）は Aloka 製 BLR201，AAPH 試薬，ルミノール試薬を用いた。なお，AAPH 試薬およびルミノール試薬の調製は下記に準じた。

1) AAPH 試薬の調製

- ① Na_2HPO_4 7.098g を蒸留水で溶解，500ml にメスアップし 0.1mol/l Na_2HPO_4 溶液とした。
- ② NaH_2PO_4 5.999g を蒸留水で溶解，500ml にメスアップし，0.1mol/l NaH_2PO_4 溶液とした。
- ③ 0.1mol/l Na_2HPO_4 305ml と 0.1mol/l NaH_2PO_4 195ml を混合し 0.1mol/l PBS（pH7.0）とした。
- ④ 2,2-azobis（2-amidinopropane）dihydrochloride（AAPH）5.424g を 500ml の 0.1mol/l PBS に溶解させ，AAPH 試薬とした。

2) ルミノール試薬の調製

- ① NaOH 20g を蒸留水で溶解，500ml にメスアップ

し 1mol/l NaOH 溶液とした。

- ② ホウ酸 1.546g を 400ml の蒸留水で溶解，1mol/l NaOH で pH9.3 に調整後 500ml の溶液とし 0.05mol/l ホウ酸緩衝液とした。
- ③ 0.05M ホウ酸緩衝液とメタノールを 1：3 で調合した溶液 500ml に，チトクローム C 50.438mg とルミノール 9.744mg を溶解させルミノール試薬とした。

投与方法

投与方法は胃ゾンテ強制経口投与にて隔日で行い，投与量は 250mg/kg/0.3ml とした。実験開始まで 3 週間事前投与を行った。

原理

AOA_{SOD}

XA（キサンチン）に XOD（キサンチンオキシターゼ）を加え，酵素活性温度の 37℃ に加温すると XA が XOD と反応し， O_2^- （スーパーオキシドアニオン）が発生する。SOD は 2 つのスーパーオキシドアニオンを過酸化水素と酸素に不均化する酵素であり（式(1)）血清中に存在する。



scavenging されずに残った O_2^- は加えた NO_2^- -TB（ニトロブルーテトラゾリウム）と結合し，ジホルマゼンを形成して紫色を呈する（Fig. 2）。この際の発色を測定することで SOD 阻害率（2 式）として換算し，これを SOD 様活性度とした。

SOD 様活性度(阻害率%)

$$= \frac{(E_{BL} - E_{BL-BL}) - (E_S - E_{S-BL})}{(E_{BL} - E_{BL-BL})} \times 100 \quad (2)$$

E_S ：検体（Sample）， E_{BL} ：盲検（Blank）， E_{S-BL} ：検体盲検， E_{BL-BL} ：試薬盲検

AOA_{AAPH}

2,2-azobis（2-amidinopropane）dihydrochloride（AAPH）は 37℃ に加温する事により分解し，ベルオ

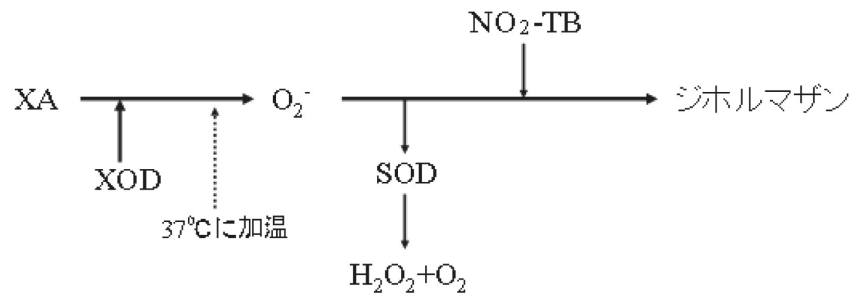


Fig. 2. SOD 様活性測定原理と過程

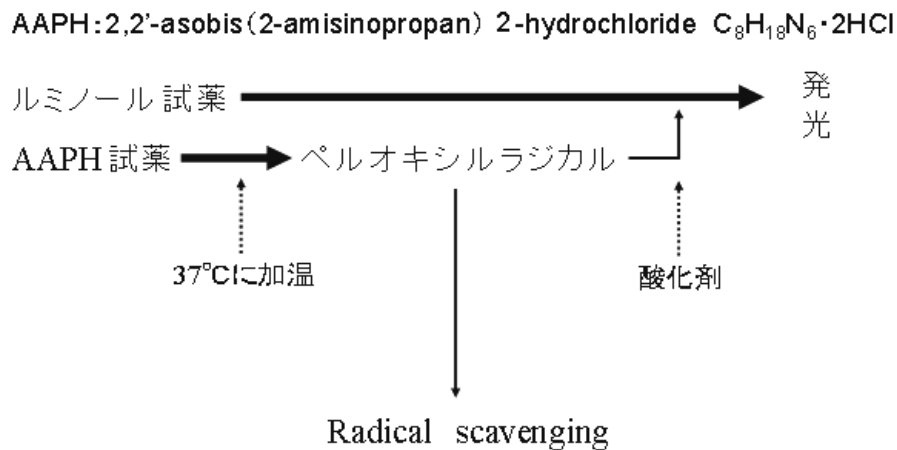


Fig. 3. AAPH 抗酸化測定原理と過程

キシラジカルを発生する。ペルオキシラジカルはルミノールに対し酸化剤として働くため、ルミノールの酸化還元反応により発光する (Fig. 3)。その発光強度【count/min】を測定することにより消去されずに残ったペルオキシラジカルの量を測定しようとするものである。

測定方法

AOA_{SOD}の測定

心臓採血により採取した血液をヘパリン処理し血清分離を行った後、血清を96穴プレートに分注した。Sampleのblankとして蒸留水を用いた。その後、発光試薬を入れ、1分間攪拌後、酵素溶液およびblank溶液を注入、攪拌ののち、 37°C 、28min インキュベートした。その後、反応停止液を添加し、5min 攪拌後、

micro plate reader で測定した。

AOA_{AAPH}の測定

心臓採血により採取した血液をヘパリン処理し血清分離を行った後、血清自体には強い抗酸化能力を有する為、 0.1mol/IPBS (pH7) で100倍希釈し、 $200\mu\text{l}$ の希釈血清にAAPH試薬 $200\mu\text{l}$ を添加した。ルミネッセンスリーダーにその検体を注入後、 37°C にて2分間加温し、加温が十分となったらルミノール試液 $200\mu\text{l}$ を注入し、発光強度を測定し、AAPHのanti oxidant activityとした。

研究結果

AOA_{SOD}抗酸化活性

AOA_{SOD}の測定結果をTable 1とFig. 4に示す。

Contro 1 群に比べ propolis 1 群 ($P < 0.05$), propolis 2 群 ($P < 0.01$) に統計学的な有意差が認められ, SOD 様活性が上昇している事がわかる。特に propolis 2 群の方の SOD 活性が高かった。

このことから, propolis にはスーパーオキシドアニオンに対して抗酸化能力を有することが確認された。

AOA_{AAPH}

AOA_{AAPH} の測定結果を Table 2 と Fig. 5 に示す。Control 群に比べ propolis1 群と propolis 2 群ともに統計学的な有意差が認められた ($P < 0.01$)。これにより, propolis はペルオキシラジカルに対する抗酸

化能力が高いことも確認された。

肺細胞組織染色の変化

肺細胞組織の変化の結果を Fig. 6 に示す。喫煙肺は, 解剖時に鬱血状態が見られ, 赤紫色が覆っていた。喫煙 + Propolis 肺組織に対し, マウス喫煙肺のコントロールは, より肺気腫を呈し肺実質部に肺胞壁の破壊を伴う気腔の増大が生じており, 肺胞毛細血管が著しく消失している事が示唆される。また, 肺細胞の空隙が大きく肺胞中隔は薄く引っ張られているのが分かる。

組織からも分かるように, 喫煙のみのコントロール

Table 1. Effect of each *Propolis* groups on SOD activity in mice serum (Mean $\pm$ S. E.).

Groups	SOD activity (inhibition rate (%)) Mean $\pm$ S. E.
Control	15.34 $\pm$ 3.88
Propolis No. 1	22.36 $\pm$ 4.65*
Propolis No. 2	29.75 $\pm$ 2.10**

Significantly different from * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$ by tukey-kramer test.

Table 2. Effect of each *Propolis* groups on antioxidation activity in mice serum (Mean $\pm$ S. E.).

Groups	Antioxidation activity (kcount) Mean $\pm$ S. E.
Control	0.103 $\pm$ 0.019
Propolis No. 1	0.061 $\pm$ 0.021**
Propolis No. 2	0.072 $\pm$ 0.025**

Significantly different from ** $p < 0.01$ by tukey-kramer test.

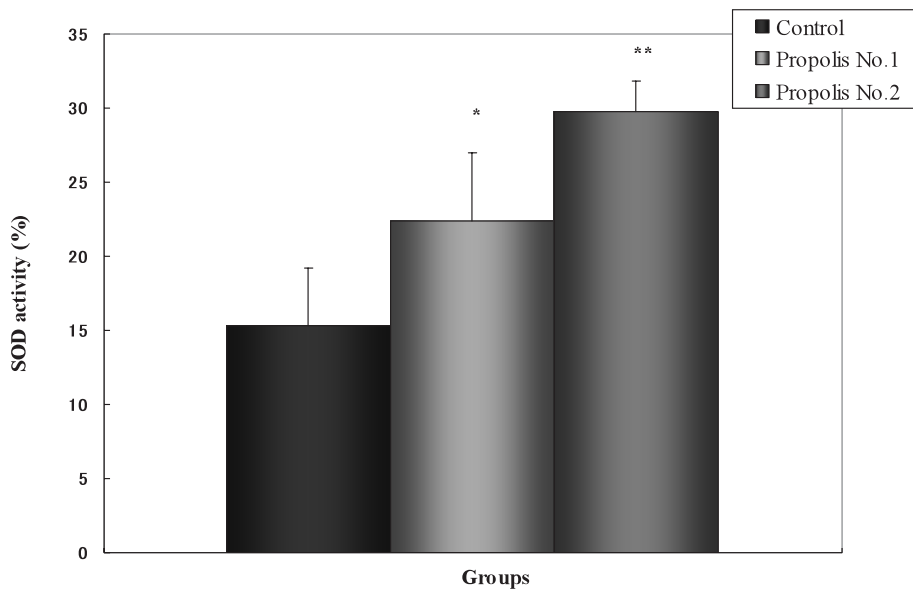


Fig. 4. Anti-oxidation activity measured by the SOD method. Significant differences (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) were found between control group and each propolis group by tukey-kramer test.

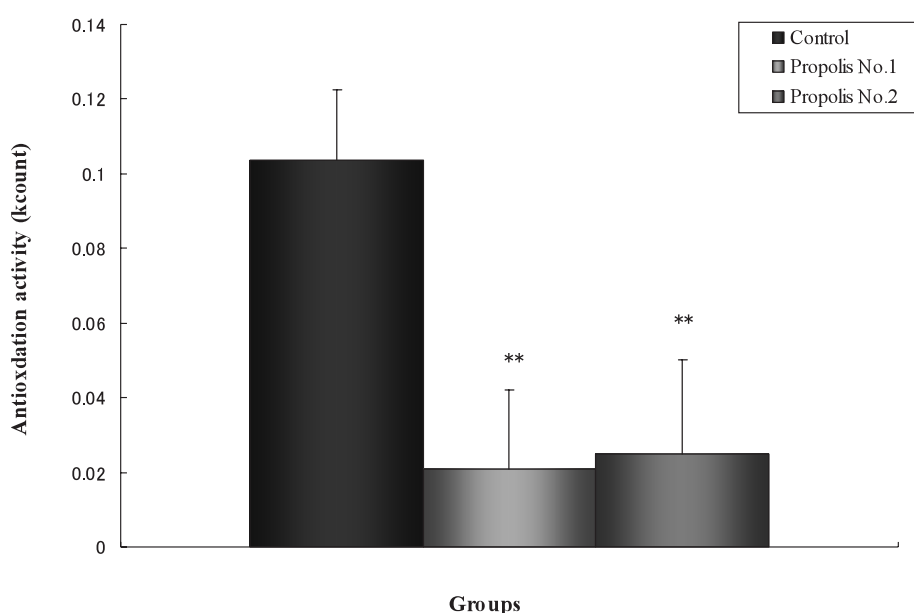


Fig. 5. Anti-oxidation activity measured by the AAPH method. Significant differences (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) were found between control group and each propolis group by tukey-kramer test.

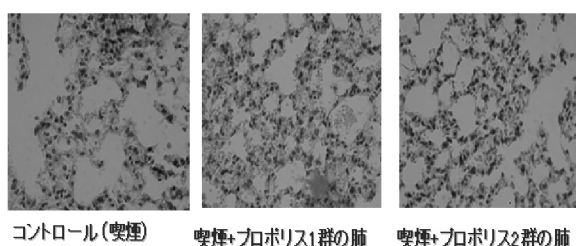


Fig. 6. Control (喫煙のみ) 群, 喫煙 + Propolis 1 投与群, 喫煙 + Propolis 2 投与群における各群の肺細胞の組織学的変化。

群の肺細胞は, Propolis 投与群に比べて肺細胞の間隔が空いている。喫煙 + Propolis 1 群と喫煙 + Propolis 2 群の肺細胞には肺細胞の間隔が密である。炎症を起こしているのが認められるが, 喫煙 + Propolis 1 群と喫煙 + Propolis 2 群の肺には正常状態であった。

考察

煙草には人体に対して約 200 種類の有害物質が含まれている。特に代表的な有害成分が, 「ニコチン」と「タール」と「一酸化炭素」である¹⁾。これらは, すべてが人体の活性酸素高めるだけでなく, 血流の低下や老化を招く。本研究では, ブラジル産 Propolis の二種

類を用いて喫煙に対する肺機能改善と抗酸化効果について比較検討を行った。

SOD 様活性については propolis 1 群より propolis 2 群に有意な活性が認められた。従って, propolis にはスーパーオキシドアニオンに対して抗酸化能力を有することが確認された。propolis の SOD 様活性により, 生体中の喫煙からの O_2^- ラジカルに対して scavenger として働き, 肺細胞損傷が抑制された事が考えられる^{3,4)}。また, 本研究により, AAPH 法における抗酸化活性も確認されたが, Montoro らは propolis の有効成分により抗酸化作用を証明している³⁾。Scheller らは Propolis 投与による放射線照射後の白血球減少が抑制された事に対して Propolis による radical scavenging 効果であると報告した²⁾。さらに Park らは Propolis のクレスチンによる radical scavenging 効果を有すると報告している⁵⁾。本研究においては AAPH 法および SOD 法における抗酸化測定ではその効果が確認されているので, ペルオキシラジカルおよびスーパーオキシドアニオンにおいて radical scavenging 作用であると考えられる。また, Propolis の有効成分であるフラボノイドによる radicalscavenge 作用^{6,7)} により,

肺細胞を改善したと考えられる。従って、Propolis の投与において抗酸化作用により、体内の代謝促進により、細胞再生が活性されると思われる。

文献

- 1) Bhavsar TM, Cerreta JM, Cantor JO: Short-term cigarette smoke exposure predisposes the lung to secondary injury. *Lung* **185**(4), 227-233, 2007.
- 2) Scheller S, Kawalski H, Oklek K, Dworniczak S, Matsuno T, Waldmar-Klimmek K, Rajca M, Shani J: Correlation between virulence of various strains of mycobacteria and their susceptibility to ethanolic extract of propolis (EEP). *Z Naturforsch.* **53** (11-12), 1040-1044 1998.
- 3) Montoro A, Almonacid M, Serrano J, Saiz M, Barquinero JF, Barrios L, Verdu G, Perez J, Villaescusa JI: Assessment by cytogenetic analysis of the radioprotection properties of propolis extract. *Radiat Prot Dosimetry* **115** (1-4), 461-464, 2005.
- 4) Rossi A, Longo R, Russo A, Borrelli F, Sautebin L: The role of the phenethyl ester of caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lung cyclooxygenase activity by propolis. *Fitoterapia.* **73** Suppl., 30-37, 2002.
- 5) Park YK, Fukuda I, Ashida H, Nishiumi S, Guzman JP, Sato HH, Pastore GM: Suppression of dioxin mediated aryl hydrocarbon receptor transformation by ethanolic extracts of propolis. *Biosci Biotechnol Biochem.* **68**(4), 935-938, 2004.
- 6) Banskota AH, Nagaoka T, Sumioka LY, Tezuka Y, Awale S, Midorikawa K, Matsushige K, Kadota S: Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *J Ethnopharmacol.* **80**(1), 67-73, 2002.
- 7) Kimoto T, Koya-Miyata S, Hino K, Micallef MJ, Hanaya T, Arai S, Ikeda M, Kurimoto M: Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and artepillin C. *Virchows Arch.* **438**(3), 259-270, 2001.

Lung Function Improvement and Antioxidation Effect of Two Kinds of Brazilian Propolis Products for Tobacco Smoke Injury

Yeunhwa GU^{1,2,4)}, Junko TANAKA¹⁾, Kenji MARUYAMA¹⁾,
Tota INOUE¹⁾, Masami OSHIMA¹⁾, Torao ISHIDA^{1,4)},
Ki-Mun KANG³⁾, Jung-Sook CHOI⁵⁾,
Shigetoshi TSUTSUMI⁶⁾ and Yong K. Park⁷⁾

¹⁾Graduate School of Health Science, Suzuka University of Medical Science

²⁾Department of Radiation Oncology, Catholic University Medical College, Seoul, Korea

³⁾Department of Therapeutic Radiology, Gyeongsang National University Hospital, Gyeongsang Institute of Health Sciences, Jinju, Korea

⁴⁾Hi-tech Research Center, Suzuka University of Medical Science

⁵⁾Gyeongdo provincial college, Kyoungbook, Korea

⁶⁾Amazon Food, Co., Ltd. Research Center, Tokyo Japan

⁷⁾State University of Campinas, College of Food Engineering (UNICAMP), Department of Food Science, Laboratory of Food Biochemistry, SP, Brazil.

Key Words: Tobacco, Propolis, Lung function improvement, Antioxidation effect

Abstract

In this study, improvement of lung function and positive effect of antioxidation were examined using two kinds of Brazilian propolis products for overcoming injury caused by tobacco smoke. We orally administered 250 mg/kg of propolis to ICR mice over a three week period. We let mice breathe smoke of a cigarette in a special air control breeding environment and performed the comparison. We examined antioxidative effects of propolis using a blood test, a urine analysis, a pulmonary histological experiment, SOD-like activity, and the AAPH method. Using these methods for antioxidation activity, antioxidative effect of propolis was confirmed. The antioxidation activity as SOD-like activity in the propolis treated group was significantly higher than that in the control group. In addition, antioxidation action of the propolis was also confirmed by the AAPH method. In a histological experiment of the lung, improvement of histological function was found in the propolis treated group. The

antioxidation effect is probably caused by the antioxidative action of the flavonoids which are primary active components of propolis and by internal SOD activity like altopilin C-like activity. In addition, we thought that stress that the immune system goes through from an amino acid and flavonoid of propolis was improved.