

平成 22 年 5 月 11 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790430
 研究課題名（和文） 代替医療素材を目指したプロポリスのウイルス感染症に関する研究
 研究課題名（英文） Antiviral activity of propolis
 研究代表者
 清水 寛美（SHIMIZU TOMOMI）
 九州保健福祉大学・薬学部・助教
 研究者番号：80412831

研究成果の概要（和文）：プロポリスは、諸外国ではすでに代替医療素材として使用されている天然物質である一方、国内ではその科学的知見が低いことから健康食品としての使用に留まっている。本研究では、プロポリスの様々なウイルス感染症に対する有用性を動物レベルで証明し、一部作用機序も併せて検討した。さらに、異なる週齢層のマウスによる評価を加え、プロポリスがウイルス感染症に対して治療効果を有することを明らかにし、幅広い有用性と適用についての科学的知見の蓄積の一助とした。このことからプロポリスがウイルス感染症に対して代替医療素材として利用可能であることを示した。

研究成果の概要（英文）：Propolis has been worldwide as a folk medicine since ca.300 BC. It is currently used as an alternative medicine in various countries. However, in Japan, it uses as only a dietary supplement to maintain or improve human health. Because of propolis is little studied for their effects. In this study, it was examined antiviral effect and its mechanism of propolis. These results were revealed the widely usefulness and application of propolis

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：食品衛生，プロポリス，ウイルス感染症，代替医療，健康食品

1. 研究開始当初の背景

プロポリスは、その多様な生理活性と広範な用途性から、近年、代替医療への使用に高い支持を得ている健康食品の一つである。一方、ウイルス感染症は、免疫機能の低下や亢進が、原因ウイルスの増殖に影

響し、発熱や疼痛といった様々な防御すべき生体シグナルを生み出す疾患の一つである。こうしたウイルス感染症の予防・改善には、プロポリスは非常に有用な物質であると考えられるが、プロポリスのウイルス感染症に対する有用性については、様々

な生体シグナルを加味した実験、すなわち動物レベルでの報告がほとんどない。これらの科学的知見を増やすことは、プロポリスの幅広い有用性と適正使用を証明するものであり、国内でも代替医療素材として利用可能な食品であることを明らかにしていくものと考えた。

2. 研究の目的

これまでに著者は、インフルエンザウイルス感染症に対するプロポリスの有効性をマウス感染モデルを用いて検討したところ、経口投与によって治療効果を持つことを見出した。本研究では、プロポリスの、インフルエンザウイルスの他、異なるウイルス感染症に対しても有用性を動物レベルにて明らかにする。それら作用機序の一環である免疫賦活作用やウイルスの増殖抑制作用について検討を加え、プロポリスの代替医療に利用可能な新たな有効性と用途を見出す目的がある。また、ウイルス感染症は免疫低下が症状の増悪化に関連していることから、一般的に感染防御機能が低下している高齢者に対してもプロポリスが有効のか否かを検討に加え、治療のみならず予防での利用も目指した研究とした。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた抗ウイルス活性の検討：培養細胞は、MDCK 細胞、Vero 細胞、HEp-2 細胞を用いた。ウイルスはインフルエンザウイルス (IFV ; A/PR8/34)、ヘルペスウイルス (HSV-1, 7401H 株)、Respiratory syncytial virus (RSV ; A2 株) を用いた。抗ウイルス活性はブラック減少法により検討し、MTT 法による細胞毒性の結果と比較し評価した。

(2) マウス脾細胞を用いた免疫賦活作用の検討：マウスから脾臓を摘出し、2%牛血清含有の維持培地を用いて調製した。さらにプロポリスを添加し、37 でインキュベート後、脾細胞の増殖を MTT 法を用いて測定した。また、その上清の IFN- γ 量を ELISA キットにより測定した。

(3) ウイルス感染マウスに対する影響、IFV 感染マウス：マウスは DBA/2 (Th1 応答優性) および BALB/cN (Th2 応答優性) 種の雌性、6 週齢および 6 ヶ月齢を用いた。マウスはウイルス (500pfu/mouse) を経鼻接種し感染した。プロポリスは 10mg/kg の用量で、感染日から 1 日 3 回経口投与し、体重減少、生存日数の延長、肺胞洗浄液 (BALF) 中のウイルス量の測定によって、抗ウイルス効果を評価した。また、BALF 中のサイトカイン量は ELISA キットにより測定した。プロポリスによる細胞障害性リンパ球 (CTL) 細胞活性は、感染マウスの肺細胞を用い、P-815 標的細胞の細胞死を lactate dehydrogenase (LDH) 遊離法で測定した。

(4) IFV 増殖抑制作用の検討：培養細胞に IFV 感染後プロポリスを添加した。細胞から IFV の RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法を用いて M 遺伝子の m, c, vRNA を検出した。

(5) ウイルス感染マウスに対する影響、HSV-1 感染マウス：マウスは BALB/cN 種の雌性、6 週齢および 6 ヶ月齢を用いた。マウスはウイルス (10⁶pfu/mouse) を経皮接種し感染した。プロポリスは 10mg/kg の用量で、感染日から 1 日 3 回経口投与し、皮膚病変形成遅延、生存期間の延長を観察し、抗ウイルス効果を評価した。また、感染マウスの脾細胞を用いたプロポリスの IFN- γ 産生量を算出した。

4. 研究成果

(1) 抗ウイルス活性：ウイルスには動物実験が実施可能な 3 種類、IFV、HSV-1 および RSV を用いた。Table 1 に示したように、HSV-1 および RSV に対し、6 種類のうち一部のプロポリスに抗ウイルス活性があることがわかった。また、これまでに IFV に対しては、AF-08 が 22.6 \pm 2.0 μ g/ml と最も強い抗ウイルス活性が認められている。

Table 1 プロポリスの抗ウイルス活性と細胞毒性

	HSV		RSV	
	EC ₅₀ (μ g/ml)	CC ₅₀ (μ g/ml)	EC ₅₀ (μ g/ml)	CC ₅₀ (μ g/ml)
AF-05	64.9 \pm 4.2*	88.5 \pm 1.6	14.7 \pm 6.4*	91.3 \pm 1.3
AF-06	61.0 \pm 0.2*	93.9 \pm 1.8	< 10*	70.7 \pm 0.7
AF-07	51.4 \pm 1.3*	82.0 \pm 0.3	< 5*	92.3 \pm 2.2
AF-08	> 50	43.4 \pm 2.6	> 5	3.7 \pm 0.1
AF-17	> 50	55.7 \pm 1.6	> 5	3.5 \pm 0.1
AF-19	48.0 \pm 2.5*	94.2 \pm 0.3	6.0 \pm 1.8*	88.6 \pm 0.1
Acv	0.48 \pm 0.05	> 100	-	-
Ribavirin			0.87 \pm 0.15	136.9 \pm 9.5

* P < 0.05 vs. control by Student's t -test.

以上から、特にプロポリスの活性に選択性が見られた、HSV-1 および IFV に対し動物実験をすることにした。

(2) 免疫賦活作用：検討した 6 種類のうち 2 種類に有意な IFN- γ 誘導能があることがわかった (Table 2)。中でも、AF-06 では低用量で、作用が認められ、免疫賦活作用があることが示唆された。

Table 2 マウス脾細胞における IFN- γ 産生量

	濃度 (μ g/ml)			
	0	0.03	0.1	0.3
AF-06	3.7 \pm 1.0	432.6 \pm 203.0*	372.8 \pm 44.0*	228.3 \pm 59.4*
AF-08	3.6 \pm 1.0	107.5 \pm 6.0	210.7 \pm 97.5*	332.5 \pm 110.0*

*、** P < 0.05, 0.01 vs. control by Student's t -test.

(3) IFV 感染症に対する治療効果とその作用機序 DBA/2 マウス：感染による体重減少は、マウス 6 週齢において AF-06 および AF-08 とともに有意な抑制効果が見られた。一方、BALF 中のウイルス量は AF-08 投与群にのみ減少傾向がみられた (Fig. 1)。

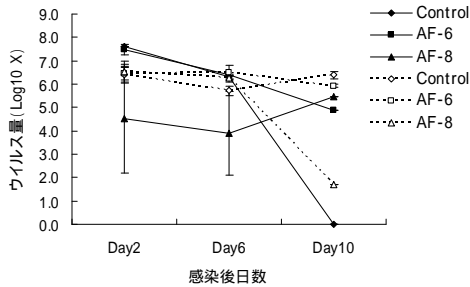


Fig. 1 BALF 中のウイルス量

BALB/cN マウス：感染による体重減少は、プロポリス投与による有意な効果は見られず、週齢による差もなかった。一方、BALF 中のウイルス量は 6 週齢では AF-08 投与群が、6 ヶ月齢では AF-06 および AF-08 投与群に有意な減少が見られた (Fig. 2)。

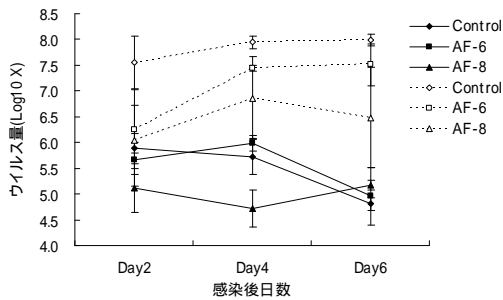


Fig. 2 BALF 中のウイルス量の減少

これらマウス BALF 中のサイトカイン量を測定したところ、感染後 2 から 4 日まで、6 ヶ月齢マウスにおいて IFN- γ が高い傾向にあり、Th1 優位を示した。また、DBA/2 マウスでは 6 日まで有意な IFN- γ 産生が認められた。

これらの結果、Th1 応答優位な DBA/2 マウスでは体重減少の軽減といった感染初期からの症状緩和が見られ、Th2 応答優位な BALB/cN マウスでは、体重減少には影響しないものの、ウイルス量の減少が見られた。また、BALF 中の IFN- γ 産生傾向から、IFV 感染において、プロポリスが Th1 優位に作用をしていることが推察された。

そこで、6 ヶ月齢マウスを用いて、感染マウスの脾細胞および肺細胞における CTL 活性を測定した (Fig. 3)。

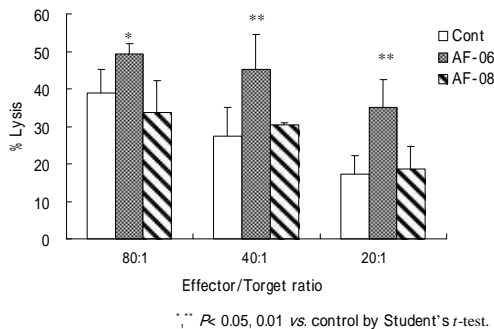


Fig. 3 ウイルス感染老齢マウスにおける CTL 活性

コントロールと比較して、AF-06 投与群に優位な CTL 活性の増加が認められた。また、プロポリスを感染 7 日間前投与の場合にも同様の効果が認められた。一方、AF-08 では認められず、脾細胞ではどちらにもこのような効果は顕著に見られなかった。

以上から、AF-06 投与は Th1 応答を増強することがわかった。免疫応答は加齢にともなって Th2 優位となる。ウイルスの排除には CTL などの細胞性免疫が主として作用する。すなわち、Th1 応答優位な DBA/2 マウスではその優位性を増強し、Th2 応答優位な BALB/cN マウス (特に老齢マウス) では Th1 応答を補うことで、これら抗ウイルス効果があったと考えられた。Th2 から Th1 応答へのシフトが治療効果となり、この効果は、前投与なくして効果が得られることから、プロポリスによる新たな予防法も確立できるかもしれない。

(4) IFV の RNA 合成阻害作用

前述の AF-08 の抗ウイルス効果は、週齢および種差を問わず認められ、特に BALF 中のウイルス量が減少したことから、直接的な抗ウイルス作用が推察された。Table 3 に示したように、培養細胞からの RNA 量を測定したところ、AF-08 添加により、濃度依存的にウイルス RNA 量の減少が認められた。このことは、AF-08 が IFV の RNA 合成を阻害することを示しており、直接的な抗ウイルス効果を有することを明らかにした。

Table 3 ウイルス RNA 合成の阻害作用

	AF-08 ($\mu\text{g/ml}$)			
	0	10	30	60
mRNA	3.2 \pm 0.3	0.6 \pm 0.3**	0.6 \pm 0.4**	0.2 \pm 0.1**
cRNA	0.5 \pm 0.2	0.1 \pm 0.03*	0.1 \pm 0.1*	0.03 \pm 0.1*
vRNA	1.0 \pm 0.3	0.2 \pm 0.1**	0.2 \pm 0.1**	0.1 \pm 0.03**

* , ** $P < 0.05, 0.01$ vs. control by Student's t -test.

(5) HSV-1 感染症に対する治療効果とその作用機序

6 週齢のマウスでは、コントロールと比較して、AF-06 に有意な抗 HSV-1 効果が認められた (Table 4)。6 ヶ月齢のマウスでは、AF-06 および AF-08 に抗 HSV-1 効果が見られた。

Table 4 皮膚変性遅延と生存期間の延長

		水疱形成日	帯状疱疹形成日	生存期間
		6 週齢	Control	3.1 \pm 0.1
	AF-06	4.0 \pm 0.3*	6.0 \pm 0.3**	7.7 \pm 0.7
	AF-08	3.4 \pm 0.2	5.1 \pm 0.1	6.3 \pm 0.2
6 ヶ月齢	Control	3.9 \pm 0.6	6.3 \pm 0.1	7.0 \pm 0.4
	AF-06	4.5 \pm 0.3*	6.3 \pm 0.1	7.0 \pm 0.5
	AF-08	4.8 \pm 0.6*	6.1 \pm 0.5	7.5 \pm 1.2*

* , ** $P < 0.05, 0.01$ vs. control by Student's t -test.

一般的に抗 HSV-1 効果は、感染時における IFN- γ 量により左右される。AF-06 および AF-08 添加による感染マウス脾細胞での IFN- γ 誘導能を検討したところ、AF-06 のみに

有意に認められた。一方、AF-08 は認められなかった。そこで、感染マウス脳でのウイルス量を測定したところ減少し、さらに遅延型過敏反応試験で有意な反応の増強作用が認められた。このことから、AF-08 の抗 HSV-1 効果は、そのもの自身かあるいは、活性代謝物によるものであり、HSV-1 自体の増殖を抑制する作用があることが示唆された。

(6) まとめ

プロポリス 6 種類のうち、免疫賦活作用を有する AF-06 と直接的な抗ウイルス活性を有する AF-08 を見出した。それぞれ、有する効果により、ウイルス感染症に対して治療効果を有することがわかった。さらに、老齢のマウスに対しても有用であり、ウイルス感染症による重篤化を軽減し、予防として用いる可能性も見出せた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

Shimizu T., Hino A., Tsutsumi A., Park.Y.K., Watanabe W. and Kurokawa M.: Anti-influenza virus activity of propolis in vitro and its efficacy against influenza infection in mice. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, **19**,(2008), 7-13.

Watanabe W., Shimizu T., Hino A. and Kurokawa M.: Effects of decabrominated diphenyl ether(DBDE) on developmental immunotoxicity in offspring mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **26**,(2008),315-319.

Hama Y., Kurokawa M., Imakita M., Yoshida Y., Shimizu T., Watanabe W., Shiraki K.: Interleukin 12 is a primary cytokine responding to influenza virus infection in the respiratory tract of mice. *Acta Virologica*, **53**, (2009), 233-240.

Kurokawa M., Watanabe W., Shimizu T., Sawamura R., Shiraki K.: Modulation of cytokine production by 7-hydroxycoumarin in vitro and its efficacy against influenza infection in mice. *Antiviral Research*, **85**, (2009), 373-380.

Sawamura R., Sun Y., Yasukawa K., Shimizu T., Watanabe W., Kurakawa M.: Antiviral activities of diarylheptanoids against influenza virus in vitro. *Natural Resource Letter*, **64**, (2010), 117-120.

Watanabe W., Shimizu T., Sawamura R., Hino A., Konno K., Hirose A., Kurakawa M.: Effects of tetrabromobisphenol A, a brominated flame retardant, on the immune

response to respiratory syncytial virus infection in mice. *International Immunopharmacology*, **10**, (2010), 393-397.

Watanabe W., Shimizu T., Sawamura R., Hino A., Konno K., Kurokawa M.: Functional disorder of primary immunity responding to respiratory syncytial virus infection in offspring mice exposed to a flame retardant, decabrominated diphenyl ether, perinatally. *Journal of Medical Virology*, 9999, (2010), 1-8.

木村敏行,清水寛美,山本郁男:鎮痛効果を持つピリミジンヌクレオシド誘導体,生体の科学,60(5),454-455,2009.

[学会発表](計 5 件)

清水寛美,渡辺 渡,澤村理英,日野あかね,堤 重敏,Y.K.Park,黒川昌彦:臭素化難燃物暴露によるRSウイルス感染病態の増悪化に対するプロポリスの効果,第18回抗ウイルス療法研究会,2008.5,鹿児島.

清水寛美,渡辺 渡,澤村理英,堤 淳子,堤 重敏,安川 憲,黒川昌彦:プロポリスAF-08の抗インフルエンザウイルス作用機序解析とその活性画分の検討,第56回日本ウイルス学会学術集会,2008.10,岡山.

清水寛美,渡辺 渡,澤村理英,日野あかね,安川 憲,堤 淳子,堤 重敏,Y.K.Park,黒川昌彦:プロポリスAF-08およびその活性画分の抗インフルエンザウイルス作用と作用機序解析,第25回日本薬学会九州支部大会,2008.12,宮崎.

支部大会,2008.12,宮崎.
清水寛美,渡辺 渡,澤村理英,堤 淳子,堤 重敏,安川 憲,黒川昌彦:抗インフルエンザウイルス活性を有するプロポリスAF-08の活性物質の探索,第57回日本ウイルス学会学術集会,2009.10,東京.

清水寛美,渡辺 渡,澤村理英,日野あかね,安川 憲,堤 淳子,堤 重敏,Y.K.Park,黒川昌彦:抗インフルエンザウイルス活性を有するプロポリスAF-08の活性物質の探索(2),日本薬学会第130年会,2010.3,岡山.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 1 件)

名称：抗インフルエンザウイルス剤
発明者：安川 憲，黒川昌彦，清水寛美，澤村理英
権利者：安川 憲，黒川昌彦，清水寛美，澤村理英
番号：特許 2008-302042
取得年月日：2009年11月27日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 寛美 (SHIMIZU TOMOMI)
九州保健福祉大学・薬学部・助教
研究者番号：80412831

(2) 研究分担者

なし ()
研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()
研究者番号：