【原著】

水溶性プロポリス(WSP)と乳酸産生菌(EF-2001)の混合物による抗腫瘍作用ならびに抗酸化作用

篠田憲彦[1]、三宅泰士[1]、松島祐樹[1]、鈴木郁功[1]、長谷川正俊[2]、
岩佐広行[3]、岩佐正弘[3]、小阪孝三[4]、内藤康弘[2]

[1] 鈴鹿医療科学大学大学院保健衛生学研究科
[2] 医療法人）社団聖友会内藤メディカルクリニック
[3] 日本ベルム（株）
[4] 三重大学大学院医学研究科

（受付：平成20年3月13日）
（受理：平成20年4月10日）

要　旨

水溶性プロポリス（WSP）は免疫賦活作用と抗酸化作用ならびに鎮痛や抗炎症作用を有し、EF-2001（*Enterococcus faecalis*-2001）は免疫賦活作用及び整腸作用等が報告されている。そこでブラジル産の水抽出プロポリス（WSP）と乳酸球菌製剤（EF-2001）混合物における Sarcoma-180 固形癌への腫瘍内投与による抗腫瘍効果をマウスにおいて検討した。

先行研究で、固形癌移植マウスに WSP と EF-2001 が 1：1 同比率の混合物を 400 mg/kg を経口投与した場合においては、2 週目までは有意な腫瘍抑制効果はみられなかったが 3 週目より腫瘍抑制効果を確認している（$P < 0.05$）。今回 WSP と EF-2001 が 1:3 の被験混合物について、固形癌移植マウスに 100 mg/kg、200 mg/kg ならびに 400 mg/kg を腫瘍内に投与した。その結果 200 mg/kg および 400 mg/kg においては顕著な有意差がみられ、用量依存的な抗腫瘍効果が認められた（$P < 0.01$）。これは EF-2001 の免疫賦活作用に加えて EF-2001 の整腸作用が加わり、WSP が効果的に吸収にされたため WSP の有する抗腫瘍作用が相乗的、効率的に発現したものと考えられる。WSP と EF-2001 を最適な比率で混合させた場合にはより抗腫瘍活性が高められる可能性が示唆された。

キーワード：水溶性プロポリス（WSP）、*Enterococcus faecalis*-2001（EF-2001）、抗腫瘍効果、抗酸化作用

緒　言

水溶性プロポリス（WSP）は多岐に亘り研究され、免疫賦活作用[1]、抗酸化作用[2]、鎮痛・抗炎症作用[3,4]、抗腫瘍作用[2,5]等の多種多様な活性が明らかになっている。また、乳酸球・桿菌には、整腸作用[6]や腸内細菌叢の正常化[7]など消化機能に対する改善効果が以前から知られており、免疫機能促進作用、血圧低下作用、好中球及びマクロファージ等の食細胞の活性化作用[8,9]等を有することが報告されている。今回、免疫乳酸菌といわれている乳酸球菌由来加熱死菌体粉末 EF-2001 を用いて WSP との混合物による Sarcoma-180 固形癌に対する抗腫瘍作用並びに抗酸化作用について検討を加えた。

材料・方法

1.水溶性プロポリス（WSP）の抽出法

Suzuki らの方法[1]に準じておこなった。その結果ブラジル産プロポリス原塊 300 g から水抽出法で得られた WSP 収量は 34.0 g、収率は 11.4% であった。

2.乳酸産生菌由来加熱死菌体粉末 EF-2001

乳酸産生菌由来加熱死菌体粉末 EF-2001 (*Enterococcus faecalis*-2001) は日本ベルム (株) より提供されたものを実験に供試した。

実験方法

Sarcoma-180 固形癌細胞 (106 cells/mouse) を ICR 系 5 週齢雄マウスの右鼠頸部皮下移植後、WSP と EF-2001 配合試料 100 mg/kg 、WSP と EF-2001 配合試料 200 mg/kg ならびに WSP と EF-2001 配合試料 400 mg/kg において各々 1 : 3 の配合比率とし、計 3 群の腫瘍内への 35 日間連続投与 (0.3 ml/回/日/マウス) をおこない、経時変化に伴う腫瘍面積の測定(長径 × 短径 = mm^2) と移植後 35 日目の摘出肉腫重量の計測および腫瘍抑制率を算出した。なお対照群には生理食塩水を同量投与した。

WSP および EF-2001 の混合物による Sarcoma- 180 固形癌に対する抗腫瘍作用

(1) WSP + EF-2001 配合比率 (1:3) での腫瘍内投与による抗腫瘍作用

腫瘍細胞には Sarcoma-180 細胞を用いた。腫瘍移植法および腫瘍面積 (mm^2) の測定ならびに腫瘍抑制率 (%) の算出は、下記の式から算定した。

抑制率 (%) = (Cw－Tw/Cw)×100

(Cw = 対照群の平均腫瘍重量、Tw = 実験群の平均腫瘍重量)

今回の実験群では WSP＋EF-2001 混合試料 (配合比率 1:3) に統一し、用量は 100 mg/kg、200 mg/kg、および 400 mg/kg の 3 群を準備し、移植後 1 日目から 34 日間に亘って、被検試料 0.5 ml を連日腫瘍内に 1 日 1 回投与した。なお、対照群 (n=7) には生理食塩水を実験群と同様の条件下で腫瘍内に投与した。

WSP および EF-2001 の混合物による Sarcoma- 180 固形癌に対する抗酸化作用

(2) WSP＋EF-2001 配合比率 (1:1) での混合試料における抗酸化作用

被験動物は ICR 系 5 週齢雄マウス (平均体重 30 g,日本 SLC 社) を用い、被験試料 0.5 mL を連日経口投与した (1 回/日)。投与開始後 15 日目に、フリーラジカル自動分析装置 FRAS4 (ウイスマー研究所) を用いて抗酸化力を BAP (Biological Anti-oxdant Potential) Test 法[10] により測定した。なお、対照群には蒸留水を実験群と同様の条件下で経口投与した。また、実験群には WSP＋EF-2001 混合試料 (配合比率 1:1) 160 mg/kg および 480 mg/kg の 2 群を供試した。.

結　果

(1) WSP ならびに EF-2001 の混合物における Sarcoma-180 固形癌に対する抗腫瘍作用

蒸留水投与の対照群に対して、EF-2001 単独投与群では腫瘍抑制効果に有意差はなく、同様に WSP＋EF-2001 混合試料 (配合比率 1 : 1) に対し用量 400 mg/kg の投与群においては、やや腫瘍抑制傾向はみられたが顕著な抗腫瘍効果は認められなかった。結果を図 1 に示した。

一方 WSP＋EF-2001 混合試料 (配合比率 1 : 3) に対し用量 100 mg/kg および用量 200 mg/kg を投与した群では対照群と比較して有意な腫瘍抑制効果が認められ、用量 400 mg/kg を投与した群においては腫瘍移植後 5 週目には顕著な腫瘍抑制が認められ、抗腫瘍作用が確認された ($P < 0.05$)。結果を図 2 に示した。

WSP＋EF-2001 混合物の 200 mg/kg および 400 mg/kg 投与群における腫瘍面積増加は、対照群と比べて 4 週目以降に極めて有意に抑制された ($P < 0.05$、$P < 0.01$)。WSP 単独、EF-2001 単独、WSP＋EF-2001 混合物 200 mg/kg ならびに WSP＋EF-2001 混合物 400 mg/kg 投与群の腫瘍抑制率は各々 30%、25%、57%、70% であり、WSP と EF-2001 両混合物による顕著な相乗効果が認められた。

腫瘍移植後 5 週目に摘出した腫瘍の重量 (g) および 5 週目における腫瘍抑制率 (%) を表 1 に示した。

生理食塩水投与の対照群が腫瘍重量 20.2±

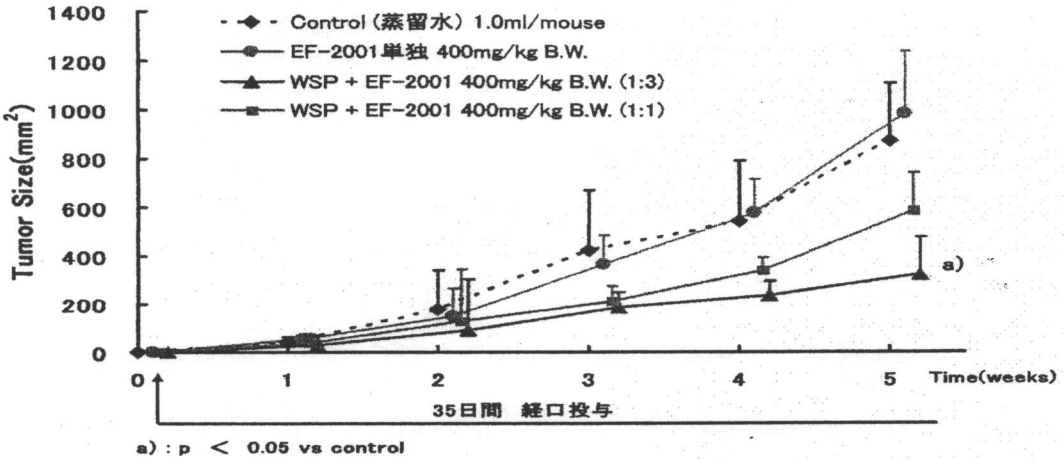

図1　Sarcoma-180マウスに対するEF-2001単独投与ならびにWSP＋EF-2001混合物（1：3）の抗腫瘍効果

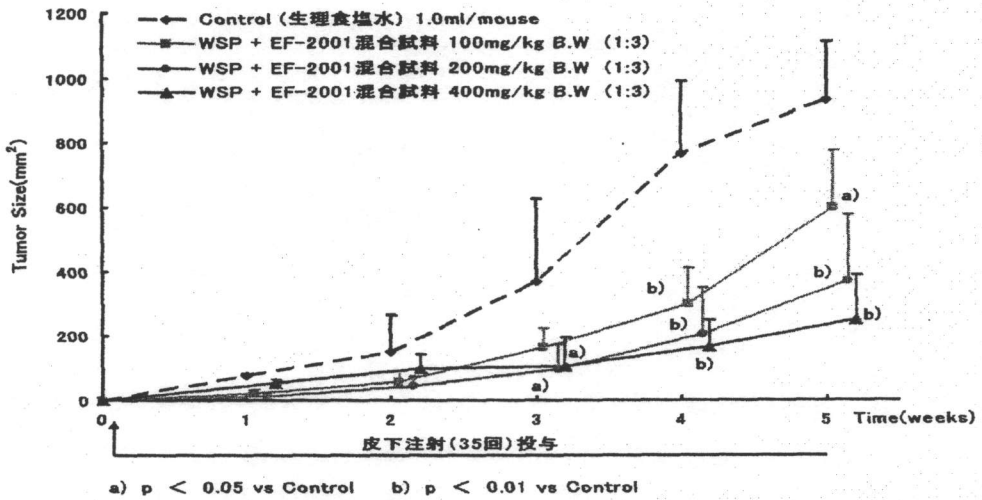

図2　Sarcoma-180マウスに対するWSP＋EF-2001混合物（1：3）の抗腫瘍効果

表1　混合試料（配合比率1:3）の腫瘍内投与における移植後5週目におけるWSP＋EF-2001の抗腫瘍効果

対象群・投与群	用量 (mg/kg)	動物数 (n)	腫瘍重量 Mean±SD(g)	腫瘍抑制率 (%)
対照群(0.9%NaClSol.)	—	7	20.2±5.9	—
WSP+EF-2001投与群	100	7	17.1±5.9	36.1 a)
WSP+EF-2001投与群	200	7	10.6±4.1	60.7 b)
WSP+EF-2001投与群	400	7	9.5±3.3	73.5 b)

a) P<0.01vs control　b) P<0.01vs control

5.9 g であったのに対して WSP＋EF-2001 混合試料 100 mg/kg 接種群の腫瘍重量は 17.1±5.9 g、腫瘍抑制率 36.1% であり有意な腫瘍抑制効果が得られた（$P<0.05$）。一方、混合試料 200 mg/kg および 400 mg/kg 投与群では顕著な抗腫瘍作用が認められ、特に 400 mg/kg 投与群の腫瘍抑制率は 73.5% であり極めて高い腫瘍抑制効果が得られた（$P<0.01$）。また腫瘍抑制率は WSP また腫瘍抑制率は WSP＋EF-2001 混合試料の濃度に伴い上昇しており、用量依存的な効果が認められた。

（2）WSP ならびに EF-2001 の混合物における Sarcoma-180 固形癌に対する抗酸化作用

WSP ならびに EF-2001 混合物の抗酸化能を検討した結果、図 3 に示すように WSP：EF-2001＝ 1：1 の実験群において 160 mg/kg および 480 mg/kg において対照群と比較して有意な抗酸化活性が認められた（$P<0.05$）。また、混合試料 160 mg/kg 投与群の 3 倍濃度である 480 mg/kg の投与群においてはより高い抗酸化能が認められたことは、用量依存的に抗酸化活性が発現されることを示していた。

考　察

水溶性プロポリス（WSP）ならびに乳酸産生菌由来加熱死菌体粉末（EF-2001）の混合物による抗腫瘍作用および抗酸化作用について検討を加えた。その結果、WSP＋EF-2001 混合試料の配合比率を一定の条件とした被験混合物の腫瘍内投与による抗腫瘍作用においては用量依存的に有意な腫瘍抑制ならびに抗腫瘍効果が認められ、WSP：EF-2001＝1：3 の配合比率においては顕著な抗腫瘍効果が認められた。WSP を用量 400 mg/kg で単独腫瘍内投与した場合には対照群と有意な抗腫瘍効果は認められなかったが WSP：EF-2001＝ 1：1 の同用量での配合比率においては極めて高い抗腫瘍作用を示し、WSP：EF-2001＝ 1：3 の配合比率よりは抗腫瘍効果は劣るが有意な抗腫瘍作用を示すことが確認された。さらに WSP：EF-2001＝ 1：3 の配合比率では EF-2001 の用量を 100 mg/kg から200 mg/kg、400 mg/kg と増量するに伴い用量依存的により高い抗腫瘍作用を発現することが確認された。乳酸産生菌由来加熱死菌体である EF-2001 はマクロファージを介したサイトカインの放出、即ち腫瘍壊死因子である TNF-α の産生能促進による免疫増強効果と、抗生物質等の投与により死滅した腸内細菌叢を早期に回復させる整腸作用を有している。この整腸作用により WSP の吸収率が改善され、本来 WSP が有している抗腫瘍作用が効率的に発現増強され、免疫賦活作用ならびに抗腫瘍作用が相乗的に作用し顕著な抗腫瘍効果をもたらしたものと考えられる。また腫瘍内投与によってより高い抗腫瘍作用が認められたのは WSP と EF-2001 が

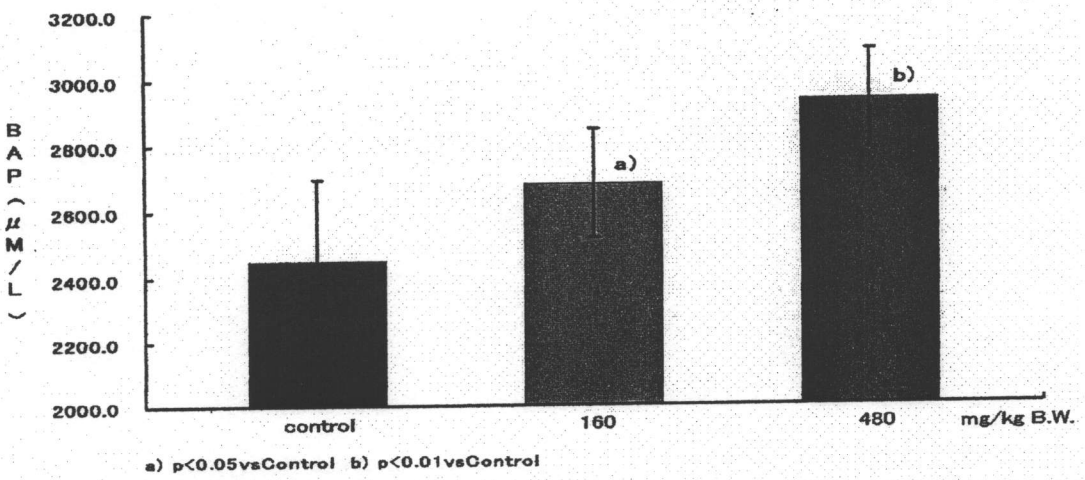

図 3　WSP＋EF-2100 混合物の抗酸化作用

宿主免疫系、特に非特異性免疫系の機能を相乗的に賦活化したことに起因し、マクロファージと NK 細胞の活性化および IFN-γ、IL-12、TNF-α などの諸種サイトカインの産生が効率よく促進された結果 WSP による免疫賦活作用と EF-2001 の有する免疫増強効果とが相乗的に作用し、顕著な抗腫瘍作用が得られたものと考えられる。また経口投与における抗腫瘍効果および抗酸化作用に対しても高い抗腫瘍効果が得られているので WSP ならびに EF-2001 混合試料を経口的に摂取することで生体の新陳代謝を改善させる効果を有していることが示唆され、経口投与ならびに腫瘍内投与の同時併用時における配合率について検討を進めることでさらに有効性を高めることが可能であると考えられる。

文　献

1) Suzuki I, Takai H, Koide M, et al.: Anti tumor effect of the immunoactivity fractions obtained from Brazilian water-soluble propolis. Given in combination with anti-cancer agents in Ehrlich carcinoma bearing mice. Honeybee Sci **17:** 1-6 1996
2) Suzuki I, Hayashi I, Takai T, et al.: Antitumor and anticytopenic effects of aqueous extracts of propolis in combination with chemotherapeutic agents. Cancer Biother & Radiopharmaceut **17:** 553-562 2003
3) Dobrowolski JW, Vohora SB, Sharma M, et al.: Antibacterial, antifungal antiinflammatory, and antipyretic studies on propolis by-product. J Ethnopharmacol **35:** 77-82 1991
4) Mirzoeva OK and Calder PC: The effect of propolis and its components on eicosanoid during the inflammatory response. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **55:** 441-449 1996
5) Nakamura T, Itokawa Y, Cho KH, et al.: Effect of propolis on peripheral white cell, antioxidative activity and tumor growth in irradiated mice. J Tradit Chinese Med **26:** 299-305 2003
6) Huycke MM, Joyce WA and Gilmore MS: *Enterococcus faecalis* cytolysin without effect on the intestinal growth of susceptible enterococci in mice. J Infect Dis **172:** 273-276 1995
7) Fernandez FJ, de la Fuente J, Rubianes M, et al.: *Enterococcus faecalis* bacteremia Rev. Clin Esp **204:** 244-250 2004
8) Kuramoto U, Kobayashi N, Otsuka M, et al.: Effect in the biophylaxis mechanism of the heating bacillus mort body constituent derived from *Enterococcus faecalis*. J Biotherapy **16:** 107 2002
9) Wakita S, Kobayashi N, Takeuchi O, et al.: Effect of hot water extract of *Enterococcus faecalis* on anti-tumor activity in tumor-bearing mice. Biotherapy **15:** 363-366 2001
10) Rampoldi C: Ciornale Italiano delle Malattie del Torace **4:** 277-280 1998

連絡先：鈴木郁功、
鈴鹿医療科学大学大学院保険衛生学研究科
三重県鈴鹿市岸岡町 1001-1（510-0293）
TEL:0593-83-8991, FAX:0593-83-9666

Antitumor Activity in the Mixture of Water Soluble Propolis (WSP) and *Enterococcus faecalis* (EF-2001)

Norihiko SHINODA[1], Yasushi MIYAKE[1], Yuki MATUSHIMA[1], Ikukatsu SUZUKI[1], Hiroyuki IWASA[3], Masahiro IWASA[3], Kouzou KOSAKA[4], Masatoshi HASEGAWA[2] and Yasuhiro NAITO[2]

[1] Graduate School of Health Science, Suzuka University of Medical Science, Suzuka
[2] Medical Corporation, Naito Immunity Medical Clinic, Nagoya
[3] Nihon Berumu Co. Ltd.
[4] Mie University Graduate School of Medicine

Summary

Water soluble propolis (WSP) has immunostimulation action, antioxidative effect, anodyne and antiinflammatory action, and as for *Enterococcus faecalis*-2001 (EF-2001) it is reported to have immunostimulation action and an intestinal regulation action, etc. We have thus examined the antitumor effects of a mixture of water extraction propolis (WSP) and lactic acid micrococcus (EF-2001) for the mice bearing Sarcoma-180 solid cancer. In the previous study, we have orally gave a 400 mg mixture of WSP and EF-2001 (1:1, v/v) to solid cancer transplanted mice, and observed no significant tumor-inhibiting effect until 2nd week, but found a significant inhibiting effect more than 3rd week ($P < 0.05$).

The present study used the 1:3 ratio mixture of WSP and EF-2001 at the amounts of 100 mg/kg, 200 mg/kg, and 400 mg/kg for the tumor of solid cancer-transplanted mouse. The prescription amounts of 200 mg/kg and 400 mg/kg clearly showed a significant antitumor effect with a dose dependent manner ($P < 0.01$). It was supposed that WSP was absorbed effectively and gave the immunity-activating effect with the aide of the intestinal regulation action of EF-2001, resulting in an efficient antitumor effect of WSP with a synergistic manner.

These results indicate that the antitumor activity of WSP is probably raised when WSP and EF-2001are mixed in the most suitable ratio.

Key words: water soluble propolis (WSP), *Enterococcus faecalis*-2001(EF-2001), antitumor effect , antioxidative effect

Address: Ikukatsu SUZUKI, Graduate School of Health Science, Suzuka University of Medical Science, Kishioka 1001-1, Suzuka City, Mie pref, 510-0293 Japan