

水溶性プロポリス有効成分のin vitro系における 日和見病原菌に対する抗菌作用機序の解析 —特にキレート効果—

渡 邊 隆 司・朝 日 俊 博・柳 本 行 雄

プロポリスの薬剤耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA菌)、緑膿菌およびカンジダ アルビカンス菌に対して完全殺菌に要した有効濃度は、各々5, 10および40mg/ml以上であり、プロポリスは、真菌に対するよりも細菌群に対して強い抗菌効果を示すことが確認された。プロポリスの抗菌効果、特にMRSA菌に対する抗菌効果は、菌体成分の合成系やDNA複製系を阻害することよりも、むしろ菌体細胞壁の構築・構造の形態変化が誘発されることによって起こるであろうこと、即ち、プロポリスの抗菌作用機序の一つとして、菌細胞壁中のムコペプチド層に多量に存在する、CaイオンやMgイオンなどがプロポリス有効成分と錯体 (キレート) を形成することによってムコペプチド層で架橋を形成しているこれらイオンが除去され、その結果、架橋構造の崩壊に基づく菌体膜からの内容成分の流出が二次的に生じ、菌の死滅が容易に誘起されたものであろうことが推察された。

キーワード：水溶性プロポリス, 薬剤耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA菌), 抗菌作用, キレート効果

【緒 言】

古代からの種々の民間伝承薬発祥中心地域は、南米アマゾン流域の原始林地帯やアンデス山系森林地帯であり、これら地域の原住民 (インディオ) 達が、もろもろの疾患・疾病に最適の天然素材を発見し、適切な剤形にして子孫に延々と伝承し続け、現在に至っていることは周知のところである。このような天然素材による各種疾患・疾病治療法の優れた発見は、単なる偶然性が重なったものではなく、世界で最も古いマヤ文明が栄えた時代にすでに科学的手法で成し遂げられていたことも多くの科学者によって証明されている。例えば、ガラナ灌木の果実には、カカオ果実に含まれるカフェインと類似構造を有するガラニンが、カフェインの6～8倍含まれており、インディオ達は部族間での戦闘に対してガラナ粉末を服用し、興奮・覚醒させてから戦いに挑んだこと (無論、現在では長距離ドライバー、夜間作業員や受験生はこれを利用しており、疾患面では肝機能回復改善剤として用いられている)。また、ペルー山岳に自生するチャン・カピエドラ灌木の葉の粉末は、胆石や腎結石の治療に古代から用いられているが、このチャン・カピエドラの名は、インディオ語の「碎石、石を砕く葉」に由来している。このように、古代南米では天然素材が、各種病気治療法の主役を担っていたと理解されている^{1, 2)}。ところで、プロポリスの歴史は古く、紀元前のギリシャ時代にまでさかのぼり、現在では世界

の各地で、諸種疾患の民間伝承治療薬として用いられている。プロポリスとは、蜜蜂によって採取された樹木の葉や樹液を蜜蜂の唾液、蜜蝋や花粉などと練り合わせて造られた樹脂状の物質で、主に巣の内部の構築成分として利用されている。近年、プロポリスの種々の効果、例えば抗腫瘍作用¹⁻³⁾、抗感染症作用^{4, 5)}、抗炎症効果⁶⁾、抗アレルギー作用⁷⁾あるいは各種生活習慣病改善効果^{8, 9)}などの疾患に対する効果が注目されており、これらの効果・効能を有する有効成分の薬理的・生理学的作用の研究が、国内外で鋭意進められているところである。一方、プロポリスの代表的な主要成分としては、フラボノイド（フラボン、フラボノール、ケルセチン）やカフェ酸誘導体などであるが、これまでの研究報告を総括すると1成分-1効果という、いわゆるワンヒット作用によるものではなく、複数成分による相乗的な効果作用に基づいているものと思われる。ところで、プロポリスの抗菌効果に関する研究報告では、細胞壁や細胞膜構造が多少とも異なるグラム陽性菌とグラム陰性菌に対して、その抗菌作用の程度に差異があるものの¹⁰⁾、いずれにおいても程度の差こそあれプロポリスは抗菌作用を示す有効成分を含有していることは疑いのないところである。しかしながら、各種感染症に対して、プロポリスは、病原細菌・真菌に対しても、病原ウイルスに対しても有効であるとされているが^{4, 5, 10)}、菌群とウイルス群との形態や増殖様式は全く異なるので、プロポリス成分による殺菌作用と抗ウイルス作用が、同一のメカニズムによって生じているとは言い難い。一方、プロポリスの病原細菌や真菌に対する抗菌作用についての詳細な作用機序に関する報告も、現在までのところみられない。

本研究では、グラム陽性菌、グラム陰性菌および真菌に対して、プロポリスが最も強い増殖抑制作用を示した菌種を選択し、プロポリスの抗菌効果の作用機序解明の検討を試みた。

【材料と方法】

1. プロポリス：2種類の水抽出プロポリスを実験に供試した。

(1) ブラジル産プロポリス (2) 中国産プロポリス

2. 菌種：下記の臨床分離3種（三重大学医学部付属病院中央検査部由来）を実験に供試した。

(1) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA菌；グラム陽性球菌）

(2) 緑膿菌（グラム陰性桿菌）

(3) カンジダ アルビカンス菌（カンジダ菌；真菌）

3. 培地：

上記3菌種の増殖用培地としては普通寒天培地（GAM；栄研化学）を用い、選択確認培地としてはNo. 110培地（MRSA菌用；栄研化学）、NAC培地（緑膿菌用；栄研化学）、およびサブロー培地（カンジダ菌用；栄研化学）を各々用いた。

4. 供試菌液の調整

培地上の3菌種を集菌し、滅菌生理食塩水（生食水）に懸濁したのち、各菌液の吸光度（OD）を2波長分光光度計（日立、540nm）にて測定し、OD=0.37に調整した。なお、OD=0.37の菌数は、MRSA菌では平均 4×10^6 生菌単位（colony forming unit=CFU）/ml、緑膿菌では

平均 3×10^7 CFU/ml としてカンジダ菌では平均 4×10^5 CFU/ml であった。

5. プロポリスの供試3菌種に対する抗菌効果の比較実験

1) ディスク法 - 供試3菌種調整菌液 (約 10^6 CFU/プレート: 直径90mm) を各選択確認寒天培地上に塗布した後、プロポリス液 (0.63 ~ 40mg/ml) を浸したペーパーディスク (径: 5mm) を滅菌ピンセットにてプレートの内側に沿って、培地上に置き37℃、24時間培養した後、ディスク周縁に生じた増殖阻止円 (ハロー) の直径から、プロポリスの効果を判定した。なお、確認試験としてスポット法をおこなった。即ち、希釈プロポリス液を、白金耳にてスポット (約0.05ml/白金耳) し、24時間培養した後に、増殖阻止円の有無を調べた。

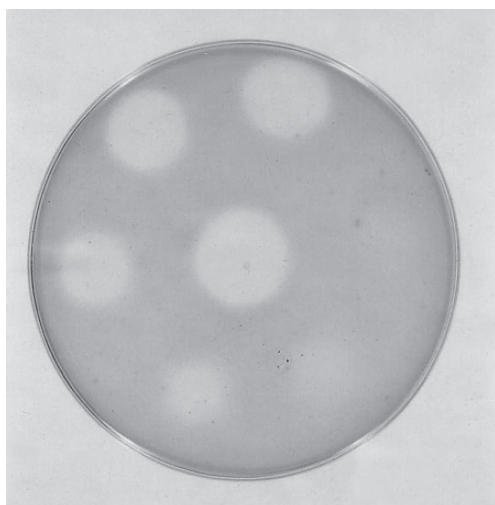
2) 希釈法 - プロポリス液 (5 ~ 100mg/ml) と調整菌液 (約 10^6 CFU/ml) を混合し、37℃で一定時間作用させた後、経時的に菌・プロポリス混合液を10倍希釈し、定法に準じてCFUを定量した。なお、CFUの増減の程度でプロポリスの殺菌効果を判定した。

6. カルシウム (Ca) およびマグネシウム (Mg) のプロポリス抗菌効果に対する阻止実験

生食水に溶解したCaCl₂・MgCl₂ (各50mg/ml) 混液、あるいはCaCl₂液 (50mg/ml)、MgCl₂液 (50mg/ml) にプロポリス液 (25mg/ml) を各々混合させた後、調整MRSA菌液 (約 10^6 CFU/ml) を加え、37℃で一定時間作用させ、経時的に混合液中のCFUを定量した。CFUの増減の程度でこれらミネラル類のプロポリスの抗菌作用に対する阻止効果の有無を判定した。

【結果】

1. ディスク法によるプロポリスの抗菌効果



水溶性プロポリス画分のスポット法による
MRSA菌に対する増殖阻止円像

MRSA菌、緑膿菌およびカンジダ菌 (各 10^6 CFU/ml) を寒天培地上に塗布した後、各濃度プロポリス (ブラジル産および中国産) を浸したペーパーディスクをのせ、37℃、24時間培養し、ペーパーディスクの周縁に増殖阻止円が生じたものを陽性とした。その結果、カンジダ菌に対してはブラジル・中国産いずれのプロポリス (0.63 ~ 40mg/ml) も殺菌効果を示さなかった。一方、2種のプロポリスはMRSA菌と緑膿菌に対しては有効であったものの、ブラジル産プロポリスの抗菌効果は、中国産よりも多少とも抗菌作用が優れていることが明らかとなった (図表省略)。他方、希釈プロポリス液をMRSA菌培養寒天シャー

レ（径：10cm）上にスポットした際の抗菌効果の結果は左の写真像に示す通りである。これら結果から、プロポリスの殺菌作用機序の解析にブラジル産プロポリスとMRSA菌との組み合わせで、抗菌作用機序に関する一連の実験を以下におこなった。

2. プロポリスのMRSA菌に対する生食水中および増殖培養液中における殺菌効果

MRSA菌液（ 10^6 CFU/ml）を生食水および培養液（プロス）中に添加し、さらにプロポリス（5～100mg/ml）を加え、37℃、2時間培養し、残存生菌数を経時的に算定した。その結果、Fig.1に示すように、生菌数は生食水とプロスのいずれにおいてもプロポリス濃度の増加に伴ってほぼ同じ勾配で直線的に減少した。一方、この減少パターンを百分率で換算したところ、生食水、プロス共にプロポリスの有効濃度は10mg/ml以上であった（図表省略）。

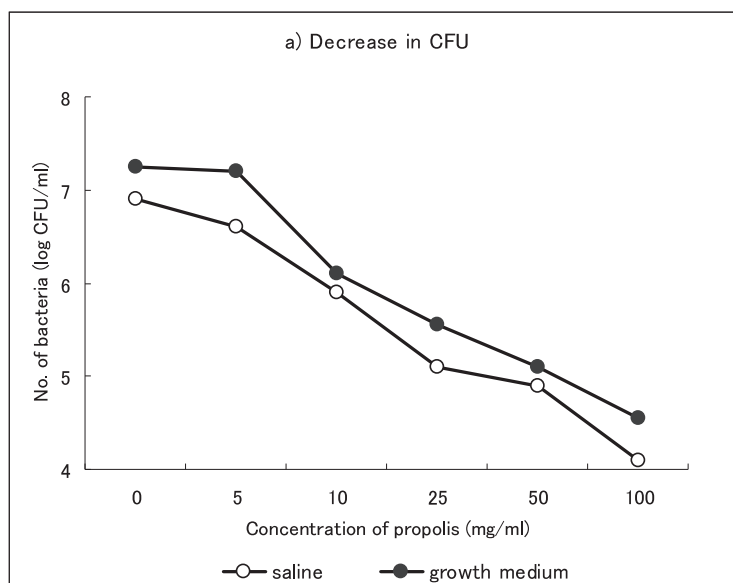


Figure 1. Killing action of Brazilian propolis against *S.aureus* in saline or in growth medium

3. プロポリスの生食水中および増殖培養中における作用時間とMRSA菌殺菌効果の関連性

MRSA菌（ 10^6 CFU/ml）を生食水およびプロス中に懸濁し、さらにプロポリス（25mg/ml）を加えた後37℃で培養し、1時間毎に残存生菌数を算定した。その結果、Fig. 2に示すように、生食水中のMRSA菌の生菌数は、1時間目では、対照群のそれよりも4オーダー減少した（1/10000）。換言すると、100万個以上の生菌数が一時間後にはわずか100個にまで減少したことになる。さらに、2時間後には完全に殺菌された。一方、プロス中でのMRSA菌は、3時間後でも3オーダーの減少、即ち100万個のオーダーの菌は1000個のオーダーの減少（1/1000）にとどまり、残存生菌数は生食水での場合の10倍以上であった。この結果から、プロポリス成分の殺菌効果は菌のDNA複製系や蛋白合成系などに対する阻止作用によることよりも、増殖

状態にない生食水中のMRSA菌に対しても著しい殺菌作用を示したことから、MRSA菌の細胞壁・細胞膜レベルを特異的に阻害していることに起因するものであろうことが推察されたので以下の実験をおこなった。

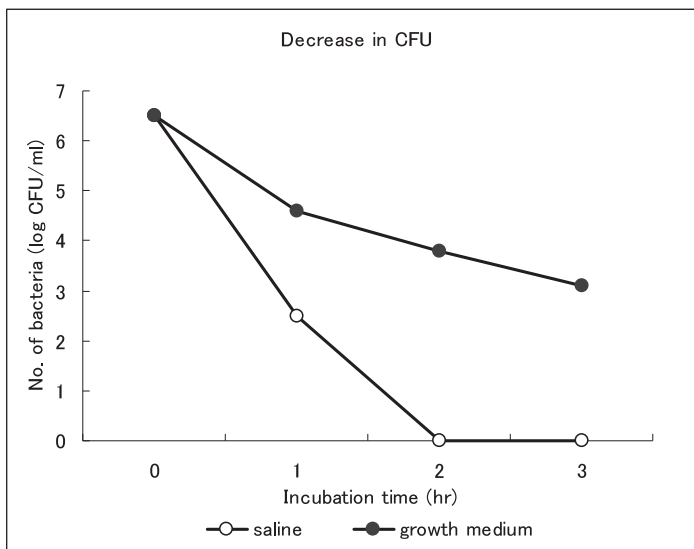


Figure 2. Time-dependency of killing action of Brazilian propolis against *S.aureus* in saline or in growth medium

4. CaおよびMgのプロポリスの抗菌効果に対する阻止作用

Fig. 2の結果から、プロポリスは生食水中のMRSA菌に対しても強い殺菌効果を示すことが明らかとなった。そこで、プロポリスの殺菌作用の機序解明の一つとして、プロポリス中の有効成分のひとつであるフラボノイドやカフェ酸誘導体が菌の細胞壁内のムコペプチド層に含まれるCaイオンやMgイオンをキレート化（錯体化）することによって、菌体の細胞壁や細胞膜崩壊が起こり、菌体内の内容成分が流出し、その結果、菌増殖系ではない生食水においても殺菌効果が生じたことに基づくものであろうことが強く示唆されたので、この推論を立証するために、次の実験システムを勘案した。即ち、生食水に塩化カルシウムと塩化マグネシウムを溶解させ（終濃度：10～50mg/ml）、さらにプロポリス（25mg/ml）を加えた反応液を準備した。このプロポリス・Ca・Mg混合反応液にMRSA菌（ 10^6 CFU/ml）を添加し37℃、2時間培養後、残存生菌数を計測した。さらにCa・Mgによるプロポリス抗菌効果阻止率を求めた。その結果、Fig. 3に示すように、プロポリス単独による殺菌効果（棒グラフ；参照）は、Ca・Mg混液の添加によって著しく阻止された。即ち、生菌の増加傾向にある実験システムに対して、Ca、Mgの阻止効果はそれらの濃度上昇に伴って増強され、50mg/mlのCa・Mg存在下では対照群のレベルにまで上昇した。一方、Ca・Mgのプロポリス抗菌効果阻止作用、即ち塩化カルシウム・塩化マグネシウム混合液添加によるプロポリスのMRSA菌への付着・吸着抑制（阻止）

率を調べたところ、添加濃度に依存して上昇し、25mg/mlで約30%、50mg/mlでは約90%の割合でプロポリスの抗菌作用は、抑制・阻止されることが明らかとなった（図表省略）。尚、抑制・阻止率は、著者らが提案した方法で求めた（Watanabe, T. et al. Journal of Bacteriology, 144: 428-431, 1980）。

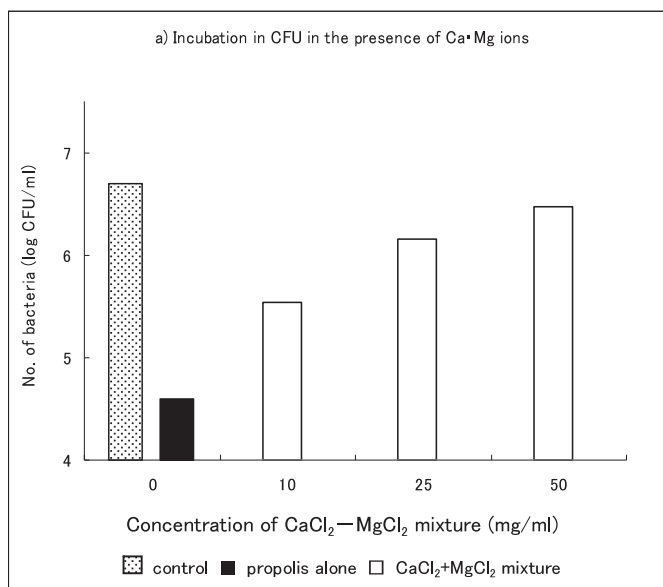


Figure 3. Inhibitory action of CaCl₂ and MgCl₂ mixture to antibacterial effect of Brazilian propolis

5. Caイオン単独およびMgイオン単独によるプロポリス抗菌効果阻止作用

Fig. 3で示したCa・Mg混合液によるプロポリスの抗菌効果の阻止作用が、特にCaイオンによるものであるか、あるいはMgイオンによるものであるかについて調べるために、CaCl₂単独あるいはMgCl₂単独の溶液を準備し同様の実験を行い、プロポリスの抗菌効果に対する阻止率を求めた。その結果、Fig. 4に示すように50mg/mlのCaイオンとMgイオンのプロポリス抗菌効果阻止率は、各々40%と60%であり、両ミネラルによる特異性のある阻止・阻害作用の傾向はみられず、Caイオン、Mgイオン共にプロポリスと同程度でキレート化されること、即ち菌に対するプロポリスの効果がCaイオン、Mgイオンそれぞれによっても阻止されることが明らかとなった。このように、両ミネラルによる同等の阻止効果を示したことは、共に+2価のミネラルであることに基づくものであろうと考えられる。いずれにせよ、菌体由来のCaイオンやMgイオンがプロポリスによってキレート化され、菌が生存するために必要なミネラル類が菌体から遊離し、死に至ったものと推察された。

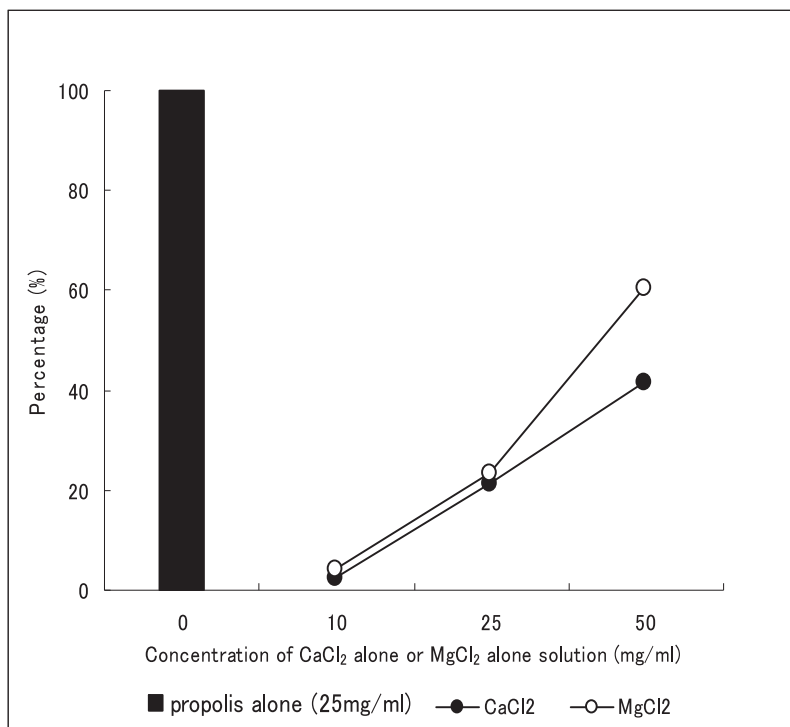


Figure 4. Inhibitory action of CaCl_2 alone or MgCl_2 alone to antibacterial effect Brazilian propolis

6. 菌体由来CaおよびMgイオンとプロポリス含有主成分とのキレート（錯体）形成様式と殺菌作用のメカニズム

グラム陽性・陰性菌の菌体のムコペプチド層は、細胞壁の基本層として重要な位置を占めており、このムコペプチド層の内側に菌の細胞膜が接している。一方、ムコペプチド層内には多量のCaイオンが存在しており、ペプチドと結合して架橋を形成し菌体の形態を保っている。このCaイオンとペプチドとの結合が開裂すると架橋構造に変化が生じ、水分などの流出入が起り菌体の膨化や菌体内容成分が流出しやすくなり、死に至ることが推察された。これまでの実験の結果、増殖培養液中でも生食水中でもMRSA菌に対するプロポリスの抗菌作用比に全く差は見られず、しかも1時間前後で殺菌効果が見られたことから、プロポリスの殺菌作用はDNA複製阻害や蛋白合成阻害などのいわゆる抗生物質的な作用機序によることよりも、むしろ菌体を構築している細胞壁あるいは細胞膜構造の急激な変化による可能性が大であることが強く示唆された。そこで、Ca/Mgイオンとプロポリス主成分間で形成されると考えられるキレート分子構造を想定し作成した (Fig. 5;参照)。この図の左側に示すように、ムコペプチド層中に多量に含まれているCaイオンがプロポリス主成分のフラボノールのベンゼン環の2個のOH基と錯体（キレート）を形成することによってムコペプチド層内のCaイオンが急速に減少し、その結果、菌体構造の変化、構築崩壊そして菌の死という一連の作用によることが考えられ、

そこでCaイオンの配位数は6個、Mgイオンの配位数は4個と6個であることから、プロポリス主成分とCaイオン間に生じるキレートの模式平面図と立体図を勘案し作成した (Fig. 5: 中央部および右側分子模型図; 参照)。

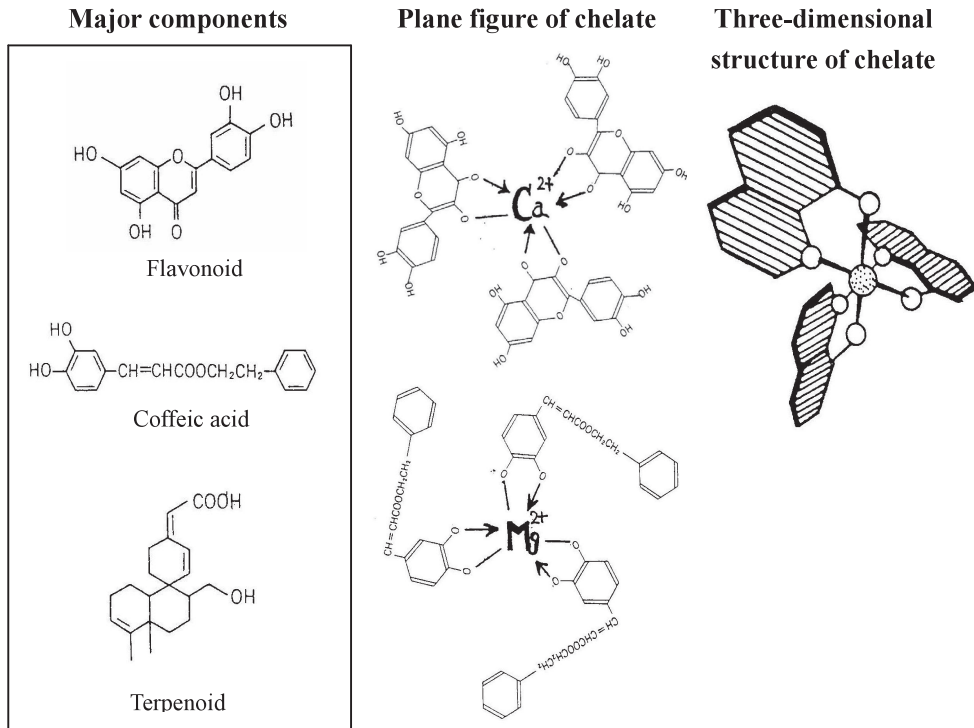


Figure 5. Formation of chelate-complex between propolis components and Ca ion or Mg ion

Right of the figure is a major components contained propolis. Center of this is a Plane figure of chelate complex. Left of this is a three-dimensional structure of chelate complex.

【考 察】

プロポリスが各種細菌類や真菌類に対して抗菌効果を示すこと^{4, 5, 10)}、さらにはウイルス感染症に対しても有効であること⁵⁾についてはすでに報告されている。しかしながら、一つの細胞体で自己分裂(2分裂)をおこなう菌群と、ウイルスエンベロープ内部にDNAかRNAいずれかの核酸から成る単純な形態を有し、感染した動植物の細胞内でのみ増殖可能なウイルス群とでは、形態の違いは無論のこと、増殖様式も全く異なるので、これら微生物群に対するプロポリスの同一メカニズムによって、抗菌作用や抗ウイルス作用が誘起されていることは極めて疑わしい。他方、各種病原菌に対しては、プロポリスによる同一の殺菌メカニズムが起こっているという考え方に立脚した場合においても、プロポリスにはフラボノイド系、カフェ酸誘導体あるいはテルペノイド系を主成分する多くの成分を含有していることから^{1, 3, 6)}、抗菌効果の作用機序についての解析は困難であり、現在までのところ、作用機序の解明・解析に關す

る詳細な報告は皆無である。

今回、我々は、プロポリスの抗菌効果が同一の作用機序に基づくものであるか否かの解明・解析について、供試日和見病原菌の中で、プロポリスに対して最も高い感受性を示したMRSA菌とブラジル産プロポリス水溶液との組み合わせで試みた。MRSA菌を生食水あるいは増殖培養液（プロス）に浮遊させ、さらにプロポリス25mg/mlを加え、37℃で一定時間作用させたところ、生菌数の減少パターンおよび減少率は生食水を用いた場合と増殖培養液を用いた場合では、殆ど同程度であったことから、プロポリスの抗菌効果は菌体細胞壁の構築・構造形態に何らかの変化をもたらしたことによるものであろうことが強く示唆された。そこで、プロポリスの有効主成分の分子構造を調べたところ、金属イオンと錯体（キレート）を形成することが可能な化学構造を有する成分を含有していることが分かった（Fig. 5 参照）。そこで、これら成分（フラボノイド、カフェ酸誘導体、テルペノイド）の錯体形成の可能性を調べたところ、プロポリスのMRSA菌に対する抗菌効果は、高濃度のCaイオンやMgイオンの存在下で、阻止・阻害され、しかもこれら金属イオンによる阻止・阻害作用は濃度の上昇に伴って増強されることが確認された。

これら結果から、グラム陽性菌およびグラム陰性菌のいずれの細胞壁中に含まれるムコペプチド層には多量のCaイオンが存在し、ペプチド成分と強く結合することによって強い架橋を形成し細胞壁の安定性を維持・保持しているが、恐らくプロポリス中の成分、例えばフラボノールやカフェ酸フェネチルエステルは、これら成分の立体分子構造からムコペプチド層中のCaイオンを錯体化し、その結果、架橋構造が崩れ、菌体内容成分が菌体膜を介して流出されることによって菌が死滅したものと推察された。ところで、キレート剤のひとつであるエチレンジアミン-四-酢酸（EDTA）は、培養用プレート上に増殖した培養細胞を剥離する際に、最も使用されている物質であり、培養細胞がプレートから剥離される原理は、プレート表面に付着した培養細胞の偽足先端内部に集合しているCaイオンなどの細胞由来の金属イオン類をEDTAがキレート化し、60～120秒処理で細胞をプレートから生きたまま離脱させることに基づいている。しかし、5分間以上処理した場合には細胞は壊死状態で剥離される。興味あることに、EDTA分子の3次元基本構造は、プロポリスの主成分のひとつであるカフェ酸誘導体のそれと類似していることから、カフェ酸やフラボノイド誘導体による菌細胞壁ムコペプチド層に存在するCaイオンやMgイオンとのキレート化による菌の死滅を容易に招来するであろうと論じた我々の推論は、極めて信憑性の高いものであろうと考えられる。一方、プロポリスはグラム陰性菌である緑膿菌に対しても殺菌作用を示したことから、緑膿菌においても同様のキレート効果が誘起されたことは、上記の推論を立証するものである。他方、木本、渡邊ら²⁾は、アルテピリンCの抗腫瘍効果は、アルテピリンCの癌細胞のDNA分裂におけるM期を阻害することを報告しているが、このアルテピリンC分子構造から、錯体形成の可能性は極めて低いと推測される。

本研究において、プロポリスの抗菌効果における作用機序の一端としてプロポリス成分の中には菌由来の金属イオン（例えばCaイオン）をキレート化してその結果、菌に対して死の機転を誘発することが明らかとなった。今後、プロポリス含有成分を各々精製結晶化し、これら

を用いて詳細な殺菌メカニズムについての更なる検討を進めると共に、殺菌メカニズムとは恐らく異なると考えられる病原ウイルスに対する抗ウイルス作用機序についての解明・解析をも進めたい。

【主要文献】

- 1) Watanabe, T. and Takai, H. An anticancer action of water-soluble propolis in combination with anticancer drug (5-FU). *Med. & Biol.* 132: 1 - 6, 1996.
- 2) Kimoto, T., Watanabe, T., Arai, M. and Micallef, M.J. Apoptosis and suppression of tumor growth by artemisinin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer Detect. & Prevent.* 22: 506-515, 1998.
- 3) Suzuki, I., Hayashi, I. and Watanabe, T. Antitumor and anticytopenic effects of aqueous extract from propolis in combination with chemotherapeutic agents. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals.* 17: 553-562, 2003.
- 4) Kujumagiew, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, V. and Propov, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activities of propolis of different geographic origin. *J. Ethnopharmacol.* 64: 235--240, 1999.
- 5) Dobrowski, J.W., Vohora, S.B., Sharma, M. and Shah, S.A. Antibacterial, anti-fungal, anti-inflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J. Ethnopharmacol.* 35: 77-82, 1991.
- 6) Mirzoeva, O.K. and Calder, P.C. The effect of propolis and its components on eicosanoid during the inflammatory response. *Prostaglandins leukot. Essential Fatty Acids.* 55: 441-449, 1996.
- 7) Miyatake, H., Nishiki, M. and Matsumoto, H. Evaluation of propolis. Effects of Brazilian and Chinese propolis on histamine release from rat peritoneal mast cells induced by concanavalin A. *Biol. Pharma. Bull.* 21: 723-729, 1998.
- 8) Fuliang, H.U., Hephurn, H.R., Xuan, H. and Chen, M. Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitus. *Pharmacol. Res.* 51: 147-152, 2005.
- 9) Matsui, T., Ebuchi, S., Ohguchi, M. and Micallef, M.J. And Doi, S. Strong anti-hyperglycemic effects of water-soluble fraction of Brazilian propolis and its bioactive constituents. *Biol. Pharma. Bull.* 27: 1797-1083, 2004.
- 10) Dimov, V., Tvanovska, N., Bankoova, V. and Propov, S. Immunomodulatory action of propolis: Prophylactic activity against gram-negative infections and adjuvant effects of water-soluble derivatives. *Vaccine*, 10: 817-824, 1992.

共同執筆の分担について

渡邊隆司（四天王寺大学）：実験構築と論文作成
朝日俊博（三重化糧（株）研究開発）：実験（全部）
柳本行雄（生活科学研究所）：論文校閲