

## プロポリスのキサンチンオキシダーゼ活性阻害作用及び血漿尿酸値低下作用

吉積一真,<sup>\*,a</sup> 西岡信雄,<sup>b</sup> 辻 智子<sup>a</sup>

## The Xanthine Oxidase Inhibitory Activity and Hypouricemia Effect of the Propolis in Rats

Kazuma YOSHIKUMI,<sup>\*,a</sup> Nobuo NISHIOKA,<sup>b</sup> and Tomoko TSUJII<sup>a</sup>

Fancl Corporation Central Research Laboratory,<sup>a</sup> 12-13 Kamishinano, Totsuka-ku, Yokohama  
244-0806, Japan and Morikawa Kenkodo Co., Ltd.,<sup>b</sup> 2170 Taguchi, Kousa-machi,  
Kamimashiki-gun, Kumamoto 861-4616, Japan

(Received December 13, 2004; Accepted December 18, 2004)

The xanthine oxidase (XOD) inhibitory activity of propolis from China and Brazil was measured. The propolis from both place were seen to have XOD inhibitory activity. However, a stronger tendency was shown in the propolis from China. The compounds in each the propolis were measured quantitatively. A great deal of chrysin, galangin, and caffeic acid phenetyl ester were found in the propolis from China, an abundance of *p*-coumaric acid and artepillin C in the propolis from Brazil. Therefore it was revealed that the propolis compounds are very different depending on their place of origin. The XOD inhibitory activity of these five compounds was measured. Caffeic acid phenetyl ester had the strongest activity, with chrysin and galangin next; *p*-coumaric acid and artepillin C showed weak XOD inhibitory activity. We evaluated the hypouricemic effect of propolis from China on hyperuricemia induced by the uricase inhibitor, oxonic acid (500 mg/kg *p.o.*, 1 h before the test drugs), and measured plasma uric acid values in rats. Oral propolis had a hypouricemic effect 2 h after its administration to oxonate-pretreated rats. These results suggested that a continuous intake of propolis may be effective for the prevention and the treatment of gout and hyperuricemia.

**Key words**—propolis; xanthine oxidase inhibitor; gout and hyperuricemia; uric acid; oxonic acid

## 緒 言

わが国において、痛風及びその予備群である高尿酸血症は食生活の欧米化などに伴い、その患者数は年々増加している。痛風、高尿酸血症の多くは遺伝的素因に過食、肥満、常習飲酒、ストレスなどの生活環境の異常が重なって発症する。わが国の痛風患者数は30—50万人存在し、そのほとんどが男性である。高尿酸血症患者はさらに多数であり、痛風及び高尿酸血症患者を合わせると、450—500万人にも上ると推定されている。<sup>1)</sup>このような痛風、高尿酸血症では、同様の生活環境の異常が発症に関与する腎障害、高血圧、高脂血症や耐糖能異常などの生活習慣病を複合的に合併している場合が多い。<sup>2,3)</sup>

痛風、高尿酸血症は、血漿での尿酸が増加することにより引き起こされる病気であるが、この血漿尿

酸値を正常値内にコントロールすることが、これらの病気に対する予防、治療の基本である。一般に、痛風あるいは高尿酸血症は体内で尿酸が過剰に産生される産生過剰型、腎臓機能の低下により尿酸の排泄能力が低下している排泄低下型、両者を併せ持った混合型に分けることができるが、どの型の痛風、高尿酸血症患者も、血漿尿酸値を正常値にまで低下させることにより、急性発作の減少、慢性化への停止、腎・血管系への合併症の予防及び悪化を防ぐことができる。そこで、産生過剰型の痛風、高尿酸血症患者に対しては尿酸生成抑制薬であるアロプリノール<sup>4)</sup>が、排泄低下型、混合型の痛風、高尿酸血症患者に対しては尿酸排泄促進薬であるプロベネシド、ベンズブロマロン<sup>5)</sup>などが臨床の場で使用されているが、蕁麻疹や皮疹、肝機能障害などの副作用を伴う場合が多い。<sup>4,5)</sup>

プロポリスは、ミツバチが周辺の植物の芽や浸出物を集めて作った樹脂状物質であり、主な成分は、樹脂、ろう質、花粉、その他ミネラル類などであ

<sup>a</sup>株式会社ファンケル中央研究所, <sup>b</sup>森川健康堂株式会社  
e-mail: kayoshizu@fancl.co.jp

る。このプロポリス中には、桂皮酸や *p*-クマール酸などのフェノール酸類、フラボノイドなど多くのポリフェノールが含まれているため、生体内において種々の薬理的効果が期待できる。

プロポリスは古くから東ヨーロッパを中心とした世界中の多くの地方で民間伝承薬として用いられ、抗癌作用,<sup>6)</sup> 抗炎症作用,<sup>7)</sup> 抗酸化作用,<sup>8)</sup> 免疫賦活作用,<sup>9)</sup> 抗ウイルス作用,<sup>10)</sup> 肝保護作用<sup>11)</sup> など数多くの薬理的な作用や治療効果が報告されており、ドイツにおいては医薬品としても認可されている。

近年、プロポリスの成分分析研究が進み、ブラジル産プロポリスは、アルテピリンCやドルパニンなどの桂皮酸誘導体が主成分であり、ブラジル産以外の中国産、オーストラリア産、ヨーロッパ産、ウルグアイ産などのプロポリスは、クリシンやピノセンブリン、ガランギンなどのフラボノイドが主成分であることが明らかとなっている。<sup>12)</sup> また、熊澤らはブラジル産とそれ以外の産地のプロポリスでは、抗酸化作用が大きく異なることを報告している。<sup>13)</sup> このようにプロポリスは、産地により含有する成分や薬理的な作用が大きく異なると考えられている。

また、フラボノイド<sup>14-16)</sup> やクマリン及びその誘導体,<sup>17)</sup> カフェー酸及びその誘導体<sup>18)</sup> などにキサンチンオキシダーゼ（以下、XODとする）活性の阻害作用を有することが報告されていることから、プロポリスがXOD活性を阻害して血漿尿酸値を低下させることにより、痛風や高尿酸血症の予防や治療に有効であることが示唆される。

そこで今回、プロポリス中の代表的な成分としてクリシン、ガランギン、アルテピリンC、*p*-クマール酸及びカフェー酸フェネチルエステル（Fig. 2）を選択し、産地の異なるプロポリス、すなわち、中国産及びブラジル産プロポリス中の含有量を測定するとともに、XOD活性阻害作用を比較し、さらにオキシニン酸誘発高尿酸血症モデル動物を作製し、プロポリスの血漿尿酸値低下作用についても検討を行った。

### 試薬及び試験方法

**1. 試薬** クリシン、ガランギン、アルテピリンC、*p*-クマール酸及びキサンチンは、和光純薬工業株式会社（大阪）より購入したものを、カフェー酸フェネチルエステル、アロプリノール、プロベネシドは

シグマ（St. Louis, M.O.）より購入したものをを使用した。また、オキシニン酸は、アルドリッチ（Milwaukee, W.I.）より購入したオキシニン酸カリウム塩を、XOD（Butter milk 由来）はオリエンタル酵母工業株式会社（大阪）より購入したものをを使用した。

**2. 試験物質の抽出** ブラジル及び中国において入手したプロポリス原塊1kgを粉砕後、10倍量の80%含水エタノールで浸漬抽出し（常温、3日間）、ろ過後、減圧濃縮乾固することにより、80%含水エタノール抽出物をそれぞれ460g、375gを得た。

**3. 各成分の定量** Figure 2中に示した5つの成分の定量は、各標準品を用いて検量線を作成したのち、被験物質をHPLC（LC-2010A、株式会社島津製作所、京都）を用いて定量を行った。

すなわち、検体2mlに相当量のメタノールを加え、超音波抽出を行う。その後、メタノールを加えて50mlに定容した。これを直接、あるいは適宜希釈して、ミリアろ過したものをHPLC分析に供した。

#### HPLC分析条件

##### ① アルテピリンC

カラム：STR ODS-II φ 4.6 mm×15 cm（信和化学株式会社、京都）

移動相：A液 5%ギ酸、B液 メタノール

A : B = 70 : 30 (v/v) → 0 : 100 (v/v) 35分間のリニアグラジエント

測定波長：280 nm、流速：1.0 ml/min、カラム温度：40°C

##### ② *p*-クマール酸

カラム：YMC-Pack ODS-A A-312 φ 6.0 mm×15 cm（株式会社ワイエムシィ、京都）

移動相：2.5%酢酸：メタノール：アセトニトリル = 50 : 8 : 5 (v/v/v)

測定波長：320 nm、流速：1.0 ml/min、カラム温度：40°C

##### ③ クリシン及びガランギン

カラム：YMC-Pack ODS-A A-312 φ 6.0 mm×15 cm（株式会社ワイエムシィ、京都）

移動相：2.5%酢酸：メタノール：アセトニトリル = 25 : 10 : 10 (v/v/v)

測定波長：360 nm、流速：1.0 ml/min、カラム温度：40°C

## ④ カフェー酸フェネチルエステル

カラム：STR ODS-II  $\phi$  4.6 mm $\times$ 15 cm (信和化工株, 京都)

移動相：A液 2.5%酢酸, B液 アセトニトリル, C液 メタノール

0分 $\rightarrow$ 40分：A：B：C=75：25：0(v/v/v)

40分 $\rightarrow$ 50分：A：B：C=50：30：20(v/v/v)

測定波長：330 nm, 流速：1.0 ml/min, カラム温度：40°C

4. キサンチンオキシダーゼ活性阻害作用の測定  
XOD 活性阻害作用の測定は, Chang ら<sup>14)</sup>及び Nagao ら<sup>15)</sup>の方法を一部改変して, 産生される尿酸の量を HPLC により測定することにより求めた。

すなわち, 12.5 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8) に溶解させた 50  $\mu$ M キサンチン緩衝液に, 各濃度に調製した試験試料 10  $\mu$ l を加えて 37°C で 5 分間, プレインキュベーションした。その後, XOD 緩衝液 (0.1 mU) を加え, 37°C で 10 分間インキュベーションしたのち, 3.2% 過塩素酸溶液を加え反応を停止し, その後, 0.4 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8) 及びアセトニトリルを加えたあとに, 産生した尿酸の量を HPLC (検出器：UV-970, ポンプ：PU-980, 日本分光株, 東京) にて測定した。

測定条件は, カラム：Shim-Pack CLC-NH<sub>2</sub> ( $\phi$  6.0 mm $\times$ 150 cm, 株島津製作所, 京都) を用い, 移動相：アセトニトリル/20 mM リン酸二水素カリウム (3：2 v/v) 水溶液, 流速：1.0 ml/min, 温度：30°C, 検出波長：290 nm であり, この条件では尿酸のピーク面積は 6.2 分付近に検出された。

なお, 阻害率 (%) は, 試験試料を加えてない場合に産生される尿酸量 ( $\Delta_{A-control}$ ) に対する各濃度に調製した試験試料を加えた場合に産生される尿酸量 ( $\Delta_{A-test}$ ) の減少量で表した。

$$\text{阻害率}(\%) = (1 - \Delta_{A-test} / \Delta_{A-control}) \times 100$$

5. 動物, 飼料及び飼育 動物は, 5 週齢の雄性 SD 系ラット (日本チャールズリバー株, 神奈川) を購入し, 十分検疫馴化したあとに一般状態の観察及び体重測定を行い, 健康状態が良好な動物を選んで 6 週齢で使用した。

ラットは温度：22 $\pm$ 3°C, 湿度：55 $\pm$ 15%, 換気：常時オールフレッシュ方式, 照明：12 時間/日 (午前 6 時より午後 6 時), 照度：150—300 ルクス

に設定し, ステンレス製ブラケット飼育ゲージに 1 匹ずつ収容した。

飼料は, 実験動物用粉末飼料及び固形飼料 (飼育/繁殖用) CE-2 (日本クレア株, 東京) を, 飲料水は水道水を自動給水装置でいずれも自由摂取させた。

また, この実験計画及び実施に当たっては, 総理府公示第 6 号 (昭和 55 年 3 月) “実験動物の飼養及び保管等に関する基準” に準じて行った。

6. オキシニン酸誘発高尿酸血症ラットにおける血漿尿酸値の測定 本試験は, Osada ら<sup>19)</sup>及び Yonetani ら<sup>20)</sup>の方法を一部改変して行った。

すなわち, ラットを血漿尿酸値と体重が各群で平均化するようにして, 1 群 5 匹で無処置群, 高尿酸血症群 (以下, 対照群とする), アロプリノール 10 mg/kg 投与群, プロベネシド 100 mg/kg 投与群, プロポリス 500 mg/kg 投与群の 5 群に分けた。

ラットは非絶食下で用いた。まず, 500 mg/kg のオキシニン酸 0.5% カルボキシメチルセルロース (CMC) 水溶液を経口投与した。この 1 時間後に, 溶媒又は被験物質液を経口投与した。採血は, オキシニン酸投与 1 時間前, 溶媒又は被験物質液投与 1, 2 及び 3 時間後に尾静脈から行い, 血漿を調製して尿酸の測定に供した。尿酸の測定に当たっては, 市販測定キット (ウリックアシッド-テストワコー：和光純薬工業株, 大阪) を用いて測定した。

結果は, 平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。高尿酸血症モデルの確立の検討として, 無処置群と対照群の 2 群間において, 無処置群を基準として各採血時点で *t*-検定を行った。被験物質の有効性を検討するため, 無処置群を除いた 4 群で無処置群を基準として各採血時点で Dunnett の多重比較を行った。*p* 値が 0.05 未満であったとき「有意である」と判定し, 有意差水準として 5%, 1% 及び 0.1% を使用した。

## 結果及び考察

わが国において, 痛風は食生活の欧米化などに伴い, その患者数は年々増加してきた。痛風の予備軍とも言える高尿酸血症患者はさらに多数であり, やはり痛風と同様に増加している。

高尿酸血症とは, 血漿中の尿酸濃度が一定以上に上昇した状態であり, 血漿尿酸の飽和度を越える状態を指す。近年, この血漿尿酸値管理の対策として, 生活習慣の中で重要な位置を占める食に注目

し、食品の持つ生体調節機能を利用して血漿尿酸値を低下させようとする試みが精力的になされている。<sup>21-23)</sup>

そこで、われわれは、オキソニン酸誘発高尿酸血症ラットにおけるプロポリスの血漿尿酸値低下作用について検討を行った。

まず、中国産及びブラジル産プロポリスの XOD 活性阻害作用について検討を行ったところ、Fig. 1 に示したように、両産地のプロポリスも濃度依存的に XOD 活性を阻害したが、その阻害作用は中国産の方が強い傾向を示した。

次に、プロポリスの産地により含有する成分が大きく異なることが報告されている<sup>12)</sup>ことから、代表的な成分である Fig. 2 に示したクリシン、ガランギン、アルテピリン C、*p*-クマール酸及びカフェー酸フェネチルエステルの 5 成分について、中国産及びブラジル産プロポリス中の含有量の定量を行った。その結果、Table 1 に示したように、中国産においてはクリシンやガランギン及びカフェー酸フェネチルエステルが多く含まれており、一方、ブラジル産はアルテピリン C や *p*-クマール酸が多く含まれていることが明らかとなり、産地により含有する

成分が大きく異なることが示された。

さらに、これら 5 成分と XOD 活性阻害作用との関係を明らかにする目的で、5 成分の XOD 活性阻害作用について検討を行ったところ、Table 2 に示したように、カフェー酸フェネチルエステルの阻害作用が最も強く、ついでクリシン及びガランギンであり、アルテピリン C や *p*-クマール酸は弱い阻害作用であった。この結果は、中国産がブラジル産よりも XOD 活性阻害作用が強い傾向を示した結果と一致しており、中国産でフラボノイドやカフェー酸フェネチルエステルの含有量が多いことが、阻害作用の強さに一部起因していると考えられる。しかし、プロポリス中にはこれら 5 成分以外にも多くの化合物が含有されていることから、さらに他の成分についても単離を行い、阻害作用を測定するなど、詳細な検討が必要であると考えられる。

ヒトにおいて、食事由来の核酸やプリン化合物は、プリン代謝最終産物として尿酸の形で尿中に排泄される。しかし、マウスやラットなどのげっ歯類は、尿酸酸化酵素であるウリカーゼにより尿酸からさらにアラントインにまで代謝されて尿中に排泄される。<sup>24)</sup>そこでわれわれは、ウリカーゼ阻害薬であ

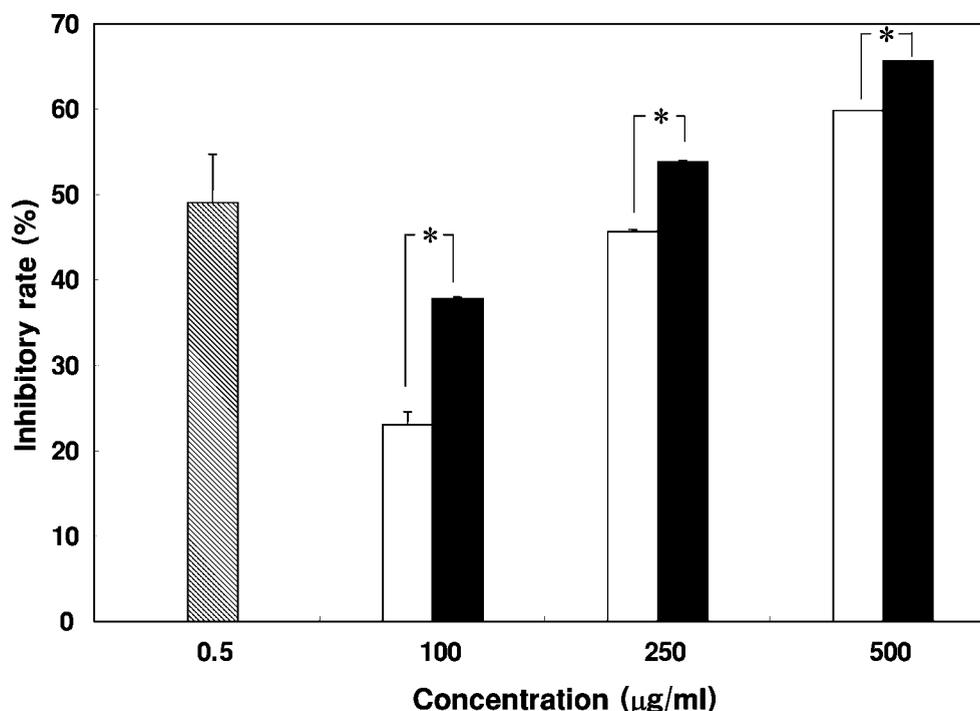


Fig. 1. XOD Inhibitory Activity of Propolis from Brazil and China

Data from 3 times tests are expressed as means±S.E. Symbols indicate propolis from Brazil (□), China (■) or allopurinol (▨) as positive control. \* $p < 0.001$ , Brazil vs China by Student's *t*-test.

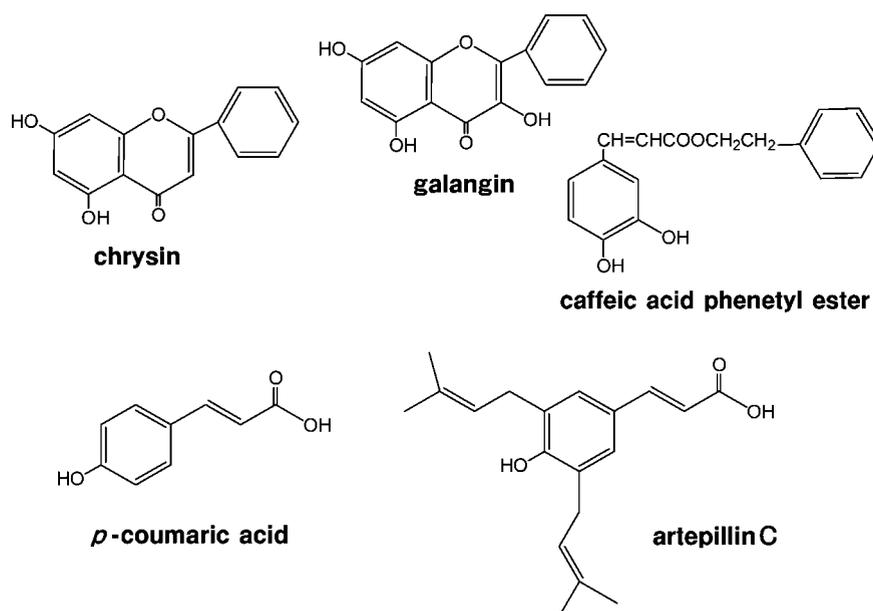


Fig. 2. Chemical Structure of Five Compounds (*p*-Coumaric Acid, Artepillin C, Chrysin, Galangin and Caffeic Acid Phenetyl Ester) in Propolis

Table 1. Quantitative Values of Five Compounds

	<i>p</i> -Coumaric acid	Artepillin C	Chrysin	Galangin	Caffeic acid phenetyl ester
Brazilian	473	2800	N.D.	2.3	5.3
Chinese	85	170	1300	607	458

N.D.: Not detected, mg/100 g.

Table 2. XOD Inhibitory Activity of Five Compounds

	IC <sub>50</sub> values (μM)
<i>p</i> -Coumaric acid	>100
Artepillin C	>100
Chrysin	12.48
Galangin	14.11
Caffeic acid phenetyl ester	5.13
Allopurinol	3.51

るオキソニン酸を投与することにより高尿酸血症モデル動物を作製し、本動物に対する XOD 活性阻害作用の強かった中国産プロポリスの血漿尿酸値低下作用について検討を行った。

Figure 3 に示したように、無処置群の血漿尿酸値は 4 回の採血で平均値で 0.49—0.74 mg/dl であった。対照群ではオキソニン酸投与前、溶媒投与 1 時間（オキソニン酸投与 2 時間後）、2 時間（オキソニン酸投与 3 時間後）及び 3 時間後（オキソニン酸

投与 4 時間後）で血漿尿酸値はそれぞれ 0.47, 1.72, 2.03 及び 2.04 mg/dl となり、オキソニン酸経口投与後無処置群に比べ約 3—4 倍に有意に上昇した（それぞれ  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ , Student's *t*-test）又は Welch's *t*-test）。

尿酸生成抑制薬であるアロプリノールは、キサンチンの類似物質であり XOD に対して競合的に、代謝産物であるオキシプリノールは非競合的に作用して、ヒポキサンチンからキサンチン、キサンチンから尿酸のいずれの経路も抑制する現在唯一の XOD 阻害薬<sup>4)</sup>である。このアロプリノール 10 mg/kg 投与群では有意に投与後低値を示し、アロプリノール投与 2 時間（オキソニン酸投与 3 時間）及び 3 時間（オキソニン酸投与 4 時間）後に、無処置群と同等にまで有意に低下した（ $p < 0.001$ , Dunnett の多重比較）。一方、尿酸排泄促進薬であるプロベネシドは、近位尿細管での尿酸分泌後の再吸収を抑制することにより、尿酸の尿中排泄を促進させる薬剤であ

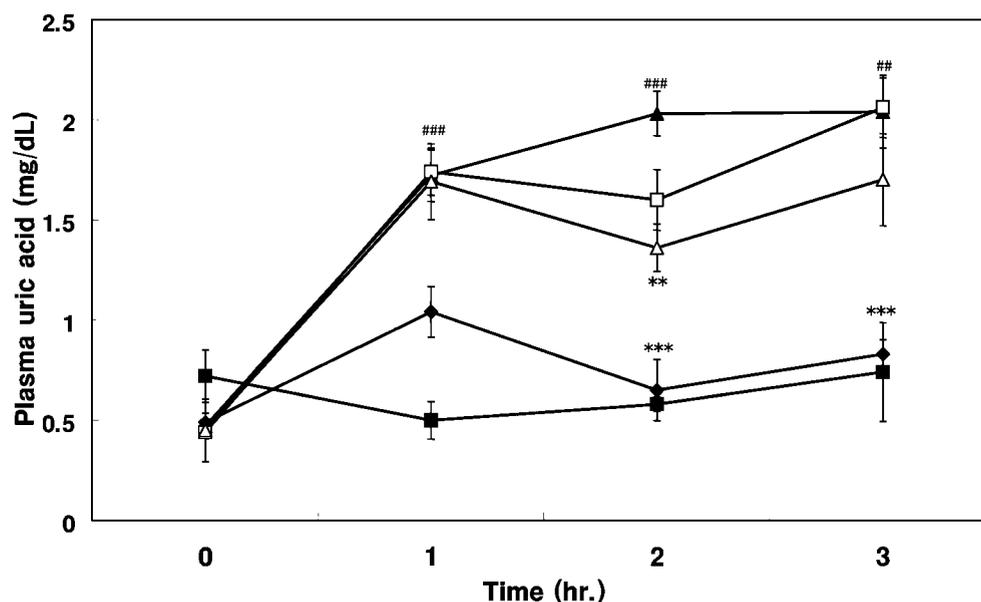


Fig. 3. Effect of Propolis on Plasma Uric Acid Levels in Rats with Oxonic Acid-Induced Hyperuricemia

Data from 5 animals are expressed as means  $\pm$  S.E. Symbols indicate non-treatment group (■), control group (▲), allopurinol group (◆), probenecid group (□) and propolis group (△). \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001 vs non-treatment group by Student's or Welch's  $t$ -test. \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001 vs control group by Dunnett's multiple comparison test.

る。<sup>9)</sup> このプロベネシド 100 mg/kg 投与群では有意な差は認められなかったものの、プロベネシド投与 2 時間（オキソニン酸投与 3 時間）後で低値を示す傾向にあった。

これに対し、XOD 活性阻害作用を有するプロポリス 500 mg/kg 投与では、投与後対照群と比較して低値に推移し、プロポリス投与 2 時間（オキソニン酸投与 3 時間）後で 1.33 mg/dl となり、対照群と比較して有意差が認められた ( $p$ <0.01, Dunnett の多重比較)。また、プロポリス投与 3 時間（オキソニン酸投与 4 時間）後では有意な差は認められなかったものの、低値を示した。

以上のことから、プロポリスの連続的な摂取が、XOD 活性を阻害して尿酸の生成を抑制することにより血漿尿酸値を低下させ、痛風やそのリスクファクターである高尿酸血症の予防あるいは治療に有効であることが示唆された。

今回は、*in vitro* 試験において XOD 活性阻害作用の強い傾向を示した中国産プロポリスを用いて *in vivo* での有効性試験を行ったが、今後は、ブラジル産及び中国産プロポリスのオキソニン酸誘発高尿酸血症ラットにおける血漿尿酸値低下作用の比較を行い、尿酸値の低下にはブラジル産プロポリスに多く含まれている桂皮酸誘導体が重要であるのか、

あるいは中国産プロポリスに多く含まれているフラボノイドやカフェー酸フェネチルエステルが重要であるのかを明らかにする必要があると思われる。

## REFERENCES

- 1) Terai C., *Naika*, **85**, 375–377 (2000).
- 2) Fujimori S., *Rinshou Eiyou*, **97**, 709–715 (2000).
- 3) Hikita M., *Gout Nucleic Acid Metab.*, **24**, 139–151 (2000).
- 4) Nakajima H., *Hyperuricemia Gout*, **9**, 21–26 (2001).
- 5) Yamamoto T., *Hyperuricemia Gout*, **9**, 16–20 (2001).
- 6) Matsuno T., *Z. Naturforsch.*, **50c**, 93–97 (1995).
- 7) Wang L., Mineshita S., Ga I., Shigematsu T., Matsuno T., *Jpn. J. Pharmacol. Ther.*, **24**, 223–224 (1993).
- 8) Hayashi K., Komura S., Ohishi N., Yagi K., *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 1521–1524 (1999).
- 9) Tatefuji T., Izumi N., Ohta T., Arai S., Ikeda M., Kurimoto M., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 966–970 (1996).
- 10) Amoros M., Lurton E., Bousite J., Girre L., Sauvager F., Cormier M., *J. Nat. Prod.*, **57**,

- 644–647 (1994).
- 11) Sugimoto Y., Tarumi T., Kaneko Y., Isayama S., Kawai N., Sugimoto H., Yamada H., Kamei C., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 1237–1239 (1999).
  - 12) Tazawa S., Warashina T., Noro T., *Nat. Med.*, **54**, 306–313 (2000).
  - 13) Kumazawa S., Nakayama T., *Honeybee Sci.*, **22**, 1–8 (2001).
  - 14) Chang W. S., Lee Y. J., Lu F. S., Chiang H. C., *Anticancer Res.*, **13**, 2165–2170 (1993).
  - 15) Nagao A., Seki M., Kobayashi H., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **63**, 1787–1790 (1999).
  - 16) Alberto B., Marina V., Lucia C., *Pharmaco. Res. Commun.*, **17**, 831–839 (1985).
  - 17) Chang W. S., Chiang H. C., *Anticancer Res.*, **15**, 1969–1974 (1995).
  - 18) Chan W. S., Wen P. C., Chiang H. C., *Anticancer Res.*, **15**, 703–708 (1995).
  - 19) Osada Y., Tsuchimoto M., Fukushima H., Takahashi K., Kondo S., Hasegawa M., Komoriya K., *Eur. J. Pharmacol.*, **241**, 183–188 (1993).
  - 20) Yonetani Y., Ishii M., Iwaki K., *Jpn. J. Pharmacol.*, **30**, 829–840 (1980).
  - 21) Unno T., Sakane I., Kakuda T., *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **47**, 740–743 (2000).
  - 22) Koguchi T., Nakajima H., Wada M., Yamamoto Y., Innami S., Maekawa A., Tadokoro T., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **48**, 184–193 (2002).
  - 23) Inoki A., Yamaguchi Y., *J. Nutr. Food*, **4**, 103–112 (2001).
  - 24) Stavric B., Nera E. A., *Clin. Toxicol.*, **13**, 47–74 (1978).