

げっ歯類における数種の異なる疾病モデルを用いた

グリーンプロポリスの防御効果に関する研究

2018 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科

(岐阜大学)

土屋 祐弥

げっ歯類における数種の異なる疾病モデルを用いた
グリーンプロポリスの防御効果に関する研究

土屋 祐弥

目次

略語一覧	4
序論	6
第1章 EEBGP の薬物誘発性急性肝障害モデルに対する防御効果の検討	
緒言	12
材料および方法	14
結果	19
考察	22
小括	27
図表	29
第2章 EEBGP の AA アミロイド症モデルに対する防御効果の検討	
緒言	43
材料および方法	44
結果	45
考察	46
小括	48
図表	49
第3章 EEBGP の HEV-9 感染による急性脳炎モデルに対する防御効果の検討	
緒言	57
材料および方法	57
結果	54
考察	60
小括	61
図表	62

総合討論	65
結論	69
謝辞	70
参考文献	71

略語一覽

AA: Amyloid A

ACTB: β -Actin

ALT: Alanine aminotransferase

APAP: *N*-Acethyl-*p*-aminophenol

AST: Aspartate aminotransferase

CAPE: Caffeic acid phenethyl ester

CAT: Catalase

CCL: CC-motif chemokine

CYP2E1: Cytochrome P450 2E1

CXCL: CXC-motif chemokine

DPPH: 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

EEBGP: Ethanol extract of Brazilian green propolis

EHV-9: Equine herpesvirus-9

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GSTM1: Glutathione-*S*-transferase M1

H.E.: Hematoxylin-Eosin

IL: Interleukin

LPS: Lipopolysaccharide

NAPQI: *N*-Acethylbenzoquinoneimine

NF- κ B: Nuclear factor- κ B

NOS2: Nitric oxide synthase-2

NRF2: Nuclear-factor erythroid-derived 2-related factor-2

SAA: Serum amyloid A

SOD: Superoxide dismutase

GPX: Grutathione peroxidase

GSR: Glutathione reductase

PPAR α : Peroxisome proliferator-activated receptor α

SULT1A1: Sulfotransferase 1A1

TNF- α : Tumor necrosis factor- α

UGT1A6: UDP-glucuronosyltransferase 1A6

序論

我が国の「平均寿命」は、2013 年時点で男性が 80.21 歳、女性が 86.61 歳である一方、介護を受けたり寝たきりになったりせず日常生活を送れる期間を示す「健康寿命」が、男性が 71.19 歳、女性が 74.21 歳と、両者の間に 10 歳前後の差があることが報告されている[1]。一方、国の医療費は年々増加の一途をたどっており、2015 年には 42 兆円にも達しているが、その約 60%は 65 歳以上の高齢者を対象としたものであり（図 1-1）[2]、平均寿命と健康寿命との乖離が大きな問題となっている。そのため、日本政府は市販医薬品を用いたセルフメディケーションによる医療費の抑制を進めるとともに[3]、若年層や中高年層を含む比較的若い世代からの疾病の予防を推進し、特に食品の有する健康増進効果に着目している。

食品は、健康食品（サプリメント）を含む一般食品と保健機能食品の 2 つに大きく分類され、さらに保健機能食品は特定保健用食品、栄養機能食品、機能性表示食品に分けられ、それぞれ 1991 年、2001 年、2015 年より運用が開始されている（図 1-2）[4, 5]。これら保健機能食品では、一般食品とは異なり、健康増進に関わる機能性表示が認められており、2018 年 3 月の時点で、特定保健用食品の許可数は 1, 000 件を[6]、機能性表示食品の登録数は 1, 300 件を超えており[7]、今後さらに増加することが予想される。これら食品の用途拡大に伴い、サプリメントの健康増進効果に関するエビデンスを取得することの重要性が高まっている。

プロポリスは、ミツバチが樹木の新芽や樹液と自らの分泌物を混合して作る樹脂状物質であり、伝統医薬やサプリメント素材として利用されている[8]。プロポリスの含有成分は、材料となる植物や抽出条件により異なる。ヨーロッパや中国では、ポプラに由来するプロポリスのエタノール抽出物が広く利用されており、クリシンやピノセンブリン、ケルセチン、ガラングイン等のフラボノイドのほか、特徴的な成分としてカフェ酸フェネチルエステル（CAPE）を含む（表 1-1）[9-11]。ポプラタイプのプロポリスでは、抗ウイルス作用や抗がん作用、抗酸化作用、抗炎症作用などが知られており[9]、マウスやラットにおいて虚血再灌流に伴う心毒性[12]、ドキソルビシンやシスプラチンによる腎毒性[13]、アセトアミノフェン（*N*-アセチル-*p*-アミノフェノール；APAP）や四塩化炭素による肝毒性[14, 15]を抑制することが報告されている。一方、日本では主にブラジル産のプロポリスがサプリメントとして利用されている。濃い緑色が特徴的なブラジル産グリーンプロポリス（Brazilian green Propolis; BGP）は、主にキク科の *Baccharis*

dracunculifolia D.C.を材料として作られ（アレクリンタイプ），そのエタノール抽出物（Ethanollic extract of BGP; EEBGP）は，アルテピリン C やバッカリン，ドルパニン等のプレニル化フェニルプロパノイド類や，ケンフェロールやケンフェライド等のフラボノイド類を含み（表 1-1, 図 1-3） [11], 抗菌作用, 抗ウイルス作用, 抗酸化作用, 抗炎症作用などが知られている[16, 17]。EEBGP は，動物実験にて糖尿病性腎症に対して保護作用を示し[18], α -ナフチルイソチオシアネート[19], *D*-ガラクトサミン[20]および水浸拘束ストレス[21]による血中肝障害マーカーの増加を抑制することが報告され，そのメカニズムとして EEBGP の有する抗酸化作用が考えられているが[18, 19], 組織レベルでの変化を評価した報告はほとんどない。

本研究では，異なるメカニズムに基づいて疾病を発症する 4 種の動物モデルにおいて，EEBGP が防御効果を示すか否か検討し，抗酸化作用や炎症抑制作用との関係性を確認した。第 1 章では，2 種の肝毒性物質（APAP および四塩化炭素）について，投与条件を決定するため，これらの物質の代謝に関わる薬物代謝酵素の遺伝子発現とグルタチオン量に対して摂餌条件および投与のタイミングの違いが与える影響について調べ，肝臓の傷害の有無およびその程度との関連について検討した。続いて，APAP あるいは四塩化炭素による肝細胞壊死に対する EEBGP の防御効果を検討するとともに，抗酸化酵素および炎症関連因子の遺伝子発現に対する影響を確認し，防御効果との関連を調べた。第 2 章では急性肝障害モデルとは異なる障害モデルとして，アミロイド A（AA）アミロイド症に対する EEBGP の防御効果を検討するとともに，抗酸化酵素および炎症関連因子の遺伝子発現に対する影響を調べ，酸化ストレスおよび炎症反応との関連について確認した。また，EEBGP には抗ウイルス作用の報告があるため[16, 17], 第 3 章では，ウマヘルペスウイルス（EHV）-9 感染に伴う急性脳炎に対する EEBGP の防御効果を検討し，併せて炎症関連因子の遺伝子発現に与える影響を検討した。

表 1-1. アレクリン (Alecrim) タイププロポリスとポプラ (Poplar) タイププロポリスの含有成分の違い (Zhang J et al., 2016 [11]より抜粋・一部改変)

Chemicals	Contents (mg/g)	
	Alecrim type	Poplar type
Phenylpropanoids (Cinnamic acid derivatives)		
① <i>p</i> -Coumaric acid	18.01	2.70
Caffeic acid	1.47	13.35
② Chlorogenic acid	8.98	-
Caffeic acid phenetyl ester (CAPE)	-	24.43
Prenylated phenylpropanoids		
③ Artepillin C	107.70	-
Flavonoids		
Quercetin	-	5.90
④ Kaempferol	0.99	1.85
Galangin	-	22.23
⑤ Kaempferide	11.18	-
Pinocembrin	1.13	44.55
Chrysin	-	66.89

-: 未検出または定量限界以下

表中の化学物質前の数字は図 1-3 に対応する。

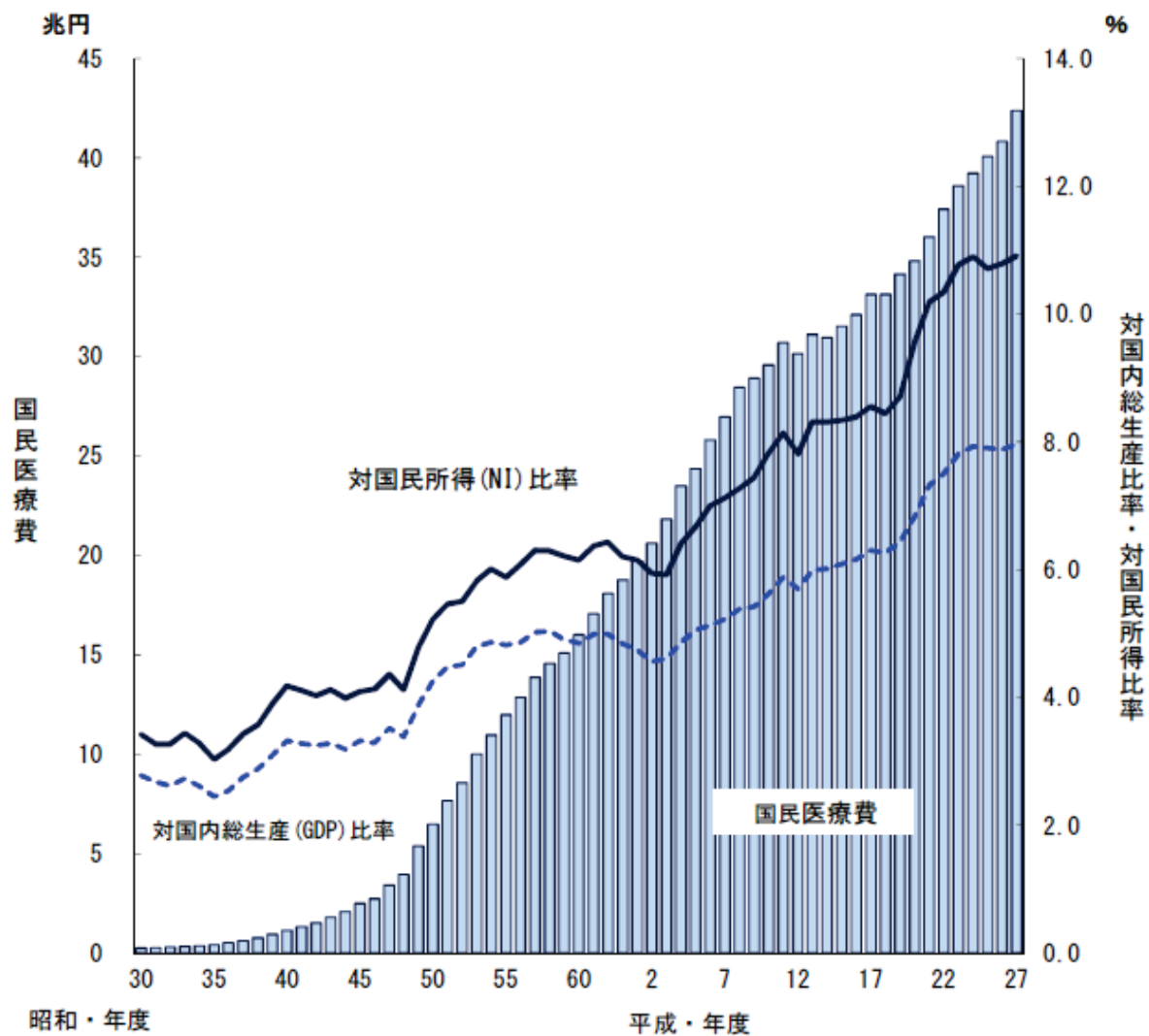


図 1-1. 国民医療費の推移（平成 27 年度 国民医療費の概況[2]より抜粋）

国民医療費は平成 27 年度では 42 兆 3,644 億円と、前年度に比べ 1 兆 5,573 億円, 3.8%増加した。

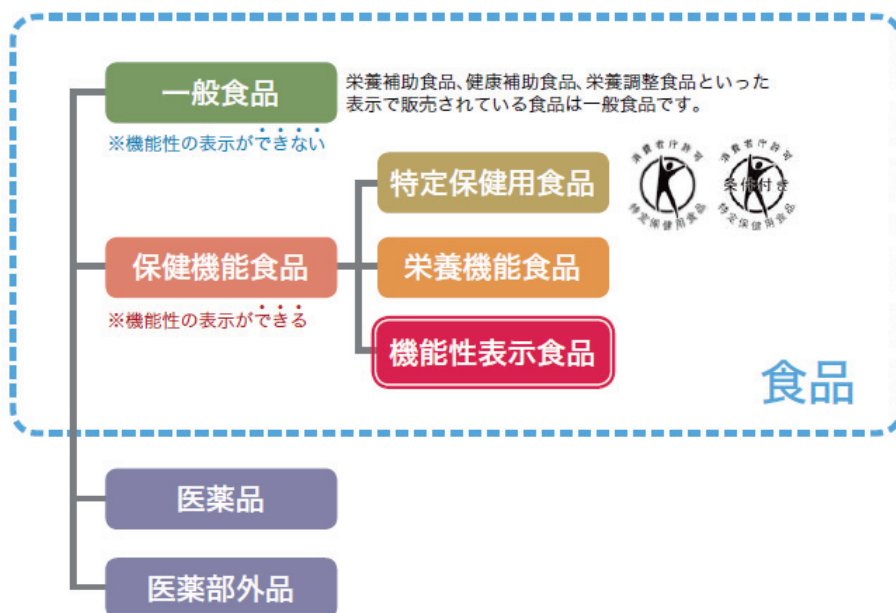
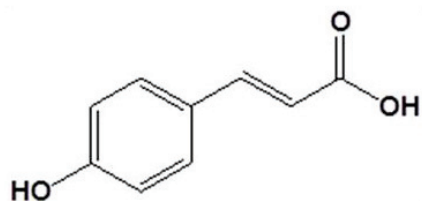


図 1-2. 一般食品，保健機能食品，医薬品の分類（機能性表示食品って何?[5]より抜粋）

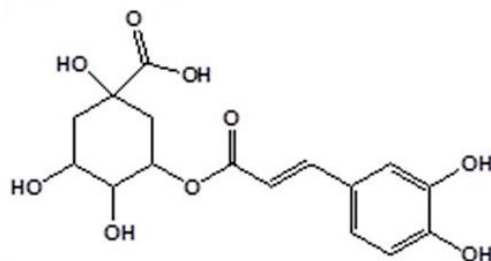
サプリメントを含む一般食品では，効果・効能等の機能性表示は一切認められていないが，保健機能食品では，ヒト臨床試験の結果に基づくものに限り機能性表示が認められている。

Phenylpropanoids

① *p*-Coumaric acid

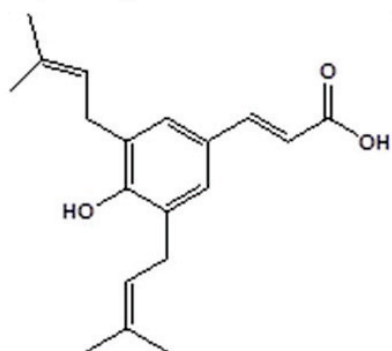


② Chlorogenic acid

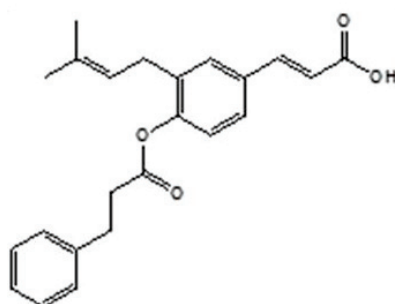


Prenylated phenylpropanoids

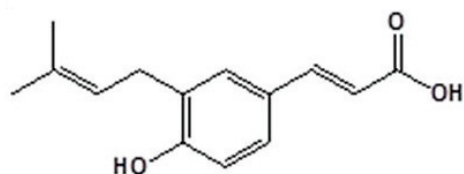
③ Artepillin C



Baccharin

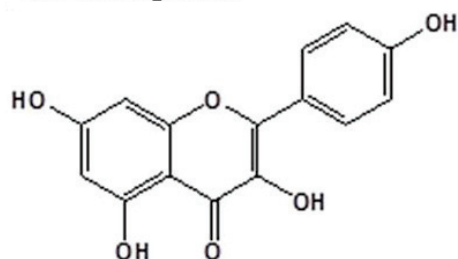


Drupanin



Flavonoids

④ Kaempferol



⑤ Kaempferide

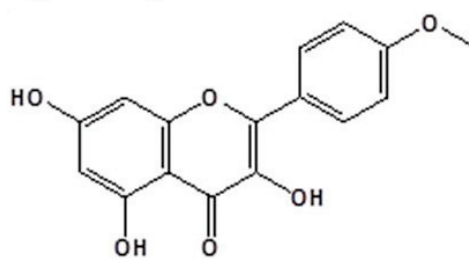


図 1-3. ブラジル産グリーンプロポリスのエタノール抽出物（EEBGP）中の主な含有成分

化合物名の中の数字は表 1-1 に対応する。

第 1 章

EEBGP の薬物誘発性肝障害モデルに対する防御効果の検討

【緒言】

一般的な解熱鎮痛薬である APAP は、ヒトにおいて過剰量の服用によって肝障害を生じることが知られており、動物でもヒトと同様のメカニズムで障害を生じることから薬物性の肝障害モデルとして広く利用されている[22]。APAP による肝毒性発現メカニズムを図 2-1 に示す。経口摂取した APAP は小腸から受動拡散により 90%以上が吸収され[23-25]、大部分はグルクロン酸抱合および硫酸抱合を受けて尿中へ排泄される。一部はシトクロム P450 2E1 (CYP2E1) により代謝されて反応性の高い *N*-アセチルベンゾキノニンイミン (NAPQI) となるが、NAPQI は速やかにグルタチオン抱合を受けて尿中へと排泄される[23, 25, 26]。しかしながら、一度に大量の APAP を摂取すると、グルクロン酸抱合および硫酸抱合の飽和に伴って NAPQI の生成量が増加し、排泄されなかった NAPQI が細胞内のミトコンドリアタンパクと非特異的に結合する。その結果、ATP 合成が阻害されて細胞機能に異常をきたすとともに、過酸化反応によって膜脂質、タンパク質、DNA が損傷し、肝細胞壊死が生じる[27-29]。実際に、抗酸化酵素である Mn-スーパーオキシドディスムターゼ (Mn-SOD) やグルタチオンペルオキシダーゼ (GPX) -1 を欠損したマウス[30, 31]やこれらの抗酸化酵素の遺伝子発現に関わる nuclear-factor erythroid-derived 2-related factor (NRF) 2 を欠損したマウスで APAP による肝障害が悪化することが報告されている[32]。また、酸化ストレスによる肝細胞壊死に加えて、APAP 投与による肝障害には炎症反応が重要であることが明らかとなっている[33, 34]。肝臓固有のマクロファージであるクッパー細胞は、壊死した細胞から放出される damage-associated molecular patterns に応答してサイトカインやケモカインを産生し、炎症性細胞を誘引することで壊死した細胞を除去するが、過剰な炎症反応は正常な肝細胞を破壊し、肝細胞壊死の範囲を拡大させる[33-35]。先行研究により、炎症性サイトカインである Interlukin (IL) -1 の産生やそのシグナル伝達[36-38]、ケモカインである CC motif chemokine ligand (CCL) -2 のシグナル伝達[39]を攪乱すると、APAP による肝障害が軽減されることが明らかとなっている。

ヒトにおける APAP の中毒量は 1 日最大服用量 (4 g/日) の 2 倍に相当する 8 g/日との報告があり、その大部分は自殺目的の意図的な過剰量の服用である[40]。一方、ヒトにおいて、慢性的な多量のアルコール摂取下や、長期の絶食下[40-42]や低栄養状態下[40, 41]では、一日最大服用量以下の摂取であっても肝障害を生じることが知られている。また、マウスでは、投与量が同じであるにもかかわらず、APAP の投与時刻によって死亡率や肝細胞壊死の程度が異なることが報告されている[43]。

ヒトにおいて、高濃度の四塩化炭素蒸気の吸入や溶液の曝露は、肝臓や腎臓、神経系などに障害を起こすが、肝毒性についてはラットやマウスなどの動物でもよく再現されるため、肝障害モデルとして広く利用されている[22]。四塩化炭素による肝毒性発現メカニズムを図 2-2 に示す。吸収された四塩化炭素は肝臓で CYP2E1 による代謝受け、トリクロロメチルラジカル ($\text{CCl}_3\cdot$) やトリクロロメチルペルオキシラジカル ($\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$) を生成する[44-46]。これらのラジカルは、脂質膜の酸化や生体高分子への非特異的結合を介して細胞機能を障害するため、CYP2E1 の発現量が特に多い小葉中心域で肝細胞壊死が生じる[44, 45]。また、四塩化炭素は肝臓におけるアポリポタンパク質の合成を阻害し、トリグリセリドの輸送が阻害されることにより、肝臓中に多数の脂肪滴が観察される[44, 45]。APAP と同様、四塩化炭素の肝毒性も摂餌条件の影響を受けることが報告されており、24 時間絶食下のラットでは自由摂餌下よりも強い肝障害が観察されている[46]。

先行研究により、APAP による肝障害は抗酸化能を有する食品由来の物質により抑制されることが報告されており、動物実験にて、トマト抽出物[48]、ショウガ科植物 (Zingiberaceae) 抽出物[49, 50]、ブドウ種子抽出物[51]が APAP による肝障害を軽減することが報告されている。同様に、ビタミン E [52]や *N*-アセチルシステイン[53]等の抗酸化物質の他、リンゴポリフェノール[54]や *S*-アリルシステイン[55]などの食品由来の抗酸化成分が四塩化炭素による肝障害と脂質過酸化を抑制することが報告されている。また、APAP 投与による肝細胞壊死[33, 34]や四塩化炭素誘発性の肝障害[56, 57]は、炎症反応を抑制することで軽減されることが明らかとなっている。ポプラタイプのプロポリスでは APAP [14]や四塩化炭素[15]に対する保護効果の報告がある一方、EEBGP についてはほとんど報告されていない。EEBGP は、*in vitro* においてラジカルスカベンジャーとして活性酸素種を直接消去し[11, 58, 59]、抗酸化酵素を誘導することが知られ[11]、マウスやラットにおいて抗酸化酵素活性を高めることで α -ナフチルイソチオシアネート[19]や水浸拘束ストレス[21]による血中の肝障害マーカーの増加を低減させることが報告されている。また、EEBGP は細胞試験や動物試験にて抗炎症作用を示すことが報告されているが[60, 61]、EEBGP の抗炎症作用と肝障害との関係については明らかになっていない。

本章では、実験 1 において、低用量の APAP 投与による肝傷害モデルを確立するため、APAP や NAPQI の代謝に関わる UDP-glucuronosyltransferase 1A6 (*Ugt1a6*), sulfotransferase 1A1 (*Sult1a1*), *Cyp2e1* および glutathione-*S*-transferase M1 (*Gstm1*) の遺伝子発現と肝臓グルタチオン量の日内での変化や、

摂餌条件による影響を確認した。続いて、800 mg/kg 体重の APAP を自由摂餌下の朝方または夕方、絶食下、あるいは制限給餌（自由摂餌下の 70%）条件下のラットに投与し、APAP による肝障害の有無および程度について検討した。また、APAP と同様に毒性発現に CYP2E1 が関わる四塩化炭素について、自由摂餌下あるいは絶食下のラットに投与し、肝傷害の有無および程度について検討した。実験 2 では、EEBGP の事前投与が APAP 誘発性肝障害に対して保護的に働くか否かを検討し、抗酸化酵素および炎症関連因子の遺伝子発現に対する影響を調べることで、EEBGP の抗酸化作用および抗炎症作用と組織傷害に対する保護効果との関係性について検討した。さらに、実験 3 で EEBGP の事前投与が四塩化炭素誘発性肝傷害に対して保護的に働くか否かを検討した。

【材料と方法】

・被験物質

被験物質には、BGP 原塊の 95%エタノール抽出物（EEBGP; アピ㈱, 岐阜, 日本）を用いた。EEBGP をデキストリン粉末（松谷化学工業㈱, 兵庫, 日本）と 2:3 の割合で混合して乾燥させ、一般飼育用固形飼料（CE-2; 日本クレア㈱, 東京, 日本）に 0.3%（実験 2）あるいは 1.2%（実験 3）で混合した。

・動物

実験には、5-6 週齢の雄性 Wistar/ST ラット（日本 SLC㈱, 静岡, 日本）を用い、室温 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、明暗各 12 時間（明期: 8:00~20:00）にコントロールした動物室にて約 1 週間馴化させた後、試験に使用した。動物試験は、アピ㈱長良川リサーチセンターの動物実験委員会の承認のもと（実験 1: #42-002 および #44-020, 実験 2: #43-006, 実験 3: #44-038）, 動物倫理規定に従って実施した。

実験 1

・給餌条件

動物を、自由摂餌群、前日 17:00 から 9:00 までの 16 時間絶食群ならびに制限給餌群に分け、CE-2 を与えた。制限給餌は、先行文献を参考に[62], 同系統、同週齢の雄性ラットにおける 1 日あたりの平均摂餌量の約 70%に相当する 14 g を毎日 17:00 に給餌し、10 日間継続した。制限給餌条件下では、毎日 9:00 に一般状態を観察し、体重および摂餌量を記録した。

・遺伝子発現量およびグルタチオン量の測定

自由摂餌下および制限給餌条件下では 9:00 および 16:00 に、絶食下では 9:00 に（各 $n = 5$ ），イソフルラン（和光純薬工業㈱，大阪，日本）吸入麻酔下で肝臓を摘出して重量を測定した後，液体窒素で凍結し，薬物代謝酵素の遺伝子発現量および肝臓グルタチオン量を測定した。

凍結した肝臓約 50 mg に ISOGEN® II（㈱ニッポンジーン，東京，日本）を加えて Polytron® PT1300D（Kinematica AG, Lucerne, Switzerland）にてホモジナイズ（12, 000 rpm）した。滅菌 Milli-Q 水を加えて，室温で 15 分間静置した後，遠心分離（12, 000×G, 4℃, 15 分）し，上清を回収した。抽出した Total RNA は *ρ*-ブROMOアニソール（和光純薬工業㈱）および 8 M 塩化リチウム溶液（ナカライテスク㈱，京都，日本）にて精製し，抽出した Total RNA から SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）を用いて cDNA を合成した。cDNA をテンプレートとし，Applied Biosystems 7300 Real Time PCR system（Thermo Fisher Scientific）を用いて，定量 PCR（95℃, 15 秒→60℃, 1 分を 40 サイクル）を実施した。Reference gene として Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（*Gapdh*）遺伝子を用い，個体ごとの遺伝子発現量は *Gapdh* 遺伝子の相対量として算出した。測定する薬物代謝酵素遺伝子は，文献情報を基に[24-26, 63, 64], APAP 代謝に関与する *Ugt1a6*, *Sult1a1*, *Cyp2e1* および *Gstm1* とした。使用したプライマーを表 2-1 に示した。

凍結した肝臓約 100 mg に 5% (w/v) スルホサリチル酸溶液（ナカライテスク㈱）を加えてホモジナイズ（12, 000 rpm）した。遠心分離（8, 000×G, 4℃, 10 分）後の上清を用い，GSSG/GSH Quantification Kit（㈱同仁化学研究所，熊本，日本）にて総グルタチオン量を測定した。個体ごとのグルタチオン量は肝臓湿重量で換算し，肝臓あたりのグルタチオン量として算出した。

・APAP 誘発性肝障害の評価

APAP の投与量は，ヒトにおいて肝障害を示す 8 g をラットの体表面積で換算した 800 mg/kg 体重とした。APAP（ナカライテスク㈱）を 0.5% (w/v) メチルセルロース（信越化学工業㈱，東京，日本）溶液に懸濁し，自由摂餌下では 9:00（ $n = 3$ ）および 16:00（ $n = 5$ ），絶食下では 9:00（ $n = 5$ ），制限給餌条件下では 16:00（ $n = 5$ ）に，それぞれ単回強制経口投与した。なお，自由摂餌下 16:00 投与では，APAP 投与から剖検まで絶食し，自由摂餌下 9:00 投与および絶食下 9:00 投与では 10:00 から 16:00 まで自由摂餌

とし、16:00 から剖検までは絶食した。制限給餌条件下 16:00 投与では 17:00 に約 14 g 給餌した。

いずれの動物も APAP 投与から約 24 時間後にイソフルラン吸入麻酔下で腹大静脈より採血した後、放血致死した。肝臓を摘出した後、10%中性緩衝ホルマリン溶液（マイルドホルム®10N; 和光純薬工業㈱）にて固定し、定法に従ってヘマトキシリン-エオジン（H.E.）染色標本を作製し、光学顕微鏡にて観察した。採取した血液は、血清を遠心分離（3,000 rpm, 4℃, 15 分）した後、生化学自動分析装置（富士ドライケム 7000i; 富士フィルムメディカル㈱, 東京, 日本）を用いて、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）値およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）値を測定した。

・四塩化炭素誘発性肝障害の評価

四塩化炭素の投与量は 800 mg/kg 体重とした。四塩化炭素（和光純薬工業㈱）を 0.1% (v/v) Tween 80（東京化成工業㈱, 東京, 日本）を含む 0.5% (w/v)メチルセルロース溶液にホモジナイザー（TAITEC CULTRAS HOMOGENIZER VP-60S; タイテック㈱, 埼玉, 日本）を用いて分散させ、自由摂餌下（n = 5）あるいは 16 時間絶食下（n = 4）の 10:00 に、それぞれ単回強制経口投与した。なお、自由摂食下投与では、投与日の 8:00 までは自由に摂食させ、投与後は 2 時間絶食させた。絶食下投与では、投与前日の 18:00 から絶食させ、四塩化炭素投与後 2 時間まで絶食を継続した。その後、いずれの条件でも自由に摂食させ、投与日の 17:00 から剖検までは絶食させた。

いずれの動物も四塩化炭素投与から約 24 時間後にイソフルラン吸入麻酔下で腹大静脈より採血した後、放血致死した。肝臓を摘出した後、10%中性緩衝ホルマリン溶液にて固定し、定法に従って H.E.染色標本を作製し、光学顕微鏡にて観察した。採取した血液は、血清を遠心分離（3,000 rpm, 4℃, 15 分）した後、生化学自動分析装置（富士ドライケム 7000i）を用いて、ALT 値および AST 値を測定した。

実験 2

・実験デザイン

Control 群には CE-2 を、EEBGP 群は 0.3% EEBGP 食を 7 日間連続で与えた。APAP の投与量および投与時間は実験 1 の結果から設定し、投与開始から 8 日目の 16:00 に、0.5% (w/v)メチルセルロース溶液に懸濁した APAP を 800 mg/kg 体重で単回強制経口投与し、剖検まで絶食させた。小葉中心性の肝細胞壊死がみられた Control 群 4 例および EEBGP 群 5 例を評価に用いた。

APAP 投与から約 24 時間後にイソフルラン吸入麻酔下で腹大静脈血を得た後、屠殺し、肝臓を摘出した。肝臓の一部は液体窒素で凍結し、抗酸化酵素および炎症関連遺伝子の発現量を測定した。肝臓の残りの部分は 10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定した後、定法に従って H.E.染色標本を作製し、光学顕微鏡にて観察した。肝臓の正常領域に占める壊死領域の割合は、顕微鏡（×50 倍）下でランダムに 8 枚取得した画像を用いて面積値を算出した。画像解析には Image J（National Institutes of Health, USA）を使用した。採取した血液は、血清を遠心分離（3,000 rpm, 4℃, 15 分）した後、生化学自動分析装置を用いて、ALT 値および AST 値を測定した。

・ 定量 PCR

抗酸化酵素である *Sod1*, *Sod2*, Catalase (*Cat*) , *Gpx1*, *Gpx4*, Peroxiredoxin-1 (*Prdx1*) , Glutathione reductase (*Gsr*) , サイトカインである *Il1b*, *Il6*, *Il10*, *Il23a*, *Tnf*, ケモカインである *Ccl2*, *Ccl3*, CXC motif chemokine ligand-2 (*Cxcl2*) および Nitric oxide synthase-2 (*Nos2*) 遺伝子の発現量を定量 PCR にて測定した。Control 群および EEBGP 群より得られた肝臓約 50 mg に ISOGEN® II を加えてにてホモジナイズ（12,000 rpm）し、実験 1 の方法に従って cDNA を合成した後、定量 PCR にて抗酸化酵素および炎症関連遺伝子の発現量を測定した。使用したプライマーを表 2-2 に示した。Reference gene には *Gapdh* 遺伝子(表 2-1)を用いて、個体ごとの遺伝子発現量は *Gapdh* 遺伝子の相対量として算出した。

実験 3

・ 実験デザイン

Control 群には CE-2 を、EEBGp 群は 1.2% EEBGP 食を 7 日間連続で与えた。投与開始から 8 日目の 9:00 に、0.1% (w/v) Tween 80 含有 0.5% (w/v)メチルセルロース溶液に懸濁した四塩化炭素を 800 mg/kg 体重で単回強制経口投与した。その後、いずれの条件でも自由に摂食させ、投与日の 17:00 から剖検までは絶食させた。小葉中心性の肝細胞壊死がみられた各群 6 例を評価に用いた。

四塩化炭素投与から約 24 時間後にイソフルラン吸入麻酔下で腹大静脈血を得た後、屠殺し、肝臓を摘出して 10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定した後、定法に従って H.E.染色標本を作製し、光学顕微鏡にて観察した。採取した血液は、血清を遠心分離（3,000 rpm, 4℃, 15 分）した後、生化学自動分析装置を用いて、ALT および AST を測定した。

・統計処理

実験 1 では、薬物代謝酵素の遺伝子発現量、肝臓グルタチオン量、APAP 投与 24 時間後の血中 ALT 値および AST 値は、Bartlett の検定にて各群の分散を比較し、等分散の場合は Dunnett の多重比較検定、不等分散の場合は Steel の多重比較検定を用いて自由摂餌下 9:00 とその他の条件下で比較した。加えて、制限給餌条件下の肝臓グルタチオン量は、F 検定にて分散を比較した後、Student の t 検定を用いて、2 つのタイムポイント (9:00 および 16:00) 間で比較した。四塩化炭素投与 24 時間後の血中 ALT 値および AST 値は、F 検定にて分散を比較した後、Welch の t 検定を用いて自由摂餌下と絶食下で比較した。実験 2 では、血中 ALT 値および AST 値、肝細胞壊死領域の割合、抗酸化酵素および炎症関連遺伝子の発現量は、F 検定にて分散を比較した後、等分散の場合は Student の t 検定、不等分散の場合は Welch の t 検定を用いて Control 群と EEBGP 群で比較した。炎症関連遺伝子の発現量と肝細胞壊死領域の割合は、Spearman の順位相関係数を用いて相関の有無を確認した。実験 3 では、血中 ALT 値および AST 値は、F 検定にて分散を比較した後、Student の t 検定を用いて Control 群と EEBGP 群で比較した。統計処理にはエクセル統計 2012 (Social Survey Research Information Co., Ltd, 東京, 日本) を用い、有意水準は $p < 0.05$ とした。

【結果】

実験 1

・制限給餌条件下における一般状態、体重、摂餌量

制限給餌群のいずれの動物においても一般状態に異常はみられなかった。制限給餌条件下で飼育した動物に体重低下はみられず (図 2-3) , 自由摂餌群の 83%であった。制限給餌群では、全ての個体が試験期間を通して与えた全量 (14 g) を摂食した。

・異なる摂餌条件下における薬物代謝酵素遺伝子の発現量および肝臓グルタチオン量の変化

Cyp2e1 遺伝子の発現量は、自由摂餌下 9:00 と比較して自由摂餌下 16:00 では有意な変化がみられなかったものの、絶食下および制限給餌条件下では有意に増加した ($p < 0.01$, 図 2-4)。自由摂餌下 16:00, 絶食下および制限給餌条件下の *Ugt1a6*, *Sult1a1* および *Gstm1* 遺伝子の発現量は、自由摂餌下 9:00 と比較して有意な変化はみられなかった (図 2-4)。

自由摂餌下 16:00 の肝臓グルタチオン量は、自由摂餌下 9:00 と比較して有意な変化がみられなかった。制限給餌条件下 9:00 では自由摂餌下 9:00 の 86%とわずかな減少がみられたが、有意な変化ではなかった。一方、絶食下および制限給餌下 16:00 では自由摂餌下 9:00 と比較して有意に低下し ($p < 0.01$) , 加えて制限給餌下 16:00 では制限給餌下 9:00 と比較して有意に低下した ($p < 0.01$, 図 2-5)。

・ APAP 誘発性肝障害に対する摂餌条件の影響

各条件下において、800 mg/kg 体重の APAP を経口投与したところ、自由摂餌下 9:00 の投与では、いずれの動物の肝臓にも異常はみられなかった (図 2-6A)。一方、自由摂餌下 16:00 投与では、4 例で炎症細胞浸潤を伴った小葉中心性の肝細胞壊死が観察され、別の 1 例で中心静脈周囲に炎症細胞浸潤を伴った単細胞性の肝細胞壊死が観察された (図 2-6B)。小葉中心性の肝細胞壊死がみられた個体では、ALT 値が自由摂餌下の平均値 (51.0 ± 9.2 U/L) の約 160%以上に、AST 値が自由摂餌下の平均値 (84.7 ± 8.0 U/L) に対して 300%以上に増加し、単細胞性の肝細胞壊死がみられた個体では、AST 値が自由摂餌下の平均値の約 150%に増加したが、ALT 値は自由摂餌下と変わらなかった (表 2-3)。

絶食下の投与では、2 例で炎症細胞浸潤を伴った小葉中心性の肝細胞壊死が観察され (図 2-6C) , 別の 2 例で中心静脈周囲に炎症細胞浸潤を伴った単細胞性の肝細胞壊死が観察された。小葉中心性の肝細胞壊死がみられた個体では、ALT 値が自由摂餌下の平均値の約 150%に、AST 値が自由摂餌下の平均値に対して 300%以上に増加し、単細胞性の肝細胞壊死がみられた個体では、AST 値が自由摂餌下の平均値の約 140%に増加したが、ALT 値は自由摂餌下と変わらなかった (表 2-3)。

制限給餌条件下では、3 例で中心静脈周囲に炎症細胞浸潤を伴った単細胞性の肝細胞壊死が観察され (図 2-6D) , これらの動物では AST 値が自由摂餌下の平均値の約 120%に増加したが、ALT 値は全例で変わらなかった (表 2-3)。

いずれの条件でも、ALT 値および AST 値は自由摂餌下 9:00 と比較して有意な変化ではなかった。

・ 四塩化炭素誘発性肝障害に対する摂餌条件の影響

自由摂餌下で 800 mg/kg 体重の四塩化炭素を経口投与したところ、全例で炎症性細胞浸潤を伴った小葉中心性の肝細胞壊死と、中間域で肝細胞の脂肪変性が観察された (図 2-7A-a)。絶食下の投与では、全

例で小葉中心域から中間域にかけて炎症性細胞浸潤を伴った肝細胞壊死がみられ、自由摂餌下に比べて少数ではあるが、中間域に脂肪変性を示す肝細胞が観察された（図 2-7A-b）。肝細胞壊死の範囲と関連するように、ALT 値では有意な差ではなかったものの、自由摂餌下 (130.6 ± 104.1 U/L) に対し、絶食下 (918.5 ± 598.7 U/L) で高く ($p = 0.05$)、AST 値は自由摂餌下が 310.0 ± 252.1 U/L であったのに対し、絶食下では $3,899.3 \pm 1150.3$ U/L と有意に高かった ($p < 0.05$, 図 2-7B)。

実験 2

・一般状態、体重、摂餌量

EEBGP の 7 日間混餌投与による一般状態の異常はみられず、体重推移、体重増加量および摂餌量は対照群と変わらなかった（データ示さず）。

・病理組織評価および生化学検査

APAP を投与したラットの肝臓を病理組織学的に観察したところ、炎症性細胞の浸潤を伴った小葉中心性の肝細胞壊死がみられた（図 2-8A-a）。EEBGP を投与した動物では、Control 群の動物と同様に炎症性細胞の浸潤を伴った小葉中心性の肝細胞壊死がみられたが（図 2-8A-b）、EEBGP 群の肝細胞壊死の範囲 ($28.2 \pm 5.0\%$) は Control 群 ($45.9 \pm 5.3\%$) と比較して有意に低下した ($p < 0.05$, 図 2-8B)。また、肝細胞壊死の変化と同様に、Control 群と EEBGP 群の間に有意差はみられなかったものの、EEBGP 投与により ALT 値 (256.4 ± 69.2 U/L) は Control 群 (803.8 ± 341.1 U/L) の約 1/3 に、AST 値 ($1,807.6 \pm 738.3$ U/L) は Control 群 ($3,447.3 \pm 998.8$ U/L) の約半分に低下した（図 2-8C）。

・遺伝子発現量の変化

Sod1, *Sod2*, *Cat*, *Gpx1*, *Gpx4*, *Prdx1*, *Gsr* のいずれの抗酸化酵素遺伝子の発現量においても、EEBGP 群と Control 群の間で統計的に有意な変化はみられなかった（図 2-9）。

一方、炎症関連遺伝子では、Control 群と比較して、EEBGP 群で *Il10* 遺伝子の発現量が有意に低下し ($p < 0.05$)、有意な差はみられなかったものの、*Il1b* 遺伝子の発現量の低下傾向がみられた ($p = 0.06$)（図 2-10）。その他のいずれの遺伝子発現量においても、EEBGP 群と Control 群の間で統計的に有意な変化はみられなかったが、EEBGP 群では *Il6* および *Cxcl2* 遺伝子の発現量がそれぞれ Control 群の 57.2% およ

び 46.0%に低下した (図 2-10)。

肝細胞壊死の範囲と遺伝子発現の変化の関係性を確認したところ, *Il1b* ($R = 0.73$, $p < 0.05$) および *Il10* 遺伝子 ($R = 0.82$, $p < 0.01$) で有意な相関がみられ, *Il6* ($R = 0.57$) , *Ccl3* ($R = 0.65$) および *Cxcl2* 遺伝子 ($R = 0.58$) では有意ではなかったものの, 相関傾向がみられた (図 2-11)。

実験 3

・病理組織評価および生化学検査

四塩化炭素を投与したラットの肝臓を病理組織学的に観察したところ, 炎症性細胞の浸潤を伴った小葉中心性の肝細胞壊死と, 中間域で肝細胞の脂肪変性が観察された (図 2-12A-a)。EEBGP を投与した動物では, Control 群の動物と同様の変化がみられ, その程度に差はみられなかった (図 2-12A-b)。これらの変化と同様に, ALT 値は Control 群の 211.7 ± 112.6 U/L に対し EEBGP 投与群では 236.8 ± 166.6 U/L, AST 値は Control 群の 560.7 ± 185.3 U/L に対し EEBGP 投与群では 503.3 ± 413.2 U/L と, 両群の間に差はみられなかった (図 2-12B)。

【考察】

実験 1

長期の絶食あるいは低栄養状態下におけるヒトでは, APAP の一般的な中毒量 (8 g/日) よりも低い用量でも肝障害を生じることが知られている[40, 41]。また, マウスにおいて, 投与量が同じであるにもかかわらず, APAP 投与による死亡率や肝細胞壊死の範囲が投与時刻によって異なることが報告されている[43]。このような APAP 誘発性肝障害の感受性の違いに薬物代謝酵素活性や肝臓グルタチオンが影響していることが示唆されているため, 実験 1 では, APAP の薬物動態に関わる薬物代謝酵素活性について, 日内での変化および給餌条件の影響を確認した。その結果, APAP や NAPQI の抱合および排泄を促進する *Ugt1a6*, *Sult1a1* および *Gstm1* 遺伝子の発現量は, 自由摂餌下における朝方と夕方に変化せず, 絶食下や制限給餌条件下でも顕著な変化はみられなかった。*Cyp2e1* 遺伝子の発現量は, 自由摂餌下における朝方と夕方ではほとんど変化しなかったものの, 絶食下および制限給餌条件下の自由摂餌下 9:00 と比較して有意に増加した。CYP2E1 は低分子化合物の水酸化や脱メチル化を触媒する酵素であり, その遺伝子発現は, 基質となる化学物質の摂取や大量の飲酒により増加することが報告されている[63-65]。一方

で、絶食下でも CYP2E1 が誘導されることが報告されている[47, 63, 66]。糖の供給が不足すると、エネルギー不足を補うためにアセチル CoA からアセト酢酸, β -ヒドロキシ酪酸, アセトンなどのケトン体が合成されるが[67], アセトンは CYP2E1 を誘導し[64, 65], アセトンの血中濃度時間曲線下面積と CYP2E1 活性は正の相関を示すことが報告されている[47]。絶食下[63]や 3 週間の 80%制限給餌下[68]では血中のケトン体濃度が増加することが報告されており, 10 日間の 70%制限給餌であっても恒常的なエネルギー不足を補うためにケトン体代謝が亢進し, 結果として CYP2E1 が誘導された可能性があると考えられた。

グルタチオンはシステイン, グルタミン酸, グリシンの 3 つのアミノ酸から構成されるトリペプチドであるが, これらのアミノ酸のうち, システインの生体内の貯蔵量は多くない上, 合成には必須アミノ酸であるメチオニンとセリンが必要であることから, 餌からのアミノ酸供給が減少するとグルタチオンの生合成量は低下する[69, 70]。実際にシステイン欠乏食で 8 日間飼育したラットでは, グルタチオン量は通常食群の 75%まで減少した一方で[69], 全てのアミノ酸の供給がなくなる 24 時間絶食下のラットではグルタチオン量は自由摂餌下の約 40%まで低下する[70]。本研究では, 絶食下に加えて, 10 日間の 70%制限給餌条件下でも自由摂餌下と比較して有意に低下した。Qin らは, 1 日間の 75%制限給餌条件下では肝臓グルタチオン量は自由摂餌下と変わらないと報告していることから[71], 本研究のように継続した制限給餌下では餌から供給されるアミノ酸が一律に減少するため, グルタチオンの生合成量が減少している可能性があると考えられた。加えて, 肝臓グルタチオン量は日内で変動することが知られている[47, 72]。ラットは主に暗期に摂餌するため, 自由摂餌下の肝臓グルタチオン量は, 明期初期に最も高く, 時間の経過に伴って減少し, 明期後半では明期初期の約 70%まで減少することが報告されているが[47, 72], 本研究における自由摂餌下のグルタチオン量は明期初期 (9:00) と明期後半 (16:00) でほとんど変わらなかった。一方, 70%の制限給餌条件下では, 明期後半 (16:00) のグルタチオン量は明期初期 (9:00) の 44%にまで低下し, 制限給餌下では自由摂餌下よりも大きな変動がみられることが明らかとなった。

絶食下および制限給餌条件下では, *Cyp2e1* 遺伝子発現の増加と肝臓グルタチオン量の低下が確認されたことから, APAP 誘発性の肝障害に影響する可能性が考えられた。そこで, 自由摂餌下 9:00 投与では肝障害を生じない 800 mg/kg 体重の APAP を絶食下および制限給餌条件下のラットに投与した。その結果, 絶食下では小葉中心性の肝細胞壊死が観察され, 制限給餌条件下では中心静脈周囲に単細胞性の肝細胞壊死が観察された。これらの変化は, CYP2E1 活性の増加に伴った NAPQI の生成量の増加と, 肝臓グル

タチオン量の低下に伴った NAPQI 排泄量の減少の結果であると考えられた。加えて、このような低用量の APAP 投与では肝細胞壊死の有無や程度に大きな個体差がみられることが明らかとなり、その原因として *Cyp2e1* 遺伝子の発現量（最大で 2 倍）や肝臓グルタチオン量（最大で 1.5 倍）の個体差の影響が考えられた。一方で、*Cyp2e1* 遺伝子の発現量や肝臓グルタチオン量は絶食下と制限給餌条件下でほとんど変わらなかったにもかかわらず、肝細胞壊死の程度は絶食下の方が悪かったことから、CYP2E1 やグルタチオン以外の要因が関与している可能性も考えられた。実際に、マウスやラットを 18～36 時間絶食させると、抗酸化酵素の活性が自由摂餌下よりも低下し、過酸化脂質が増加することが報告されているが[73, 74], 4～6 週間にわたって給餌量を自由摂餌下の 60～70%に制限したラットでは、スーパーオキシドディスムターゼ、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ等の抗酸化酵素の活性が自由摂餌下よりも増加し、脂質過酸化が抑制されることが報告されている[73, 75-77]。これらの報告から、摂餌条件間でみられた障害の程度の違いや個体差の原因として、薬物代謝以外の要因も関係している可能性が考えられた。

驚くべきことに、自由摂餌下 16:00 では、*Cyp2e1* 遺伝子の発現量やグルタチオン量が自由摂餌下 9:00 とほとんど変わらないにも関わらず、APAP 投与によって絶食下よりも多くの動物で小葉中心性の肝細胞壊死が観察され、肝障害マーカーである ALT および AST が高値を示した。その理由の 1 つとして、APAP 投与後の摂餌の影響が考えられた。グルタチオンの生合成量はシステインあるいはその前駆物質であるメチオニンの供給量に依存し、ラットにおいて APAP 投与に伴って低下したグルタチオン量を *N*-アセチルシステインが回復させ[78], 40 時間絶食後に様々な濃度のシステインを含む餌を与えたラットでは、システイン量依存的にグルタチオン量が増加することが報告されている[70]。また、APAP 投与後のメチオニン経口投与が肝障害を抑制するとの報告もある[79]。一方、マウスにおいて、グルタチオンが十分に残っているにもかかわらず NAPQI のシステイン付加体が検出された [80]。このことは NAPQI がグルタチオン存在下でも非特異的に細胞内のチオールと結合する可能性を示唆しており、餌由来のシステインやメチオニンが肝臓に移行し、直接 NAPQI と結合して肝障害を抑制した可能性もあると考えられた。

薬物代謝酵素が摂餌条件の影響を受けることが明らかであったため、APAP と同じく毒性発現に CYP2E1 が関わる四塩化炭素誘発性の肝障害について、自由摂餌下と絶食下で障害の程度を比較した。その結果、絶食下では自由摂餌下よりも広い範囲で肝細胞壊死が認められ、既知の報告と一致した[47, 71]。これらの報告でも、絶食により *Cyp2e1* 遺伝子の発現量の増加や CYP2E1 活性の増加が示されてい

ることから、絶食による四塩化炭素の肝毒性の増強は、CYP2E1 の誘導が反映されたものと考えられた。

実験 2

EEBGP を APAP の投与に先立って 7 日間投与することにより、APAP による肝細胞壊死の範囲が軽減することが確認された。APAP が肝細胞壊死を誘導するメカニズムから、EEBGP が、(i) 活性酸素種の消去、(ii) 炎症反応の調整、(iii) APAP および NAPQI の代謝制御および排泄促進に影響している可能性が考えられた。

EEBGP は、RAW294.6 細胞において抗酸化酵素の mRNA 量およびタンパク量を増加させ、活性酸素種の産生を低下させることが報告されている[11]。しかしながら、本実験では、抗酸化酵素遺伝子の発現量には変化がみられず、抗酸化酵素の誘導によって活性酸素種を消去する可能性は低いと考えられた。一方、本実験では、肝臓において炎症反応を促進する *Il1b*, *Il6*, *Cxcl2* といった炎症性サイトカインやケモカイン遺伝子の発現量が EEBGP 投与により低下した。加えて、これらの遺伝子の発現量、特に *Il1b* 遺伝子と肝細胞壊死の範囲に相関がみられたことから、EEBGP 投与は炎症反応を促進する遺伝子の発現上昇を抑え、炎症反応を調整した可能性が考えられた。抗 IL-1 抗体や IL-1 受容体欠損マウスを用いた報告から、APAP による肝障害の進展には IL-1 α および IL-1 β の活性化が密接に関わり[81, 82]、肝障害を起こしたマウスにおいて、IL-1 β の抑制はその他のサイトカイン産生を抑制し、炎症反応に伴う組織障害の軽減に重要な役割をもつことが指摘されている[83]。一方、肝組織の傷害の伴い炎症反応が生じると、炎症性サイトカインとともに、炎症反応を負にフィードバック制御する抗炎症性サイトカインが誘導される[64, 65]。マウスへの APAP 投与でも代表的な抗炎症性サイトカインである *Il10* 遺伝子の発現量が増加することが報告されている[86, 87]。Kannno らは APAP による肝障害に伴って血中の *Il10* 遺伝子の mRNA が増加することを報告しており[87]、EEBGP 投与群でみられた *Il10* 遺伝子の発現量の低下は、EEBGP が直接 *Il10* 遺伝子の発現に影響したというよりも肝細胞壊死の軽減に伴った変化である可能性が考えられた。実際に、本実験では、*Il10* 遺伝子の発現量と肝細胞壊死の範囲に相関がみられた。

本試験では、抗酸化酵素遺伝子には変化がみられず、サイトカイン及びケモカイン遺伝子の変化のみが確認され、これにはサンプリングのタイムポイントが関係しているかもしれないと考えられた。マウスに APAP 投与すると 1 時間以内にグルタチオンが枯渇し[88, 89]、その後すぐに活性酸素種が産生されるため[89-91]、抗酸化酵素の誘導は投与 24 時間後よりも早いタイミングで起こっている可能性がある。一

方で、好中球等の炎症性細胞の浸潤は投与 24 時間後でも継続していることが報告されている[91]。

BGP とは起源植物や含有成分が異なる、ポプラタイププロポリスのエタノール抽出物をマウスやラットに 7 日間連続して経口投与すると、CYP2E1 活性が低下し、APAP や NAPQI の排泄に関わる Sulfotransferase 活性および Glutathione-*S*-transferase 活性が増加することが報告され[14]、ポプラ系プロポリスの特徴成分である CAPE を 3 日間連続して経口投与することにより CYP2E1 タンパク量および CYP2E1 活性が低下することが報告されている[92]。本実験で用いた EEBGP は CYP2E1 活性に対する報告のあった CAPE を含んでいないが[11, 59]、EEBGP が薬物代謝酵素に影響した可能性は完全には否定できなかった。

実験 3

EEBGP を四塩化炭素の投与に先立って 7 日間投与したが、四塩化炭素による肝細胞壊死の範囲や脂肪変性の程度は Control 群と変わらなかった。四塩化炭素による肝障害は、 $\cdot\text{CCl}_3$ や $\cdot\text{OCCl}_3$ のようなラジカルによる脂質過酸化を原因とするため[44, 45]、ビタミン E [52]や *N*-アセチルシステイン[53]等の直接ラジカルを消去する物質での保護効果が報告されている。先行研究では、EEBGP やアルテピリン C が、活性酸素種[58]や 2, 2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル (DPPH) ラジカル[59, 93]を非酵素的に直接消去することが報告されている。我々は、ラットへの 500mg/kg 体重の EEBGP の単回強制経口投与により、EEBGP 中の主要成分である *p*-クマル酸、ドルパニンおよびアルテピリン C の血中濃度は投与後 10~20 分でそれぞれ最高血中濃度に達し、投与 1 時間後には *p*-クマル酸はその 1/10 まで低下し、ドルパニンおよびアルテピリン C は血中からほとんど消失することを確認しており (Data not shown) , 混餌投与では、肝組織中の濃度が肝障害を抑制するのに十分な濃度まで上昇しなかった可能性が考えられた。四塩化炭素による肝障害は、クッパー細胞の欠損[56, 57]や TNF- α の阻害[94]により減弱する一方で、IL-1 のシグナル伝達を阻害すると、四塩化炭素投与 24 時間後の肝細胞壊死にはほとんど影響せず、投与 3 日後において肝細胞壊死の範囲が低下することが報告されている[95]。また、四塩化炭素の投与により肝臓で過酸化ジアシルグリセロールが生じ、プロテインキナーゼ C を介して Nuclear factor- κ B (NF- κ B) を活性化し、肝細胞壊死を誘導することが報告されている[96]。これらの報告から、組織障害と炎症反応との関係は四塩化炭素と APAP では異なることが予想され、両者の間で EEBGP の作用が異なった一因である可能性が考えられた。

【小括】

ヒトにおいて、一般的な中毒量よりも少ない量にもかかわらず、APAP の摂取により肝障害を生じる場合があることが知られており、動物試験にて APAP の代謝に関わる薬物代謝酵素や肝臓グルタチオンの関与が示唆されている。実験 1 では、このような低用量の APAP 摂取時に生じる肝障害を模したモデルを作製する目的で、1 日の異なる時間における薬物代謝酵素の遺伝子発現量および肝臓グルタチオン量を確認し、加えて摂餌条件の影響を確認した。その結果、すでに報告のある絶食下に加えて、70%の制限給餌を 10 日間継続した条件下でも、自由摂餌下と比較して *Cyp2e1* 遺伝子の発現量が増加し、グルタチオン量が低下した。一方、自由摂餌下における 9:00 と 16:00 の比較では、*Cyp2e1* 遺伝子の発現量およびグルタチオン量に顕著な変化はみられなかった。各条件下において、通常的自由摂餌下の投与 (9:00 投与) では肝細胞壊死がみられない 800 mg/kg 体重の APAP を投与したところ、絶食下および制限給餌条件下で肝細胞壊死を生じ、これは CYP2E1 およびグルタチオンの変化に伴って APAP の代謝が変化したためと考えられた。一方、自由摂餌下 16:00 投与では、絶食下や制限給餌下よりも多くの動物で肝細胞壊死が観察され、*Cyp2e1* 遺伝子やグルタチオン量の変化よりも、APAP 投与後の摂餌の有無が肝細胞壊死の程度により大きく影響する可能性が考えられた。加えて、このような低用量の APAP 投与では肝細胞壊死の有無や程度に大きな個体差がみられることが明らかとなり、その原因として *Cyp2e1* 遺伝子の発現量や肝臓グルタチオン量の個体差の影響が考えられた。本実験で実施した各投与条件のうち、APAP の投与条件として最も強い障害がみられた自由摂餌下 16:00 投与を実験 2 に用いることとした。また、APAP とは異なる肝障害モデルとして、四塩化炭素を自由摂餌下および絶食下で投与したところ、絶食下でより強い障害が観察されたが、これは絶食により誘導された CYP2E1 に起因したものであると考えられた。

実験 2 で、APAP 誘発性肝障害に対する EEBGP の抑制効果を検討したところ、0.3% EEBGP を APAP 投与前に 7 日間、混餌投与することで肝細胞壊死の範囲が有意に低下した。保護効果のメカニズムを確認するため、抗酸化酵素遺伝子および炎症関連遺伝子の発現への影響を確認したところ、EEBGP の投与は抗酸化酵素遺伝子の発現にはほとんど影響を与えず、サイトカインやケモカインのような炎症関連因子の遺伝子発現を低下させた。また、*Il1b* 遺伝子や *Il10* 遺伝子の発現低下と肝細胞壊死の軽減には相関がみられたことから、EEBGP の肝障害抑制メカニズムの 1 つとして、炎症反応に影響している可能性が考えられた。

実験 3 で、四塩化炭素誘発性肝障害に対する EEBGP の抑制効果を検討したところ、1.2% EEBGP の 7 日間混餌投与は、肝細胞壊死および肝細胞の脂肪変性に影響しなかった。四塩化炭素による肝障害では、CYP2E1 代謝物であるラジカルの消去が重要であり、EEBGP がラジカル消去作用を有することが報告されているものの、今回の実験条件では障害を抑制するには不十分であった可能性が考えられた。

【図表】

表 2-1. プライマーリスト

Gene name	F or R	Sequence	Accession no.
<i>Ugt1a6</i>	F	5'-AACATGATCTTCATTGGAGGGAC-3'	NM_057105.3
	R	5'-CCATCGCTTTCTTCTCTGGAATC-3'	
<i>Sult1a1</i>	F	5'-CCACGGCTCCTTAAGACACA-3'	NM_031834.1
	R	5'-AGACAACCACATCCTTTGCATTT-3'	
<i>Cyp2e1</i>	F	5'-CTGAGACCACCAGCACAACT-3'	NM_031543.1
	R	5'-GCCCAATAACCCTGTCAATTTCT-3'	
<i>Gstm1</i>	F	5'-ATGATACTGGGATACTGGAACGT-3'	NM_017014.1
	R	5'-CACTGGCTTCTGTCATAGTCG-3'	
<i>Gapdh</i>	F	5'-GACATGCCGCCTGGAGAA-3'	NM_017008.4
	R	5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'	

F: Forward primer, R: Reverse primer

表 2-2. プライマーリスト

Gene name	F or R	Primer sequence	Accession No.
Antioxidative enzyme genes			
<i>Sod1</i>	F	CAGGATTAAGTGAAGGCGAGCAT	NM_017050.1
	R	GCTGGACCGCCATGTTTCTT	
<i>Sod2</i>	F	GCTGGCTTGGCTTCAATAAGG	NM_017051.2
	R	GTGCTCCCACACATCAATCC	
<i>Cat</i>	F	AGCCAGAAGAGAAACCCACAAA	NM_012520.2
	R	CCATTCATGTGCCGATGTCC	
<i>Gpx1</i>	F	CGGGACTACACCGAAATGAATG	NM_030826.4
	R	TCACCTCGCACTTCTCAAACAA	
<i>Gpx4</i>	F	GTGCATCGTCACCAACGTG	NM_017165.3
	R	CGGCTGCAAACCTCCTTGATT	
<i>Prdx1</i>	F	TCAGATCCCAAGCGCACCAT	NM_057114.1
	R	AGCGGCCAACAGGAAGATCA	
<i>Gsr</i>	F	GTGACCACGAGGAAGACGAAA	NM_053906.2
	R	CATCTCATCGCAGCCAATCC	
Inflammatory-related genes			
Cytokines			
<i>Il1b</i>	F	TGAGGACCCAAGCACCTTCT	NM_031512.2
	R	TGGGAACATCACACACTAGCA	
<i>Il6</i>	F	GTCAACTCCATCTGCCCTTCA	NM_012589.2
	R	TGTCAACAACATCAGTCCCAAGA	
<i>Il10</i>	F	AGTGGAGCAGGTGAAGAATGA	NM_012854.2
	R	CAGTAGATGCCGGGTGGTT	
<i>Il23a</i>	F	CCAGCTTCATACCTCCCTACT	NM_130410.2
	R	AGGATCTTGGAACGGAGAAGA	
<i>Tnf</i>	F	GGTTCCGTCCCTCTCATAAC	NM_012675.3
	R	TCCACATCTCGGATCATGCTTT	
Chemokines			
<i>Ccl2</i>	F	CTCTCTTCCTCCACCACTATGC	NM_031530.1
	R	GTAGTTCTCCAGCCGACTCATT	
<i>Ccl3</i>	F	ACAAGCGCACCTCTGTT	NM_013025.2
	R	GAATTTGCCGTCCATAGGAGAA	
<i>Cxcl2</i>	F	GCGCCCAGACAGAAGTCATA	NM_053647.1
	R	CGAGGCACATCAGGTACGAT	
Production of inflammatory mediators			
<i>Nos2</i>	F	TCAGGCTTGGGTCTTGTTAGC	NM_012611.3
	R	ATGTCTGTGACTTTGTGCTTCTG	

F: Forward primer, R: Reverse primer

表 2-3. 異なる摂餌条件下におけるアセトアミノフェン投与 (800 mg/kg 体重) 24 時間後の病理組織学検査の結果, 血中 ALT 値および AST 値

Feeding condition	Administered time	Hepatocellular necrosis		Inflammatory cell infiltration	ALT (U/L)	AST (U/L)
		Centrilobular	Single cell			
Ad libitum feeding	9:00	-	-	-	41	84
		-	-	-	53	77
		-	-	-	59	93
	16:00	+	-	+	192	973
		-	+	+	51	130
		+	-	+	83	261
		+	-	+	393	2896
		+	-	+	722	5080
	16 hours fasting	+	-	+	92	283
		+	-	+	82	380
		-	+	+	49	115
		-	+	+	53	125
		-	-	-	40	79
Restricted feeding	16:00	-	+	+	51	100
		-	-	-	37	61
		-	+	+	48	83
		-	+	+	59	102
		-	-	-	39	59

+ : 肝細胞壊死あるいは炎症性細胞浸潤あり, - : 肝細胞壊死あるいは炎症性細胞浸潤なし

自由摂餌下の平均値±標準偏差 ALT: 51.0±9.2 U/L, AST: 84.7±8.0 U/L

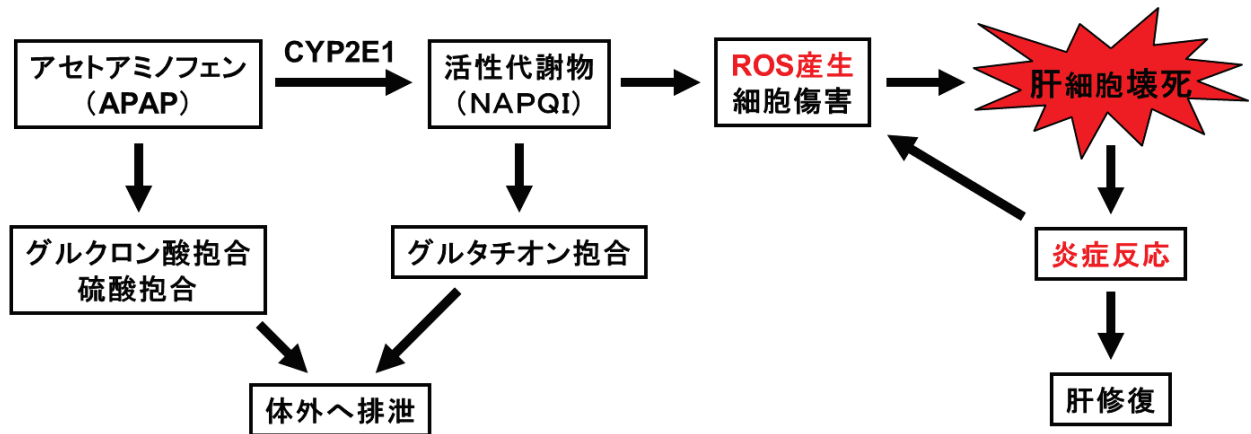


図 2-1. APAP の毒性発現メカニズム

APAP の大部分はグルクロン酸抱合および硫酸抱合を受けて尿中へ排泄されるが、一部は CYP2E1 により NAPQI に代謝され、速やかにグルタチオン抱合を受けて尿中へと排泄される。しかしながら、一度に大量の APAP を摂取すると、排泄されなかった NAPQI が細胞機能を障害し、産生した活性酸素種（ROS）によって肝細胞が壊死する。壊死した細胞は、炎症性細胞により除去されるが、過剰な炎症反応は正常な肝細胞まで破壊し、肝細胞壊死の範囲を拡大させる。

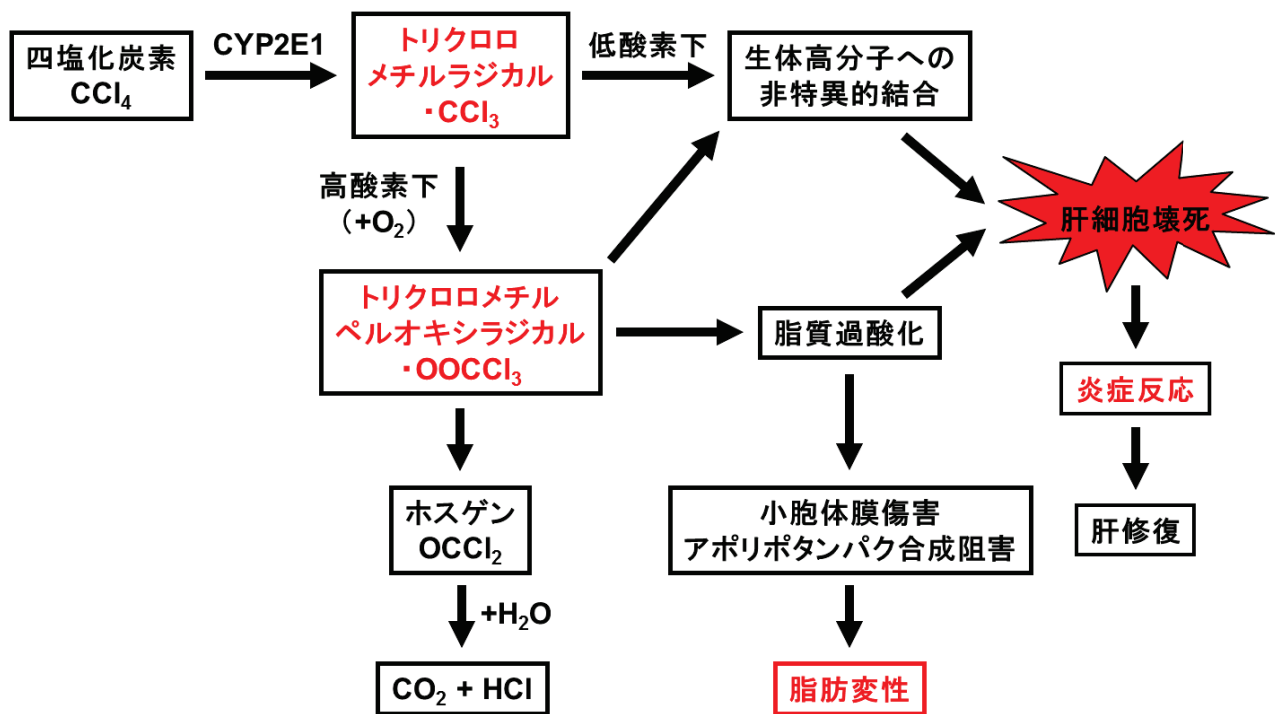


図 2-2. 四塩化炭素の毒性発現メカニズム

四塩化炭素が CYP2E1 によって代謝されることで、 $\cdot\text{CCl}_3$ や $\cdot\text{OOCCL}_3$ などのラジカルが生じる。これらのラジカルがタンパクや脂質等の生体高分子を酸化的に傷害し、肝細胞を壊死させる。また、アポリポタンパク質の合成が阻害されることで、トリグリセリドの輸送が滞り、肝臓中に脂肪滴が蓄積する。ラジカルの一部はホスゲン (OCCl_2) を経て、二酸化炭素 (CO_2) と塩酸 (HCl) に分解される。

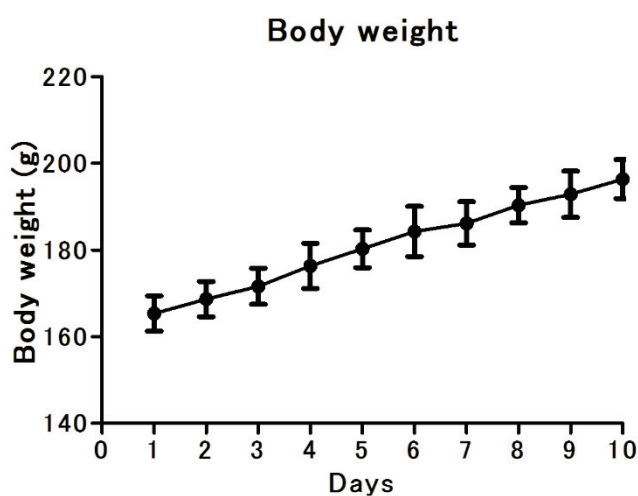


図 2-3. 制限給餌下における体重推移

制限給餌下（自由摂餌下の 70%; 14 g/日）であっても体重の低下はみられなかった。

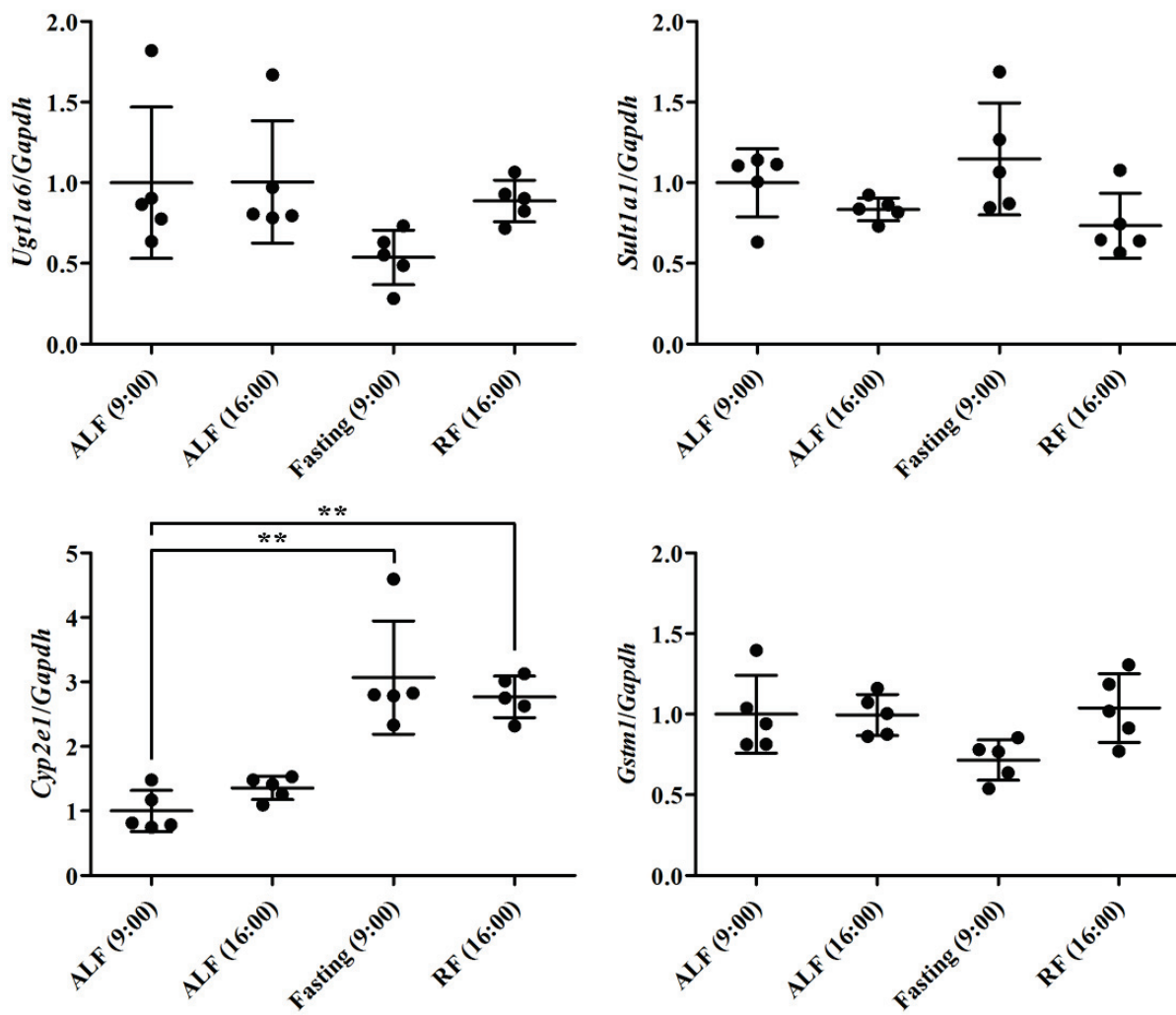


図 2-4. 異なる摂餌条件下における UDP-glucuronosyltransferase 1A6 (*Ugt1a6*), sulfotransferase 1A1 (*Sult1a1*), cytochrome P450 2E1 (*Cyp2e1*)および glutathione-*S*-transferase M1 (*Gstm1*) 遺伝子の mRNA 量

各遺伝子の発現量は *Gapdh* に対する相対値とした。各点は各個体の遺伝子発現量を示し、横棒は各群の平均（中央）および標準偏差（上下）を、括弧は採材時間を示す。各遺伝子の発現量は *Gapdh* の発現量で補正した。ALF: 自由摂餌下, Fasting: 16 時間絶食下, RF: 制限給餌下（自由摂餌の 70%）。 **: $p < 0.01$ vs ALF 群 (9:00) (Steel の多重比較検定)。

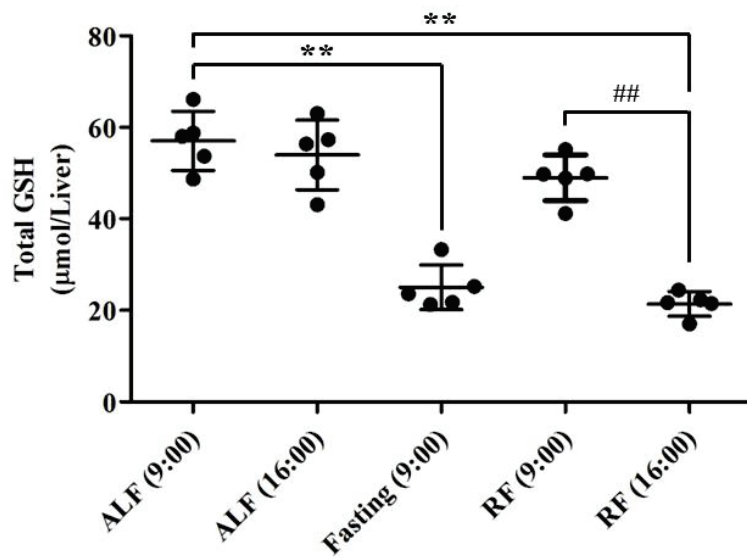


図 2-5. 異なる摂餌条件下における肝臓グルタチオン量

各点は各個体のグルタチオン量を示し、横棒は各群の平均（中央）および標準偏差（上下）を、括弧は採材時間を示す。ALF: 自由摂餌下, Fasting: 16 時間絶食下, RF: 制限給餌下（自由摂餌の 70%）。**: $p < 0.01$ vs ALF 群 (9:00) (Dunnett の多重比較検定)。#: $p < 0.01$ vs RF 群 (9:00) (Student の t 検定)。

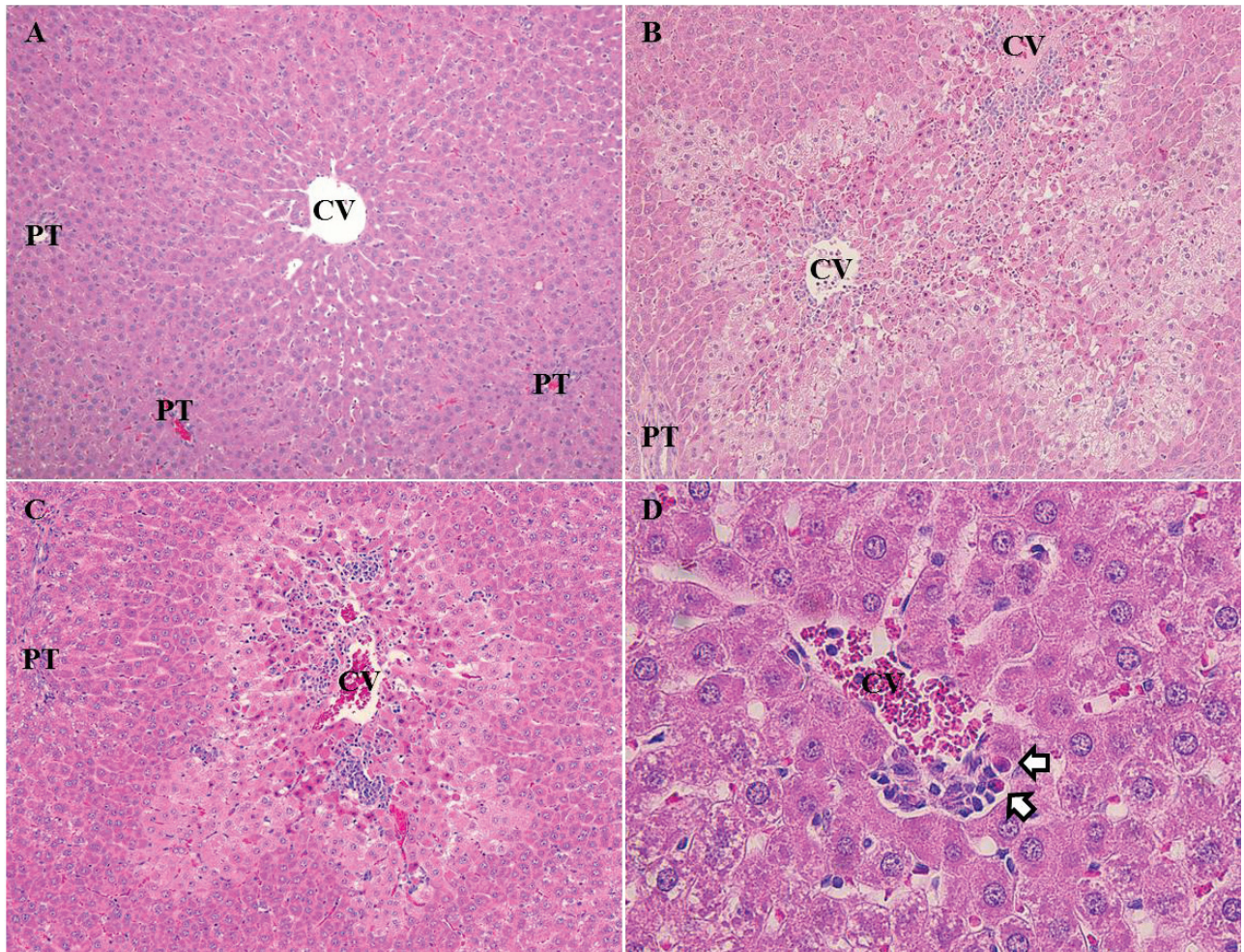


図 2-6. 異なる摂餌条件下における APAP 投与（800 mg/kg 体重）24 時間後の肝組織像

（A）自由摂餌下 9:00 投与：肝組織に明らかな変化はみられない。（B）自由摂餌下 16:00 投与：炎症性細胞浸潤を伴った小葉中心性の肝細胞壊死が観察された。（C）16 時間絶食下 9:00 投与：炎症性細胞浸潤を伴った小葉中心性の肝細胞壊死が観察された。（D）制限給餌条件下 16:00 投与：中心静脈周囲に炎症性細胞浸潤を伴った単細胞性の肝細胞壊死が観察された。矢印は単細胞性の肝細胞壊死を示す。CV: central vein. PT: Portal triad. H.E.染色（A, B, C: $\times 100$, D: $\times 400$ ）。

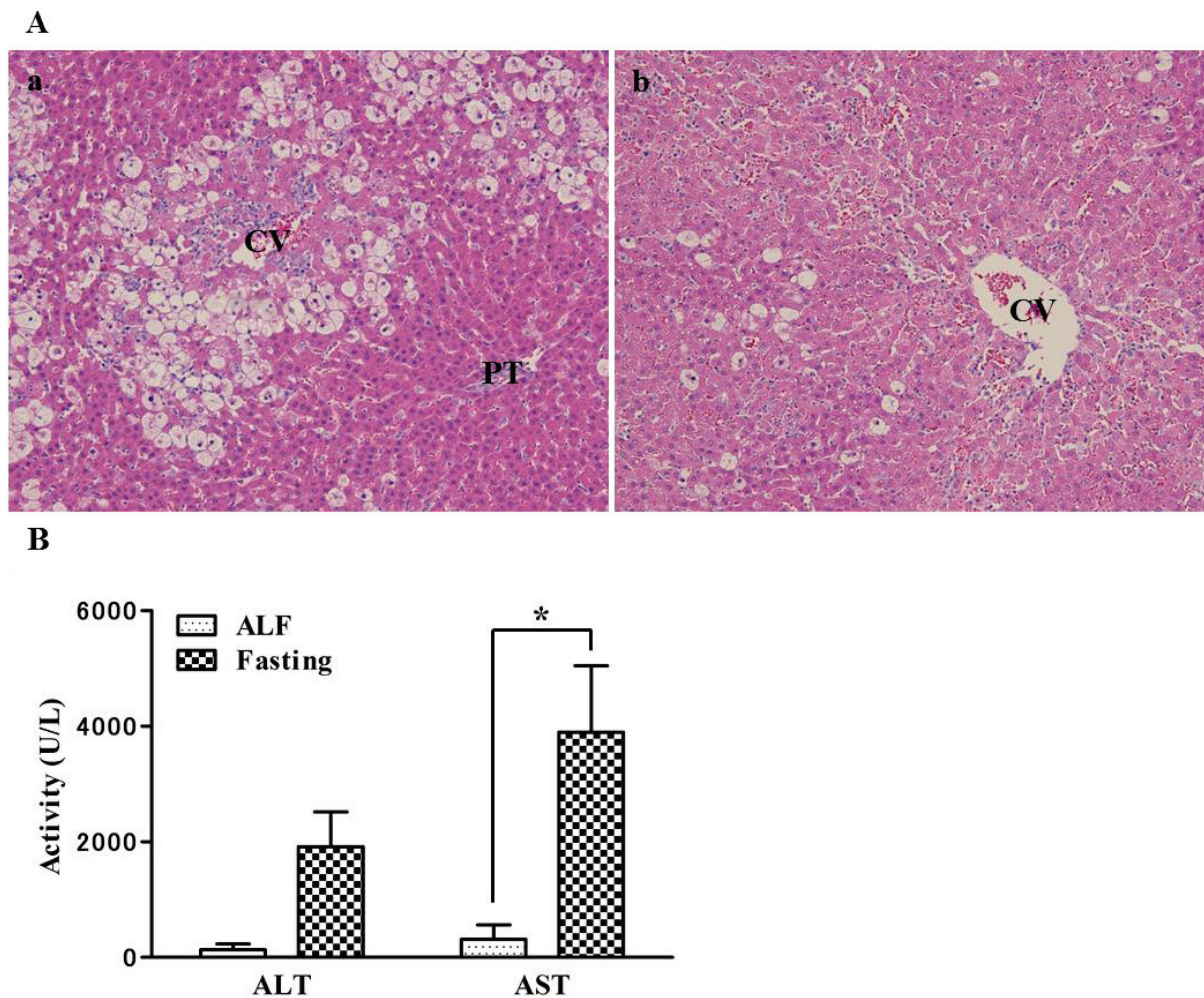


図 2-7. 異なる摂餌条件下における四塩化炭素投与（800 mg/kg 体重）24 時間後の肝組織像

(A) a: 自由摂餌下 10:00 投与: 炎症性細胞浸潤を伴った小葉中心性の肝細胞壊死と、中間域で脂肪変性が観察された。b: 16 時間絶食下 10:00 投与: 小葉中心域から中間域にかけて炎症性細胞浸潤を伴った肝細胞壊死と、中間域で脂肪変性が観察された。CV: central vein. PT: Portal triad. H.E.染色 (×100)。(B) 自由摂餌下および 16 時間絶食下における ALT 値および AST 値。縦棒は各群の平均および標準偏差を示す。ALF: 自由摂餌下, Fasting: 16 時間絶食下。* $p < 0.05$ vs ALF 群 (Welch の t 検定)。

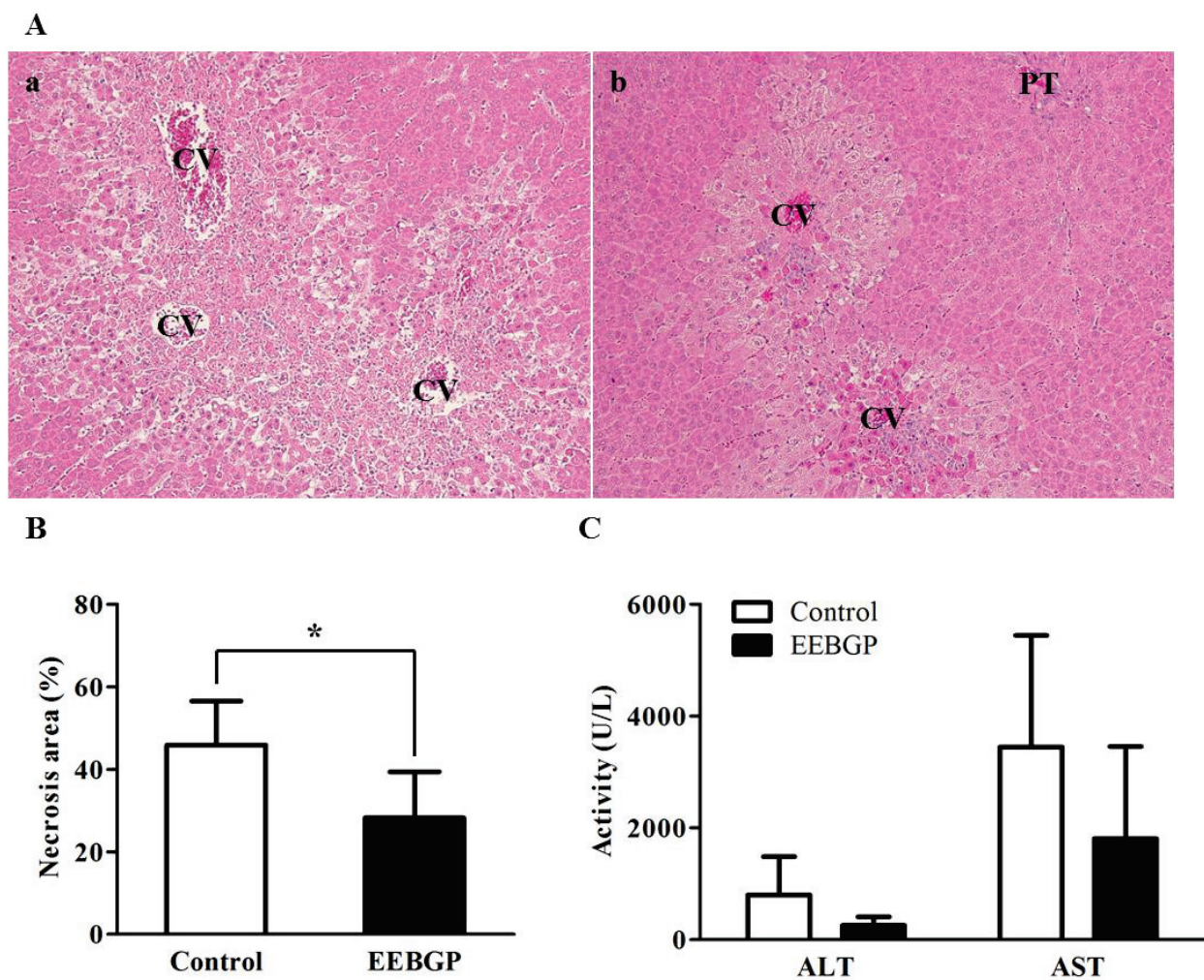


図 2-8. 肝細胞壊死に対する EEBGP 投与の影響

(A) APAP (800 mg/kg 体重) 投与 24 時間後の肝組織像。a: Control 群, b: EEBGP 群。CV: central vein. PT: Portal triad. H.E.染色 (×100)。(B) Control 群および EEBGP 群における肝細胞壊死の範囲。縦棒は各群の平均および標準偏差を示す。* $p < 0.05$ vs control 群 (Student の t 検定)。(C) Control 群および EEBGP 群における ALT 値および AST 値。縦棒は各群の平均および標準偏差を示す。

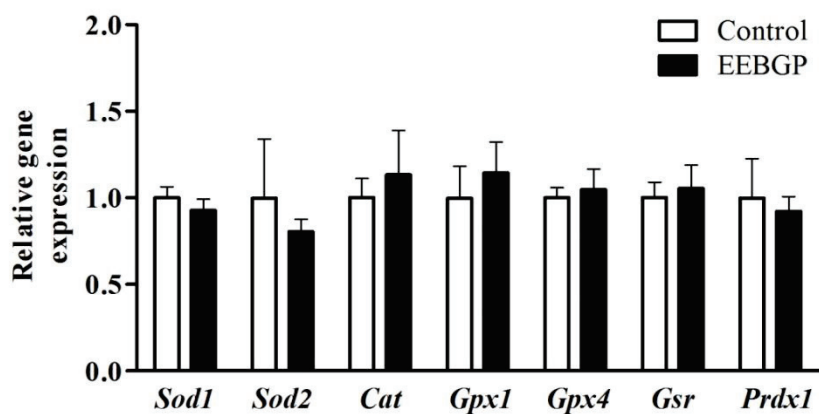


図 2-9. 肝臓における抗酸化酵素遺伝子の発現量

縦棒は各群の平均および標準偏差を示す。各遺伝子の発現量は *Gapdh* の発現量で補正した。

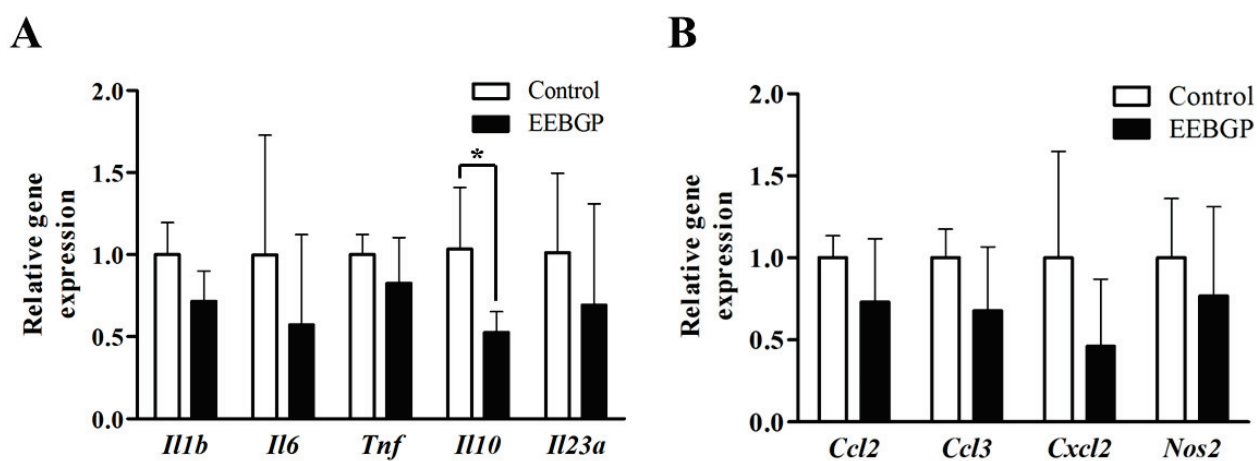


図 2-10. 肝臓における炎症関連遺伝子の発現量

A: サイトカイン, B: ケモカインおよび一酸化窒素合成酵素。縦棒は各群の平均および標準偏差を示す。各遺伝子の発現量は *Gapdh* の発現量で補正した。*: $p < 0.05$ vs Control 群 (Student の t 検定)。

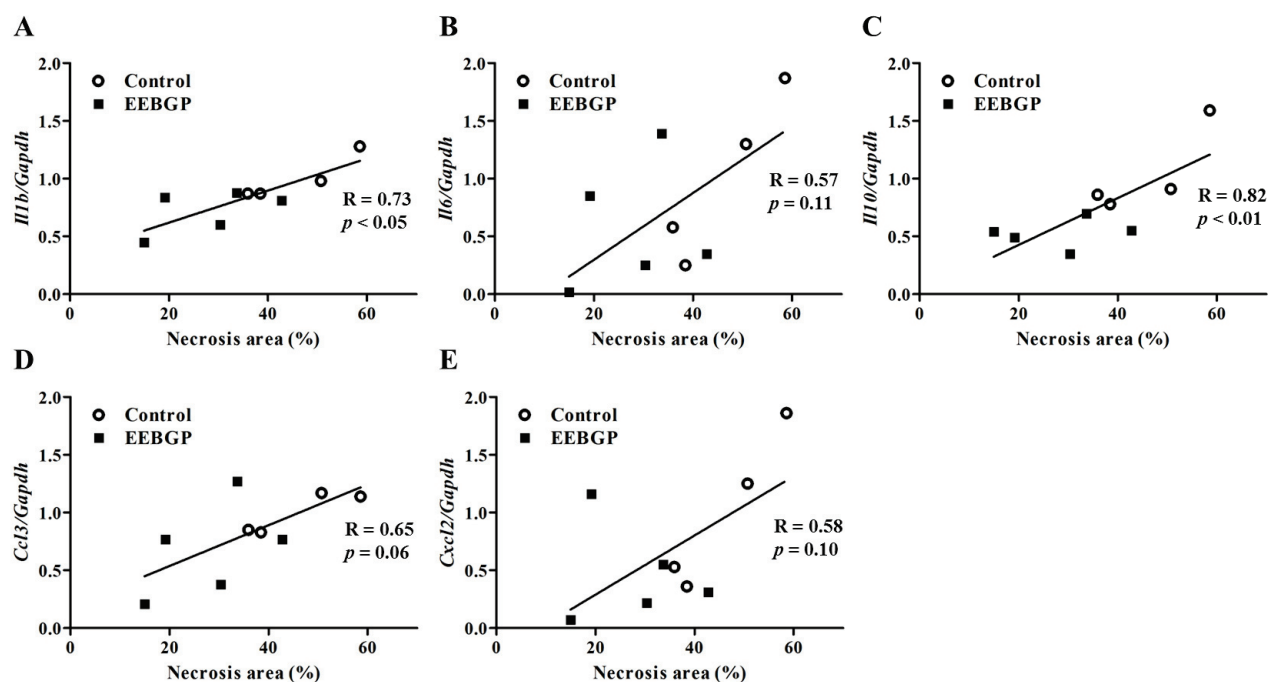


図 2-11. 肝細胞壊死の範囲と肝臓における炎症関連遺伝子の発現量の関係

縦軸に各遺伝子の発現量を、横軸に肝細胞壊死の範囲を示す。(A) *Il1b* 遺伝子、(B) *Il6* 遺伝子、(C) *Il10* 遺伝子、(D) *Ccl3* 遺伝子、(E) *Cxcl2* 遺伝子。各遺伝子の発現量は *Gapdh* の発現量で補正した。R 値（相関係数）および p 値（相関の有意性）は Spearman の順位相関係数を用いて算出した。

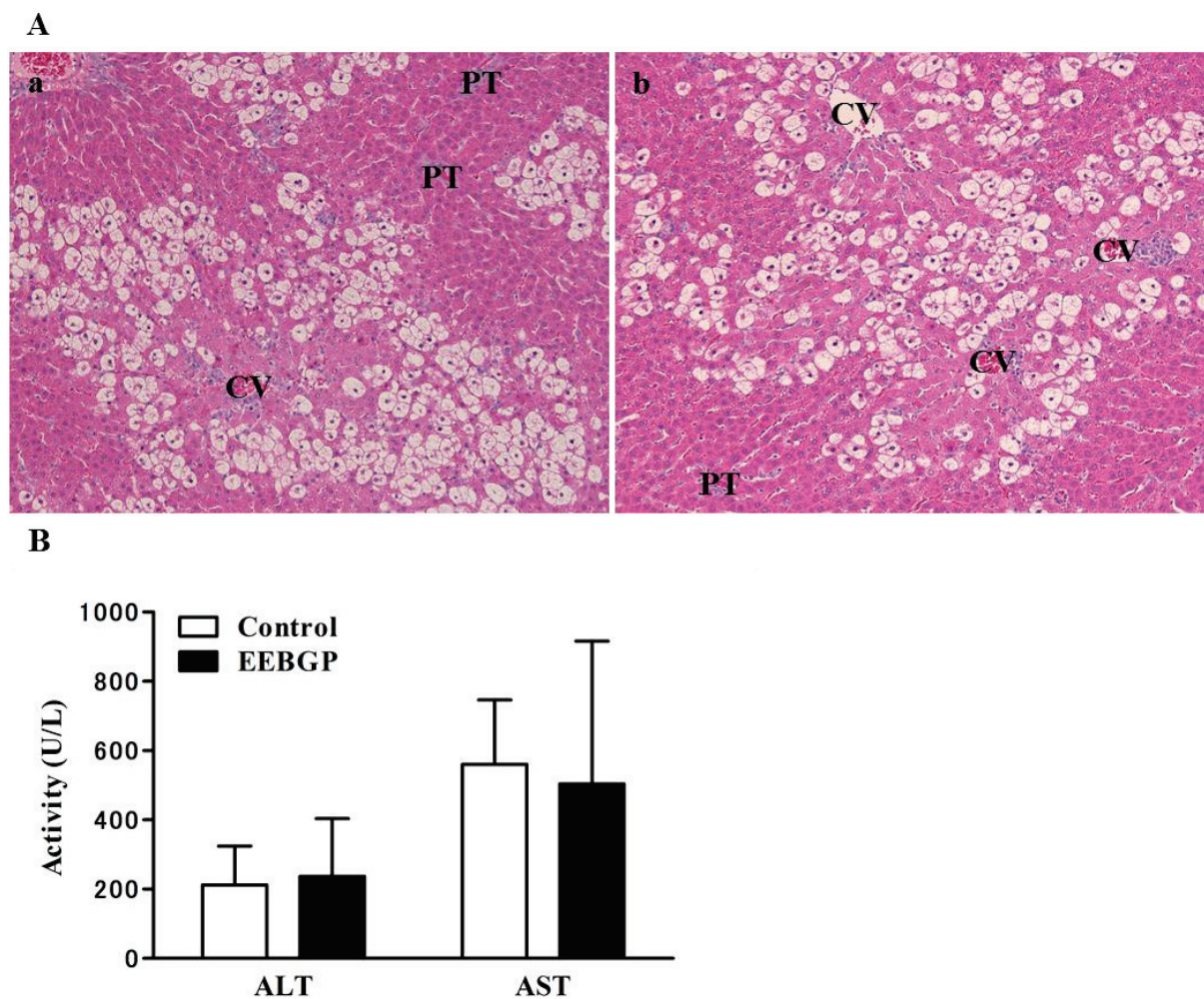


図 2-12. 四塩化炭素による肝細胞壊死に対する EEBGP 投与の影響

(A) 四塩化炭素 (800 mg/kg 体重) 投与 24 時間後の肝組織像。a: Control 群, b: EEBGP 群。CV: central vein. PT: Portal triad. H.E.染色 (×100)。(B) Control 群および EEBGP 群における ALT 値および AST 値。縦棒は各群の平均および標準偏差を示す。

第 2 章

EEBGP の AA アミロイド症モデルに対する防御効果の検討

【諸言】

アミロイド A (AA) アミロイド症は、関節リウマチやクローン病などの慢性炎症疾患に伴って肝臓にて産生される炎症性タンパク質の 1 つ、血清アミロイド A (SAA) タンパクが変性して重合し形成されるアミロイド A 繊維が、脾臓、肝臓、腎臓、腸管等の全身臓器や関節に沈着して腎不全や消化管機能障害を発症し、重度の場合には死に至る疾患である[97, 98]。AA アミロイド症の発症には、炎症刺激による持続的な前駆タンパクの生成と、それに続くアミロイド A の変性が鍵となる[98] (図 3-1)。抗 IL-6 受容体抗体の投与により慢性炎症患者で増加した血中 SAA 量を正常値まで戻すことが知られているが[99], SAA の変性や重合の原因は明らかになってはおらず, AA アミロイド症に対する治療法は確立されていない[100, 101]。マウスを用いた実験では、アミロイド β (A β) の沈着をビタミン E [102]や α -リポ酸[103], クルクミン[104, 105]等の抗酸化物質が抑制し, *in vitro*においてクルクミンが A β 線維の形成を抑制することが報告されている[106]。また、家族性アミロイドポリニューロパチーでもトランスサイレチン沈着が抗酸化物質により抑制され[107], 脾臓アミロイド沈着症の病態進行に酸化ストレスが関わることを報告されている[108]。AA アミロイド症患者でも臓器中の過酸化脂質の増加が報告されているが[109], 酸化ストレスと AA アミロイド症の病態との関係や AA アミロイド症における抗酸化物質の摂取がアミロイド繊維の形成に与える影響については明らかになっていない。

先行研究では、マウスにおいて、ポプラ系プロポリスに含まれるピノセンプリンが A β 繊維の形成と神経の変性を抑制することが報告されている[110]。また、EEBGP[111]や BGP に含まれる 3, 4, 5-トリ-*O*-カフェオイルキナ酸[112]が, *in vitro*にて神経細胞を A β による毒性から保護することが報告されている。

本章では、炎症状態でアミロイド A 線維を投与することにより肝臓や脾臓にアミロイド線維が沈着することが報告されている[113, 114]マウス AA アミロイド症モデルを用いて、EEBGP の混餌投与による保護効果を検討するとともに、抗酸化酵素および炎症関連遺伝子との関係について確認した。

【材料と方法】

・被験物質

被験物質には、EEBGP を用いた。EEBGP をデキストリン粉末と 2:3 の割合で混合して乾燥させ、CRF-1 (Charles river laboratories, 東京, 日本) に 0.02%, 0.1%および 0.5%混合させた。

・動物

実験には、7 週齢、雄の C57BL/6J マウスを用い、コンベンショナルな環境下（室温 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、明暗各 12 時間（明期：8:00～20:00）にコントロールした動物室）で約 1 週間馴化させた後、試験に使用した。ボトルに入れた水道水と粉末飼料（CRF-1; Charles river laboratories）を自由摂取させた。全ての動物試験は、東京農工大学内の動物倫理規定に従って実施した（承認番号：#27-96）。

・実験デザイン

マウスを 4 群にグループ分けし、それぞれプロポリスを 0%（Control 群）、0.02%、0.1%および 0.5%の用量で 17 日間、混餌投与した。投与開始後 7 日目に、炎症刺激として 2.0%硝酸銀水溶液 0.5mL を皮下投与し、同時に AEF を 0.3mL 腹腔内投与した。AEF には AA アミロイド症罹患マウスの脾臓 20 倍混濁液を用いた。ELISA による SAA 値測定のため、炎症刺激 3 日後に眼底採血した。炎症刺激後 10 日にジエチルエーテル麻酔下で心臓から全採血した後、剖検した。本モデルにおいて、アミロイド沈着が報告されている脾臓および肝臓を採材し、メタカーン液で固定し、H.E.染色および免疫組織化学を行った。肝臓の一部は液体窒素で凍結し、抗酸化酵素および炎症関連因子の遺伝子発現量を測定した。

・免疫組織化学

脾臓および肝臓において抗マウス SAA ヤギ抗体（1 : 160; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA）を用いて免疫組織化学を行った。アミロイド沈着量は、Image J を用いて、顕微鏡（ $\times 50$ 倍）下でランダムに 3 枚取得した画像から組織面積における染色陽性部位の割合を測定した。

・血中 SAA の測定

炎症反応 3 日後および 10 日後の血液により得られた血清から、マウス SAA 測定 ELISA キット（Tridelta Development Limited, Maynooth, County Kildare, Ireland）を用いて測定した。

・定量 PCR

Control 群および EEBGP 群より得られた肝臓約 50 mg に RNeasy Mini Kit（Qiagen, Venlo Netherlands）を加えてホモジナイズ（12, 000 rpm）した。抽出した Total RNA から、PrimeScript RT

Master Mix (タカラバイオ(株), 滋賀, 日本) を用い, LifeECO Thermal Cycler (Hangzhou Bioer Co., Ltd, Hangzhou, China) にて cDNA を合成した (37°C, 15 分→85°C, 5 秒)。SYBR Premix Ex Taq II (タカラバイオ(株)) を用いて, 合成した cDNA をテンプレートとし, Thermal Cycler Dice Real Time System II (タカラバイオ(株)) にて定量 PCR (95°C, 5 秒→60°C, 30 秒を 40 サイクル) を実施した。プライマーリストは下表 3-1 の通り。Reference gene には β -actin (Actb) 遺伝子を用いて, 個体ごとの遺伝子発現量は Actb 遺伝子の相対量として算出した。

・統計解析

脾臓のアミロイド沈着量, 肝臓のアミロイド沈着量, 血中 SAA 量および各遺伝子発現量は, Bartlett の検定にて各群における分散を比較した後, Dunnett の多重比較検定を用いて Control 群と各濃度の EEBCP 群で比較した。脾臓あるいは肝臓のアミロイド沈着量と炎症刺激 3 日後あるいは 10 日後の血中 SAA 量, または脾臓あるいは肝臓のアミロイド沈着量と肝臓における各遺伝子の発現量について, Spearman の順位相関係数を用いて相関の有無を確認した。統計処理にはエクセル統計 2012 を用い, 有意水準は $p < 0.05$ とした。

【結果】

・脾臓および肝臓のアミロイド沈着に対する EEBCP 投与の影響

H.E.染色および抗マウス SAA 抗体を用いた免疫組織化学の結果, Control 群および各濃度の EEBCP 投与群において脾臓では濾胞周囲に (図 3-2A および 3-2B), 肝臓のディッセ腔にアミロイド沈着が認められた (図 3-3A および 3-3B)。アミロイド沈着量を定量した結果, 脾臓では有意な差ではなかったものの, 0.5% EEBCP 群で Control 群の 56.7%に低下し (図 3-2C), 肝臓では全ての EEBCP 群においてアミロイド沈着量が有意に低下した ($p < 0.05$, 図 3-3C)。

・血中 SAA 量

Control 群および各濃度の EEBCP 投与群で炎症刺激 3 日後および 10 日後の血中 SAA 測定値の有意な差は認められなかった (図 3-4)。血中 SAA 量と脾臓および肝臓におけるアミロイド沈着量との相関を確認したところ, Control 群では炎症刺激 10 日後の血中 SAA 量と肝臓におけるアミロイド沈着量 ($R =$

0.90, $p < 0.05$) に有意な相関がみられ、炎症刺激 3 日後の血中 SAA 量と肝臓 ($R = 0.60$) および脾臓におけるアミロイド沈着量 ($R = 0.66$)、炎症刺激 10 日後の血中 SAA 量と脾臓におけるアミロイド沈着量 ($R = 0.57$) に相関傾向がみられた (図 3-5)。一方, EEBGP 群では、炎症刺激 3 日後の血中 SAA 量と肝臓 ($R = 0.44$) および脾臓におけるアミロイド沈着量 ($R = 0.42$)、炎症刺激 10 日後の血中 SAA 量と肝臓 ($R = 0.23$) および脾臓におけるアミロイド沈着量 ($R = 0.21$) と、いずれの場合も相関性が低下した (図 3-5)。

・抗酸化酵素遺伝子および炎症関連遺伝子の発現量

肝臓において、抗酸化酵素である *Cat* 遺伝子の mRNA 量が全ての EEBGP 群で有意に増加し ($p < 0.05$)、*Prdx1* 遺伝子の mRNA 量が 0.02% および 0.5% EEBGP 群で有意に増加し ($p < 0.05$)、*Sod1*, *Sod2*, *Gpx1* 遺伝子の mRNA 量が 0.5% EEBGP 群で有意に増加した ($p < 0.05$)。一方, *Gsr* 遺伝子の mRNA 量には有意な変化は見られなかった (図 3-6)。炎症関連遺伝子では、*Ccl2* 遺伝子の mRNA 量が 0.1% および 0.5% EEBGP 群で有意に低下し ($p < 0.05$)、有意な差ではなかったものの、0.5% EEBGP 群で *Il6* および *Il1b* 遺伝子の mRNA 量はそれぞれ Control 群の 49.2% および 61.0% であった (図 3-7)。

肝臓における各遺伝子の発現量とアミロイド沈着量との相関を確認したところ、*Sod2* 遺伝子 ($R = -0.52$, $p < 0.01$)、*Cat* 遺伝子 ($R = -0.62$, $p < 0.01$)、*Gpx1* 遺伝子 ($R = -0.73$, $p < 0.01$)、*Prdx1* 遺伝子 ($R = -0.67$, $p < 0.01$) で有意な負の相関が、*Ccl2* 遺伝子 ($R = 0.70$, $p < 0.05$) で有意な正の相関がみられた (図 3-8)。その他の遺伝子では明らかな相関はみられなかった。

【考察】

硝酸銀の皮下投与により炎症反応を惹起したマウス AA アミロイド症モデルにおいて、炎症反応を惹起する前後 17 日間の EEBGP の混餌投与により、脾臓および肝臓におけるアミロイド沈着量の減少がみられた。また、EEBGP 投与により抗酸化酵素遺伝子の発現が有意に増加し、炎症関連遺伝子では *Ccl2* 遺伝子の発現が有意に低下し、*Il1b* 遺伝子および *Il6* 遺伝子の発現の低下傾向がみられた。組織に沈着するアミロイド線維の原因物質である SAA タンパクは肝細胞にて IL-6 刺激により生産されることが知られており [115]、本研究でも Control 群における血中 SAA 量と肝臓や脾臓におけるアミロイド沈着量との相関

が認められた。しかしながら、EEBGP の摂取による血中 SAA 値の変化は認められず、血中 SAA 量とアミロイド沈着量との相関も低かったことから、EEBGP は SAA 産生の抑制ではなく、SAA の変性を抑制することによってアミロイド沈着量を低下させた可能性が考えられた。

本実験では、EEBGP の投与により肝臓の抗酸化酵素遺伝子の発現増加がみられ、肝臓のアミロイド沈着量との間に負の相関がみられた。EEBGP は、RAW264.7 細胞において Heme oxygenase-1 (*Hmox1*) , Glutamine-cysteine ligase catalytic subunit (*Gclc*) , Glutamine-cysteine ligase modifier subunit および thioredoxin reductase-1 等の抗酸化酵素遺伝子の発現を増加させ、活性酸素種の産生を抑制するとともに、転写促進因子 NRF2 の転写活性を高めることが報告されている[11]。これら *Hmox1* 遺伝子や *Gclc* 遺伝子に加え、本研究にて遺伝子発現の増加がみられた *Sod1* 遺伝子、*Cat* 遺伝子、*Gpx1* 遺伝子等の抗酸化酵素の遺伝子発現は、NRF2 に制御されており、NRF2 の活性化によって生体の抗酸化能が高まることが知られている[116]。また、*Sod1* 遺伝子や *Cat* 遺伝子、*Gpx1* 遺伝子は転写促進因子 Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α によっても転写制御されるが、EEBGP の 8 週間の混餌投与により肝臓中 PPAR α タンパク量が有意に増加したことが報告されている[117]。以上のことから、EEBGP 投与が抗酸化酵素の遺伝子発現に影響を与えることで、肝臓における酸化ストレスが低減し、アミロイド沈着が抑制された可能性が考えられた。

EEBGP の摂取により *Ccl2* 遺伝子の発現が有意に低下した。*CCL2* は炎症刺激によりマクロファージ等により産生されるケモカインであり、単球/マクロファージの走化性因子および活性化因子として働く[118]。詳細なメカニズムは未だ不明であるが、過去の研究からアミロイド繊維の形成および分解の双方に何らかの形でマクロファージが関与していると考えられており[119]、加えて、アミロイド沈着部周囲のマクロファージにおいて過酸化脂質の増加が認められている[109]。本実験では、EEBGP 摂取で *Ccl2* 遺伝子の発現低下がみられ、*Ccl2* 遺伝子の発現量と肝臓のアミロイド沈着量の間には正の相関がみられたことから、*CCL2* を介したマクロファージの活性化がアミロイド沈着に影響している可能性も考えられた。加えて、本実験では、EEBGP の摂取により炎症性サイトカインである *Il1b* 遺伝子および *Il6* 遺伝子の発現が Control 群の約半分に低下した。前述したように、SAA タンパクは肝細胞にて IL-6 刺激により産生されるが、マクロファージにおける IL-6 合成および分泌には IL-18 の刺激が関わることを報告されている[120]。しかしながら、本実験では炎症性サイトカインの遺伝子発現が低下したにもかかわらず、

EEBGP 摂取による血中 SAA 量の低下はみられなかった。AA アミロイド症モデル動物において、抗 IL-6 受容体抗体により IL-6 の機能をほぼ完全に抑えることで SAA 産生を抑制することが報告されていることから[99], EEBGP 摂取による遺伝子発現の抑制のみでは SAA 産生を抑制するには不十分であった可能性が考えられた。一方, *Il1b* 遺伝子および *Il6* 遺伝子の発現量と肝臓のアミロイド沈着量の間には正の相関がみられたことから、これらサイトカインが肝臓における SAA の変性に何らかの影響を与えているかもしれない。

【小括】

本章では、炎症刺激とアミロイド繊維の投与による AA アミロイド症モデルマウスにおいて、EEBGP 保護効果を検討した。その結果、炎症反応惹起の前後 17 日間、EEBGP を混餌投与することで、肝臓および脾臓のアミロイド沈着が抑制された。炎症刺激 3 日後および 10 日後の血中 SAA 量は Control 群と各 EEBGP 投与群の間で変わらなかったことから、EEBGP は SAA 産生には影響しないと考えられた。また、肝臓において、抗酸化酵素遺伝子の発現が増加し、炎症関連遺伝子の発現が低下し、これらの遺伝子発現の変化と肝臓のアミロイド沈着量の間には相関がみられた。これらの結果から、EEBGP が遺伝子発現を介して抗酸化能を高め、また炎症反応を制御することで SAA の変性を抑制し、アミロイド線維への伸長を抑制した可能性が考えられた。

【図表】

表 3-1. プライマーリスト

Gene name	F or R	Sequence	Accession No.
Reference gene			
<i>Actb</i>	F	CCCTGGCTCCTAGCACCAT	NM_007393.5
	R	AGAGCCACCAATCCACACAGA	
Antioxidative enzyme gene			
<i>Sod1</i>	F	GGTGAACCAGTTGTGTTGTC	NM_011434.1
	R	CCGTCCTTTCCAGCAGTC	
<i>Sod2</i>	F	GACCTGCCTTACGACTATG	NM_013671.3
	R	GAAGAGCGACCTGAGTTG	
<i>Cat</i>	F	CAGGTGCGGACATTCTAC	NM_009804.2
	R	TTGCGTTCTTAGGCTTCTC	
<i>Gpx1</i>	F	CAATCAGTTCGGACACCAGGAG	NM_008160.6
	R	TCTACCATTCACCTTCGCACTTC	
<i>Prdx1</i>	F	TTCTTTTACCCTCTTGACTTT	NM_011034.4
	R	TCTTGGGTGTGTTAATCC	
<i>Gsr</i>	F	GGATTGGCTGTGATGAGATG	NM_010344.4
	R	CTGAAGAGGTAGGATGAATGG	
Inflammatory cytokine gene and chemmokine gene			
<i>Il1b</i>	F	GCAACTGTTCCCTGAACTCAACT	NM_008361.4
	R	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT	
<i>Il6</i>	F	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC	NM_031168.2
	R	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC	
<i>Ccl2</i>	F	TTAAAAACCTGGATCGGAACCA	NM_011333.3
	R	GCATTAGCTTCAGATTTACGGG	

F: Forward primer, R: Reverse primer

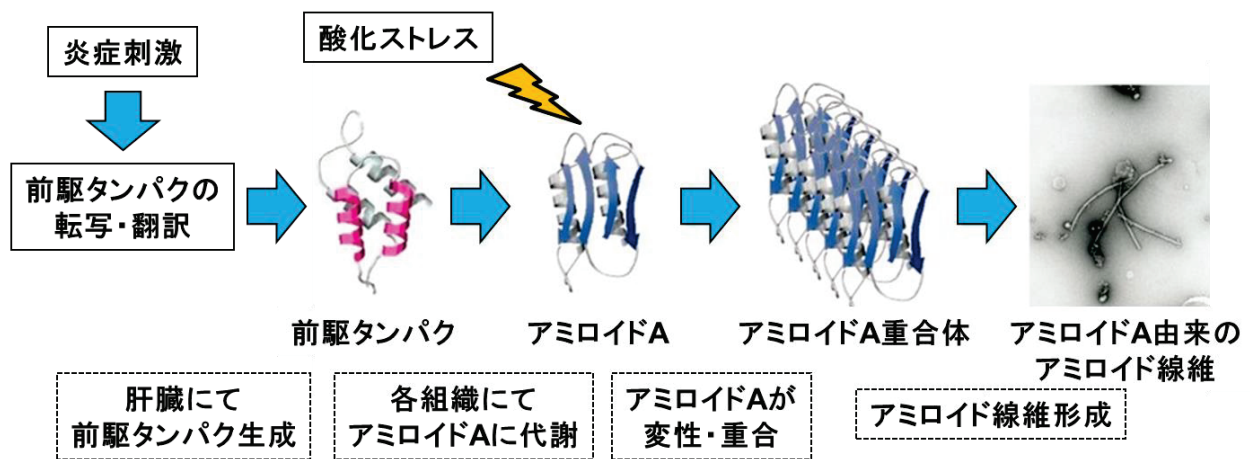


図 3-1. アミロイド A 線維の組織沈着メカニズム

(http://www.tenure-track-tuat.org/scholar/agriculture/post_30.html より一部改変, 2018.5.7)

AA アミロイド症では, 炎症刺激によって前駆タンパクが持続的に産生され, 続いて酸化ストレスによってアミロイド A が変性し, 重合体を形成することでアミロイド線維となり, 組織に沈着する。

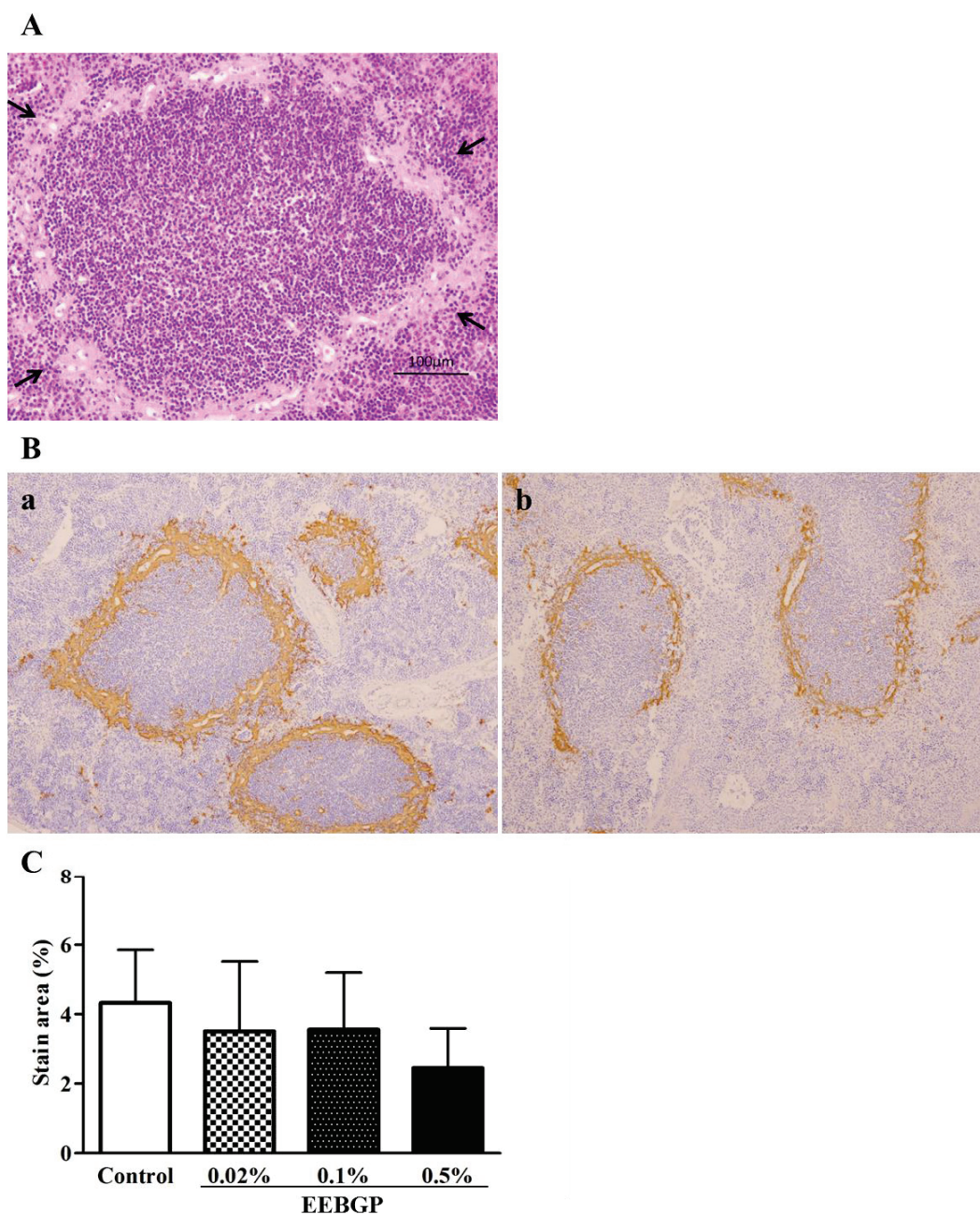


図 3-2. 脾臓におけるアミロイド沈着量に対する EEBGP 投与による影響

(A) H.E.染色像 (×40)。濾胞周囲にアミロイド沈着が認められた (矢印)。(B) 抗アミロイド A 抗体による免疫組織化学像 (×100)。a: Control 群, b: 0.5% EEBGP 投与群。0.5% EEBGP 投与群ではアミロイド沈着の低下傾向が認められた。(C) Control 群および各濃度の EEBGP 投与群における脾臓のアミロイド沈着量。縦棒は各群の平均および標準偏差を示す。

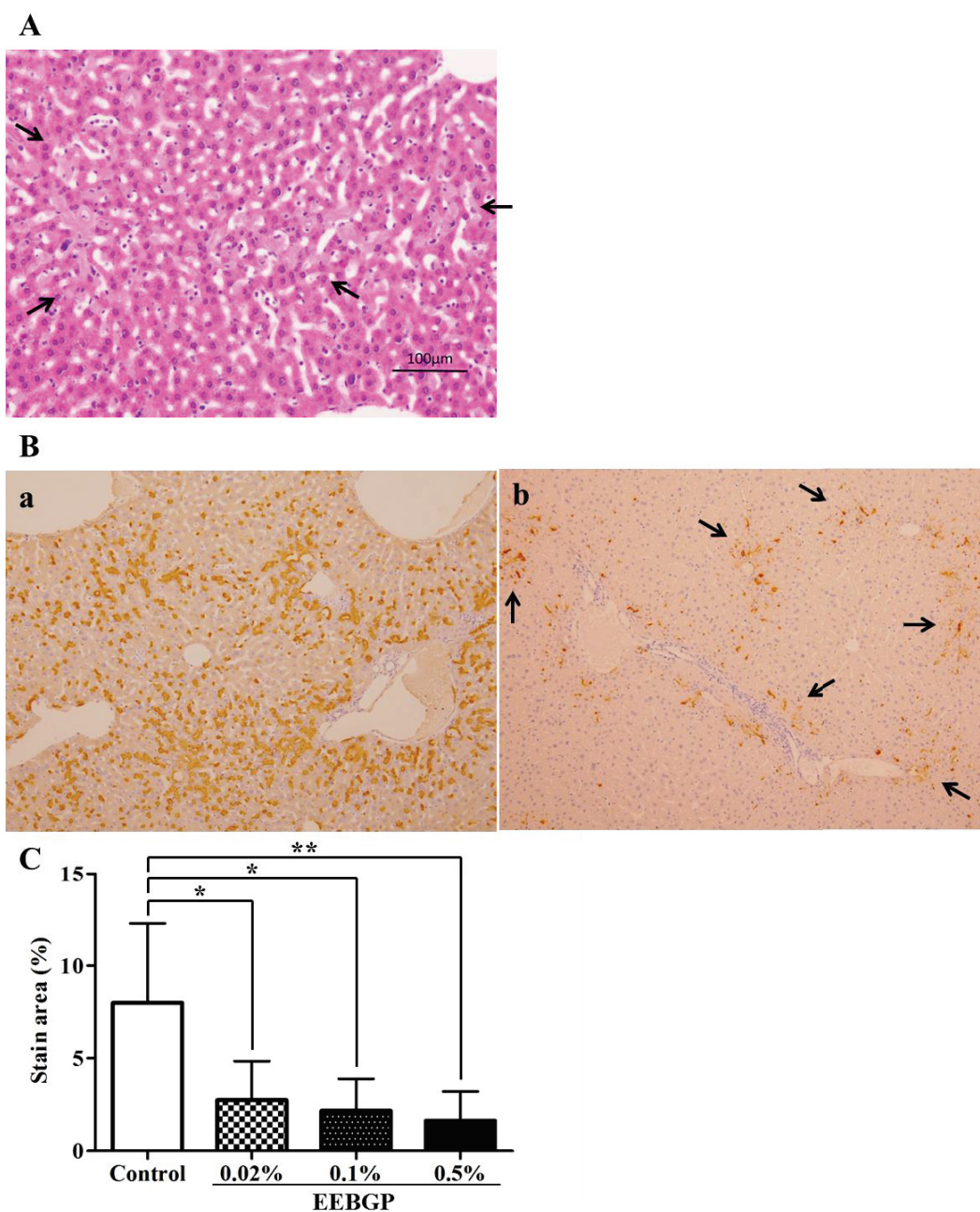


図 3-3. 肝臓におけるアミロイド沈着量に対する EEBGP 投与による影響

(A) H.E.染色像 (×40)。ディッセ腔にアミロイド沈着が認められた (矢印)。(B) 抗アミロイド A 抗体による免疫組織化学像 (×100)。a: Control 群, b: 0.5% EEBGP 投与群。0.5% EEBGP 投与群ではアミロイド沈着の低下が認められた。(C) Control 群および各濃度の EEBGP 投与群における肝臓のアミロイド沈着量。縦棒は各群の平均および標準偏差を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs control 群 (Dunnett の多重比較検定)。

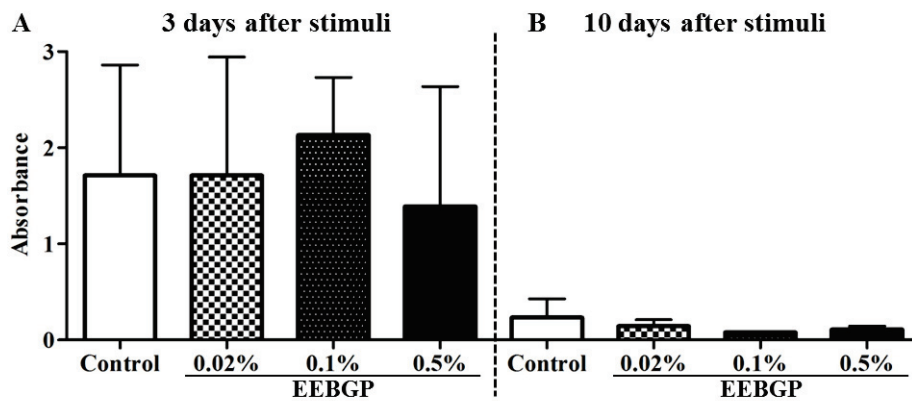


図 3-4. 炎症刺激後 3 日後および 10 日後の血中 SAA 量

縦棒は各群の平均および標準偏差を示す。A: 炎症刺激 3 日後, B: 炎症刺激 10 日後。

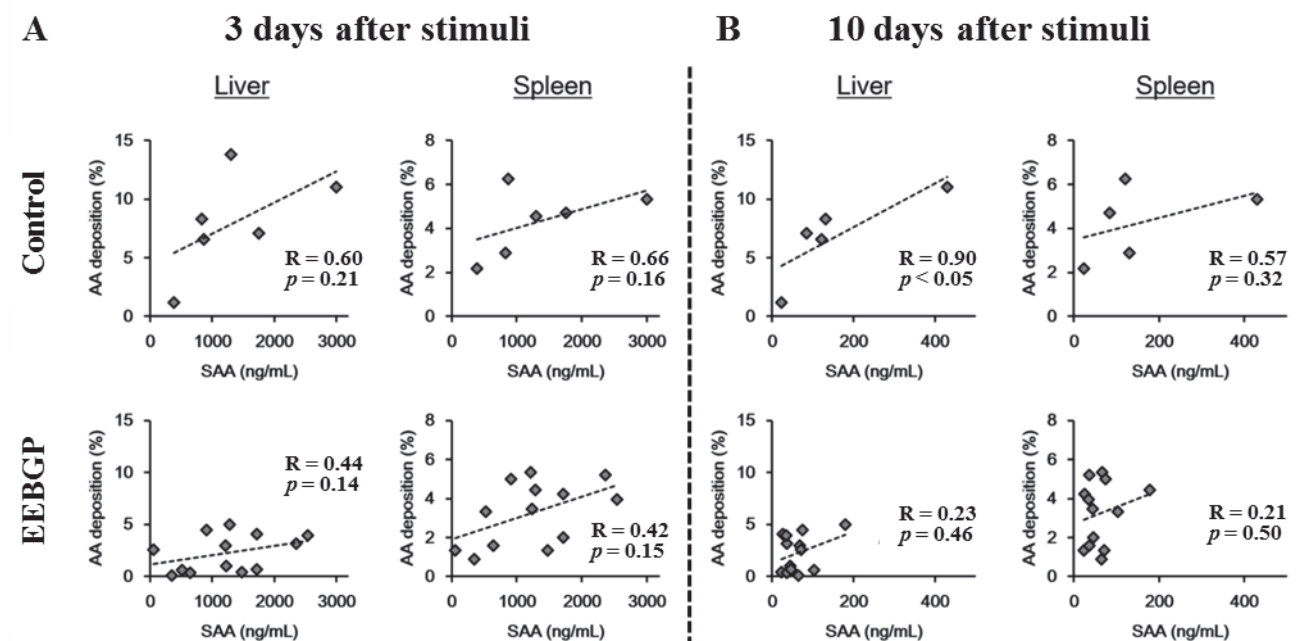


図 3-5. 炎症刺激 3 日後および 10 日後の血中 SAA 量と脾臓あるいは肝臓のアミロイド沈着量との関係

縦軸に脾臓あるいは肝臓におけるアミロイド沈着量を, 横軸に血中 SAA 量を示す。A: 炎症刺激 3 日後, B: 炎症刺激 10 日後。上段: Control 群, 下段: EEBGP 投与群。R 値 (相関係数) および p 値 (相関の有意性) は Spearman の順位相関係数を用いて算出した。

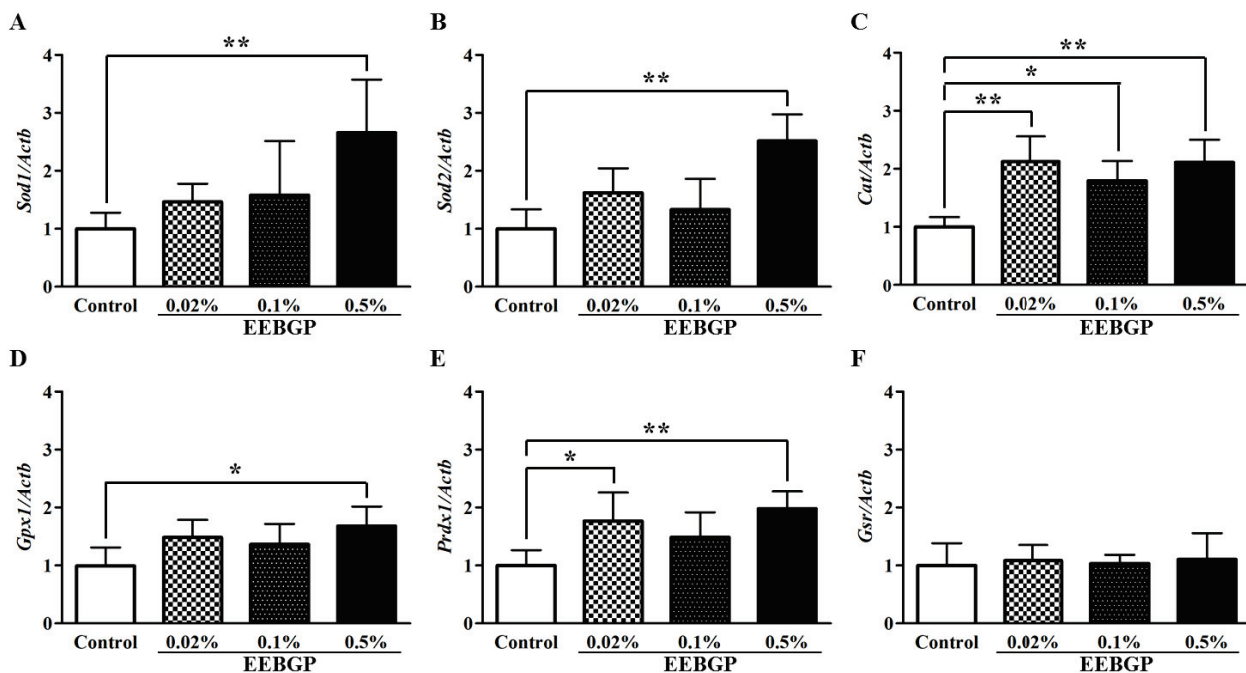


図 3-6. 抗酸化酵素遺伝子の発現量

縦棒は各群の平均および標準偏差を示す。(A) *Sod1* 遺伝子, (B) *Sod2* 遺伝子, (C) *Cat* 遺伝子, (D) *Gpx1* 遺伝子, (E) *Prdx1* 遺伝子, (F) *Gsr* 遺伝子。各遺伝子の発現量は *Actb* の発現量で補正した。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs Control 群 (Dunnett の多重比較検定)

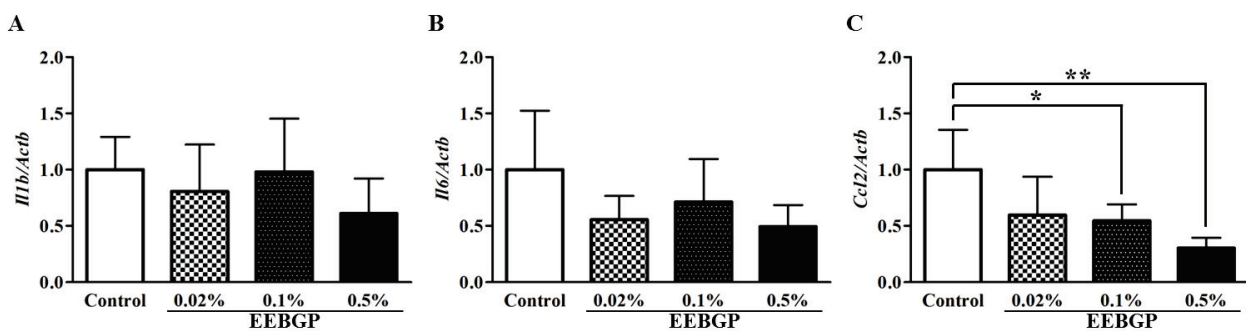


図 3-7. 炎症関連遺伝子の発現量

縦棒は各群の平均および標準偏差を示す。(A) *Il1b* 遺伝子, (B) *Il6* 遺伝子, (C) *Ccl2* 遺伝子。各遺伝子の発現量は *Actb* の発現量で補正した。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs Control 群 (Dunnett の多重比較検定)

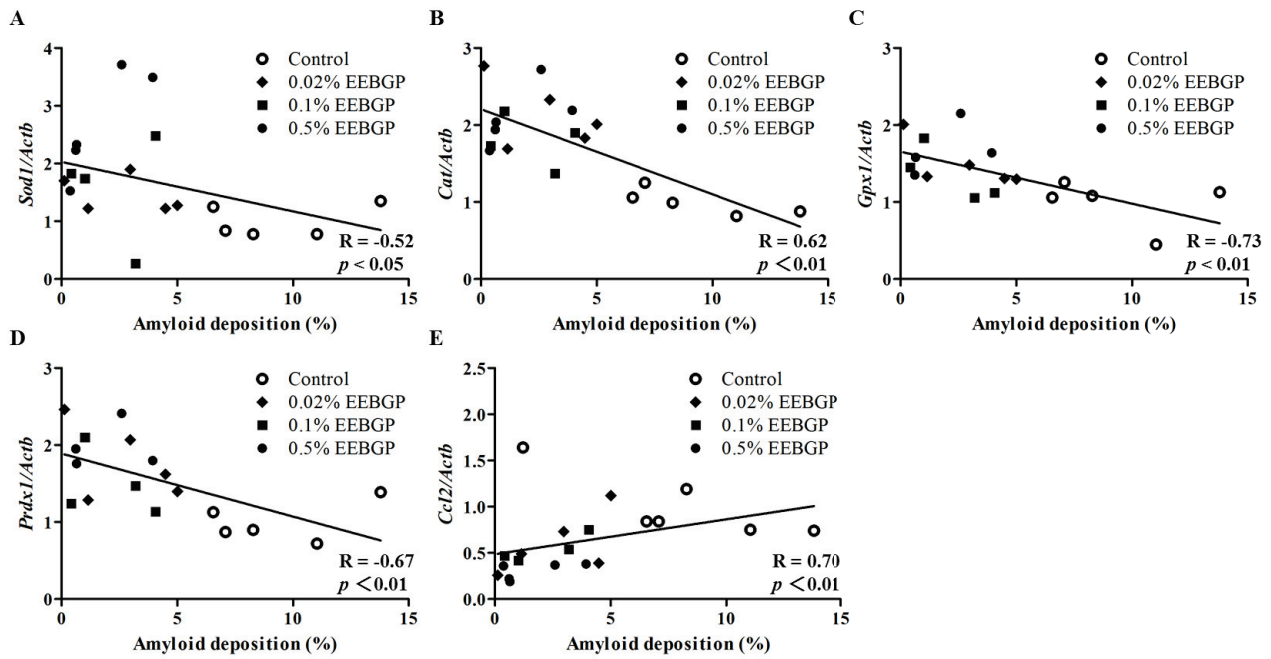


図 3-8. 抗酸化酵素遺伝子および炎症関連遺伝子の発現量と肝臓アミロイド沈着量の関係

縦軸に各遺伝子の発現量を、横軸に肝細胞壊死の範囲を示す。(A) *Sod1* 遺伝子、(B) *Cat* 遺伝子、(C) *Gpx1* 遺伝子、(D) *Prdx1* 遺伝子、(E) *Ccl2* 遺伝子。各遺伝子の発現量は *Actb* の発現量で補正した。R 値（相関係数）および p 値（相関の有意性）は Spearman の順位相関係数を用いて算出した。

第 3 章

EEBGP の EHV-9 感染性急性脳炎モデルに対する防御効果の検討

【諸言】

プロポリス中のフェニルプロパノイド類（カフェ酸, *p*-クマル酸）やフラボノイド類（ガラנגニン, ピノセングリン, クリシン）が培養した単純ヘルペスウイルスに対して増殖抑制効果を示すことが報告されている[121, 122]。その他にも, プロポリスおよびその含有成分が, herpes simplex type 1, herpes simplex type 2, adenovirus type 2, poliovirus type 2, vesicular stomatitis virus [123], vaccinia virus [124]などの DNA ウイルスや RNA ウイルスの増殖を阻害することが報告されている。プロポリスには免疫調整作用があることが知られており[125, 126], 近年 BGP の免疫賦活作用が細胞試験や動物試験にて報告されている[127, 128]。

EHV-9 は, Alphaherpesvirinae subfamily に属する varicellovirus の 1 つで, EHV メンバーの中で最も新しく, EHV-1 に近縁なウイルスである。EHV-9 の最初の報告は日本の動物園で発生したトムソンガゼル (*Gazella thomsonii*)における大流行であったが[129, 130], EHV-9 は鼻腔からウシ[131], ウマ[132], ヒツジ[133]およびイヌ[134]に感染することが報告されているため, 家畜への感染拡大が懸念されている。EHV-9 の病原性は乳幼期のハムスターを用いて調べられており, EHV-9 は接種から 12~24 時間, 嗅覚上皮で増殖した後, 数日以内に嗅神経および三叉神経を通じて脳に移動する[135]。

本章では, EHV-9 感染に伴う急性脳炎に対して EEBGP が保護効果を示すか検証するとともに, サイトカイン遺伝子を測定することで EEBGP の免疫調節作用について確認した。

【材料と方法】

・被験物質

被験物質には, EEBGP を用い, 5%アラビアガム溶液（㈱ナカライテスク）に懸濁して経口投与した。

・動物

実験には, 3-4 週齢, 雄のシリアンハムスター (*Mesocricetus auratus*)（日本 SLC ㈱）を用い, 室温 23 ±1℃, 湿度 50±10%, 明暗各 12 時間にコントロールした環境下で 5 日間馴化させた後, 試験に使用した。ボトルに入れた水道水と粉末飼料（CRF-1）を自由摂取させた。全ての動物試験は, 岐阜大学内の動物倫理規定に従って実施した（承認番号：#27-96）。

・ウイルス株

ウシ正常腎臓細胞 (MDBK) で保持した EHV-9 の原株 (P19, 5th 102 passages) を試験に用いた。ウイルス数は MDBK 細胞におけるプラークアッセイを用いて評価した。

・試験デザイン

動物を, Control 群 (n = 20) , EHV-9 感染群 (以下 EHV 群; n = 20) , EEBGP 経口投与+ EHV-9 感染群 (以下 EEBGP 群; n = 20) に分け, EEBGP 群には EEBGP を 500 mg/kg 体重の用量で 7 日間経口投与し, Control 群および EHV 群には投与溶媒 (5%アラビアガム溶液) を投与した。先行研究を参考に[136, 137], 試験 8 日目に, EHV 群および EEBGP 群の動物には 50 μ L の EHV-9 (3×10^4 plaque forming unit (pfu)) を鼻腔感染させ, Control 群には 50 μ L の培地 (MEM- α) を与えた。交差感染を防ぐため, 動物は群ごとにケージを分けて飼育し, 一般状態を毎日観察した。各群 5 匹ずつ, EHV-9 感染から 2 日後, 3 日後, 4 日後および 5 日後にそれぞれペントバルビタールナトリウム (100 mg/kg 体重) にて安楽死させ, 速やかに脳, 心臓, 肺, 腎臓, 肝臓および脾臓を摘出した。摘出した脳組織は 2 つに分割し, 一方は液体窒素で凍結して RNA 抽出に用い, もう一方は *p*-ホルムアルデヒドにて固定し, H.E.染色および免疫組織化学を行った。

・定量 PCR

各群より得られた脳および肺から AllPrep DNA/RNA/Protein Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて Total RNA を抽出し, QuantiTectR Reverse Transcription Kit (Qiagen) を用いて cDNA を合成した。cDNA をテンプレートとし, LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche, Basel, Switzerland) と Takara PCR Thermal Cycler Dice® Real Time System single (タカラバイオ(株)) を用いて, 定量 PCR (95°C, 30 秒→60°C, 10 秒を 40 サイクル) を実施した。EHV-9 特異的プライマー [137], *Il2*, *Il10* および Interferon- γ (*Ifng*) 遺伝子のプライマー [138, 139] の配列は, 先行文献を参考にした (表 4-1)。Reference gene として *Actb* 遺伝子を用い, 個体ごとの遺伝子発現量は *Actb* 遺伝子の相対量として算出した。

- ・病理組織学検査および免疫組織化学

固定した各組織をパラフィン包埋および薄切し、H.E.染色標本を作製し、光学顕微鏡にて観察した。先行文献に従い[135], 1次抗体に抗EHV-9ウサギ血清(1:800), 2次抗体にビオチン化抗ウサギIgG抗体(Dako, Santa Clara, CA, USA)を用い、En Vision+System HRP-labeled polymer (Dako) とDiaminobenzidine (DAB) Substrate Chromogen System (Dako) にて脳の組織切片中のEHV-9を検出した。

- ・統計処理

脳組織におけるサイトカイン遺伝子の発現量は、1-way analysis of variance 検定後、Tukey-Kramer の検定を用いて3群間で比較した。統計処理にはエクセル統計2012を用い、有意水準は $p < 0.05$ とした。

【結果】

- ・一般状態、死亡例および体重推移

EHV-9感染3日目、EHV群およびEEBGP群の全個体で、うつ、流涎、鼻汁、協調性の欠如および定期的な痙攣がみられ、続いて、横臥位および昏睡が観察された。感染3日目にはいずれの群でも死亡個体はみられなかったが、EHV群では感染4日目に2例、5日目に4例の死亡が観察され、EEBGP群では感染4日目に2例、5日目に3例の死亡が観察された(表4-2)。Control群では一般状態の異常および死亡例の出現はみられなかった(表4-2)。また、感染5日目の体重が、EHV群およびEEBGP群ではControl群と比較して有意に低下した(Data not shown)。

- ・肉眼所見および病理所見

EHV群およびEEBGP群では肉眼的に髄膜および脳血管の鬱血がみられ、病理組織学的に血管周囲の細胞浸潤を特徴とする非化膿性脳炎(図4-1A, B), 巣状あるいは瀰漫性のグリオース、神経細胞の変性および脱落が観察され(図4-1C), 変性した細胞では高頻度で好酸性の核内封入体がみられた。これらの組織変化は主に嗅球および大脳の灰白質で観察され、発生率はEHV群とEEBGP群との間で変わらなかった。一方、Control群ではいずれの組織変化も観察されなかった。

EHV-9は感染3日後から嗅球で検出され、EHV群では感染4日後、EEBGP群では感染5日後に最も

多く検出された(図 4-1D)。一方、感染 2 日後の EHV 群および EEBGP 群や、試験期間を通じて Control 群では EHV-9 は検出されなかった。

・ウイルス DNA の検出および炎症関連遺伝子の発現量

EHV-9 の DNA が感染 2 日目から 5 日目までの脳組織で検出された。EHV-9 感染 2 日後の脳組織では、Control 群と比較して、EEBGP 群で *Il2*, *Il10* および *Ifng* 遺伝子の mRNA 量の有意な増加がみられ ($p < 0.01$) , EHV-9 群では *Il10* 遺伝子のみ mRNA 量の有意な増加がみられた ($p < 0.05$)。EHV-9 感染 2 日後には、EHV-9 群と EEBGP 群のいずれの群でも *Il2*, *Il10* および *Ifng* 遺伝子の mRNA 量の有意な増加がみられ ($p < 0.01$) , 両者の間に差はみられなかった(図 4-2)。

【考察】

プロポリスは *in vitro* にて様々な DNA ウイルスや RNA ウイルスに対して効果を示すことが報告されている[123, 124]。また、プロポリスに含まれるフラボノイドであるケルセチンやルチンは、単純ヘルペスウイルス、ポリオウイルスおよびシンドビスウイルスに対して抗ウイルス効果を示し[140]、クリシンやケンフェロールが複数の単純ヘルペスウイルス、アデノウイルスおよびロタウイルスの増殖を抑制することが報告されている[140-142]。しかしながら、本実験において、EEBGP の前投与は EHV-9 感染に伴う急性脳炎を抑制することはできなかった。

先行研究では、EGP が細胞性免疫および体液性免疫の活性化し、マウスにおいて免疫を賦活することが報告されている[143]。本実験でも、EEBGP の投与により、EHV-9 感染 2 日後から脳組織における *Il2*, *Il10* および *Ifng* 遺伝子の発現量が増加した。IL-2 は 1 型ヘルパーT (Th1) 細胞から分泌されるサイトカインで T 細胞の増殖および活性化、免疫グロブリンの産生およびナチュラルキラー細胞への分化を促進する[134]。IFN- γ も Th1 細胞から分泌され、マクロファージの活性化に関わり、細胞内の病原菌を殺し、ウイルス感染の拡大を防ぐとともに、炎症反応を増強する[144, 145]。これらサイトカインの発現量は生物個体の免疫状態を反映しており、ウイルス感染に伴う様々な疾患に対する防御効果において重要な役割を担っている[143]。先行研究にて EEBGP の免疫調整作用が報告され[143]、本実験においても EEBGP 投与は脳炎の発症に先んじてサイトカイン遺伝子の発現量を増加させたにも関わらず、EHV-9

感染に伴う急性脳炎の程度は EHV-9 群と変わらなかった。本実験で用いた動物モデルでは, EHV-9 は鼻腔から感染した後, 嗅神経を通して脳に侵入し, 嗅索に沿ってシナプス間を広がりながら嗅球および大脳の神経細胞で増殖するが, EHV-9 感染から急性脳炎発症まで非常に短時間で進行することが明らかになっている[146, 147]。EEBGP の前投与は急性鼻炎や鼻腔内でのウイルスの増殖を抑制することができず, EHV-9 は感染個体の嗅球や大脳に到達したことから, EEBGP 投与でみられた免疫調整作用は急性脳炎の発症や病態の進行を抑制するには不十分であったかもしれない。EEBGP の免疫調整作用は確認されていることから, 本実験のように鼻腔から直接脳組織に移動するような感染経路ではなく, 病態の進行がよりマイルドな経口や経眼のような感染経路で[136], EEBGP の防御効果をあらためて確認する必要があると考えられた。

【小括】

本章では, ハムスターを用いた EHV-9 感染による急性脳炎モデルにおいて EEBGP 保護効果を検討した。EHV-9 感染前に 7 日間, EEBGP を経口投与したが, 急性脳炎の発生率や脳の組織像において EEBGP 投与の影響はみられず, EHV-9 感染に伴う炎症関連遺伝子の増加に EEBGP 投与は影響を与えなかった。一方, EEBGP は EHV-9 感染前の *Il2*, *Il10* および *Ifng* 遺伝子の発現量を増加させたことから, 免疫調整効果を有する可能性が考えられたが, 本実験では感染に対する防御効果を示さなかったことから, 更なる検討が必要であると考えられた。

【図表】

表 4-1. プライマーリスト

Gene name	Accession no.	F or R	Sequence
EHV-9			
<i>EHV9 gORF30</i>	YP_002333511.1	F	5'-GTCAGGCCCACTTGAT-3'
		R	5'-ATGCGAGTCTGTGCCGTTGT-3'
Inflammation-related genes			
<i>Il2</i>	NM_001281629.1	F	5'-CACCCACTTCAAGCTCT-3'
		R	5'-TCCACCACAGTTACTGTC-3'
<i>Il10</i>	XM_005079860.2	F	5'-TGGACAACATACTACTCACTG-3'
		R	5'-GATGTCAAATTCATTCATGGC-3'
<i>Ifng</i>	NM_001281631.1	F	5'-GACAACCAGGCCATCC-3'
		R	5'-CAAAACAGCACCGACT-3'
Reference gene			
<i>Actb</i>	NM_001281595.1	F	5'-TCTACAACGAGCTGCG-3'
		R	5'-CAATTTCCCTCTCGGC-3'

F: Forward primer, R: Reverse primer

表 4-2. EHV-9 感染後の死亡例数

Groups	Treatment		Day 8	Day 10	Day 11	Day 12	Day 13
	Day 1-7	Day 8	(day of infection)	(2nd dpi)	(3nd dpi)	(4nd dpi)	(5nd dpi)
Control	5% Arabic gum	50 μ L of MEM- α	0/20	0/20	0/15	0/10	0/5
EHV		50 μ L of EHV-9 (1×10^4 pfu)	0/20	0/20	0/15	2/10	4/5
EEBGP			0/20	0/20	0/15	2/10	3/5

EHV-9 感染 2 日目から毎日 5 例ずつ安楽死させた。表中の数字は死亡個体/全個体を示す。dpi: day post inoculation, pfu: plaque forming unit。

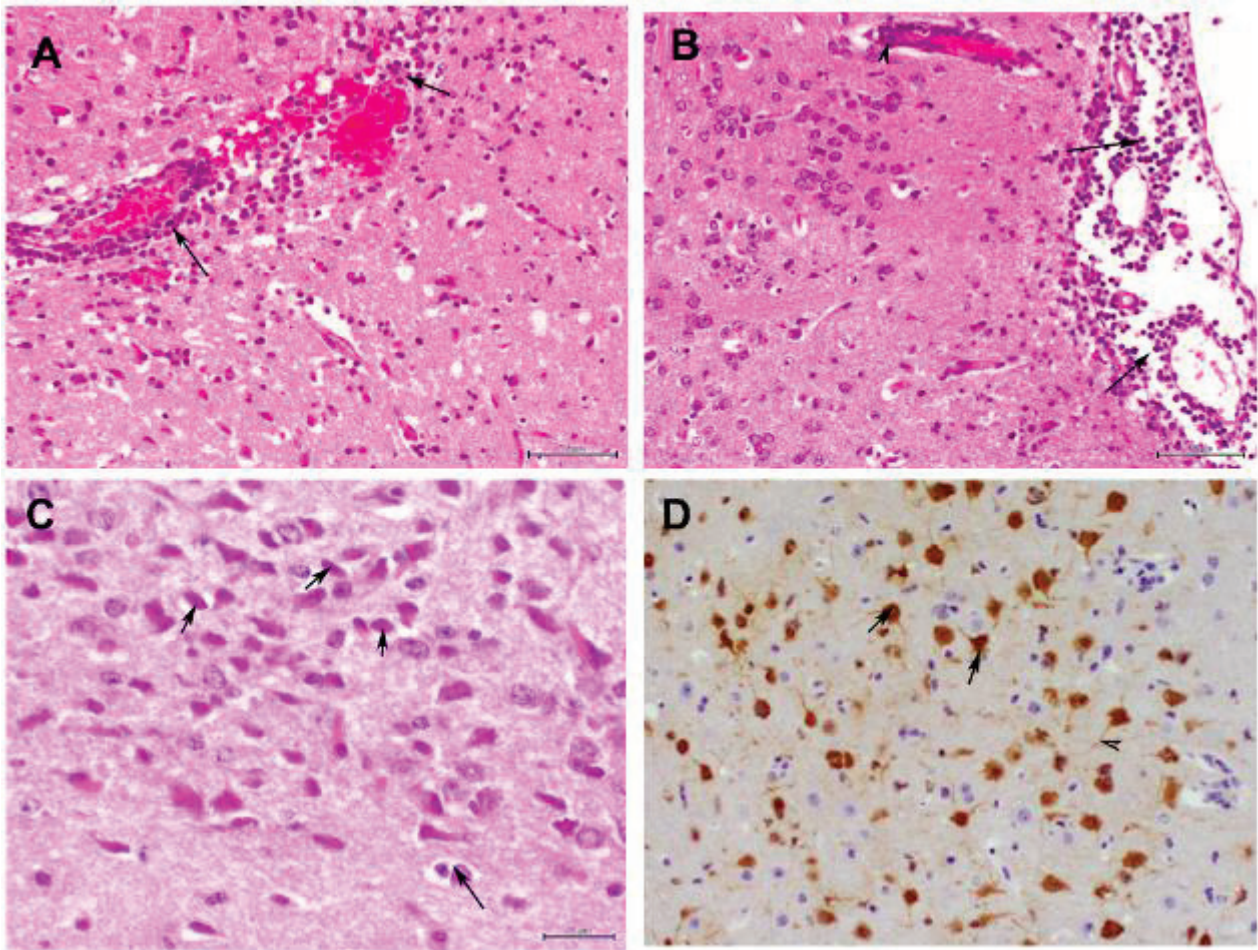


図 4-1. EHV-9 を感染させたハムスターの脳の病理組織像

(A) 血管周囲の炎症性細胞浸潤 (矢印)。H.E.染色像, Bar = 50 μ m。(B) 髄膜脳炎 (矢印) および血管周囲の炎症性細胞浸潤 (矢頭)。H.E.染色像, Bar = 50 μ m。(C) 核の萎縮および空胞化を伴った神経細胞の変性および壊死 (矢印)。H.E.染色像, Bar = 20 μ m。(D) 抗 EHV-9 ウサギ血清染色像。EHV-9 は神経の細胞体 (矢印) あるいは神経突起 (矢頭) に存在した。

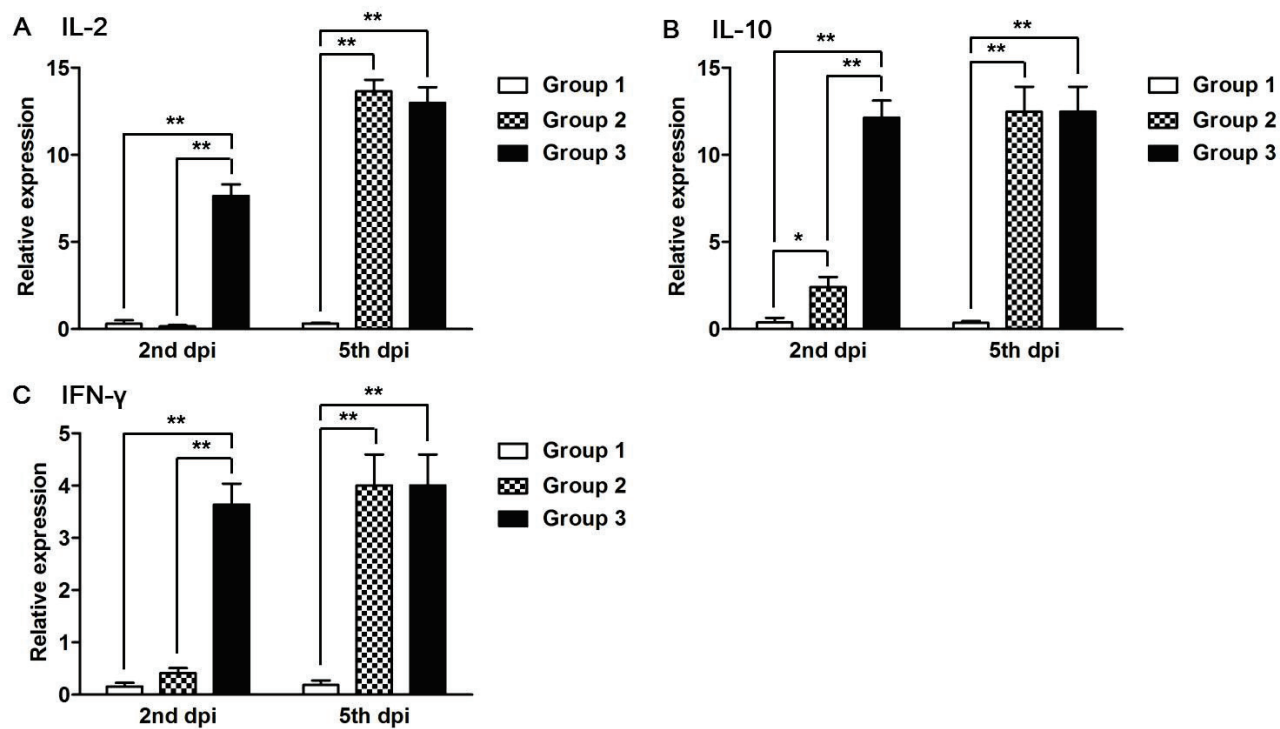


図 4-2. EHV-9 感染後の炎症関連遺伝子の発現量の変化に対する EEBGP 投与の影響

(A) *Il2* 遺伝子, (B) *Il10* 遺伝子, (C) *Ifng* 遺伝子。縦棒は各群の平均および標準偏差を示す。各遺伝子の発現量は *Actb* の発現量で補正した。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$: 3 群間比較 (Tukey-Kramer の検定)。

総合討論

本研究では、健康食品素材として利用される EEBGP を用いて、原因や障害のメカニズムが異なる 4 つの疾病モデル、ラットを用いた APAP 誘発性肝障害モデルおよび四塩化炭素誘発性肝障害モデル、マウスを用いた AA アミロイド症モデル、およびハムスターを用いた EHV-9 感染による急性脳炎モデル、に対する保護効果の有無と、その作用メカニズムを探るため抗酸化酵素および/あるいは炎症関連遺伝子の発現との関係を検討した。APAP は摂取量の増加に伴い肝障害の程度が増悪する中毒性肝障害誘発物質の代表例であるが、ヒトにおいて一般的な中毒量よりも低い用量でも肝障害が生じることが知られている。第 1 章では、実験 1 として比較的低用量の APAP 摂取時に生じる肝障害を模したモデルを作製する目的で、肝障害の発現に関わる薬物代謝酵素の遺伝子発現量および肝臓グルタチオン量の 1 日の異なる時間帯（朝方あるいは夕方）における違いや摂餌条件の影響を確認した。その結果、すでに報告のある絶食下に加えて、70%の制限給餌を 10 日間継続した条件下でも、自由摂餌下と比較して *Cyp2e1* 遺伝子の発現量が増加し、グルタチオン量が低下した。一方、自由摂餌下における 9:00 と 16:00 の比較では、*Cyp2e1* 遺伝子の発現量およびグルタチオン量に顕著な変化はみられなかった。各条件下において、通常的自由摂餌下の投与（9:00 投与）では肝障害を生じない 800 mg/kg 体重の APAP を投与したところ、絶食下および制限給餌条件下で肝細胞壊死を生じ、これは CYP2E1 およびグルタチオンの変化に伴って APAP の代謝が変化したためと考えられた。一方、自由摂餌下 16:00 投与では、絶食下や制限給餌下よりも強い肝障害が観察され、*Cyp2e1* 遺伝子やグルタチオン量の変化よりも、APAP 投与後の摂餌が肝障害の有無に大きな影響を与える可能性が示唆された。また、別の肝障害モデルとして APAP と同じく毒性発現に CYP2E1 が関わる四塩化炭素について、自由摂餌下と絶食下で肝障害の程度を比較したところ、*Cyp2e1* 遺伝子の発現の変化を反映して絶食下でより強い障害が観察された。実験 1 の結果を基に、肝細胞壊死の程度が最も強かった自由摂餌下 16:00 投与の条件を用い、APAP 誘発性の肝細胞壊死に対する EEBGP の抑制効果を検討した（実験 2）。混餌にて 0.3% EEBGP を APAP 投与前に 7 日間投与したところ、肝細胞壊死の範囲が有意に低下した。保護効果の作用メカニズムを確認するため、抗酸化酵素遺伝子および炎症関連遺伝子の発現への影響を確認したところ、EEBGP の投与は抗酸化酵素遺伝子の発現にはほとんど影響せず、サイトカインやケモカインのような炎症関連因子の遺伝子発現を低下させた。また、*Il1b* 遺伝

子や *Il10* 遺伝子の発現低下と肝細胞壊死の範囲の低下には相関がみられたことから、EEBGP の保護効果のメカニズムの 1 つとして、組織障害により惹起された炎症反応に影響を与えている可能性が考えられた。さらに、実験 3 として、四塩化炭素誘発性肝障害に対する EEBGP の抑制効果を検討したところ、1.2% EEBGP の 7 日間混餌投与は、肝細胞壊死および肝細胞の脂肪変性に影響しなかった。四塩化炭素による肝障害では、CYP2E1 代謝物であるラジカル消去が重要であり、EEBGP にはラジカル消去作用が報告されているが、今回の実験条件では障害を抑制するには不十分であった可能性が考えられた。

第 2 章では、炎症刺激とアミロイド繊維の投与によるマウス AA アミロイド症モデルにおいて、EEBGP の保護効果を検討した。その結果、炎症反応惹起の前後 17 日間、EEBGP を混餌投与することで、肝臓および脾臓のアミロイド沈着が抑制された。炎症刺激 3 日後および 10 日後の血中 SAA 量は Control 群と各 EEBGP 投与群の間で変わらなかったことから、EEBGP は SAA 産生には影響しないと考えられた。また、肝臓において、抗酸化酵素遺伝子の発現が増加し、炎症関連遺伝子の発現が低下し、これらの遺伝子発現の変化と肝臓のアミロイド沈着量の間には相関がみられた。これらの結果から、EEBGP は SAA の産生ではなく、SAA の変性を抑制することでアミロイド線維への伸長および組織への沈着を抑制し、そのメカニズムとして抗酸化酵素遺伝子の発現増加に伴う抗酸化能の向上と、炎症反応の制御が考えられた。

第 3 章では、ハムスターを用いた EHV-9 感染による急性脳炎モデルにおいて EEBGP 保護効果を検討した。EHV-9 感染前に 7 日間、EEBGP を経口投与したが、急性脳炎の発生率や脳の組織像において EEBGP 投与の影響はみられなかった。一方、免疫機能に関与する *Il2*, *Il10* および *Ifng* 遺伝子の発現量が EHV-9 感染後に大きく増加したが、EEBGP を投与した動物ではより早いタイミングからこれら遺伝子の発現量が増加しており、EEBGP が免疫機能に影響する可能性が考えられた。

第 1 章および第 2 章の結果から、異なる 2 つの障害モデルにおいて、EEBGP が組織障害に伴う炎症反応を調節する可能性が示された。肝臓ではウイルス感染による慢性炎症に加え、アルコール摂取や脂肪肝を原因として慢性炎症が生じることがあり、最終的に肝硬変や肝がんなど重篤な肝疾患に進行することが知られている[148, 149]。すでに細菌感染を模したマウス LPS 投与モデルにおいて、EEBGP が炎症関連因子の増加を抑制することが報告されていたが[60]、本研究において化学物質（硝酸銀）投与による直接的な炎症反応の惹起に加えて、APAP 投与によって生じた組織障害が誘発する炎症関連因子の変化にも

影響を与えることが確認された。先行研究では、EEBGP の主要成分の 1 つであるアルテピリン C が, *in vitro*において NF- κ B の活性化を抑制し[150, 151], EEBGP およびアルテピリン C が LPS 刺激した培養マクロファージにおけるサイトカイン産生を抑制することが報告されている[151]。本研究の結果は, 少なくとも肝臓においては EEBGP が炎症反応を制御する可能性を示しており, 今後慢性炎症性疾患の進行抑制や治療への EEBGP の利用が期待される。一方, 第 3 章の結果から, EEBGP が免疫関連遺伝子の発現を誘導し, 免疫機能を調整している可能性が示された。EEBGP を投与したマウスから採取したマクロファージでは, サイトカインや炎症メディエーターに EEBGP の影響はほとんどみられないが, このマクロファージを LPS や IFN- γ とともに培養すると TNF- α や一酸化窒素の産生が増加することが報告されている[128, 152]。前述のようにアルテピリン C が LPS 刺激に伴うサイトカイン産生を抑制する一方で, アルテピリン C 以外の成分がこのようなマクロファージの感受性の増加に関わるとの報告がある[152]。以上のことから, 多数の化学物質を含有する EEBGP は炎症抑制作用と免疫調整作用のいずれの作用も有しており, 感染や障害の有無および個体の免疫状態によって炎症反応を正にも負にも制御する可能性があると考えられた。

本研究において, AA アミロイド症モデルでは肝臓や脾臓におけるアミロイド沈着の抑制とともに, 肝臓中の抗酸化酵素遺伝子の発現量が増加し, 炎症関連遺伝子の発現量が低下した。一方で, APAP 誘発性肝障害モデルでは, 肝細胞壊死の範囲は減少し, 一部の炎症関連遺伝子の発現が低下したものの, 抗酸化酵素遺伝子の発現は変わらなかった。加えて, 四塩化炭素誘発性の肝障害モデルにおける肝細胞壊死や脂肪変性, あるいは EHV-9 感染モデルにおける脳炎の発症に EEBGP 投与の影響はみられなかった。これらの各疾病モデルにおいて EEBGP の保護効果や遺伝子発現への影響に差異がみられた理由の 1 つとして, 動物種間における代謝速度の違いと EEBGP 投与のタイミングの影響が考えられた。マウスと比較して, ラットでは化学物質の代謝および排泄が速いことが知られている[153]。アルテピリン C を経口投与したところ, ラットへの 30 mg/kg 体重の投与では 1 時間以内に血中からほとんど消失するのに対し[154], マウスへの 10 mg/kg 体重の投与では 4 時間後でも血中から検出されることが報告されている[150]。さらに, 本研究において, AA アミロイド症モデルでは障害の誘発前に加えて, アミロイド繊維の投与および炎症反応の惹起後も継続して EEBGP を投与しているのに対し, APAP 肝障害モデルや四塩化炭素誘発性肝障害モデルでは障害誘発前までの投与であり, EHV-9 感染性急性脳炎モデルでは EEBGP の投与終

了から脳炎の発症まで約 2 日間のギャップがあった。第 1 章の考察で述べたように、我々は、ラットへの EEBGP の単回強制経口投与後、EEBGP 中の主要成分が 1 時間以内に血中からほとんど消失することを確認しており、これは投与のタイミングによって EEBGP 中の主要成分の血中濃度が大きく変わることを示している。以上のことから、各疾病モデル間でみられた遺伝子発現に対する影響の違いは、動物種差による代謝速度の違いに加えて、EEBGP 投与のタイミングの違いによる肝臓への EEBGP 暴露の差によるものである可能性が考えられた。今後、EEBGP の保護効果を検討する場合には、障害誘発前の予防的な投与に加えて、障害誘発後にも継続して投与する必要があるのではないかと考えられた。

以上、本研究を通じて EEBGP が主に肝臓に対して保護効果を示すことが見出され、その作用メカニズムとして炎症反応の制御が考えられた。加えて、一部の病態モデルでは EEBGP の継続摂取が抗酸化酵素の遺伝子発現を増加させることが示された。肝機能障害は生命に関わる重篤な疾患であり、本研究の結果を基に EEBGP の肝保護作用について更なる研究を進めるとともに、肝保護作用を示す健康食品素材として多くのヒトの健康に寄与することが期待される。また、本研究ではウイルス感染に伴う急性脳炎には影響しなかったものの、免疫関連遺伝子の発現に変化がみられたことから、EEBGP の感染予防効果については更なる研究が必要である。

結論

異なるメカニズムに基づいて疾病を発症する 4 種の動物モデルにおいて, EEBGP が防御効果を示すか検討し, 抗酸化作用や炎症抑制作用との関係性を確認した。第 1 章で, APAP あるいは四塩化炭素誘発性の肝障害に対する効果を検討したところ, EEBGP は炎症関連遺伝子の発現を調整することで APAP 誘発性の肝細胞壊死を抑制した。一方, EEBGP は四塩化炭素誘発性の肝細胞壊死および脂肪変性には影響しなかった。第 2 章で, AA アミロイド症に対する効果を検討したところ, EEBGP は脾臓および肝臓でのアミロイド沈着を抑制し, この抑制作用は SAA タンパクの産生抑制ではなく, 抗酸化酵素遺伝子の発現増加および炎症関連遺伝子の調整による SAA タンパクの変性抑制によるものであることが考えられた。第 3 章で, EHV-9 感染に伴う急性脳炎に対する効果を検討したところ, 脳炎の発症率および病理組織像に EEBGP は影響しなかった。以上, 病理組織学的な観点から, EEBGP 投与が一部の疾病モデルに対して保護効果を示すことが見出され, そのメカニズムとして EEBGP が炎症反応の制御や組織の抗酸化能に影響している可能性が示された。

謝辞

本稿を終えるにあたり，本研究に関して終始御指導，御鞭撻を賜りました，岐阜大学連合獣医学研究科 獣医病理学研究室教授 柳井徳麿博士，同准教授 酒井洋樹博士，岐阜大学生命科学研究支援センター 助教 平田暁大博士に深謝致します。

本稿作成に関して懇篤な御指導，御助言を賜りました，東京農工大学農学部共同獣医学科教授 渋谷 淳博士，帯広畜産大学畜産学部教授 古林与志安博士，岩手大学農学部共同獣医学科教授 佐藤洋博士，東京農工大学農学部共同獣医学科准教授 吉田敏則博士に深く感謝致します。

本研究の実施の機会を与えて頂きましたアピ株式会社 野々垣孝会長ならびに野々垣孝彦社長，本研究の遂行に関して御指導，御協力を賜りました，同長良川リサーチセンター長 市原賢二博士ならびに所員諸氏に心より感謝致します。

参考文献

1. 厚生労働省, 健康日本 21 (第二次) 各目標項目の進捗状況について, 2013
2. 厚生労働省, 平成 27 年度 国民医療費の概況, 2015
3. 厚生労働省, セルフメディケーション税制 (医療費控除の特例) について, 2017
4. 消費者庁, 特定保健用食品とは
5. 消費者庁, 機能性表示食品って何?, 2015
6. 日本健康栄養食品協会
<http://www.jhnfa.org/tokuho-0.html>
7. 機能性食品ネット - 機能性表示食品データベース -
<http://kinouseishokuhin.net/database/list>
8. Salatino A, Fernandes-Silva CC, Righi AA, and Salatino ML. Propolis research and the chemistry of plant products. *Nat Prod Rep.* 28: 925-936. 2011.
9. Kurek-Górecka A, Rzepecka-Stojko A, Górecki M, Stojko J, Sosada M, and Swierczek-Zieba G. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules.* 2013. 19(1): 78-101.
10. Cui-ping Z, Shuai H, Wen-ting W, Shun P, Xiao-ge S, Ya-jing L, and Fu-liang H. Development of high-performance liquid chromatographic for quality and authenticity control of Chinese propolis. *J Food Sci.* 79: C1315-22. 2014.
11. Zhang J, Shen X, Wang K, Cao X, Zhang C, Zheng H, and Hu F. Antioxidant activities and molecular mechanisms of the ethanol extracts of *Baccharis propolis* and *Eucalyptus propolis* in RAW264.7 cells. *Pharm Biol.* 54: 2220-2235. 2016.
12. Zhang P, Tang Y, Li NG, Zhu Y, and Duan JA. Bioactivity and chemical synthesis of caffeic acid phenethyl ester and its derivatives. *Molecules.* 19: 16458-16476. 2014.

13. Murtaza G, Karim S, Akram MR, Khan SA, Azhar S, Mumtaz A, and Bin Asad MH. Caffeic acid phenethyl ester and therapeutic potentials. *Biomed Res Int.* 2014: 145342. 2014.
14. Seo KW, Park M, Song YJ, Kim SJ, and Yoon KR. The protective effects of Propolis on hepatic injury and its mechanism. *Phytother Res.* 17: 250-253. 2003.
15. Bhadauria M, Nirala SK, and Shukla S. Propolis protects CYP 2E1 enzymatic activity and oxidative stress induced by carbon tetrachloride. *Mol Cell Biochem.* 302: 215-24. 2007.
16. Sforcin JM. Biological Properties and Therapeutic Applications of EEBCP. *Phytother Res.* 30: 894-905. 2016.
17. Sforcin JM, and Bankova V. EEBCP: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol.* 133: 253-260. 2011.
18. Abo-Salem OM, El-Edel RH, Harisa GE, El-Halawany N, and Ghonaim MM. Experimental diabetic nephropathy can be prevented by propolis: Effect on metabolic disturbances and renal oxidative parameters. *Pak J Pharm Sci.* 22(2):205-210. 2009.
19. Nakamura T, Ohta Y, Ohashi K, Ikeno K, Watanabe R, Tokunaga K, and Harada N. Protective effect of Brazilian EEBCP against liver damage with cholestasis in rats treated with α -naphthylisothiocyanate. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013. 302720. 2013.
20. Sugimoto Y, Tarumi T, Kaneko Y, Isayama S, Kawai N, Sugimoto H, Yamada H, and Kamei C. Effect of propolis extract on D-galactosamine-induced hepatic injury in rats. *Biol Pharm Bull.* 122: 1237-1239. 1999.
21. Nakamura T, Ohta Y, Ohashi K, Ikeno K, Watanabe R, Tokunaga K, and Harada N. Protective effect of Brazilian EEBCP against hepatic oxidative damage in rats with water-immersion restraint stress. *Phytother Res.* 26: 1482–1489. 2012.
22. Jaeschke H, Williams CD, McGill MR, Xie Y, and Ramachandran A. Models of drug-induced liver injury for evaluation of phytotherapeutics and other natural products. *Food Chem Toxicol.* 55: 279-289. 2013.
23. Cummings AJ, King ML, and Martin BK. A kinetic study of drug elimination: the excretion of paracetamol and its metabolites in man. *Br J Pharmacol Chemother.* 29: 150–157. 1967.

24. Albert KS, Sedman AJ, and Wagner JG. Pharmacokinetics of orally administered acetaminophen in man. *J Pharmacokinet Biopharm.* 2: 381–393. 1974.
25. Clements JA, Critchley JA, and Prescott LF. The role of sulphate conjugation in the metabolism and disposition of oral and intravenous paracetamol in man. *Br J Clin Pharmacol.* 18: 481–485. 1984.
26. Dahlin DC, Miwa GT, Lu AY, and Nelson SD. N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81: 1327–1331. 1984.
27. Jaeschke H, and Bajt ML. Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. *Toxicol Sci.* 89: 31-41. 2006.
28. Jaeschke H, McGill MR, Williams CD, and Ramachandran A. Current issues with acetaminophen hepatotoxicity- a clinically relevant model to test the efficacy of natural products-. *Life Sci.* 88: 737-745. 2011.
29. Bantel H, and Schulze-Osthoff K. Mechanisms of cell death in acute liver failure. *Front Physiol.* 793: 1-879. 2012.
30. Yoshikawa Y, Morita M, Hosomi H, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T. Knockdown of superoxide dismutase 2 enhances acetaminophen-induced hepatotoxicity in rat. *Toxicology.* 264: 89-95. 2009.
31. Lei XG, Zhu JH, McClung JP, Aregullin M, and Roneker CA. Mice deficient in Cu,Zn-superoxide dismutase are resistant to acetaminophen toxicity. *Biochem J.* 399: 455-461. 2006.
32. Liu J, Wu KC, Lu YF, Ekuase E, and Klaassen CD. Nrf2 protection against liver injury produced by various hepatotoxicants. *Oxid Med Cell Longev.* 2013: 305861. 2013.
33. Maher JJ. DAMPs ramp up drug toxicity. *J Clin Invest.* 119: 246-249. 2009.
34. Martin-Murphy BV, Holt MP, and Ju C. The role of damage associated molecular pattern molecules in acetaminophen-induced liver injury in mice. *Toxicol Lett.* 192: 387-394. 2010.
35. Huebener P, Pradere JP, Hernandez C, Gwak GY, Caviglia JM, Mu X, Loike JD, Jenkins RE, Antoine DJ, and Schwabe RF. The HMGB1/RAGE axis triggers neutrophil-mediated injury

amplification following necrosis. *J Clin Invest.* 125(2):539-50. 2015.

36. Imaeda AB, Watanabe A, Sohail MA, Mahmood S, Mohamadnejad M, Sutterwala FS, Flavell RA, and Mehal WZ. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. *J Clin Invest.* 119: 305-314. 2009.
37. Blazka ME, Wilmer JL, Holladay SD, Wilson RE, and Luster MI. Role of proinflammatory cytokines in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 133: 43-52. 1995.
38. Chen CJ, Kono H, Golenbock D, Reed G, Akira S, and Rock KL. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med.* 13: 851-856. 2007
39. Mossanen JC, Krenkel O, Ergen C, Govaere O, Liepelt A, Puengel T, Heymann F, Kalthoff S, Lefebvre E, Eulberg D, Luedde T, Marx G, Strassburg CP, Roskams T, Trautwein C, and Tacke F. Chemokine (C-C Motif) receptor 2-positive monocytes aggravate the early phase of acetaminophen-induced acute liver injury. *Hepatology.* 64: 1667-1682. 2016.
40. Rumack BH. Acetaminophen misconceptions. *Hepatology.* 40: 10-15. 2004.
41. Sabaté M, Ibáñez L, Pérez E, Vidal X, Buti M, Xiol X, Mas A, Guarner C, Forné M, Solà R, Castellote J, Rigau J, and Laporte JR. Paracetamol in therapeutic dosages and acute liver injury: causality assessment in a prospective case series. *BMC Gastroenterol.*, 11: 1-7. 2007.
42. Whitcomb DC, and Block GD. Association of acetaminophen hepatotoxicity with fasting and ethanol use. *JAMA.* 272: 1845-1850. 1994.
43. Matsunaga N, Nakamura N, Yoneda N, Qin T, Terazono H, To H, Higuchi S, and Ohdo S. Influence of feeding schedule on 24-h rhythm of hepatotoxicity induced by acetaminophen in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 311: 594-600. 2004.
44. 増田康輔. 四塩化炭素からトキシコロジーを学ぶ. *薬学雑誌.* 126: 885-899. 2006
45. Recknagel RO, Glende EA Jr, Dolak JA, and Waller RL. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Ther.* 43: 139-154. 1989.
46. International Program on Chemical Safety (IPCS). Carbon Tetrachloride. 1999

47. Bruckner JV, Ramanathan R, Lee KM, and Muralidhara S. Mechanisms of circadian rhythmicity of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther.* 300: 273–281. 2002.
48. Jamshidzadeh A, Baghban M, Azarpira N, Mohammadi Bardbori A, and Niknahad H. Effects of tomato extract on oxidative stress induced toxicity in different organs of rats. *Food Chem Toxicol.* 46: 3612-3615. 2008
49. Yemitan OK, and Izegebu MC. Protective effects of *Zingiber officinale* (Zingiberaceae) against carbon tetrachloride and acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Phytother Res.* 20: 997-1002. 2006.
50. Ajith TA, Hema U, and Aswathy MS. *Zingiber officinale* Roscoe prevents acetaminophen-induced acute hepatotoxicity by enhancing hepatic antioxidant status. *Food Chem Toxicol.* 45: 2267-72. 2007.
51. Ray SD, Kumar MA, and Bagchi D. A novel proanthocyanidin IH636 grape seed extract increases in vivo Bcl-XL expression and prevents acetaminophen-induced programmed and unprogrammed cell death in mouse liver. *Arch Biochem Biophys.* 369: 42-58. 1999.
52. Liu SL, Degli Esposti S, Yao T, Diehl AM, Zern MA. Vitamin E therapy of acute CCl₄-induced hepatic injury in mice is associated with inhibition of nuclear factor kappa B binding. *Hepatology.* 22: 1474-1481. 1995.
53. Wong CK, Ooi VE, and Wong CK. Protective effects of N-acetylcysteine against carbon tetrachloride- and trichloroethylene-induced poisoning in rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 14: 109-116.2003.
54. Yang J, Li Y, Wang F, Wu C. Hepatoprotective effects of apple polyphenols on CCl₄-induced acute liver damage in mice. *J Agric Food Chem.* 58: 6525-6531. 2010.
55. Kodai S, Takemura S, Minamiyama Y, Hai S, Yamamoto S, Kudo S, Yoshida Y, Niki E, Okada S, Hirohashi K, and Suehiro S. S-allyl cysteine prevents CCl₄-induced acute liver injury in rats. *Free Radic Res.* 41: 489-497. 2007.
56. Muriel P, Alba N, Pérez-Alvarez VM, Shibayama M, and Tsutsumi VK. Kupffer cells inhibition prevents hepatic lipid peroxidation and damage induced by carbon tetrachloride. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 130: 219-226. 2001.

57. Kiso K, Ueno S, Fukuda M, Ichi I, Kobayashi K, Sakai T, Fukui K, and Kojo S. The role of Kupffer cells in carbon tetrachloride intoxication in mice. *Biol Pharm Bull.* 35: 980-983. 2012.
58. Nakajima Y, Tsuruma K, Shimazawa M, Mishima S, and Hara H. Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. *BMC Complement Altern Med.* 9: 4. 2009.
59. Izuta H, Narahara Y, Shimazawa M, Mishima S, Kondo S, and Hara H. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity of bee products and their constituents determined by ESR. *Biol Pharm Bull.* 32: 1947–1951. 2009.
60. Wang K, Hu L, Jin XL, Ma QX, Marcucci MC, Netto AAL, Sawaya ACHF, Huang S, Ren WK, Conlon MA, Topping DL, and Hu FL. Polyphenol-rich propolis extracts from China and Brazil exert anti-inflammatory effects by modulating ubiquitination of TRAF6 during the activation of NF- κ B. *J Funct Foods.* 19: 464–478. 2015.
61. Szliszka E, Kucharska AZ, Sokół-Łętowska A, Mertas A, Czuba ZP, and Król W. Chemical Composition and Anti-Inflammatory Effect of Ethanolic Extract of Brazilian Green Propolis on Activated J774A.1 Macrophages. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013: 1-13. 2013.
62. Kondo K, Yamada N, Suzuki Y, Toyoda K, Hashimoto T, Takahashi A, Kobayashi A, Shoda T, Kuno H, and Sugai S. Enhancement of acetaminophen-induced chronic hepatotoxicity in restricted fed rats: a nonclinical approach to acetaminophen-induced chronic hepatotoxicity in susceptible patients. *J. Toxicol. Sci.* 37: 911–929. 2012.
63. Miller KW, and Yang CS. Studies on the mechanisms of induction of N-nitrosodimethylamine demethylase by fasting, acetone, and ethanol. *Arch Biochem Biophys.* 229: 483–491. 1984.
64. González-Jasso E, López T, Lucas D, Berthou F, Manno M, Ortega A, and Albores A. CYP2E1 regulation by benzene and other small organic chemicals in rat liver and peripheral lymphocytes. *Toxicol Lett.* 144: 55–67. 2003.
65. Gonzalez FJ. The 2006 Bernard B. Brodie Award Lecture. Cyp2e1. *Drug Metab Dispos.* 35: 1–8. 2007.
66. Brown BL, Allis JW, Simmons JE, and House DE. Fasting for less than 24 h induces cytochrome P450 2E1 and 2B1/2 activities in rats. *Toxicol Lett.* 81: 39–44. 1995.
67. Rui L. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol.* 4: 177–197. 2014.

68. Mahoney LB, Denny CA, and Seyfried TN. Caloric restriction in C57BL/6J mice mimics therapeutic fasting in humans. *Lipids Health Dis.* 5: 13. 2006.
69. Sendelbach LE, White CA, Howell S, Gregus Z, and Klaassen CD. Effect of sulfhydryl-deficient diets on hepatic metallothionein, glutathione, and adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate (PAPS) levels in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 102: 259–267. 1990.
70. Tateishi N, Higashi T, Naruse A, Nakashima K, and Shiozaki H. Rat liver glutathione: possible role as a reservoir of cysteine. *J Nutr.* 107: 51–60. 1977.
71. Qin LQ, Wang Y, Xu JY, Kaneko T, Sato A, and Wang PY. One-day dietary restriction changes hepatic metabolism and potentiates the hepatotoxicity of carbon tetrachloride and chloroform in rats. *Tohoku J Exp Med.* 212: 379–387. 2007.
72. Bélanger PM, Desgagné M, and Bruguierolle B. Temporal variations in microsomal lipid peroxidation and in glutathione concentration of rat liver. *Drug Metab Dispos.* 19: 241–244. 1991.
73. Stankovic M, Mladenovic D, Ninkovic M, Vucevic D, Tomasevic T, and Radosavljevic T. Effects of caloric restriction on oxidative stress parameters. *Gen Physiol Biophys.* 32: 277–283. 2013.
74. Marczuk-Krynicka D, Hryniewiecki T, Piatek J, and Paluszak J. The effect of brief food withdrawal on the level of free radicals and other parameters of oxidative status in the liver. *Med Sci Monit.* 9: BR131-135. 2003.
75. Albrecht R, Pelissier MA, Atteba S, and Smaili M. Dietary restriction decreases thiobarbituric acid-reactive substances generation in the small intestine and in the liver of young rats. *Toxicol Lett.* 63: 91–96. 1992.
76. Xia E, Rao G, Van Remmen H, Heydari AR, and Richardson A. Activities of antioxidant enzymes in various tissues of male Fischer 344 rats are altered by food restriction. *J Nutr.* 125: 195–201. 1995.
77. Mohammadi M, Ghaznavi R, Keyhanmanesh R, Sadeghipour HR, Naderi R, and Mohammadi H. Caloric restriction prevents lead-induced oxidative stress and inflammation in rat liver. *ScientificWorldJournal.* 2014: 2014. 2014.

78. Lauterburg BH, Corcoran GB, and Mitchell JR. Mechanism of action of N-acetylcysteine in the protection against the hepatotoxicity of acetaminophen in rats in vivo. *J Clin Invest.* 71: 980-991. 1983.
79. Sugimura Y, and Yamamoto K. Effect of orally administered reduced and oxidized- glutathione against acetaminophen-induced liver injury in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 44: 613-624. 1998.
80. McGill MR, Lebofsky M, Norris HR, Slawson MH, Bajt ML, Xie Y, Williams CD, Wilkins DG, Rollins DE, and Jaeschke H. Plasma and liver acetaminophen-protein adduct levels in mice after acetaminophen treatment: dose-response, mechanisms, and clinical implications. *Toxicol Appl Pharmacol.* 269: 240-249. 2013.
81. Blazka ME, Wilmer JL, Holladay SD, Wilson RE, and Luster MI. Role of proinflammatory cytokines in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 133: 43–52. 1995.
82. Chen CJ, Kono H, Golenbock D, Reed G, Akira S, and Rock KL. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med.* 13: 851–856. 2007.
83. Glasgow SC, Ramachandran S, Blackwell TS, Mohanakumar T, and Chapman WC. Interleukin-1beta is the primary initiator of pulmonary inflammation following liver injury in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 293: L491–L496. 2007.
84. Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Lang R, and Iredale JP. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest.* 115: 56–65. 2005.
85. Zhai Y, Busuttil RW, and Kupiec-Weglinski JW. Liver ischemia and reperfusion injury: new insights into mechanisms of innate-adaptive immune-mediated tissue inflammation. *Am J Transplant.* 11: 1563–1569. 2011.
86. Bourdi M, Masubuchi Y, Reilly TP, Amouzadeh HR, Martin JL, George JW, Shah AG, and Pohl LR. Protection against acetaminophen-induced liver injury and lethality by interleukin 10: role of inducible nitric oxide synthase. *Hepatology.* 35: 289–298. 2002.
87. Kanno S, Tomizawa A, and Yomogida S. Detecting mRNA predictors of acetaminophen-induced hepatotoxicity in mouse blood using quantitative real-time PCR. *Biol Pharm Bull.* 39: 440–445. 2016

88. Hanawa N, Shinohara M, Saberi B, Gaarde WA, Han D, and Kaplowitz N. Role of JNK translocation to mitochondria leading to inhibition of mitochondria bioenergetics in acetaminophen-induced liver injury. *J Biol Chem.* 283: 13565-13577. 2008.
89. Jaeschke H, Knight TR, and Bajt ML. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Lett.* 144: 279-288. 2003.
90. Jaeschke H, and Ramachandran A. Oxidant stress and lipid peroxidation in acetaminophen hepatotoxicity. *React Oxy Species (Apex).* 5: 145-158. 2018.
91. Cover C, Liu J, Farhood A, Malle E, Waalkes MP, Bajt ML, and Jaeschke H. Pathophysiological role of the acute inflammatory response during acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 216: 98-107. 2006.
92. Lee KJ, Choi JH, Khanal T, Hwang YP, Chung YC, and Jeong HG. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Toxicology.* 248: 18–24. 2008.
93. Zhang C, Shen X, Chen J, Jiang X, and Hu F. Identification of Free Radical Scavengers from Brazilian Green Propolis Using Off-Line HPLC-DPPH Assay and LC-MS. *J Food Sci.* 82: 1602-1607. 2017.
94. Sehitoglu I, Tumkaya L, Bedir R, Ozer E, Cure MC, Kalkan Y, Yuce S, and Cure E. Protective Effect of Infliximab against Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 34: 175-182. 2015.
95. Zhu RZ, Xiang D, Xie C, Li JJ, Hu JJ, He HL, Yuan YS, Gao J, Han W, and Yu Y. Protective effect of recombinant human IL-1Ra on CCl₄-induced acute liver injury in mice. *World J Gastroenterol.* 16: 2771-2779. 2010.
96. Toriumi K, Horikoshi Y, Yoshiyuki Osamura R, Yamamoto Y, Nakamura N, and Takekoshi S. Carbon tetrachloride-induced hepatic injury through formation of oxidized diacylglycerol and activation of the PKC/NF- κ B pathway. *Lab Invest.* 93: 218-229. 2013.
97. Obici L, Raimondi S, Lavatelli F, Bellotti V, and Merlini G. Susceptibility to AA amyloidosis in rheumatic diseases: a critical overview. *Arthritis Rheum.* 61: 1435-1440. 2009.

98. Real de Asúa D, Costa R, Galván JM, Filigheddu MT, Trujillo D, and Cadiñanos. J. Systemic AA amyloidosis: epidemiology, diagnosis, and management. *Clin Epidemiol.* 6: 369–377. 2014.
99. Lane T, Gillmore JD, Wechalekar AD, Hawkins PN, and Lachmann HJ. Therapeutic blockade of interleukin-6 by tocilizumab in the management of AA amyloidosis and chronic inflammatory disorders: a case series and review of the literature. *Clin Exp Rheumatol.* 33: S46-53. 2015.
100. Obici L, and Merlini G. AA amyloidosis: basic knowledge, unmet needs and future treatments. *Swiss Med Wkly.* 142: w13580. 2012.
101. Shtrasburg S, Pras M, Rabinovich E, Gal R, Livneh A, and Lidar M. Attempts at suppression of amyloidogenesis in a mouse model by a variety of anti-inflammatory agents. *Autoimmun Rev.* 12: 18–21. 2012.
102. Conte V, Uryu K, Fujimoto S, Yao Y, Rokach J, Longhi L, Trojanowski JQ, Lee VM, McIntosh TK, and Praticò D. Vitamin E reduces amyloidosis and improves cognitive function in Tg2576 mice following repetitive concussive brain injury. *J Neurochem.* 90: 758–764. 2004.
103. Jesudason EP, Masilamoni JG, Ashok BS, Baben B, Arul V, Jesudoss KS, Jebaraj WC, Dhandayuthapani S, Vignesh S, and Jayakumar R. Inhibitory effects of short-term administration of DL- α -lipoic acid on oxidative vulnerability induced by A β amyloid fibrils (25-35) in mice. *Mol Cell Biochem.* 311: 145–156. 2008.
104. Lim GP, Chu T, Yang F, Beech W, Frautschy SA, and Cole GM. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J Neurosci.* 21: 8370–8377. 2011.
105. Zhang C, Browne A, Child D, and Tanzi RE. Curcumin decreases amyloid- β peptide levels by attenuating the maturation of amyloid- β precursor protein. *J Biol Chem.* 285: 28472–28480. 2010.
106. Ono K, Hasegawa K, Naiki H, and Yamada M. Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. *J Neurosci Res.* 75: 742–750. 2004.
107. Macedo B, Magalhães J, Batista AR, and Saraiva MJ. Carvedilol treatment reduces transthyretin deposition in a familial amyloidotic polyneuropathy mouse model. *Pharmacol Res.* 62: 514–522. 2010.

108. Kamata K, Mizukami H, Inaba W, Tsuboi K, Tateishi Y, Yoshida T, and Yagihashi S. Islet amyloid with macrophage migration correlates with augmented β -cell deficits in type 2 diabetic patients. *Amyloid*. 21: 191–201. 2014.
109. Ando Y, Nyhlin N, Suhr O, Holmgren G, Uchida K, el Sahly M, Yamashita T, Terasaki H, Nakamura M, Uchino M, and Ando M.. Oxidative stress is found in amyloid deposits in systemic amyloidosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 232: 497–502. 1997.
110. Liu R, Wu CX, Zhou D, Yang F, Tian S, Zhang L, Zhang TT, and Du GH. Pinocembrin protects against β -amyloid-induced toxicity in neurons through inhibiting receptor for advanced glycation end products (RAGE)-independent signaling pathways and regulating mitochondrion-mediated apoptosis. *BMC Med*. 10: 105. 2012.
111. Nakajima Y, Shimazawa M, Mishima S, and Hara H. Neuroprotective effects of Brazilian green propolis and its main constituents against oxygen-glucose deprivation stress, with a gene-expression analysis. *Phytother Res*. 23: 1431–1438. 2009.
112. Miyamae Y, Han J, Sasaki K, Terakawa M, Isoda H, and Shigemori H. 3,4,5-tri-O-caffeoylquinic acid inhibits amyloid β -mediated cellular toxicity on SH-SY5Y cells through the upregulation of PGAM1 and G3PDH. *Cytotechnology*. 63: 191–200. 2011.
113. Murakami T, Ishiguro N, and Higuchi K. Transmission of systemic AA amyloidosis in animals. *Vet Pathol*. 51: 363–371. 2014.
114. Murakami T, Inoshima Y, and Ishiguro N. Systemic AA amyloidosis as a prion-like disorder. *Virus Res*. 207: 76–81. 2015.
115. Hagihara K, Nishikawa T, Isobe T, Song J, Sugamata Y, and Yoshizaki K. IL-6 plays a critical role in the synergistic induction of human serum amyloid A (SAA) gene when stimulated with proinflammatory cytokines as analyzed with an SAA isoform real-time quantitative RT-PCR assay system. *Biochem Biophys Res Commun*. 314: 363–369. 2004.
116. Ma Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 53: 401–426. 2013.
117. Ichi I, Hori H, Takashima Y, Adachi N, Kataoka R, Okihara K, Hashimoto K, Kojo S. The beneficial effect of propolis on fat accumulation and lipid metabolism in rats fed a high-fat diet. *J Food Sci*. 74: H127–31. 2009.

118. Ruiz Silva M, van der Ende-Metselaar H, Mulder HL, Smit JM, and Rodenhuis-Zybert IA. Mechanism and role of MCP-1 upregulation upon chikungunya virus infection in human peripheral blood mononuclear cells. *Sci Rep*. 6: 32288. 2016.
119. Lundmark K, Vahdat Shariatpanahi A, and Westermarck GT. Depletion of spleen macrophages delays AA amyloid development: a study performed in the rapid mouse model of AA amyloidosis. *PLoS One*. 8: e79104. 2013.
120. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 87: 2095-2147. 1996.
121. Schnitzler P, Neuner A, Nolkemper S, Zundel C, Nowack H, Sensch KH, and Reichling J. Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. *Phytother Res*. 24 :20-28. 2010.
122. Silva-Carvalho R, Baltazar F, and Almeida-Aguiar C. Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015: 29. 2015.
123. Amoros M, Sauvager F, Girre L, and Cormier M. In vitro antiviral activity of propolis. *Apidologie*. 23: 231-240. 1992.
124. Maksimova-Todorova V, Manolova N, Gegova G, Serkedzhieva Iu, and Uzunov S. Antiviral effects of some fractions isolated from propolis. *Acta Mic Bulg* 17: 79-85. 1985.
125. Bonvehí JS, and Bermejo FO. Element content of propolis collected from different areas of South Spain. *Environ Monit Assess* 185: 6035-6047. 2013.
126. Marcucci MC, Ferreres F, García-Viguera C, Bankova VS, De Castro SL, Dantas AP, Valente PH, and Paulino N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol* 74: 105-112. 2001.
127. Gao W, Wu J, Wei J, Pu L, Guo C, Yang J, Yang M, and Luo H. Brazilian green propolis improves immune function in aged mice. *J Clin Biochem Nutr* 55: 7-10. 2014.
128. Sforcin J. Propolis and the immune system: A review. *J Ethnopharmacol*. 113: 1-14. 2007.
129. Fukushi H, Tomita T, Taniguchi A, Ochiai Y, Kirisawa R, Matsumura T, Yanai T, Masegi T,

- Yamaguchi T, and Hirai K. Gazelle herpesvirus 1: a new neurotropic herpesvirus immunologically related to equine herpesvirus 1. *Virology* 227: 34-44. 1997.
130. Yanai T, Sakai T, Fukushi H, Hirai K, Narita M, Sakai H, and Masegi T. Neuropathological study of gazelle herpesvirus 1 (equine herpesvirus 9) infection in Thomson's gazelles (*Gazella thomsoni*). *J Comp Pathol* 119: 159-168. 1998.
 131. El-Habashi N, El-Nahass ES, Namihira Y, Hagiwara H, and Fukushi H. Neuropathogenicity of equine herpesvirus 9 in cattle. *J Equine Vet Sci* 31: 72-77. 2011.
 132. Taniguchi A, Fukushi H, Matsumura T, Yanai T, Masegi T, and Hirai K. Pathogenicity of a new neurotropic equine herpesvirus 9 (gazelle herpesvirus 1) in horses. *J Vet Med Sci* 62: 215-218. 2000.
 133. Taniguchi A, Fukushi H, Yanai T, Masegi T, Yamaguchi T, and Hirai K. Equine herpesvirus 9 induced lethal encephalomyelitis in experimentally infected goats. *Arch Virol* 145: 2619-2627. 2000.
 134. Yanai T, Fujishima N, Fukushi H, Hirata A, Sakai H, and Masegi T. Experimental infection of equine herpesvirus 9 in dogs. *Vet Pathol* 40: 263-267. 2003.
 135. El-Habashi N, Kato Y, El-Nahass E, Fukushi H, Hirata A, Sakai H, Kimura J, and Yanai T. An ocular infection model using suckling hamsters inoculated with equine herpesvirus 9 (EHV-9): kinetics of the virus and time-course pathogenesis of EHV-9-induced encephalitis via the eyes. *Vet Pathol* 50: 56-64. 2013.
 136. El-Habashi N, Murakami M, El-Nahass E, Hibi D, Sakai H, Fukushi H, Sasseville V, and Yanai T. Study on the infectivity of equine herpesvirus 9 (EHV-9) by different routes of inoculation in hamsters. *Vet Pathol*. 48: 558-564. 2011.
 137. Saleh AG, Anwar SI, Abas OM, Abd-Ellatieff HA, Nasr M, Saleh I, Fukushi H, and Yanai T. Effect of a single point mutation on equine herpes virus 9 (EHV-9) neuropathogenicity after intranasal inoculation in a hamster model. *J Vet Med Sci* 79: 1426-1436. 2017.
 138. Escobedo G, Palacios-Arreola MI, Olivos A, López-Griego L, and Morales-Montor J. Tamoxifen treatment in hamsters induces protection during taeniosis by *Taenia solium*. *BioMed res inter*. 10. 2012.

- 139.Vernel-Pauillac F, and Merien F. Proinflammatory and immunomodulatory cytokine mRNA time course profiles in hamsters infected with a virulent variant of *Leptospira interrogans*. *Infecand immun* 74: 4172-4179. 2006.
- 140.Kamboj A , Saluja AK , Kumar M , and Atri P. Antiviral activity of plant polyphenols. *J Pharm Res.* 5: 2402-2412. 2012.
- 141.Debiaggi M, Tateo F, Pagani L, Luini M, and Romero E. Effects of propolis flavonoids on virus infectivity and replication. *Microbiologica.* 13: 207-213. 1990.
- 142.Chen PC, and Wong G. Honey bee propolis: prospects in medicine. *Bee World.* 77: 8-15. 1996
- 143.Fischer G, Conceição FR, Leite FP, Dummer LA, Vargas GD, Hübner Sde O, Dellagostin OA, Paulino N, Paulino AS, Vidor T. Immunimodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. *Vaccine* 25: 1250-1256. 2007.
- 144.Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman R, Locksley RM. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med* 169: 59-72. 1989.
- 145.Squires KE, Schreiber RD, McElrath MJ, Rubin BY, Anderson SL, and Murray HW. Experimental visceral leishmaniasis: role of endogenous IFN-gamma in host defense and tissue granulomatous response. *The J Immunol* 143: 4244-4249. 1989.
- 146.Fukushi H, Taniguchi A, Yasuda K, Yanai T, Masegi T, Yamaguchi T, and Hirai K. A hamster model of equine herpesvirus 9 induced encephalitis. *J Neurovirol* 6: 314-319. 2000.
- 147.Narita M, Uchimura A, Kawanabe M, Fukushi H, and Hirai K. Invasion and spread of equine herpesvirus 9 in the olfactory pathway of pigs after intranasal inoculation. *J Comp Pathol* 124: 265-272. 2001.
- 148.Muriel P. NF-kappaB in liver diseases: a target for drug therapy. *J Appl Toxicol.* 29: 91–100. 2009.
- 149.Szabo G, and Csak T. Inflammasomes in liver diseases. *J Hepatol.* 57: 642–654. 2012.
- 150.Paulino N, Abreu SR, Uto Y, Koyama D, Nagasawa H, Hori H, Dirsch VM, Vollmar AM, Scremin A, and Bretz WA. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, artepillin C, in

Brazilian propolis. *Eur J Pharmacol.* 587: 296–301. 2008.

151. Szliszka E, Mertas A, Czuba ZP, and Król W. Inhibition of Inflammatory Response by Artepillin C in Activated RAW264.7 Macrophages. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013: 1-11. 2013.
152. Chan GC, Cheung KW, and Sze DM. The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 44: 262-273. 2013.
153. Martignoni M, Groothuis GM, and de Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2: 875–894. 2006.
154. Konishi Y, Hitomi Y, Yoshida M, and Yoshioka E. Absorption and bioavailability of artepillin C in rats after oral administration. *J Agric Food Chem.* 53: 9928–9933. 2005.