

氏名（本（国）籍）	土 屋 祐 弥（静岡県）
主指導教員氏名	岐阜大学 教授 柳 井 徳 磨
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	獣医博甲第510号
学位授与年月日	平成30年9月21日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	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
審査委員	主査 東京農工大学 教授 渋谷 淳 副査 帯広畜産大学 教授 古 林 与志安 副査 岩 手 大 学 教 授 佐 藤 洋 副査 東京農工大学 准教授 吉 田 敏 則 副査 岐 阜 大 学 教 授 柳 井 徳 磨

学位論文の内容の要旨

プロポリスは、ミツバチが自らの分泌物と樹木の樹液などを混合して作る樹脂状物質であり、伝統的医薬品やサプリメントとして健康増進に利用されている。ブラジル産グリーンプロポリスのエタノール抽出物（Ethanollic extract of Brazilian green propolis; EEBGP）は、プレニル化フェニルプロパノイド類やフラボノイド類を含み、抗酸化作用、抗炎症作用、抗ウイルス作用などを有する。EEBGP は、実験的に糖尿病性腎症や薬物性肝毒性に対して、抗酸化作用に関連した保護作用を示す。本研究では、異なる4種の疾病モデルを用いて、EEBGP の防御効果について検討し、その防御作用のメカニズムを解明した。

第1章では、最初に予備検討として、ラットを用いた実験で肝毒性物質の代謝に対する時間帯や摂餌条件の影響を検討し、既知の絶食下と同様に、10日間の制限給餌（自由摂餌下の70%）下においても、自由摂餌下と比較して Cytochrome P450 2E1 (*Cyp2e1*) 遺伝子の発現量が増加し、肝臓グルタチオン量が低下することを明らかにした。次いで、各種条件の組み合わせで、800 mg/kg 体重のアセトアミノフェン(APAP)を投与したところ、自由摂餌下9:00の投与では肝細胞壊死はみられなかったが、絶食下および制限給餌条件下の投与では肝細胞壊死が観察された。一方、最も強い障害は、遺伝子発現やグルタチオン量に顕著な変化がみられなかったものの、APAP投与から剖検まで絶食した自由摂餌下16:00の投与で観察されたことから、肝障害の程度には *Cyp2e1* 遺伝子やグルタチオン量の変化よりも、APAP投与後の摂餌が強く影響している可能性が示唆された。一方、四塩化炭素に

ついて、自由摂餌下と絶食下での投与で障害の程度を比較したところ、*Cyp2e1* 遺伝子の変化を反映して絶食下でより強い障害が観察された。次いで、EEBGP の保護効果を検討するために、最も強い障害のみられた自由摂餌下における 16:00 での APAP 投与に先んじて、0.3% EEBGP の 7 日間混餌投与を行ったところ、肝細胞壊死の範囲が縮小した。その作用メカニズムを確認するため関連遺伝子の発現を検討した結果、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、炎症関連遺伝子を発現低下させた。また、Interleukin (IL)-18 (*Il1b*)や IL-10 (*Il10*)の遺伝子発現量と肝細胞壊死の範囲に相関がみられたことから、EEBGP は炎症反応を調整して、APAP による組織障害を軽減した可能性が考えられた。次いで、四塩化炭素誘発性の肝細胞壊死および肝細胞の脂肪変性に対して、1.2% EEBGP の 7 日間混餌投与の効果を検討した結果、特に影響を認めなかった。

第 2 章では、マウスを用いたアミロイド A (AA) アミロイド症モデルに対する EEBGP の保護効果を検討した。すなわち、炎症反応惹起の前後 17 日間、EEBGP を 0.02~0.5% の用量で混餌投与したところ、肝臓および脾臓のアミロイド沈着の程度が低下することを見出した。炎症刺激後の血中 Serum amyloid A (SAA) 量に EEBGP 投与は影響を与えなかったが、肝臓において抗酸化酵素遺伝子の発現増加と炎症関連遺伝子の発現低下がみられ、これらの遺伝子発現の変化と肝臓のアミロイド沈着量に相関がみられた。以上のことから、EEBGP は SAA の産生ではなく、抗酸化酵素の誘導に伴う抗酸化能の向上と、炎症反応の制御により SAA の変性を抑制し、結果としてアミロイド線維の伸長および組織への沈着を抑制したものと考えられた。

第 3 章では、シリアンハムスターの equine herpes virus-9 型 (EHV-9) 感染による急性脳炎モデルにおいて EEBGP の保護効果を検討した。EHV-9 感染前に 7 日間、EEBGP を経口投与したところ、感染後の急性脳炎の発生率や脳の組織像に 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 IL-2 (*Il2*), *Il10* および Interferon- γ (*Ifng*) 遺伝子の発現量が EEBGP を投与した動物で早いタイミングで増加しており、EEBGP が免疫機能に影響を与える可能性が考えられた。

以上、本研究を通じて EEBGP が APAP 誘発性肝障害および AA アミロイド症に対して保護効果を示すことが明らかになり、その作用メカニズムに関して炎症の制御と抗酸化酵素誘導が関与することが推測された。薬害性の肝障害はしばしば日常的に問題となる疾病であり、難病とされるアミロイド症の予防に、EEBGP が一定の効果を示すことを明らかにした。すなわち、EEBGP の健康食品素材として可能性を示したと考える。

審 査 結 果 の 要 旨

申請者は、ブラジル産グリーンプロポリスのエタノール抽出物 (EEBGP) について、異なる 4 種の疾病モデルを用いて、その疾病防御効果を検討し、さらに防御作用のメカニズムについて明らかにした。

第 1 章では、まず、ラットを用いてアセトアミノフェン (APAP) の毒性発現について給餌条件の影響を検討したところ、既知の絶食下と同様に、10 日間の制限給餌 (自由摂餌下の 70%) 下においても、自由摂餌下に比較して Cytochrome P450 2E1 (*Cyp2e1*) 遺伝子の発現量や肝臓グルタチオン量に変化し、それが APAP により誘発される肝細胞壊死の出現程度に影響を与えることを見出した。一方、最も強い障害は遺伝子発現やグルタチオン量に顕著な変化がない条件下で見出された。当該条件のみ APAP 投与後剖検まで絶食したことから、*Cyp2e1* 遺伝子やグルタチオン量の変化よりも、APAP 投与後の摂餌条件の方が肝障害の程度に強く影響を示す可能性が示唆された。次いで最も強い障害のみられた条件下で APAP を投与し、EEBGP の保護効果を検討したところ、0.3% EEBGP の 7 日間混餌投与により肝細胞壊死の範囲が縮小した。遺伝子発現解析の結果、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なかったものの、炎症関連遺伝子の発現低下を認めた。その中で Interleukin (IL)-1 β (*Il1b*) 遺伝子や IL-10 (*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ことから、EEBGP は炎症反応を調整して、APAP による組織障害を軽減した可能性が示唆された。次いで、四塩化炭素誘発性の肝細胞壊死および肝細胞の脂肪変性に対して、1.2% EEBGP の 7 日間混餌投与の効果を検討した結果、特に影響を認めなかった。

第 2 章では、マウスを用いて、EEBGP がアミロイド A (AA) アミロイド症モデルに対して保護効果を有することを明らかにした。すなわち、炎症反応惹起の前後 17 日間、EEBGP を 0.02~0.5% の用量で混餌投与することにより、肝臓および脾臓のアミロイド沈着量が低下傾向を示した。炎症刺激後の血中 Serum amyloid A (SAA) 量に EEBGP は影響を与えなかったが、肝臓では抗酸化酵素遺伝子の発現の増加と炎症関連遺伝子の発現低下がみられ、これらの遺伝子発現の変化と肝臓のアミロイド沈着量が相関した。以上の結果から、EEBGP は SAA の産生ではなく、抗酸化酵素の誘導に伴う抗酸化能の向上と、炎症反応の制御により SAA の変性を抑制し、結果としてアミロイド線維の伸長および組織への沈着を抑制したと考えられた。

第 3 章では、シリアンハムスターの equine herpes virus-9 型 (EHV-9) 感染による急性脳炎モデルを用いて、EEBGP の保護効果を検討した。EHV-9 感染前に 7 日間、EEBGP を経口投与した結果、急性脳炎の発生率や脳の組織像に 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 IL-2 (*Il2*)、*Il10* および Interferon- γ (*Ifng*) 遺伝子の発現量は EEBGP を投与した動物で早い時期に増加しており、EEBGP が免疫機能に影響を与える可能性が考えられた。

以上、EEBGP は APAP 誘発性肝障害および AA アミロイド症に対して保護効果を示すことを明らかにし、その作用メカニズムとして炎症反応の制御と抗酸化酵素の誘導が関与するものと考えられた。

以上について、慎重に審議し、審査委員全員が本論文は岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分な価値を有すると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Inhibitory effect of propolis on the development of AA amyloidosis
著 者 名 : Harata, D., Tsuchiya, Y., Miyoshi, T., Yanai, T., Suzuki, K. and Murakami, T.
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology
巻・号・頁・発行年 : 31 (2) : 89-93, 2018
- 2) 題 目 : Effects of food restriction on the expression of genes related to acetaminophen-induced liver toxicity in rats
著 者 名 : Tsuchiya, Y., Sakai, H., Hirata, A. and Yanai, T.
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology
巻・号・頁・発行年 : In press
- 3) 題 目 : Brazilian green propolis suppresses acetaminophen-induced hepatocellular necrosis by modulating inflammation-related factors in rats
著 者 名 : Tsuchiya, Y., Sakai, H., Hirata, A. and Yanai, T.
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology
巻・号・頁・発行年 : In press
- 4) 題 目 : Evaluation of preventive effects of Brazilian green propolis on equine herpesvirus 9-induced acute encephalitis
著 者 名 : Tsuchiya, Y., Abd-Ellatieff, H.A., Abou, Rawash, A.A. and Yanai, T.
学術雑誌名 : Journal of Veterinary Science & Medical Diagnosis
巻・号・頁・発行年 : In press

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Effect of mouse strain on equine herpesvirus 9 infection
著 者 名 : El-Nahass, E., El-Habashi, N., El-Dakhly, K.M., Tsuchiya, Y. and Yanai, T.
学術雑誌名 : Journal of Comparative Pathology
巻・号・頁・発行年 : 157 (1) : 67-74, 2017