

日本国産蜂蜜による好中球の走化活性に及ぼす影響

平成 27 年 5 月 19 日受付

田 中 美 子¹⁾
高 崎 摩依子²⁾
三 輪 奈緒子²⁾
高 橋 純 一^{1,2)}
竹 内 実^{1,2)}

¹⁾ 京都産業大学ミツバチ産業科学研究センター

²⁾ 京都産業大学総合生命科学部

要 旨

蜂蜜は蜜蜂により産生される天然成分で、食用としてだけでなく、健康維持や創傷、風邪、皮膚炎の治療薬として世界で広く利用されている。我々は、これまでにナイジェリア産の蜂蜜が免疫作用を示すことや、日本国産蜂蜜のマウス腹腔内投与により、細菌感染に重要な役割を果たしている自然免疫系の免疫細胞の1つである好中球が誘導されることを報告してきた。そこで今回、日本国産蜂蜜による好中球の走化活性の指標である方向性 (Direction) と 移動速度 (Velocity) に及ぼす影響について、ソバ、クリ、シロハナマメ、ミカン、トチ、フカ、レンゲ、アカシア、百花蜂蜜を用いて検討した。Direction は、蜂蜜 10 mg/ml の濃度で、ソバ、シロハナマメ、レンゲ蜂蜜で有意な増強、Velocity は、ソバ、アカシア、レンゲ蜂蜜で有意な増強が認められ、日本国産蜂蜜は好中球の走化活性を増強することが認められた。特に、レンゲ蜂蜜では反応 30 分後において、多くの好中球の遊走が確認された。以上より、日本国産蜂蜜は好中球の運動性 (走化性) を促進することから、細菌感染においてすばやく感染部位に好中球を誘導し、感染予防に効果があることが示唆された。

キーワード：日本国産蜂蜜、好中球、走化活性、方向性、移動速度

1. はじめに

蜂蜜は、蜜蜂によって産生される天然成分であり、フルクトース、グルコース、マルトースの他、アミノ酸やビタミン、フラボノイドなど様々な化合物を含んでおり、世界中の国々で食用として親しまれている^{1,2)}。また、蜂蜜は食用としてだけでなく、健康維持の他、怪

我、火傷など創傷治癒、美容などさまざまな用途に用いられている。特定の花から集められた蜂蜜は単花蜂蜜と呼ばれ、Manuka honey、Acacia honeyなどがよく知られている。蜂蜜の一般的な作用としては抗菌作用があることが知られており^{3,4)}、その中でも Manuka honey の強い抗菌作用が注目されている。その作用はマヌカハニーに含まれるメチルグリオキサール (MGO) によるものであり、その抗菌効果は、フェノール溶液の濃度に換算され、ユニーク・マヌカ・ファクター (UMF) として数値化され評価されている^{5,6,7)}。

蜂蜜による免疫機能への影響としては、Jelly bush honey、Manuka honey、Pasture honey による MonoMac-6 単球細胞株の TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 の発現増加^{8,9)} や、Manuka honey に含まれる 5.8 kDa の物質による TLR4 を介した TNF- α の発現増加¹⁰⁾ などが報告されている。また我々の研究室でも、日本国産蜂蜜による肺胞マクロファージの IL-1 β 、CXCL1、CXCL2、TNF- α の発現増加を報告してきた¹¹⁾。CXCL1、CXCL2 は炎症時に局所へ好中球を遊走させるケモカインである。蜂蜜は好中球に対するケモカインを増強することから、好中球と関連していることが考えられる。

好中球は、細菌感染やウイルスなどの様々な刺激に対して末梢血から組織に浸潤し、貪食や殺菌を行う免疫細胞であり、顆粒内の強力な殺菌能を有する細胞溶解酵素や ROS を生成することで病原体の殺菌を行っている¹²⁾。好中球は、fMLP などの細菌由来ペプチドによる刺激により感染部位に遊走し、殺菌能を発揮する。したがって、好中球の走化活性に及ぼす日本国産蜂蜜の影響を調べることは非常に重要である。我々の研究室でも、ナイジェリア産の蜂蜜であるジャングルハニーが、好中球の走化活性を増強する作用があることを報告してきた^{13,14,15)}。しかし、日本国産蜂蜜による好中球の走化活性への影響についての報告はまだされていない。そこで、日本国産蜂蜜が好中球の走化活性へ及ぼす影響について検討した。

2. 材料及び方法

1. 実験動物

モルモット 5～6 週齢の Hartley、雄モルモットを使用した。尚、本研究の動物実験は、京都産業大学動物実験規定に基づき動物実験員会により承認された。

2. 日本国産蜂蜜の調製

蜂蜜はソバ (長谷川養蜂場、北海道産)、クリ (小野養蜂場、岩手県産)、シロハナマメ (種田養蜂場、北海道産)、ミカン (山口養蜂場、徳島県産)、アカシア (群馬養蜂協会、群馬県産)、トチ (黒田養蜂場、栃木県産)、フカ (沖縄県養蜂協会、沖縄県産)、レンゲ (中村養蜂園、熊本県産)、百花 (京都産業大学竹内研究室、京都府産) 蜂蜜を使用した (表 1)。それぞれの蜂蜜は大塚生理食塩水 [生食水 (大塚製薬)] で 500 mg/ml になるよう調製し、0.22 μ m フィル

表1 使用した日本国産蜂蜜の蜜源、生産地および糖度

蜂蜜の蜜源	産地	糖度 (%)
ソバ	北海道	79.5
クリ	岩手県	80.7
シロハナマメ	北海道	80.1
ミカン	徳島県	77.2
アカシア	群馬県	82.0
トチ	栃木県	78.5
フカ	沖縄県	80.0
レンゲ	熊本県	77.7
百花	京都府	82.6

ター (MILLIPORE) を通して滅菌後、保存した。また、走化活性の陽性コントロールとして N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) を生食水で 1 mg/ml に調製し、対照物質として蜂蜜の主要成分であるグルコース (ナカライテスク)、およびフルクトース (和光) を生食水で 500 mg/ml に調製し、蜂蜜溶液と同様に滅菌後、保存した。それぞれの実験には、各保存溶液を生食水で各濃度に希釈し、使用した。

3. Lipopolysaccharide (LPS) の調製

LPS はナカライテスク株式会社より購入した。LPS を PBS(-) で 1 mg/ml に希釈し、 -20°C で保存した。

4. 末梢血好中球の分離

末梢血好中球は、モルモットの心採血で得られた血液より分離された。モルモットにソムノベンチル (共立製薬) 40 mg/kg を投与し麻酔した後、ヘパリンを少量加えた注射器で採血後、血液を PBS で 2 倍希釈し、それと等量の 3.5% デキストランを加え、室温で 30 分間静置して赤血球を沈殿させた。30 分後、二層に分かれた中の白血球が含まれている上層を取り出し、PBS(-) 5 ml を加え、1000 rpm、10 分、 4°C で遠心洗浄を行った。遠心後、上清を取り除き R(+) 4 ml に再懸濁し、3 ml のリンパ球分離溶液 (ナカライテスク) の上に静かに重層し、1500 rpm、30 分間、 20°C で遠心した。遠心後、三層の内の下層のみを残し、PBS(-) 5 ml を加え 1000 rpm、10 分、 4°C で遠心洗浄を行った。遠心後、再度同様の方法で分離を行った。遠心後、得られた沈査に Lysis Solution (NH_4Cl 、 NaHCO_3 、EDTA) 2 ml を加え、室温で 1 分静置し赤血球を溶解させた後、1000 rpm、5 分、 4°C で遠心し、回収された細胞を好中球とした。好中球は、 2×10^6 個/ml に調製し使用した。なお、分離した好中球の純度は 85% 以上であった (図 1)。

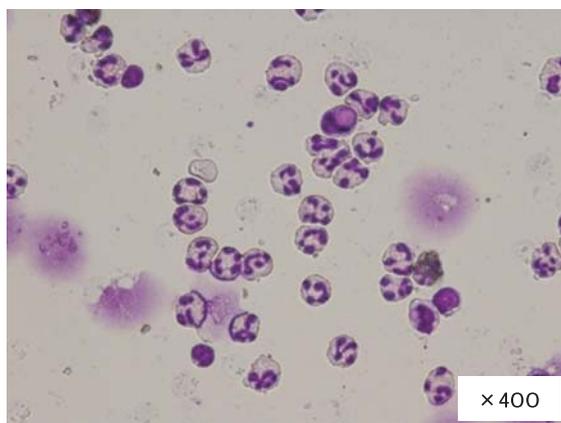


図1 モルモット末梢血より分離した好中球

5. 日本国産蜂蜜の好中球に対する走化活性

走化性の測定には水平式走化性解析装置 EZ-TAXIScan を用いた。EZ-TAXIScan 用チップの各チャンネルに上記で得た好中球を $1\ \mu\text{l}$ (2×10^9 個) 注入し、好中球を注入した反対側に、日本国産蜂蜜溶液 $10\ \text{mg/ml}$ 、fMLP $10^{-6}\ \text{M}$ および生食水を $1\ \mu\text{l}$ ずつ注入し濃度勾配を作り、 37°C で 30 分間、30 秒間隔で細胞の動きを撮影し、TAXIScan Analyzer 2 の Cell Tracking ソフトを用いて、好中球の走化活性（運動性）機能について、細胞移動の方向性（Direction）と移動速度（Velocity）を解析した。

6. 有意差検定

すべての実験において平均値と標準誤差を求め、成績値は平均値（mean） \pm 標準誤差（standard error: S.E.）で表示した。有意差検定は student's t-test によりコントロール群（生食水群）と蜂蜜群を比較し、p 値を求め $p < 0.05$ を有意とした。

3. 結果

1. 日本国産蜂蜜による好中球の走化活性

1) 方向性と移動速度

走化活性は、方向性（Direction）と移動速度（Velocity）について解析した。Direction は、生食水添加の方向性比率を 1.00 とした場合、ソバ添加 5.72 ± 1.81 （mean \pm SE）、fMLP 添加 4.15 ± 0.60 で有意（ $p < 0.001$ ）、シロハナマメ添加 3.02 ± 1.10 、レンゲ添加 3.17 ± 0.50 で有意（ $p < 0.05$ ）な増強が認められ、走化活性が確認された。クリ添加 0.79 ± 0.18 、ミカン添加 1.23 ± 0.33 、アカシア添加 1.43 ± 0.56 、トチ添加 0.01 ± 0.09 、フカ添加 0.79 ± 0.24 、

百花添加 2.08 ± 0.53 、LPS 添加 0.81 ± 0.21 、グルコース添加 1.80 ± 0.29 、フルクトース添加 1.86 ± 0.52 では有意な差は認められなかった (図 2a)。また、Velocity は、生食水添加の移動速度比率を 1.00 とした場合、fMLP 添加 1.53 ± 0.04 で有意 ($p < 0.001$)、ソバ添加 1.52 ± 0.13 で有意 ($p < 0.01$)、アカシア添加 1.14 ± 0.05 、レンゲ添加 1.48 ± 0.05 で有意 ($p < 0.05$) な増強が認められ、走化活性が確認された。クリ添加 0.93 ± 0.10 、シロハナメ添加 1.18 ± 0.04 、ミカン添加 1.20 ± 0.11 、トチ添加 0.92 ± 0.04 、フカ添加 0.91 ± 0.24 、百花添加 1.25 ± 0.10 、LPS 添加 1.00 ± 0.12 、グルコース添加 1.27 ± 0.16 、フルクトース添加 1.14 ± 0.17 では有意な差は認められなかった (図 2b)。

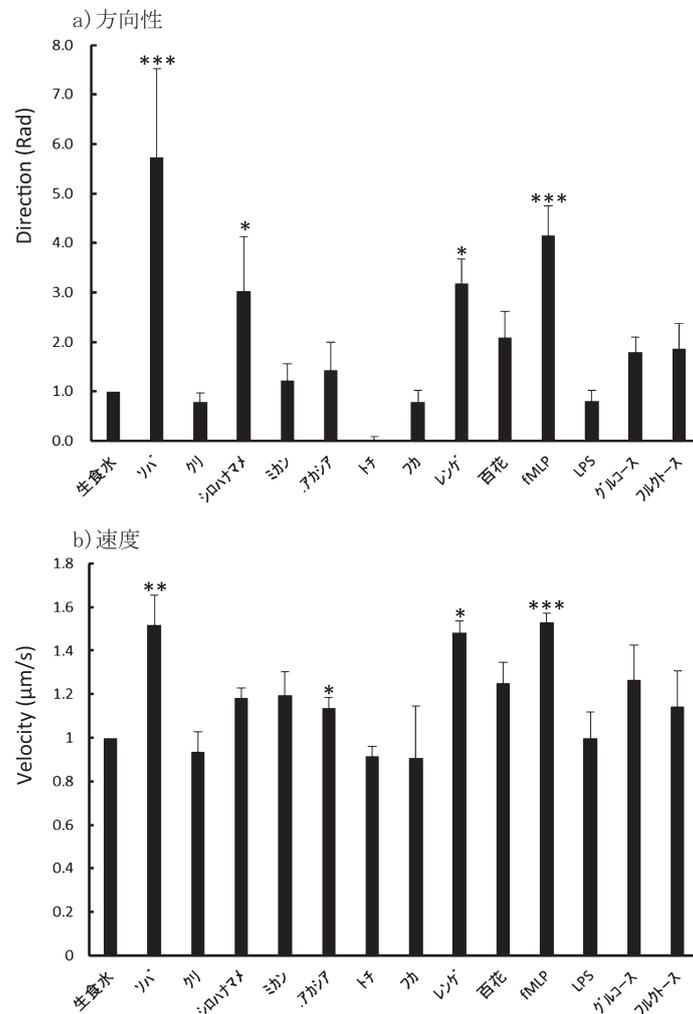


図 2 日本国産蜂蜜による好中球の方向性と移動速度
蜂蜜最終濃度 (10 mg/ml), * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$

2) 移動細胞数

特に、レンゲ蜂蜜では、好中球の走化性、移動速度の増強が認められた（図3）。方向性と移動速度ともに強い有意な増強が認められたレンゲ蜂蜜による、好中球の移動細胞数を検討した。レンゲ蜂蜜による好中球の移動細胞数は、生食水添加に比べ、反応30分後に多くの好中球の遊走が認められた。一方、蜂蜜の主成分であるグルコース、フルクトースでは好中球の遊走は認められなかった（図4a～d）。次に、蜂蜜添加30分後の移動好中球数は、生食水添加23個、レンゲ添加43個で、生食水添加に比べレンゲ蜂蜜添加で移動好中球数の増加が認められた（図5）。

3) 経時的变化

レンゲ蜂蜜において好中球の走化活性の増強が認められたため、走化活性の経時的变化についてヒストグラムで検討した。好中球の走化活性の経時的变化は、生食水添加に比べ、レンゲ蜂蜜添加において、走化活性の増加傾向が認められた。走化因子であるfMLPが反応後5分から10分で強い走化活性が認められたのに比べ、レンゲ蜂蜜は持続的に強い走化活性が確認された（図6）。これらの結果より、日本国産蜂蜜が好中球の走化活性を示すことが認められ、好中球に対して走化因子として働く可能性が示唆された。

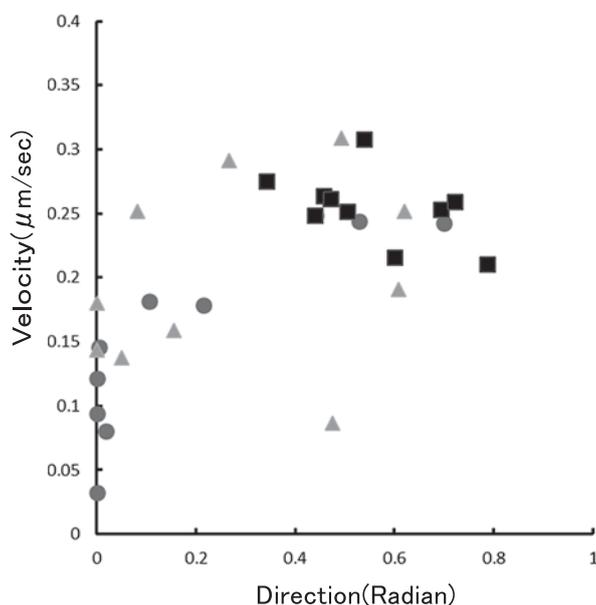


図3 レンゲ蜂蜜による好中球の走化活性
●：生食水, ▲：レンゲ蜂蜜, ■：fMLP
蜂蜜最終濃度 (10 mg/ml)

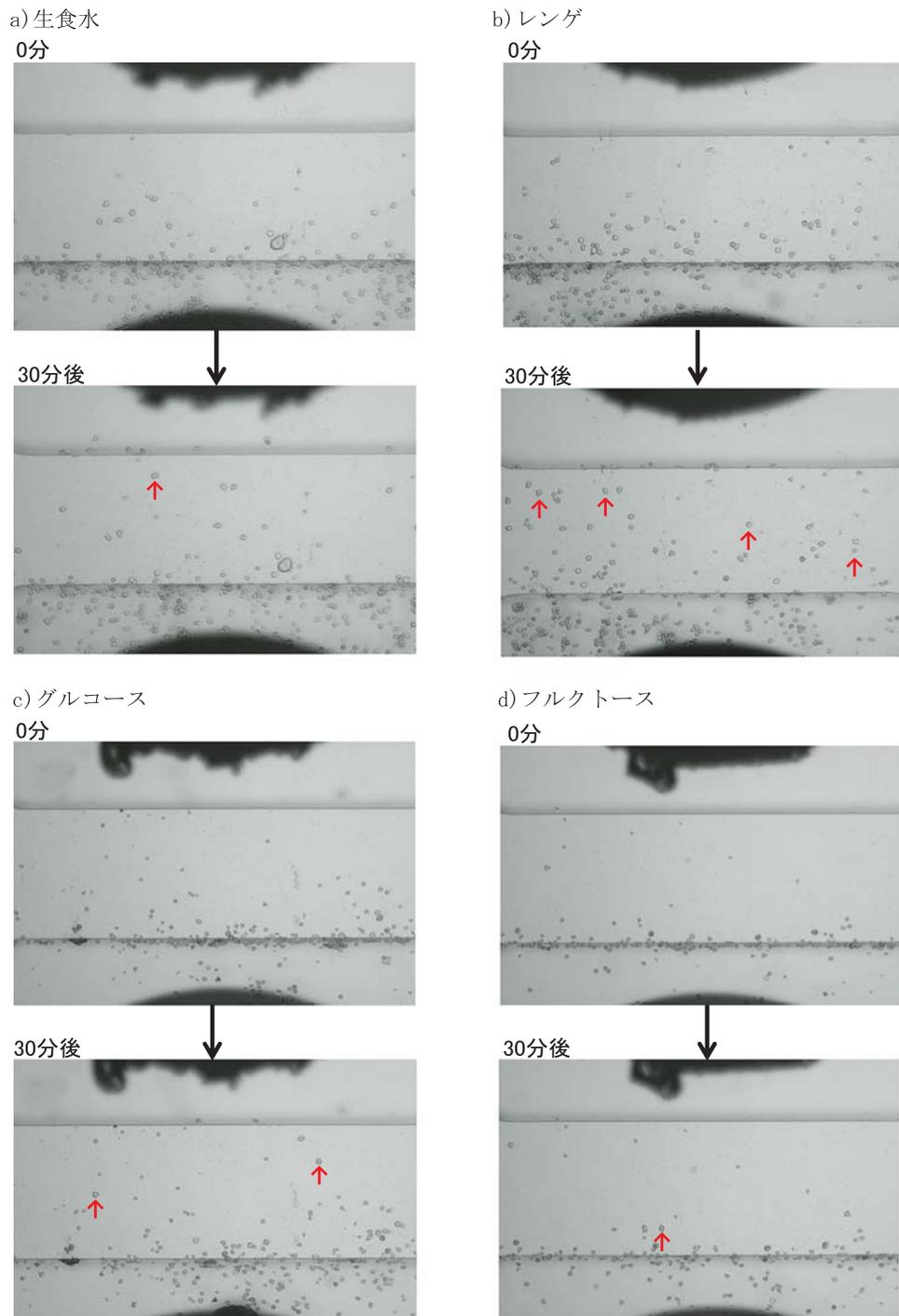


図4 レンゲ蜂蜜の好中球に対する走化活性
↑: 移動好中球 蜂蜜最終濃度 (10 mg/ml)

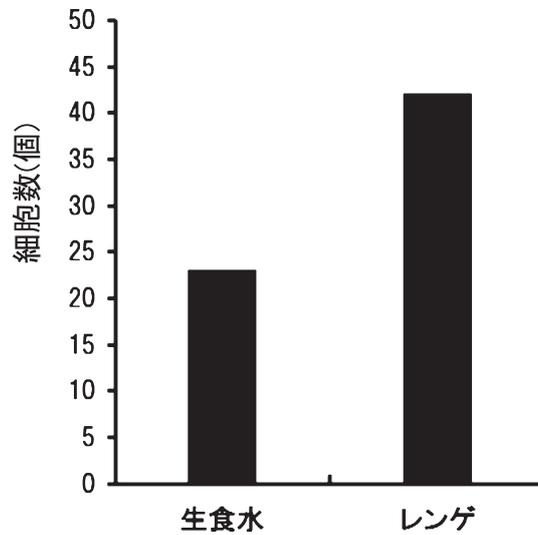


図5 レンゲ蜂蜜による好中球の移動細胞数への影響
蜂蜜最終濃度 (10 mg/ml)

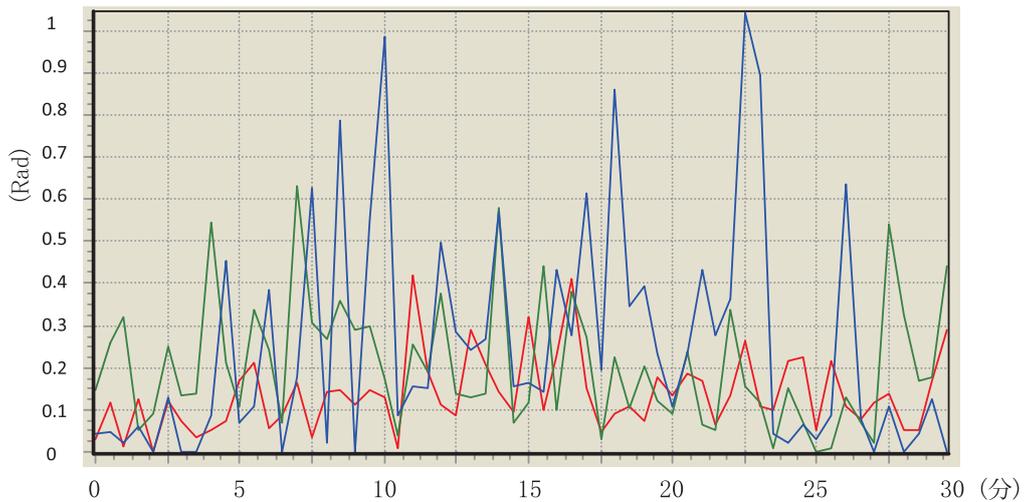


図6 レンゲ蜂蜜による好中球の走化活性の経時的変化に及ぼす影響
—: 生食水 —: レンゲ蜂蜜 —: fMLP 蜂蜜最終濃度 (10 mg/ml)

4. 考 察

蜂蜜は食用として世界中で親しまれているが、食用だけではなく、健康維持や創傷の治療薬など伝統的な薬として、古くから様々な用途に用いられている。また、蜂蜜は抗菌作用を持ち、抗菌作用による創傷の治療が報告され、創傷患者への新しい治療法として期待されている。蜂

蜜の抗菌作用についての報告はされているが、蜂蜜の免疫機能への影響についての報告は少ない。Manuka honey、Pasture honey、Jungle honey など世界にも蜂蜜はあり、健康や美容の他、風邪、皮膚炎、火傷などの治療薬、疾患予防薬として、伝統的に医療用として利用されてきた^{4,5)}。蜂蜜が治療薬として利用されていることから、生体への免疫作用に対する効果があると考えられる。これまでに我々は、ナイジェリア産の蜂蜜が抗体産生機能を増強する作用があることを報告し¹⁶⁾、好中球の走化活性を増強する作用があることを報告してきた^{13,14,15)}。しかし、日本国産蜂蜜による好中球の走化活性への影響についての報告はほとんどされていない。そこで、日本各地で採取された、蜜源の異なる蜂蜜である、ソバ、クリ、シロハナマメ、ミカン、アカシア、トチ、フカ、レンゲ、百花蜂蜜について、好中球の走化活性への影響を検討した。

好中球の走化活性の測定は、従来から中間部分が膜で仕切られた well やチャンバーを使用し、膜の下にある走化性因子に対して細胞がどれだけ膜を通り抜けて移動するかを測定することで評価されてきた^{17,18)}。この方法では一方向のみでしか細胞の走化性を評価できず、細胞の詳細な動きを正確に測定することができない。本研究で使用した EZ-TAXIScan は、水平上で細胞の動きを評価でき、さらに動画として測定できるため、より詳細な細胞の動きが正確に観察できるのが特徴である。走化活性の指標である方向性 (Direction) と移動速度 (Velocity) について解析したところ、反応 30 分後に、Direction は、ソバ、シロハナマメ、レンゲ蜂蜜で有意に増強し、Velocity はソバ、アカシア、レンゲ蜂蜜で有意に増強した。これらの結果より、数種の日本国産蜂蜜には好中球の走化活性を増強させる働きがあることが認められた。好中球の走化活性としては、*Ganoderma lucidum* (マンネンタケ) に含まれる多糖類により好中球の遊走活性が増加する報告がされている¹⁹⁾。今回、ソバ、シロハナマメ、レンゲ蜂蜜でも同様の結果であったことから、日本国産蜂蜜が好中球の走化性因子として働くことが示された。特に走化活性の増強が認められたレンゲ蜂蜜では、生食水に比べ、方向性、速度ともに増強が確認され、その活性は走化因子である fMLP と同等であった。この結果より、日本国産蜂蜜には好中球の走化活性に対して強い増強作用があることが示された。

しかし、蜂蜜にはエンドトキシン (LPS) が含まれている可能性があり、蜂蜜の免疫活性が LPS によるものであることが報告されている²⁰⁾。我々の研究では、LPS には好中球の走化活性は認められなかった。この結果より、蜂蜜による好中球の走化活性の増強は、LPS によるものではないことが考えられる。

今回、日本国産蜂蜜には免疫機能を活性化する結果が得られたが、一方、Buckwheat honey による鎮咳効果²¹⁾ や、蜂蜜に含まれるフラボノイドである chrysin の抗炎症作用が報告されており^{22,23)}、蜂蜜に含まれるポリフェノール成分の抗炎症としての治療の可能性が期待されている²⁴⁾。また、Thyme honey 添加で Raw264.7 細胞の PGE2、COX2 の発現は濃度依存的に増加するが、蜂蜜と LPS の同時添加により、一定の濃度を超えると PGE2、IL-6 の発

現を抑えられる炎症反応の調節機能が報告されている²⁵⁾。今後、抗炎症作用について、日本国産蜂蜜の産地、蜂蜜の種類による効果の違いも検討する予定である。

謝 辞

本研究は、ミツバチ産業科学研究センターと一般社団法人日本養蜂協会の支援により行われた。

参考文献

1. Ciulu M, Solinas S, Floris I, Panzanelli A, Pilo MI, Piu PC, Spano N, Sanna G. RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey. *Talanta*, 2011; 83: 924–929.
2. Hegazi GA, Abd El-Hady FK. Influence of Honey on the Suppression of Human Low Density Lipoprotein (LDL) Peroxidation (In vitro). *Evid Based Complement Alternat Med*, 2009; 6: 113–121.
3. Irish J, Blair S, Carter DA. The antibacterial activity of honey derived from Australian flora. *PLoS One*, 2011; 6: e18229. [PubMed: 2146489]
4. Cooper R. Honey in wound care: antibacterial properties. *GMS Krankenhhyg Interdiszip*, 2007; 2: Doc51. [PubMed: 20204083]
5. Kwakman PH, Te Velde AA, de Boer L, Vandenbroucke-Grauls CM, Zaat SA. Two major medicinal honeys have different mechanisms of bactericidal activity. *PLoS One*, 2011; 6: e17709. [PubMed: 21394213]
6. Lu J, Turnbull L, Burke CM, Liu M, Carter DA et al. Manuka-type honeys can eradicate biofilms produced by *Staphylococcus aureus* strains with different biofilm-forming abilities. *PeerJ*, 2014; 2: e326. [PubMed: 24711974]
7. Sherlock O, Dolan A, Athman R, Power A, Gethin G, Cowman S, Humphreys H. Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complementary & Alternative Medicine*, 2010; 10: 47. [PubMed: 20813024]
8. Tonks A, Cooper RA, Price AJ, Molan PC, Jones KP. Stimulation of TNF-alpha release in monocytes by honey. *Cytokine*, 2001; 14: 240–242.
9. Tonks AJ, Cooper RA, Jones KP, Blair S, Parton J, Tonks A. Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes. *Cytokine*, 2003; 21: 242–247.
10. Tonks AJ, Dudley E, Porter NG, Parton J, Brazier J, Smith EL, Tonks A. A 5.8-kDa component of manuka honey stimulates immune cells via TLR4. *Journal of Leukocyte Biology*, 2007; 82: 1–10.
11. 岡田大地, 廣野由里子, 田中美子, 佐々木一馬, 棚橋靖行, 高橋純一, 佐倉正明, 竹内実. 日本国産ハチミツによる肺胞マクロファージの免疫機能に及ぼす影響. *京都産業大学 先端科学技術研究所所報*. 2013; 12: 33–44.
12. Rada B, Leto T. Oxidative Innate Immune Defenses by Nox/Duox Family NADPH Oxidases.

- Contrib Microbiol, 2008; 15: 164–187.
13. 福田美樹, 宮川真由子, 竹内実. ジャングルハニーによる免疫機能への影響と抗腫瘍作用. 京都産業大学論集. 2009; 38: 95–118.
 14. Miyagawa M, Fukuda M, Hirono Y, Kawazoe A, Shigeyoshi E, Sakura M, Takeuchi T, Mazda O, Pinkerton KE, Takeuchi M. Effect of Jungle honey on chemotactic activity of neutrophils. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*. 2010; 2(4): 149–154.
 15. Fukuda M, Kobayashi K, Hirono Y, Miyagawa M, Ishida T, Ejiogu EC, Sawai M, Pinkerton KE, Takeuchi M. Jungle honey enhances immune function and antitumor activity. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011; 2011: 1–7.
 16. 重吉瑛里, 竹内実. ジャングルハニーによる抗体産生機能への影響とその機構について. 京都産業大学論集. 2013; 42: 21–52.
 17. Balamayooran G, Batra S, Balamayooran T, Cai S, Jeyaseelan S. Monocyte Chemoattractant Protein 1 Regulates Pulmonary Host Defense via Neutrophil Recruitment during *Escherichia coli* Infection. *Infect Immun*. 2011; 79(7): 2567–2577.
 18. Kornerup KN, Salmon GP, Pitchford SC, Liu WL, Page CP. Circulating platelet-neutrophil complexes are important for subsequent neutrophil activation and migration. *Journal of Applied Physiology*, 2010; 109(3): 758–767.
 19. Hsu MJ, Lee SS, Lee ST, Lin WW. Signaling mechanisms of enhanced neutrophil phagocytosis and chemotaxis by the polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum*. *Br J Pharmacol*. 2003; 139(2): 289–298.
 20. Timm M, Bartelt S, Hansen EW. Immunomodulatory effects of honey cannot be distinguished from endotoxin. *Cytokine*, 2008; 42: 113–120.
 21. Paul MI, Beiler J, McMonagle A, Shaffer LM, Duda L, Berlin MC. Effect of Honey, Dextromethorphan, and No Treatment on Nocturnal Cough and Sleep Quality for Coughing Children and Their Parents. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2007; 161: 1140–1146.
 22. Ha SK, Moon E, Kim SY. Chrysin suppresses LPS-stimulated proinflammatory responses by blocking NF- κ B and JNK activations in microglia cells. *Neurosci Lett*. 2010; 485: 143–147.
 23. Woo JK, Jeong JY, Inoue H, Park WJ, Kwon KT. Chrysin suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression through the inhibition of nuclear factor for IL-6 (NF-IL6) DNA-binding activity. *FEBS Letters*, 2005; 579: 705–711.
 24. Wang HX, Gheldof N, Engeseth JN. Effect of Processing and Storage on Antioxidant Capacity of Honey. *Journal of Food Science*, 2004; 69: 96–101.
 25. Raynaud A, Ghezali L, Gloaguen V, Liagre B, Quero F, Petit JM. Honey-induced macrophage stimulation: AP-1 and NF- κ B activation and cytokine production are unrelated to LPS content of honey. *Int Immunopharmacol*. 2013; 17: 874–879.

Effect of Japanese honeys on chemotactic activity in neutrophils

Yoshiko TANAKA

Maiko TAKASAKI

Naoko MIWA

Jun-ichi TAKAHASHI

Minoru TAKEUCHI

Abstract

Honey is natural edible product collected by *Apis mellifera*. Honey is not only for food, widely used in the world for the health maintenance, cold, dermatitis and treatment of wound. We previously reported that honey in Nigeria indicates the immunological effect and Japanese honey induces neutrophils of a kind of immune cells which is an important role in bacterial infections. Therefore, we investigated the effect of Japanese honeys on the direction and velocity as chemotactic activity of neutrophils. The direction and velocity were significantly augmented by 3 honeys at 10 mg/ml concentration. Japanese honeys indicated chemotactic activity for neutrophils. Especially, honey of lotus flower showed migration of many neutrophils after 30 minutes. These results suggest that Japanese honeys may prevent bacterial infections through facilitation of migration in neutrophils.

Keywords: Japanese honey, neutrophil, chemotactic activity, direction, velocity