

## 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

福 田 美 樹  
宮 川 真 由 子  
竹 内 実

(平成 20 年 10 月 1 日提出)  
(平成 20 年 12 月 15 日修正)

### 要 旨

ジャングルハニーは、ナイジェリアの熱帯雨林に生息する野生の蜂が長期にわたり樹木や花から集めてきた蜂蜜である。ナイジェリアでは、この蜂蜜が健康や美容の他、風邪、皮膚炎、火傷の治療薬、疾患予防薬として古くから利用されてきた。しかし、その作用機構については解明されておらず、免疫学的な作用については殆んど報告がされていない。そこで、ジャングルハニーによる免疫機能への影響と腫瘍に対する抗腫瘍効果について検討した。

ジャングルハニー (1 mg / 匹) を 7 日間連続投与により、総腹腔細胞数は、対照の PBS 投与群  $1.17 \pm 0.11 \times 10^6$  個 / 匹 (mean  $\pm$  S.E.) に比較して、ジャングルハニー投与群  $5.13 \pm 0.28 \times 10^6$  個 / 匹で、4.38 倍の有意 ( $p < 0.05$ ) な増加が認められた。ジャングルハニー腹腔内投与により増加した細胞の Dot Plot を FACS により解析したところ、ジャングルハニー投与群で、FSC 値 120 ~ 400, SSC 値 200 ~ 800 の部分に、対照群では認められない細胞集団の出現が認められた。この細胞集団を特定するために、細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体を用いて検討したところ、ジャングルハニー投与群で、Gr-1 陽性細胞比率の有意 ( $p < 0.05$ ) な増加が認められた。また、Gr-1 抗原発現強度についてもジャングルハニー投与群で有意 ( $p < 0.01$ ) な増加が認められた。ジャングルハニー投与群で出現した Gr-1 陽性細胞集団を分離したところ、その細胞は好中球であることが判明した。ジャングルハニー投与により好中球が腹腔内に増加したことから、ジャングルハニーが好中球の走化性因子として働いている可能性を検討した。ジャングルハニー 1 mg/ml, 10 mg/ml 添加で、非添加に比べて好中球の遊走が確認され、ジャングルハニーが好中球の走化性因子として働いていることが示された。一方、好中球の遊走に関わるケモカインである RANTES, MIP-2 の mRNA 発現比率へのジャングルハニーによる影響は認められなかった。

ジャングルハニー投与による腹腔細胞の増加と好中球の遊走が認められたため、増加した細胞の腫瘍に対する抗腫瘍効果について LL/2 腫瘍を用いて検討した。腫瘍生着率は対照群で 100%, ジャングルハニー投与群で 20%, 平均腫瘍重量は対照群 2.57 g, ジャングルハニー投与群 0.02 g であり、ジャングルハニー投与による腫瘍の生着と増殖の抑制が認められた。腫瘍組織の病理組織所見に関しては、ジャングルハニー投与群で腫瘍内に広範囲な出血性の壊死巣と腫瘍細胞の離開傾向が認められ、壊死巣には好中球の強い浸潤が認められた。ジャングルハニーの活性成分に関しては、HPLC 水系ゲルろ過クロマトグラフィーを用いてジャングルハニー溶液を 5 分画に分け、各画分 (Fr.) 刺激による IL-1 $\beta$  mRNA の発現比率を検討した。非刺激と比較して Fr. 2 刺激において IL-1 $\beta$  mRNA の発現比率の有意 ( $p < 0.001$ ) な増加が認められ、Fr. 2 の有効成分は分子量約 261 の物質で、LL/2 腫瘍に対する抗腫瘍作用も認められた。以上の成績より、ジャングルハニーに好中球に対する走化活性性と抗腫瘍作用が認められ、その有効成分は分子量約 261 の物質であることが示唆された。

キーワード：ジャングルハニー，好中球，走化性，抗腫瘍活性，免疫機能

## 1. 緒 言

天然成分には、様々な生理活性が知られており、以前より我々もその免疫作用について研究してきた [1,2]。蜂蜜には、グルコース、フルクトースのほか各種ビタミン、ミネラル、アミノ酸が含まれ、栄養が豊富な天然の食品として親しまれている [3-5]。しかし、蜂蜜は食用としてだけではなく、伝統的な薬として古くから世界各国で利用され、美容、健康維持の他、怪我、火傷などの創傷治癒の治療に用いられている。また、蜂蜜は花の種類によって成分が異なるため、Manuka honey, Pasture honey, Jelly bush honey, Jungle honey などの種類がある。その中でジャングルハニーは、ナイジェリアの熱帯雨林に生息する野生の蜂が長期にわたり樹木や花から集めてできた蜂蜜である。ナイジェリアでは、この蜂蜜が健康や美容の他、風邪、皮膚炎、火傷の治療薬、疾患予防薬として伝統的な医療に利用されてきた。そのため、食用ではなく、むしろ治療薬として使用されていることから、生体への作用、特に免疫作用に対する効果が考えられる。

一般的な蜂蜜の作用としては、抗菌作用があることがよく知られ、その作用は、蜂蜜の高い浸透圧、酸性の性質、蜂蜜に含まれる過酸化水素や花の種類に由来する成分であると報告されている [6-10]。また、近年では蜂蜜に含まれるフラボノイド、フェノール酸が抗菌作用を示すことが報告されている [11,12]。臨床実験では、帝王切開と子宮摘出後のグラム陽性菌、陰性菌による傷の感染症や細菌感染による涙欠損およびマイボーム腺病への蜂蜜の治療による細菌感染の早期根絶、治療期間の短縮、傷跡の減少などが報告され [13,14]、創傷患者に対する蜂蜜を使った感染への新しい治療法が期待されている。細菌の感染防御を担っている、免疫機能への蜂蜜の影響としては、Manuka honey によるヒト単球由来 Mono Mac6 細胞株の IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  産生の促進が報告されている [15,16]。この有効成分は 5.8 kDa の物質でグラム陰性菌に存在するリポ多糖体を認識する受容体 TLR4 を介してサイトカイン産生を活性化することが報告されている [17]。その他、蜂蜜の経口投与による胸腺依存、非依存性の抗体産生機能の増強なども報告されている [18]。また、免疫機能への影響としては、蜂蜜と関連した物質として成分は異なるが、ロイヤルゼリーとプロポリスが知られている。ロイヤルゼリーは、働き蜂が体内で蜂蜜を消化し再び口から分泌したもので、女王蜂の唯一の食物である。蜂蜜と同様、栄養が豊富で、近年では健康食品としてよく知られ、免疫機能の増強と抗腫瘍作用が報告されている。ロイヤルゼリーの免疫機能への影響としては、活性化マクロファージの IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  産生の抑制による抗炎症作用が認められ、蜂蜜と関連した物質ではあるが、上述で述べた Manuka honey の報告とは逆の作用が報告されている [19]。抗腫瘍作用については、担癌マウスに対する延命効果や環境エストロゲンによって引き起こされる癌細胞の増殖抑制などが報告されてい

る [20,21]。プロポリスは、蜜蜂自らの唾液と植物の樹脂を混ぜ合わせて作られるものである。代表的な有効成分にはポリフェノールが知られ、免疫機能の増強と抗腫瘍作用が報告されている [22]。プロポリスの免疫機能への影響については、脾臓中の CD4<sup>+</sup>T 細胞の増加、抗体産生機能の増強、IL-2、IL-4 産生の増加などの免疫機能の増強が報告されている [23]。抗腫瘍作用については、腫瘍細胞に対する NK 細胞の細胞障害活性の増強、腫瘍細胞の増殖と転移の抑制、延命効果が報告され [23-25]、さらに担癌マウスに対するプロポリスと化学療法の併用で、血球欠乏症の抑制と延命効果が報告されている [26,27]。しかし、蜂蜜の免疫機能への影響と抗腫瘍作用の機構についての報告は非常に少なく、詳細な解明はされていない。また、前述したように、免疫作用への影響の可能性が考えられるジャングルハニーについての報告は現在のところされていない。そこで、ジャングルハニーの免疫機能への影響と抗腫瘍作用について、ジャングルハニーを腹腔内投与し、総腹腔細胞数、腹腔細胞の Dot Plot、細胞表面抗原、活性酸素の産生、好中球の走化性、サイトカイン mRNA 発現に及ぼす影響と Lewis Lung Carcinoma 2 (LL/2) 腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を検討した。

## 2. 材料及び方法

### 2.1 ジャングルハニーの調製

ジャングルハニー（日本オリジンズ）を 0.2 mg/ml になるよう 40°C の蒸留水を加え、十分攪拌し、凍結乾燥した。凍結乾燥したジャングルハニーを PBS 溶液 (Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> を含まない生理的リン酸緩衝溶液：日水製薬) で 10 mg/ml に調整し、0.22 μm フィルター (MILLIPORE) を通して滅菌後、各濃度に PBS または R(+) 培養液 [RPMI1640 (ナカライテスク) 500 ml に 10% FCS, ペニシリン (明治製薬) 100 U/ml, ストレプトマイシン (明治製薬) 100 μg/ml] で希釈し実験に使用した。尚、ジャングルハニーの主な成分と一般の蜂蜜の比較を図 1 に示した。

### 2.2 ジャングルハニー成分の分画

ジャングルハニーの分画は HPLC 水系ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて分離し、示差屈折計 (RI) で検出した。OHpak SB-802 HQ カラム (Shodex) を用いて、ジャングルハニー 100 mg/ml を流速 1 ml/min で PBS により溶出した。25 分間溶出し 5 分間隔で分取し、0-5 分をフラクション 1 (Fr. 1), 5.01-10 分を Fr. 2, 10.01-15 分を Fr. 3, 15.01-20 分を Fr. 4, 20.01-25 分を Fr. 5 として分画後、一晚凍結乾燥後、各画分の重量を測定し、上記と同様に調製した。

### 2.3 実験動物

マウスは 8-10 週齢の C57BL/6、雌マウス (日本 SLC) を使用した。モルモットは 5-6 週齢の Hartley、雄モルモット (日本 SLC) を使用した。尚、本研究の動物実験に関しては、京都産

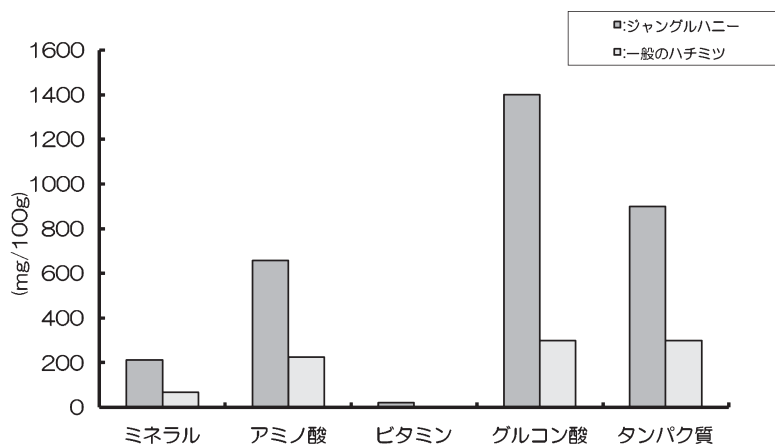


図1 ジャングルハニーの成分

業大学動物実験規定に基づき、京都産業大学動物実験委員会により承認された。

## 2.4 腫瘍細胞

腫瘍細胞は、Lewis Lung Carcinoma 2(LL/2) 腫瘍細胞を使用した。LL/2 腫瘍細胞はMEM(+) 培養液 [D-MEM (ナカライテスク) 500 ml に 10%FCS, ペニシリン 100 U/ml, ストレプトマイシン 100  $\mu$ g/ml] により, 10 cm シャーレ (FALCON) で 2~3 日おきに継代し, 維持した。継代後 2 日目もしくは 3 日目の細胞をトリプシン-EDTA 溶液 (0.25% トリプシン : 0.02% EDTA = 1 : 1, ナカライテスク) を 2 ml 添加し, その後 MEM(-) 培養液 [D-MEM, 500 ml にペニシリン 100 U/ml, ストレプトマイシン 100  $\mu$ g/ml] を 3 ml 添加し, 2 回洗浄した後, 1000 rpm, 10 分間, 4°C で遠心した。遠心後, 0.2% トリパンブルーを用いてトリパンブルー色素排除試験法にて, 血球計算盤上で生細胞数を算定した。

## 2.5 ジャングルハニーの投与

上記で調製したジャングルハニーを PBS で 1 mg/0.4 ml/匹の濃度に調整し, 1 日, 1 回, 7 日間, マウス腹腔内に投与し, これをジャングルハニー投与群とした。対照群として, PBS 0.4 ml/匹をジャングルハニー溶液投与群と同様に 1 日, 1 回, 7 日間, マウス腹腔内に投与し, これを PBS 投与群 (control) とした。

## 2.6 腹腔細胞の回収と調製

7 日間投与した翌日に, マウスを麻酔死させた。その後クリーンベンチ内でハサミとピンセットを用いてマウスの皮膚を切り腹膜を露出させ, 27 G の注射針の付いた注射器で腹腔内に冷 PBS を約 7 ml 注射した。腹腔をよく揉み, 22 G の注射針に付け替え, 注入した PBS を回収し

た．回収後，1000 rpm，10 分間，4°C で遠心後，上清を除去した後，R(+) を 1 ml 加えて懸濁した．0.2% トリパンブルーを用いてトリパンブルー色素排除法にて，血球計算盤上で生細胞数を算定し，各濃度に腹腔細胞浮遊液を調製した．

## 2.7 腹腔細胞の Dot Plot と細胞表面抗原

上記で得た腹腔細胞浮遊液を FACS 緩衝液で再懸濁し，細胞浮遊液 100  $\mu$ l ( $1 \times 10^5$  個) を FITC (fluorescein isothiocyanate) 標識した抗 CD3 抗体 (BD. Bioscience)，抗 CD11b 抗体 (BD. Bioscience)，抗 CD19 抗体 (BD. Bioscience)，抗 NK 抗体 (BD. Bioscience)，PE (phycoerythrin) 標識した抗 Gr-1 抗体 (BD. Bioscience) を FACS 緩衝液で希釈し，0.5  $\mu$ g/100  $\mu$ l の抗体希釈液と 4°C，45 分間反応させた．反応終了後，FACS 緩衝液 2 ml を加え，1000 rpm，10 分間遠心洗浄を 2 回行った．上清を取り除き，300  $\mu$ l の FACS 緩衝液を加え FACSsort (BD) を用いて，Dot Plot 解析した．FSC (Forward Scatter: 前方散乱光) と SSC (Side Scatter: 側方散乱光) 値および FL-1 (Fluorescence-1: 緑色蛍光) と FL-2 (Fluorescence-2: 赤色蛍光) 値を測定し，各抗原陽性細胞比率と平均抗原発現強度を PBS 投与群とジャングルハニー投与群で比較した．

## 2.8 細胞集団の分離

Dot Plot 解析により，ジャングルハニー投与群に出現した細胞集団にゲートをかけ，FACS を用いて分画した．

## 2.9 分画細胞

上記で得た分画細胞を R(+) で  $5 \times 10^5$  個 / ml に調製した後，200  $\mu$ l ( $1 \times 10^5$  個) をスライドガラス上の遠心法浮遊細胞収集装置に滴下し，1000 rpm，5 分間遠心し，スライドガラスを乾燥させた．乾燥後，メチルアルコールを滴下し 3 分間固定し，固定後メチルアルコールを振り落とし，乾燥させ，ギムザ染色液で 30 分間染色した．染色後，スライドガラスの染色液を洗い流し，乾燥させ，サイトスピン標本を作製し，顕微鏡にて細胞の形態を観察した．

## 2.10 走化活性

細胞はモルモットの末梢血から単離した好中球を用いた．モルモットからヘパリン (持田製薬) を加えた注射器で採血後，血液を PBS で 2 倍希釈し，3.5% デキストランを等量加えて室温で 30 分間静置して赤血球を沈殿させた．上清を取り，Ficoll-Paque PLUS (GE ヘルスケア) に重層し，1500 rpm，30 分間，20°C で遠心した．上清を除去した後，赤血球 / 顆粒球層に蒸留水 9 ml を素早く加えて細胞を懸濁し溶血させ，10 秒後に 1 ml の  $10 \times$  PBS を加えて溶血を止めた．1000 rpm，10 分間で遠心後，上清を除去し，R(+) で  $2 \times 10^6$  個 / ml に調製した．走化性の測定には EZ-TAXIScan (GE ヘルスケア) 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  $1\mu\text{l}$  ( $2 \times 10^3$  個) 注入し, チップに 1 列に並べた. 好中球を注入した反対側に, R(+), 陽性コントロールとして N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine(fMLP) $10^{-6}\text{M}$ , ジャングルハニー溶液  $1\text{mg/ml}$ ,  $10\text{mg/ml}$  を  $1\mu\text{l}$  ずつ注入し濃度勾配を作った.  $37^\circ\text{C}$  で 30 分間, 15 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, 好中球の移動の方向性と速度を解析した.

## 2.11 LL/2 腫瘍増殖

ジャングルハニー溶液及び PBS を 7 日間腹腔内投与後, 翌日に, PBS で  $4 \times 10^5$  個 /  $0.2\text{ml}$  に調製した LL/2 腫瘍細胞を腹腔内に移植し, 4 週間後に解剖して腫瘍生着の有無と腫瘍重量を測定した. 延命効果については, 上記と同様にジャングルハニー, Fr. 2, PBS を投与後, 平均生存日数と生存率を測定した.

## 2.12 腫瘍組織の病理組織

生着した腫瘍組織塊を摘出し, 10% 中性緩衝ホルムアルデヒド液 (ナカライテスク) で固定し, パラフィン包埋後, ミクロトームで  $4\mu\text{m}$  の薄切切片を作製した. 作製した薄切切片をキシレンで 5 分間静置を 2 回の脱パラフィン, 100% エタノールで 5 分間静置を 2 回, 70% エタノールで 5 分間静置を 1 回で脱キシレンした後, ヘマトキシリンで 3 分間染色し, 流水で 10 分間洗浄し, エオジンで 15 分間染色後, 70% エタノール, 80% エタノール, 90% エタノール, 100% エタノールで脱水した. その後, キシレンで 5 分間, 3 回透徹を行い, ピオライトで封入し, 顕微鏡で観察した.

## 2.13 サイトカイン mRNA の発現

### 2.13.1 腹腔細胞の培養

腹腔細胞浮遊液を R(+) で  $1.0 \times 10^6$  個 /  $\text{ml}$  に調製した後, 96 well 細胞培養プレート (FALCON) に  $1 \times 10^5$  個 /  $100\mu\text{l/well}$  加えた後, R(-)[RPMI1640, 500 ml に 10%FCS, ペニシリン  $100\text{U/ml}$ , ストレプトマイシン  $100\mu\text{g/ml}$ ] を  $100\mu\text{l}$ , LPS $20\mu\text{g/ml}$  を  $100\mu\text{l}$  (最終濃度  $10\mu\text{g/ml}$ ), ジャングルハニー溶液  $1\text{mg/ml}$  を  $100\mu\text{l}$  (最終濃度  $500\mu\text{g/ml}$ ), 各 well に添加し,  $5\%\text{CO}_2$  下,  $37^\circ\text{C}$ , 24 時間培養した.

### 2.13.2 全 RNA の抽出

培養後, 上清を除き, Solution D を  $100\mu\text{l}$  加え well の底に付着した細胞を溶解し回収する操作を 2 回行い, 1 well につき計  $200\mu\text{l}$  の培養細胞抽出液を回収した. この細胞抽出液を AGPC 法により全 RNA を抽出した. それぞれの細胞抽出液を  $100\mu\text{l}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ -phenol  $100\mu\text{l}$ , 2M-Sodium

Acetate 10  $\mu$ l, CIAA 40  $\mu$ l 加え, 4°C, 15000 rpm, 5 分間遠心をした。遠心後, 上清 100  $\mu$ l を取り, 100% エタノール 200  $\mu$ l を加えて攪拌した後, -80°C で 15 分間静置した。その後, 4°C, 15000 rpm, 30 分間遠心後, 上清を除き, 沈殿に Solution D 300  $\mu$ l, phenol/CIAA 300  $\mu$ l を加えて攪拌後, 20°C, 15000 rpm, 5 分間遠心した。遠心後, 上清 300  $\mu$ l を取り, 100% エタノール 700  $\mu$ l を加えて攪拌し, -80°C で 15 分間静置した。4°C, 15000 rpm, 20 分間遠心後, 上清を除き, 沈殿に 75% エタノール 1000  $\mu$ l を加えて攪拌し, 4°C, 15000 rpm, 10 分間遠心した。遠心後, 上清を除き, アスピレーターを用いて減圧乾燥させ, 全 RNA を得た。

### 2.13.3 cDNA の作製

上記で得た, 全 RNA に滅菌水 10  $\mu$ l, random primer (宝酒造) 1  $\mu$ l を加えて攪拌, 軽く遠心し, 65°C で 5 分間静置した後, 氷冷中で 5 分間静置した。その後, DTT(invitrogen) 2  $\mu$ l, 5  $\times$  First-Strand Buffer(invitrogen) 8  $\mu$ l, 25 mM dNTP 0.8  $\mu$ l, 滅菌水 15.2  $\mu$ l, MLV (invitrogen) 1  $\mu$ l 加えて軽く遠心し, 37°C で 45 分間静置し, 全 RNA から cDNA への逆転写反応を行った。その後, 65°C, 10 分間で MLV を失活させ, 10 分間氷冷中で静置し, cDNA を作製した。

### 2.13.4 PCR (polymerase chain reaction)

IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MIP-2, RANTES mRNA と  $\beta$ -actin mRNA の発現比率を検討するため, 上記で調製した cDNA サンプル 1  $\mu$ l, 下記の primer の sense, anti-sense(invitrogen) をそれぞれ 0.75  $\mu$ l, 2  $\times$  GoTaq Green Master Mix(Promega)10  $\mu$ l, 滅菌水 7.5  $\mu$ l を加えた。DNA Engine Thermal Cycler 用いて, 30 サイクルで cDNA を増幅した。なお 1 サイクルは 94°C denature, 56°C annealing, 72°C extension を各 30 秒とした。Primer は以下の配列のものを使用した。

$\beta$ -actin (250 bp)

sense 5'-GCATTGTTACCAACTGGGAC-3'

anti-sense 5'-TCTCCGGAGTCCATCACAAT-3'

IL-1 $\beta$  (290 bp)

sense 5'-AGCTACCTGTGTCTTTCCCG-3'

anti-sense 5'-GTCGTTGCTTGTTCTCCTT-3'

TNF- $\alpha$  (253 bp)

sense 5'-AGTGGTGCCAGCCGATGGGTTGT-3'

anti-sense 5'-GCTGAGTTGGTCCCCCTTCTCCAG-3'

MIP-2(303 bp)

sense 5'-TCCAGAGCTTGAGTGTGACG-3'

anti-sense 5'-TTAGCCTTGCCTTTGTTCAG-3'

RANTES(186 bp)

sense 5'-GTGCCCACGTCAAGGAGTAT-3'

anti-sense 5'-GGGAAGCGTATACAGGGTCA-3'

### 2.13.5 電気泳動

上記で増幅させた PCR 産物 20  $\mu$ l を, 8% アクリルアミドゲルを用いて, 45 mA で約 90 分, 電気泳動を行った. 分子量マーカーは, pBR322DNA-MSP I Digest (BioLabs) を使用した. 電気泳動後, ゲルをエチジウムブロマイド (1  $\mu$ g/ml) で 20 分間染色し, 滅菌水で軽く洗ったあと, BioDoc-It システム (UVP) で泳動画像を取り込んだ.

### 2.13.6 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MIP-2, RANTES 及び $\beta$ -actin mRNA の発現比率

上記で取り込んだ PCR 産物の泳動画像を Scion image によりデンストメトリー解析を行い, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MIP-2, RANTES 及び  $\beta$ -actin の発現量を求め,  $\beta$ -actin に対する IL-1 $\beta$ , MIP-2, TNF- $\alpha$  及び RANTES mRNA の発現比率を求めた.

## 2.14 腹腔細胞の活性酸素 (O<sub>2</sub><sup>-</sup> 及び H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) の産生

腹腔細胞浮遊液を R(+) で  $1.0 \times 10^6$  個/ml に調整した後, 100  $\mu$ l ( $1 \times 10^5$  個) に Hydroethidine (HE, Polysciences) の最終濃度 10  $\mu$ M, 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, LAMBDA) の最終濃度が 20 mM になるように PBS(+) [Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> を含む PBS, 日水製薬] を用いて希釈し, 最終容量を 1 ml にした. その後, 37°C, 30 分間振揺反応させ, 反応終了後, PBS(+) を 2 ml 加え, 1000 rpm, 10 分間遠心洗浄を 2 回行った. 上清を取り除き, PBS(+) を 200  $\mu$ l 加え, FACS を用いて, 活性酸素産生細胞陽性比率を測定した.

## 2.15 統計解析

全ての実験において平均値と標準誤差を求め, 値は平均値 (mean)  $\pm$  標準誤差 (standard error: S.E.) で表示した. 各実験群の群間の有意差検定は student's t test により行い,  $p < 0.05$  を有意差とした.

# 3. 成績

## 3.1 ジャングルハニー投与による腹腔細胞数

PBS 投与群 (control) の総細胞数は  $1.17 \pm 0.11 \times 10^6$  個/匹 (mean  $\pm$  S.E.), ジャングルハニー投与群の総細胞数は  $5.13 \pm 0.28 \times 10^6$  個/匹で, PBS 投与群に比べて, ジャングルハニー投与群で有意 ( $p < 0.001$ ) な増加が認められた (図 2).



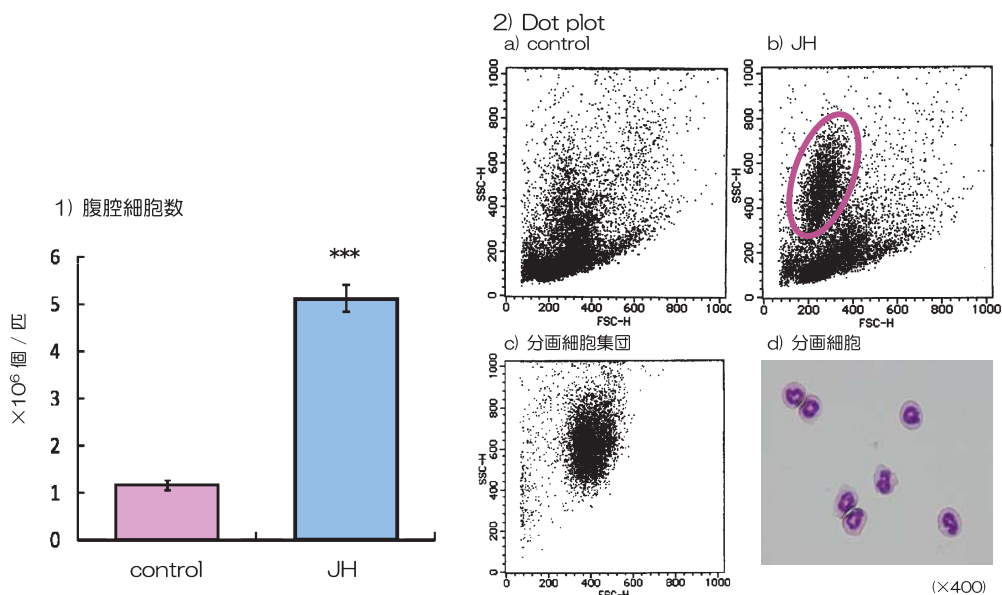


図2 ジャングルハニーによる腹腔細胞数と Dot Plot

1) マウスの腹膜を露出させ、下腹部より冷 PBS 7-10 ml を注射筒で注入し、注射筒で腹腔内の PBS を回収した。その後、トリパンブルーを用いて細胞数を測定した。2) マウスの腹膜を露出させ、下腹部より冷 PBS 7-10 ml を注射筒で注入し、注射筒で腹腔内の PBS を回収した。その後、細胞サイズと細胞内構造を FACS を用いて解析した。JH: Jungle honey, \*\*\*:  $p < 0.001$

### 3.2 ジャングルハニー投与による Dot Plot 及び細胞表面抗原

#### 3.2.1 Dot Plot

PBS 投与群に比べて、ジャングルハニー投与群の FSC 値 120 ~ 400、SSC 値 200 ~ 800 の領域に細胞集団の出現が認められた (図 2)。

#### 3.2.2 抗原陽性細胞比率 (%)

CD3 の陽性細胞比率は PBS 投与群  $45.07 \pm 3.23\%$  (mean  $\pm$  S.E.)、ジャングルハニー投与群  $43.46 \pm 1.67\%$ 、CD11b 陽性細胞比率は PBS 投与群  $46.50 \pm 2.56\%$ 、ジャングルハニー投与群  $42.77 \pm 2.36\%$  で両群において有意な差は認められなかった。CD19 陽性細胞比率は PBS 投与群  $66.57 \pm 3.04\%$ 、ジャングルハニー投与群  $69.55 \pm 2.34\%$ 、NK 陽性細胞比率は PBS 投与群  $62.74 \pm 3.97\%$ 、ジャングルハニー投与群  $65.20 \pm 1.56\%$  で両群において有意な差は認められなかった。一方、Gr-1 陽性細胞比率は PBS 投与群  $60.94 \pm 2.77\%$ 、ジャングルハニー投与群  $68.86 \pm 1.81\%$  で、PBS 投与群と比べ、ジャングルハニー投与群で有意 ( $p < 0.05$ ) な増加が認められた (図 3)。

#### 3.2.3 抗原発現強度

CD3 の抗原発現強度は PBS 投与群  $24.18 \pm 2.38$  (mean  $\pm$  S.E.)、ジャングルハニー投与群  $22.96$

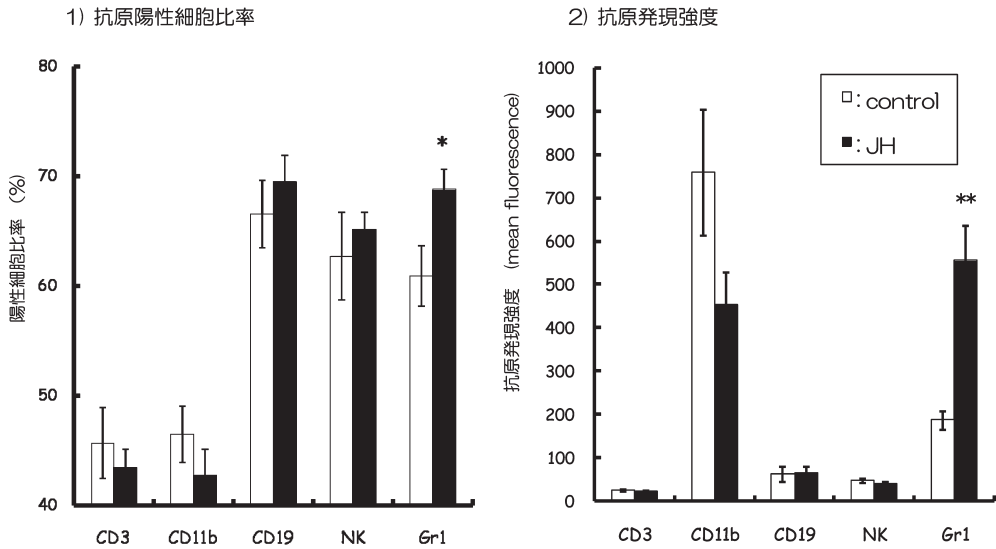


図3 ジャングルハニーによる細胞表面抗原

CD3: T細胞表面に存在する抗原で、T細胞レセプターへの抗原結合シグナルを細胞内へ伝える。CD11b: 主にマクロファージの細胞表面に存在する抗原で、補体C3bと結合し、食作用を補助する。CD19: B細胞表面に存在する抗原で、B細胞を活性化する。NK: Natural Killer細胞表面に存在する抗原。Gr1: 顆粒球細胞表面に存在する抗原。\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$

$\pm 2.07$ , CD11b 抗原発現強度は PBS 投与群  $760.26 \pm 145.47$ , ジャングルハニー投与群  $454.09 \pm 73.99$  で両群において有意な差は認められなかった。CD19 抗原発現強度は PBS 投与群  $63.47 \pm 17.58$ , ジャングルハニー投与群  $65.36 \pm 13.47$ , NK 抗原発現強度は PBS 投与群  $46.82 \pm 4.86$ , ジャングルハニー投与群  $40.02 \pm 5.13$  で両群において有意な差は認められなかった。Gr-1 抗原発現強度は PBS 投与群  $186.92 \pm 21.76$ , ジャングルハニー投与群  $557.07 \pm 79.09$  で、PBS 投与群と比べ、ジャングルハニー投与群で有意 ( $p < 0.01$ ) な増加が認められた (図3)。

### 3.2.4 出現した細胞集団の性状

Dot Plot 解析でジャングルハニー投与群に増加が認められた細胞集団を分取して、サイトスピン標本を作製し、ギムザ染色を行い、形態学的に観察したところ、増加した細胞は好中球であることが認められた (図2)。

### 3.3 ジャングルハニーの好中球に対する走化活性

各走化性因子添加30分後の移動好中球数は非添加13個、ジャングルハニー (1 mg/ml) 添加40個、ジャングルハニー (10 mg/ml) 添加29個で、非添加に比べて、ジャングルハニー (1, 10 mg/ml) 添加で移動好中球数の増加が認められた。好中球の平均移動速度は、非添加  $0.04 \mu\text{m}/\text{sec}$ , fMLP ( $10^{-6}\text{M}$ ) 添加  $0.22 \mu\text{m}/\text{sec}$ , ジャングルハニー (1 mg/ml) 添加  $0.17 \mu\text{m}/\text{sec}$ , ジャングルハニー

(10 mg/ml) 添加 0.12 $\mu$ m/sec で ,非添加に比べて ,fMLP ,ジャングルハニー (1 ,10 mg/ml) 添加で平均移動速度の有意 ( $p < 0.001$ ) な増加が認められた . 細胞の方向性 (radian) は ,非添加 0.09 rad ,fMLP ( $10^{-6}$ M) 添加 0.53 rad ,ジャングルハニー (1 mg/ml) 添加 0.39 rad ,ジャングルハニー (10 mg/ml) 添加 0.36 rad で ,非添加に比べて ,fMLP ,ジャングルハニー (1 ,10 mg/ml) 添加で方向性の有意 ( $p < 0.001$ ) な増加が認められた . これらの結果より ,ジャングルハニーが好中球の走化性因子として働くことが示された ( 図 4, 5 ) .

### 3.4 ジャングルハニーによる腹腔細胞のケモカイン mRNA の発現

ジャングルハニー投与による好中球数の増加より , 好中球の遊走に関わるケモカインで , 腹腔マクロファージが産生する RANTES 及び MIP-2 の mRNA 発現について検討した .

#### 3.4.1 RANTES mRNA の発現

RANTES mRNA 発現比率は , 非刺激  $0.41 \pm 0.03$  (mean  $\pm$  S.E.) , LPS 刺激  $0.83 \pm 0.12$  , ジャングルハニー刺激  $0.43 \pm 0.03$  で , 非刺激と比べて , LPS 刺激で有意 ( $p < 0.01$ ) な増加が認められたが , ジャングルハニー刺激において有意な差は認められなかった ( 図 6 ) .

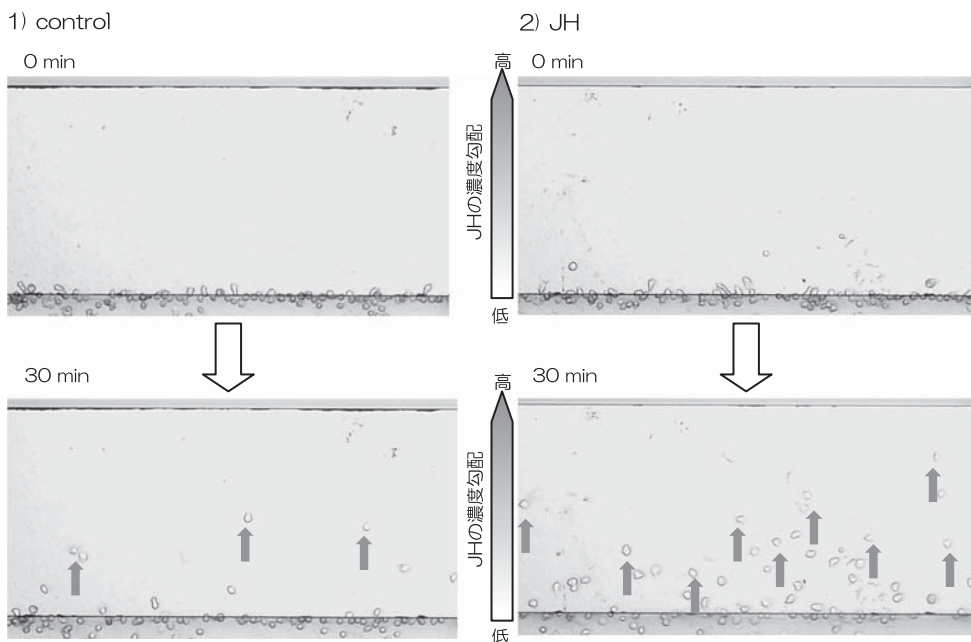


図 4 ジャングルハニーの好中球に対する走化活性

↑: 移動細胞

3.4.2 MIP-2 mRNA の発現

MIP-2 mRNA 発現比率は、非刺激  $0.34 \pm 0.04$  (mean  $\pm$  S.E.), LPS 刺激  $0.49 \pm 0.05$ , ジャングルハニー刺激  $0.43 \pm 0.03$  で、有意な差は認められなかった (図6). これらの結果より、ジャングルハニー投与による腹腔細胞の増加, 好中球の遊走に RANTES と MIP-2 は関与していないこと

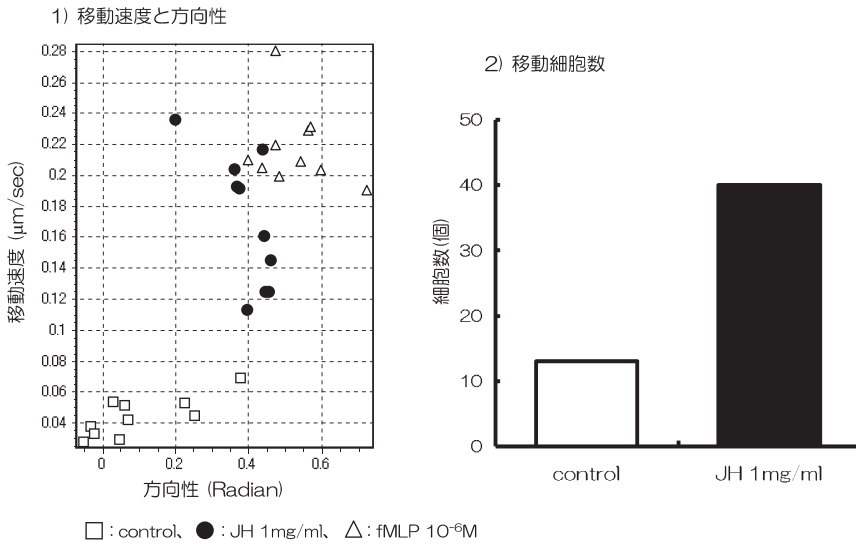


図5 ジャングルハニーの好中球に対する走化活性

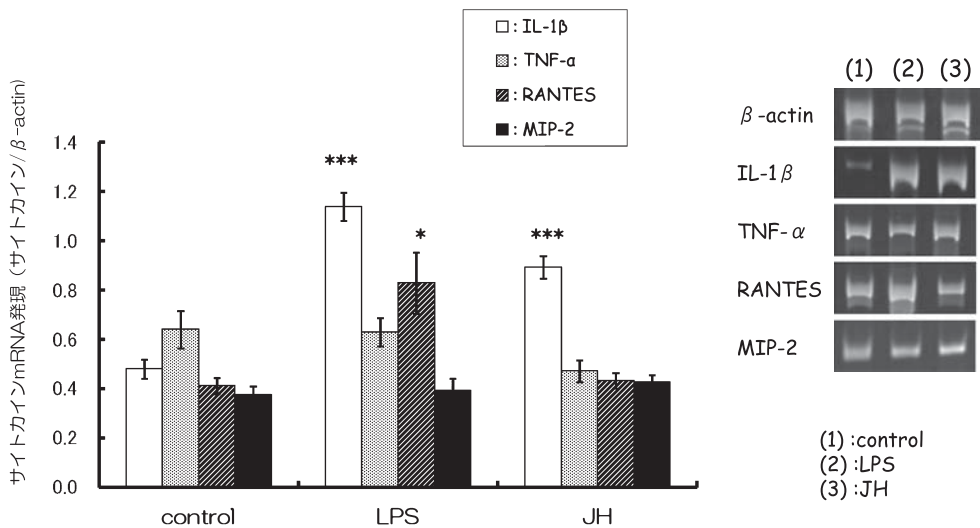


図6 ジャングルハニーによる腹腔細胞のサイトカイン mRNA 発現

腹腔細胞 ( $1 \times 10^5$  コ/100 $\mu\text{l}$ ) に LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), JH (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 100 $\mu\text{l}$  を添加し, 24 時間培養後, AGPC 法により RNA を抽出し, RT-PCR を行った. その後, 電気泳動で発現を確認した. \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.01$

が示された。

### 3.5 ジャングルハニー投与による LL/2 腫瘍細胞の腹腔内移植に対する抗腫瘍効果

ジャングルハニーの腹腔内投与により、腹腔細胞，特に好中球の増加とジャングルハニーに対する好中球の遊走が確認されたので、これらの増加した免疫細胞を介した抗腫瘍作用を検討した。腫瘍生着率は PBS 投与群 100% であったのに対し、ジャングルハニー投与群 20% で、平均腫瘍重量は、PBS 投与群  $2.57 \pm 1.05$  g (mean  $\pm$  S.E.)、ジャングルハニー投与群  $0.02 \pm 0.02$  g であった。これらの結果から、ジャングルハニー投与による腫瘍の生着及び増殖の抑制が認められ、ジャングルハニーに抗腫瘍効果があることが示された(図7)。腫瘍組織の病理組織所見に関しては、PBS 投与群で、腫瘍組織内に壊死巣が認められたが好中球の浸潤は少なく、充実した腫瘍組織内には核の淡明な腫瘍細胞が多く認められた。ジャングルハニー投与群では、腫瘍組織内に広範囲な壊死巣が認められ、PBS 投与群と比べて、好中球の強い浸潤が認められた。また、出血性の壊死巣と腫瘍細胞の離開傾向も認められた(図8)。

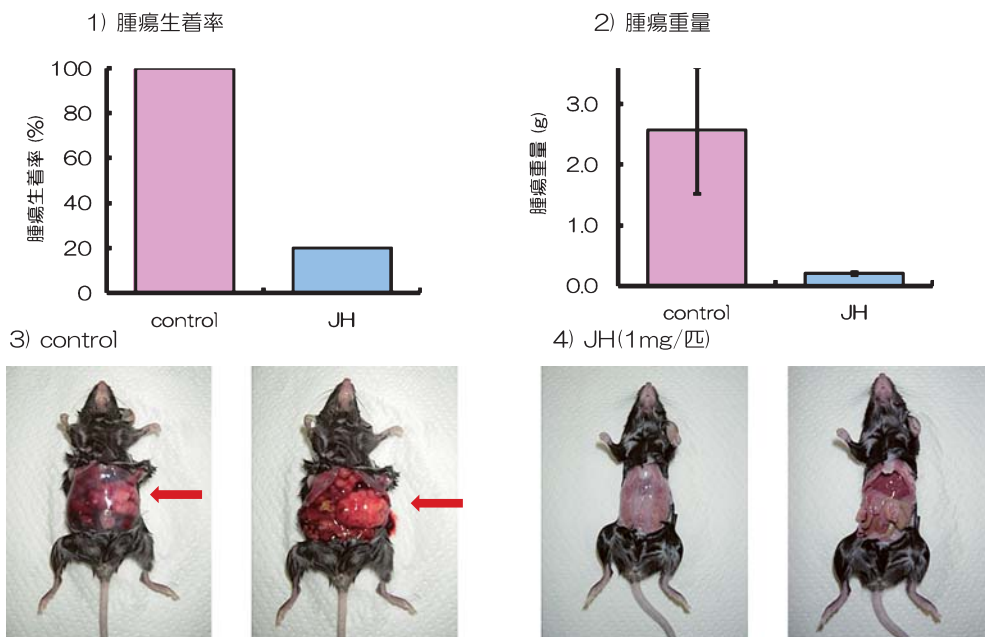


図7 ジャングルハニーによる LL/2 腫瘍に対する抗腫瘍作用  
 PBS または JH を 7 日間腹腔内投与後、LL/2 腫瘍細胞を腹腔内移植した。4 週間後、解剖し、生着率、生着した腫瘍重量を測定した。←：腫瘍

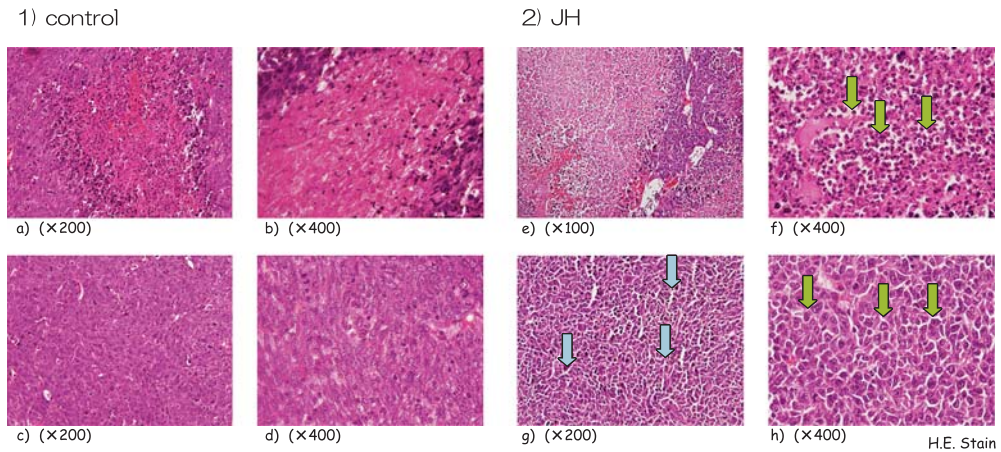


図8 ジャングルハニーによるLL/2腫瘍の組織所見

1) コントロール群では、腫瘍内に壊死巣が認められるが好中球の浸潤は少ない。充実した腫瘍組織に核の淡明な腫瘍細胞が多く認められる。2) ジャングルハニー群では、腫瘍内に広範囲な壊死巣が認められ好中球の強い浸潤が認められる。出血性の壊死巣も認められる。腫瘍細胞の離開傾向が認められる。↓：腫瘍細胞の離開 ↓：好中球の浸潤

### 3.6 ジャングルハニーによる腹腔細胞のサイトカイン mRNA の発現

ジャングルハニー投与群の腫瘍組織に好中球の強い浸潤が認められたことから、ジャングルハニーによって増加した腹腔細胞の中の好中球が抗腫瘍に関与している可能性が示唆された。そこで、腫瘍抑制の作用機構について検討するために、抗腫瘍性、マクロファージ、好中球の活性に関わる IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  の mRNA 発現比率を検討した。

#### 3.6.1 IL-1 $\beta$ mRNA 発現

IL-1 $\beta$  mRNA 発現比率は、非刺激  $0.48 \pm 0.04$  (mean  $\pm$  S.E.), LPS 刺激  $1.06 \pm 0.05$ , ジャングルハニー刺激  $0.94 \pm 0.06$  で、非刺激と比べて、LPS 刺激とジャングルハニー刺激で有意 ( $p < 0.001$ ) な増加が認められた (図6)。

#### 3.6.2 TNF- $\alpha$ mRNA 発現

TNF- $\alpha$  mRNA 発現比率は、非刺激  $0.64 \pm 0.08$  (mean  $\pm$  S.E.), LPS 刺激  $0.63 \pm 0.06$ , ジャングルハニー刺激  $0.47 \pm 0.04$  で、有意な差は認められなかった (図6)。

### 3.7 ジャングルハニー投与による腹腔細胞の活性酸素 (O<sub>2</sub><sup>-</sup> 及び H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 産生

ジャングルハニー投与群の腫瘍組織に好中球の強い浸潤が認められたことから、ジャングルハニーによって増加した腹腔細胞の中の好中球が抗腫瘍に関与している可能性が示唆された。IL-1 $\beta$  以外の mRNA 発現比率に有意な変化が認められなかったので、次に、抗腫瘍性因子とし

て知られている活性酸素の産生について検討した。PBS 投与群の  $O_2^-$  産生細胞比率を 1.0 とした場合、ジャングルハニー投与群 1.16, PBS 投与群の  $H_2O_2$  産生細胞を 1.0 とした場合、ジャングルハニー投与群 1.13 で、それぞれ有意 ( $p < 0.001$ ) な増加が認められ、 $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  が抗腫瘍に関与することが示唆された (図 9)。

### 3.8 ジャングルハニー分画による腹腔細胞の IL-1 $\beta$ mRNA の発現

ジャングルハニーの活性成分を同定するため、HPLC 水系ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて 5 つの画分に分け、IL-1 $\beta$  mRNA の発現比率を検討した。IL-1 $\beta$  mRNA 発現比率は、非刺激  $0.48 \pm 0.04$  (mean  $\pm$  S.E.), LPS 刺激  $1.06 \pm 0.05$ , ジャングルハニー非分画刺激  $0.94 \pm 0.06$ , Fr. 1 刺激  $0.67 \pm 0.12$ , Fr. 2 刺激  $1.11 \pm 0.13$ , Fr. 3 刺激  $0.42 \pm 0.05$ , Fr. 4 刺激  $0.58 \pm 0.04$ , Fr. 5 刺激  $0.64 \pm 0.05$  で、非刺激に比べて、Fr. 2 で有意 ( $p < 0.001$ ) な増加が認められた (図 10)。

### 3.9 ジャングルハニー分画による LL/2 腫瘍細胞の腹腔内移植に対する抗腫瘍効果

平均生存日数は、PBS 投与群  $22.50 \pm 2.7$  日 (mean  $\pm$  S.E.), ジャングルハニー非分画投与群  $27.60 \pm 1.69$  日, Fr. 2 投与群  $30.60 \pm 1.06$  日で、PBS 投与群に比べて、Fr. 2 投与群で有意 ( $p < 0.05$ ) な平均生存日数の延長が認められた。また、生存率に関しては、PBS 投与群 0%, ジャングルハニー非分画投与群 40%, Fr. 2 投与群 60% で、ジャングルハニー非分画と Fr. 2 投与群で生存率の増加が認められた。これらの結果より、ジャングルハニー非分画と Fr. 2 投与による延命効果が認められ、Fr. 2 に最も強い延命効果が認められた (図 11)。

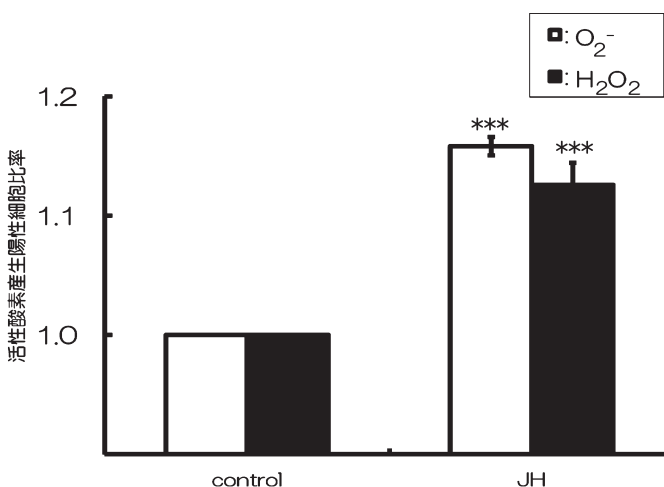
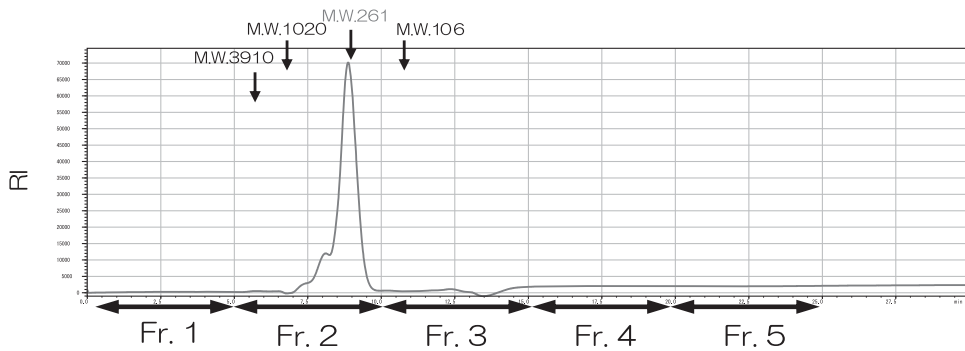


図 9 ジャングルハニーによる腹腔細胞の活性酸素産生

\*\*\*:  $p < 0.001$

1) ゲルろ過クロマトグラフィーによる分画



2) IL-1 $\beta$  mRNA 発現

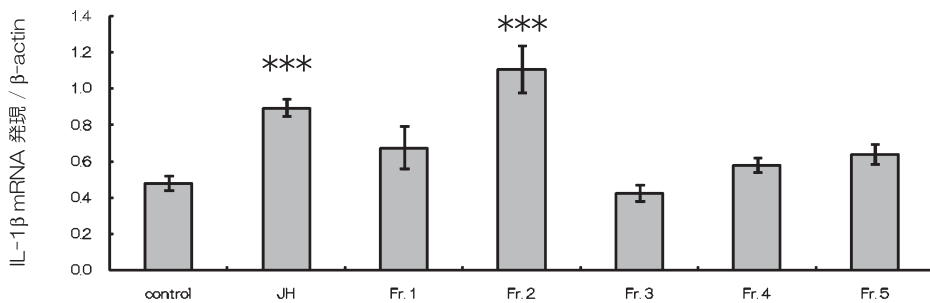


図 10 ジャングルハニーの分画とその画分 (Fr.) による腹腔細胞の IL-1 $\beta$  mRNA 発現  
\*\*\*:  $p < 0.001$

1) 生存日数

群	平均生存日数
control	22.5 $\pm$ 2.72
JH	27.6 $\pm$ 1.69
Fr. 2	30.6 $\pm$ 1.06*

\*:  $p < 0.05$

2) 生存率

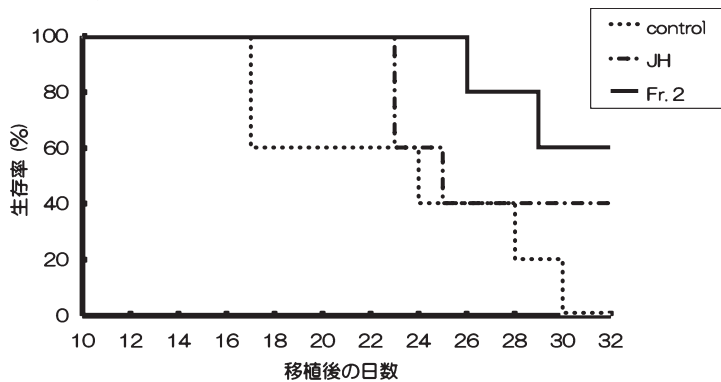


図 11 ジャングルハニーによる LL/2 腫瘍移植マウスの延命効果



#### 4. 考 察

蜂蜜は食用として日常的に親しまれているが、食用だけではなく、伝統的な薬として古くから世界各国で利用され、怪我、火傷など創傷治癒、美容、健康維持などさまざまな用途に用いられている。また、蜂蜜は抗菌作用を持ち、これらに関する報告や、蜂蜜の抗菌作用による創傷治療の報告がされ [13,14]、創傷患者への新しい治療法として期待されている。また、蜂蜜の主要な抗菌作用は、蜂蜜の高い浸透圧、酸性、過酸化水素、花の由来成分であると報告されている [6-12]。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。蜂蜜のひとつであるジャングルハニーは、ナイジェリア産の蜂蜜で、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として利用されてきた。これらの治療薬として利用されているため、ジャングルハニーは生体への免疫作用に対する効果があると考えられる。しかし、ジャングルハニーの免疫作用についての報告は全くされておらず、その詳細な作用機構はまだ解明されていない。そこで、ジャングルハニーの免疫機能への影響と免疫を介した抗腫瘍作用について検討した。ジャングルハニーの投与量に関しては、予備実験で 0.01, 0.1, 1.0 mg/マウスの量を腹腔内投与した結果、1.0 mg/マウスで腹腔細胞の増加が認められたことより全て 1.0 mg/マウスの投与量で実験を行った。ジャングルハニーの投与法に関しては、ジャングルハニーの直接投与の作用が報告されていないため、一般的な投与法である腹腔内投与によりその影響を検討した。

ジャングルハニー腹腔内投与による腹腔細胞数への影響は、PBS 投与群に比べて、ジャングルハニー投与群で 4.38 倍の有意 ( $p < 0.001$ ) な増加が認められた。現在のところ、蜂蜜の腹腔細胞数への影響に関する報告はされていない。しかし、他の天然成分としては、*Chenopodium ambrosioides* (ケアリタソウ) の葉の抽出液や *Oribignya phalerata* Mart (ヤシ) の中果皮の抽出液腹腔内投与によって、腹腔細胞数の増加と腹腔マクロファージを活性化するという報告があり [28,29]、これらの報告と同様の結果であった。腹腔細胞数の増加は、腹腔内にジャングルハニーを投与することにより、ジャングルハニーに反応した細胞が腹腔内に誘導され、増加したためと考えられる。

ジャングルハニーの腹腔内投与により増加した細胞の性状を調べるため、FACS を用いて解析した。Dot Plot への影響は、ジャングルハニー投与群で FSC 値 120 ~ 400, SSC 値 200 ~ 800 に PBS 投与群には認められない細胞集団の出現が認められた。ジャングルハニーにより増加した腹腔細胞の細胞表面抗原への影響を調べるため、抗 CD3 抗体、抗 CD11b 抗体、抗 CD19 抗体、抗 NK 抗体、抗 Gr-1 抗体を用いて検討した。ジャングルハニーにより Gr-1 陽性細胞比率と Gr-1 表面抗原の抗原発現強度に有意 ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) な増加が認められ、形態学的に好中球であることが確認された。蜂蜜の Dot Plot と細胞表面抗原への影響に関する報告はないが、蜜蜂の巣の成分であるプロポリスの腹腔内投与により、好中球数の増加とマクロファージ数の減

少が報告されている [30]。ジャングルハニーによる好中球数の増加に関しては、この報告と同様の結果であった。マクロファージに関しては、ジャングルハニー投与による減少は認められなかったが、CD11b の抗原発現強度の減少傾向が認められたことから、ジャングルハニーが好中球だけでなくマクロファージの細胞表面抗原にも影響を及ぼしていることが考えられる。

ジャングルハニー投与によって腹腔内の好中球が増加したことから、ジャングルハニーに腹腔内へ好中球を誘導する可能性が考えられた。そこで、ジャングルハニーの好中球に対する走化性について検討した。非添加に比べ、ジャングルハニー (1, 10 mg/ml) 添加による好中球の移動速度と方向性の増加が認められた。蜂蜜による好中球の走化性に関する報告はされていないが、他の天然成分としては、*Ganoderma lucidum* (マンネンタケ) に含まれる多糖体により好中球の遊走活性が増加する報告がされており [31]、ジャングルハニーによる結果と同様であったことから、ジャングルハニーが好中球の走化性因子として働くことが示された。さらに、腹腔内への遊走に関わるジャングルハニー以外の走化性因子についても検討した。ジャングルハニー投与による好中球数の増加から、好中球の遊走に関わるケモカインで、腹腔マクロファージが産生する RANTES 及び MIP-2 の mRNA 発現について検討した。RANTES 及び MIP-2 mRNA の発現に変化は認められなかったことより、ジャングルハニー投与による好中球の遊走に RANTES 及び MIP-2 は関与していないことが示唆された。しかし好中球の遊走に関わるケモカインである KC などについてもさらに検討の必要があると考えられる。

ジャングルハニーの腹腔内投与により、腹腔細胞、特に好中球の増加とジャングルハニーの好中球に対する走化活性が確認されたので、これらの増加した免疫細胞を介した抗腫瘍作用を検討した。腫瘍細胞は同系腫瘍で腫瘍抗原性が低く、ヒト癌に類似し、免疫系を抑制することが報告されている LL/2 腫瘍細胞を用いた [32]。腫瘍生着率に関しては、PBS 投与群の腫瘍生着率が 100% であるのに対して、ジャングルハニー投与群の腫瘍生着率は 20% で、ジャングルハニー投与により、腫瘍生着の抑制が認められた。平均腫瘍重量に関しては、PBS 投与群の平均腫瘍重量が 2.57 g であるのに対して、ジャングルハニー投与群の平均腫瘍重量は 0.02 g で、ジャングルハニー投与により、平均腫瘍重量の減少が認められた。これらの腫瘍生着率と平均腫瘍重量の結果より、ジャングルハニーは腫瘍の発生の予防効果、増殖抑制効果があることが示唆された。ジャングルハニー投与による腫瘍の増殖抑制に関して得られた結果は、ロイヤルゼリー、プロポリス、プロポリスに含まれるポリフェノール成分の投与による腫瘍の増殖抑制の報告と一致し [33,34]、ロイヤルゼリーに比べて、ジャングルハニーでより強い腫瘍の増殖抑制が認められた。また、他の天然成分では、*Phellinus linteus* (メシマコブ)、*Chenopodium ambrosioides* (ケアリタソウ) の葉の抽出液投与による腫瘍の増殖抑制が報告されている [35,36]。腫瘍組織の病理組織所見については、PBS 投与群に比べて、ジャングルハニー投与群では腫瘍組織内の広範囲な壊死巣に好中球の強い浸潤が認められた成績から、好中球が腫瘍増殖の抑制に深く関与している可能性が示唆された。

ジャングルハニー投与による抗腫瘍作用と腫瘍組織に好中球の強い浸潤が認められたことから、ジャングルハニーによって増加した腹腔細胞が抗腫瘍作用に関与している可能性が示唆された。そこで、腹腔細胞中のマクロファージ、好中球の活性化と抗腫瘍に関わり、主にマクロファージから産生されるサイトカインの mRNA 発現について検討を加えた。サイトカインの 1 つである IL-1 $\beta$  は、幅広く免疫反応を増強し、好中球の活性と遊走能を高め、炎症反応に関与する。TNF- $\alpha$  は、細胞のアポトーシスを誘導し、腫瘍の壊死誘導に関わる一方で、好中球やマクロファージを活性化し、炎症反応や感染防御に関与するサイトカインである。IL-1 $\beta$  mRNA の発現比率に関しては、非刺激に比べて、ジャングルハニー刺激で、有意 ( $p < 0.001$ ) な増加が認められたが、TNF- $\alpha$  mRNA については、両者間で差は認められなかった。IL-1 $\beta$  の mRNA 発現の増加より、腹腔細胞がジャングルハニー刺激によって活性化されたと考えられる。また、TNF- $\alpha$  mRNA の発現の増加が認められなかったことから、腹腔細胞の活性、抗腫瘍作用には TNF- $\alpha$  が関与していない可能性が示唆された。Tonks らは、Manuka honey により MM6 細胞株とヒト単球の炎症性サイトカイン産生が増強した報告をしており [13-15]、IL-1 $\beta$  の産生に関しては同様の結果であったが、TNF- $\alpha$  については一致しなかった。これは、実験系の違い、または蜂蜜の種類による違いによるものと考えられる。

さらに腹腔細胞の抗腫瘍作用の機構を検討するため、抗腫瘍性因子として知られている活性酸素産生について検討を加えた。O<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生細胞陽性比率は、細胞内に HE を取り込ませ、HE が赤色蛍光を発する Ethidium bromide に酸化され核が染まることを利用して測定した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生細胞陽性比率は、細胞内に DCFH-DA を取り込ませ、DCFH が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によって緑色蛍光を発する DCF に酸化されることにより測定した [37]。活性酸素産生細胞は、PBS 投与群に比べて、ジャングルハニー投与群で、有意 ( $p < 0.001$ ) な増加が認められた。蜂蜜による活性酸素産生への影響の報告はないが、天然成分としては、Ganoderma lucidum (マンネンタケ)、P.cornucopiae (タモギタケ) の抽出液腹腔内投与によって、腹腔細胞の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生が増加するという報告があり [38]、ジャングルハニーと同様の結果であった。活性酸素は、主に活性化された好中球により産生され、感染防御、さらには腫瘍に対する障害を引き起こすことが報告されている [39-42]。腫瘍組織の病理組織所見からは、ジャングルハニー投与群の腫瘍組織内に、好中球の強い浸潤が認められたことより、ジャングルハニー投与による抗腫瘍作用は、腫瘍組織内に浸潤した好中球から産生された活性酸素が関与している可能性が示唆された。

ジャングルハニーに免疫機能の活性化と抗腫瘍作用が認められたことから、次に、ジャングルハニーの有効成分を同定するため、ジャングルハニーを HPLC で 5 つの画分 (Fr.) に分け、各画分の IL-1 $\beta$  の mRNA 発現比率を検討した。IL-1 $\beta$  の mRNA 発現の増加は、ジャングルハニーの Fr. 1, 3, 4, 5 では認められなかったが、Fr. 2 で有意 ( $p < 0.001$ ) な増加が認められた。Fr. 2 に IL-1 $\beta$  mRNA の発現活性が認められたので、さらに Fr. 2 の抗腫瘍作用についても検討した。LL/2 腫瘍細胞移植後の平均生存日数は、PBS 投与群に比べて、ジャングルハニー非分画投与群、

Fr. 2 投与群で増加し, Fr. 2 投与群では, 有意 ( $p < 0.05$ ) な平均生存日数の延長が認められた. この結果より, ジャングルハニーと Fr. 2 投与による延命効果が認められ, Fr. 2 に最も強い延命効果が認められた. 蜂蜜投与による延命効果の報告はないが, 天然成分としては, ロイヤルゼリー, プロポリス, プロポリスに含まれるポリフェノール成分の投与で, 担癌マウスの平均生存日数の延長による延命効果が報告され [20,25,30,33,34], ジャングルハニーも同様の結果であった. また, その他の天然成分では, *P. ostreatus* (ヒラタケ) の投与によって, 担癌マウスの延命効果が認められたと報告 [38] されている. ジャングルハニーの有効成分は Fr. 2 に存在し, この Fr. 2 の有効成分は計算上, 分子量約 261 の物質であると推定された. 蜂蜜, ロイヤルゼリーの有効成分は, 55 kDa のタンパク質 Apalbumin-1, Manuka honey の有効成分は 5.8 kDa の物質であると同定され, これらの成分はマウスのマクロファージの TNF- $\alpha$  産生を活性化すると報告されている [17,43,44]. これらの報告は, ジャングルハニーの有効成分と比べて, 分子量, 物質の免疫活性で異なり, ジャングルハニーの有効成分はこれらと異なったジャングルハニー特有のものであると考えられる.

以上より, ジャングルハニーは腹腔細胞を増加, 特に好中球の増加を誘導し, ジャングルハニー自体に好中球に対する遊走・走化活性が示された. また, 抗腫瘍作用に関しては, ジャングルハニーの刺激によって産生された IL-1 $\beta$  により好中球が活性化され, 活性化された好中球より産生された活性酸素が抗腫瘍作用に関与している可能性が示唆された (図 12). さらに, その有効成分は Fr. 2 に存在し, 分子量約 261 の成分であることが判明した. 今後は, ジャングルハニーの Fr. 2 に含まれる有効成分の同定など, さらなる検討が必要である.

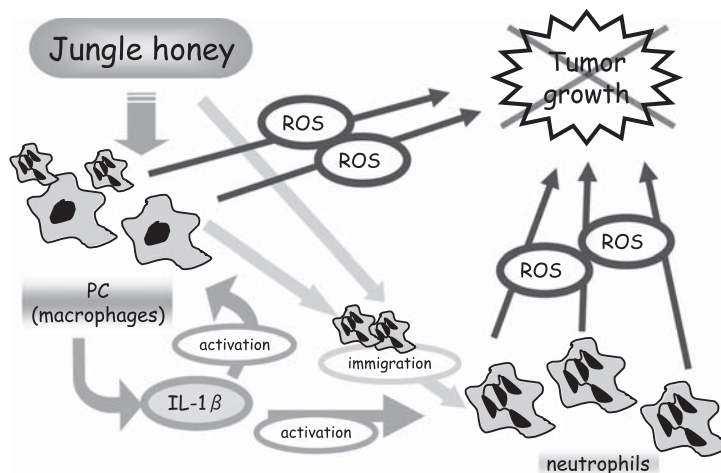


図 12 ジャングルハニーによる免疫活性と抗腫瘍作用の機構  
ROS: reactive oxygen species (活性酸素種)

参 考 文 献

- [1] 竹内実, 本木実, 鈴木伊豆美, 野本亀久雄. 腫瘍抗原特異的キラー T 細胞誘導の BCG による増強効果癌と化学療法, 1993; 10: 1980–1986.
- [2] Nakajima A, Ishida T, Koga M, Takeuchi T, Mazda O, Takeuchi M. Effect of hot water extract from *Agaricus blazei* Murill on antibody-producing cells in mice. *Int Immunopharmacol*, 2002; 2: 1205–1211.
- [3] Qiu PY, Ding HB, Tang YK, Xu RJ. Determination of chemical composition of commercial honey by near-infrared spectroscopy. *J Agric Food Chem*, 1999; 47: 2760–2765.
- [4] Weston RJ, Brocklebank LK. The oligosaccharide composition of some New Zealand honey. *Food Chem*, 1999; 64: 33–37.
- [5] Stinson EE, Subers MH, Petty J, White JW Jr. The composition of honey. V. Separation and identification of the organic acids. *Arch Biochem Biophys*, 1960; 89: 6–12.
- [6] Lusby PE, Coombes A, Wilkinson JM. Honey: A potent agent for wound healing? *J WOCN*, 2002; 29: 295–300.
- [7] Cooper RA, Molan PC, Harding KG. Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. *J R Soc Med*, 1999; 92: 283–285.
- [8] Bogdanov S. Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *Lebensm Wiss Technol*, 1999; 30: 748–753.
- [9] Allen KL, Molan PC, Reid GM. A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. *J Pharm Pharmacol*, 1991; 43: 817–822.
- [10] Somal NA, Coley KE, Molan PC, Hancock BM. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to the antibacterial activity of manuka honey, *J R Soc Med*. 1994 ; 87: 9–12.
- [11] Wahdan H. Causes of the anti-microbial activity of honey. *Infection*, 1998;26:26–31.
- [12] Tim TP, Lamb AJ. Anti-microbial activity of falconoid. *Int J Antimicrob Agents*, 2005; 26: 343–356.
- [13] Al-Waili NS, Saloom KY. Effects of topical honey on post-operative wound infections due to gram positive and gram negative bacteria following caesarean section and hysterectomies. *Eur J Med Res*, 1999; 4: 126–130.
- [14] Albietz JM, Lenton LM. Effect of antibacterial honey on the ocular flora in tear deficiency and meibomian gland disease. *Cornea*, 2006 ; 25: 1012–1019.
- [15] Tonks AJ, Cooper RA, Jones KP, Blair S, Parton J. Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocyte. *Cytokine*, 2003; 21: 242–247.
- [16] Tonks A, Cooper RA, Price AJ, Molan PC, Jones KP. Stimulation of TNF- $\alpha$  release in monocytes by honey. *Cytokine*, 2001; 14: 240–242.
- [17] Tonks AJ, Dudley E, Porter NG, Parton J, Brazier J, Smith EL. A 5.8-kDa component of manuka honey stimulates immune cell via TLR4. *J Leukoc Biol*, 2007; 82: 1–10.
- [18] Al-Waili NS, Haq A. Effect of honey on antibody production against thymus-dependent and thymus-independent antigens in primary and secondary immune responses. *J Med Food*, 2004; 7: 491–494.

- [19] Kohno K, Okamoto I, Sano O, Arai N, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M. Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004; 68: 138–145.
- [20] Bincoletto C, Eberlin S, Figueiredo CA, Luengo MB, Queiroz ML. Effects produced by Royal jelly on haematopoiesis: relation with host resistance against Ehrlich ascites tumor challenge. *Int Immunopharmacol*, 2005; 5: 679–688.
- [21] Nakaya M, Onda H, Sasaki K, Yukiyoshi A, Tachibana H, Yamada K. Effect of royal jelly on Bisphenol A-induced proliferation of human breast cancer cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007; 71: 253–255.
- [22] Park JH, Lee JK, Kim HS, Chung ST, Eom JH, Kim KA, Chung SJ, Paik SY, Oh HY. Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in Balb/c mice. *Int Immunopharmacol*, 2004; 4: 429–436.
- [23] Sforcin JM. Propolis and the immune system. *J Ethnopharmacol*, 2007; 113: 1–14.
- [24] Orsolich N, Sver L, Terzic S, Basic I. Peroral application of water-soluble derivative of propolis and its related polyphenolic compounds and their influence on immunological and antitumor activity. *Vet Res Commun*, 2005; 29: 575–593.
- [25] Orsolich N, Kosalec L, Basic I. Synergistic anti-tumor effect of polyphenolic components of water soluble derivative of propolis against Ehrlich ascites tumor. *Biol Pharm Bull*, 2005; 28: 694–700.
- [26] Benkovic VK, Horvat, BG, Knezevic FD, Bevanda MB, Orsolich N. Enhanced anti-tumor activity of irinotecan combined with propolis and its polyphenolic compounds on Ehrlich ascites tumor in mice. *Biomed Pharmacother*, 2007; 61: 292–297.
- [27] Suzuki I, Hayashi I, Takaki T, Groveman DS, Fujimiya Y. Anti-tumor and anticytopenic effects of aqueous extracts of propolis in combination with chemotherapeutic agents. *Cancer Biother Rasiopharm*, 2002; 17 : 553–562.
- [28] Cruz GV, Pereira PV, Patricio FJ, Costa GC, Sousa SM, Frazao JB, Aragao-Filho WC, Maciel MC, Silva LA, Amaral FM, Barroqueiro ES, Guerra RN, Nascimento FR. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. *J Ethnopharmacol*, 2007; 111: 148–154.
- [29] Nascimento FR, Barroqueiro ES, Azevedo AP, Lopes AS, Ferreira SC, Silva LA, Maciel MC, Rodriguez D, Guerra RN. Macrophage activation induced by *Orbignya phalerata* Mart. *J Ethnopharmacol*, 2006; 103: 53–58.
- [30] Orsolich N, Basic I. Water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages. *J Ethnopharmacol*, 2005; 102: 37–45.
- [31] 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: 289–298.
- [32] Shinya M, Mazda O, Tsuchihara C, Hirai H, Imanishi J, Takeuchi M. Interleukin-2 abolishes myeloid cell accumulation induced by Lewis lung carcinoma. *J Interferon Cytokine Res*, 2003; 23: 631–638.
- [33] Tamura T, Fujii A, Kuboyama N. Anti-tumor effects of royal jell (RJ). *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 1987 ; 89: 73–80.

- [34] Orsolic N, Sver L, Terzic S, Tadic Z, Basic I. Inhibitory effect of water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds on tumor growth and metastasizing ability: A possible mode of anti-tumor action. *Nutr Cancer*, 2003; 47: 156–163.
- [35] Nakamura T, Matsugo S, Uzaka Y, Matsuo S, Kawagishi H. Fractionation and anti-tumor activity of the mycelia of liquid-cultured *Phellinus linteus*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004; 68: 868–872.
- [36] Nascimento FR, Cruz GV, Pereira PV, Maciel MC, Silva LA, Azevedo AP, Barroqueiro ES, Guerra RN. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. *Life Sci*, 2006; 78: 2650–2653.
- [37] Matsugo S, Sasai M, Shinmori H, Yasui F, Takeuchi M, Takeuchi T. Generation of a novel fluorescent product, monochlorofluorescein from dichlorofluorescein by photo-irradiation. *Free Radic Res*, 2006; 40: 959–965.
- [38] Shamtsyan M, Konusova V, Maksimova Y, Goloshchev A, Panchenko A, Simbirtsev A, Petrishchev N, Denisova N. Immunomodulating and anti-tumor of extracts of several mushrooms. *J Biotechnol*, 2004; 113: 77–83.
- [39] Clark RA, Szot S. The myeloperoxidase-hydrogen peroxide-halide system as effector of neutrophil-mediated tumor cell cytotoxicity. *J Immunol*, 1981; 126:1295–1301.
- [40] Clark RA, Klebanoff SJ. Neutrophil-mediated tumor cell cytotoxicity: Role of the peroxidase system. *J Exp Med*, 1975; 14: 1442–1447.
- [41] Dallegri F, Frumento G, Patrone F. Mechanisms of tumor cell destruction by PMA-activated human neutrophils. *Immunology*, 1983; 48: 273–279.
- [42] 長井苑子, 佐竹範夫, 三尾直士, 竹内実, 楠目馨, 西村浩一, 泉孝英. 炎症性肺疾患と好中球の役割. *呼吸*, 1992; 11: 150–155.
- [43] Majtan J, Kovacova E, Bilikova K, Simuth J. The immunostimulatory effect of the recombinant apalbumin 1-major honeybee royal jelly protein-on TNF $\alpha$  release. *Int Immunopharmacol*, 2006; 6: 269–278.
- [44] Simuth J, Bilikova K, Kovacova E, Kuzmova Z, Schroder W. Immunochemical approach to detection of adulteration in honey: physiologically active royal jelly protein stimulating TNF-alpha release is a regular component of honey. *J Agric Food Chem*, 2004 ; 52 : 2154–2158.

## Effect of Jungle Honey on Immune Function and Anti-tumor Activity

Miki FUKUDA

Mayuko MIYAGAWA

Minoru TAKEUCHI

### Abstract

Jungle honey (JH) is collected from timber and blossom by wild honey bees that live in the tropical forest of Nigeria. JH is used as a traditional medicine for colds, skin inflammation and burn wounds as well as general health care. However, the effects of JH on immune functions are not clearly known. Therefore, we investigated the effects of JH on immune functions and anti-tumor activity in mice. Female C57BL/6 mice were injected with JH (1 mg/mouse/day, 7 times intra-peritoneal). After seven injections, peritoneal cells (PC) were obtained. Anti-tumor activity was assessed by growth of Lewis Lung Carcinoma/2 (LL/2) cells. PC numbers were increased in JH-injected mice compared with control mice. In Dot Plot analysis by FACS, a new cell population appeared in JH-injected mice. The percent of Gr-1 surface antigen and the intensity of Gr-1 antigen expression of PC were increased in JH-injected mice. The new cell population was neutrophils. JH possessed chemotactic activity for neutrophils. Tumor incidence and weight were decreased in JH-injected mice. The ratio of reactive oxygen species (ROS) producing cells was increased in JH-injected mice. The effective component in JH was fractionized by gel filtration using HPLC and was an approximate molecular weight (MW) of 261. These results suggest that neutrophils induced by JH possess potent anti-tumor activity mediated by ROS and the effective immune component of JH is substrate of MW 261.

**Keywords:** Jungle honey, neutrophil, chemotaxis, anti-tumor activity, immune function