

## 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

重 吉 瑛 里  
竹 内 実

(平成 24 年 9 月 14 日提出)  
(平成 24 年 11 月 29 日修正)  
(平成 24 年 12 月 17 日再修正)

### 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蜜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、疾患予防薬として利用されてきた。そのため、生体への免疫作用に対する効果があると考えられる。我々は、ジャングルハニーによる好中球数の増加、好中球機能の増強、活性酸素産生による抗腫瘍作用を報告している。しかし、ジャングルハニーによる免疫作用についての詳細な機構はまだ解明されていない。そこで、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検討した。

抗体産生機能については、SRBC (Sheep red blood cell) を抗原とし、抗体産生誘導期と発現期に及ぼす影響について PFC (Plaque forming cell) 法により検討した。抗体産生誘導期では、ジャングルハニーの腹腔内投与及び経口投与により、コントロール [PBS(-) 投与群] と比べ、ジャングルハニー投与群で抗体産生細胞である PFC 数の有意な増加が認められたが、発現期では有意な差は認められなかった。また、脾臓細胞数はジャングルハニーの腹腔内投与により、有意な増加が認められた。貪食細胞陽性比率は、ジャングルハニー投与による影響は認められなかった。腹腔マクロファージの MHC class II, CD86, 脾臓細胞の TCR, CD28, CD3, CD4 の陽性細胞比率は、ジャングルハニー投与群で差は認められなかったが、脾臓細胞の CD19 陽性細胞比率のみ有意な増加が認められた。IL-1 $\beta$  mRNA 発現比率は、腹腔細胞、腹腔マクロファージ及び肺胞マクロファージにおいて、ジャングルハニーにより有意な増加が認められた。IL-6 mRNA 発現比率は、腹腔細胞と腹腔マクロファージにおいて有意な増加が認められた。NF- $\kappa$ B mRNA 発現比率は、ジャングルハニーにより有意な増加が認められた。また、脾臓細胞の IL-4 mRNA 発現比率もジャングルハニーにより有意な増加が認められた。脾臓細胞の増殖は、ジャングルハニーにより有意な増加が認められたが、脾臓細胞の非付着細胞と B 細胞の細胞増殖は、ジャングルハニーによる変化は認められなかった。ジャングルハニーによる抗体産生機能、サイトカイン産生の増強及び脾臓細胞の増加が LPS の受容体である TLR4 を認識している可能性について、TLR4 欠損マウスを用いて抗体産生機能への影響を検討した。PFC 数は、野生型マウスと同様にジャングルハニー投与で有意な増加が認められた。ジャングルハニーの有効成分に関しては、ジャングルハニー全分画を HPLC で 6 つの分画 (Fr. 1~6) に分け、各分画の抗体産生機能とサイトカイン mRNA 発現への影響について検討した。PFC 数は、Fr. 2 投与群で有意な増加が認められ、その他の分画で増加は認められなかった。IL-1 $\beta$  と IL-6 mRNA 発現比率は、Fr. 2 により有意な増加が認められ、分子量約 206~393 の熱に安定な物質であった。

以上より、ジャングルハニーはマクロファージを活性化し、NF- $\kappa$ B を介して IL-1 $\beta$  と IL-6 mRNA 発現を増強させ、マクロファージから産生された IL-1 $\beta$  が Th2 細胞に作用し、IL-4 の産生を増強させ、CD19 陽性細胞が増加し、IL-6 を介して B 細胞の初期段階に作用し、抗体産生細胞へと分化させ、抗体産生機能を増強させた可能性が示唆された。

キーワード：ジャングルハニー、マクロファージ、B 細胞、抗体産生、サイトカイン

## 1. 緒言

蜂蜜は、蜜蜂によって産生される天然産物であり、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、タンパク質を含んでおり、世界中の国々で食用として親しまれている[1-5]。また、蜂蜜は食用としてだけでなく、健康維持の他、創傷の治療薬として利用されてきた。蜂蜜には花の種類によって様々な異なった種類があり、Manuka honey や Acacia honey などがよく知られている。一般的な蜂蜜の作用としては、抗菌作用があり [6, 7]、抗菌作用による創傷の治癒や、蜂蜜に含まれる  $H_2O_2$  によってバクテリアに対する静菌作用と DNA 切断活性が引き起こされ、バクテリアの増殖を抑制することが報告されている [8, 9]。蜂蜜の一つである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蜜蜂が、長期にわたり樹木や花から集めてきた蜂蜜である。ジャングルハニーの成分には、糖質、ビタミン、グルコン酸、タンパク質、ミネラル、アミノ酸などが一般の蜂蜜と比べ多く含まれており、ナイジェリアでは、この蜂蜜が食用ではなく、むしろ健康や美容の他、風邪、皮膚炎、火傷の治療薬として伝統的な医療に利用されてきた。そのため、生体への作用、特に免疫作用に及ぼす効果が考えられる。

蜂蜜による免疫機能への影響としては、MonoMac-6 単球細胞株の TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 の産生増加 [10, 11] や、Manuka honey に含まれる 5.8 kDa の物質による TLR4 を介した TNF- $\alpha$  の産生を増強させる報告 [12]、エールリッヒ腹水癌の増殖を抑制する報告 [13] などがある。一方、蜂蜜のフェノール性成分による炎症組織の NO 及び PGE<sub>2</sub> に対する抗炎症作用が報告されており、蜂蜜に含まれるフェノール成分による抗炎症としての治療の可能性が期待されている [14]。蜂蜜による抗体産生機能への影響については、蜂蜜の経口投与による胸腺依存または胸腺非依存性抗原に対する抗体産生機能を増強させる報告がある [15]。蜂蜜に関連した物質として、ローヤルゼリーとプロポリスがある。ローヤルゼリーは、働き蜂の上顎と下顎の咽頭腺から分泌される成分が反応することによって生成される分泌物であり、蜂蜜とは違い、多くの脂肪酸を含んでいる [16]。ローヤルゼリーの免疫機能への影響としては、ローヤルゼリーの Major royal jelly protein3 による抗アレルギー作用や、ローヤルゼリーから分離した脂肪酸である 10-hydroxy-2-decanoic acid と 3,10-dihydroxy-decanoic acid による免疫調節作用や [17, 18]、抗体産生機能の増強が報告されている [19]。また、プロポリスは、蜜蜂が花からの滲出物を集めて作り出される樹脂性の物質であり [20]、フェノール性の成分を豊富に含んでおり、抗腫瘍作用 [21]、抗酸化作用 [22, 23]、抗炎症作用 [24, 25] 及び抗体産生機能の増強が報告されている [26, 27]。

抗体産生機能は、マクロファージが細菌などの抗原を貪食によって取り込むことにより誘導される。マクロファージは、抗原を取り込むとサイトカインを放出し、T 細胞を活性化する。マクロファージは、分解した抗原を細胞内に持つ MHC class II と結合させ、細胞表面に出ささせ、ヘルパー T 細胞の TCR とマクロファージの細胞表面に出出した MHC class II と抗原が結合することによって T 細胞を活性化し、IL-4、IL-5 や IL-6 などのサイトカインを産生することで、B 細

胞を活性化し、抗体産生細胞に分化させ、抗体を産生させる[28–30]。また、抗体産生は、細菌やウイルスなどに対する生体防御機構において重要な働きを担っており、抗体産生の過程において、細菌などの抗原に対する貪食機能やサイトカインの産生が重要な役割を果たしている。

ジャングルハニーの免疫機能への影響については、腹腔細胞数の増加、好中球の走化活性、活性酸素産生による抗腫瘍作用が報告されている[31–33]。しかしながら、ジャングルハニーによる抗体産生機能への影響については報告されていない。また、蜂蜜の抗体産生機能への影響とその機構についての報告は非常に少なく、詳細な説明はされていない。そこで、ジャングルハニーの抗体産生機能とその機構について、T細胞依存性抗原であるSRBC抗原を用いて抗体産生機能、貪食機能、細胞表面抗原、細胞増殖、サイトカイン及び転写因子mRNA発現に及ぼす影響とその有効成分について検討した。

## 2. 材料及び方法

### 2.1 実験動物

マウスは、8–10週齢のC57BL/6、雌マウスと8–10週齢のC3H/HeJ、雌マウスを使用した。尚、本研究の実験動物に関しては、京都産業大学実験動物実験規定に基づき、同大学動物委員会により承認されたものである。

### 2.2 ジャングルハニーの調製

ジャングルハニー（日本オリジンズ製）を0.2 mg/mlになるように40°Cの蒸留水を加え、十分攪拌した。大型シャーレに入れ、-20°Cで凍結させ、3日間凍結乾燥した。水分の吸収を防ぐため、保存は容器にシリカゲルを入れ、デシケータ内に密閉状態で保存した。なお、ジャングルハニーの成分については図1に示した。凍結乾燥したジャングルハニーをPBS(-) [Phosphate buffer saline: Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> を含まない生理的緩衝溶液: 日水製薬] 溶液で10 mg/mlの濃度に調製し、0.22 μm フィルター (MILLIPORE) を通して滅菌後、4°Cで保存した。実験にはこのジャングルハニーをPBS(-) またはR(-) 培養液 [RPMI1640 (ナカライテスク) 500 ml に、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 を含んだもの] で各濃度に希釈し使用した。

### 2.3 抗原

抗原は、T細胞依存性抗原であるSheep red blood cell (SRBC) を使用した。SRBCは株式会社日本バイオテスト研究所から購入し、製造後2週間以内に使用した。SRBCの調製は、SRBC 1 ml と0.85%生理食塩水を10 ml 加え、2000 rpm, 10 分間、3 回遠心洗浄し、5 × 10<sup>8</sup> 個/ml に調製し、実験に使用した。

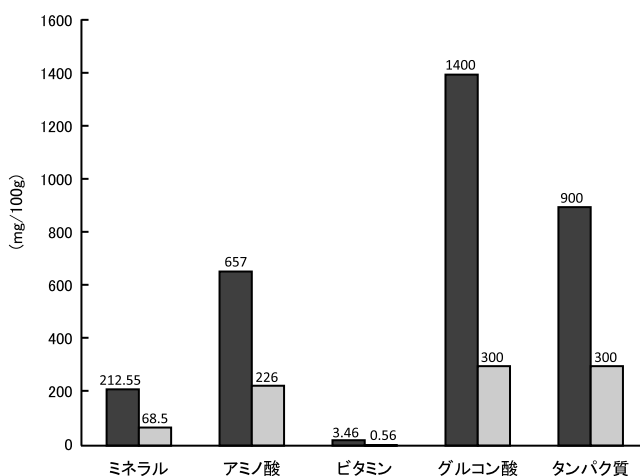


図1 ジャングルハニーの成分  
 ■ : ジャングルハニー, □ : 一般の蜂蜜

## 2.4 抗体産生 (Plaque forming cell assay: PFC 法)

### 2.4.1 ジャングルハニーの投与及び SRBC 抗原の免疫

ジャングルハニーと SRBC の投与は、ジャングルハニーを PBS(-) で 1 mg/0.2 ml/匹の濃度に調製後、 $1 \times 10^8$  個/0.2 ml/匹の濃度に調製した SRBC をマウス腹腔内に同時に投与 (免疫) し、ジャングルハニー投与群とした。コントロールとして PBS(-) 0.2 ml/匹と SRBC  $1 \times 10^8$  個/0.2 ml/匹をマウス腹腔内投与し、これを PBS(-) 投与群とした。また、ジャングルハニーを PBS(-) で 100 mg/0.2 ml/匹の濃度に調製後、経口投与し、 $1 \times 10^8$  個/0.2 ml/匹の濃度に調製した SRBC をマウス腹腔内に同時に投与し、これを経口投与 (p.o.) 群とした。

### 2.4.2 脾臓細胞の調製

脾臓細胞は、上記で免疫したマウスを 4 日後に CO<sub>2</sub> で安楽死させた後、腹腔をハサミで切開し、脾臓を摘出した。摘出した脾臓を R(-) 2 ml と金属メッシュを入れた 35 × 10 mm 細胞培養シャーレに入れ、金属メッシュ内で脾臓をハサミで細切後、R(-) を 2 ml 加え、滅菌ガーゼで濾過し、R(-) で混和後、1500 rpm、5 分、4°C で遠心洗浄を行い、上清を捨て、沈渣に R(-) を加え全量が 5 ml になるように調製した。この脾臓細胞浮遊液 10 μl に 0.2% トリパンプルーを 190 μl 加え、トリパンプルー色素排除法にて、血球計算盤上で生細胞数を測定し、以下の実験に使用した。

### 2.4.3 Plaque forming cell (PFC: プラーク形成細胞)

抗体産生機能は、SRBC 抗原を用いて PFC 法により測定した。

### (1) 誘導期

誘導期の PFC の測定は、上記で調製した脾臓細胞浮遊液 100  $\mu$ l, 25% SRBC 50  $\mu$ l, モルモット補体 (3 倍希釈) 50  $\mu$ l, R(-) 300  $\mu$ l をエッペンチューブに入れて混合し, Chunningham チャンバー内に混合液 150  $\mu$ l 入れてパラフィンで封入後, 37°C で 1 時間反応させて, PFC 数を光学顕微鏡下で測定し, ジャングルハニー投与群と PBS(-) 投与群の PFC 数を比較し, 誘導期における抗体産生機能を評価した。

### (2) 発現期

発現期による PFC 数の測定は,  $1 \times 10^8$  個/0.2 ml/匹の濃度に調製した SRBC をマウス腹腔内に投与し, 投与 4 日後に前述の方法で脾臓を摘出し, 脾臓細胞浮遊液を得た。この脾臓細胞浮遊液 100  $\mu$ l, 25% SRBC 50  $\mu$ l, モルモット補体 (3 倍希釈) 50  $\mu$ l, R(-) 200  $\mu$ l と, PBS(-) 100  $\mu$ l またはジャングルハニー 100  $\mu$ l (最終濃度 10  $\mu$ g/ml または 100  $\mu$ g/ml) を 1.5 ml チューブに入れて混合し, Chunningham チャンバー内に混合液 150  $\mu$ l 入れてパラフィンで封入後, 37°C で 1 時間反応させて, PFC 数を光学顕微鏡下で測定し, ジャングルハニー添加とジャングルハニー非添加の PFC 数を比較し, 発現期における抗体産生機能を評価した。

## 2.5 腹腔細胞の調製

腹腔細胞は, マウスを CO<sub>2</sub> で安楽死させた後, クリーンベンチ内でハサミとピンセットを使い, マウスの皮膚を切皮し, 腹膜を露出させ, 27G の注射針のついた注射器で腹腔内に冷 PBS(-) を約 8 ml 注射し, 腹腔をよく揉み, 22G の注射針に付け替えた注射器で腹腔洗浄溶液を回収した。回収後, 洗浄液を 1000 rpm, 4°C, 10 分間遠心した後, 上清を捨て, 沈渣に R(+) 培養液 (RPMI1640, 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 を含んだ) を 2 ml 加えて懸濁し, 腹腔細胞浮遊液とした。この浮遊液 10  $\mu$ l に, 0.2% トリパンブルーを 90  $\mu$ l 加え, 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, 腹腔細胞浮遊液を  $1 \times 10^6$  個/ml に調製した。

## 2.6 貪食機能

### 2.6.1 SRBC の FITC (fluorescein isothiocyanate) 標識と投与

上記で調製した SRBC を PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit (SIGMA) を使用し, FITC 標識した。SRBC ( $5 \times 10^8$  個) に PKH67 ( $4 \times 10^{-6}$  M) を 1 ml 加え, 5 分間放置し, 1% BSA 2 ml を加え, 1 分間放置した。その後, R(+) を 4 ml 加え, 2000 rpm, 4°C, 10 分間遠心洗浄を行った。遠心洗浄の後, 上清を除去し, R(+) を 10 ml 加え, 2000 rpm, 4°C, 10 分間, 3 回遠心洗浄を行った。さらに, 3 回の遠心洗浄後, 上清を除去し, 0.85% NaCl を 10 ml 加え, 2000 rpm, 4°C, 10 分間, 2 回遠心洗浄を行ない, FITC 標識 SRBC を調製した。この FITC 標識 SRBC を  $1 \times 10^8$  個/0.2 ml

に調製し、ジャングルハニー1 mg/0.2 ml/匹と同時にマウスの腹腔内に投与した。

### 2.6.2 貪食機能の測定

投与 30 分後に、前述と同様に腹腔内洗浄により腹腔細胞を回収した。回収した腹腔細胞浮遊液に塩化アンモニウム溶液を加え、貪食していないSRBCを溶血させた。その後、1000 rpm、5 分間遠心洗浄を行い、FACSortによりFL-1 (Fluorescence-1: 緑色蛍光)を測定し、貪食細胞陽性比率を求めた。

## 2.7 細胞表面抗原

ジャングルハニー 1 mg/0.4 ml/匹、または PBS(-) 0.4 ml/匹をマウス腹腔内に投与し、投与の 4 日後、前述と同様の方法で、腹腔細胞浮遊液と脾臓細胞浮遊液を得た。この細胞浮遊液を PBS(-) で  $1 \times 10^6$  個/ml に調製した。この細胞浮遊液 100  $\mu$ l ( $1 \times 10^5$  個) に FITC 標識した抗 CD3 抗体 (B.D. Bioscience) 0.5 mg/ml, 抗 CD19 抗体 (B.D. Bioscience) 0.5 mg/ml, 抗 TCR 抗体 (B.D. Bioscience) 0.5 mg/ml, PE (phycoerithrin) 標識した抗 CD86 抗体 (B.D. Bioscience) 0.2 mg/ml, 抗 MHC class II 抗体 (B.D. Bioscience) 0.2 mg/ml, 抗 CD4 抗体 (B.D. Bioscience) 0.2 mg/ml, 抗 CD28 抗体 (eBioscience) 0.2 mg/ml を PBS(-) で 5  $\mu$ g/100  $\mu$ l に調製した抗体希釈液と 4°C, 45 分間反応させた。非染色として、細胞浮遊液 100  $\mu$ l に PBS(-) 100  $\mu$ l を加え、同様に反応させた。反応終了後、FACS 緩衝液 (9.6 g の  $\text{NaN}_3$ , FCS 10 ml, 10 mg/ml の  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  溶液 10 ml に蒸留水を加え全量で 1000 ml にしたものを) を 2 ml 加え、1000 rpm, 4°C, 10 分間遠心洗浄を行った。遠心洗浄後、上清を除去し、500  $\mu$ l の FACS 緩衝液を加え FACSort (BD) を用いて、FL-1 (Fluorescence-1: 緑色蛍光) と FL-2 (Fluorescence-1: 赤色蛍光) を測定し、各抗原陽性細胞比率を測定した。また、マクロファージ分画を領域 GATE1 (図 6a), 脾臓細胞分画を GATE2 (図 7a) として測定した。

## 2.8 肺胞マクロファージの調製

肺胞マクロファージは、気管支肺胞洗浄によって回収した。マウス腹腔内に PBS(-) で 10 倍希釈したソムノペンチル 0.5 ml を注射し、麻酔死させ、滅菌済みのハサミとピンセットを用いて腹部から頸部にかけて肺及び気管支が露出するよう切開した。露出した主気管支が伸びるようにピンセットを差し込み、主気管支にメスの先で穴を開け、22G テルモノンベベル針を挿入した後、主気管支の下に綿糸を通して針と主気管支を結び固定した。固定後、PBS(-) 1 ml を入れた針なしテルモシリンジをノンベベル針に装着し、PBS(-) 0.9 ml を主気管支から肺へと注入し回収する操作を行い、この操作を 5 回行い、回収液を気管支肺胞洗浄液 (Broncho Alveolar Lavage: BALF) とした。肺胞マクロファージの調製は、BALF を 1500 rpm, 4°C, 10 分間遠心後、上清を取り除き、沈渣に R(+) 0.5 ml を加え、肺胞マクロファージ浮遊液とした。この細胞浮遊液 10  $\mu$ l に 0.2% トリパンプルー 10  $\mu$ l を加え、色素細胞排除試験法により血球計算盤で生細胞数を測定

し、肺胞マクロファージ浮遊液を $5 \times 10^5$  個/ml の濃度に調製した。

## 2.9 サイトカインと NF- $\kappa$ B mRNA の発現

### 2.9.1 腹腔細胞と肺胞マクロファージの培養

前述で調製した腹腔細胞  $1 \times 10^5$  個/100 $\mu$ l/well または肺胞マクロファージ  $5 \times 10^4$  個/100 $\mu$ l/well を 96 well 細胞培養プレート (FALCON) に加えた後、R(-) を 100 $\mu$ l, またはジャングルハニー溶液 100 $\mu$ l (最終濃度 10 $\mu$ g/ml~500 $\mu$ g/ml) を各 well に添加し、5% CO<sub>2</sub> 下、37°C で 24 時間培養した。

### 2.9.2 腹腔マクロファージの培養

前述で調製した腹腔細胞  $1 \times 10^5$  個/100 $\mu$ l/well を 96 well 細胞培養プレートに加え、5% 37°C で 2 時間放置した。2 時間後、上清を除去し、非付着細胞を取り除き、付着細胞を腹腔マクロファージとした。その後、腹腔マクロファージに R(+) 100 $\mu$ l を加え、R(-) を 100 $\mu$ l, またはジャングルハニー溶液 100 $\mu$ l (最終濃度 500 $\mu$ g/ml) を各 well に添加し、5% CO<sub>2</sub> 下、37°C で 24 時間培養した。

### 2.9.3 全 RNA の抽出

細胞を 24 時間培養後、上清を除去し、SolutionD (Denaturing solution) を 100 $\mu$ l 加え、各 well の細胞を溶解し、回収した。この操作を 2 回行い、1 well につき計 200 $\mu$ l の培養細胞抽出液を回収した。それぞれの回収した細胞抽出液を 200 $\mu$ l, H<sub>2</sub>O-phenol 200 $\mu$ l, 2M-Sodium Acetate 20 $\mu$ l, CIAA (Chloroform isomylalcohol) 80 $\mu$ l 加え、4°C, 15000 rpm, 5 分間遠心した。遠心後、上清 200 $\mu$ l を取り、この上清に 100%エタノール 400 $\mu$ l 加えて攪拌し、-20°C で 1 時間静置した。その後、4°C, 15000 rpm, 30 分間遠心後、上清を除去し、沈澱に SolutionD 300 $\mu$ l, phenol/CIAA 300 $\mu$ l 加えて攪拌し、20°C, 15000 rpm, 5 分間遠心した。遠心後、上清を 300 $\mu$ l 取り、この上清に 100%エタノール 700 $\mu$ l 加えて攪拌し、-20°C で 1 時間静置した。その後、4°C, 15000 rpm, 20 分間遠心後、上清を除去し、沈澱に 75%エタノール 1000 $\mu$ l 加えて攪拌し、4°C, 15000 rpm, 10 分間遠心した。遠心後、上清を除去し、アスピレーターを用いて減圧乾燥させ、全 RNA を得た。また、脾臓細胞の全 RNA 抽出は、SRBC とジャングルハニーを投与した 4 日後に回収した脾臓細胞を SolutionD で溶解させ、上記の方法により抽出し、全 RNA を得た。

### 2.9.4 cDNA の作成

上記で得た全 RNA に滅菌水 10 $\mu$ l, random primer (宝酒造) 1 $\mu$ l 加えて攪拌し、軽く遠心後、パラフィルムを巻いて 65°C で 5 分間静置した後、5 分間水冷中に静置した。その後、DTT (Dithiothreitol) (invitrogen) 4 $\mu$ l, 5  $\times$  First-Strand Buffer (invitrogen) 8 $\mu$ l, 25 mM dNTP (Deoxynucleoside triphosphate)

0.8  $\mu$ l, MLV (Murine leukemia virus) (invitrogen), 滅菌水 15.2  $\mu$ l 加えて攪拌し, 軽く遠心した後, 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 分間処置し MLV を失活させ, 10 分間氷冷中で静置し, cDNA を作成した.

#### 2.9.5 PCR (polymerase chain reaction)

各サイトカイン, NF- $\kappa$ B mRNA 及び  $\beta$ -actin mRNA の発現を検討するため, 上記で調製した cDNA サンプル 1  $\mu$ l, 下記の sense, anti-sense 各プライマー (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 加え, 混合した. この混合液を DNA Engine Thermal Cycler を用いて, TGF- $\beta$  は 26 サイクル,  $\beta$ -actin, IL-1 $\beta$ , IL-10 は 30 サイクル, NF- $\kappa$ B は 32 サイクル, IL-5, IL-6 は 35 サイクル, IL-4, IL-12 は 36 サイクル行い, cDNA を増幅した. なお 1 サイクルは, 94°C denature, 56°C annealing, 72°C extension の反応を各 30 秒とした. プライマーは以下の配列のものを使用した.

##### $\beta$ -actin (250 bp)

sense            5'-GCATTGTTACCAACTGGGAC-3'  
antisense        5'-TCTCCGGAGTCCATCACAAT-3'

##### IL-1 $\beta$ (290 bp)

sense            5'-AGCTACCTGTGTCTTTCCCG-3'  
antisense        5'-GTCGTTGCTTGGTTCTCCTT-3'

##### IL-6 (268 bp)

sense            5'-GATGCTACCAAACCTGGAGATAATC-3'  
antisense        5'-GGTCCTTAGCCACTCCTTCTGTG-3'

##### IL-4 (174 bp)

sense            5'-CGAAAAGCCCCGAAAGAGTC-3'  
antisense        5'-GGAGATGGATGTGCCAAAC-3'

##### IL-5 (227 bp)

sense            5'-AAAGAGAAGTGTGGCGAGGA-3'  
antisense        5'-GCATTTGCACAGTTTTGTGG-3'

##### IL-12 (200 bp)

sense            5'-GTGGAATGGCGTCTCTGTCT-3'  
antisense        5'-TGGTTTGATGATGTCCCTGA-3'



#### IL-10 (274 bp)

sense 5'-GTGAAGACTTTCTTTCAAACAAAG-3'

antisense 5'-CTGCTCCACTGCCTTGCTCTTATT-3'

#### TGF- $\beta$ (330 bp)

sense 5'-AGAGCCCTGGATAACTATTGCTTC-3'

antisense 5'-GCTGCACTTGCAGGAGCGCAC-3'

#### NF- $\kappa$ B (283 bp)

sense 5'-CTCCCTACGGTGGGATTACA-3'

antisense 5'-AGCTGCAGAGCCTTCTCAAG-3'

### 2.9.6 電気泳動

8%アクリルアミドゲルを作成し、上記で増幅させた PCR 産物 20  $\mu$ l をゲルコームに注入し、40 mA で約 90 分間、電気泳動を行った。分子量マーカーは、pBR322DNA-MSP I Digest 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、蒸留水で軽く洗い、BioDoc-It システム (UVP) で泳動画像を取り込んだ。

### 2.9.7 サイトカイン及び NF- $\kappa$ B mRNA 発現比率

サイトカイン及び NF- $\kappa$ B mRNA の発現比率は、上記で取り込んだ泳動画像を Scion image によりデシメトリー解析を行い、それぞれの mRNA の発現量を求め、 $\beta$ -actin に対する各サイトカイン及び NF- $\kappa$ B の発現比率を求めた。

## 2.10 脾臓細胞の分離と細胞増殖

### 2.10.1 非付着細胞の分離

非付着細胞の分離は、前述で得た脾臓細胞浮遊液を  $5 \times 10^6$  個/ml に調製し、96 well 細胞培養プレートに  $5 \times 10^5$  個/100  $\mu$ l/well 加え、37°C で 2 時間放置した。2 時間後、上清を回収し、これを非付着細胞分画とした。

### 2.10.2 B 細胞の分離

前述で得た脾臓細胞浮遊液を  $1 \times 10^7$  個/40  $\mu$ l に調製し、脾臓細胞 40  $\mu$ l に Biotin-Antibody Cocktail (抗 CD43 抗体, 抗 CD4 抗体, Ter-119 抗体を含む) 10  $\mu$ l を加え、4°C で 15 分間放置した。15 分後、MACS buffer [PBS(-) に 0.5% FCS, 5 mM EDTA を加えたもの] 30  $\mu$ l と Anti-Biotin MicroBeads 10  $\mu$ l を加え、4°C で 15 分間放置し、脾臓細胞中の B 細胞以外の細胞を磁気標識した。反応終了

後, 2 ml の MACS buffer を加え, 混和後, 1500 rpm, 4°C, 10 分間遠心洗浄を行った. 遠心後, 上清を取り除き, MACS buffer 1 ml で懸濁した. 磁気標識した脾臓細胞を autoMACS Pro Separator (Miltenyi Biotec K.K.) を使用し, 磁気標識されていない細胞を分離し, この細胞を B 細胞浮遊液とした. 分離後, B 細胞浮遊液を 1500 rpm, 4°C, 10 分間遠心した. 遠心後, 上清を取り除き, R(+) 1 ml で懸濁し, 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, B 細胞浮遊液を  $5 \times 10^6$  個/ml に調製した.

### 2.10.3 細胞増殖

全脾臓細胞, 上記で分離した非付着細胞, B 細胞を  $5 \times 10^6$  個/ml に調製し, 96 well 細胞培養プレートに, この細胞浮遊液 100  $\mu$ l と, ジャングルハニー溶液 (最終濃度 500  $\mu$ g/ml) を 100  $\mu$ l 加え, 37°C で 24 時間培養した. 24 時間培養後, <sup>3</sup>H-Thymidine を 18.5 kBq/25  $\mu$ l/well 加え, さらに 24 時間培養した. 培養終了後, セルハーベスターで細胞を回収し, トップカウンターを用いて放射活性(cpm) の値を測定し, ジャングルハニー非添加の値を 1 として表示した.

### 2.10.4 細胞形態

細胞形態は, 上記で培養した脾臓細胞浮遊液 100  $\mu$ l ( $1 \times 10^5$  個) をスライドグラス上の遠心法浮遊液細胞収集装置に滴下し, 500 rpm, 5 分間遠心した. 遠心後, スライドグラスにメチルアルコールを滴下し 3 分間固定し, ギムザ染色液で 30 分間染色した. 染色後, スライドグラスの裏面から染色液を水道水で洗い流し, ドライヤーで乾燥させ, サイトスピン標本を作製し, 光学顕微鏡で観察した.

## 2.11 ジャングルハニーの分画と有効成分

ジャングルハニーは, HPLC 水系ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて示差屈折計(RI) で検出した. OHpak SB-802HQ カラム (Shodex) を用いて, ジャングルハニー 100 mg/ml を流速 0.5 ml/min で PBS(-) により溶出した. 0~60 分間溶出し, 10 分間隔で分取し, 0~10 分をフラクション 1 (Fr. 1), 10.01~20 分を Fr. 2, 20.01~30 分を Fr. 3, 30.01~40 分を Fr. 4, 40.01~50 分を Fr. 5, 50.01~60 分を Fr. 6 として分画した. 分画後, SC250 Express Speed Vac<sup>®</sup> Concentrator (Thermo) を用いて 24 時間凍結乾燥させた後, 各分画の重量を測定し, PBS(-) で 10 mg/ml に調製した. それぞれの分画は, PBS(-) で 1 mg/0.2 ml の濃度に調製し, SRBC  $1 \times 10^8$  個/0.2 ml と同時にマウス腹腔内に投与し, 投与の 4 日後に前述の方法で PFC 数を測定した. また, サイトカイン mRNA 発現は, Fr. 2 を最終濃度 1 mg/ml に調製し, 腹腔細胞に加え, 24 時間培養し, 前述と同様に RT-PCR によって測定した. なお, Fr. 2 の熱処理は 120°C, 20 分間オートクレーブで処理し, 同様に PFC 数とサイトカイン mRNA 発現を測定した.

ジャングルハニーの主要成分としてグルコン酸が含まれていることから, グルコン酸による

抗体産生機能とサイトカイン mRNA 発現を前述と同様に検討した。グルコン酸は、グルコン酸ナトリウム（ナカライテスク）を使用し、PBS(-)で 1 mg/0.2 ml の濃度に調製し、SRBC  $1 \times 10^8$  個/0.2 ml と同時にマウス腹腔内に投与し、投与の 4 日後に前述の方法で PFC 数を測定した。また、IL-1 $\beta$  mRNA 発現は、グルコン酸を最終濃度 10  $\mu$ g/ml ~ 1 mg/ml の濃度に調製し、前述で調製した腹腔細胞に加え、24 時間培養後、前述と同様に RT-PCR によって測定した。

## 2.12 有意差検定

全ての実験において、平均値と標準偏差を求め、全ての成績値は平均値 (mean)  $\pm$  標準偏差 (standard deviation: S.D.) 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抗体産生機能への影響

#### 3.1.1 誘導期

抗体産生機能は、プラーク形成細胞 (PFC) により求めた (図 2a)。ジャングルハニー腹腔内投与の場合、脾臓 1 個あたりの PFC 数は、PBS(-) 投与群  $2.96 \pm 1.82 \times 10^4$  個/脾臓 (mean  $\pm$  S.D.)、ジャングルハニー投与群  $9.26 \pm 3.69 \times 10^4$  で、ジャングルハニー投与により有意 ( $p < 0.001$ ) な増加が認められた (図 2b)。脾臓細胞  $1 \times 10^6$  個あたりの PFC 数は、PBS(-) 投与群  $198.56 \pm 32.16$  / 脾臓細胞  $1 \times 10^6$  個 (mean  $\pm$  S.D.)、ジャングルハニー投与群  $450.95 \pm 203.87$  で、ジャングルハニー投与により、有意 ( $p < 0.001$ ) な増加が認められた (図 3a)。また、経口投与の場合、脾臓 1 個あたりの PFC 数は、PBS(-) 投与群  $4.50 \pm 1.68 \times 10^4$ 、ジャングルハニー投与群  $8.30 \pm 2.65 \times 10^4$  で、ジャングルハニー投与により有意 ( $p < 0.05$ ) な増加が認められた (図 2b)。脾臓細胞  $1 \times 10^6$  個あたりの PFC 数は、PBS(-) 投与群  $358.09 \pm 98.10$ 、ジャングルハニー投与群  $674.07 \pm 262.11$  で、ジャングルハニー投与により有意 ( $p < 0.05$ ) な増加が認められた (図 3a)。

#### 3.1.2 発現期

発現期の PFC 数は、PBS 群  $384.23 \pm 96.00$  / 脾臓細胞数  $1 \times 10^6$  個 (mean  $\pm$  S.D.)、ジャングルハニー 10  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml 群  $358.82 \pm 155.62$ ,  $414.99 \pm 82.83$  で、3 群間で有意な差は認められなかった (図 3b)。

#### 3.1.3 脾臓細胞数

脾臓細胞数は、ジャングルハニー腹腔内投与において、PBS(-) 投与群  $1.63 \pm 0.34 \times 10^8$  個/匹 (mean  $\pm$  S.D.)、ジャングルハニー投与群  $2.15 \pm 0.44 \times 10^8$  で、ジャングルハニー投与により、有

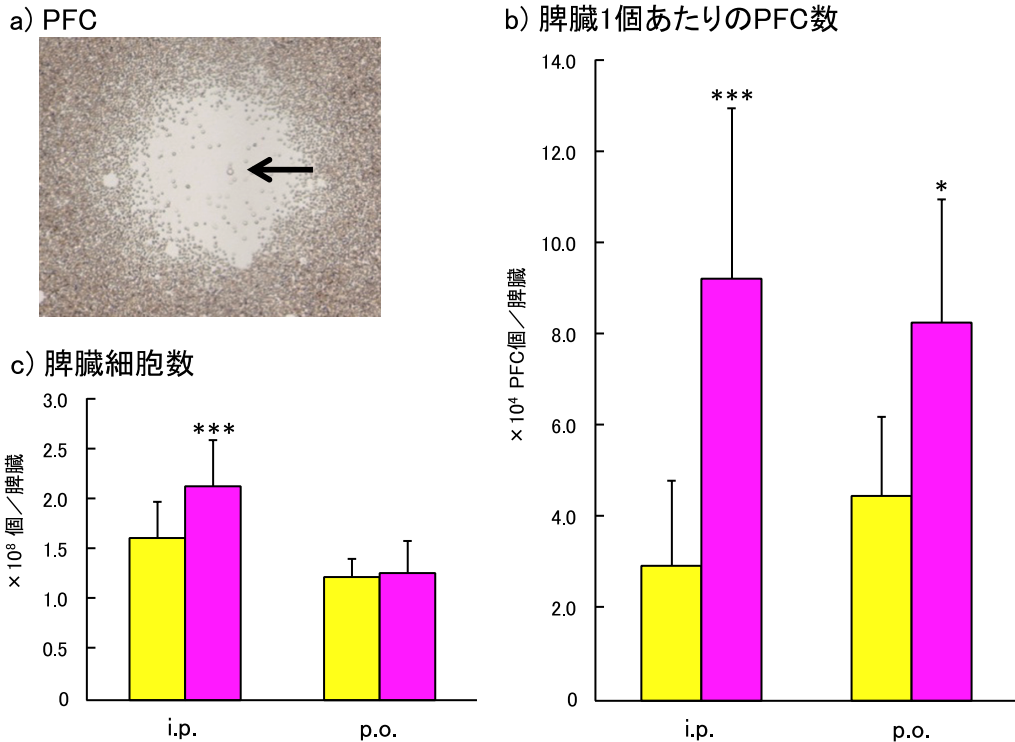


図2 ジャングルハニー投与による脾臓細胞数と抗体産生機能への影響  
 ■: PBS(-)投与群, ■: JH投与群, i.p.: 腹腔内投与, p.o.: 経口投与, ←: 抗体産生細胞  
 \*: p < 0.05, \*\*\*: p < 0.001

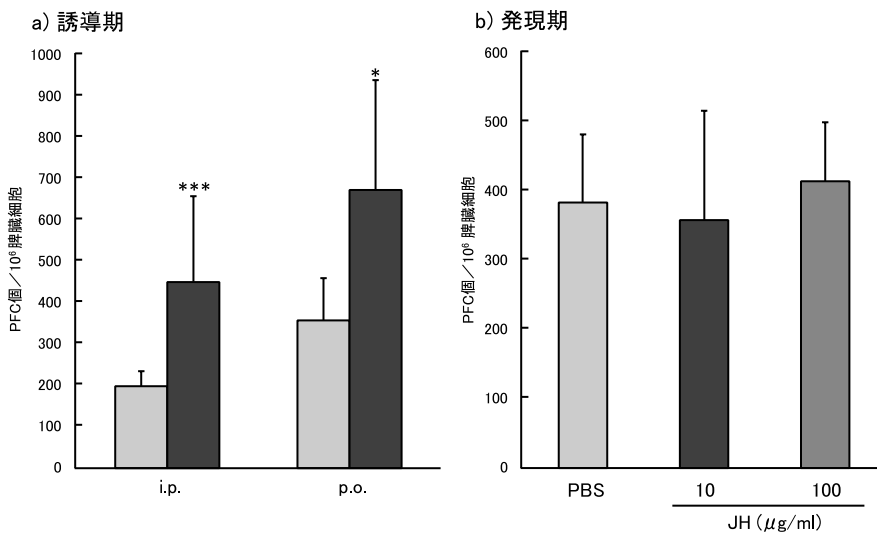


図3 ジャングルハニー投与による抗体産生機能への影響  
 ■: PBS(-)投与群, ■: JH投与群, \*: p < 0.05, \*\*\*: p < 0.001

意 ( $p < 0.001$ ) な増加が認められた (図2c).

ジャングルハニーによる抗体産生は、腹腔内投与と経口投与ともに抗体産生の初期である誘導期において増強されたが、発現期には影響を及ぼさなかった。この成績から、以下の実験ではジャングルハニーを腹腔内投与とした。

### 3.2 ジャングルハニー腹腔内投与による腹腔マクロファージの貪食機能への影響

抗体産生の機構は、図4で示した。抗体産生の最初の過程である貪食機能についてSRBCをFITC標識し(図5a)、検討した。貪食機能は、PBS(-)投与群とジャングルハニー投与群で、細胞が緑色蛍光を発しており、SRBCが腹腔マクロファージの細胞内に取り込まれていることが確認できたが、PBS(-)投与群とジャングルハニー投与群で貪食機能に差は認められなかった(図5c)。また、貪食細胞陽性比率は、PBS(-)投与群  $24.38 \pm 2.84$  (mean  $\pm$  S.D.), ジャングルハニー投与群  $29.56 \pm 5.51$  で、PBS(-)投与群とジャングルハニー投与群間で有意な差は認められなかった(図5d)。

### 3.3 ジャングルハニー投与による腹腔マクロファージと脾臓細胞の Dot Plot 及び細胞表面抗原への影響

ジャングルハニーの投与により、抗体産生機能の増強が認められたことから、抗体産生の過

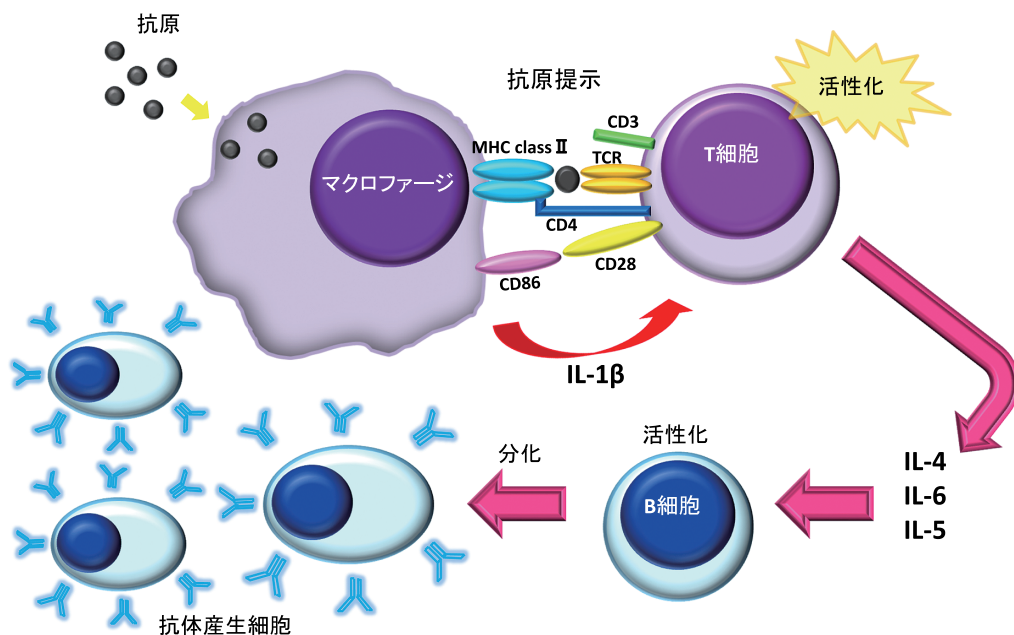


図4 抗体産生の機構  
Y: 抗体

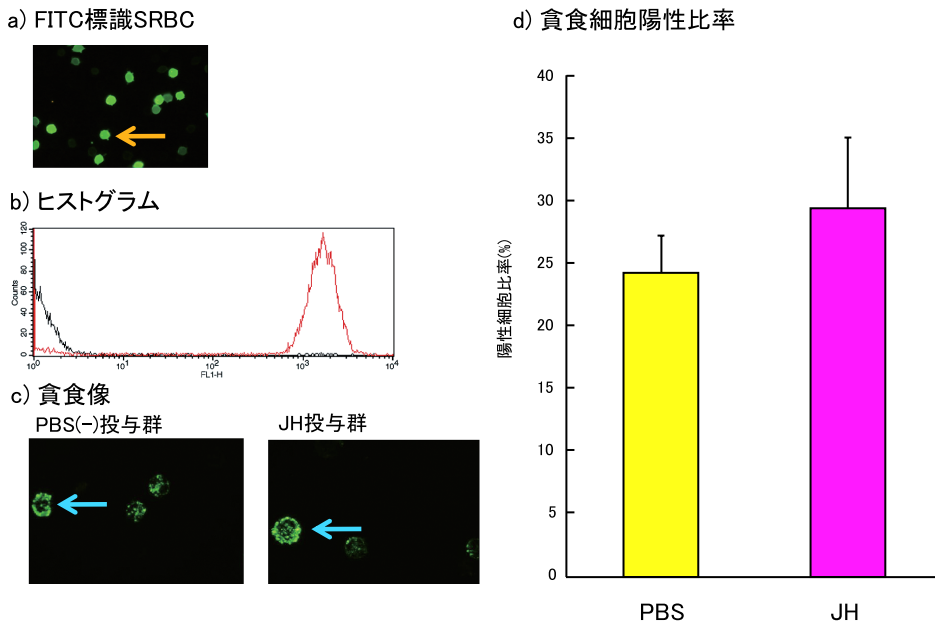


図5 ジャングルハニー投与による貪食機能への影響  
 〡 : FITC 標識 SRBC, 〡 : SRBC を貪食したマクロファージ

程で重要な抗原提示を担っている腹腔マクロファージの細胞表面抗原MHC class II, CD86, T 細胞の細胞表面抗原 TCR, CD28, CD3, CD4 及び B 細胞の細胞表面抗原である CD19 の陽性細胞比率を検討した。

### 3.3.1 腹腔マクロファージ

腹腔マクロファージの領域は、GATE1 (図 6a) を用いて検討した。MHC class II の陽性細胞比率は、PBS(-) 投与群  $80.52 \pm 7.36$  (mean  $\pm$  S.D.), ジャングルハニー投与群  $83.94 \pm 5.07$  で、両群において有意な差は認められなかった。CD86 の陽性細胞比率は、PBS(-) 投与群  $80.79 \pm 5.00$ , ジャングルハニー投与群  $84.24 \pm 3.28$  で、両群において有意な差は認められなかった (図 6b)。なお、Dot Plot に関しては、PBS(-) 投与群とジャングルハニー投与群間において変化は認められなかった (図 6a)。

### 3.3.2 脾臓細胞

脾臓細胞の領域は、GATE2 (図 7a) を用いて検討した。CD19 陽性細胞比率は、PBS(-) 投与群  $26.63 \pm 6.94$  (mean  $\pm$  S.D.), ジャングルハニー投与群  $38.16 \pm 8.62$  で、PBS(-) 投与群と比べ、ジャングルハニー投与群において有意 ( $p < 0.05$ ) な増加が認められた。CD3 陽性細胞比率は、

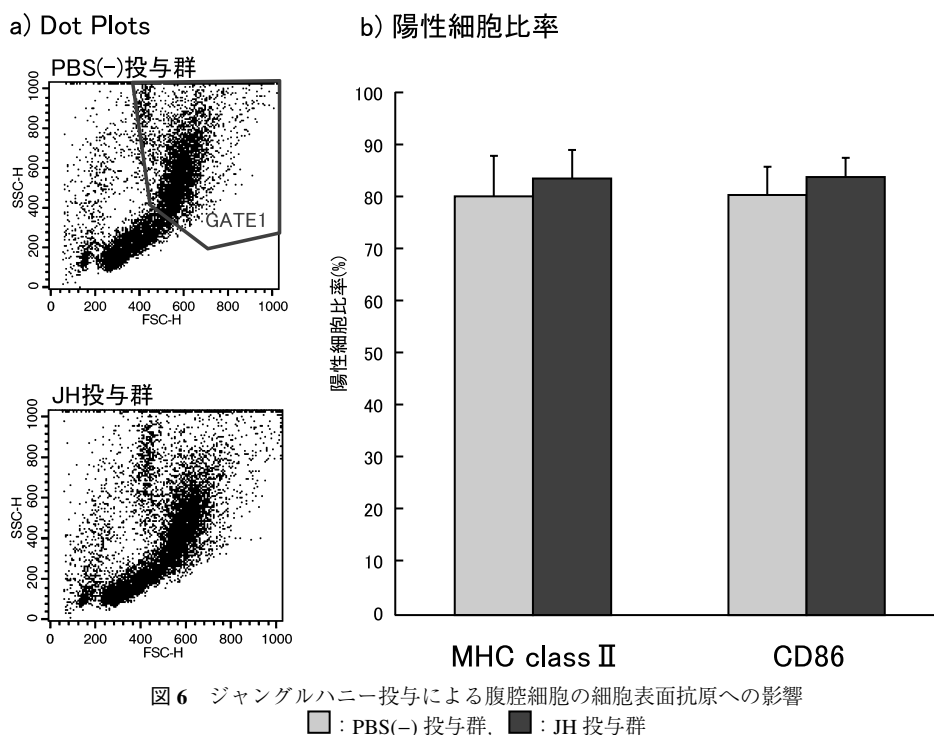


図6 ジャングルハニー投与による腹腔細胞の細胞表面抗原への影響  
 □ : PBS(-) 投与群, ■ : JH 投与群

PBS(-) 投与群  $59.67 \pm 5.55$ , ジャングルハニー投与群  $61.45 \pm 3.09$  で, 両群において有意な差は認められなかった. CD4 陽性細胞比率は, PBS(-) 投与群  $61.09 \pm 4.51$ , ジャングルハニー投与群  $63.28 \pm 6.39$  で, 両群において有意な差は認められなかった. TCR 陽性細胞比率は, PBS(-) 投与群  $67.88 \pm 5.29$ , ジャングルハニー投与群  $63.36 \pm 1.71$  で, 両群において有意な差は認められなかった. CD28 陽性細胞比率は, PBS(-) 投与群  $82.36 \pm 1.61$ , ジャングルハニー投与群  $82.11 \pm 1.29$  で, 両群において有意な差は認められなかった (図 7b). なお, Dot Plot に関しては, PBS(-) 投与群とジャングルハニー投与群間において変化は認められなかった (図 7a).

### 3.4 ジャングルハニーによるサイトカインと NF- $\kappa$ B mRNA 発現比率への影響

ジャングルハニーの投与により抗体産生機能の増強と CD19 陽性細胞比率の増加が認められたことから, 抗体産生に関係する腹腔マクロファージと脾臓細胞から産生されるサイトカイン及び転写因子の mRNA 発現について検討した.

#### 3.4.1 腹腔細胞のサイトカイン mRNA 発現比率

IL-1 $\beta$  mRNA 発現比率は, ジャングルハニー非添加  $0.89 \pm 0.14$  (mean  $\pm$  S.D.), ジャングルハニー 10  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml 添加  $1.10 \pm 0.13$ ,  $1.09 \pm 0.13$  で, 非添加と比べ, ジャングルハニー添加

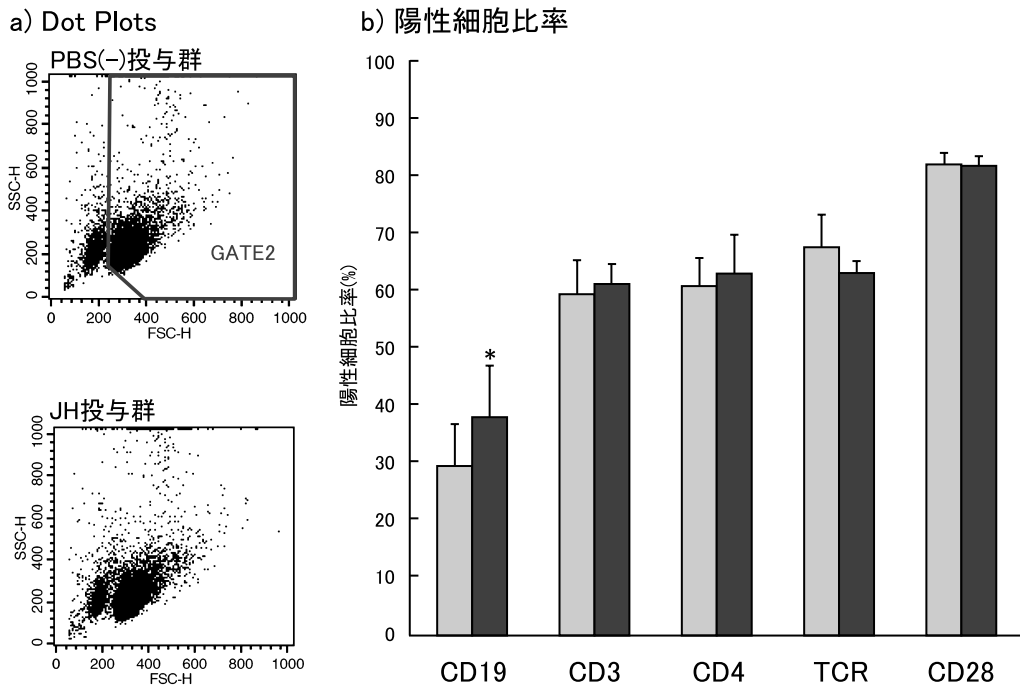


図7 ジャングルハニー投与による脾臓細胞の細胞表面抗原への影響

□ : PBS(-) 投与群, ■ : JH 投与群, \*:  $p < 0.05$

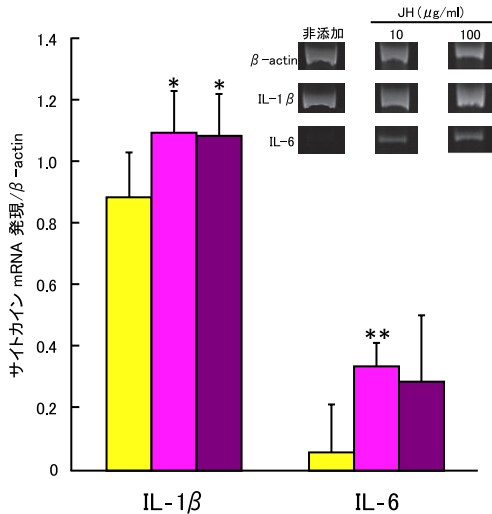
において有意 ( $p < 0.05$ ) な増加が認められた。IL-6 mRNA 発現比率は、非添加  $0.06 \pm 0.15$  (mean  $\pm$  S.D.), ジャングルハニー  $10 \mu\text{g/ml}$ ,  $100 \mu\text{g/ml}$  添加  $0.34 \pm 0.07$ ,  $0.29 \pm 0.21$  で、非添加と比べ、ジャングルハニー添加において有意 ( $p < 0.01$ ) な増加が認められた (図 8a)。IL-12 mRNA 発現比率は、非添加  $0.38 \pm 0.09$ , ジャングルハニー  $10 \mu\text{g/ml}$ ,  $100 \mu\text{g/ml}$  添加  $0.37 \pm 0.12$ ,  $0.32 \pm 0.08$  で、非添加と比べ、ジャングルハニー添加において有意な差は認められなかった。IL-10 mRNA 発現比率は、非添加  $0.40 \pm 0.18$ , ジャングルハニー  $10 \mu\text{g/ml}$ ,  $100 \mu\text{g/ml}$  添加  $0.32 \pm 0.08$ ,  $0.30 \pm 0.09$  で、非添加と比べ、ジャングルハニー添加において有意な差は認められなかった。TGF- $\beta$  mRNA 発現比率は、非添加  $0.60 \pm 0.23$ , ジャングルハニー  $10 \mu\text{g/ml}$ ,  $100 \mu\text{g/ml}$  添加  $0.46 \pm 0.20$ ,  $0.49 \pm 0.38$  で、非添加と比べ、ジャングルハニー添加において有意な差は認められなかった (図 8b)。

### 3.4.2 腹腔マクロファージの IL-1 $\beta$ と IL-6 mRNA 発現比率

腹腔細胞で IL-1 $\beta$  と IL-6 mRNA 発現の増加が認められたことから、IL-1 $\beta$  と IL-6 の主要な産生細胞である腹腔マクロファージについて検討した。IL-1 $\beta$  mRNA 発現比率は、非添加  $0.76 \pm 0.05$  (mean  $\pm$  S.D.), ジャングルハニー  $500 \mu\text{g/ml}$  添加  $1.21 \pm 0.01$  で、非添加と比べ、ジャングルハニー添加において有意 ( $p < 0.01$ ) な増加が認められた。IL-6 mRNA 発現比率は、非添加  $0.00$



a) IL-1β とIL-6 mRNA 発現比率



b) IL-12、IL-10及びTGF-β mRNA 発現比率

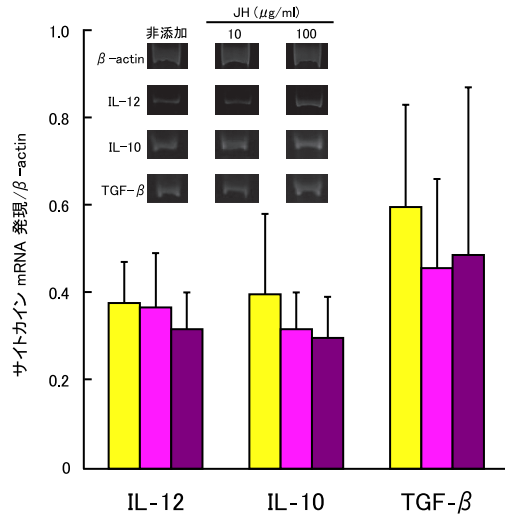


図8 ジャングルハニーによる腹腔細胞のサイトカイン mRNA 発現比率への影響  
 □ : 非添加, □ : JH 10 μg/ml, □ : JH 100 μg/ml, \*: p < 0.05, \*\*: p < 0.01

± 0.00 で全く発現が見られなかった。一方、ジャングルハニー 500 μg/ml 添加 0.49 ± 0.08 で、非添加と比べジャングルハニー添加において有意 (p < 0.01) な増加が認められた (図 9a)。

3.4.3 腹腔マクロファージの NF-κB mRNA 発現比率

ジャングルハニーにより、IL-1β と IL-6 mRNA 発現の増加が認められたことから、IL-1β と IL-6 の転写因子である NF-κB mRNA 発現について検討した。NF-κB mRNA 発現比率は、ジャングルハニー非添加 0.60 ± 0.02 (mean ± S.D.)、ジャングルハニー 500 μg/ml 添加 0.88 ± 0.09 で、非添加と比べ、ジャングルハニー添加において有意 (p < 0.01) な増加が認められた (図 9a)。

3.4.4 肺胞マクロファージの IL-1β mRNA 発現比率

腹腔マクロファージにより IL-1β mRNA 発現の増加が認められたことから、肺胞マクロファージについて同様に検討した。IL-1β mRNA 発現比率は、非添加 0.15 ± 0.21 (mean ± S.D.)、ジャングルハニー 100 μg/ml, 500 μg/ml, 1 mg/ml 添加 0.84 ± 0.06, 1.20 ± 0.04, 1.12 ± 0.06 で、非添加と比べ、ジャングルハニー添加において有意 (p < 0.05) な増加が認められた (図 9b)。

3.4.5 脾臓細胞の IL-4 と IL-5 mRNA 発現比率

B 細胞の増殖と分化に関与している Th2 から産生される IL-4 と IL-5 について検討した。IL-4 mRNA 発現比率は、PBS(-) 投与群 0.26 ± 0.05 (mean ± S.D.)、ジャングルハニー投与群 0.42 ±

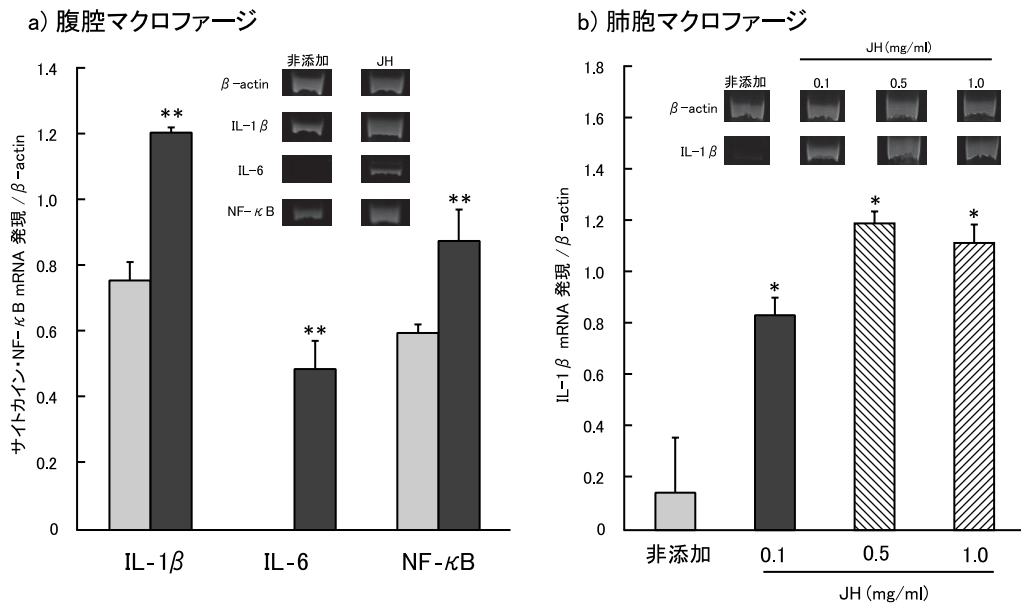


図9 ジャングルハニーによる腹腔マクロファージ, 肺胞マクロファージのサイトカイン及びNF-κB mRNA 発現比率への影響

□ : 非添加, ■ : JH, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$

0.08 で, PBS(-) 投与群と比べ, ジャングルハニー投与群において有意 ( $p < 0.05$ ) な増加が認められた。IL-5 mRNA 発現比率は, PBS(-) 投与群  $0.58 \pm 0.30$ , ジャングルハニー投与群  $0.82 \pm 0.22$  で, 両群において有意な差は認められなかった (図 10)。

### 3.5 ジャングルハニーによる脾臓細胞の細胞増殖への影響

ジャングルハニーにより, 脾臓細胞数と CD19 陽性細胞比率が増加したことから, ジャングルハニーによる脾臓細胞の増殖について検討した。

#### 3.5.1 細胞増殖

##### (1) 全脾臓細胞

全脾臓細胞の細胞増殖は, ジャングルハニー非添加を 1 とした場合, ジャングルハニー添加  $1.62 \pm 0.26$  (mean  $\pm$  S.D.) で,  $^3\text{H}$ -Thymidine の有意な取り込みが認められたことから, ジャングルハニー添加により, 有意 ( $p < 0.01$ ) な細胞増殖が認められた (図 11a)。

##### (2) 非付着細胞

全脾臓細胞でジャングルハニーにより, 細胞増殖が認められたことから, マクロファージを除いた非付着細胞分画で細胞増殖を検討した。非付着細胞の細胞増殖は, 非添加を 1 とした場

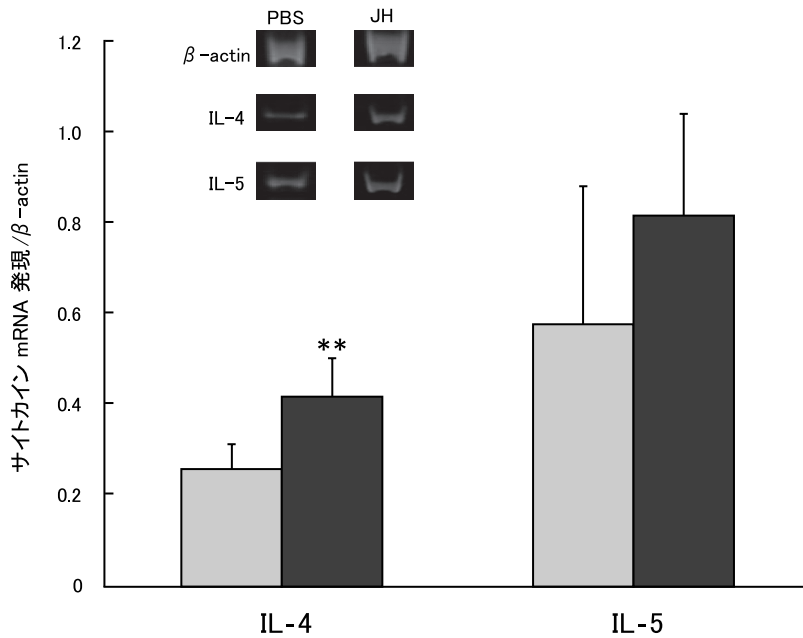
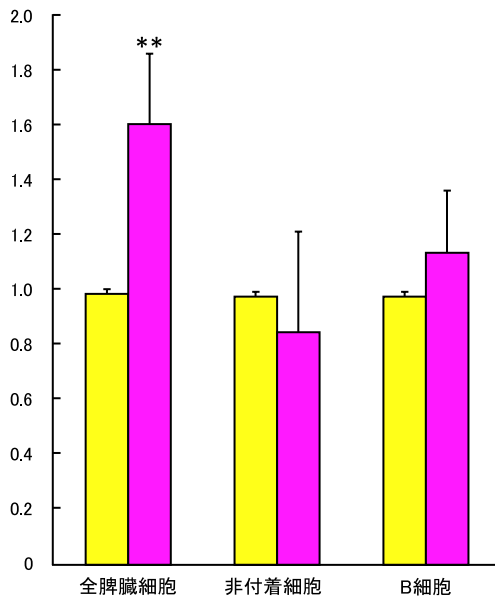
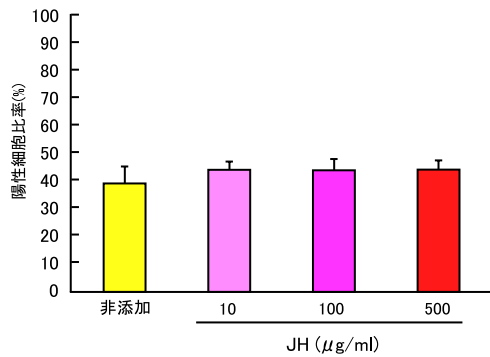


図 10 ジャングルハニーによる脾臓細胞のサイトカイン mRNA 発現比率への影響  
 □ : 非添加, ■ : JH, \*\*: p < 0.01

a) 細胞増殖



b) CD19陽性細胞比率



c) 細胞形態

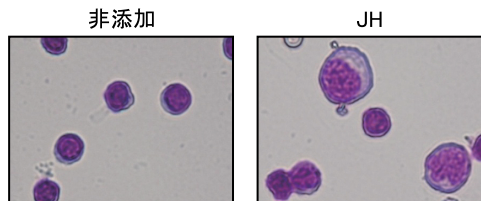


図 11 ジャングルハニーによる細胞増殖への影響  
 □ : 非添加, □ : JH, \*\*: p < 0.01

合、ジャングルハニー添加  $0.85 \pm 0.36$  で、ジャングルハニー添加により、有意な差は認められなかった (図 11a).

### (3) B 細胞

ジャングルハニーにより、B 細胞の細胞表面抗原である CD19 陽性細胞比率の増加が認められたことから、B 細胞を分離し、B 細胞の増殖について検討した。B 細胞の細胞増殖は、非添加を 1 とした場合、ジャングルハニー添加  $1.14 \pm 0.22$  で、ジャングルハニー添加により、有意な差は認められなかった (図 11a).

#### 3.5.2 CD19 陽性細胞比率 (%)

CD19 陽性細胞比率は、ジャングルハニー非添加  $39.44 \pm 5.43$  (mean  $\pm$  S.D.), ジャングルハニー  $10 \mu\text{g/ml}$ ,  $100 \mu\text{g/ml}$ ,  $500 \mu\text{g/ml}$  添加  $44.43 \pm 2.27$ ,  $44.23 \pm 3.39$ ,  $44.48 \pm 2.64$  で、非添加と比べ、ジャングルハニー添加において有意な差は認められなかった (図 11b).

#### 3.5.3 細胞形態

脾臓細胞の細胞形態は、ジャングルハニー非添加と比べ、ジャングルハニー添加で非添加では見られない芽球化した細胞が観察された (図 11c).

### 3.6 ジャングルハニーと TLR4 の関与

ジャングルハニーによる抗体産生機能の増強は、ジャングルハニーに含まれている可能性のある LPS が TLR4 を認識していることが考えられる。そこで、LPS の関与について、LPS のレセプターである TLR4 遺伝子を欠損している C3H/HeJ マウスを用いて PFC 数を検討した。PFC 数は、PBS(-) 投与群  $461.44$ /脾臓細胞数  $1 \times 10^6$  個、ジャングルハニー投与群  $1011.36$  で、PBS(-) 投与群と比べ、ジャングルハニー投与群において正常 (野生型) マウスと同様に増加が認められた (図 12a).

また、ジャングルハニー添加による脾臓細胞の TLR4 陽性細胞比率について検討したところ、TLR4 陽性細胞比率は、ジャングルハニー非添加  $46.86 \pm 1.70$  (mean  $\pm$  S.D.), ジャングルハニー  $10 \mu\text{g/ml}$ ,  $100 \mu\text{g/ml}$ ,  $500 \mu\text{g/ml}$  添加  $50.06 \pm 2.57$ ,  $53.17 \pm 6.44$ ,  $53.26 \pm 6.06$  で、非添加と比べ、ジャングルハニー添加において有意な差は認められなかった (図 12b).

### 3.7 ジャングルハニー分画による抗体産生機能とサイトカイン mRNA 発現比率への影響

ジャングルハニーにより、抗体産生機能とサイトカイン mRNA 発現の増強が認められたことから、ジャングルハニーの活性成分を同定するため、HPLC ゲル濾過クロマトグラフィーを用い

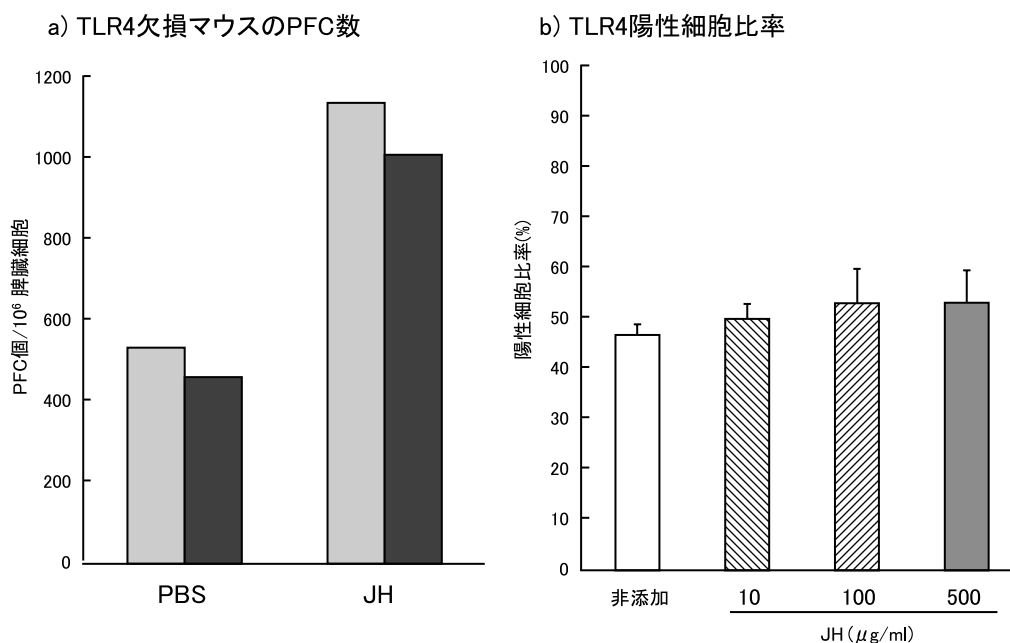


図 12 ジャングルハニーの抗体産生機能と TLR4 の関与  
 □: 野生型 (C3H/HeN), ■: TLR4 欠損 (C3H/HeJ)

て 6 つの分画 (Fr. 1~Fr. 6) に分け、抗体産生機能とサイトカイン mRNA 発現比率を検討した。

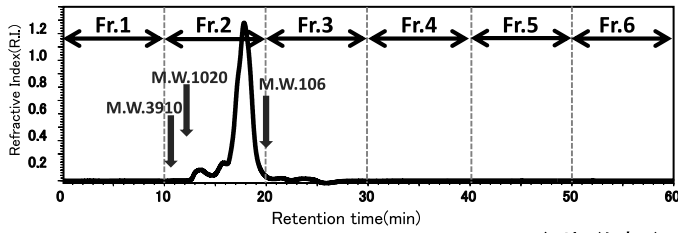
### 3.7.1 PFC 数

各分画のクロマト図は図 13a に示した。Fr. 1~Fr. 6 をマウスに投与した場合の PFC 数は、PBS(-) 投与群  $198.56 \pm 132.86$ /脾臓細胞  $1 \times 10^6$  個 (mean  $\pm$  S.D.), Fr. 1 投与群  $245.86 \pm 109.19$ , Fr. 2 投与群  $820.64 \pm 109.19$ , Fr. 3 投与群  $292.48 \pm 34.04$ , Fr. 4 投与群  $208.07 \pm 64.36$ , Fr. 5 投与群  $204.40 \pm 99.62$ , Fr. 6 投与群  $191.95 \pm 67.64$  で、PBS(-) 投与群と比べ、Fr. 2 投与群において有意 ( $p < 0.001$ ) な増加が認められた (図 13b)。熱処理した Fr. 2 の PFC 数は、PBS(-) 投与群  $320.23 \pm 9.29$ , 熱処理 Fr. 2 投与群  $555.80 \pm 66.00$  で、PBS(-) 投与群と比べ、熱処理 Fr. 2 投与群において有意 ( $p < 0.05$ ) な増加が認められた (図 14a)。また、グルコン酸を投与した場合の PFC 数については、PBS(-) 投与群  $234.00 \pm 111.44$ , グルコン酸投与群  $358.02 \pm 135.28$  で、PBS(-) 投与群と比べ、グルコン酸投与群において有意な差は認められなかった (図 14c)。

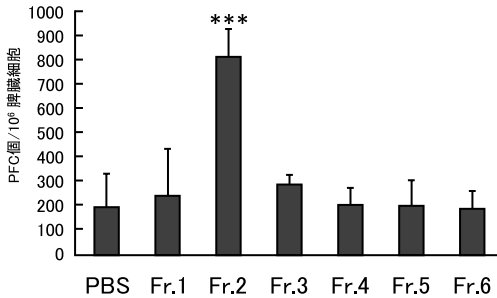
### 3.8 IL-1 $\beta$ と IL-6 mRNA 発現比率

Fr. 2 の IL-1 $\beta$  mRNA 発現比率は、非添加  $0.56 \pm 0.08$  (mean  $\pm$  S.D.), Fr. 2 添加  $1.05 \pm 0.13$  で、非刺激と比べ、Fr. 2 添加において有意 ( $p < 0.01$ ) な増加が認められた (図 13c)。熱処理 Fr. 2 の

a) ジャングルハニーの分画



b) PFC数



c) サイトカイン mRNA 発現比率

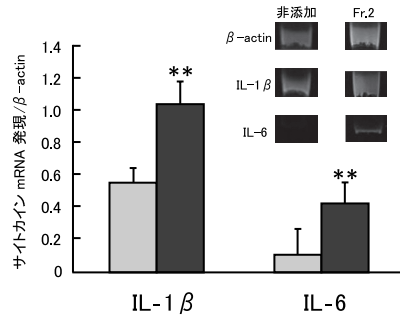
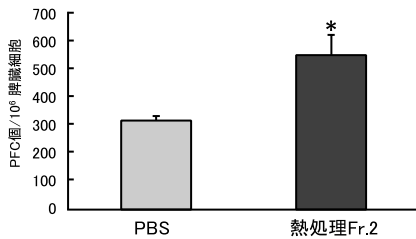
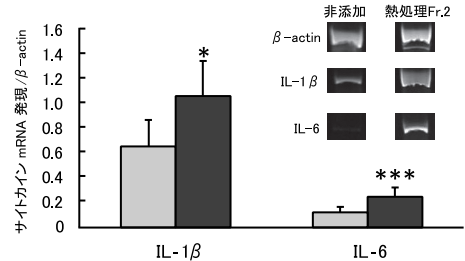


図 13 ジャングルハニー分画による抗体産生機能とサイトカイン mRNA 発現比率への影響  
 □ : 非添加, ■ : Fr. 2, \*\*: p < 0.01, \*\*\*: p < 0.001

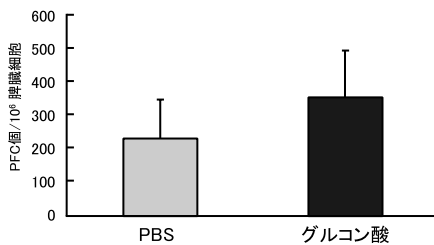
a) 熱処理Fr.2のPFC数



b) 熱処理Fr.2のサイトカイン mRNA 発現比率



c) グルコン酸のPFC数



d) グルコン酸のIL-1β mRNA 発現比率

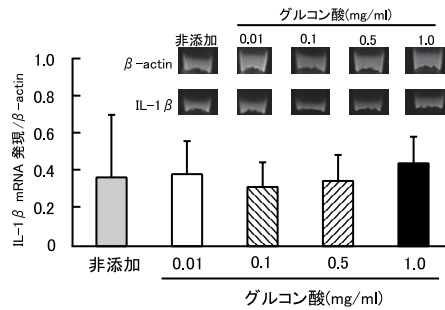


図 14 熱処理 Fr. 2, グルコン酸による抗体産生機能及びサイトカイン mRNA 発現比率への影響  
 □ : 非添加, ■ : 熱処理 Fr. 2, \*: p < 0.05, \*\*\*: p < 0.001

IL-1 $\beta$  mRNA 発現比率は、非添加  $0.66 \pm 0.20$ 、熱処理 Fr. 2 添加  $1.07 \pm 0.27$  で非添加と比べ、熱処理 Fr. 2 添加において有意 ( $p < 0.05$ ) な増加が認められた (図 14b)。また、グルコン酸の IL-1 $\beta$  mRNA 発現比率は、非添加  $0.37 \pm 0.32$ 、グルコン酸  $10 \mu\text{g/ml}$ ,  $100 \mu\text{g/ml}$ ,  $500 \mu\text{g/ml}$ ,  $1 \text{ mg/ml}$  添加  $0.39 \pm 0.17$ ,  $0.32 \pm 0.12$ ,  $0.35 \pm 0.13$ ,  $0.45 \pm 0.13$  で、非添加と比べ、グルコン酸添加において有意な差は認められなかった (図 14d)。

Fr. 2 の IL-6 mRNA 発現比率は、非添加  $0.11 \pm 0.15$  (mean  $\pm$  S.D.), Fr. 2 添加  $0.43 \pm 0.12$  で、非添加と比べ、Fr. 2 添加において有意 ( $p < 0.01$ ) な増加が認められた (図 13c)。熱処理 Fr. 2 の IL-6 mRNA 発現比率は、非添加  $0.00 \pm 0.00$ 、熱処理 Fr. 2 添加  $0.25 \pm 0.06$  で、非添加と比べ、熱処理 Fr. 2 添加において有意 ( $p < 0.001$ ) な増加が認められた (図 14b)。Fr. 2 に含まれる物質の分子量については、標準物質である Polyethylene glycol を用いた検量線から算出し、分子量約 206~393 であった。

#### 4. 考察

蜂蜜の一つであるジャングルハニーは、ナイジェリアでは古くから治療薬として使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。我々は、ジャングルハニー投与による好中球数の増加、好中球機能の増強、活性酸素産生による抗腫瘍作用を報告している [31-33]。しかし、ジャングルハニーによる免疫作用についての詳細な作用機構は、まだ解明されていない。そこで、ジャングルハニーによる抗体産生機能への影響とその機構について検討した。

抗体産生機能については、抗体産生誘導期と発現期に及ぼす影響について検討したところ、抗体産生誘導期において、ジャングルハニーの腹腔内投与と経口投与により、抗体産生機能の増強が認められた。蜂蜜による抗体産生機能への影響としては、蜂蜜の経口投与による胸腺依存、非依存性抗原に対する抗体産生機能を増強する報告や、蜂蜜に関連した物質であるプロポリスの成分であるカフェ酸フェネチルエステルやローヤルゼリーの投与による SRBC に対する PFC 数の増加が報告 [19, 26, 27] されている。また、他の天然成分としては、Luffa cylindrical (ヘチマ) から分離した sapogenin 1, 2 による PFC 数の増加が報告されており [34]、これらの報告と同様の結果であった。しかし、抗体産生発現期については、ジャングルハニー投与による有意な差は認められなかった。これらの結果より、ジャングルハニーは、抗体産生の初期に影響を及ぼしていることが示された。また、ジャングルハニー投与による脾臓細胞数への影響は、ジャングルハニーの腹腔内投与により、有意な増加が認められたが、現在のところ蜂蜜による脾臓細胞数の増加に関する報告はされていない。

抗体産生の機構は、まずマクロファージが細菌などの抗原を貪食によって取り込むことにより誘導される。マクロファージは、分解した抗原を細胞内に持つ MHC class II と結合させ、細胞

表面に表出し、CD4 陽性細胞の TCR とマクロファージの細胞表面に表出した MHC class II を結合させ、抗原提示をすることによって、T 細胞を活性化し、IL-4, IL-5, IL-6 などのサイトカインを産生することによって B 細胞を活性化し、B 細胞を抗体産生細胞に分化させ、抗体を産生させる [28-30].

ジャングルハニーの投与により、抗体産生の初期において抗体産生機能の増強が認められたことから、抗体産生機構 (図4) の最初の段階であるマクロファージの貪食機能への影響について検討した。腹腔マクロファージの貪食機能は、ジャングルハニー投与による貪食細胞陽性比率の変化は認められず、ジャングルハニーはマクロファージの貪食機能に影響を及ぼさないことが示された。次に、抗体産生の次の段階である抗原提示に関して、マクロファージの抗原提示に関連する細胞表面抗原である MHC class II 抗原と CD86 抗原、ヘルパー T 細胞の抗原提示に関連する細胞表面抗原である TCR 抗原、CD3 抗原、CD4 抗原、CD28 抗原及び B 細胞の表面抗原である CD19 抗原陽性細胞比率を検討した。MHC class II 抗原は、マクロファージなどの抗原提示細胞に発現しており、貪食作用によって取り込まれた外来抗原は、細胞内で MHC class II 分子と結合し、細胞表面に発現して CD4 陽性 T 細胞の TCR に抗原を提示する。CD86 は、ヘルパー T 細胞上の CD28 に結合し、T 細胞を活性化するのに必要な共刺激分子である。ジャングルハニーによる細胞表面抗原への影響については、ジャングルハニーの投与による MHC class II, CD86, TCR, CD28, CD3, CD4 陽性細胞比率の変化は認められなかったが、CD19 陽性細胞比率の増加が認められ、ジャングルハニーが B 細胞の比率を増加させることが示された。蜂蜜による CD19 陽性細胞比率への影響に関する報告はされていない。しかし、他の天然成分である *Crocus sativus* (サフラン) や M8 として知られている *Agaricus* などのキノコの抽出物の投与による CD19 陽性細胞比率の増加が報告 [35, 36] されており、これらと同様の結果が得られた。これらの結果より、ジャングルハニーは、抗原提示に関与する細胞表面抗原には影響を及ぼさず、B 細胞を増加させる可能性が示された。

ジャングルハニーにより、抗体産生機能の増強と CD19 陽性細胞比率の増加が認められたことから、抗体産生機能や B 細胞の増殖、分化に関与するサイトカインである IL-1 $\beta$ , IL-6 及び IL-4 mRNA 発現について検討した。IL-1 $\beta$  は、マクロファージや B 細胞から産生され、IL-6 などの産生を誘導し、B 細胞を増殖させ、抗体産生を増強させるサイトカインである [37]。IL-6 は、単球やマクロファージ、B 細胞などから産生され、B 細胞の分化に関与している [38]。IL-1 $\beta$  mRNA 発現比率は、腹腔細胞、腹腔マクロファージ及び肺胞マクロファージにおいて、ジャングルハニーにより、有意な増加が認められた。IL-6 mRNA 発現比率は、腹腔細胞及び腹腔マクロファージにおいて、ジャングルハニーにより、有意な増加が認められた。蜂蜜による IL-1 $\beta$  と IL-6 産生の影響としては、MonoMac-6 単球細胞株の IL-1 $\beta$  と IL-6 産生を増加した報告がある [10]。また、プロポリスの経口投与によって腹腔マクロファージからの炎症性サイトカイン産生が増加するという報告 [24] があり、同様の結果が得られた。今回の結果より、ジャングルハ



ニーは、マクロファージを活性化し、IL-1 $\beta$ とIL-6の産生を増強することが示唆された。次に、ジャングルハニーにより、IL-1 $\beta$ とIL-6 mRNA 発現の有意な増加が認められたことから、IL-1 $\beta$ やIL-6の転写因子であるNF- $\kappa$ B mRNA 発現比率について検討した。NF- $\kappa$ Bは、I $\kappa$ Bと会合しており、NF- $\kappa$ Bの核内移行を阻止しているが、細胞表面に発現している受容体からの活性化シグナルが伝わることにより、I $\kappa$ Bから解離し、NF- $\kappa$ Bは核内へ移行し、転写因子として様々なサイトカイン遺伝子を発現させ、免疫機能を調節する[39]。NF- $\kappa$ B mRNA 発現比率は、ジャングルハニーにより有意な増加が認められた。蜂蜜によるNF- $\kappa$ B活性の報告はないが、他の天然成分として、*Cordyceps militaris* (サナギタケ) 抽出物によるマクロファージのNF- $\kappa$ B活性によるIL-1 $\beta$ などの前炎症性サイトカインの産生を増強させる報告[40]があり、ジャングルハニーは、NF $\kappa$ Bを活性化し、IL-1 $\beta$ とIL-6 mRNA 発現を増加させることが示唆された。IL-4は、主にTh2細胞から産生され、B細胞の活性化、分化や増殖に関与している他、Th2細胞への分化誘導作用があり、Th1細胞への分化を抑制する。Th1細胞は、マクロファージなどから産生されるIL-12によって誘導され、IL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ を産生し、Th2細胞への分化を抑制し、マクロファージの活性化やキラーT細胞を誘導する。また、Th2細胞は、IL-4によって誘導され、IL-4、IL-5、IL-6などのサイトカインを産生し、抗体産生を促進する[41, 42]。脾臓細胞のIL-4 mRNA 発現比率は、ジャングルハニー投与により、有意な増加が認められた。蜂蜜によるIL-4産生に関する報告はないが、他の天然成分としては、*Astragali Radix* (オウギ) や *Boswellia carterii* (ニューウコウジュ) 抽出物による脾臓細胞からのTh2サイトカインであるIL-4産生の増加が報告[43, 44]されており、今回の結果と同様であった。IL-4 mRNA 発現の増加が認められたことから、ジャングルハニーはTh1型ではなく、Th2型サイトカインの産生を増強させ、CD19陽性細胞比率を増加させた可能性が示唆された。

ジャングルハニー投与により脾臓細胞数とCD19陽性細胞比率の増加が認められたことから、ジャングルハニーによるB細胞増殖への影響について検討した。全脾臓細胞の細胞増殖は、ジャングルハニー添加により、有意な増加が認められた。しかし、非付着細胞と分離したB細胞の細胞増殖は、ジャングルハニー添加により、変化は認められなかった。全脾臓細胞の増殖に関しては、*in vitro*系におけるプロポリスによる脾臓細胞の<sup>3</sup>H-thymidineの取込み減少が報告[45]されており、この報告と異なる結果が得られた。この違いは、蜂蜜とプロポリスの成分や培養条件の差によるものであると考えられる。今回の結果より、ジャングルハニーによる脾臓細胞増殖には、ジャングルハニーが直接B細胞に作用し、B細胞を増殖させるのではなく、付着細胞であるマクロファージに作用し、サイトカインを介してB細胞を増殖させることが示唆された。

ジャングルハニーにより、抗体産生機能、サイトカイン産生の増強及び脾臓細胞増殖が認められた。しかし、蜂蜜にはLPSなどのエンドトキシンが含まれている可能性があり、ジャングルハニーの免疫活性がLPSによることが考えられる[46]。また、蜂蜜がTLR4を介して免疫作用を発揮することが報告されている[12]。LPSは特異的にTLR4を認識する。TLR4は、グラ

ム陰性菌を認識する受容体であり、LPSはCD14に結合し、CD14からTLR4とMD-2の複合体に受け渡され、結合したシグナルはI $\kappa$ BからNF- $\kappa$ Bを解離させ、NF- $\kappa$ Bを活性化し、マクロファージを活性化させ、IL-1 $\beta$ やIL-6などの炎症性サイトカイン遺伝子を発現し、炎症反応を誘導する[47-49]。そこで、LPSの受容体であるTLR4を欠損しているC3H/HeJマウス[50]を用いて抗体産生機能への影響について検討した。PFC数は、ジャングルハニー投与により、有意な増加が認められた。また、ジャングルハニーによる脾臓細胞のTLR4陽性細胞比率への影響は、ジャングルハニー非添加とジャングルハニー添加において差は認められなかった。これらの結果より、ジャングルハニーによる抗体産生機能の増強は、TLR4を介したLPSによるものではないこと及びジャングルハニーは、TLR4を認識せずに免疫機能を増強することが示された。しかし、Manuka honeyの5.8 kDaの成分やプロポリスがTLR4を介して炎症性サイトカインの産生を増強することが報告[12, 24]されており、これらの報告とは異なる結果が得られた。これは、Manuka honeyにLPSが含まれている可能性や、蜂蜜の種類や含まれている成分の違いによるものであると考えられる。以上の結果より、ジャングルハニーはマクロファージを活性化し、NF- $\kappa$ Bを介してIL-1 $\beta$ とIL-6 mRNA発現を増強させ、Th2細胞からIL-4 mRNA発現を増強させることによって、CD19陽性細胞比率を増加させ、IL-6を介してB細胞の初期段階に作用し、B細胞を抗体産生細胞へと分化させ、抗体産生を増強させた可能性が示唆された。

ジャングルハニーにより、抗体産生機能やサイトカイン mRNA発現の増強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、ジャングルハニー全分画をHPLCゲル濾過クロマトグラフィーによって、6つの分画(Fr.)に分け、各分画の抗体産生機能とサイトカイン mRNA発現比率への影響を検討した。抗体産生機能の指標である抗体産生細胞(PFC)数は、Fr. 2投与により有意な増加が認められ、その他の分画ではPFC数の増加が認められなかった。また、Fr. 2投与により、抗体産生機能の増強が認められたことから、Fr. 2によるIL-1 $\beta$ とIL-6 mRNA発現比率への影響について検討した。IL-1 $\beta$ とIL-6 mRNA発現比率は、Fr. 2添加により、有意な増加が認められた。これらの結果より、ジャングルハニーの抗体産生機能の活性成分は、Fr. 2に含まれることが示された。Fr. 2により、抗体産生機能の増強が認められたことから、Fr. 2に含まれる活性成分の性状について、120°Cで20分間熱処理したFr. 2による抗体産生機能とIL-1 $\beta$ 及びIL-6 mRNA発現比率への影響について検討した。PFC数は、熱処理Fr. 2投与により、有意な増加が認められた。IL-1 $\beta$ とIL-6 mRNA発現比率は、熱処理Fr. 2添加により、有意な増加が認められた。これらの結果より、ジャングルハニーの有効成分は、Fr. 2に含まれ、熱に安定であり、標準物質であるPolyethylene glycolを用いた標準曲線から、分子量約206~393の物質であると推定された。蜂蜜の有効成分に関しては、Manuka honeyは、5.8 kDaの物質であり、TLR4を介してTNF- $\alpha$ の産生を増加する報告[12]がある。また、ローヤルゼリーの有効成分として70 kDaのMajor royal jelly protein 3, 55 kDaのapalbumin-1, 49 kDaのapalbumin-2が報告されており、抗アレルギー作用やマクロファージを活性化し、TNF- $\alpha$ の産生を増強する

ことが知られている [17, 51, 52]. また、蜂蜜とは異なるが、抗体産生機能を活性化させる有効成分としてプロポリスのカフェ酸フェネチルエステルが報告されているが、免疫活性機構が異なる [26] ことから、ジャングルハニーの有効成分は、これらとは異なる物質であると考えられる。

また、ジャングルハニーの主要成分には、グルコン酸が含まれており、グルコン酸の分子量は、196 である。そこで、Fr. 2 に含まれる有効成分がグルコン酸である可能性について検討した。PFC 数と IL-1 $\beta$  mRNA 発現比率は、グルコン酸投与による差は認められなかった。この結果より、ジャングルハニーの有効成分は、グルコン酸以外の成分であると考えられる。

以上より、ジャングルハニーはマクロファージを活性化し、NF- $\kappa$ B を介して IL-1 $\beta$  と IL-6 mRNA 発現を増強させ、マクロファージから産生された IL-1 $\beta$  が Th2 細胞に作用し、IL-4 mRNA 発現を増強させることによって、IL-4 により CD19 陽性細胞比率を増加させ、IL-6 を介して B 細胞を抗体産生細胞へと分化させ、抗体産生機能を増強する可能性が示唆された (図15)。また、その有効成分は Fr. 2 に含まれる熱に安定な分子量約 206~393 の物質で、グルコン酸以外の成分であることが示された。今後、ジャングルハニーのFr. 2に含まれる有効成分の同定と他の免疫機能への影響について検討する予定である。

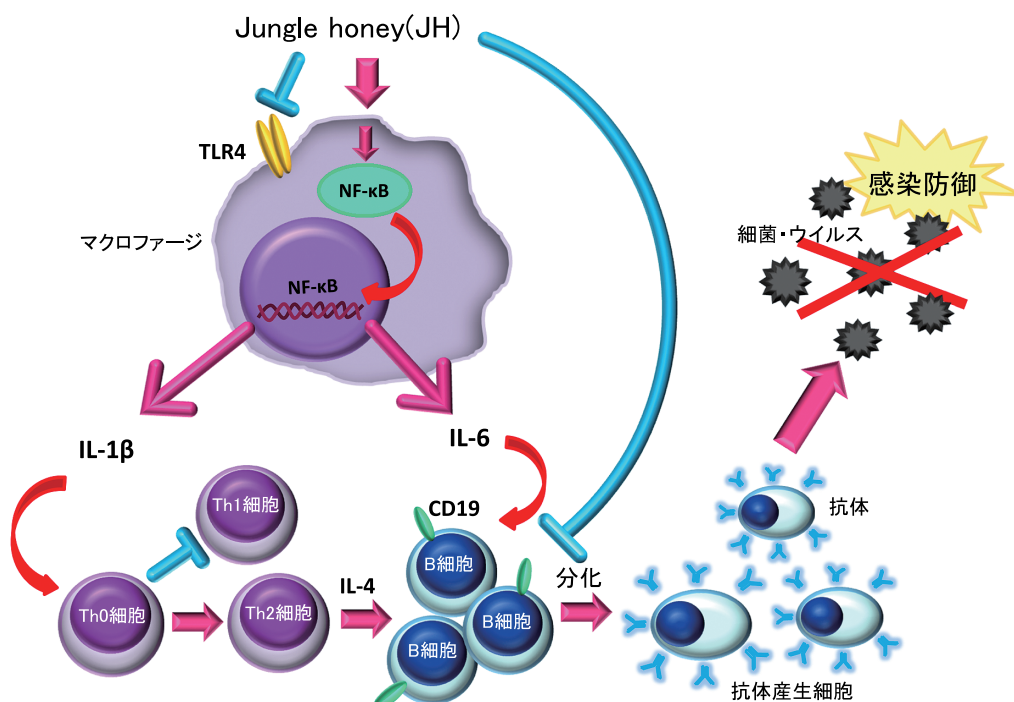


図 15 ジャングルハニーによる抗体産生機構  
Y : 抗体

## 参 考 文 献

- [1] Qiu PY, Ding HB, Thang YK, Xu RJ. Determination of chemical composition of commercial honey by near-infrared spectroscopy. *J Agric Chem*. 1999 Jul; 47(7): 2760–2765
- [2] Jonathan W. White Jr., Nancy Hoban. Composition of Honey. IV. Identification of the Disaccharides. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1959 Feb; 80(2): 386–392
- [3] 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 Jan; 83(3): 924–929
- [4] Hoyle E. The vitamin content of honey. *Biochem J*. 1929; 23(1): 54–60
- [5] Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernandez-Lopez J, Perez-Alvarez JA. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J Food Sci*. 2008 Nov; 73(9): 117–124
- [6] Irish J, Blair S, Carter DA. The antibacterial activity of honey derived from Australian flora. *PLoS One*. 2011 Mar; 6(3): e18229
- [7] Kwakman PH, Te Velde AA, de Boer L, Vandenbroucke-Grauls CM. Two major medicinal honeys have different mechanism of bacterial activity. *PLoS One*. 2011 Mar; 6(3): e17709
- [8] Cooper R. Honey in wound care: antibacterial properties. *GMS Krankenhhyg Interdiszip*. 2007 Des; 2(2): Doc51
- [9] Brudzynski K, Abubaker K, Laurent M, Castle A. Re-examining the role of hydrogen peroxide in bacteriostatic and bactericidal activities of honey. *Front Microbiol*. 2011 Oct; 2(123)
- [10] Tonks AJ, Cooper RA, Jones KP, Blair S, Parton J, Tonks A. Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes. *Cytokine*. 2003 Mar; 21(5): 242–247
- [11] Tonks A, Cooper RA, Price AJ, Molan PC, Jones KP. Stimulation of TNF-alpha release in monocytes by honey. *Cytokine*. 2001 May; 14(4): 240–242
- [12] 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. *J Leukoc Biol*. 2007 Nov; 82(5): 1147–1155
- [13] Japanathan SK, Mondhe D, Wani ZA, Pal HC, Mandal M. Effect of honey and eugenol on Ehrlich ascites and solid carcinoma. *J Biomed Biotechnol*. 2010
- [14] Kassim M, Achoui M, Mansor M, Yusoff KM. The inhibitory effects of Gelam honey and its extracts on nitric oxide and prostaglandin E(2) in inflammatory tissues. *Fitoterapia*. 2010 Dec; 81(8): 1196–1201
- [15] AI-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(4): 491–494
- [16] Takeshi Nagai, Reiji Inoue, Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. *Food Chemistry*. 2004 Feb; 84(2): 181–186
- [17] Okamoto I, Taniguchi Y, Kunitaka T, Kohno K, Iwai K, Ikeda M, Kurimoto M. Major royal jelly protein3 modulates immune responses in vitro and in vivo. *Life Sci*. 2003 Sep; 73(16): 2029–2045
- [18] Vucevic D, Melliou E, Vasilijic S, Gasic S, Ivanovski P, Chinou I, Colic M. Fatty acids isolated from royal jelly modulate dendritic cell-mediated immune response in vitro. *Int Immunopharma-*

- col. 2007 Sep; 7(9): 1211–1220
- [19] Sver L, Orsolich N, Tadic Z, Njari B, Valpotic I, Basic I. A royal jelly as a new potential immunomodulator in rats and mice. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 1996 Jan; 19(1): 31–38
- [20] Marcucci MC, Ferreres F, Garcia-Viquera C, Bankova VS, De Costro SL, Dantas AP, Valente PH, Paulino N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol.* 2001 Feb; 72(2): 105–112
- [21] Sforcin JM. Propolis and immune system: a review. *J Ethnopharmacol.* 2007 Aug; 113(1): 1–14
- [22] Gomez-Caravaca AM, Gomez-Romero M, Arraez-Roman D, Sequra-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharm Biomed Anal.* 2006 Jun; 41(4): 1220–1234
- [23] Russo A, Longo R, Vanella A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia.* 2002 Nov; 73: 21–29
- [24] Orsatti CL, Missima F, Pagliarone AC, Bachiega TF, Bufalo MC, Araujo JP Jr, Sforcin JM. Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptor 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. *Phytother Res.* 2010 Aug; 24(8): 1141–1146
- [25] Orsatti CL, Missima F, Pagliarone AC, Sforcin JM. Th1/Th2 cytokines' expression and production by propolis-treated mice. *J Ethnopharmacol.* 2010 Jun; 129(3): 314–318
- [26] 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 Mar; 4(3): 429–436
- [27] Scheller S, Gazda G, Pietsz G, Gabrys J, Szumlas J, Eckert L, Shani J. The ability of extract of propolis to stimulate plaque formation in immunized mouse spleen cells. *Pharmacol Res Commun.* 1988 Apr; 20(4): 323–328
- [28] 竹内実 喫煙による抗体産生抑制 *臨床免疫* 2007; 48(6): 673–681
- [29] Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20: 621–667
- [30] Hwang I, Ki D. Receptor-mediated T cell absorption of antigen presenting cell-derived molecules. *Front Biosci.* 2011 Jan; 16: 411–421
- [31] 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 Basad Complement Alternat Med.* 2009 Jan
- [32] 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 the chemotactic activity of neutrophils. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* 2010; 2(4): 149–154
- [33] 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
- [34] Khajuria A, Gupta A, Garai S, Wakhloo BP. Immunomodulatory effect of two sapogenins 1 and 2 isolated from *Luffa cylindrica* in Balb/C mice. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007 Mar; 17(6): 1608–1612
- [35] Bani S, Pandey A, Agnihotri VK, Pathania V, Singh B. Selective Th2 Upregulation by *Crocus sativus*: A Nutraceutical Spice. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011

- [36] Han SS, Cho CK, Lee YW, Yoo HS, Antimetastatic and immunomodulating effect of water extracts from various mushrooms. *J Acupunct Meridian Stud.* 2009 Sep; 2(3): 218–227
- [37] Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol.* 2010 Feb; 10(2): 89–102
- [38] Dienz O, Rincon M. The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. *Clin Immunol.* 2009 Jan; 130(1): 27–33
- [39] Ma X, Becker Buscaglia LE, Barker JR, Li Y. MicroRNAs in NF-kappaB signaling. *J Mol Cell Biol.* 2011 Jun; 3(3): 159–166
- [40] Shin S, Kwon J, Lee S, Kong H, Lee CK, Cho K, Ha NJ, Kim K. Immunostimulatory Effects of *Cordyceps militaris* on Macrophages through the Enhanced Production of Cytokines via the Activation of NF-kappaB. *Immune Netw.* 2010 Apr; 10(2): 55–63
- [41] Amsen D, Spilianakis CG, Flavell RA. How are Th1 and Th2 effector cells made? *Curr Opin Immunol.* 2009 Apr; 21(2): 153–160
- [42] Koyasu S, Moro K. Type 2 innate immune responses and the natural helper cell. *Immunology.* 2011 Apr; 132(4): 475–481
- [43] Kang H, Ahn KS, Cho C, Bae HS. Immunomodulatory effect of *Astragali Radix* extract on murine TH1/TH2 cell lineage development. *Bio Pharm Bull.* 2004 Dec; 27(12): 1946–1950
- [44] Chevrier MR, Ryan AE, Lee DY, Zhongze M, Wu Yan Z, Via CS. *Boswellia carterii* extract inhibits TH1 cytokines and promotes TH2 cytokines in vitro. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005 May; 12(5): 575–580
- [45] Sa-Nunes A, Faccioli LH, Sforcin JM. Propolis: lymphocyte proliferation and IFN-gamma production. *J Ethnopharmacol.* 2003 Jul; 87(1): 93–97
- [46] Timm M, Bartelt S, Hansen EW. Immunomodulatory effects of honey cannot be distinguished from endotoxin. *Cytokine.* 2008 Apr; 42(1): 113–120
- [47] 矢田純一. 2009. 医系免疫学. 改訂 11 版, 中外医学社, 392–393
- [48] Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* 2008 May; 42(2): 145–151
- [49] Kensuke M. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends in Microbiology* 2004 Apr; 12(4): 186–192
- [50] Wong PM, Kang A, Chen H, Yuan Q, Fan P, Sultzner BM, Kan YW, Chung SW. Lps(d)/Ran of endotoxin-resistant C3H/HeJ mice is defective in mediating lipopolisaccharide endotoxin responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Sep; 96(20): 11543–11548
- [51] Majtan J, Kovacova E, Bilikova K, Simuth J, The immunostimulatory effect of the recombinant apalbumin 1-major honeybee royal jelly protein-on TNFalpha release. *Int Immunopharmacol.* 2006 Feb; 6(2): 269–278
- [52] 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.

## Effect of Jungle Honey on Function of Antibody Production and Its Mechanism

Eri SHIGEYOSHI  
Minoru TAKEUCHI

### Abstract

Jungle honey (JH) is a kind of honey that collected from timber and blossom by wild honeybees in Nigeria. JH is used as a traditional medicine for colds, skin inflammation but not edible. We previously reported that JH enhanced immune functions of neutrophils. However, the effects of JH on immune functions are not fully understood. Therefore, in this study, we investigated the effect of JH on antibody production and its mechanism. The effect of JH on antibody production was measured by PFC assay using Sheep Red Blood Cells (SRBC) as antigen in induction phase and expression phase of antibody production. The number of Plaque Forming Cells (PFC) as antibody producing cell was significantly increased in induction phase but not expression phase by JH injected mice compared with non-injected mice with JH. The number of spleen cell was also increased in JH injected mice. Since the result of enhanced antibody production in induction phase, the effect of JH on phagocytic activity was investigated. Phagocytic activity of peritoneal macrophages was not significantly difference in JH-injected mice compared with non-injected mice with JH. Cell surface antigens associated with antigen presentation and B cell surface antigens were investigated. The percentages of MHC class II, CD86 positive cells of peritoneal macrophages and TCR, CD28 CD3, and CD4 of spleen cells were not changed by JH ingestion. The percentage of CD19 positive cells of spleen cells was significantly increased by JH injection. The mRNA expression of cytokines and transcription factor associated with antibody production were measured. IL-1 $\beta$  mRNA expression of peritoneal cells, peritoneal macrophages and alveolar macrophages were significantly increased by JH. IL-6 mRNA expressions of peritoneal macrophages were significantly increased by JH. From these results, we investigated the expression of NF- $\kappa$ B mRNA as transcription factor of IL-1 $\beta$  and IL-6. Expression of NF- $\kappa$ B mRNA was significantly increased by JH. L-4 mRNA expressions of spleen cells was also significantly increased by JH. Proliferation of spleen cells were increased by JH but not non-adherent cells and B cells. We investigated the possibility of TLR-4 as recognize receptor of LPS in enhancement of antibody production, cytokine and proliferation of spleen cells by JH using TLR-4 deficiency mice. The number of PFC was increased by JH in the both of wild type and TLR-4 deficiency mice. The effective component of JH was fractionized from Fr.1 to Fr.6 by gel filtration using HPLC, antibody production and cytokine mRNA expression were assessed using each fraction. The number of PFC, IL-1 $\beta$  and IL-6 mRNA expressions were significantly increased by Fr. 2. Fr-2 was substance from MW 206 to 393 and resistance for heat-treatment.

These results suggest a possibility that release of IL-1 $\beta$  and IL-6 from activated-macrophage through the increases of IL-1 $\beta$  and IL-6 mRNA expressions mediated with NF- $\kappa$ B by JH impacts to Th2 cells, these increased-IL-1 $\beta$  induce to enhancement of IL-4 production, increase of CD19 positive cell and

differentiation from immature B cells via IL-6 to antibody producing cells, results in enhancement of function in antibody production by JH.

**Keywords:** Jungle honey, macrophage, B cell, antibody production, cytokine