

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

平成 25 年 5 月 17 日受付

岡田大地¹⁾
廣野由里子²⁾
田中美子³⁾
佐々木一馬¹⁾
棚橋靖行²⁾
高橋純一^{2,3)}
佐倉正明²⁾
竹内実^{1,2,3)}

¹⁾ 京都産業大学工学部

²⁾ 京都産業大学総合生命科学部

³⁾ 京都産業大学ミツバチ産業科学研究センター

要 旨

ハチミツは蜜蜂により産生される天然成分で、健康維持のほかに創傷、風邪、皮膚炎の治療薬として世界で広く利用されている。我々も、ナイジェリア産のハチミツが免疫作用を示すことを報告してきたが、日本国産ハチミツについては、まだ免疫機能への十分な説明がされていない。そこで、肺の感染防御において重要な役割をしている免疫細胞である肺胞マクロファージ (AM) に着目し、その免疫機能の活性化に関わるサイトカインの mRNA 発現に及ぼす日本国産ハチミツの影響について検討した。AM のサイトカイン mRNA 発現は、LPS 刺激によって IL-1 β 、TNF- α 、CXCL1,2 の発現が有意に増強した。日本国産ハチミツ (京産ハチミツ) は 5mg/ml 添加濃度で最もサイトカイン mRNA 発現を増強させた。各種ハチミツの影響について、そば、くり、白花豆、とち、くろがねもちハチミツについて検討したところ、くろがねもちハチミツが IL-1 β mRNA 発現を最も増強させ、とち、くろがねもちハチミツが TNF- α mRNA 発現を増強させた。くろがねもちハチミツは LPS 刺激で増強した IL-1 β の mRNA 発現を更に増強させ、くりハチミツは LPS で増強した TNF- α の mRNA 発現を減少させた。以上の結果から、日本国産ハチミツは AM の免疫機能を増強させる可能性が示され、ハチミツの違いにより、その活性は異なることが示唆された。また、蜜源の違いにより、LPS 刺激により増強したサイトカイン mRNA 発現を増強もしくは抑制することが示され、AM の免疫機能への影響が異なり、ハチミツが免疫改善

に応用できる可能性が示唆された。

キーワード：日本国産ハチミツ、肺胞マクロファージ、サイトカイン、免疫機能、インターロイキン1 β

1. はじめに

ハチミツは、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、タンパク質を多く含んでおり、世界中の国々で食用として親しまれている。また、ハチミツは食用としてだけではなく、健康維持の他、創傷の治療薬として利用されてきた。ハチミツは花の種類によって成分が異なり、Manuka honey、Acacia honeyなどがよく知られている [1,2]。一般的なハチミツの作用としては、抗菌作用があることが知られており、その作用は、ハチミツの高い浸透圧、酸性の性質、ハチミツに含まれる H₂O₂ や花の種類に由来する成分であると報告されている [3,4]。また、近年ではハチミツに含まれるフラボノイド、フェノール酸が抗酸化作用を示すことが報告されている [5]。マヌカハニーが 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ことから [6]、日本国産ハチミツにサイトカイン産生を活性化することが考えられる。サイトカインは、おもに免疫細胞から産生され、様々な免疫反応、炎症反応などに関わる糖タンパク質で、生体の免疫調節において重要な因子である。

一方、生体の免疫系において呼吸により大気中の病原微生物、有害粒子は肺に取り込まれることから、肺は感染防御の観点から重要な器官である。肺には、これらの異物を処理するため、免疫細胞である肺胞マクロファージ (Alveolar Macrophages: AM) が常在する [7,8]。AM は、呼吸によって肺に取り込まれた外来物質に対して食作用や活性酸素産生を通して初期防御として機能する。AM は、取り込んだ異物を抗原処理と提示を通して抗体産生に関与する。また、サイトカインの放出などにより局所免疫反応を調節している。さらに、マクロファージは癌細胞に直接的な細胞障害作用、多種のサイトカイン放出を通して抗腫瘍効果を示す [9,10,11,12]。このように AM は、肺の免疫監視に重要な役割を果たしていることから、AM の免疫機能について研究することは大変意義がある。ハチミツの AM の免疫機能への影響については、ジャングルハニーの報告だけで、それ以外のハチミツによる報告はされていない。そこで、免疫反応において重要なサイトカインについて、日本国産ハチミツの AM のサイトカイン mRNA 発現に対する影響を免疫の正常状態と LPS (Lipopolysaccharide) による免疫亢進状態の両方の条件下で、ハチミツの影響を検討した。

2. 材料及び方法

1. 材料

1) 動物

実験動物に関しては8～10週齢のC57BL/6雄マウス123匹を使用した。尚、本研究の動物実験は、京都産業大学動物実験規程に基づき動物実験員会により承認された。

2) 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RPMI1640(-) [(ナカライテスク)、100U/mlペニシリン(明治製菓)、100 μ l/mlストレプトマイシン(明治製菓)を含む、以下R(-)とする]で10mg/mlに希釈し、-20 $^{\circ}$ Cで保存後、使用時に再溶解し使用濃度に調製した。

3) ハチミツの調製

ハチミツは京都産業大学ハチミツ(京産ハチミツ;百花蜜、京都産業大学)、そば(長谷川養蜂場、北海道)、くり(小野養蜂場、岩手県)、白花豆(種田養蜂場、北海道)、とち(井上養蜂場、京都府綾部市)、くろがねもち(野々垣養蜂場、愛知県)ハチミツを使用した。各ハチミツ原液を100mg/mlになるようにPBS[Phosphate buffer saline (-):Mg²⁺、Ca²⁺を含まない生理的緩衝溶液]で調製し、0.22 μ mフィルター(MILLIPORE)を通して滅菌後、これをハチミツ保存液とし、4 $^{\circ}$ Cで保存した。実験には前述で調製した各ハチミツをR(-)培養液[RPMI1640(ナカライテスク)500mlにペニシリン(明治製菓)100U/ml、ストレプトマイシン(明治製菓)100 μ g/mlを含んだもの]で最終濃度5mg/mlに希釈調製した。なお、予備実験で京産ハチミツ1mg/ml、5mg/ml、10mg/mlの各濃度で検討した結果から、最適のハチミツの濃度は5mg/mlと設定した。

2. 方法

1) 気管支肺胞洗浄(Broncho Alveolar Lavage: BAL)

気管支肺胞洗浄については、マウスの腹腔内にPBS(-)で10倍希釈したソムノベンチル(共立製薬)0.6mlを注射し、麻酔死させ、滅菌済みのはさみ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が露出するよう切開した。27Gの針先(テルモ)で主気管支に穴を開け、21Gノンバル針を挿入した後、気管の下に綿糸を通して針と気管を結び固定した。固定後、PBS(-)1mlを入れた針なしテルモシリンジをノンバル針に装着し、PBS(-)0.95mlを気管から気管支、肺へと注入・吸引し回収する操作を行い、細胞を回収した。この操作を5回繰り返し、回収液を気管支肺胞洗浄液(Broncho Alveolar Lavage Fluid: BALF)とした。

2) 肺胞マクロファージ (Alveolar Macrophages : AM) の調製

AM の調製は、前述で得られた BALF を 1000rpm、10 分間、4℃ で遠心後、上清を取り除き R(+) 培養液 [RPMI1640 (ナカライテスク) 500ml に 10% FCS55.6ml、ペニシリン (明治製菓) 100U/ml、ストレプトマイシン (明治製菓) 100µg/ml を含んだもの] 0.5ml を加えて懸濁した。この細胞浮遊液 10µl に 0.2% トリパンブルー 10µl 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た。なお、BAL により得られた細胞は、ギムザ染色により形態学的に 95% 以上が肺胞マクロファージであった。

3) 肺胞マクロファージ (Alveolar Macrophages : AM) の培養

96 穴細胞培養プレートに、前述で調製した AM を 5×10^5 個 /ml となるよう R(+) で調製した細胞浮遊液 100µl を加え、LPS は R(-) で 100µg/ml に調製、分注して - 20℃ で保存し、それを培養前 R(-) で最終濃度 10µg/ml となるよう調製し添加した。1 - 3) で調製したハチミツは PBS(-) で最終濃度 5mg/ml になるようにそれぞれ加え全量を 200µl/well にし、37℃ のインキュベーターで 24 時間培養した。培養後、上清を取り除き、残った細胞に SolutionD (4M グアニジンチオシアン酸塩、25mM クエン酸ナトリウム、0.5% N-ラウロイルサルコシンナトリウム、0.1M 2-メルカプトエタノール) 200µl を加えて細胞を溶解させ、- 20℃ で冷凍保存した。

4) AM のサイトカイン mRNA 発現

i) 全 RNA の抽出

サイトカイン全 RNA の抽出は、2 - 3) で得た細胞溶解液 200µl をエッペンチューブに取り、H₂O-phenol 200µl、2M Sodium Acetate 20µl、CIAA 80µl を加えて攪拌し、15000rpm、5 分間、4℃ で遠心した。その後、新しいエッペンチューブに 100% エタノール 400µl を取り、上清 200µl を加えて攪拌した後、- 80℃ で 15 分間放置した。再び 15000rpm、30 分、4℃ で遠心し、上清を取り除き、SolutionD 300µl、Phenol/CIAA 300µl を加え攪拌し、15000rpm、5 分間、20℃ で遠心した。遠心後、新しいエッペンチューブに 100% エタノール 700µl を取り、上清 300µl を加え攪拌し、- 80℃ で 15 分間放置した。その後、15000rpm、20 分、4℃ で遠心し、上清を取り除き、75% エタノール 1000µl を加え攪拌し、15000rpm、10 分、4℃ で遠心して上清を取り除き、アスピレーターで 20 分間乾燥させた。これを全 RNA とした。

ii) cDNA の作製

上記の全 RNA を乾燥した後、超純水 10µl、ランダムプライマー (Randon Primer:RP、宝酒造) 1µl を加えて攪拌し、65℃ で 5 分間放置した後さらに氷上で 5 分間放置した。その後、25mM dNTP 0.8µl、0.1M DTT (invitrogen) 4µl、5 × First-Strand Buffer (invitrogen) 8µl、dH₂O 15.2µl、MLV (invitrogen) 1µl を順に加え、攪拌し 15000rpm で軽く遠心後、37℃、45 分間温浴層で反

応させた。その後、65℃、10 分間静置し酵素を失活させ、氷上でさらに 10 分間静置後、- 20℃で保存し cDNA を作製した。

iii) PCR

PCR は、前述で得た cDNA 1 μ l を 0.2ml チューブに取り、sense、anti-sense (invitrogen) プライマー (β -actin、IL-1 β 、IL-1RA[Receptor Antagonist:RA]、IL-6、IL-12、IL-17、TNF- α [Tumor Necrosis Factor: TNF]、CXCL1[C-X-C Ligand: CXCL]、CXCL2、CXCL4) (Greiner) をそれぞれ 0.75 μ l、dH₂O、7.5 μ l、Go-Taq10 μ l を加え攪拌し、軽く遠心後 PCR 装置を用いて cDNA を増幅させた。なお、1 サイクルは 95℃ denature、56℃ annealing、72℃ extension を各 30 秒とし、30 ~ 35 サイクル PCR を行った。プライマーは以下の配列のものを使用した。

β -actin (250bp) 30 サイクル

sense 5'-GCATTGTTACCAACTGGGAC-3'

antisense 5'-TCTCCGGAGTCCATCACAAT-3'

IL-1 β (290bp) 30 サイクル

sense 5'-AGCTACCTGTGTCTTTCCCG-3'

antisense 5'-GTCGTTGCTTGTTCTCCTT-3'

IL-1RA (360bp) 30 サイクル

sense 5'-TCATTGGGGCCTGAGGAACA-3'

antisense 5'-AGGGTAAGGGAGTCACTTGG-3'

IL-6 (268bp) 30 サイクル

sense 5'-GATGCTACCAAACCTGGAGATAATC-3'

antisense 5'-GGTCCTTAGCCACTCCTTCTGTG-3'

IL-12 (200bp) 30 サイクル

sense 5'-GTGGAATGGCGTCTCTGTCT-3'

antisense 5'-TGGTTTGATGATGTCCTGA-3'

IL-17 (144bp) 30 サイクル

sense 5'-TCCCTCTGTGATCTGGGAAG-3'

antisense 5'-AAAGTGAAGGGCAGCTCTC-3'

TNF- α (253bp) 30 サイクル

sense 5'-GATGCTACCAAACCTGGAGATAATC-3'

antisense 5'-GGTCCTTAGCCACTCCTTCTGTG-3'

CXCL1 (107bp) 35 サイクル

sense 5'-AACCGAAGTCATAGCCACAC-3'

antisense 5'-ACTTGGGGACACCTTTTAGC-3'

CXCL2 (209bp) 35 サイクル

sense 5'-AGTGAAGCTGCGCTGTCAATG-3'

antisense 5'-CAGTTAGCCTTGCCTTTGTTC-3'

CXCL4 (212bp) 30 サイクル

sense 5'-AGTCCTGAGCTGCTGCTTCT-3'

antisense 5'-CCATTCTTCAGGGTGGCTAT-3'

iv) 電気泳動

ビーカーに40% アクリルアミド 7ml、超純水 27.75ml、10 × TEB 1.75ml、TEMED 44 μ l、10%APS 350 μ l を加えて攪拌し、ガラス版に流し込み8% アクリルアミドゲルを作成した。その後、前述で得た PCR 産物 18 μ l をゲルの溝に流し込み、40mA、120 分電気泳動を行った。分子量マーカーは、pBR322 DNA-MSP I Digest(BioLads)1 μ l を使用し、同様に電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルをエチジウムブロマイドで20 分間染色し、蒸留水で軽く洗浄した後、遺伝子定量解析システムで PCR 増幅産物のバンドを検出した。検出したバンドは、Scion Image(Scion Corporation) を使用して解析を行い、それぞれのサイトカイン mRNA の発現は、サイトカイン mRNA / β -actin の比率で示した。

5) 有意差検定

有意差検定は、すべての実験において平均値 (mean) と標準偏差 (standard deviation:S.D.) を求め、student's-t-test によりコントロール (ハチミツ非添加) 群とハチミツ添加群を比較し、p 値を求め $p < 0.05$ を有意とした。

3. 結果

1.AMの細胞数

BALによって回収されたマウス1匹あたりのAMの総細胞数は、 $1.62 \pm 0.60 \times 10^5$ 個/ml/匹 (mean \pm S.D.) であった。

2.AMのサイトカイン mRNA 発現

IL-1 β mRNA 発現比率は LPS 非刺激 0.07 ± 0.13 (mean \pm S.D.)、LPS 刺激 0.78 ± 0.29 、CXCL2 mRNA 発現比率は LPS 非刺激 0.01 ± 0.005 、LPS 刺激 0.92 ± 0.18 、CXCL1 mRNA 発現比率は LPS 非刺激 0.01 ± 0.005 、LPS 刺激 0.76 ± 0.33 、TNF- α mRNA 発現比率は LPS 非刺激 0.29 ± 0.28 、LPS 刺激 0.83 ± 0.31 で、IL-1 β 、CXCL1、CXCL2、TNF- α は LPS 非刺激に比較して LPS 刺激で有意 ($p < 0.01$) な増加が認められた。IL-1RA mRNA 発現比率は LPS 非刺激 0.27 ± 0.08 、LPS 刺激 0.42 ± 0.31 、IL-6 mRNA 発現比率は LPS 非刺激 0.01 ± 0.005 、LPS 刺激 0.13 ± 0.13 、IL-12 mRNA 発現比率は LPS 非刺激 0.13 ± 0.21 、LPS 刺激 0.13 ± 0.14 、IL-17 mRNA 発現比率は LPS 非刺激 0.06 ± 0.16 、LPS 刺激 0.03 ± 0.07 、CXCL4 mRNA 発現比率は LPS 非刺激 0.06 ± 0.16 、LPS 刺激 0.04 ± 0.07 で有意な差は認められなかった (図1)。LPS 刺激により、AM の IL-1 β 、TNF- α 、CXCL1 および CXCL2 mRNA 発現が有意に増強された。

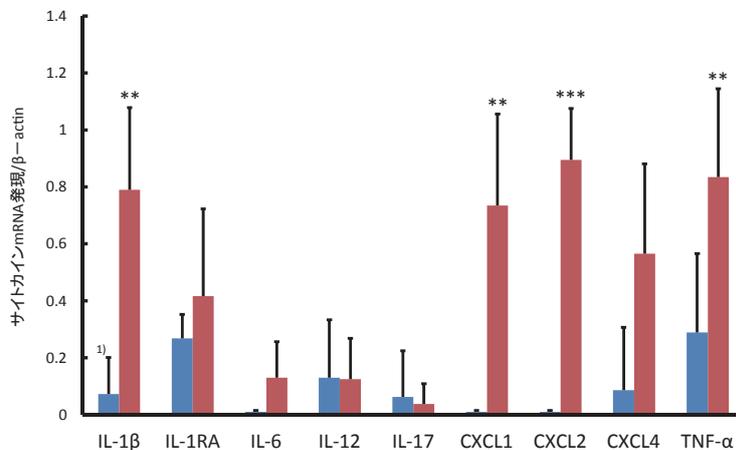


図1 AMのサイトカイン mRNA 発現

1): mean \pm SD, ■: LPS非刺激, ■: LPS刺激, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

3. ハチミツによる AM の IL- β mRNA 発現に及ぼす影響

AM のサイトカイン mRNA 発現の結果から、初期免疫応答の活性化、炎症などに重要なサイ

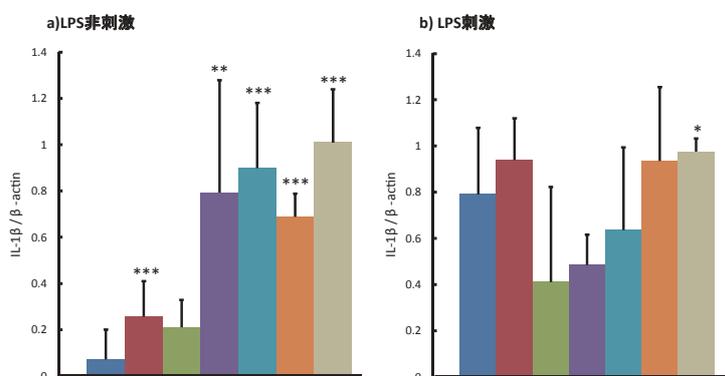


図2 ハチミツによるAMのIL-1β mRNA発現への影響

■:コントロール, ■:京産, ■:そば, ■:くり, ■:白花豆, ■:とち, ■:クロガネモチ, *:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001

トカインであるインターロイキン1β (IL-1β) と炎症、抗腫瘍などに関連する腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor α) である TNF-α mRNA 発現が LPS 刺激により増強されたことから、これらのサイトカインについて LPS 非刺激、LPS 刺激下でハチミツによる mRNA 発現への影響を検討した。

1) LPS 非刺激の場合

IL-1β mRNA 発現比率は、ハチミツ非添加のコントロール群 0.07 ± 0.13 (mean ± S.D.) に比べて、京産ハチミツ 0.26 ± 0.16 、そばハチミツ 0.21 ± 0.12 、くりハチミツ 0.82 ± 0.50 、白花豆ハチミツ 0.92 ± 0.29 、とちハチミツ 0.69 ± 0.10 、くろがねもちハチミツ 1.04 ± 0.24 で、ハチミツ非添加に対し、京産、白花豆、とち、くろがねもちハチミツで有意 ($p < 0.001$)、くりハチミツで有意 ($p < 0.01$) な増加が認められた (図2)。

2) LPS 刺激の場合

IL-1β mRNA 発現比率は、コントロール群で 0.78 ± 0.29 、そばハチミツ 0.41 ± 0.41 、くりハチミツ 0.48 ± 0.13 、白花豆ハチミツ 0.64 ± 0.36 で抑制傾向が認められたが、京産ハチミツ 0.96 ± 0.18 、とちハチミツ 0.94 ± 0.32 で増強傾向が、くろがねもちはちみつ 0.96 ± 0.06 で、有意 ($p < 0.05$) な増加が認められた (図2)。

4. ハチミツによるAMのTNF-α mRNA発現に及ぼす影響

1) LPS 非刺激の場合

TNF-α mRNA 発現比率は、コントロール群で 0.29 ± 0.28 (mean ± S.D.)、京産ハチミツ 0.30 ± 0.23 、そばハチミツ 0.21 ± 0.12 、くりハチミツ 0.56 ± 0.38 、白花豆ハチミツ 0.79 ± 0.27 、

とちハチミツ 0.89 ± 0.14 、くろがねもちハチミツ 0.90 ± 0.09 で、コントロール群に比較して、とち、くろがねもちハチミツで有意 ($p < 0.01$)、白花豆ハチミツで有意 ($p < 0.05$) な増加が認められた (図 3)。

2) LPS 刺激の場合

TNF- α mRNA 発現比率は、コントロール群 0.83 ± 0.31 で、京産ハチミツ 1.00 ± 0.21 、そばハチミツ 0.21 ± 0.28 、くりハチミツ 0.59 ± 0.13 、白花豆ハチミツ 1.03 ± 0.26 、とちハチミツ 0.89 ± 0.29 、くろがねもちハチミツ 0.71 ± 0.09 で、そばハチミツで有意 ($p < 0.01$) な減少が認められた (図 3)。

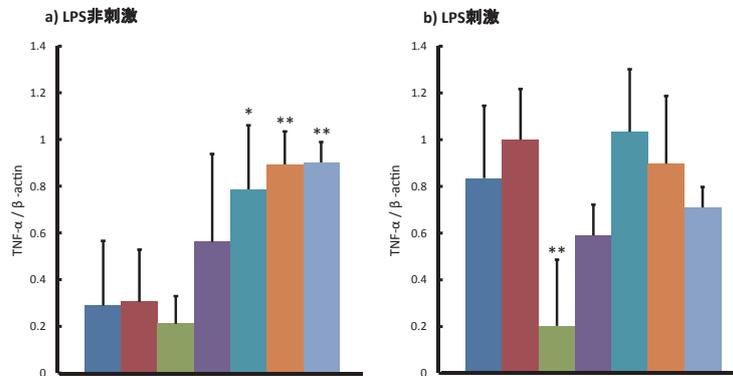


図 3 ハチミツによる AM の TNF- α mRNA 発現への影響

■:コントロール, ■:京産, ■:そば, ■:くり, ■:白花豆, ■:とち, ■:くろがねもち, *:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001

4. 考察

ハチミツは、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さまざまな用途に用いられている。また、ハチミツは抗菌作用を持ち、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。ハチミツの抗菌作用についての報告はされているが、ハチミツ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 など世界にもハチミツはあり、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 [3,4]。治療薬として利用されていることから、ハチミツが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、ハチミツの蜜源の違いによる日本国産ハチミツの免疫機能への影響について十分に解明されていないため、日本各地で採取された日本国産ハチミツの免疫機能への影響を肺の免疫において重要な肺胞マクロファージについて検

討した。

AM の mRNA サイトカイン発現比率については、LPS 非刺激群に対し、LPS 刺激群で IL-1 β 、CXCL1、CXCL2、TNF- α が有意な増加が認められた。LPS 非刺激が、コントロールで免疫の正常な状態を示す。一方、Lipopolysaccharide(LPS) は、グラム陰性菌の細胞壁外膜の構成成分で、主に多糖側鎖、オリゴ糖、リピド A が共有結合している大きな分子であり、マクロファージや樹状細胞を活性化し、サイトカイン産生を強く誘導することから、LPS 刺激は免疫の亢進状態を示す。IL-1 β 及び TNF- α は AM の活性化に関わり、IL-1 β は AM が刺激を受けることで最初に産生される炎症性サイトカインである。また、IL-1 β は、マクロファージや好中球に作用し好中球流入に関わるケモカインである CXCL1,2 mRNA 発現量を増加させる報告がある [13,14]。今回の結果からも LPS により IL-1 β が産生され、肺胞マクロファージに作用した結果これらの産生を増強した可能性が示唆された。AM の IL-1 β と TNF- α mRNA 発現に対するハチミツの最適濃度については、予備検討で京産ハチミツ 5mg/ml で LPS 非刺激群、LPS 刺激群の両方で有意な増加が認められた。また、LPS 非刺激群に対する LPS 刺激群の反応性を検討したところ 5mg/ml が最適濃度であることが示された。また、ハチミツの濃度については、Jungle honey では 1mg/ml 濃度で AM の IL-1 β mRNA 発現を最も増強させる報告があり [15]、今回の実験の 5mg/ml よりも低濃度であるが、この違いは、ハチミツ種による違いであると考えられる。

百花ハチミツで、種々の花から集められた京産ハチミツ 5mg/ml 濃度で AM のサイトカイン mRNA 発現を増強することが示されたため、蜜源の異なる単花ハチミツである、そば、くり、白花豆、とち、くろがねもちハチミツについても検討した。LPS 非刺激下での AM の IL-1 β の mRNA 発現比率は、コントロール群に対し、くり、白花豆、とち、くろがねもちで、TNF- α は白花豆、とち、くろがねもちで有意な増加が認められた。LPS 刺激下の IL-1 β mRNA 発現比率はコントロール群に対し、くろがねもちで有意な増加が、TNF- α はそばハチミツで有意な減少が認められた。このことから、免疫の正常状態では、ハチミツは AM の IL-1 β 及び TNF- α の mRNA 発現を増強させることが示唆された。一方、LPS 刺激による免疫亢進状態では、増強された IL-1 β の mRNA 発現をくろがねもちハチミツはさらに増強させ、くりハチミツは LPS 刺激により増強された TNF- α の mRNA 発現を逆に抑制した。

以上の結果より、AM で LPS 刺激により強く発現するサイトカインは IL-1 β 、TNF- α 、CXCL1,2 で、IL-1 β 、TNF- α の mRNA 発現を最も増強させたハチミツは、くろがねもちハチミツであった。くろがねもちハチミツは LPS によって増強した IL-1 β の mRNA 発現増強をさらに増強させた。くりハチミツは LPS によって増強した TNF- α の mRNA 発現を抑制した。これらの結果より、日本国産ハチミツが免疫機能に影響を及ぼす可能性が考えられ、ハチミツ種によりその免疫作用は異なり、今後さらにその詳細について研究するとともにハチミツが免疫改善に応用できる可能性が考えられる。

謝辞

本研究で使用した日本国産ハチミツを御提供いただいた日本養蜂はちみつ協会に深謝致します。

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 (3) :924-9.
- [2] Irish J, Blair S, Carter DA. The antibacterial activity of honey derived from Australian flora. *PLoS One*. 2011;6 (3) :e18229.
- [3] 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 (3) :e17709.
- [4] Cooper R. Honey in wound care: antibacterial properties. *GMS Krankenhhyg Interdiszip*. 2007;2 (2) :Doc51.
- [5] Woo KJ, Jeong YJ, Inoue H, Park JW, Kwon TK. Chrysin suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression through the inhibition of nuclear factor for IL-6 (NF-IL6) DNA-binding activity. *FEBS Lett*. 2005;579 (3) :705-11.
- [6] 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;82 (5) :1147-55.
- [7] 竹内 実. 喫煙と免疫機能. *臨床免疫*, 2001;36:843-850
- [8] 長井 苑子, 竹内 実, 泉 孝英. 喫煙の肺における炎症反応、免疫反応に及ぼす影響. *最新医学*, 1898;44:1388-1393.
- [9] Pouniotis DS, Plebanski M, Apostolopoulos V, McDonald CF. Alveolar macrophage function is altered in patients with lung cancer. *Clin Exp Immunol*. 2006;143 (2) :363-72.
- [10] Ortega E, Hueso F, Collazos ME, Pedrera MI, Barriga C, Rodríguez AB. Phagocytosis of latex beads by alveolar macrophages from mice exposed to cigarette smoke. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 1992;15 (2) :137-42.
- [11] Therriault MJ, Proulx LI, Castonguay A, Bissonnette EY. Immunomodulatory effects of the tobacco-specific carcinogen, NNK, on alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol*. 2003;132 (2) :232-8.
- [12] Hodge S, Hodge G, Ahern J, Jersmann H, Holmes M, Reynolds PN. Smoking alters alveolar macrophage recognition and phagocytic ability: implications in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;37 (6) :748-55.
- [13] Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Charrier K, Peschon JJ, Kolls JK. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med*. 2001;194 (4) :519-27.
- [14] Qiu C, Li Y, Li M, Li M, Liu X, McSharry C, Xu D. Anti-interleukin-33 inhibits cigarette smoke-induced lung inflammation in mice. *Immunology*. 2013;138 (1) :76-82.
- [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.

Effect of Japanese honey on immune function in alveolar macrophage

Daichi OKADA
Yuriko HIRONO
Yoshiko TANAKA
Kazuma SASAKI
Yasuyuki TANAHASHI
Jun-ichi TAKAHASHI
Masaaki SAKURA
Minoru TAKEUCHI

Abstract

Honey is used not only as a natural food, but also as a traditional medicine for colds, skin inflammation and burns wounds as well as general health care. We proposed that Jungle honey in Nigeria would have potential biological effects, especially on immune cell activity. However, the effects of Japanese honey on immune functions are not clearly known. Therefore, we investigated the effects of Japanese honey on immune functions of alveolar macrophages that play an important role of immune system in the lung. The mRNA expressions of IL-1 β , TNF- α and CXCL1,2 in alveolar macrophage were significantly increased by LPS stimulation. Kyoto Sangyo honey as a kind of Japanese honey enhanced the mRNA expression of cytokines at the concentration of 5mg/ml. Various Japanese honeys also enhanced IL-1 β and TNF- α mRNA expressions. However, Chest nut honey inhibited enhanced-TNF- α mRNA expression by LPS stimulation. Japanese honeys enhance the immune functions and the effects differ by the difference flower sources of honeys. These results suggest that Japanese honeys may contribute to modification of immune functions.

Keywords: Japanese honey, Alveolar macrophage, Cytokine, Immune function, IL-1 β