

日本国産蜂蜜による マクロファージと好中球の免疫機能に及ぼす影響

平成 26 年 5 月 23 日受付

田 中 美 子¹⁾
高 崎 摩依子²⁾
瀧 谷 崇 大²⁾
高 橋 純 一^{1,2)}
廣 野 由里子²⁾
竹 内 実^{1,2)}

¹⁾ 京都産業大学ミツバチ産業科学研究センター

²⁾ 京都産業大学総合生命科学部

要 旨

蜂蜜は蜜蜂により産生される天然成分で、食用としてだけでなく、健康維持や創傷、風邪、皮膚炎の治療薬として世界で広く利用されている。我々は、これまでにナイジェリア産の蜂蜜が免疫作用を示すことを報告してきたが、日本国産蜂蜜については、まだ免疫機能への十分な解明がなされていない。そこで、日本国産蜂蜜による免疫機能として、サイトカインの遺伝子発現に及ぼす影響を、ソバ、クリ、シロハナマメ、クロガネモチ、シロハナセンダングサ、ミカン、トチ、ビワ、フカ、レンゲ、アカシア、百花蜂蜜について、*in vitro*、*in vivo*系で検討した。*in vitro*系において、マクロファージ細胞株である Raw264.7 細胞の IL-1 β mRNA 発現は、クリ、シロハナマメ、ミカン、トチ、ビワ、アカシア蜂蜜において有意な増加が認められ、CXCL2 mRNA 発現は、クリ、シロハナマメ、トチ蜂蜜において有意な増加が認められた。次に、腹腔細胞数、細胞分画、表面抗原陽性細胞比率への影響を、IL-1 β 、CXCL2 mRNA 発現の増加が見られたクリ、シロハナマメ、トチ蜂蜜について、*in vivo*系で検討した。マウスの腹腔総細胞数は、クリ、シロハナマメ蜂蜜において有意な増加、トチ蜂蜜において増加傾向が確認され、好中球の比率の増加が認められた。さらに、腹腔細胞の表面抗原陽性細胞比率を FACS 解析で測定したところ、クリ、シロハナマメ、トチ蜂蜜において Gr-1、TLR2 抗原の有意な増加、シロハナマメ、トチ蜂蜜で CD11b 抗原の有意な増加、クリ蜂蜜で CD11b 抗原の増加傾向が認められた。CD14、TLR4、F4/80 抗原は有意な差は認められなかった。以上の結果により、日本国産蜂蜜は TLR2 を介しマクロファージを活性化し、IL-1 β を増強し、その結果、好中球のケモカインである CXCL2 が産生され、好中球が誘導されることが示唆された。

キーワード：日本国産蜂蜜、マクロファージ、好中球、サイトカイン、細胞表面抗原

1. はじめに

蜂蜜は、蜜蜂によって産生される天然成分であり、フルクトース、グルコース、マルトースの他、アミノ酸やビタミン、フラボノイドなど様々な化合物を含んでおり、世界中の国々で食用として親しまれている^{1,2)}。また、蜂蜜は食用としてだけでなく、健康維持の他、怪我、火傷など創傷治癒、美容などさまざまな用途に用いられている。特定の花から集められた蜂蜜は単花蜂蜜と呼ばれ、Manuka honey、Acacia honeyなどがよく知られている。蜂蜜の一般的な作用としては抗菌作用があることが知られており^{3,4)}、その中でも Manuka honey の強い抗菌作用が注目されている。その作用はマヌカハニーに含まれるメチルグリオキサール (MGO) によるものであり、その抗菌効果は、抗菌溶液であるフェノール溶液の濃度に換算され、ユニーク・マヌカ・ファクター (UMF) として数値化され評価されている^{5,6,7)}。

蜂蜜による免疫機能への影響としては、Jelly bush honey、Manuka honey、Pasture honey による MonoMac-6 単球細胞株の TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 の発現増加^{8,9)}や、Manuka honey に含まれる 5.8kDa の物質による TLR4 を介した TNF- α の発現増加¹⁰⁾などが報告されている。また我々の研究室でも、ナイジェリア産の蜂蜜であるジャングルハニーによる腹腔細胞の IL-1 β 、IL-6、NF- κ B の発現増加^{11,12,13)}、日本国産蜂蜜による肺胞マクロファージの IL-1 β 、CXCL1、CXCL2、TNF- α の発現増加を報告してきた¹⁴⁾。これらのサイトカイン産生にかかわる重要な細胞として、マクロファージがある。

マクロファージは、抗原刺激により IL-1 β 、TNF- α などの炎症性サイトカインや、好中球の走化性因子であるケモカイン CXCL1、CXCL2 を産生する。IL-1 β は単球やマクロファージから産生される内因性発熱物質であり、マクロファージや好中球から産生される TNF- α などと合わせ炎症性サイトカインと総称される。これらの炎症性サイトカインは、細菌感染時の生体の初期防御として働く。CXCL1、CXCL2 は炎症時に局所へ好中球を遊走させるケモカインの一つである。

好中球は、細菌感染やウイルスなどの様々な刺激に対して末梢血から組織に浸潤し、貪食や殺菌を行う免疫細胞であり、顆粒内の強力な殺菌能を有する細胞溶解酵素や ROS を生成することで病原体の殺菌を行っている¹⁵⁾。このことにより、好中球の誘導は免疫機能の活性化につながると思われる。そこで、日本国産蜂蜜の免疫機能への影響を、マクロファージと好中球について、in vitro と in vivo 系で検討した。

2. 材料及び方法

1. 実験動物

実験動物に関しては 8~10 週齢の C57BL/6 雄マウス 21 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定に基づき動物実験委員会により承認された。

2. 日本国産蜂蜜の調製

蜂蜜はソバ（長谷川養蜂場、北海道産）、クリ（小野養蜂場、岩手県産）、シロハナマメ（種田養蜂場、北海道産）、モチ（野々垣養蜂場、愛知県産）、シロハナセンダングサ（俵養蜂場、沖縄県産）、ミカン（山口養蜂場、徳島県産）、トチ（黒田養蜂場、栃木県産）、ビワ（中田養蜂場、香川県産）、フカ（沖縄県養蜂協会、沖縄県産）、レンゲ（中村養蜂園、熊本県産）、アカシア（北海道産）、百花（京都産業大学竹内研究室、京都府産）蜂蜜を使用した（表1）。それぞれの蜂蜜は大塚生理食塩水〔生食水（大塚製薬）〕で500mg/mlになるよう調製し、0.22 μ m フィルター（MILLIPORE）を通して滅菌後、保存した。また、免疫活性陽性コントロールとしてLPS（ナカライテスク）を生食水で1mg/mlに調製し、対照物質としては蜂蜜の主要成分であるグルコース（ナカライテスク）、フルクトース（和光）およびスクロース（和光）を生食水で500mg/mlに調製し、蜂蜜溶液と同様に滅菌後、保存した。それぞれの実験には、各保存溶液を生食水で各濃度に希釈し、使用した。

表1 使用した日本国産蜂蜜の蜜源、生産地および糖度

| 蜂蜜の蜜源 | 産地 | 糖度 (%) |
|------------|-----|--------|
| ソバ | 北海道 | 79.5 |
| クリ | 岩手県 | 80.7 |
| シロハナマメ | 北海道 | 80.1 |
| クロガネモチ | 愛知県 | 80.6 |
| シロハナセンダングサ | 沖縄県 | 80.0 |
| ミカン | 徳島県 | 77.2 |
| トチ | 栃木県 | 78.5 |
| ビワ | 香川県 | 81.3 |
| フカ | 沖縄県 | 80.0 |
| レンゲ | 熊本県 | 77.7 |
| アカシア | 北海道 | 78.7 |
| 百花 | 京都府 | 82.6 |

3. Raw264.7 細胞の培養

1) Raw264.7 細胞の調製

マクロファージ細胞は、Raw264.7（独立行政法人理化学研究所 バイオリソースセンター）を使用した。細胞はR（+）培養液〔RPMI1640（ナカライテスク）500mlに10%FCS、ペニシリン（明治製薬）100U/ml、ストレプトマイシン（明治製薬）100 μ g/ml〕により、10cm シャーレ（FALCON）で3~4日おきに継代し、維持した。継代は、3日目もしくは4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）〕2mlを添加し、37 $^{\circ}$ C、5分間静置した後、2mlのR（+）を加え、セルスクラッパー（Corning）で接着した細胞を遊離させた。さらにR（+）6mlでシャーレに付着している細胞を完全に回収

した後、1000rpm、5分間、4℃で遠心した。遠心後、R(+)に懸濁し、0.2%トリパンブルーを用いて色素細胞排除試験法にて、血球計算盤上で生細胞数を算定した。

2) Raw264.7細胞の培養

96穴細胞培養プレートに、R(+)で 1×10^6 個/mlに調製したRaw264.7細胞浮遊液100 μ lを加え、生食水で50mg/mlに調製した蜂蜜、グルコース、フルクトース、スクロース、陽性コントロールとして1 μ g/mlに調製したLPS10 μ l、陰性コントロールとして生食水10 μ l添加し、R(+)で全量を200 μ l/wellにした。その後、37℃、24時間培養した。培養後、上清を取り除き、残った細胞にSolution D (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ナトリウム、0.1M 2-メルカプトエタノール) 100 μ lを加えて細胞を溶解させた。

4. Raw264.7のサイトカイン mRNA 発現

1) 全RNAの抽出

サイトカイン全RNAの抽出は、上記で得た細胞溶解液100 μ lに、H₂O-phenol100 μ l、2M Sodium Acetate10 μ l、CIAA40 μ l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上清100 μ lを移し、100%エタノール200 μ lを加えて攪拌した後、-80℃、15分間静置した。再び15000rpm、30分、4℃で遠心し、上清を取り除き、Solution D 300 μ l、Phenol/CIAA300 μ l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上清300 μ lを取り、100%エタノールを700 μ l加え攪拌し、-80℃、15分間静置した。その後、15000rpm、20分、4℃で遠心し、上清を取り除き、75%エタノール1000 μ l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、全RNAを得た。

2) cDNAの作製

上記の全RNAに滅菌水10 μ l、ランダムプライマー(宝酒造)1 μ lを加えて攪拌し、65℃、5分間静置した後、氷上で5分間静置した。その後、25mM dNTP0.8 μ l、0.1M DTT(invitrogen) 4 μ l、5 \times First-Strand Buffer(invitrogen) 8 μ l、dH₂O15.2 μ l、MLV(invitrogen) 1 μ lを順に加え、攪拌し15000rpmで軽く遠心後、37℃、45分間恒温槽で反応させた。その後、65℃、10分間静置し酵素を失活させ、さらに氷上で10分間静置後、-20℃で保存しcDNAを作製した。

3) PCR

PCRは、上記で得たcDNA1 μ lを0.2mlチューブに取り、sense、anti-sense各プライマー[β -actin、IL-1 β 、CXCL2(invitrogen)]をそれぞれ0.75 μ l、滅菌水7.5 μ l、2 \times Go-Taq Green Master

Mix (Promega) 10 μ l を加え攪拌し、軽く遠心後、DNA Engine Thermal Cyclers を用いて、 β -actin は 24 サイクル、IL-1 β 、CXCL2 は 28 サイクル行い cDNA を増幅させた。なお、1 サイクルは 95 $^{\circ}$ C denature、56 $^{\circ}$ C annealing、72 $^{\circ}$ C extension を各 30 秒とし、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)

sense 5'-GCATTGTTACCAACTGGGAC-3'
anti-sense 5'-TCTCCGGAGTCCATCACAAT-3'

IL-1 β (290bp)

sense 5'-AGCTACCTGTGTCTTTCCCG-3'
anti-sense 5'-GTCGTTGCTTGGTTCTCCTT-3'

CXCL2 (209bp)

sense 5'-AGTGAAGTGCCTGTCAATG-3'
anti-sense 5'-CAGTTAGCCTTGCCCTTGTTC-3'

4) 電気泳動

40% アクリルアミド 7ml、滅菌水 27.75ml、10 \times TEB 1.75ml、TEMED 44 μ l、10%APS350 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、上記で得た PCR 産物 18 μ l をゲルの溝に流し込み、45mA、90 分電気泳動を行った。分子量マーカーは、pBR322 DNA-MSP I Digest (BioLabs) 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. 蜂蜜の腹腔内投与と腹腔細胞の調製

1) 腹腔内投与

マウスに、500mg/ml に調製した蜂蜜 200 μ l (投与量：100mg/匹) を腹腔内投与した。コントロールには生食水 200 μ l を同様に投与した。

2) 腹腔細胞の回収、調製

24 時間後、マウスを CO₂ で安楽死させた後、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の注射針の付いた注射器で腹腔内に冷PBS(-)を約8ml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1000rpm、4℃、10分間遠心した後、上清を捨て、沈渣にPBS(-)を加え、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 1×10^6 個/mlに調製した。

6. 細胞分画

細胞分画は、上記で回収した腹腔細胞液100 μ l (1×10^5 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、500rpm、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、光学顕微鏡下で観察し細胞分画を測定した。

7. Dot Plot と細胞表面抗原の解析

1) Dot Plot

Dot Plotは、上記で得られた細胞浮遊液100 μ lを、FACS sort (BD.Bioscience)を用い、腹腔細胞の領域をGATE1として各サンプル10000個の細胞を取り込み、FSC (Forward Scatter: 前方散乱光) 値とSSC (Side Scatter: 側方散乱光) 値を測定し、生食水投与群と蜂蜜投与群を比較した。

2) 表面抗原陽性細胞比率

細胞表面抗原は、上記で回収した腹腔細胞液100 μ l (1×10^5 個)にFITC標識をした抗CD11b抗体 (B.D. Bioscience) 0.5mg/ml、抗TLR2抗体 (e. Bioscience) 0.5mg/mlを1 μ l、PE標識をした抗Gr-1抗体 (B.D. Bioscience) 0.2mg/ml、抗CD14抗体 (B.D. Bioscience) 0.2mg/ml、抗TLR4抗体 (e. Bioscience) 0.2mg/mlを2.5 μ l、Mouse BD Fc Block [Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (B.D. Bioscience)] で非特異染色の原因であるFcレセプターの結合をブロックした後FITC標識をした抗F4/80抗体 (abcom) 0.1mg/mlを5 μ l加え、PBS(-)で全量を200 μ lにし、4℃、45分間反応させた。非染色として、細胞浮遊液100 μ lにPBS(-)100 μ lを加え、同様に反応させた。反応終了後、FACS緩衝液(9.6gNaN₃、FCS10ml、10mg/ml Ca²⁺Mg²⁺溶液10mlを蒸留水で1000mlにしたもの)2mlを加え、1000rpm、4℃、10分間遠心洗浄を2回行った。遠心洗浄後、上清を除去し、300 μ lのFACS緩衝液を加えFACS sortを用い、腹腔細胞の領域をGATE1として各サンプル10000個の細胞を取り込み、FL-1 (Fluorescence: 緑色蛍光) と、FL-2 (Fluorescence-1: 赤色蛍光) を測定し、各抗原の相棒陽性比率を測定した。

8. 有意差検定

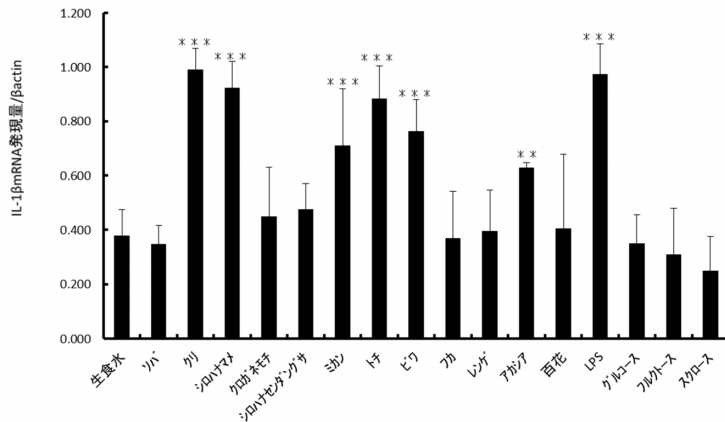
すべての実験において平均値と標準偏差を求め、成績値は平均値 (mean) ±標準偏差 (standard deviation: S. D.) で表示した。有意差検定は student's-test によりコントロール群と蜂蜜群を比較し、p 値を求め $p < 0.05$ を有意とした。

3. 結果

1. 日本国産蜂蜜添加による in vitro 系でのサイトカイン mRNA 発現への影響

Raw264.7 細胞の IL-1 β mRNA 発現比率は、生食水添加 0.377 ± 0.097 (mean \pm SD) に比べ、クリ添加 0.990 ± 0.079 、シロハナマメ添加 0.922 ± 0.100 、ミカン添加 0.709 ± 0.211 、トチ添加 0.882 ± 0.123 、ビワ添加 0.763 ± 0.116 、LPS 添加 0.974 ± 0.112 で、有意 ($p < 0.001$)、アカシア添加 0.627

a) IL-1 β mRNA 発現比率



b) CXCL2 mRNA 発現比率

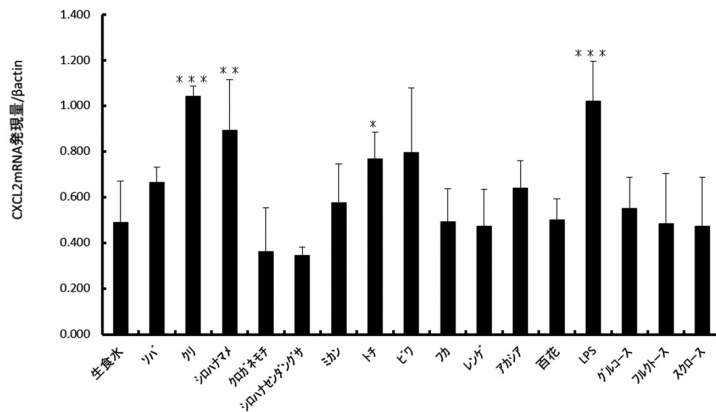


図 1 日本国産蜂蜜添加による Raw264.7 細胞のサイトカイン mRNA 発現への影響
蜂蜜最終濃度 (2.5mg/ml), *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$

± 0.020 で、有意 ($p < 0.01$) な増加が認められた。ソバ添加 0.346 ± 0.070 、クロガネモチ添加 0.448 ± 0.183 、シロハナセンダングサ添加 0.475 ± 0.095 、フカ添加 0.369 ± 0.172 、レンゲ添加 0.394 ± 0.153 、百花添加 0.405 ± 0.274 、グルコース添加 0.350 ± 0.107 、フルクトース添加 0.309 ± 0.169 、スクロース添加 0.248 ± 0.127 では有意な差は見られなかった (図 1a)。

Raw264.7 細胞の CXCL2 mRNA 発現比率は、生食水添加 0.490 ± 0.180 に比べ、クリ添加 1.042 ± 0.044 、LPS 添加 1.021 ± 0.175 で、有意 ($p < 0.001$)、シロハナマメ添加 0.893 ± 0.222 で、有意 ($p < 0.01$)、トチ添加 0.768 ± 0.116 で、有意 ($p < 0.05$) な増加が認められた。ソバ添加 0.663 ± 0.068 、クロガネモチ添加 0.362 ± 0.190 、シロハナセンダングサ添加 0.345 ± 0.035 、ミカン添加 0.577 ± 0.167 、ピワ添加 0.796 ± 0.282 、フカ添加 0.493 ± 0.144 、レンゲ添加 0.473 ± 0.161 、アカシア添加 0.639 ± 0.119 、百花添加 0.500 ± 0.094 、グルコース添加 0.0550 ± 0.138 、フルクトース添加 0.484 ± 0.219 、スクロース添加 0.472 ± 0.215 では有意な差は見られなかった (図 1b)。

2. 日本国産蜂蜜投与による in vivo 系での腹腔総細胞数と細胞分画への影響

in vitro 系での蜂蜜添加により、インターロイキン 1β (IL- 1β) と、CXC ケモカインリガンド 2 (CXCL2) mRNA 発現の増加が認められたクリ、シロハナマメ、トチ蜂蜜を腹腔内投与し好中球の誘導について検討した。

1) 腹腔総細胞数

腹腔総細胞数は、生食水投与 $2.3 \pm 0.42 \times 10^6$ 個/匹 (mean \pm SD) に比べ、クリ投与 $6.8 \pm 1.7 \times 10^6$ 、シロハナマメ投与 $4.0 \pm 0.7 \times 10^6$ で、有意 ($p < 0.001$) な増加が認められた。トチ投与 $2.9 \pm 1.0 \times 10^6$ では増加傾向が認められた (図 2a)

2) 細胞分画

腹腔細胞の細胞分画は、生食水投与に比べ、クリ、シロハナマメ、トチ投与において、好中球が多く観察された (図 2b)。

3) Dot Plot および細胞分画と細胞表面抗原への影響

i) Dot Plot

蜂蜜投与により、腹腔総細胞数の増加が認められたことから、Dot Plot への影響について検討した。Dot Plot は生食水投与で、FSC300~500、SSC100~300 と、FSC500~700、SSC600~1000 の領域に細胞集団が認められたが、クリ、シロハナマメ、トチ投与ではこれらの細胞集団の減少が認められた。また、生食水投与では認められない細胞集団が、クリ、シロハナマメ、トチ投与により、FSC350~600、SSC400~600 の領域に認められた (図 3a~d)。この細胞集団は、細胞分画の結果より好中球であることが確認された。

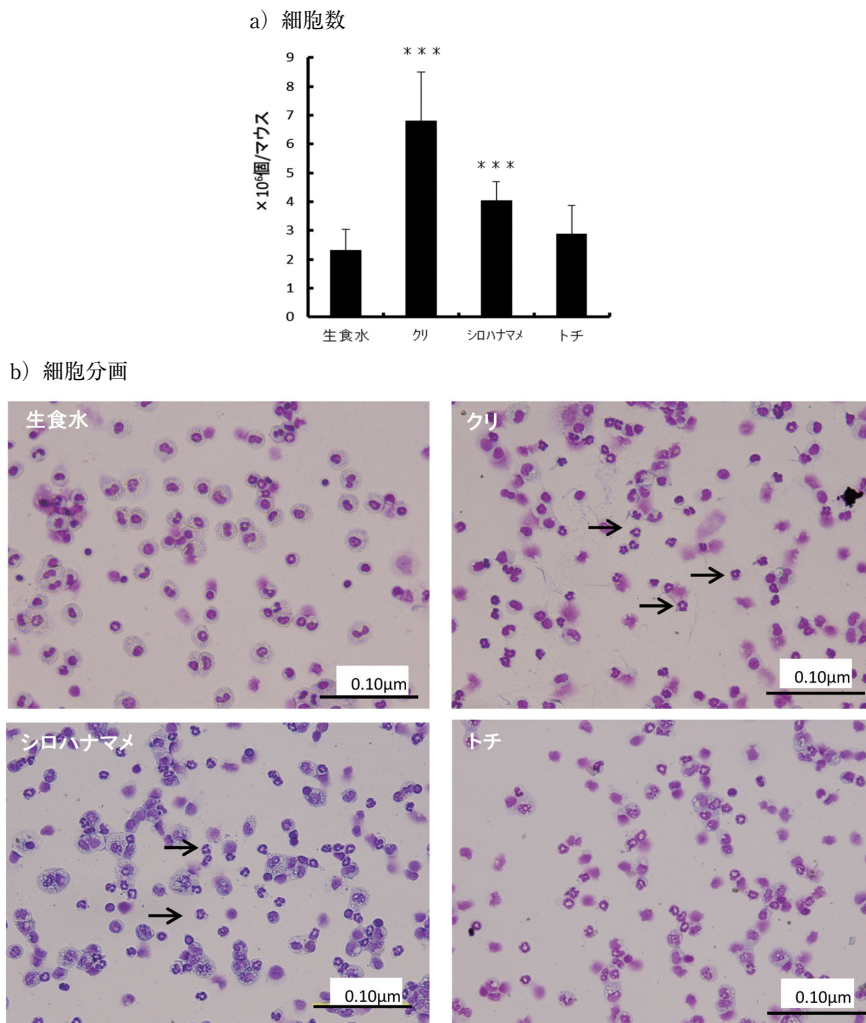


図2 日本国産蜂蜜投与による腹腔細胞の細胞分画への影響→：好中球，蜂蜜投与量 (100mg/匹)，***: $P < 0.001$

ii) 表面抗原陽性細胞比率

次に、蜂蜜による腹腔細胞の表面抗原陽性細胞比率への影響について、腹腔マクロファージの細胞表面抗原である CD11b、F4/80、CD14、TLR2、TLR4、好中球の細胞表面抗原である Gr-1 について検討した。

Gr-1 陽性細胞比率は、生食水投与 6.57 ± 2.86 (mean \pm SD) に比べ、クリ投与 63.10 ± 16.03 、シロハナマメ投与 64.29 ± 3.68 、トチ投与 57.69 ± 6.69 で有意 ($p < 0.001$) な増加が認められた。CD14 陽性細胞比率は、生食水投与 17.94 ± 8.18 に比べ、クリ投与 33.14 ± 7.06 、シロハナマメ投与 33.95 ± 6.64 、トチ投与 30.29 ± 8.98 で有意な差は認められなかった。TLR4 陽性細胞比率は、生食水投与 47.31 ± 3.31 に比べ、クリ投与 52.07 ± 2.52 、シロハナマメ投与 41.34 ± 6.40 、ト

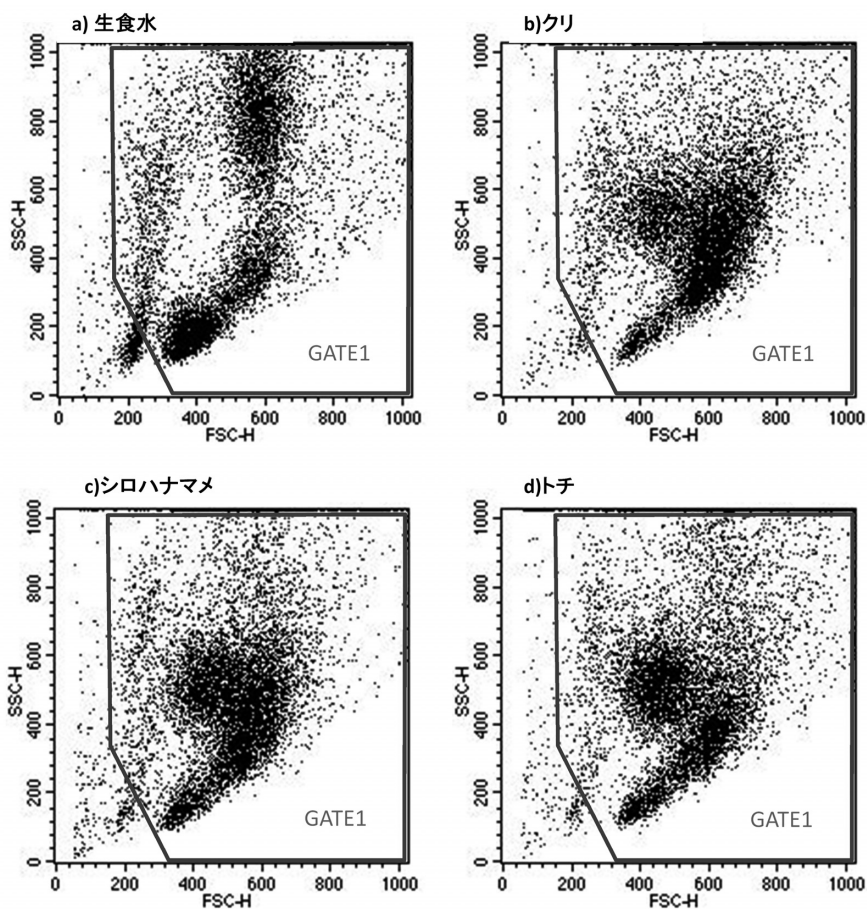


図3 日本国産蜂蜜投与による腹腔細胞の Dot Plot への影響蜂蜜投与量 (100mg/匹)

チ投与 41.42 ± 3.23 で有意な差は認められなかった。CD11b 陽性細胞比率は、生食水投与 43.41 ± 3.43 比べ、シロハナマメ投与 69.22 ± 3.31 で有意 ($p < 0.001$)、トチ投与 63.11 ± 6.26 で有意 ($p < 0.01$) な増加が認められた。クリ投与 65.00 ± 18.52 では有意な差は認められなかった。TLR 2 陽性細胞比率は、生食水投与 37.23 ± 1.16 に比べ、シロハナマメ投与 68.60 ± 1.53 、トチ投与 57.29 ± 3.64 で有意 ($p < 0.001$)、クリ投与 68.48 ± 10.30 で有意 ($p < 0.01$) な増加が認められた。F4/80 陽性細胞比率は、生食水投与 50.31 ± 2.62 に比べ、クリ投与 55.85 ± 10.66 、シロハナマメ投与 44.67 ± 3.54 、トチ投与 41.17 ± 9.61 で有意な差は認められなかった (図 4a~f)。

4. 考 察

蜂蜜は食用として世界中で親しまれているが、食用だけではなく、健康維持や創傷の治療薬

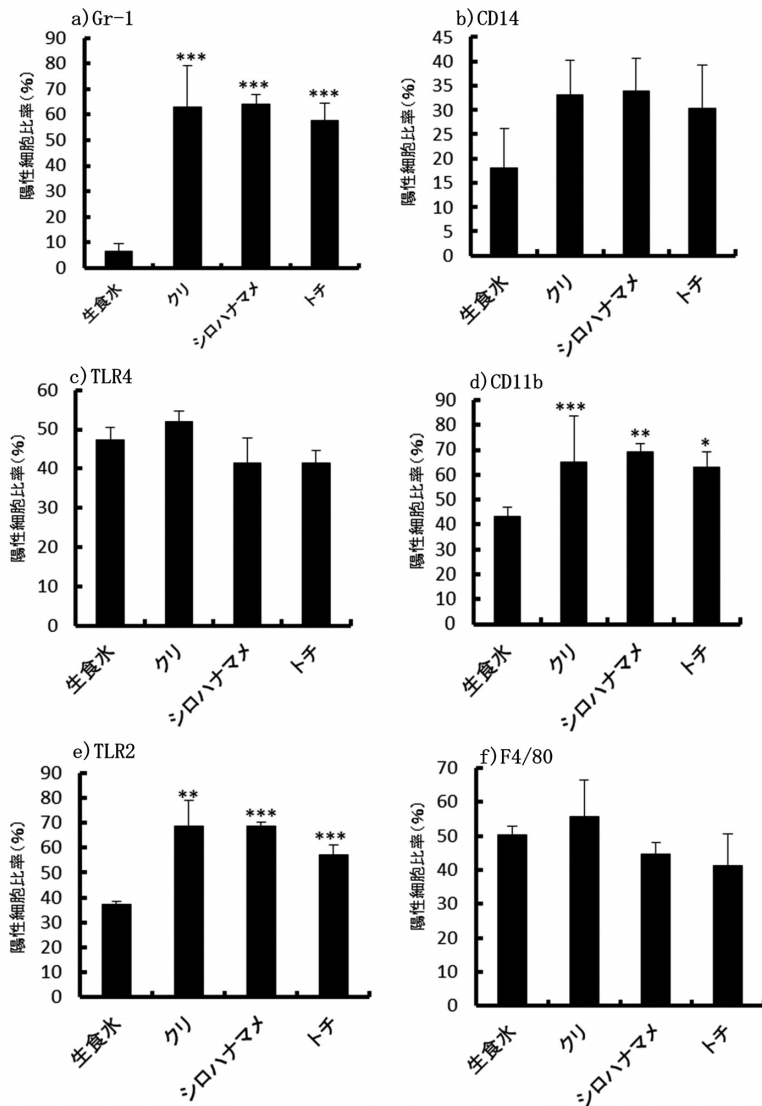


図4 日本国産蜂蜜投与による腹腔細胞の表面抗原陽性細胞比率への影響蜂蜜投与量 (100mg/匹), *: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001

など伝統的な薬として、古くから様々な用途に用いられている。また、蜂蜜は抗菌作用を持ち、抗菌作用による創傷の治療が報告され、創傷患者への新しい治療法として期待されている。蜂蜜の抗菌作用についての報告はされているが、蜂蜜の免疫機能への影響についての報告は少ない。Manuka honey、Pasture honey、Jungle honey など世界にも蜂蜜はあり、健康や美容の他、風邪、皮膚炎、火傷などの治療薬、疾患予防薬として、伝統的に医療用として利用されてきた^{4,5)}。治療薬として利用されていることから、蜂蜜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、蜂蜜の違いによる免疫作用についての報告は少ない。そこで、日本各地で採取された、蜜源の異なる蜂蜜である、ソバ、クリ、シロハナマメ、クロガネモチ、シロハナセンダングサ、ミカン、トチ、ビワ、フカ、レンゲ、アカシア、百花蜂蜜について、免疫機能への影響を検討した。

まず、初期免疫応答の活性化、炎症などに重要なサイトカインである IL-1 β と、マクロファージや好中球に作用し、好中球流入にかかわるケモカインである CXCL2 mRNA 発現について検討した。Raw264.7 細胞の IL-1 β mRNA 発現比率は、コントロールに対し、クリ、シロハナマメ、ミカン、トチ、ビワ、アカシア蜂蜜添加で有意な増加が認められた。CXCL2mRNA 発現比率は、コントロールに対し、クリ、シロハナマメ、トチ蜂蜜添加で有意な増加が認められた。これらの結果より、蜂蜜の中には IL-1 β 、CXCL2mRNA の発現比率を増加させる働きがあることが示され、特にクリ、シロハナマメ蜂蜜が IL-1 β 、CXCL2mRNA の発現を強く増加させた。

次に、IL-1 β と CXCL2 の主要産生細胞である腹腔マクロファージについて、Raw264.7 細胞で IL-1 β 、CXCL2mRNA の発現増加が認められたクリ、シロハナマメ、トチ蜂蜜を用いて *in vivo* 系で検討した。クリ、シロハナマメ蜂蜜投与で、腹腔総細胞数の有意な増加、トチ蜂蜜投与で増加傾向が認められた。この腹腔細胞の増加は、ナイジェリア産の蜂蜜や^{11,12)}、他の天然成分の *Chenopodium ambrosioides* (ケアリタソウ) の葉の抽出液や、*Oribignya phalerata* Mart (ヤシ) の中果皮の抽出液の腹腔内投与でも認められ、また、腹腔マクロファージが活性化する報告もあり^{16,17)}、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、腹腔内に蜂蜜を投与することにより蜂蜜に反応した細胞が腹腔内に誘導された結果であると考えられる。

蜂蜜の腹腔内投与により増加した細胞を調べるため、FACS を用いて解析した。Dot Plot への影響は、蜂蜜投与により、FSC300~600、SSC400~600 の領域に、コントロール群では認められない新たな細胞集団が認められた。さらに、表面抗原陽性細胞比率への影響を調べるため、抗 Gr-1 抗体、抗 CD14 抗体、抗 TLR4 抗体、抗 CD11b 抗体、抗 TLR2 抗体、抗 F4/80 抗体を用いて検討したところ、蜂蜜投与により、Gr-1、TLR2、CD11b の有意な発現増強が認められた。これらの結果と形態学的な観察により、腹腔内に増加した細胞は好中球であることが確認された。蜂蜜投与による Dot Plot と細胞表面抗原への影響に関する報告はないが、蜂蜜の巣の成分であるプロポリスの腹腔投与により、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おり¹⁸⁾、これらの報告と同様の結果が得られた。この結果より、蜂蜜は腹腔内へ好中球を誘導する作用があることが考えられる。

日本国産蜂蜜により、サイトカイン産生の増強および腹腔への好中球の誘導促進が認められた。しかし、蜂蜜にはエンドトキシン (LPS) が含まれている可能性があり、蜂蜜の免疫活性が LPS によることが考えられる¹⁹⁾。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 κ -BからNF- κ Bを遊離させ、NF- κ Bを活性化し、マクロファージを活性化させ、IL-1 β やIL-6などの炎症性サイトカインを発現し、炎症反応を誘導する^{20,21})。今回の結果より、蜂蜜投与による腹腔細胞のCD14、TLR4の細胞表面抗原の発現に差は見られなかった。このことにより、蜂蜜による免疫活性の増強は、CD14、TLR4を介したLPSによるものではないこと、および日本国産蜂蜜は、TLR4を認識せずに免疫機能を増強させる可能性が示唆された。一方、Manuka honeyに含まれる5.8kDaの物質がTLR4を介してTNF- α の発現増加させることが報告されており¹⁰)、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って免疫機能の反応が異なるためであると考えられる。また、蜂蜜投与によりTLR2の増強が認められた結果より、日本国産蜂蜜はTLR2を介して免疫反応を活性化させる働きがあることが考えられる。

今回、日本国産蜂蜜には免疫機能を活性化する結果が得られたが、一方、Buckwheat honeyによる鎮咳効果²²)や、蜂蜜に含まれるフラボノイドであるchrysinの抗炎症作用が報告されており^{23,24})、蜂蜜に含まれるポリフェノール成分の抗炎症としての治療の可能性が期待されている²⁵)。一方、Thyme honey添加でRaw264.7細胞のPGE2、COX2の発現は濃度依存的に増加するが、蜂蜜とLPSの同時添加により、一定の濃度を超えるとPGE2、IL-6の発現が抑えられる炎症反応の調節機能が報告されている²⁶)。今後、日本国産蜂蜜も同様に抗炎症作用を持つことが考えられ、産地、蜂蜜の種類による効果の違いについてさらに検討する予定である。

謝 辞

本研究は、社団法人日本養蜂協会による支援により行われた。

参考文献

1. Ciulu M, Solinas S, Floris I, Panzanelli A, Pilo MI, Piu PC, Spano N, Sanna G. RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey. *Talanta*, 2011; 83: 924-929.
2. Hegazi GA, Abd El-Hady FK. Influence of Honey on the Suppression of Human Low Density Lipoprotein (LDL) Peroxidation (In vitro). *Evid Based Complement Alternat Med*, 2009; 6: 113-121.
3. Irish J, Blair S, Carter DA. The antibacterial activity of honey derived from Australian flora. *PLoS One*, 2011; 6: e18229. [PubMed: 2146489]
4. Cooper R. Honey in wound care: antibacterial properties. *GMS Krankenhhyg Interdiszip*, 2007; 2: Doc51. [PubMed: 20204083]
5. Kwakman PH, Te Velde AA, de Boer L, Vandenbroucke-Grauls CM, Zaat SA. Two major medicinal honeys have different mechanisms of bactericidal activity. *PLoS One*, 2011; 6: e17709. [PubMed:

21394213]

6. Lu J, Turnbull L, Burke CM, Liu M, Carter DA et al. Manuka-type honeys can eradicate biofilms produced by *Staphylococcus aureus* strains with different biofilm-forming abilities. *PeerJ*, 2014; 2: e 326. [PubMed: 24711974]
7. Sherlock O, Dolan A, Athman R, Power A, Gethin G, Cowman S, Humphreys H. Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complementary & Alternative Medicine*, 2010; 10: 47. [PubMed: 20813024]
8. Tonks A, Cooper RA, Price AJ, Molan PC, Jones KP. Stimulation of TNF-alpha release in monocytes by honey. *Cytokine*, 2001; 14: 240-242.
9. Tonks A. J, Cooper R. A, Jones K. P, Blair S, Parton J, Tonks A. Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes. *Cytokine*, 2003; 21: 242-247.
10. Tonks AJ, Dudley E, Porter NG, Parton J, Brazier J, Smith EL, Tonks A. A 5.8-kDa component of manuka honey stimulates immune cells via TLR4. *Journal of Leukocyte Biology*, 2007; 82: 1-10.
11. Fukuda M, Kobayashi K, Hirono Y, Miyagawa M, Ishida T, Ejiogu EC, Sawai M, Pinkerton KE, Takeuchi M. Effect of Jungle honey on the chemotactic activity of neutrophils. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 2010; 2: 149-154.
12. 福田美樹, 宮川真由子, 竹内実. ジャングルハニーによる免疫機能への影響と抗腫瘍作用. 京都産業大学論集. 2009; 38: 95-118.
13. 重吉瑛里, 竹内実. ジャングルハニーによる抗体産生機能への影響とその機構について. 京都産業大学論集. 2013; 42: 21-52.
14. 岡田大地, 廣野由里子, 田中美子, 佐々木一馬, 棚橋靖行, 高橋純一, 佐倉正明, 竹内実. 日本国産ハチミツによる肺胞マクロファージの免疫機能に及ぼす影響. 京都産業大学 先端科学技術研究所所報. 2013; 12: 33-44.
15. Rada B, Leto T. Oxidative Innate Immune Defenses by Nox/Duox Family NADPH Oxidases. *Contrib Microbiol*, 2008; 15: 164-187.
16. 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.
17. 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.
18. Orsolić N, Basić I. Water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages. *J Ethnopharmacol*, 2005; 102: 37-45.
19. Timm M, Bartelt S, Hansen EW. Immunomodulatory effects of honey cannot be distinguished from endotoxin. *Cytokine*, 2008; 42: 113-120.
20. Guernonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 2002; 20: 621-667.
21. 矢田純一. 2009 ; 医系免疫学改訂 11 版, 中外医学社, 392-393.
22. Paul MI, Beiler J, McMonagle A, Shaffer LM, Duda L, Berlin MC. Effect of Honey, Dextromethorphan,

- and No Treatment on Nocturnal Cough and Sleep Quality for Coughing Children and Their Parents. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2007; 161: 1140-1146.
23. Ha SK, Moon E, Kim SY. Chrysin suppresses LPS-stimulated proinflammatory responses by blocking NF- κ B and JNK activations in microglia cells. *Neurosci Lett.* 2010; 485: 143-147.
 24. Woo JK, Jeong JY, Inoue H, Park WJ, Kwon KT. Chrysin suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression through the inhibition of nuclear factor for IL-6 (NF-IL6) DNA-binding activity. *FEBS Letters*, 2005; 579: 705-711.
 25. Wang HX, Gheldof N, Engeseth JN. Effect of Processing and Storage on Antioxidant Capacity of Honey. *Journal of Food Science*, 2004; 69: 96-101.
 26. Raynaud A, Ghezali L, Gloaguen V, Liagre B, Quero F, Petit JM. Honey-induced macrophage stimulation: AP-1 and NF- κ B activation and cytokine production are unrelated to LPS content of honey. *Int Immunopharmacol.* 2013; 17: 874-879.

Effect of Japanese honey on immune functions in macrophage and neutrophil

Yoshiko TANAKA
Maiko TAKASAKI
Takahiro TAKITANI
Jun-ichi TAKAHASHI
Yuriko HIRONO
Minoru TAKEUCHI

Abstract

Honey is natural edible product collected by *Apis mellifera*. Honey is not only for food, widely used in the world for the health maintenance, cold, dermatitis and treatment of wound. We previously reported that honey in Nigeria indicates the immunological effect. But Japanese honey have not been yet fully investigated on the immune function. Therefore, we investigated the effect on the immune function in vitro and in vivo systems using twelve Japanese honeys. In the in vitro system, six kinds and three kinds of honeys significantly enhanced IL-1 β and CXCL2 mRNA expressions. In the in vivo system, two kinds of honeys significantly increased peritoneal cells and percentage of neutrophils in mice. Furthermore, two kinds of honeys significantly increased percentage of Gr-1, TLR2 and CD11b surface antigens positive cells in peritoneal cells. Percentage of CD14, TLR4 and F4/80 surface antigens positive cells were not significantly increased. These results suggest that neutrophil was induced by production of CXCL2 via augmentation of IL-1 β mRNA through the activation of macrophage mediated with TLR2 by Japanese honey.

Keywords: Japanese honey, macrophage, neutrophil, cytokine, cell surface antigen