

日本国産ハチミツの免疫細胞と Lipopolysaccharide (LPS) 誘導性肺炎症に及ぼす影響

平成 29 年 5 月 15 日受付

湯 浅 愛 里¹⁾

田 中 美 子²⁾

宇 野 真由奈¹⁾

金 森 千 香¹⁾

竹 内 実^{1,2)}

¹⁾ 京都産業大学総合生命科学部

²⁾ 京都産業大学ミツバチ産業科学研究センター

要 旨

外国産ハチミツによる免疫機能への影響は報告されているが、日本国産ハチミツの免疫と抗炎症作用についての詳細な説明はされていない。そこで、日本国産ハチミツとして京都産業大学産ハチミツ（京産ハチミツ）を用い、免疫細胞である肺胞マクロファージ（AM）と Lipopolysaccharide（LPS）で誘導した肺炎症に対する影響について検討した。AM に LPS 添加群（最終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）と LPS に京産ハチミツ添加（ハチミツ最終濃度 1、10 mg/ml ）した HL（Honey + LPS）群を設け共培養し、炎症性サイトカインである IL-1 β と CXCL2 の mRNA 発現を RT-PCR 法により調べた。AM の IL-1 β mRNA 発現比率は、LPS 添加群と比較して、HL 添加群のハチミツ濃度 10 mg/ml で有意な（ $p < 0.01$ ）減少が認められた。一方、CXCL2 mRNA 発現比率は、LPS 添加群と比較して、HL 添加群のハチミツ濃度 10 mg/ml で有意な（ $p < 0.001$ ）減少が認められ、ハチミツに炎症性サイトカインの発現を抑制することが認められた。これらの *in vitro* 系の結果から、LPS 投与による肺炎症への影響を検討した。マウスに LPS 50 $\mu\text{g}/\text{匹}$ を投与した LPS 群、ハチミツ 10 $\text{mg}/\text{匹}$ を投与し 24 時間後に LPS を投与した Honey + LPS（HL）群について、それぞれの BAL 総細胞数を比較した。BAL 総細胞数は、LPS 群で有意な（ $p < 0.001$ ）増加が認められたが、HL 群で有意な（ $p < 0.05$ ）減少が認められた。好中球の細胞比率は LPS 群で有意な（ $p < 0.001$ ）増加が認められたが、HL 群で減少傾向が認められた。これらの結果から、京産ハチミツは AM の IL-1 β 、CXCL2 の産生を抑制し、LPS による好中球の肺への浸潤を抑制し、抗炎症作用を示すことが示唆された。

キーワード：ハチミツ、肺胞マクロファージ、好中球、LPS 誘導性肺炎症、サイトカイン

1. はじめに

ハチミツは、ミツバチの採集した花蜜をミツバチの唾液に含まれる酵素で分解し、貯蔵、濃縮し、巣の中で熟成されてできる天然成分である¹⁾。ハチミツの主な構成成分は糖であり、そのうち約38%がフルクトース、約31%がグルコースからなる。また、その他にもビタミン、タンパク質、有機酸、ミネラル、酵素、ポリフェノールなど栄養を豊富に含んでいる。ハチミツは紀元前5000年ごろのエジプト、ギリシャ、中国、ローマなどで、食用として摂取されるだけでなく、怪我や火傷、創傷の治療薬として使用されていた。現在ではハチミツには抗酸化作用があることや心血管疾患、ガン、感染症、神経変性への影響が報告されている^{2,3)}。

一方、Lipopolysaccharide (LPS) はグラム陰性菌の細胞壁外膜を構成する成分で、内毒素(エンドトキシン)である。エンドトキシンの成分を持つ細菌が死滅するときだけ毒素活性が示される。細菌が死ぬと、エンドトキシンが細胞壁から遊離し、感染宿主の血中に入り、発熱、悪寒、筋力低下、疼痛など炎症を引き起こす⁴⁾。LPSにはリピドA (lipidA) という特殊な脂質が存在し、これが内毒素活性を示す。LPSによる免疫応答は、肺胞マクロファージの細胞表面上にあるToll Like Receptor 4 (TLR4) がLPSを認識し、IkB- α がリン酸化され、NF- κ Bが活性化されると、炎症性サイトカインであるインターロイキン1 β (interleukin1 β : IL-1 β) や腫瘍壊死因子 α (tumor necrosis factor- α : TNF- α)、CXCL2などのケモカインを産生することで炎症反応を誘導することが知られている。また、LPSは気管支内投与によって急性肺炎症の動物モデルを作製するためにも使われている。このモデルはヒトの肺炎や肺浮腫、肺上皮障害に似た急性肺炎症症状を示し、また、好中球を肺に誘導し、肺炎症を引き起こすことが知られている⁵⁾。ハチミツの免疫系への影響や抗炎症作用への影響については、マレーシアのゲラムハニーが炎症性サイトカインの産生を抑制することや³⁾、ニュージーランドのマスカハニーが炎症性腸疾患に対する炎症の抑制を示すことが報告されているが⁶⁾、その詳細については解明されておらず、日本国産ハチミツによる抗炎症作用については報告されていない。そこで、京都産業大学産ハチミツの免疫細胞とLPSの気管支内投与により誘導した肺炎症に対する抗炎症作用について検討した。

2. 材料及び方法

1. 実験動物

実験動物は、7～9週齢のC57BL/6雌マウス(日本SLC)を使用した。なお、本研究の実験動物に関しては、京都産業大学動物実験規定に基づき、本学動物実験委員会により承認されたものである。

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 (-) 培養液 [RPMI1640 (ナカライテスク) 500 ml、100 U/ml ペニシリン (明治製菓)、100 µg/ml ストレプトマイシン (明治製菓) を含む溶液、以下 R (-) とする] で10 mg/ml 溶液を作製し、PBS (-) 溶液 [Phosphate buffer saline (-) : Mg^{2+} 、 Ca^{2+} を含まないリン酸緩衝液 (日水製薬株式会社)、以下 PBS (-) とする] で1 mg/ml に調製し、分注して-20°C で保存した。

3. 京都産業大学産ハチミツ (京産ハチミツ) の調製

ヒグチ養蜂園 (京都市) より購入したセイヨウミツバチを京都産業大学構内で飼育し、2015年6月11日に採蜜されたセイヨウミツバチの百花蜜を200 mg/ml、400 mg/ml になるようにRPMI1640 培養液または生理食塩水 (大塚製薬) で調製し、0.22 µm フィルター (MILLIPORE) を通してろ過滅菌後、これをハチミツ保存液とし、4°C で保存した。なお、ハチミツの糖度は82.7%であった。

4. LPS と京産ハチミツの気管支内投与

気管支内投与は、マウスの腹腔内にPBS (-) で20倍希釈したソムノペンチル (共立製薬) 0.35 ml を注射し麻酔したのち、気管支内投与用の台にマウスを固定し、Model FMJ-250 High Pressure Syringe (PENN-CENTURY, INC) に Model IA-1C Intratracheal Aerosolizer (PENN-CENTURY, INC) を装着した噴霧器を使用して、マウス気管支内にLPS 50 µg/50 µl/匹を投与し、これをLPS群としLPS誘導性肺炎症を作製した。また、京産ハチミツ10 mg/50 µl/匹を投与し、これをHoney群とした。さらに、京産ハチミツ10 mg/50 µl/匹を投与し、24時間後にLPS 5 µg/50 µl/匹を投与したものをHoney + LPS (HL) 群とした。なお、無処置のマウスをcontrol群とした。

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

気管支肺胞洗浄は、気管支内投与をしてから24時間後に行った。マウスの腹腔内にPBS (-) で10倍希釈したソムノペンチル (共立製薬) 0.35 ml を注射し、その後、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切開し、肺と主気管支を露出した。露出した主気管支が伸びるようにピンセットを主気管支の下に差し込み、主気管支に27Gの注射針を用いて穴を開け、21Gテルモン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ル針に装着し、PBS (-) 1 ml を主気管支から肺へと注入し、気管支肺胞洗浄を行い、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。

6. BAL 細胞の調製

BAL 細胞の調製については、前述の BALF を 1000 rpm、10 分間、4°C で遠心後、上清を取り除き、RPMI1640 (+) [RPMI1640 (ナカライテスク) 10%FCS、100 U/ml ペニシリン (明治製菓)、100 µg/ml ストレプトマイシン (明治製菓)、以下 R (+) とする] を 0.5 ml 加えて懸濁した。この細胞浮遊液にチュルク染色液を加え、血球計算盤で細胞数を測定し、細胞浮遊液を 5×10^5 個/ml の濃度に R (+) で調製した。なお、control 群の BAL 細胞は 100% 肺胞マクロファージ (Alveolar Macrophage: AM) であった。

7. BAL 細胞のサイトスピン標本の作製

BAL 細胞のサイトスピン標本は、 5×10^5 個/ml に調製した BAL 細胞浮遊液 100 µl を遠心法浮遊細胞収集装置のスライドグラス上に滴下し、850 rpm、5 分間遠心し、細胞をスライドグラスに集め、スライドグラスにメタノールを滴下し、2 分間放置し固定後、乾燥させ、ギムザ染色原液 150 µl とリン酸緩衝液 (pH 7.4) 5 ml を混合させ、ギムザ染色液を作成し、スライドグラス上に 1 ml のギムザ染色液を滴下し 30 分間染色した。染色後にスライドグラスを裏返して水道水で洗い流し、ドライヤーで乾燥させサイトスピン標本を作製し、顕微鏡下で細胞の形態を観察した。また、顕微鏡下で細胞 100 個を数え、各細胞分画の比率を求めた。

8. 肺胞マクロファージ (Alveolar Macrophage: AM) の培養

96 穴平底細胞培養プレートに、前述 6 の方法で AM を 5×10^5 個/ml となるように R (+) で調製した細胞浮遊液 100 µl を加え、解凍した LPS を培養前に R (-) で 2 µg/ml に調製し、最終濃度 1 µg/ml となるように 100 µl 添加した。これを LPS 添加群 (ハチミツ非添加) とした。また、細胞浮遊液 100 µl に LPS を 4 µg/ml に調製し、最終濃度 1 µg/ml となるように 50 µl 添加し、そこにハチミツ保存液を R (-) で 4 mg/ml、40 mg/ml、400 mg/ml に調製し最終濃度 1 mg/ml、10 mg/ml、100 mg/ml になるように 50 µl 添加した。これを Honey + LPS (HL) 添加群 (ハチミツ添加) とした。1 well あたりの各群それぞれ全量を 200 µl にし、37°C の 5% CO₂ インキュベーターで 4 時間培養した。

9. IL-1β と CXCL2 サイトカインの mRNA 発現

1) 全 RNA の抽出

前述 7 の培養後、上清を取り除き、残った細胞に Solution D (4 M グアニジンチオシアン酸塩、25 mM クエン酸ナトリウム、0.5% N-ラウロイルコシンナトリウム、0.1 M2-メルカプトエタノール) 200 µl を加えて細胞を溶解させ、これを細胞溶解液とした。全 RNA の抽出は、細胞溶解液 200 µl をエッペンチューブに取り H₂O-phenol 200 µl、2M Sodium Acetate 20 µl、CIAA 80 µl を加えて攪拌し、15000 rpm 5 分間 4°C で遠心した。その後、新しいエッペン

チューブに上清 200 μ l を取り、100% エタノール 400 μ l を加えて攪拌した後、 -20°C で 60 分間、放置した。再び 15000 rpm、30 分間、 4°C で遠心し、上清を取り除き、Solution D 300 μ l、Phenol/CIAA 300 μ l を加えて攪拌し、15000 rpm、5 分間、 20°C 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 700 μ l を加え攪拌し、 -20°C で 60 分間放置し、全 RNA を抽出した。

2) cDNA の作製

cDNA の作製は、前述で抽出された全 RNA 溶液を 15000 rpm、20 分間、 4°C 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、15000 rpm、10 分間、 4°C で遠心して上清を取り除き、アスピレーターで 30 分間乾燥させた。乾燥後、滅菌した超純水 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°C 、5 分間、放置後、さらに氷上で 5 分間放置した。その後、25 mM dNTP 0.8 μ l、0.1 M DTT (invitrogen) 4 μ l、5 \times buffer 8 μ l、MLV 1 μ l、滅菌した超純水 15.2 μ l を加え 15000 rpm で flash した後、 37°C 、45 分間、温浴槽で反応させ、 65°C 、10 分間で反応をとめ、氷上で 10 分間放置し、cDNA を作製した。作製後の cDNA は -20°C で保存した。

3) PCR

PCR は、マイクロチューブに前述で作製した cDNA 1 μ l に各プライマー (β -actin, IL-1 β , CXCL2) の sense、anti-sense を各々 0.75 μ l、Go-Taq 10 μ l、滅菌した超純水 7.5 μ l を加え攪拌し、15000 rpm で flash し PCR 装置（日本バイオラッドラボラトリー）を用いて 30 サイクルで cDNA を増幅させた。使用したプライマーの塩基配列とサイズは以下に示す。

β -actin (250 bp)

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

IL-1 β (290 bp)

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

CXCL2 (209 bp)

sense 5'-AGTGAAGCTGCGCTGTCAATG-3'
antisense 5'-CAGTTAGCCTTGCCTTTGTTC-3'

4) 電気泳動

電気泳動用の 8% アクリルアミドゲルは、40% アクリルアミド 7 ml、滅菌した超純水

27.75 ml、10 × TBE 1.75 ml、TEMED 44 µl、10% APS 350 µl をビーカーに取り攪拌し、ゲル板に流し込んで、コームを挿し込み 20 分間放置して作製した。電気泳動は、前述で作製したゲル板を泳動槽に固定し、1 × TBE 700 ml を泳動槽に注ぎ、各増幅 cDNA 20 µl、分子量マーカー (pBR322DNA-MSP I Digest: BioLabs) 1 µl をゲルの溝に分注し、45 mA で 90 分間泳動した。泳動後、ゲルを 0.5 µl/ml のエチジウムブロマイドで 20 分間染色後、遺伝子定量解析システムを用いて PCR 増幅産物の電気泳動写真を撮影した。各サンプルの PCR 増幅産物の検出バンドは Image J を使用して解析を行い、各サイトカインの mRNA 発現量 / β -actin の mRNA 発現比率を算出した。

10. 有意差検定

有意差検定は、全ての実験において、平均値 (mean) と標準偏差 (standard deviation: S.D.) を求め、student's t-test により control 群と LPS 群、LPS 群と HL 群、LPS 添加群と HL 添加群を比較し p 値を求め、 $p < 0.05$ を有意差とした。

3. 結果

1. 京産ハチミツによる AM の IL-1 β mRNA 発現への影響

IL-1 β の mRNA 発現比率は、LPS 添加群で 1.4 ± 0.8 (mean \pm S.D.)、HL 添加群のハチミツ濃度 1 mg/ml で 1.4 ± 0.4 、10 mg/ml で 0.3 ± 0.5 であり、LPS 添加群と比較して HL 添加群のハチミツ濃度 10 mg/ml、100 mg/ml で有意な ($p < 0.01$) 減少が認められた。京産ハチミツによる IL-1 β mRNA 発現の抑制が認められた (図 1)。

2. 京産ハチミツによる AM の CXCL2 mRNA 発現への影響

CXCL2 の mRNA 発現比率は、LPS 添加群で 1.6 ± 0.3 、HL 添加群のハチミツ濃度 1 mg/ml で 1.50 ± 0.60 、10 mg/ml で 0.03 ± 0.04 であり、LPS 添加群と比較して HL 添加群のハチミツ濃度 10 mg/ml、100 mg/ml で有意な ($p < 0.001$) 減少が認められた。京産ハチミツによる CXCL2 mRNA 発現の抑制が認められた (図 2)。

3. 京産ハチミツ投与による LPS 誘導性肺炎症の BAL 細胞数への影響

1) BAL 総細胞数への影響

マウス 1 匹あたりの BAL 総細胞数は、control 群で $1.3 \pm 0.3 \times 10^5$ 個 (mean \pm S.D.)、Honey 群で $1.6 \pm 0.3 \times 10^5$ 個、LPS 群で $11.9 \pm 2.8 \times 10^5$ 個、HL 群で $8.7 \pm 2.9 \times 10^5$ 個であり、control 群と比較して LPS 群で BAL 総細胞数の有意な ($p < 0.001$) 増加が認められた。また、LPS 群と比較して HL 群で BAL 総細胞数の有意な ($p < 0.05$) 減少が認められた (図 3)。

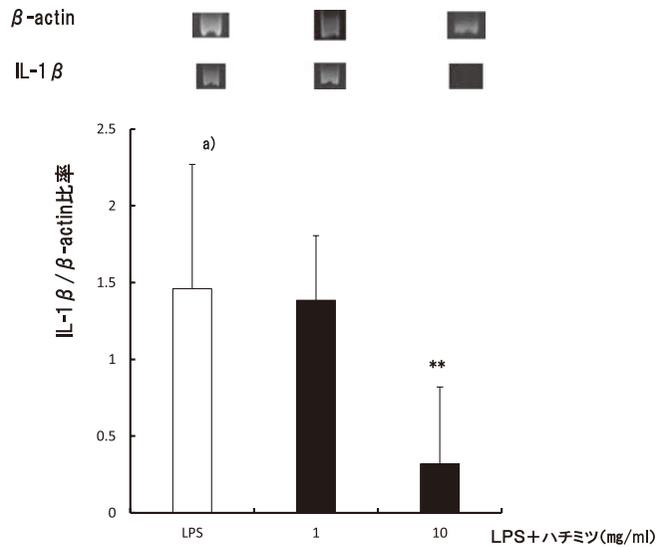


図1 京産ハチミツによるAMのIL-1 β mRNA発現への影響
 a) : Mean \pm S.D.、□ : LPS添加群、■ : HL添加群 : (Honey + LPS)
 ** : $p < 0.01$, LPS添加群 vs HL添加群

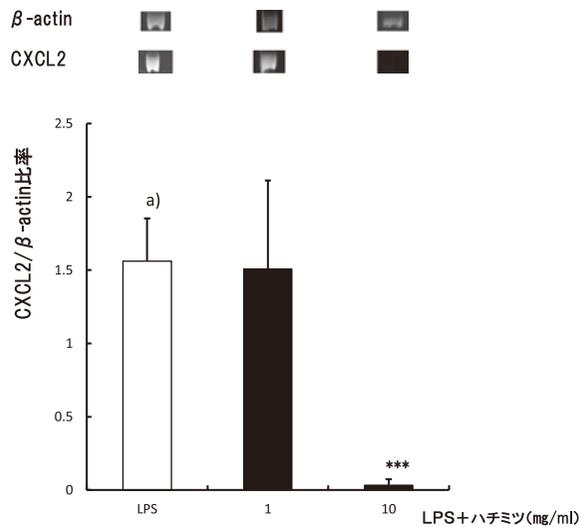


図2 京産ハチミツによるAMのCXCL2 mRNA発現への影響
 a) : Mean \pm S.D.、□ : LPS添加群、■ : HL添加群、*** : $p < 0.001$, LPS添加群 vs HL添加群

2) BAL細胞比率への影響

BAL細胞における肺胞マクロファージの比率は、control群を100%とした場合、Honey群で $97.1 \pm 3.0\%$ (mean \pm S.D.)、LPS群で $9.5 \pm 12.1\%$ 、HL群で $19.5 \pm 7.6\%$ であり、control群と比較してLPS群で有意な減少 ($p < 0.001$) が認められた。一方、好中球の比率は、control

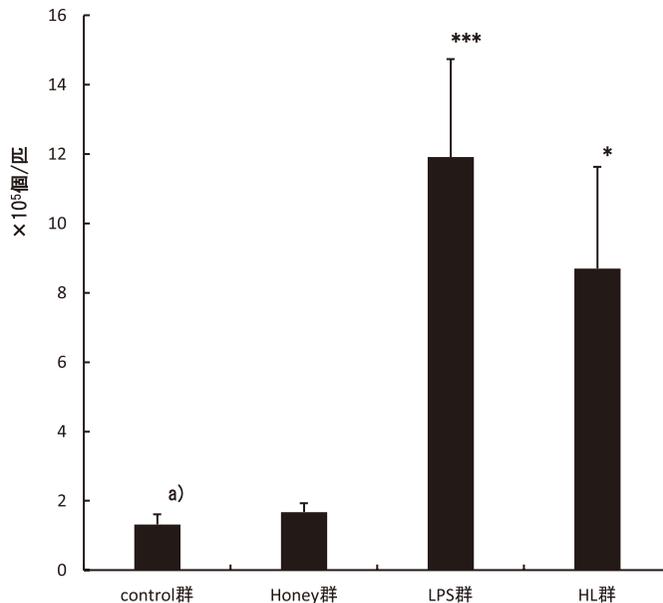


図3 京産ハチミツ投与によるLPS誘導性肺炎症のBAL総細胞数への影響

a) : Mean ± S.D., *** : $p < 0.001$, control vs LPS, * : $p < 0.05$, LPS群 vs HL群

群で0%であったが、Honey群で $2.8 \pm 3.0\%$ 、LPS群で $90.5 \pm 12.1\%$ 、HL群で $80.5 \pm 7.6\%$ であり、control群と比較してLPS群で有意な ($p < 0.001$) 増加が認められた。また、LPS群と比較してHL群で好中球比率の減少傾向が認められ、京産ハチミツがLPSによる好中球の誘導を抑制した可能性が示唆された (図4)。

4. 考 察

ハチミツは、ミツバチにより花蜜から作られる栄養分の豊富な天然成分である。ハチミツは古くから人々の生活の中において身近な存在であり、食用としてそのまま摂取されるだけでなく、創傷、火傷の治療薬として用いられてきたことから⁷⁾、免疫機能に影響を及ぼすことが考えられる。現在、ハチミツの免疫機能に対する影響については、グラムハニーのNF- κ Bの活性化阻害による抗炎症作用や⁸⁾、ジャングルハニーによる抗腫瘍作用や抗体産生機能の増強などが報告されている⁹⁾。このように外国産ハチミツの免疫機能と抗炎症作用に対する影響については報告されているが、日本国産ハチミツの抗炎症作用に対する影響についての報告はされていない。

一方、Lipopolysaccharide (LPS) はグラム陰性菌の細胞壁外膜を構成する成分で、内毒素 (エンドトキシン) の1つである。LPSは多糖体部分と内毒素活性の中心となるリポドAで構成されている。LPSが結合し、作用を示す標的細胞としては、リンパ球やマクロファージ、

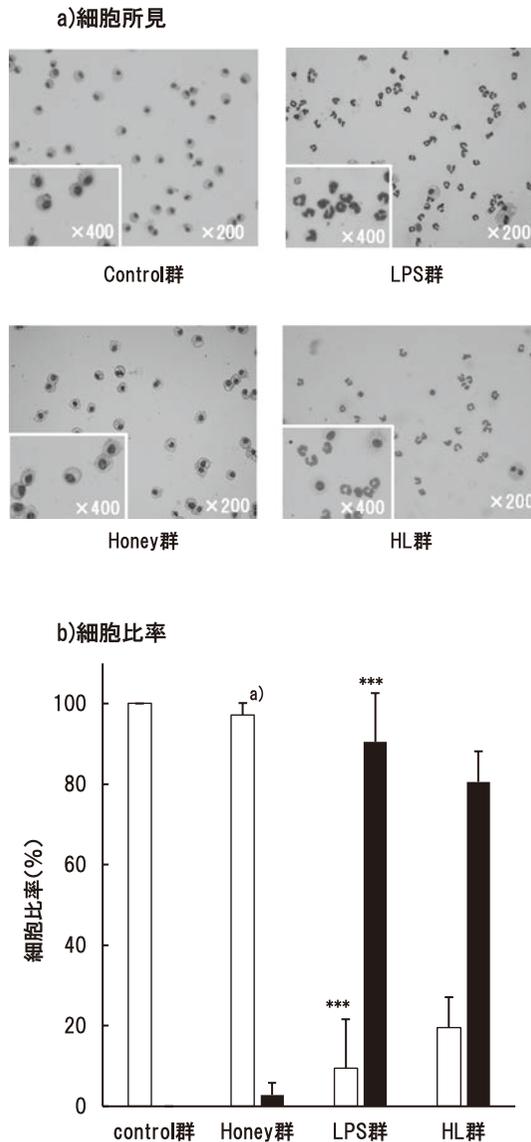


図4 京産ハチミツ投与によるLPS誘導性肺炎症のBAL細胞比率への影響
a) : Mean \pm S.D., □ : AM, ■ : 好中球, *** : $p < 0.001$, control群 vs LPS群

単球などがある。LPSが血液中に入ると、LPS Binding Protein (LBP) と結合することでLPS-LBP複合体を形成する。この複合体はマクロファージの細胞表面に存在するレセプターであるCD14と結合し、マクロファージは活性化され、TNFやIL-1などの炎症性サイトカインを産生することにより好中球が誘導・活性化され炎症が誘導されることが知られている⁹⁾。同様に、LPSがTLR4に結合し、NF- κ Bを活性化し、炎症性サイトカインを産生し、好中球を誘導されることにより、炎症反応を引き起こすことが知られている⁵⁾。

LPS の気管支内投与は、急性肺炎症障害の動物モデルを作製するためにも使われており、好中球を肺に誘導し、肺炎症を引き起こすことが知られている⁵⁾。しかし、LPS に誘導された好中球による肺炎症に対する日本国産ハチミツの影響については報告されていない。そこで、免疫細胞である AM と LPS の気管支内投与により誘導した肺炎症に対する京都産業大学産ハチミツの影響について検討した。

まず、AM の炎症性サイトカイン IL-1 β とケモカイン CXCL2 に対する京産ハチミツの影響について検討した。IL-1 β は、細菌や LPS による刺激をマクロファージが受けることで産生され、ケモカインの産生を誘導する炎症性サイトカインの一種である¹⁰⁾。IL-1 β mRNA 発現は LPS 添加群で認められたが、ハチミツ添加により有意な減少が認められた。また、CXCL2 は C-X-C サブファミリーに分類され、好中球の走化作用を示すケモカインである¹¹⁾。CXCL2 mRNA 発現は、LPS 添加群で認められたが、ハチミツ添加群で有意な減少が認められた。ハチミツのサイトカイン産生への影響については、ラットの LPS 静脈内投与により増加した IL-1 β 産生が、ゲラムハニーの静脈内投与により抑制された報告があることから³⁾、今回の LPS 刺激下でのハチミツ添加による IL-1 β mRNA 発現比率の減少は、京産ハチミツが LPS の CD14 や TLR4 への結合を阻止し IL-1 β mRNA 発現を抑制したためであると考えられる。また、ハチミツによる CXCL2 産生や CXCL2 mRNA 発現への影響については、現在報告されていない。しかし、京産ハチミツにより IL-1 β mRNA 発現が抑制されたことと同様のメカニズムで CXCL2 mRNA 発現が抑制されたと考えられる。

in vitro 系の実験で、京産ハチミツによる AM の IL-1 β と CXCL2 mRNA 発現の抑制が認められたため、次に京産ハチミツの LPS 気管支内投与による LPS 誘導性肺炎症モデルについて BAL 総細胞数に対する影響を検討した。BAL 総細胞数は、control 群と比較して LPS 群で有意な増加が認められた。また、LPS 群と比較して HL 群で有意な減少が認められた。マウスへの LPS 気管支内投与により BAL 総細胞数は増加することが報告されており¹³⁾、今回の結果と同様であった。ハチミツの気管支内投与により BAL 総細胞数が減少したという報告はされておらず、京産ハチミツの気管支内投与による BAL 総細胞数の減少は、LPS 刺激による細胞の誘導が抑制されたことによると考えられる。京産ハチミツの気管支内投与による BAL 総細胞数の減少が認められたため、サイトスピン標本を作製し、BAL 細胞の細胞比率について検討した。LPS 群では AM 比率の有意な減少、好中球比率の有意な増加が認められた。一方、LPS 群と比較して京産ハチミツ投与 (HL) 群では好中球比率の減少傾向が認められた。LPS 非投与での BAL 細胞のほとんどは AM が占め、LPS の気管支内投与により好中球が誘導され、24 時間後に好中球数がピークになることが報告されており¹³⁾、今回の結果と同様であった。京産ハチミツの気管支内投与により、BAL 細胞の好中球比率が減少したが、他のハチミツの気管支内投与により、BAL 細胞の好中球比率が減少した報告はされていない。京産ハチミツ投与群で好中球比率の減少傾向が認められたことから、京産ハチミツに抗炎症効果がある

と考えられる。以上の結果から、京産ハチミツの抗炎症機構には、まず肺胞マクロファージのグラム陰性菌異物認識レセプターである TLR4 にハチミツが作用し、LPS の TLR4 への結合を阻害し、LPS 刺激による肺胞マクロファージからの IL-1 β と CXCL2 産生が抑制され、その結果、肺胞腔への好中球の誘導が抑制された可能性が考えられる。

参考文献

- 1) 小田忠信, 吉田菊次郎. はちみつとチーズ読本, 朝文社, p. 9, 2013
- 2) M.I. Khalil, S.A. Sulaiman and L. Boukraa. Antioxidant, properties of honey and its role in preventing health disorder. *The Open Nutraceuticals Journal*, 3, 6–16, 2010
- 3) Mustafa Kassim, Kamaruddin Mohd Yusoff, Gracie Ong, Shamala Sekaran, Mohd Yasim Bin Md Yusof, Marzida Mansor. Gelam honey inhibits lipopolysaccharide-induced endotoxemia in rats through the induction of heme oxygenase-1 and the inhibition of cytokines, nitric oxide, and high-mobility group protein B1. *Fitoterapia*, 83, 1054–1059, 2012
- 4) 吉開泰信, 西山幸廣. レビンソン微生物学・免疫学, 丸善出版, p. 30, 43, 56, 2012
- 5) 山本雅, 仙波憲太郎. キーワードで理解するシグナル伝達イラストマップ, 羊土社, p. 171, 2004
- 6) Prakash A, Medhi B, Avti PK, Saikia UN, Pandhi P, Khanduja KL. Effect of different doses of Manuka honey in experimentally induced inflammatory bowel disease in rats. *Phytother Res*, Nov; 22(11): 1511–1519, 2008
- 7) Omotayo O. Erejuwa, Siti A. Sulaiman, Mohd S. Ab Wahab. Honey—a novel antidiabetic agent. *International Journal of Biological Sciences*, 8(6): 913–934, 2012
- 8) Saba Zuhair Hussein, Kamaruddin Mohd Yusoff, Suzana Makpol, Yasmin Anum Mohd Yusof. Gelam honey attenuates carrageenan-induced rat paw inflammation via NF-kB pathway. *PLoS ONE* 8(8): e72365, 2013
- 9) 中野昌康, 小玉正智. エンドトキシン 新しい治療・診断・検査, 講談社, p48, 238, 1996 年
- 10) 笹倉新平, 松島綱治. サイトカイン・ケモカインのすべて—基礎から最新情報まで, 日本医学館, p. 56, 83, 2004
- 11) 矢田純一. 医系免疫学, 中外医学社, p. 378, 2011
- 12) Albietz JM, Lenton LM. Standardised antibacterial Manuka honey in the management of persistent post-operative corneal oedema: a case series. *Clin Exp Optom*, Sep; 98(5): 464–472, 2015
- 13) Hiroaki Tsurumaki, Chihiro Mogi, Haruka Aoki-Saito, Masayuki Tobo, Yosuke Kamide, Masakiyo Yatomi, Koichi Sato, Kunio Dobashi, Tamotsu Ishizuka, Takeshi Hisada, Masanobu Yamada, Fumikazu Okajima. Protective role of proton-sensing TDAG8 in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 28931–28942, 2015
- 14) Mustafa Kassim, Marzida Mansor, Naze Al-Abd, Kamaruddin Mohd Yusoff. Gelam honey has a protective effect against lipopolysaccharide (LPS)-induced organ failure. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 6370–6381, 2012

Effect of Japanese honey on immune cell and Lipopolysaccharide(LPS)-induced lung inflammation

Airi YUASA

Yoshiko TANAKA

Mayuna UNO

Chika KANAMORI

Minoru TAKEUCHI

Abstract

Honey is natural product by honey bee, and it is generally used as wound healing and healthy food. It is known that LPS induces lung inflammation and infiltration of neutrophil into pulmonary alveolus. We previously reported that honey enhanced immune functions of neutrophils. However, the effect of honey on immune cell and anti-inflammatory effect of honey on lung inflammation are not fully understood. Therefore, we investigated the effect of honey on alveolar macrophage (AM) as an immune cell and anti-inflammatory effect of honey on LPS-induced lung inflammation. The expressions of IL-1 β and CXCL2 mRNA of AM were inhibited by honey treatment of 10 mg/ml concentration in vitro. Inhalation of LPS led to increase of number of broncho alveolar lavage cells and ratio of neutrophil in the lung. Number of broncho alveolar lavage cells and ratio of neutrophil were decreased in honey inhaled mice compare with LPS inhaled mice. These results suggest that honey has possibility of anti-inflammatory activity through the inhibition of the expressions of IL-1 β and CXCL2 mRNA by prevention of LPS binding to TLR4.

Keywords: Honey, Alveolar macrophage, Neutrophil, LPS-induced lung inflammation, Cytokine