モリンガ葉のスギ花粉アレルゲン誘発好酸球集積に対する抑制作用

誌名	日本食品科学工学会誌 : Nippon shokuhin kagaku kogaku kaishi = Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology
ISSN	1341027X
著者名	嶋田,貴志 岡森,万理子 深田,一剛 林,篤志 榎本,雅夫 伊藤,紀美子
発行元	日本食品科学工学会
巻/号	58巻12号
掲載ページ	p. 604-607
発行年月	2011年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

モリンガ葉のスギ花粉アレルゲン誘発好酸球集積に対する抑制作用

嶋田貴志[1*]，岡森万理子[1]，深田一剛[1]，林　篤志[1]，榎本雅夫[2]，伊藤紀美子[3]

[1] ニチニチ製薬株式会社　中央研究所
[2] NPO 日本健康増進支援機構
[3] 田嶋株式会社

Inhibitory Effect of Moringa Leaf on Cedar Pollen-induced Eosinophil Accumulation in Mice

Takashi Shimada[1*], Mariko Okamori[1], Kazutake Fukada[1], Atsushi Hayashi[1], Tadao Enomoto[2] and Kimiko Ito[3]

[1] Central Research Laboratories, Nichinichi Pharmaceutical Co., Ltd., 239-1 Tominaga, Iga, Mie 518-1417
[2] NPO Japan Health Promotion Supporting Network, TE Building, 3-68 Komatsubaradori, Wakayama, Wakayama 640-8269
[3] Tashima Co., Ltd., Tashima Building, 4-2-8 Isobedori Chuo Ward, Kobe, Hyogo 651-0084

We established an allergic model of the late phase of type I hypersensitivity reaction to cedar pollen in mice. In this model, BALB/c mice (5-week-old females) were immunized five times with cedar pollen allergen, and eosinophil accumulation in the peritoneal cavity was elicited by an intraperitoneal injection of the allergen. We investigated the effects of the leaf of *Moringa oleifera* on allergen-induced eosinophil accumulation and total IgE in serum by giving freely feeding mice a powder diet containing 0.3%, 1.0%, and 3.0% *M. odeifera* leaf powder. Compared to the control group (normal diet), the number of total leukocytes and eosinophils accumulated in the peritoneal cavity was significantly reduced in the groups given the diet containing 0.3% and 3.0% *M. oleifera* leaf powder. However, there were no differences in the number of lymphocytes, monocytes, and neutrophils between all groups. Furthermore, the serum level of total IgE was reduced in the *M. oleifera* leaf powder-treated groups. These results provide laboratory evidence that *M. oleifera* leaf powder reduces eosinophil accumulation at the site of allergic inflammation and attenuates the development of IgE-mediated allergy.

(Received Jun. 15, 2011 : Accepted Sep. 20, 2011)

Keywords : *Moringa oleifera*, eosinophils, cedar pollen-allergen, mice
キーワード : モリンガ，好酸球，スギ花粉アレルゲン，マウス

[1] 〒518-1417 三重県伊賀市富永 239-1
[2] 〒640-8269 和歌山県和歌山市小松原通 3-68
[3] 〒651-0084 兵庫県神戸市中央区磯辺通 4-2-8 田嶋ビル
* 連絡先 (Corresponding author), lab@nichinichi-phar.co.jp

近年，花粉症や喘息，アトピー性皮膚炎およびアレルギー性鼻炎などのアレルギー性炎症が増加していることが知られている．特にアレルギー性鼻炎の増加が顕著である．慢性のアレルギー性鼻炎の主症状である鼻閉は，鼻腔の炎症部位に好酸球が集積し，好酸球の遊離する細胞傷害因子やロイコトリエンなどのケミカルメディエーターが原因であることが報告されている[1]．

モリンガ（*Moringa oleifera* Lam）は，インド北部を原産としアフリカ，インド，フィリピンの亜熱帯・熱帯に自生する多年生の木本植物で，標準和名は「わさびの木」である．種子は食用油の原料や粉末にしてカレー粉の原料に用いられている．葉は β-カロチン（1 110 μg/100 g 乾燥物），ビタミンC（10 mg/100 g），カリウム（1 400 mg/100 g）および鉄（40 mg/100 g）を多く含有しており，栄養価の高い食材として利用されている．また，ポリフェノールも乾燥した葉に 2% と多く含まれている．さらに，モリンガの葉や種子の水またはエタノール抽出物には，抗酸化作用[2)3)]，血糖抑制作用[4)5)]，肝機能改善[6)]，血中コレステロール上昇抑制作用[7)]，血圧低下作用[8)]およびガンの抑制作用[9)]などの薬理効果も数多く報告されている．しかし，モリンガのアレルギーに対する有効性についての報告は少なく，いずれも種子のエタノールまたは n-ブタノールによる抽出物である[10)11)]．そこで本実験では，モリンガ葉のアレルギーに対する効果を調べるため，BALB/c 系マウスにスギ花粉アレルゲンを感作した後，腹腔内に同一アレルゲンを投与することで，腹腔内に集積した好酸球の割合を調べるⅠ型アレルギーの遅発相モデルとされている実験系[12)]を用いた．また，Ⅰ型アレルギーの即時相に関与する血清中総 immuno globulin E（IgE）量を測定した．

1.　実験方法

(1) モリンガ葉およびスギ花粉アレルゲン

フィリピンの農場で栽培されたモリンガの木より葉をつみ取り，3 日間天日乾燥した後，フードプロセッサーで粉砕してモリンガ葉の試料とした．使用時まで 4℃でデシケーターに入れて保存し，試料中の水分含量が 5% を超えないようにした．

スギ花粉アレルゲンは，三重県伊賀市周辺より採取したニホンスギ（*Cryptomeria japonica*）花粉より Yasueda らの方法で抽出および精製し，凍結乾燥した[13)]．「スギ花粉アレルゲン測定用 ELISA キット」（ニチニチ製薬社）を用いて，スギ花粉主要アレルゲンである Cry j 1 量が 59.8 ng/mg であることを確認した．また，Cry j 2 量は測定限界（1.7 ng/mg）以下であることを確認した．

(2) 実験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー社より 4 週齢の雌性 BALB/c 系マウスを購入し，1 週間の予備飼育中に体重増加が順調で健康な動物を選択し，実験に供した．動物は，温度 24.0 ±2.0℃，湿度 55.0±10.0%，照明 12 時間（7：00～19：00）

を環境条件とした動物室で，ポリカーボネイト製のケージに7匹ずつ入れて飼育した．飼料は粉末飼料（CE-2；日本クレア社）を，飲料水はフィルター（PF-filter; オルガノ社）濾過した水道水をそれぞれ自由摂取させた．

(3) 群構成とモリンガ葉の投与

予備飼育を終えたマウスを1群7匹で4群に分け，それぞれを対照群，低用量群，中用量群および高用量群とした．低用量群，中用量群および高用量群にはそれぞれ粉末飼料にモリンガ葉を0.3，1.0および3.0%（w/w）となるように混合して与えた．対照群には，粉末飼料のみを与えた．

(4) スギ花粉アレルゲン誘発好酸球の集積

Kanekoら[14]の方法に従い，スギ花粉アレルゲン誘発好酸球集積モデルを作製した．各マウスの背部皮内に生理食塩水で6mg/mLに調製したスギ花粉アレルゲンを投与1および2日目に0.1mL，投与7，9および15日目に0.2mLを注射して感作した．投与21日目に感作時と同様に調製したアレルゲンを0.2mL腹腔内に投与して惹起した．惹起24時間後に4mLの1%（v/v） fetal calf serum（FCS）含有リン酸緩衝生理食塩水で腹腔内を洗浄し，2mLを回収して腹腔浸出細胞を集めた．回収した洗浄液中の総白血球数をトリパンブルーで染色後，BURKER-TURK血球計算板（エルマ社）を用いて光学顕微鏡下で計測した．その後，サイトスピン（シャンドン社）を用いて塗末標本を作製し，メイグルンワルド-ギムザ染色後，リンパ球，単球，好酸球および好中球を光学顕微鏡下で識別して計測した．

(5) 血清中総IgE量

惹起24時間後に各マウスの眼窩静脈叢より採血し，遠心分離（3000×g，10分）で血清を分離した．得られた血清中の総IgE量をenzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）で測定した．96穴マイクロプレート（Corning社）に炭酸緩衝液（0.1mol/L，pH 9.6）で500倍希釈したpurified anti-mouse IgE（Phar Mingen社）を100μL/wellを添加した．0.05%（v/v）Poly（oxyethylene）sorbitan monolautate含有リン酸緩衝液（0.1mol/L，pH 7.2；PBS-T）で洗浄後，ブロッキングのため，10%（v/v）FCSを含むリン酸緩衝液（0.1mol/L，pH7.2；PBS-B）を200mL/well添加した．スタンダードとして（PBS-B）で調製したpurified mouse IgE（Phar Mingen社）または血清サンプルを100μL/well添加した．PBS-Tで洗浄し，二次抗体としてPBS-Bで500倍に希釈したbiotin anti-mouse IgE（Phar Mingen社）を100μL/well添加した．PBS-Tで洗浄し，PBS-Bで8000倍希釈したstreptavidin hoseradish peroxidase conjugate（Invitrogen社）を100μL/well添加して室温で30分間放置した．PBS-Tで洗浄後に基質として3,3′,5,5′-tetramethyl-benzidine（KPL社）を100μL/well添加した．10%（v/v）リン酸を50μL/well添加して反応を停止させ，マイクロプレートリーダー（コロナ電気社）で波長450nmの吸光度を測定した．スタンダードより三次多項式で検量線を作製し，サンプルのIgE濃度を算出した．

(6) 統計処理

結果は平均値±標準偏差で表した．統計ソフトはStat View（version 5.0，SAS Institute社）を用い，多群間比較はFisherのprotected least significant difference（PLSD）法で検定を行い，危険率5%未満を統計学的有意として表示した．

2. 実験結果および考察

腹腔内より回収した総白血球数および白血球に対する好酸球，好中球，リンパ球および単球の割合から算出したそれぞれの総数をTable 1に示した．総白血球数では，対照群，低用量群，中用量群および高用量群は，それぞれ8.43±2.26，6.39±1.48，9.10±1.48および6.49±1.20×10^6 cellsを示した．好酸球数では，2.30±1.19，1.35±0.58，1.98±0.79および1.16±0.27×10^6 cellsを示した．総白血球数および好酸球数ともに，対照群と比較して，低用量群および高用量群で危険率5%未満の有意な低値を示した．一方，好中球，リンパ球および単球では，各群間で有意な差は認められなかった．別途に計測した参考値ではあるが，スギ花粉アレルゲンを感作および惹起を行わないIntact群は，総白血球数および好酸球数はそれぞれ5.20±0.32×10^6 cellsおよび0.32±0.20×10^6 cellsであった．対照群と比較して，総白血球数が61.7%であったのに対し，好酸球数は16.5%と顕著に低い値であった．このことから，好酸球の集積はアレルゲンに特異的な集積であることが示された．本実験では，モリンガ葉を投与した群において，中用量群のみで

Table 1　Effect of *Moringa oleifera* Lam leaf powder on accumulation of leukocytes in mice

	Leukocytes (×10^6 cells)	Eosinophils (×10^6 cells)	Neutrophils (×10^5 cells)	Lymphocytes (×10^5 cells)	Monocytes (×10^6 cells)
Control	8.43±2.26	2.30±1.19	4.34±3.10	9.19±1.63	4.78±1.09
Low	6.39±1.48*	1.35±0.58*	2.31±1.93	8.60±2.53	3.94±0.93
Mid	9.10±1.48	1.98±0.79	6.53±6.23	10.60±1.96	5.40±1.02
High	6.49±1.20*	1.16±0.27*	2.23±0.75	9.67±2.47	4.14±0.90
Intact	5.20±0.32	0.38±0.20	–	–	–

Values are presented as mean ± SD. (n = 7).
The asterisk (*) indicates a significant difference from control group by PLSD (P < 0.05).
(–) indicates parameters not measured.

Table 2　Effect of *Moringa oleifera* Lam leaf powder on total IgE in sera

	total IgE (ng/mL)
Control	3064±1078
Low	2063±1135
Mid	2208±1113
High	*1481±735**
Intact	N.D.

Values are presented as mean±SD. ($n=7$).
The asterisk (*) indicates a significant difference from control group by PLSD ($P<0.05$).
N.D., not detected (<50 ng/mL).

有意な差が認められていないため，用量依存性が確認できなかった．その理由は，本結果からは明確にすることは出来ない．しかし，乳酸菌などによるアレルギー抑制試験では，用量依存性が認められないことも報告[15)~17)]されており，効果の弱い食品によるアレルギー抑制試験では，用量依存性は大きな課題であると考えられた．

血清中総IgE量の測定結果をTable 2に示した．対照群，低用量群，中用量群および高用量群はそれぞれ3064±1078，2063±1135，2208±1113および1481±735 ng/mLを示した．対照群と比較して高用量群は危険率5%未満で有意な低値を，低用量群および中用量群は低下傾向を示した．Intact群の血清中IgE量は測定限界（50 ng/mL）以下であったことから，血清中総IgEも好酸球の集積と同様にスギ花粉アレルゲンに特異的に産生されたと考えられた．

アレルギーの臨床症状は，Ⅰ型アレルギーの即時相および遅発相など様々なメカニズムが絡み合って各種の症状として発現する．鼻アレルギーの場合，即時相反応により，IgEが結合したマスト細胞よりヒスタミンやロイコトリエンなどを主とするケミカルメディエーターが放出され，鼻粘膜の知覚神経終末，血管の反応としてくしゃみの発作，水様性鼻汁，鼻粘膜腫脹（鼻閉）が見られる．一方，遅発相反応により，マスト細胞や2型T helper細胞で産生されるinterleukin (IL)-4, IL-5, granulocyte-macrophage colony-stimulating factorなどのサイトカインやplatelet activating factorやトロンボキサンなどのケミカルメディエーターおよびeotaxinやthymus and activation-regulated chemokineなどのケモカインによって，好酸球を中心とする炎症性細胞の浸潤が亢進し，鼻粘膜の腫脹が見られる[18)]．今回の報告において，モリンガ葉がⅠ型アレルギーの即時相の指標となる血清中IgE量と遅発相モデルである好酸球の集積に対して抑制作用を有することを示した．これらのことから，モリンガ葉がⅠ型アレルギーに分類される疾患に対して有効である可能性が示された．しかしながら，スギ花粉アレルゲン特異的IgE量，肥満細胞やヒスタミン量の測定，さらには，受動型および能動型皮膚アナフィラキシーなどの症状に対する効果を調べる必要が考えられ，作用機序や作用物質と併せて今後の検討課題となる．

モリンガは，葉，茎，種子および根のいずれも生育地である熱帯地域では一般的に食されており，その食経験は豊かで安全性も確立されていると考えられる．また，本報告の様なアレルギーを含め，報告されている様々なモリンガの効果[2)~11)]は，医薬品と比較すると弱いと言えるが，日常的に摂取できる食品で健康維持や疾患予防および症状の軽減が図れる可能性が考えられた．

3. 要　約

5週齢のBALB/c系雌マウスにスギ花粉アレルゲンを5回感作した後，腹腔内にアレルゲンを投与して好酸球を集積させるⅠ型アレルギーの遅発相モデルを作製した．このモデルに対して，モリンガ（*Moringa oleifera*）の葉を3種の混合比（0.3%，1.0%および3.0%）で混じた粉末飼料を自由摂取させ，好酸球の集積および血清中の総IgE量に対する影響を調べた．通常の飼料を与えた対照群と比較してモリンガ葉を0.3%および3.0%与えた群は，総白血球数および好酸球数で有意な低値を示した．血清中総IgE量では対照群と比較して3.0%のモリンガ葉を与えた群が有意な低値を示した．以上の結果より，モリンガ葉は経口的に摂取することでⅠ型アレルギーに対して抑制作用を有する可能性が示された．

文　献

1) Ott, N.L., Gleich, G.J., Peterson, E.A., Fujisawa, T. and Sue, S., Assessment of eosinophil and neutrophil participation in atopic dermatitis: Comparison with the IgE-mediated late-phase reaction. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **94**, 120-128 (1994).
2) Siddhuraju, P. and Becker, K., Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agro-climatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.). *J. Agric. Food Chem.*, **15**, 2144-2155 (2003).
3) Verma, A.R., Vijayakumar, M., Mathela, C.S. and Rao, C.V., *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of different fractions of *Moringa oleifera* leaves. *Food Chem. Toxicol.*, **47**, 2196-2201 (2009).
4) Jaiswal, D., Kumar, R.P., Kumar, A., Mehta, S. and Watal, G., Effect of *Moringa oleifera* Lam. leaves aqueous extract therapy on hyperglycemic rats. *J. Ethnopharmacol.*, **123**, 392-396 (2009).
5) Ndong, M., Uehara, M., Katsumata, S. and Suzuki, K., Effects of oral administration of *Moringa oleifera* Lam on glucose tolerance in Goto-Kakizaki and Wistar rats. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **40**, 229-233 (2007).
6) Hamza, A., Ameliorative effects of *Moringa oleifera* Lam seed extract on liver fibrosis in rats. *Food Chem. Toxicol.*, **23**, 345-355 (2009).
7) Ghasi, S., Nwobodo, E. and Ofili, J.O., Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam in high-fat diet fed Wistar rats. *J. Ethnopharmacol.*, **69**, 21-25 (2000).
8) Faizi, S., Siddiqui, B., Saleem, R., Saddiqui, S. and Aftab, K., Isolation and structure elucidation of new nitrile and

mastard oil glycosides from *Moringa oleifela* and their effect on blood pressure. *J. Nat. Prod.*, **57**, 1256-1261 (1994).

9) Bharali, R., Tabassum, J. and Azad, M.R., Chemomodulatory effect of *Moringa oleifera*, Lam, on hepatic carcinogen metabolising enzymes, antioxidant parameters and skin papillomagenesis in mice. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **4**, 131-139 (2003).

10) Mahajan, S.G. and Mehta, A., Inhibitory action of ethanolic extract of seeds of *Moringa oleifera* Lam. on systemic and local anaphylaxis. *J. Immunotoxicol.*, **4**, 287-294 (2007).

11) Mahajan, S. G., Banerjee, A., Chauhan, B. F., Padh, H., Nivsarkar, M. and Mehta, A., Inhibitory effect of n-butanol fraction of *Moringa oleifera* Lam. seeds on ovalbumin-induced airway inflammation in a guinea pig model of asthma. *Int. J. Toxicol.*, **28**, 519-527 (2009).

12) 吉井春夫，深田有理子，山本一彦，家後壽，末廣誠之，柳原行義，家長和治，奥平博一．ヒスタミン加マウス g-グロブリン，ノイトロピンおよびデキサメサゾンのブタクサ花粉誘発のマウス好酸球増多に対する抑制作用，薬理と治療，**26**, 147-154 (1998)

13) Yasueda, H., Yui, Y., Shimizu, T. and Shida, T., Isolation and partial characterization of the major allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **71**, 77-86 (1983).

14) Kaneko, M., Yazumichi, H., Takatsu, K. and Matsumoto, S., Role of Interleukin-5 in local accumulation of eosinophils in mouse allergic peritonitis. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **96**, 41-45 (1991).

15) Matsuzaki, T., Yamazaki, R., Hashimoto, S. and Yokokura, T., The effect of oral feeding of *Lactobacillus casei* strain Shirota on immunoglobulin E production in mice. *J. Dairy Sci.*, **81**, 48-53 (1998).

16) Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y. and Lee, Y.K., Probiotics： how should they be defined? *Trends Food Sci. Tech.*, **10**, 107-110 (1999).

17) Kondoh, M., Hayashi, A., Okamori, M., Motonaga, C., Enomoto, T., Cheng, L. and Shimada, T., Effects of *Enterococcus* sp. isolated from deep seawater on inhibition of allergic responses in mice. *Brit. J. Nutr.* **102**, 3-7 (2009).

18) 鼻アレルギー診療ガイドライン作成委員会，鼻アレルギー診療ガイドライン―通年性鼻炎と花粉症― 2009 年版（改訂第 6 版），（ライフ・サイエンス，東京），pp. 13-16 (2008).

（平成 23 年 6 月 15 日受付，平成 23 年 9 月 20 日受理）