

牛副腎髄質細胞からのカテコールアミン分泌に対する紅蔘成分の影響

工藤 賢三^{a)}, 赤坂 善昭^{a)}, 宮手 義和^{a)}, 高橋 栄司^{*a)}, 立川 英一^{b)}, 樫本 威志^{b)}^{a)}岩手医科大学歯学部内科学講座, ^{b)}岩手医科大学医学部薬理学講座

Effects of red ginseng fractions on catecholamine secretion from bovine adrenal medullary cells

Kenzo KUDO^{a)}, Yoshiaki AKASAKA^{a)}, Yoshikazu MIYATE^{a)}, Eiji TAKAHASHI^{*a)}, Eiichi TACHIKAWA^{b)} and Takeshi KASHIMOTO^{b)}^{a)}Department of Medicine, School of Dentistry, Iwate Medical University^{b)}Department of Pharmacology, School of Medicine, Iwate Medical University

(Received April 17, 1992. Accepted November 11, 1992.)

Abstract

The effects of red ginseng fractions, both total saponin and non-saponin isolated from *Panax ginseng* root, on catecholamine secretion were examined in bovine adrenal medullary cells. Acetylcholine (ACh, 50 μ M) induced the secretion of catecholamines from the cells. The total saponin fraction (40-800 μ g/ml) inhibited ACh-induced secretion in a concentration-dependent manner, but not the non-saponin fraction (1 mg/ml). The total saponin also inhibited high K⁺-induced secretion, but the inhibitory effect was much less than that of ACh-induced secretion. These results indicate that the total saponin fraction extracted from red ginseng has the inhibitory effect on catecholamine secretion from bovine adrenal medullary cells stimulated by ACh. The results further suggest that the effect is attributable to an inhibition of ACh action. This inhibition may be associated with the pharmacological effect of red ginseng in a function of autonomic nervous system.

Key words red ginseng, saponin, bovine adrenal medullary cell, catecholamine.**Abbreviations** ACh, acetylcholine; CA, catecholamine; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane-sulfonic acid; KRH, Krebs-Ringer-HEPES; KRP, Krebs-Ringer-Phosphate.

緒 言

紅蔘はオタネニンジン (*Panax ginseng* C.A. MEYER) いわゆる白蔘の根を蒸したもので、成分組成において若干、白蔘と異なることが報告されているが¹⁾、白蔘同様、自律神経失調を思わせるいろいろな愁訴(全身倦怠感、めまい、立ちくらみ、四肢冷感)を改善することが知られている²⁾。しかし、それらの作用機序については十分な科学的解明がなされておらず、不明な点が多い。

副腎髄質はカテコールアミン(CA)を分泌する内

分泌器官であり、交感神経節前線維終末から遊離したアセチルコリン(ACh)の刺激でCA分泌を生じる。したがって交感神経節に相当し、交感神経系のモデルとしてよく利用されている。

そこで著者らは、培養牛副腎髄質細胞からのCA分泌に対する紅蔘の2成分、粗サポニン画分と非サポニン画分の影響を検討した。

材料と方法

(1) 試薬: ①紅蔘成分として日韓高麗人蔘(株)より提供された粗サポニン画分と非サポニン画分を用

*〒020 盛岡市内丸19-1
Uchimar 19-1, Morioka 020, Japan

いた。②牛血清アルブミン (fraction V), コラゲナーゼ (Type I) は Sigma Chemical Co. 製, 仔牛血清およびアセチルコリンは半井製, Eagle's Minimum Essential Medium は日水製薬製を使用した。③牛副腎髄質細胞の分離用 medium には, Ca^{2+} -free Krebs-Ringer-phosphate (KRP) buffer (pH 7.4) [154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 2.2 mM CaCl_2 , 1.1 mM MgCl_2 , 0.85 mM NaH_2PO_4 , 2.15 mM Na_2HPO_4 , 10 mM glucose] を, 培養細胞からの CA 分泌実験の medium には, Krebs-Ringer-HEPES (KRH) buffer (pH 7.4) [125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 2.6 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgSO_4 , 25 mM HEPES, 5.6 mM glucose, 0.5 % 牛血清アルブミン] を使用した。

(2) 実験方法: 牛副腎髄質細胞は髄質切片をコラゲナーゼ消化することにより分離した³⁾。この分離細胞は 10 % 仔牛血清と抗生物質を添加した Eagle's Minimum Essential Medium にサスペンションし, 2×10^6 cells の濃度で植え, CO_2 -インキュベーター (95 % air/5 % CO_2) 中で 4 日間培養した³⁾。

副腎髄質細胞からの CA 分泌を調べるため, 培養細胞をそれぞれ KRH buffer と紅蓼成分を含む KRH buffer とで 37°C , 10 分間プレインキュベーションし, 次に ACh ($50 \mu\text{M}$) の存在下, それぞれ KRH buffer と紅蓼成分を含む KRH buffer で 7 分間インキュベーションした。反応は, 反応液を過塩素酸液 (最終濃度 0.4 M) に加えることにより終了させた。細胞から分泌された CA はアルミナで吸着, 精製し, エチレンジアミン縮合法により蛍光定量した⁴⁾ (励起波長 420 nm, 蛍光波長 540 nm)。

結 果

1. ACh による培養牛副腎髄質細胞からの CA 分泌に対する紅蓼成分の影響

副腎髄質細胞を $50 \mu\text{M}$ ACh で 7 分間, 37°C でインキュベーションすると細胞から全細胞内 CA 量の 23.5 % の CA 分泌が生じた (Table I)。同じ条件下で粗サポニン画分を加えインキュベーションすると ACh による細胞からの CA 分泌は抑制された。しかし, 非サポニン画分 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$ と $1 \text{ mg}/\text{ml}$) では自然分泌 (basal secretion; 1.2 %) と ACh による CA 分泌に対し何ら影響しなかった。 $40, 400 \mu\text{g}/\text{ml}$ の粗サポニン画分は ACh による CA 分泌をそれぞれ 10.4, 53.9 % 阻害した。これら濃度の粗サポニン画分は細胞からの CA の自然分泌にはまったく効果を示さなかった (Table I)。また, 細胞と $400 \mu\text{g}/\text{ml}$

Table I Effects of total saponin and non-saponin fractions on catecholamine (CA) secretion from cultured bovine adrenal medullary cells evoked by acetylcholine (ACh).

Treatment	CA secretion (% of total)
Basal	1.20 ± 0.03
Basal + Total saponin ($400 \mu\text{g}/\text{ml}$)	1.43 ± 0.21
Basal + Non-saponin ($1 \text{ mg}/\text{ml}$)	1.28 ± 0.18
ACh ($50 \mu\text{M}$)	23.48 ± 0.70
ACh ($50 \mu\text{M}$) + Total saponin ($40 \mu\text{g}/\text{ml}$)	21.16 ± 1.08
ACh ($50 \mu\text{M}$) + Total saponin ($400 \mu\text{g}/\text{ml}$)	11.48 ± 1.21
ACh ($50 \mu\text{M}$) + Non-saponin ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)	22.16 ± 1.63
ACh ($50 \mu\text{M}$) + Non-saponin ($1 \text{ mg}/\text{ml}$)	21.14 ± 1.37

The adrenal medullary cells were preincubated with or without total saponin (40 or $400 \mu\text{g}/\text{ml}$) or non-saponin ($10 \mu\text{g}$ or $1 \text{ mg}/\text{ml}$) for 10 min at 37°C and the cells then were incubated with or without total saponin or non-saponin in the presence or absence of ACh ($50 \mu\text{M}$) for 7 min at 37°C . Catecholamine in the medium were determined as described in Materials and Methods. Catecholamine secretion was shown as a percentage of total cellular catecholamine content. Results are given as the mean $\pm$ S.D. ($n=3$ experiments).

粗サポニン画分の 7 分間インキュベーション後, 細胞内 CA 量に変化は認められなかった (data not shown)。この結果は, 粗サポニン画分がこの濃度においてサポニンの一般的な性質である細胞膜障害作用を有していないことを示している。

2. 培養牛副腎髄質細胞からの CA 分泌に対する粗サポニン画分の影響

Fig. 1 は, 細胞からの CA 分泌に対する粗サポニン画分の濃度効果を示している。粗サポニン画分は用量依存性に ACh ($50 \mu\text{M}$) による細胞からの CA 分泌を抑制した。粗サポニン画分の抑制効果は $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ から認められ, $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ で 32.1 %, $800 \mu\text{g}/\text{ml}$ では 87.2 %, CA 分泌を阻害した。

粗サポニン画分の ACh による細胞からの CA 分泌抑制作用のメカニズムを調べるため, high (56 mM) K^+ 刺激による細胞からの CA 分泌に対する粗サポニン画分の影響を検討した。Fig. 1 に示すように粗サポニン画分は high K^+ による CA 分泌に対して $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ までまったく影響せず, $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ から抑制効果をあらわし, $800 \mu\text{g}/\text{ml}$ で CA 分泌を 28.5 % 阻害した。

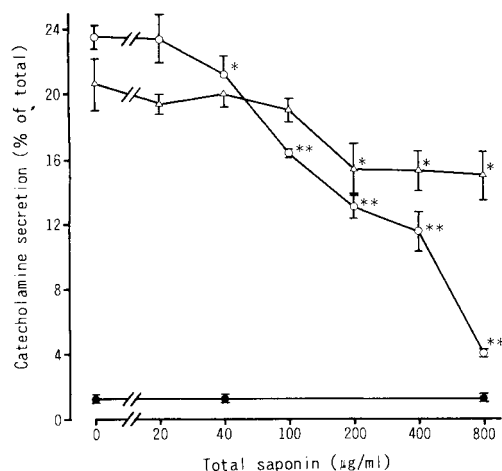


Fig. 1 Effects of different concentrations of total saponin on catecholamine secretion from the cells evoked by acetylcholine (ACh) and 56 mM K⁺. After preincubation of the cells with various concentrations of total saponin for 10 min at 37°C, the cells were incubated with various concentrations of total saponin in the absence (●) or presence (○) of ACh (50 μM), or presence (△) of 56 mM K⁺ for 7 min at 37°C. Catecholamine in the medium were determined as described in Materials and Methods. Catecholamine secretion was shown as a percentage of total cellular catecholamine content. Results are given as the mean ± S.D. (n=3 experiments). *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$, significantly different from ACh or 56 mM K⁺ induced secretion.

考 察

紅蓼の粗サポニン画分はAChによる牛副腎髄質細胞からのCA分泌を用量依存性に抑制 (Fig. 1) したが、非サポニン画分はCA分泌になんら影響しなかった (Table I)。これは紅蓼の粗サポニンが交感神経系に作用する成分であることを示唆している。

一方、電位依存性カルシウムチャンネルを直接活性化して細胞内へCa²⁺を流入させ、CA分泌をおこす high K⁺⁵⁾の刺激に対し、粗サポニン画分は低濃度 (20–100 μg/ml) でまったく効果がなく、高濃度 (200 μg/ml 以上) で抑制作用を示した。このように high K⁺のCA分泌に対する粗サポニンの抑制はAChのCA分泌に対する抑制に比べ、かなり弱いものであった (Fig. 1)。副腎髄質細胞におけるCA放出過程は、1) AChの細胞膜上ニコチン受容体への結合、2) 受容体に存在するナトリウムチャンネルの

開口と細胞内へのNa⁺流入、3) 細胞膜の脱分極、4) 電位依存性カルシウムチャンネルの開口とCa²⁺の細胞内への流入、5) 細胞内Ca²⁺濃度上昇、6) CAを含んだ顆粒の膜と細胞膜の融合、7) 開口分泌によるCA放出; である^{5,6)}したがって high K⁺を用いた結果は、AChによるCA分泌に対する粗サポニン画分の抑制が電位依存性カルシウムチャンネルを介するCa²⁺流入に直接影響したものでなく、それ以前の分泌過程に作用して生じていることを強く示唆している。たぶん、ニコチン性アセチルコリン受容体や受容体作動性ナトリウムチャンネルが粗サポニン画分の作用点であろう。

生体の自律機能の多くは、交感神経系と副交感神経系のバランス上に成立している。そのバランスがくずれると不定愁訴として現われる。したがって、今回の粗サポニン画分の副腎髄質からのCA分泌抑制は薬用人参の薬効の一つである不定愁訴改善に関係づけられるのかもしれない。

現在、精製された各種サポニン (ジンセノサイド) を用い、ACh作用抑制をおこす主成分の探索とその作用メカニズムについて、また交感神経の抑制作用と薬用人参の薬効との関係について、さらに検討を加えている。

結 論

今回、著者らはこの実験で紅蓼の粗サポニン画分がAChによる牛副腎髄質細胞からのCA分泌を抑制することを見出した。

1. 粗サポニン画分はAChによる細胞からのCA分泌を用量依存性に抑制した。

2. 非サポニン画分はCA分泌になんら影響しなかった。

3. 粗サポニン画分は high K⁺によるCA分泌にはあまり影響しなかった。

4. 以上の結果は、紅蓼成分中、粗サポニン画分がAChによる副腎髄質細胞からのCA分泌を抑制することを示しており、この作用が紅蓼の自律神経機能における薬理と関係づけられるであろう。

謝 辞

本研究に使用した人参粗サポニン画分と非サポニン画分は韓国人参煙草研究所からの提供によるものであり、同研究所ならびに日韓高麗人参 (株) に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) 北川 勲, 吉川雅之, 吉原 実, 林 輝明, 谷山登志男: 生薬修治の化学的解明 (第1報) 紅蔘 (Ginseng Radix Rubra) の含有成分その1. 薬学雑誌 **103**, 612-622, 1983.
- 2) 高橋栄司: 紅蔘の交感神経機能に対する作用. “薬用人蔘” 89 - その基礎・臨床研究の進歩 - (山村雄一, 熊谷 朗監修), 共立出版, 東京, pp.58-70, 1989.
- 3) Tachikawa, E., Takahashi, S., Furumachi, K., Kashimoto, T., Iida, A., Nagaoka, Y., Fujita, T. and Takaishi, Y.: Trichosporin - B - III, an α -aminoisobutyric acid-containing peptide, causes Ca^{2+} -dependent catecholamine secretion from adrenal medullary chromaffin cells. *Mol. pharmacol.* **40**, 790-797, 1991.
- 4) Weil-Malherbe, H. and Bone, A.D.: The chemical estimation of adrenaline-like substances in blood. *Biochem.J.* **51**, 311-318, 1952.
- 5) Wada, A., Takara, H., Izumi, F., Kobayashi, H. and Yanagihara, N.: Influx of ^{22}Na through acetylcholine receptor-associated Na channels: relationship between ^{22}Na influx, ^{45}Ca influx and secretion of catecholamines in cultured bovine adrenal medulla cells. *Neuroscience* **15**, 283-292, 1985.
- 6) Kao, L.-S. and Schneider, A.S.: Calcium mobilization and catecholamine secretion in adrenal chromaffin cells: a quin-2 fluorescence study. *J. Biol. Chem.* **261**, 4881-4888, 1986.