

Panax ginseng より抽出した粗サポニン分画および
非サポニン分画の抗体産生増強作用について

申 東桓,*^{a)} 溝口 靖紘,^{a)} 武田 弘,^{a)} 阪上 吉秀,^{a)} 小林 絢三,^{a)} 森沢 成司,^{b)} 山本 祐夫^{c)}

^{a)}大阪市立大学医学部第三内科学教室, ^{b)}大阪市立大学医学部第一生化学教室, ^{c)}大阪社会医療センター

Stimulation of antibody production by saponin
and non-saponin fractions extracted from *Panax ginseng*

Toukan SHIN,*^{a)} Yasuhiro MIZOGUCHI,^{a)} Hiroshi TAKEDA,^{a)} Yoshihide SAKAGAMI,^{a)}

Kenzo KOBAYASHI,^{a)} Seiji MORISAWA,^{b)} and Sukeo YAMAMOTO^{c)}

^{a)}The Third Department of Internal Medicine, Osaka City University Medical School

^{b)}The First Department of Biochemistry, Osaka City University Medical School

^{c)}Osaka Socio-Medical Center

(Received February 24, 1988. Accepted March 10, 1988.)

Abstract

Total saponin and non-saponin fractions prepared from extract of *Panax ginseng* root were given orally to mice, and their effects on antibody formation and on responses of spleen lymphocytes to mitogenic stimulations were examined. Although antibody responses to sheep red blood cells (SRBC) were augmented significantly by both saponin and non-saponin fractions, the effect of non-saponin fraction was more remarkable than that of saponin fraction. The responses of spleen lymphocytes to T cell mitogen such as PHA or Con A were shown to be unaffected by both saponin and non-saponin fractions. A marked suppression of IgM response to SRBC induced by the intraperitoneal injection of carrageenan, a sulfate polygalactose having macrophage toxic properties was improved by oral administration of total saponin, but this was not the case in non-saponin fraction.

Key words *Panax ginseng*, saponin fraction, non-saponin fraction, antibody formation, carrageenan

Abbreviations PHA, phytohemagglutinin; Con A, concanavalin A; PWM, pokeweed mitogen; SRBC, sheep red blood cell

緒 言

Panax ginseng は種々の生理活性を示す物質を含み, その抽出物および人參サポニンは多様な疾患の治療に用いられている。*Panax ginseng* の抽出物または粗サポニン分画の免疫系に対する作用についても, 二, 三検討されており, ヒトの末梢血単核細胞を用いる *in vitro* の実験系では, インターフェロンの誘導活性があり, natural killer(NK) 細胞の活性を増強し, antibody-dependent cell-mediated

cytotoxicity(ADCC) の effector 活性を高めることが示唆されている¹⁾。また, ginseng extract を経口的にマウスに投与すると, ヒツジ赤血球に対する抗体産生が増強され, Senliki forest virus 抗体に対する細胞性免疫が高まり, NK 細胞活性が亢進することが報告されている²⁾。

これらの免疫系に対する *Panax ginseng* の作用は主としてその抽出液または粗サポニン分画を用いて行なわれており^{3,4)} 非サポニン分画の免疫系に対する作用についてはほとんど検討されていない。

著者らは *Panax ginseng* の抽出物から粗サポニ

*〒 545 大阪市阿倍野区旭町 1-5-7
Asahi-macni, Abeno-ku, Osaka 545, Japan

ン分画と非サポニン分画を分取し、それぞれの分画をマウスに経口投与して、脾細胞におけるヒツジ赤血球に対する抗体産生、mitogen 刺激に対する応答能に及ぼす両分画の影響を検討した。また、マクロファージに摂取されてその機能を減弱させることが明らかにされているカラゲナンをマウスに投与して抗体産生の抑制を誘導し⁵⁾、Panax ginseng の粗サポニン分画および非サポニン分画の影響をしらべた。

材料と方法

(1) Panax ginseng 抽出物の分画：韓国産紅蔘 (Panax ginseng C. A. MEYER 6 年根) から抽出された粉末を日韓高麗人蔘株式会社から提供をうけて分画に用いた。すなわち、粉末を 4℃で蒸留水を用いて抽出した後、その抽出液を凍結乾燥し、これに同量の蒸留水を加えて溶解させた。ついで、Amberlight XAD-II (オルガノ社) カラムに吸着させ、蒸留水でカラムを洗浄した後、20%メタノールおよび100%メタノールでカラムから非サポニン分画および粗サポニン分画をそれぞれ溶出し、前者は 40℃、後者は 60℃で減圧濃縮した後、凍結乾燥を行った。

なお、各分画におけるサポニンの有無は、シリカゲル (60 F 254) を用いる薄層クロマトグラフィーにかけ、クロロホルム-メタノール-水の 65:35:10 溶液の下層を用いて展開して確認した。その結果、非サポニン分画にはサポニンが含まれていないことが確認された。

(2) 抗体産生に及ぼす粗サポニン分画および非サポニン分画の影響：前項のようにして Panax ginseng 抽出物から分画した粗サポニン分画および非サポニン分画をそれぞれ生理的食塩水に 10 mg/ml となるように溶解し、その 0.2 ml を 6 週齢の雄性 C57BL/6 マウスに胃ゾンデで連日 1 回経口投与した。なお、対照としては生理的食塩水 (0.2 ml) を同様にしてマウスに経口的に投与した。粗サポニン分画または非サポニン分画を投与し始めてから 3 日目に 3×10^8 個のヒツジ赤血球 (SRBC) を腹腔内に投与し、4 日後に滅菌後に脾臓を抽出して脾単核細胞浮遊液を調整した。すなわち、脾臓を Hanks 液中で細切して細胞を遊離させた後、Ficoll-Conray 重層遠心法によって単核細胞を分離し、Hanks 液で 3 回洗浄後、10%ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 培養液に 2×10^6 cells/ml となるように浮遊した。これに pokeweed mitogen (P-L Biochemical, Inc.) を 50 μ g/ml となるように添加し、

5%CO₂ 細胞培養装置内で 37℃にて 72 時間培養した。培養後、誘導された抗 SRBC 抗体産生細胞の数を Jerne ら⁶⁾の方法に準じて溶血プラーク法で計測した。すなわち、シャーレにアガロース 200 μ l モルモット血清および 10% SRBC 浮遊液をそれぞれ 20 μ l ずつ添加し、さらに 25 μ l の脾単核細胞浮遊液を加えて 5%CO₂ 大気下で 37℃ 3 時間培養した。培養後、形成された溶血斑の数を数え、脾単核細胞 1×10^6 個あたりのプラーク形成細胞数を算定して抗体産生の指標とした。

(3) Mitogen 刺激に対する応答能に及ぼす粗サポニン分画および非サポニン分画の影響：C57BL/6 マウスに前述と同様にして粗サポニン分画または非サポニン分画を毎日 1 回 5 日間経口投与し、脾単核細胞浮遊液を、 1×10^6 cells/ml で調整した。この細胞浮遊液に phytohemagglutinin-P (PHA, DIFCO Laboratories) または concanavalin A (Con A, Sigma) をそれぞれ 10 μ g/ml となるように添加し、PHA 添加時には 48 時間、Con A 添加時には 72 時間、前述と同様にして 5%CO₂ 大気下、37℃の培養装置内で培養した。その後、各培養細胞浮遊液に 1 μ Ci/ml の ³H-thymidine を加えて、それぞれ 24 時間培養し細胞をミリポアフィルター上に集め、5%トリクロール酢酸で洗浄し、フィルター上の酸不溶性分画の放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測した。なお、対照としては、mitogen を添加しないで同様にして得られた放射活性を用いた。Mitogen 刺激に対する応答能は次のように Stimulation index を算定した。

$$\text{Stimulation index (S.I.)} = \frac{\text{mitogen 添加時とりこまれた放射活性 (cpm)}}{\text{mitogen 非添加時とりこまれた放射活性 (cpm)}}$$

(4) カラゲナン投与による抗体産生の抑制に及ぼす粗サポニン分画および非サポニン分画の影響：カラゲナン処理による抗体産生の抑制は石坂ら⁵⁾の方法に準じて誘導した。すなわち、滅菌した γ -カラゲナン (DIFCO Laboratories) を生理的食塩水に 1 mg/ml となるように溶解し、その 1 ml を C57BL/6 マウスの腹腔内に注入した。ついで 6 時間後に SRBC 3×10^8 cells を腹腔内に投与してマウスを免疫し、3 日後に再び 1 mg のカラゲナンを腹腔内に投与した。2 度目のカラゲナン投与 24 時間後にマウスを屠殺し、脾単核細胞を分離調整して前述と同様にして抗 SRBC 抗体産生細胞数を溶血プラーク法で測定した。なお、粗サポニン分画および非サポニン分画の投与は、前述したように、SRBC 感作 3 日前より開始して、それらの影響を検討した。

結 果

1. 抗 SRBC 抗体産生に及ぼす粗サポニン分画および非サポニン分画の影響

C57BL/6 マウスに粗サポニン分画または非サポニン分画を連日 2 mg/kg 経口投与し、その 3 日目に SRBC を腹腔内投与して感作した。その 4 日後に脾単核細胞を採取し、PWM によって抗体産生を増幅した後、抗 SRBC 抗体産生細胞の誘導を測定した。その結果、Fig. 1 に示すように、抗 SRBC 抗体産生は粗サポニン分画および非サポニン分画の投与によって、いずれも有意に増強された。しかも、粗サポニン分画投与マウスより非サポニン分画投与マウスの方が抗 SRBC 抗体産生細胞の誘導は有意に強かった。

2. Mitogen 刺激に対する応答能

粗サポニン分画または非サポニン分画を 5 日間連

続経口投与したマウスから脾単核細胞を分離して *in vitro* で PHA または Con A で刺激した。これらの刺激に対するリンパ球の応答を ^3H -thymidine の取り込みで評価すると、Fig. 2 および Fig. 3 に示すように、PHA または Con A 刺激に対するリンパ球応答はいずれも粗サポニン分画によって増強される傾向が認められたが、粗サポニン分画を投与しない対照群との間に有意の差は認められなかった。また、非サポニン分画を投与したマウスから分離した脾単核細胞の PHA または Con A 刺激に対する応答も対照マウスとの間に有意差を認めなかった。

3. カラゲナンによって誘導した抗体産生抑制に及ぼす粗サポニン分画および非サポニン分画の影響

抗原として SRBC をマウスに投与する 6 時間前および 3 日後にカラゲナンを腹腔内に注入すると、カラゲナンを投与しない対照群に比較して、誘導される抗 SRBC プラーク形成細胞の数は約 60% に低下した (Fig. 4)。また、粗サポニン分画または非

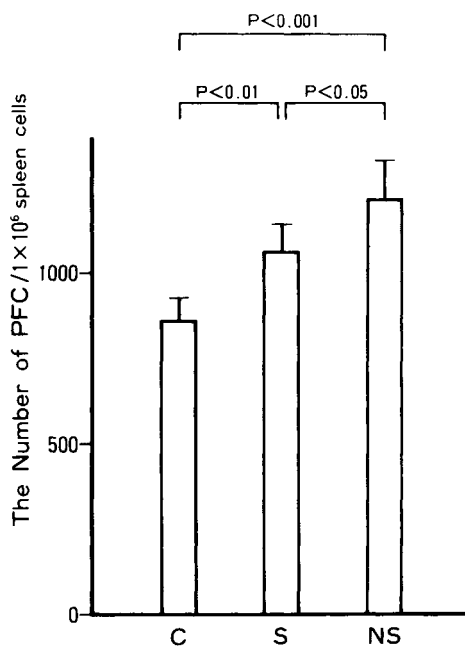


Fig. 1 The effects of saponin and non-saponin fractions on antibody responses to SRBC in mice.

C: control group which was not given any *Panax ginseng* extract (n=5), S: administered group with saponin fraction (n=5), NS: administered group with non-saponin fraction (n=5).

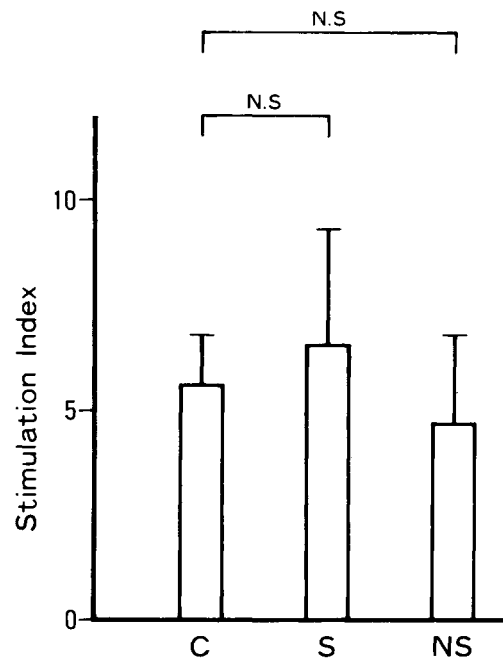


Fig. 2 The effects of saponin and non-saponin fraction on responsiveness of spleen lymphocyte to PHA-P stimulation.

C: control group which was not given any *Panax ginseng* extract (n=5), S: administered group with saponin fraction (n=5), NS: administered group with non-saponin fraction (n=5).

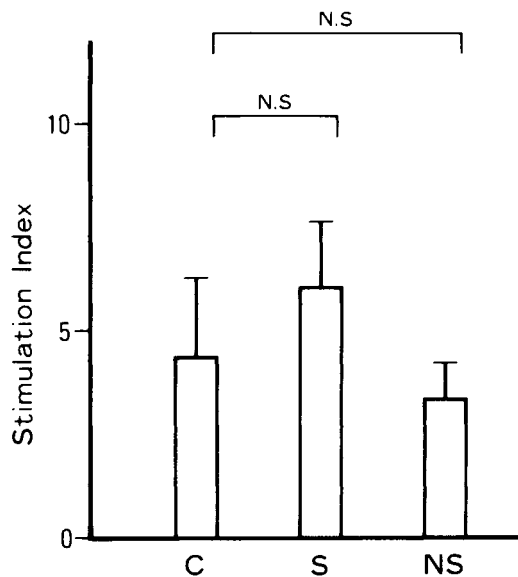


Fig. 3 The effects of saponin and non-saponin fraction on responsiveness of spleen lymphocyte to Con A stimulation.

C : control group which was not given any *Panax ginseng* extract (n=5), S : administered group with saponin fraction (n=5), NS : administered group with non-saponin fraction (n=5).

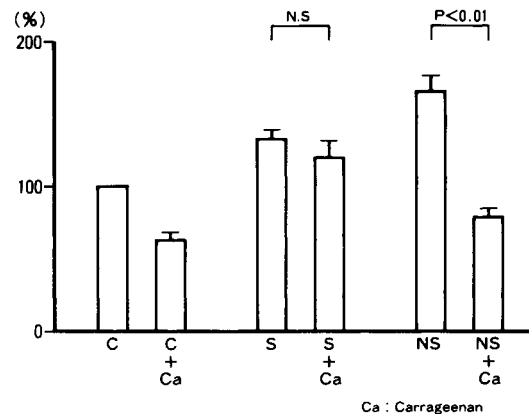


Fig. 4 The impairment of antibody formation induced by treatment with carrageenan and the effect of saponin or non-saponin fractions.

C : control which was sensitized by SRBC (n=5), C+Ca : control which was injected with carrageenan (n=5), S : saponin fraction was given and sensitized with SRBC (n=5), S+Ca : saponin fraction and carrageenan-treated (n=5), NS : non-saponin fraction was given and sensitized with SRBC (n=5), NS+Ca : non-saponin fraction and carrageenan-treated (n=5).

サポニン分画を前もって7日間マウスに投与し、カラゲナンによる抗SRBC抗体産生の抑制に対する影響を検討した。その結果、Fig. 4に示すように、粗サポニン分画を投与したマウスにおいては、カラゲナンによる抗体産生の抑制が観察されず、粗サポニン分画がカラゲナンによる抗体産生の抑制を軽減することが示唆された。これに対して、非サポニン分画を投与したマウスにおいては、カラゲナンによる抗体産生の抑制が著明であり、非サポニン分画にはカラゲナンによる抗体産生の抑制を改善する作用はないと推測された。

考 察

Panax ginseng の抽出物およびサポニンには種々の薬理学的作用が認められ、*Panax ginseng* は多くの和漢薬方剤に広く配合されて臨床的に使用されている。しかし、*Panax ginseng* の免疫系に対する作用の研究は少なく、また、その有効成分および作用機構の研究も十分ではない。Yeung⁴⁾ は *Panax ginseng* から抽出分離したサポニン分画をマウスに投

与して cytotoxic T 細胞、NK 細胞およびウィルスまたは SRBC に対する遅延型過敏反応の誘導に対するサポニンの作用を検討している。その結果、サポニンは前二者に影響を与えるが、感作に先立って投与すると、遅延型過敏反応が抑制されることを観察している。また、Singh ら²⁾ は *Panax ginseng* の抽出物をマウスに投与すると、SRBC に対する抗体産生、ウィルス抗原に対する細胞性免疫および NK 細胞活性が増強されることを報告している。さらに、Mita ら³⁾ は、ginsenoside-Rb, -Rc などの精製サポニンをマウスに静注すると、SRBC に対する抗体産生が増強されるが、ginsenoside-Rd などは逆に抗体産生を抑制することを示している。

著者らは *Panax ginseng* の免疫系への作用を検討する一環として、まず、*Panax ginseng* の抽出物から粗サポニン分画と非サポニン分画を分離してマウスに経口的に投与し、脾細胞を用いて SRBC に対する抗体産生および cell mitogen に対する応答に及ぼす影響を調べた。Mitogen のリンパ球幼若化の最大反応に対する両分画の影響を見るために、PHA では時間培養、Con A では96時間培養での反

応を検討した。その結果, mitogen に対するリンパ球の応答には有意な影響が認められなかったが, 粗サポニン分画および非サポニン分画はいずれも SRBC に対する抗体産生を増強し, その程度は前者より後者に著明であった。また, カラゲナン投与によって誘導される抗体産生の抑制は, 粗サポニン分画の前投与によって軽減された。しかし, 同様の効果は非サポニン分画投与によっては観察されなかった。カラゲナンは長鎖脂質をもつ高分子の硫酸ポリガラクトースであり, マクロファージによって容易に摂取されてリソゾームに入り, リソゾームを破壊して加水分解酵素を遊離させマクロファージを傷害する。

Ishizaka ら⁵⁾ はカラゲナン投与によって, マウスの依存性抗原に対する抗体産生が著明に抑制されることを明らかにしている。カラゲナン投与によって誘導される抗体産生の抑制が *Panax ginseng* より分離した粗サポニン分画で軽減されるという事実は, 粗サポニンが何らかの機構で B 細胞を活性化するか, またはカラゲナンによるマクロファージの傷害を軽減するためと考えられる。しかし, その詳細な機構は今後の解析が必要と思われる。また, カラゲナンによる抗体産生の抑制が非サポニン分画によっては改善されないことは, 粗サポニン分画と非サポニン分画の免疫系に対する作用機構が異なること

を示唆した。

以上より *Panax ginseng* 抽出物すなわち粗サポニン分画および非サポニン分画に含まれる抗体産生増強物質を, それぞれ分離同定して, その作用機構を明らかにすることが必要である。

文 献

- 1) Gupta, S., Agarwal, S.S., Epstein, L.B., Fernandes, G. and Good, R.A. : *Panax*-a new mitogen and interferon inducer. *Clinical Res.* 28, 504A, 1980
- 2) Singh, V.K., Agarwal, S.S. and Gupta, B.M. : Immunomodulatory activity of *Panax Ginseng* extract. *Proc. 4th International Ginseng Symp.*, 225-232, 1984
- 3) Mita, A., Shida, R., Kasai, N. and Shoji, J. : Enhancement and suppression in production of IgM-antibody in mice treated with purified saponins. *Biomedicine* 31, 223-227, 1979
- 4) Yeung, H.W. : Effect of Ginseng on the immune responses to influenza virus infection in mice. *Proc. 3rd International Ginseng Symp.*, 245-249, 1980
- 5) Ishizaka, S., Otani, S. and Morisawa, S. : Effects of carrageenan on immune responses I. Studies on the macrophage dependency of various antigens after treatment with carrageenan. *J. Immunol.* 118, 1213-1218, 1977