

Panax ginseng より抽出した粗サポニン分画および
非サポニン分画の催胆汁うっ滞因子活性に及ぼす影響

阪上 千博^{a)} 溝口 靖紘^{*a)} 市川 裕三^{a)} 河田 則文^{a)} 森沢 成司^{b)}

^{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

Effect of saponin and non-saponin fractions extracted from
Panax ginseng on the cholestatic factor activity

Chihiro SAKAGAMI^{a)} Yasuhiro MIZOGUCHI^{*a)} Yuzo ICHIKAWA^{a)} Norifumi KAWADA^{a)} and Seiji MORISAWA^{b)}

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

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

(Received July 6, 1990. Accepted November 8, 1990.)

Abstract

The effect of saponin and non-saponin fractions extracted from *Panax ginseng* on bile flow were investigated using a cholestatic factor, a kind of lymphokine which induced the intrahepatic cholestasis. As a result, it was found that bile flow was not affected with saponin fraction or non-saponin fraction, administered into the duodenum of normal rats. However, saponin fraction significantly blocked the reduction of bile flow induced by the cholestatic factor, while no effect was observed with non-saponin fraction.

Key words cholestatic factor, *Panax ginseng*, saponin fraction, non-saponin fraction, intrahepatic cholestasis.

Abbreviation PPD, purified protein derivative.

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参サポニンは多様な疾患の治療に用いられている。¹⁻⁵⁾ 最近では人参による慢性肝炎への治療が試みられるようになり、血清トランスアミナーゼの改善が認められている。^{6,7)} *Panax ginseng* の抽出物または粗サポニン分画の肝細胞障害に対する作用については、二、三検討されており、四塩化炭素やチオアセトアミドによる急性肝障害、さらに急性アルコール性肝障害に対し組織学的にも生化学的にも改善することが示唆されている。⁸⁻¹⁰⁾ 著者らも免疫学的に誘導した肝細胞障害を著明に改善することを報告した。¹¹⁾ しかし、*Panax ginseng* が肝内胆汁うっ滞に及ぼす影響についてはほとんど検討されていない。

一方、著者らは薬物アレルギー性肝炎やウイルス

性肝炎において、しばしば観察される急性肝内胆汁うっ滞が一種のリンホカインである催胆汁うっ滞因子 (cholestatic factor) によって誘導されることを明らかにした。¹²⁻¹⁴⁾ この催胆汁うっ滞因子の存在は最初、肝細胞障害が軽度にもかかわらず、肝内胆汁うっ滞が著明である薬物アレルギー性肝炎において認められた。その後、本因子は結核患者の末梢血リンパ球を精製ツベルクリン (purified protein derivative, PPD) で刺激することによっても、形成されることが見出され、¹⁵⁾ 催胆汁うっ滞因子の精製、性状および作用機構の研究が飛躍的に進歩をとげた。¹⁶⁻¹⁸⁾

そこで、著者らは *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取し、それぞれの分画が催胆汁うっ滞因子活性に対してどのような影響を及ぼすかについて検討した。

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

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、凍結乾燥を行なった。なお、各分画におけるサポニンの有無は、シリカゲル (60F254) 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) 部分精製ヒト催胆汁うっ滞因子の作製：ヒト催胆汁うっ滞因子は既報¹⁷⁾の方法に従って、作製した。すなわち、ツベルクリン反応強陽性のヒト末梢血単核細胞浮遊液 (1×10^6 cells/ml) に PPD ($10 \mu\text{g/ml}$) を添加して 37℃ で 48 時間培養した。培養後、遠心によって催胆汁うっ滞因子を含む細胞培養上清を分離し、以下の方法で催胆汁うっ滞因子の部分精製を行なった。すなわち、前述の催胆汁うっ滞因子を含む細胞培養上清を 0.01 M pH 8.1 のリン酸緩衝液に対して十分に透析した後、DEAE-セルロース (DE 52, Whatman 社製) を充填したカラムに注ぎ、Fig. 1 に示すようにリン酸緩衝液の濃度および pH を E1 から E2 まで順次変えてカラムを溶出し、溶出物を 6 つの分画に分離した。この 6 つの分画についてそれぞれ、既報の方法¹⁴⁻¹⁷⁾に従って、催胆汁うっ滞因子活性を測定し、催胆汁うっ滞因子の含まれる第 3 分画を部分精製催胆汁うっ滞因子として以後の実験に供した。

(3) *Panax ginseng* 抽出物の粗サポニン分画および非サポニン分画の胆汁流量に及ぼす影響：体重 250–350 g の雄性 Wistar 系ラットの腹腔内にペントバルビタール (30 mg/kg 体重) を注入して麻酔し、開腹して総胆管にポリエチレンチューブ (PE 10, Clay Adams 社製) を注入して胆汁を体外に誘導した。カニキュレーション後 60 分間、胆汁を自然流出させてその量を測定し、ついで前述の部分精製催胆汁うっ滞因子 ($10 \mu\text{g}$ protein/ml) 1 ml を腸間膜静

脈より緩やかに注入した。注入後、1 時間毎に胆汁を集め、その量を測定して単位時間当りの胆汁流量として胆汁うっ滞活性を計測した。なお、*Panax ginseng* の粗サポニン分画および非サポニン分画の催胆汁うっ滞因子活性 (胆汁流量低下作用) に対する影響を検討するために催胆汁うっ滞因子と同時投

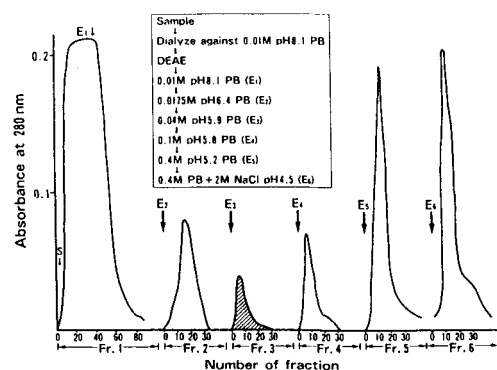


Fig. 1 Elution pattern of cholestatic factor by DEAE column chromatography.

Cholestatic factor activity was found in fraction 3.

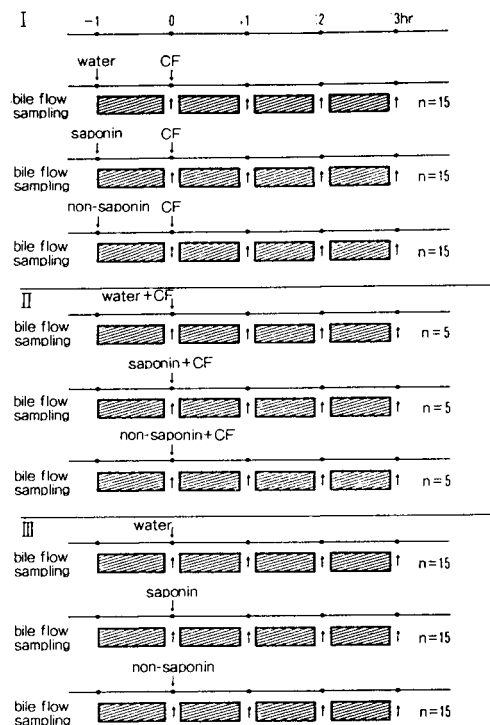


Fig. 2 Experimental schedule.
CF: cholestatic factor.

与または投与1時間前に粗サポニン分画または非サポニン分画を十二指腸内に注入し、胆汁うっ滞活性を計測した。なお、粗サポニン分画および非サポニン分画の投与量は既報¹⁹⁾のごとく20 mg/kg 体重とした。また、コントロール群として粗サポニン分画または非サポニン分画のかわりに蒸留水を1 ml 十二指腸内に注入した。

さらに、粗サポニン分画また非サポニン分画を単独に投与して、胆汁流量に及ぼす影響についても検討した。

Fig. 1 は以上の実験方法を模式図にしたものである。

(4) 統計学的検討：実験データはすべて mean $\pm$ S.E. で表わし、統計処理は *t*-検定を用いて行なった。

結 果

1. *Panax ginseng* 抽出物の粗サポニン分画および非サポニン分画の催胆汁うっ滞因子に及ぼす影響

サポニン分画、非サポニン分画または蒸留水をラットの十二指腸に注入し、60分後の胆汁流量を測定すると 1.52 ± 0.32 ml ($100.0 \pm 21.1\%$), サポニン分画投与群15匹, 非サポニン分画投与群15匹, 蒸留水投与群15匹, 計45匹) であった。

次に、サポニン分画、非サポニン分画または蒸留水を投与した1時間後に催胆汁うっ滞因子を腸間膜静脈に投与し、経時的に胆汁流量を測定した。その結果、Fig. 3 に示すように蒸留水投与群に催胆汁うっ滞因子を投与すると、0-1時間の胆汁流量は 1.09 ± 0.12 ml ($71.7 \pm 11.0\%$), 1-2時間の胆汁流量は 0.91 ± 0.10 ml ($59.9 \pm 11.0\%$), 2-3時間の胆汁流量は 0.73 ± 0.11 ml ($48.0 \pm 15.1\%$) となり、催胆汁うっ滞因子投与前に比して胆汁流量は著明に減少した。しかし、粗サポニン分画投与群に催胆汁うっ滞因子を投与すると、0-1時間の胆汁流量は 1.41 ± 0.16 ml ($92.8 \pm 11.3\%$), 1-2時間の胆汁流量は 1.28 ± 0.18 ml ($84.2 \pm 14.1\%$), 2-3時間の胆汁流量は 1.14 ± 0.08 ml ($75.0 \pm 7.0\%$) となり、催胆汁うっ滞因子による胆汁流量の減少は著明に抑制された ($p < 0.01$, Fig. 3)。

一方、非サポニン分画投与群に催胆汁うっ滞因子を投与しても、蒸留水投与群に催胆汁うっ滞因子を投与した群と差を認めなかった。すなわち、非サポニン分画は催胆汁うっ滞因子による胆汁流量の減少には影響を及ぼさなかった。

なお、催胆汁うっ滞因子と同時に粗サポニン分画

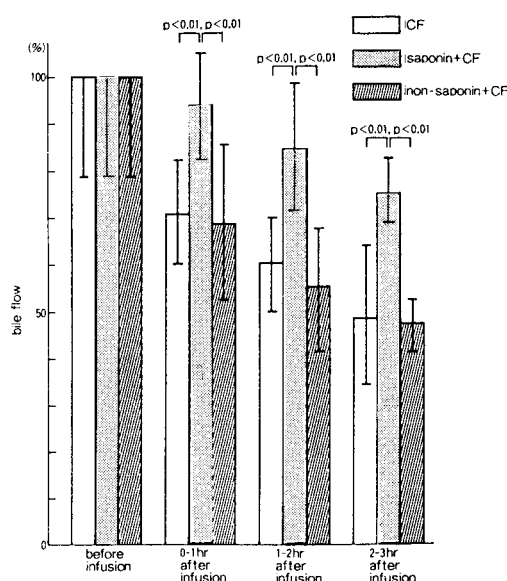


Fig. 3 Effects of saponin and non-saponin fractions extracted from *Panax ginseng* on reduction of bile flow by cholestatic factor.

Cholestatic factor was injected in rats at 1 hour after administration of saponin or non-saponin fractions, and the bile was collected for 1 hour before injection and for 1 hour periods after injection. Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 15 rats. CF: cholestatic factor.

を投与し、経時的に胆汁流量を測定しても催胆汁うっ滞因子による胆汁流量の減少には、Fig. 4 に示すようにほとんど影響を及ぼさなかった (蒸留水と催胆汁うっ滞因子投与群5匹, 粗サポニンと催胆汁うっ滞因子投与群5匹, 非サポニンと催胆汁うっ滞因子投与群5匹)。

2. *Panax ginseng* 抽出物の粗サポニン分画および非サポニン分画の胆汁流量に及ぼす影響

Panax ginseng 抽出物の粗サポニン分画または非サポニン分画をラットの十二指腸に単独で投与して、経時的に胆汁流量を測定した。なお、コントロール群として蒸留水を投与した。その結果、Fig. 5 に示すように粗サポニン分画または非サポニン分画を投与しても、胆汁流量はコントロール群に比してほとんど変化しなかった (粗サポニン分画投与群15匹, サポニン分画投与群15匹, 蒸留水投与群15匹)。

すなわち、*Panax ginseng* 抽出物の粗サポニン分画はそれ自身では利胆作用はなく、催胆汁うっ滞による胆汁流量の減少に対して抑制を示した。

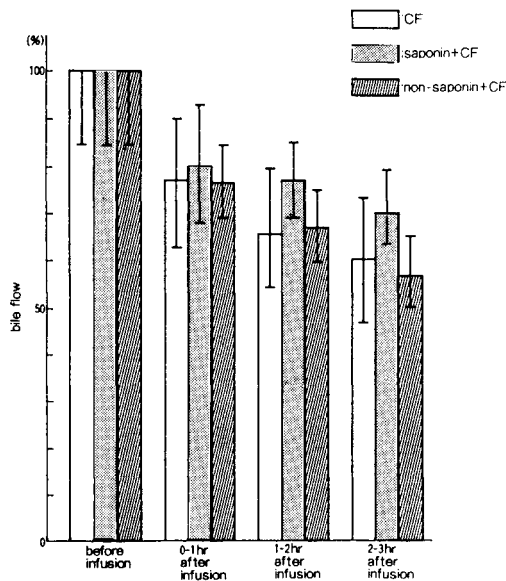


Fig. 4 Effects of saponin and non-saponin fractions extracted from *Panax ginseng* on reduction of bile flow by cholestatic factor.

Cholestatic factor was injected in rats administration with saponin or non-saponin fractions, and the bile was collected for 1 hour before injection and for 1 hour periods after injection. Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 5 rats. CF: cholestatic factor.

考 察

Panax ginseng は四塩化炭素やチオアセトアミドによる急性肝細胞障害に対し血清トランスアミナーゼの低下作用, 組織学的には肝細胞索の乱れ, 肝実質細胞の腫脹, 空胞化, 中心静脈うっ血, 壊死などを改善することが報告されている。^{8,10)} さらに, 急性アルコール性肝障害に対しても組織学的に改善し, 生化学的分析によりアルコール投与によって惹起される肝細胞内蛋白の減少や脂肪, グリコーゲン量の増加を抑制し, さらにアルコール脱水素酵素の活性を増加することが示唆されている。⁹⁾

また, 著者らはマクロファージ系細胞を肝に動員し, 活性化することにより肝細胞障害が誘導されることを明らかにし,²⁰⁾ この肝細胞障害に, 活性化マクロファージあるいは活性化Kupffer細胞から産生される肝細胞障害因子が関与することを示した。²¹⁾ この肝細胞障害に対し, *Panax ginseng* は cytoprotection に作用することを認めた。¹¹⁾ しかしながら,

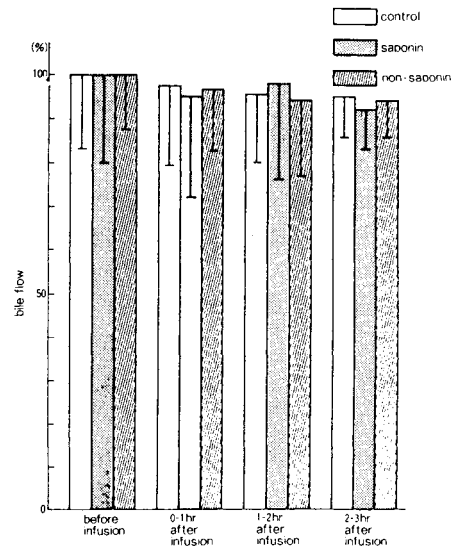


Fig. 5 Effects of saponin and non-saponin fractions extracted from *Panax ginseng* on bile flow.

Saponin or non-saponin fraction was administered to rats, and the bile was collected for 1 hour before administration and for 1 hour periods after administration. Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 15 rats.

肝内胆汁うっ滞に対し, *Panax ginseng* の作用についてはほとんど明らかにされていない。

さて, 著者らは, 肝内胆汁うっ滞が一種のリンホカインで誘導されることを明らかにした。¹²⁻¹⁴⁾ このリンホカインは催胆汁うっ滞因子と命名され, 現在では薬物アレルギー性肝炎やウイルス性肝炎以外にもアルコール性肝炎, 自己免疫性肝炎における肝内胆汁うっ滞の誘導にも関与することが示唆されている。^{16,18)} この催胆汁うっ滞因子は, 胆汁酸依存性および非依存性の胆汁排泄を抑制し, 主として毛細管胆汁の形成を抑制することが明らかにされている。²²⁾ また, ¹²⁵I 標識 IgA および ¹²⁵I 標識 insulin を用いた実験から vesicular transport system による胆汁分泌も抑制することが示されている。²³⁾ さらに, コルヒチンを用いた実験から, microfilament に作用することが示唆されている。²⁴⁾ しかし, ¹⁴C-sucrose を用いた実験から, 催胆汁うっ滞因子は tight junction の透過性には影響を与えないことが示されている。²⁵⁾

そこで, このような作用機構を有する催胆汁うっ滞因子に対し *Panax ginseng* がどのように作用す

るかを検討することによって、肝内胆汁うっ滞に対する *Panax ginseng* の効果を解析した。その結果、*Panax ginseng* の粗サポニン分画は Fig. 2 に示すように、催胆汁うっ滞因子の有する胆汁流量低下作用に対して抑制的に作用した。しかし非サポニン分画は催胆汁うっ滞因子に対しては影響を及ぼさなかった。

以上より、*Panax ginseng* は催胆汁うっ滞因子の作用に対して抑制的に作用し、その有効成分は粗サポニン分画に含まれていることが示唆された。

既に *Panax ginseng* は肝細胞障害に対して保護的に作用することが知られており^{8, 11)} 今回の実験結果により肝内胆汁うっ滞に対しても有効であることが示唆された。従って、*Panax ginseng* は肝内胆汁うっ滞を伴う慢性肝疾患の治療に有用である可能性が示唆された。

文 献

- 1) 山本昌弘：人参の代謝内分泌作用と臨床，“薬用人参—その研究と進歩”（大浦彦吉，熊谷 朗，柴田承二，高木敬次郎編），共立出版株式会社，東京，pp. 231-246, 1981.
- 2) 山本昌弘：代謝疾患と人参サポニン—高脂質血症を中心に，“薬用人参'85—その基礎・臨床医学研究”（熊谷 朗，大浦彦吉，奥田拓道編），共立出版株式会社，東京，pp. 174-193, 1985.
- 3) 加藤弘己，矢野三郎：糖尿病患者に対する有用性，“薬用人参'89—その基礎・臨床研究の進歩”（山村雄一，熊谷朗監修），共立出版株式会社，東京，pp. 96-107, 1989.
- 4) 高野健太郎，山口武典，原 齋，尾前照雄：脳血管障害後遺症と紅参，“薬用人参'89—その基礎・臨床研究の進歩”（山村雄一，熊谷 朗監修），共立出版株式会社，東京，pp. 131-139, 1989.
- 5) 仲田三平，山本純己：リウマチ性疾患の末梢循環障害に対する人参の作用，“薬用人参'89—その基礎・臨床研究の進歩”（山村雄一，熊谷 朗監修），共立出版株式会社，東京，pp. 140-147, 1989.
- 6) 木岡清英，溝口靖紘，市川裕三，森沢成司：慢性肝炎の小柴胡湯による治療に対するコウジン末増量の効果，第5回薬用人参研究会講演要旨集，p. 25, 1990.
- 7) 山本昌弘：慢性肝炎に対する小柴胡湯並びに正官庄コウジン末併用の効果，第5回薬用人参研究会講演要旨集，p. 26, 1990.
- 8) Dug, R.H.: Pharmacobiological action of Ginsenoside Rb₁, Rg₁, and Re. Proceedings of the 2nd International Ginseng Symposium, pp. 135-140, 1978.
- 9) Chung, N.J.: The preventive effect of the saponin fraction of *Panax ginseng* C.A. Meyer against ethanol intoxication of rat liver. Proceedings of the 4th International Ginseng Symposium, pp. 63-74, 1984.
- 10) ヒキノヒロシ：生薬の肝障害抑制作用，薬学雑誌 **105**, 109-118, 1985.
- 11) 溝口靖紘，申 東恒，森沢成司：肝細胞障害および急性肝不全モデルに及ぼす人参の影響，“薬用人参'89—その基礎・臨床研究の進歩”（山村雄一，熊谷 朗監修），共立出版株式会社，東京，pp. 197-206, 1989.
- 12) Mizoguchi, Y., Ohnishi, F., Monna, T., Yamamoto, S. and Morisawa, S.: Partial purification of the cholestatic factor derived from lymphocytes of tuberculin-sensitized guinea pigs. *Gastroenterol. Jpn.* **16**, 260-267, 1981.
- 13) Mizoguchi, Y., Ohnishi, F., Monna, T., Yamamoto, S., Otani, S. and Morisawa, S.: Studies on intrahepatic cholestasis induced in drug-induced allergic hepatitis: Intrahepatic cholestasis induced in the rat by the culture supernatant of activated lymphocytes. *Hepato-gastroenterol.* **28**, 147-150, 1981.
- 14) Mizoguchi, Y., Ohnishi, F., Monna, T., Yamamoto, S., Nakai, K., Otani, S. and Morisawa, S.: Studies on intrahepatic cholestasis: Intrahepatic cholestasis induced in rats by the culture supernatant of activated lymphocytes. *Hepato-gastroenterol.* **28**, 292-295, 1981.
- 15) 溝口靖紘，阪上吉秀，東森俊博，大西文明，中尾昌弘，門奈文之，山本祐夫，森沢成司：ヒト活性化リンパ球から産出される催胆汁うっ滞因子の部分精製，日臨免誌 **4**, 305-311, 1981.
- 16) Mizoguchi, Y., Sakagami, Y., Monna, T., Yamamoto, S. and Morisawa, S.: Participation of the cholestatic factor in the pathogenesis on intrahepatic cholestasis, found in various liver diseases. *Gastroenterol. Jpn.* **17**, 224-229, 1982.
- 17) Mizoguchi, Y., Sakagami, Y., Yamamoto, S. and Morisawa, S.: Studies on the functional mechanism of cholestatic factor. *Jpn. J. Allergol.* **33**, 903-908, 1984.
- 18) Mizoguchi, Y., Miyajima, K., Sakagami, Y., Yamamoto, S. and Morisawa, S.: Detection of the cholestatic factor in the liver tissue of patients with acute intrahepatic cholestasis. *Annals of Allergy* **56**, 304-307, 1986.
- 19) 森沢成司：免疫系に対する薬用人参の作用，“薬用人参'89—その基礎・臨床研究の進歩”（山村雄一，熊谷 朗監修），共立出版株式会社，東京，pp. 187-196, 1989.
- 20) Tsutsui, H., Mizoguchi, Y., Yamamoto, S. and Morisawa, S.: Studies on experimentally-induced acute hepatic failure: Possible involvement of activated liver adherent cells. In “Cells of the hepatic sinusoid” (Eds. by A. Kirn, D.L. Knook, E. Wisse), Kupffer Cell Foundation, The Netherlands, pp. 307-314, 1986.
- 21) Mizoguchi, Y., Tsutsui, H., Sakagami, Y., Kuboi, H., Seki, S., Kobayashi, K., Yamamoto, S. and Morisawa, S.: Characteristics of the hepatocytotoxic factor in mice with experimentally-induced massive hepatic cell necrosis. *Jpn. J. Allergol.* **37**, 959-968, 1988.
- 22) 阪上吉秀，宮島慶治，筒井ひろ子，志波 孝，東森俊博，中尾昌弘，溝口靖紘，山本祐夫，森沢成司：催胆汁うっ滞因子の作用機能—胆汁酸依存性および非依存性胆汁排泄と erythritol clearance に対する影響，日消誌 **79**, 2121-2126, 1982.

- 23) 宮島慶治, 溝口靖紘, 加藤寛子, 北村瑞穂, 児玉千枝, 筒井ひろ子, 阪上吉秀, 東森俊博, 山本祐夫, 森沢成司: 催胆汁うっ滞因子の作用機構— ^{125}I -Insulin の胆汁中排泄への影響. 消化器と免疫 **14**, 202-205, 1985.
- 24) 阪上吉秀, 申 東恒, 溝口靖紘, 宮島慶治, 進藤嘉一, 東森俊博, 関 守一, 黒木哲夫, 針原重義, 小林絢三, 森沢成司, 山本祐夫: 催胆汁うっ滞因子の作用機構—コルヒチン投与ラットに及ぼす影響. 肝臓 **27**, 1265-1270, 1986.
- 25) 阪上吉秀, 溝口靖紘, 武田 弘, 申 東恒, 進藤嘉一, 宮島慶治, 筒井ひろ子, 東森俊博, 関 守一, 山本祐夫, 門奈丈之, 森沢成司: 催胆汁うっ滞因子の作用機構— ^{14}C -sucrose および ^{32}P -orthophosphate の胆汁排泄に対する影響. 日消誌 **82**, 2904-2911, 1985.