

# Inhibitory effect of Panax notoginseng methanol extract (denchi) on the cytokine IL-1 $\beta$ release from PBMC cells

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/42853">http://hdl.handle.net/2297/42853</a>

# 田七人參成分のサイトカイン (IL-1 $\beta$ ) 分泌抑制作用

## Inhibitory Effect of *Panax notoginseng* Methanol Extract (Denchi) on the Cytokine IL-1 $\beta$ Release from PBMC Cells

嶋田 努<sup>1)</sup> 丸山 博文<sup>2)</sup> 栗原 久<sup>3)</sup>  
丸山 悠司<sup>4)</sup> 赤瀬 智子<sup>5)</sup> 油田 正樹<sup>1)</sup>

### ABSTRACT

The aim of this research was to find the mechanism of anti-inflammatory effect and the properties of the active constituents of methanol extract of *Panax notoginseng* (Denchi) *in vitro*.

Denchi (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) inhibited the release of IL-1 $\beta$  (88%), INF- $\alpha$  (51%), IL-4 (34%), INF- $\gamma$  (28%), IL-10 (27%), IL-6 (13%) from PMBC. However, it did not change the IL-2 release, and increased the IL-5 release (48%). The fraction-C, in which denchi-specific ginsenosides were contained, showed strong and dose-related inhibition of IL-1 $\beta$  release (IC<sub>50</sub>=2.86  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). However, the inhibitory activity of *Panax ginseng*-related ginsenosides (fraction-B) was extremely weak, 20% at 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , as compared with that of the fraction-C.

These results suggest that the anti-inflammatory effect of Denchi is achieved through an inhibition of the IL-1 $\beta$  release, and that the active compounds are highly lipid-soluble ginsenosides. (Jpn Pharmacol Ther 2008 ; 36 : 191-8)

**KEY WORDS** *Panax notoginseng* (Denchi), Ginsenosides, Cytokine, Inhibition of IL-1 $\beta$  release, PBMC cell, Anti-inflammatory effect

### はじめに

田七ニンジン (以下, 田七と記載) とは, 中国雲南省から広西省の限定された高原地域においてのみ採れるウコギ科のサンシチニンジン (*Panax notoginseng* F. H. Chen) の根茎を乾燥したものである。田七

には「三七」「田三七」などさまざまな呼び名があり, これらの名前の由来は, 種を蒔いてから生薬として収穫できるまでに3~7年もの年月を要するためとされている。さらに, 「山漆」「金不換」などもよばれ, とくに「金不換」は, 金にも換えがたいほど高価なものという意味があった。サンシチニン

<sup>1)</sup>武蔵野大学 薬学研究所 <sup>2)</sup>株式会社ツムラ ツムラ研究所 <sup>3)</sup>東京福祉大学 大学院 <sup>4)</sup>NPO 健康資源研究開発機構 補完医療薬評価研究部 <sup>5)</sup>昭和薬科大学 病態科学研究室  
Tsutomu Shimada and Masaki Aburada : Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Musashino University ; Hirofumi Maruyama : Medical Evaluation Laboratory, Tsumura & Co. ; Hisashi Kuribara : Tokyo University and Graduate School of Social Welfare ; Yuji Maruyama : NPO for Research & Development in Health Resources ; Research Division for Assessment of Complementary Medicine ; Tomoko Akase : Department of Clinical and Biomedical Sciences, Showa Pharmaceutical University

ジンはその名前から、いわゆるチョウセンニンジン(オタネニンジン: *Panax ginseng* C. A. Meyer, 以下, 人參と記載) としばしば混同されるが, 別種の植物である。

田七については, 古来より止血効果のある重要な生薬として用いられていた。ベトナム戦争のとき負傷したベトナム兵が止血剤として田七の粉末を傷口に擦り込んでいたことから, アメリカ兵がそれを持ち帰り, 薬理作用の検討が始まったといわれている<sup>1,2)</sup>。その後の基礎的研究により, 田七に含まれるサポニン類 (ginsenoside 類) に抗炎症・抗アレルギー作用<sup>3~5)</sup>や肝保護作用<sup>6)</sup>などが, triacylglycerol に抗酸化作用<sup>7)</sup>が, またタンパク質には抗真菌作用<sup>8)</sup>などが確認され, 広範囲な薬理活性を有することが示唆された。

すでにわれわれは, 田七のメタノール抽出成分を, 薄層クロマトグラフィー法 (TLC) および高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC) によって人參のエタノール抽出成分と比較検討した<sup>9)</sup>。その結果, 田七には人參との共通成分として ginsenoside Rg1, Rb1, Rd, Re および Rg2 が検出されたが, いずれの成分とも含有量は田七のほうが高く, とくに ginsenoside Rg1 の含有量が有意に高いことが確認された。さらに, TLC による分析では田七には, 人參には検出されなかった ginsenoside 類の 7 個の特異的スポット (Rf 値 0.38~0.6) が確認された。また HPLC による分析では, TLC で認められた特異的スポットに対応するピークに加えて, ginsenoside 類ではない特異的な成分ピーク (ピーク X) が確認された。一方, 人參には, ginsenoside Rb2, Rb3, Rc, Rf, Ro などが認められたが, これらの成分は田七では検出されなかった。

TLC および HPLC による成分分析の結果から, 田七は人參と異なる薬理作用を示す可能性が示唆された。先に述べたように, 田七の薬理作用として止血作用<sup>1)</sup>や抗炎症・抗アレルギー作用<sup>3~5)</sup>などが知られているが, その有効成分の同定, および作用機序の解明はなされていない。

本研究では, 田七の抗炎症作用に注目し, 炎症と関連が深いサイトカイン分泌に対する抑制作用とその有効成分について検討した。

## I 材料と方法

### 1 実験材料

田七人參は中国雲南省で生産されたもので, (株)和光化学 (高崎市) から提供された。人參の乾燥品 (日本薬局方収載標品: ツムラ, 東京) および ginsenoside Rb1 (Extrasynthese 社: Genay, France) は市販製品を使用した。

サイトカイン刺激物質として phytohemagglutinin (INF- $\alpha$ , IL-2 および IL-10 の分泌刺激物質), lipopolysaccharide (TNF- $\alpha$ , IL-1 および IL-6 の分泌刺激物質), および concanavallin A (IL-4 および IL-5 の分泌刺激物質) はいずれも, RayBiotech, Inc (Norcross, GA, USA) の製品を使用した。

### 2 試料の作製

田七の乾燥粉末 (201.74 g) を, 約 10 倍量 (2100 mL) のメタノール (MeOH) にて 2 時間にわたって加熱還流した。得られた抽出液を常温 (30°C 以下) で減圧濃縮して MeOH を除去し, 得られた固形物 43.85 g に以下の処置を施した。

固形物の一部 (0.91 g) をサンプリング (田七エキス (A)) に供し, 残り (約 43 g) を celite に吸着乾燥させ, silica gel カラムクロマト (6 id $\times$ 19.5 cm) に供した。silica gel クロマトの展開溶液としてクロロホルム/メタノール/水 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O) 系を適用し, 勾配溶離法<sup>10,11)</sup>で成分分離を行った。

すなわち, 田七の MeOH 抽出液を図 1 に示す過程で, 展開溶液 (CHCl<sub>3</sub>: MeOH: H<sub>2</sub>O) の比率を 8: 2: 0.2 (液量 2000 mL) から開始し, 15: 5: 0.7 (液量 2000 mL), 7: 3: 0.5 (液量 2000 mL), 6: 4: 1 (液量 1000 mL) と段階的に変えて溶出し, MeOH (液量 2000 mL) を最終液としてクロマトカラムを洗浄して残存成分を溶出した。この過程で流出する溶出液を 500~1000 mL の流分で分画し, Fr. 1~Fr. 12 を得た。

これら Fr. 1~Fr. 12 の溶出画分につき, 前報<sup>9)</sup>において認められた TLC (CHCl<sub>3</sub>: MeOH: H<sub>2</sub>O=7: 3: 0.5) における Rf 値の高い成分 (0.38~0.6) を含む画分を得るため, ginsenoside Rg1 を指標にして, それより高い画分 (Fr. 1~Fr. 4) と低い画分 (Fr. 5~Fr. 12) をそれぞれあわせ, 常温・減圧下で蒸発乾燥して得られた乾固物 (Fr. 1~Fr. 4 を画分 (C)): 2.83

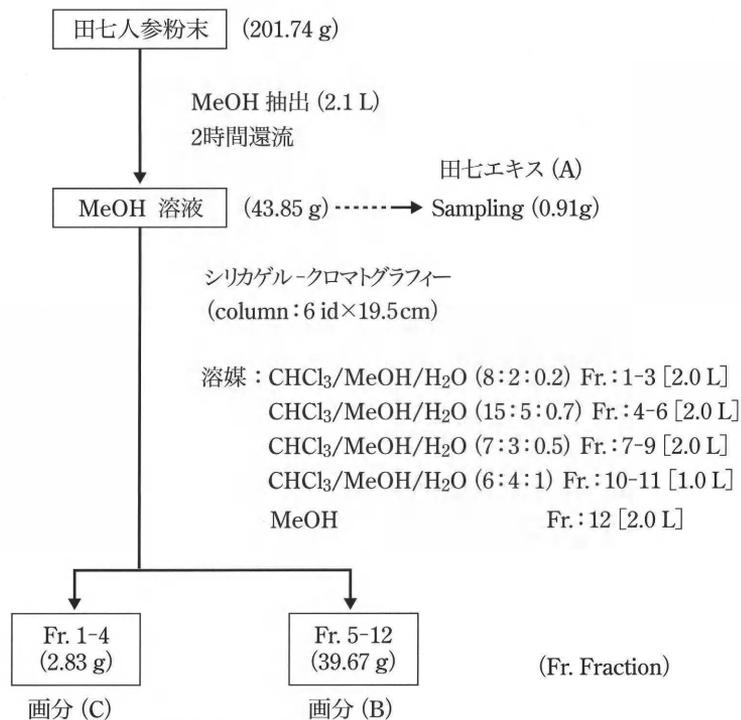


図 1 田七人参成分の分画フローチャート

表 1 炎症性サイトカイン分泌刺激の条件

サイトカイン	使用細胞	刺激物質 (濃度)	培養条件 (時間/温度)	分析法
INF- $\gamma$	PBMC	PHA (2 $\mu$ g/mL)	24 h/37°C	EIA
TNF- $\alpha$	PBMC	LPS (1 $\mu$ g/mL)	24 h/37°C	EIA
IL-1 $\beta$	PBMC	LPS (1 $\mu$ g/mL)	24 h/37°C	EIA
IL-2	PBMC	PHA (20 $\mu$ g/mL)	48 h/37°C	EIA
IL-4	PBMC	ConA (20 $\mu$ g/mL)	48 h/37°C	EIA
IL-5	PBMC	ConA (20 $\mu$ g/mL)	48 h/37°C	EIA
IL-6	PBMC	LPS (1 $\mu$ g/mL)	24 h/37°C	EIA
IL-10	PBMC	PHA (3 $\mu$ g/mL)	48 h/37°C	EIA

PHA, Phytohemagglutinin ; LPS, Lipopolysaccharide ; ConA, Concanavallin A ;  
 PMBC, Periferal mononuclear blood cell ; EIA, ELISA immunoassay method.

g, Fr. 5~Fr. 12 を画分 (B) : 39.67 g) を実験試料とした。

### 3 TLC 解析

シリカゲル薄層クロマト (TLC Plates silica gel 60 F254 : Merk-KGaA, Darmstadt, Deutschland) を用い, CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O = 7 : 3 : 0.5 混合液を展開溶媒として, 展開距離 15 cm で試料検体である田七エキス (A), 画分 (B), 画分 (C) を展開した。また, 成分化合物を特定するため ginsenoside Rg1 を, 参考として人参の 50% エタノール (EtOH) 抽出エ

キスを同一プレートで展開した。

TLC 上の成分検出は, 噴霧試液に 10% 硫酸 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) を用い, 噴霧後, 105°C, 5 分間加熱によって行った。

### 4 サイトカイン分泌に及ぼす作用の検討

1) 8 種類のサイトカイン分泌に及ぼす田七エキス A の作用

表 1 は, 末梢血単球 (PBMC) 細胞からのサイトカイン (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 および IL-10) の分泌刺激条件, およびそ



1. 人參 (50% エタノール抽出液)
2. 田七エキス (A)
3. 画分 (B)
4. Ginsenoside Rg1
5. 画分 (C)

図 2 田七エキス (A), 画分 (B), 画分 (C), ginsenoside Rg1 および人參エキス (50%EeOH 抽出成分) の薄層クロマトグラフィー (TLC)

これらの測定法を示したものである。この条件下で、8種類のサイトカイン分泌に及ぼす田七エキス (A) の影響を検討した。

PBMC 細胞に、田七エキス (A) と phytohemagglutinin (INF- $\alpha$ , IL-2 および IL-10 の分泌刺激物質), lipopolysaccharide (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  および IL-6 の分泌刺激物質) あるいは concanavallin A (IL-4 および IL-5 の分泌刺激物質) のいずれかを同時に適用した。すなわち、INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  および IL-6 については 37°C で 24 時間, IL-2, IL-4, IL-5 および IL-10 については 37°C で 48 時間にわたり培養後、それぞれのサイトカイン分泌量を ELISA 法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: 酵素免疫測定法) にて測定した。ELISA キットおよびサイトカイン抗体は RayBio Inc (Norcross, GA, USA) から購入した。

各サイトカイン分泌刺激物質の単独適用による分泌量を 100% とし、それに対する田七エキス A + 刺激物質の併用適用による分泌減少の割合を阻害率とした。

なお、上記実験系において、標準分泌阻害物質として、IL-1 $\beta$  に対して cyclohexamide を、その他の

サイトカインに対して dexamethasone をそれぞれ適用した場合、分泌がほぼ 100% 阻害されることが確認されている (Cerep, Le Bois Eveque, France からの情報)。

## 2) IL-1 $\beta$ 分泌に及ぼす田七エキス (A), 画分 (B), 画分 (C) の阻害作用

IL-1 $\beta$  分泌に及ぼす田七エキス (A) (10, 30 および 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 画分 (B) (50, 100 および 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) および画分 (C) (25, 50, 100 および 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の阻害効果を検討した。PBMC 細胞に lipopolysaccharide と各試料を同時適用し、37°C で 24 時間培養後、IL-1 $\beta$  分泌量を ELISA 法にて測定した。

さらに、IL-1 $\beta$  分泌に及ぼす画分 (C) の低用量 (0.625, 1.25, 2.5, 5 および 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の効果についても、同法にて測定した。

## 5 データ分析

それぞれの試料について測定を 3 回実施した。50% 分泌阻害濃度 (IC<sub>50</sub> 値) は、3 回の測定値の平均に対して Hill 方程式を適用し、得られた阻害曲線の非線形回帰分析によって決定した。

表 2 田七人参のメタノール抽出エキス (田七エキス A) のサイトカイン分泌阻害率

サイトカイン	濃度 (μg/mL)	%抑制率
IFN-γ	100	28
TNF-α	100	51
IL-1β	100	88
IL-2	100	-1
IL-4	100	34
IL-5	100	-48
IL-6	100	13
IL-10	100	27

表 3 田七エキス (A), 画分 (B), 画分 (C) の IL-1β 分泌阻害率

	濃度 (μg/mL)	%抑制率
田七エキス (A)	10	-2
田七エキス (A)	30	17
田七エキス (A)	100	78
画分 (B)	50	-9
画分 (B)	100	-2
画分 (B)	200	20
画分 (C)	25	97
画分 (C)	50	91
画分 (C)	100	97
画分 (C)	200	99

## II 結 果

### 1 田七エキス (A), 画分 (B) および画分 (C) の TLC パターン

図 2 は, 田七エキス (A), 画分 (B) および画分 (C), ginsenoside Rg1, および人参エキス (50% EeOH 抽出成分) を, 展開溶媒として CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O=7:3:0.5 を用いて展開した TLC クロマトグラムである。TLC の結果から, 画分 (B) には ginsenoside Rg1 より脂溶性の低い成分が, 画分 (C) には ginsenoside Rg1 より脂溶性の高い成分がそれぞれ含有されていることが確認された。しかも, 画分 (B) と画分 (C) の各スポットは, 田七エキス (A) のスポットとよく一致していた。

### 2 サイトカイン分泌に及ぼす作用

1) 8 種類のサイトカイン分泌に及ぼす田七エキス (A) の作用

表 2 は, PBMC 細胞からの炎症性サイトカイン分泌に及ぼす田七エキス (A) の効果を示したものである。サイトカインの分泌刺激には, INF-α, IL-2 および IL-10 については phytohemagglutinin, TNF-α, IL-1β および IL-6 については lipopolysaccharide, および IL-4 および IL-5 については concanavallin A が用いられた。

田七エキス (A) (100 μg/mL) は, IL-1β 分泌を 88%, TNF-α 分泌を 51%, IL-4 分泌を 34%, INF-γ 分泌を 28%, IL-10 分泌を 27%, IL-6 分泌を 13% 抑制した。一方, IL-2 分泌には影響せず, IL-5 分泌を 48% 促進した。

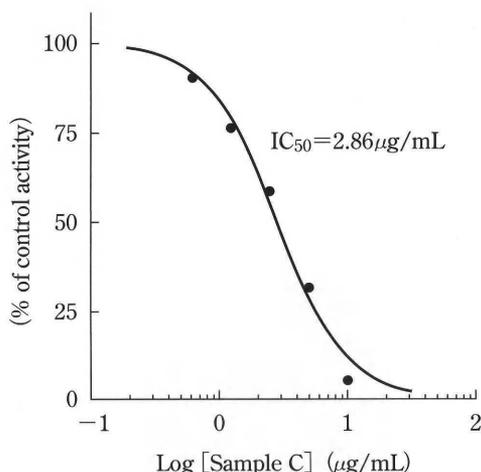


図 3 画分 (C) の IL-1β 分泌阻害作用の濃度-効果相関

2) IL-1β 分泌に及ぼす田七エキス (A), 画分 (B), 画分 (C) の阻害作用

田七エキス (A) が強力な IL-1β 分泌阻害作用を有することが判明したことから, IL-1β 分泌に及ぼす田七エキス (A), 画分 (B) および画分 (C) の濃度-効果相関を検討した。その結果を表 3 に示す。

田七エキス (A) は, 30 μg/mL で 17%, および 100 μg/mL で 78% 阻害した。画分 (B) は, 200 μg/mL の高濃度で 20% 阻害したのみで, IL-1β 分泌阻害作用はきわめて弱かった。一方, 画分 (C) においては, 25, 50, 100 および 200 μg/mL の濃度で, それぞれ 97, 91, 97 および 99% の阻害と, 強力な IL-1β 分泌阻害作用を示した。つまり, IL-1β 分泌阻害の活性成分は画分 (C) に存在することが判明した。

### 3) 画分 (C) の IL-1 $\beta$ 分泌阻害作用の濃度-効果 相関

画分 (C) の IL-1 $\beta$  分泌阻害作用が 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度ですでに天井に達していることから、さらに低濃度範囲 (0.65, 1.25, 2.5, 5 および 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の濃度-効果相関を検討した。その結果を図 3 に示す。

画分 (C) は、選択した濃度範囲で濃度依存的な IL-1 $\beta$  分泌阻害作用を示し、50% 阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) は 2.86  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。

## III 考 察

近年、疾病の予防や改善においては、因果論に基づく疾病原因とその症状との相関性から薬を処方する西洋医学ばかりでなく、「証」、すなわち治療を前提とした病態のありようを統合して薬物処方を行う東洋医学にも広く注目が集まっている。

さて、サイトカインとは、免疫系細胞群の相互作用に働く 20 数種類の内因性微量タンパク分子の総称であり、国際委員会は 1978 年に、これ以後、新たに発見されるサイトカインをすべて白血球の間という意味のインターロイキン (IL) の名称でよぶことになった。ただし、腫瘍壊死因子 (TNF)、インターフェロン (INF) もサイトカインの一種である。サイトカインの主たる作用は免疫系の調節、および造血にあずかる幹細胞の分化と炎症反応に大別される。

すでに、田七には抗炎症作用のあることが報告されているが<sup>3-5)</sup>、その有効成分の分離同定や作用機序の検討はほとんど行われていない。生体内へ病原菌や異物が侵入した際、免疫系では各種免疫細胞がサイトカインを分泌して生体防御力を高める。そこで本研究では、田七の抗炎症作用の発現機序を解明する目的で、PBMC 細胞から炎症と関連の深い 8 種類のサイトカインの分泌に及ぼす効果を検討した。

最初に、サイトカイン刺激物質によって惹起される PBMC 細胞からのサイトカイン (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 および IL-10) 分泌に及ぼす田七の MeOH 抽出エキス (田七エキス (A)) 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の効果を検討したところ、IL-1 $\beta$  分泌に対して強力な (88%) 分泌抑制作用が認められた。次いで TNF- $\alpha$  分泌に対しては中

程度 (51%) の分泌抑制作用が認められたが、IL-4, INF- $\gamma$ , IL-10, IL-6 分泌に対しては顕著な阻害作用は認められなかった。

Rhule ら<sup>12)</sup>は、田七のエタノール抽出物が LPS 刺激による TNF- $\alpha$  や IL-6 分泌を抑制し、同時に、LPS 刺激では COX-2 と IL-1 $\beta$  の mRNA の発現が減弱することを報告している。さらに、Wu ら<sup>13)</sup>は、肝繊維症モデルラットにおいて、田七エキスが TNF- $\alpha$  分泌を抑制することを報告している。これらの報告は、本実験で田七エキスが各種サイトカイン分泌を阻害したと一致しており、田七の抗炎症作用の発現にはサイトカインの分泌阻害が密接に関与していることを示唆している。他方、Li ら<sup>14)</sup>は、空気注入による炎症モデルにおいて、田七エキスを処置すると好中球中の Ca<sup>2+</sup> レベルおよびフォスホオリパーゼ-2 の活性が低下することを報告している。これらの結果から、田七の抗炎症作用は、免疫系細胞間の情報伝達にあずかるサイトカインの分泌に対する遮断機構に深く関連することが示唆された。

次に、田七のメタノールエキスが PMBC 細胞からの IL-1 $\beta$  分泌を強力に阻害する結果から、その阻害成分の検討を行った。すなわち、田七エキス (A) 中の成分を、人参と共通する成分を含む画分 (B) と田七に特有な成分を含む画分 (C) に分離し、IL-1 $\beta$  分泌に及ぼすそれぞれの画分の阻害効果を検討した。

まず、人参と共通する成分を含む画分 (B) の IL-1 $\beta$  分泌阻害作用を検討したが、有意な効力は認められなかった。この画分 (B) には ginsenoside Rb1, Rd, Re および Rg1 が含まれていることが確認されている<sup>9)</sup>。先に Smonlinski ら<sup>15)</sup>は、ginsenoside Rb1 が LPS 刺激による TNF- $\alpha$  と IL-6 の分泌を抑制することを報告している。しかし、本実験で画分 (B) が IL-1 $\beta$  分泌を阻害しなかったことから、これら人参と共通する ginsenoside 類の抗炎症作用は、IL-1 $\beta$  の分泌阻害を介する機構作用と異なる機序によるものと推定された。事実、Rhule ら<sup>12)</sup>も、田七の抗炎症作用が TNF- $\alpha$  や IL-6 の分泌阻害によらないことを報告している。

一方、画分 (C) には、強力 (IC<sub>50</sub>=2.86  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) かつ用量依存的な IL-1 $\beta$  分泌阻害作用が認められ

た。画分 (C) には, ginsenoside Rg2 を除くと, 人参に含まれない ginsenoside 類で, しかも脂溶性の高い化合物が含まれており, TLC では 7 個のスポットが認められ, さらに HPLC では ginsenoside ではない化合物 (ピーク X) の存在も確認されている (栗原ほか, 2008)。田七の抗炎症作用は, これらの ginsenoside 類あるいはピーク X による IL-1 $\beta$  分泌阻害作用が関与している可能性が考えられる。しかし, 本研究ではこれらの化合物の同定および構造決定を行っておらず, 詳細は明らかでない。

IL-1 の代表的な生理活性として, 免疫活性化作用, すなわち発熱作用, 炎症誘発作用ばかりでなく, 破骨細胞の活性化作用を有することが知られている<sup>16,17)</sup>。田七が IL-1 $\beta$  遊離を比較的顕著に阻害することから, 抗炎症作用はもとより, 骨密度低下の防止作用を有することが期待される。

免疫系は炎症機構に関連する内分泌系と同時に中枢神経系とも密接な関係をもつシステムであることから, 神経系諸疾患におけるサイトカインの作用動態についても多様な研究成果が報告されている。たとえば, Alzheimer 病の動物モデルにおけるアミロイド $\beta$  タンパクの動態と脳内の小グリア細胞からの IL-1 $\beta$  遊離との関係が注目されている<sup>18~21)</sup>。また, フットショック暴露によるストレス負荷ラットでは, 視床下部において IL-1 $\beta$  濃度が上昇し, この変化は交感神経末端からのノルエピネフリン遊離に起因することが解明されている<sup>22)</sup>。

## 結 論

本実験では, 田七の画分 (C) が IL-1 $\beta$  遊離を有意に阻害すること, および確認された脂溶性の高い成分 (ginsenoside 類) が人参には含まれていない田七固有の成分であることが明らかとなった。これらの結果より, 田七は人参と異なる薬理活性および臨床応用性を有することが期待される。今後は有効成分の探索と同時に, 脳機能に及ぼす作用, たとえば Alzheimer 病の予防効果, ストレス緩和効果などを意図した薬理作用の実験について検討を進めていく予定である。

## 要 旨

本研究では, 田七人参 (田七) の抗炎症作用の機序および活性成分の解明を目的に, 炎症と関係の深い 8 種類のサイトカイン (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 および IL-10) の分泌に対する作用を検討した。

田七のメタノール抽出エキス (田七エキス (A): 100  $\mu$ g/mL) は, それぞれ IL-1 $\beta$  分泌を 88%, TNF- $\alpha$  分泌を 51%, IL-4 分泌を 34%, INF- $\gamma$  分泌を 28%, IL-10 分泌を 27%, IL-6 分泌を 13% 抑制した。他方, IL-2 分泌には有意な影響を認めず, IL-5 分泌を 48% 促進した。そこで分泌阻害効果ももっとも強かった IL-1 $\beta$  分泌についてさらに検討したところ, 田七エキス (A) の阻害率は, 30  $\mu$ g/mL で 17%, および 100  $\mu$ g/mL で 78% であった。一方, シリカゲル薄層クロマトグラフィー (展開溶媒として CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O=7:3:0.5 混合液, 展開距離 15 cm) で ginsenoside Rg1 およびそれより Rf 値の低い画分 (B) (人参と共通する ginsenoside 類を多く含む画分) の IL-1 $\beta$  分泌阻害率は, 200  $\mu$ g/mL の高濃度でも 20% であり, きわめて低いことがわかった。しかし, Rf 値の高い画分 (C) はその IC<sub>50</sub> が 2.86  $\mu$ g/mL と, 有意な IL-1 $\beta$  分泌阻害作用を示すことが認められた。本結果は, 田七の抗炎症作用が主として IL-1 $\beta$  の分泌阻害作用を介して発現すること, その活性成分は人参に含まれない脂溶性の高い ginsenoside 類に起因することが強く示唆された。

【謝辞】 本研究を遂行するにあたり, 実験対象である田七人参を提供いただいた和光化学(株)代表取締役社長・吉濱達三氏に深くお礼を申し上げます。また, 本研究の成分分析過程で, 熱意ある研究支援をいただいた(株)ツムラの服部尚子, 西村浩昭の両研究員に深謝します。

## 文 献

- 1) White CM, Fan C, Chow M. An evaluation of the hemostatic effect of externally applied notoginseng and notoginseng total saponins. J Clin Pharmacol 2000; 40: 1150-3.
- 2) Ng TB. Pharmacological activity of Sanchi ginseng (*Panax notoginseng*). J Pharm Pharmacol 2006; 58: 1007-19.
- 3) Hao CQ, Tang F. Anti-inflammatory effect of total

- saponins of *Panax notoginseng*. Zhongguo Yao Li Xue Bao 1986 ; 7 : 252-5. (In Chinese, Abstract in English)
- 4) Wang YL, Chen D, Wu JL. Effects and mechanism of total saponins of *Panax notoginseng* on anti-inflammation and analgesia. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi 1994 ; 14 : 35-36. (In Chinese, Abstract in English)
  - 5) Li SH, Chu Y. Anti-inflammatory effect of total saponins of *Panax notoginseng*. Chongguo Yao Li Xue Bao 1999 ; 20 : 551-4.
  - 6) Yoshikawa M, Morikawa T, Kashima Y, Ninomiya K, Matsuda H. Structures of new dammarane-type triterpene saponins from the flower buds of *Panax notoginseng* and hepatoprotective effects of principal ginseng saponins. J Nat Prod 2003 ; 66 : 922-7.
  - 7) Chan P, Thomas GN, Tomlinson B. Protective effects of trilinolein extracted from *Panax notoginseng* against cardiovascular disease. Acta Pharmacol Sin 2002 ; 23 : 1157-62.
  - 8) Lam SK, Ng TB. Isolation of a small chitinase-like anti-fungal protein from *Panax notoginseng* (Sanchi ginseng) roots. Int J Biochem 2001 ; 33 : 287-92.
  - 9) 栗原久, 丸山悠司, 赤瀬智子, 嶋田努, 油田正樹, 田七人参の薬理活性物質の探索: 薄層および高速液体クロマトグラフィーによる田七人参と人参の成分の比較分析. 日米高齢者保健福祉学会誌 2008 ; 3. (印刷中)
  - 10) 栗原久, 森田誠, 石毛敦, 林紘司, 丸山悠司. 改良型高架式十字迷路装置による柴朴湯の抗不安効果発現成分の探索. 神経精神薬理 1996 ; 18 : 643-53.
  - 11) 栗原久, 吉濱達三, 丸山悠司. イチョウ葉エキスおよびその含有成分の抗不安作用: マウスの高架式十字迷路実験による評価. 薬理と治療 2002 ; 30 : 955-62.
  - 12) Rhule A, Navarro S, Smith JR, Shepherd DM. *Panax notoginseng* attenuates LPS-induced pro-inflammatory mediators in RAW264.7 cells. J Ethnopharmacol 2006 ; 106 : 121-8.
  - 13) Wu F, Zhang SS, Kang GF. Effects of *Panax notoginseng* saponins on the expression of tumor necrosis factor alpha and secretion phospholipase A2 in rats with liver fibrosis. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi 2003 ; 11 : 51-2. (In Chinese, Abstract in English)
  - 14) Li Y, Liu L, Barger SW, Griffin WTS. Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on Tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway. J Neurosci 2003 ; 23 : 1605-11.
  - 15) Smolinski AT, Pestka JJ. Modulation of lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine production *in vitro* and *in vivo* by the herbal constituents agigenin (chamomile), ginsenoside Rb (1) (ginseng) and parthenolide (feverfew). Food Chem Toxicol 2003 ; 41 : 1381-90.
  - 16) 永井政則. 発熱の生理: 最近の話題. 小児内科 1993 ; 25 : 449-58.
  - 17) 宮園浩平, 菅沼和夫編. サイトカイン・増殖因子. 羊土社 ; 1998.
  - 18) Akama KT, Van Eldik LJ.  $\beta$ -amyloid stimulation of inducible nitric-oxide synthase in astrocytes is interleukin- $1\beta$ - and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-dependent, and involves a TNF- $\alpha$  receptor-associated factor- and NF $\kappa$ B-inducing kinase-dependent signaling mechanism. J Biochem Chem 2000 ; 17 : 7918-24.
  - 19) Mene W, Calvo C-F, Froger N, Ezan P, Amigou E, Koulakoff A, et al. Proinflammatory cytokines released from microglia inhibit gap junctions in astrocytes: potentiation by  $\beta$ -amyloid. FASEB J 2006 ; 10 : 1096/fj.05-4297fj.
  - 20) Lemere CA. A beneficial role of IL- $1\beta$  in Alzheimer disease? J Clin Invest 2007 ; 117 : 1483-5.
  - 21) Shaftel SS, Kyrkanides S, Olschowka JA, Miller JH, Johnson RE, et al. Sustained hippocampal IL- $1\beta$  overexpression mediates chronic neuroinflammation and ameliorates Alzheimer plaque pathology. J Clin Invest 2007 ; 117 : 1595-604.
  - 22) Blandino P Jr, Barnum CJ, Deak T. The involvement of norepinephrine and microglia in hypothalamic and splenic IL- $1\beta$  responses to stress. J Neuroimmunol 2006 ; 173 : 87-95.

\* \* \*