

紅参の強制遊泳マウスにおける抗疲労効果

木村善行、住吉真帆

愛媛大学医学部医化学第2教室

**Anti-Fatiguing Effects of Red Ginseng in Stress Mice induced by
Forced Swimming**

Yoshiyuki Kimura and Maho Sumiyoshi

序 言

現在、我が国の食生活は欧米化し、肥満、高脂血症、動脈硬化症、高血圧症などの生活習慣病の罹患者数が年々増加している。これらの疾病の増加と相まって、現在の多様化した社会での競争することが最優先とされている環境によって絶えずストレスに曝され、肉体的・精神的な疲労を訴えている人たちが増加している。このようにストレスを長期間受けることは、健康面においても多大な影響をもたらし、特に、疲労の蓄積は、食生活と相互に関連し合って、免疫力の低下と共に生活習慣病を増悪させ、ウイルスなどによるインフルエンザなどの感染症や癌に罹患する患者が増加することが予測される。このように、疲労蓄積時の免疫機能がストレス暴露によって低下することは報告されているが、実験的なエビデンスは少ない。朝鮮人參は抗疲労作用、ストレス緩和をはじめとして、多岐の薬効を示すことが報告されている。強制拘束などのストレス負荷によって血中コルチステロン値の上昇やナチュラル・キラー（NK）活性の低下が報告されている^{1, 2)}。今回、紅參の抗疲労作用およびストレス緩和作用の薬理的品質評価を検討するために、遊泳時間に及ぼす影響および強制遊泳ストレスによる血中コルチステロンおよびNK活性に及ぼす影響も併せて検討した。

材料および方法

1. **材料**：紅參は日本粉末薬品(株)から提供を受けた。各被験体は1000mgを蒸留水10mlに懸濁し、マウス体重10g当たり0.1mlを10日間朝1回(7:00)経口投与(1g/kg体重)した。無処置群(正常群)および強制遊泳負荷マウス群(コントロール群)は蒸留水のみを上記と同じスケジュールで投与した。
2. **使用動物**：C57BL/6J系マウス(5週齢、雄性)1群7から14匹を1週間予備飼育した後、健康なマウスを実験に供した。
3. **強制遊泳実験方法**：
被験体および蒸留水を各マウスに投与し、3日目に被験体投与30分後に強制遊泳させ、遊泳時間を測定した。同様に、5日目、7日目および9日目に被験体投与30分後に強制遊泳を行い、遊泳時間を測定した。その遊泳時間を測定することによって、疲労防止および疲労回復作用の効果を判定した。

4. 強制遊泳マウスにおける血中コルチコステロンの測定：

被験体 9 日間投与後、10 日目に各マウスを屠殺し、血液は下大静脈から¹H³ リン採血し、血漿を得た。分離した血漿中のコルチコステロンは Corticosterone [¹²⁵I] Assay 系 (Amersham Bioscience 社製) を用いた Radio Immuno Assay (RIA) によって測定した。

5. 強制遊泳マウスからの脾臓リンパ球の分離：

被験体を 9 日間投与後、10 日目に各マウスを屠殺し、無菌的に脾臓を摘出し、血液は下大静脈から¹H³ リン採血し、血漿を得た。無菌的に摘出した脾臓から、脾臓リンパ球を分離し、リンパ球数を 4×10^5 細胞数/ml に調整した。この脾臓リンパ球を NK 活性のエフェクター細胞とした。

4. NK 活性測定におけるターゲット細胞 (YAC-1) の調整および蛍光標識：

YAC-1 細胞 (NK 感受性細胞) は理化学研究所 (つくば市) から分与して頂き、愛媛大学医学部医化学第二教室において、継代維持したものをを用いた。YAC-1 細胞の蛍光標識は、 1×10^5 個/ml の YAC-1 細胞に $3 \mu\text{M}$ BCECF-AM (蛍光標識剤) を添加し、30 分間 37°C でインキュベーションし、インキュベーション終了後、10% 牛血清含有 RPMI-1640 で 3 回洗浄し、余分な BCECF-AM 溶液を除去した。

5. 強制遊泳ストレス負荷マウスの NK 活性の測定：

9 日目の強制遊泳負荷後の各マウスから調整した脾臓リンパ球 (1×10^5 細胞数/ml) の $100 \mu\text{l}$ を丸底 96 穴プレート (Falcon 社製) に播種し、さらに BCECF 標識 YAC-1 細胞 (1×10^4 細胞数/ml) $100 \mu\text{l}$ を加え、2 時間混合培養した。培養後、遠心し、上清中に遊離してきた蛍光物質 (BCECF) を励起波長 500nm、蛍光波長 540nm で蛍光強度を測定した。YAC-1 細胞内の全蛍光強度は 0.25% Triton X-100 で溶解し、算出した。NK 活性は、以下の式で求めた。

$$\left[\frac{(\text{マウス脾臓リンパ球で処理した YAC-1 細胞からの遊離蛍光強度} - \text{未処置の YAC-1 細胞からの自然遊離蛍光強度})}{(\text{YAC-1 細胞からの全蛍光強度} - \text{未処置の YAC-1 細胞からの自然遊離蛍光強度})} \right] \times 100$$
 で算出した。

6. 統計処理：

Super ANOVA ソフトを用いて、Fishser's Protected LSD test による多重群間検定を行い、 $P < 0.05$ を有意とした。

実験結果および考察

1. 遊泳時間に及ぼす紅参の影響

a) 紅参投与3日目の遊泳時間に及ぼす影響

図1に示すように、投与3日目の強制遊泳時間は非投与群（コントロール群）においては約25分間の遊泳時間で、紅参がコントロール群に比較して有意に遊泳時間を延長させた。

(図1)

b) 紅参投与5日目の遊泳時間に及ぼす影響

強制遊泳実験において、投与5日目の遊泳時間は、コントロール群が3日目と同様に約25分間で、紅参がコントロール群に比較して有意に遊泳時間を延長させた(図2)。

(図2)

c) 紅参投与7日目の遊泳時間に及ぼす影響

投与7日目の遊泳時間は、コントロール群は約32分間で、わずかに3日目および5日目に比較して遊泳時間が延長した。紅参がコントロール群と比較して有意に遊泳時間を延長し、抗疲労作用を示した(図3)。

(図3)

d) 紅参投与9日目の遊泳時間に及ぼす影響

投与9日目の強制遊泳実験において、コントロール群の遊泳時間は約33分間で、7日目の遊泳時間とほぼ同じであった。紅参投与群はコントロール群との間に遊泳時間において、有意な差異は認められなかった(図4)。

(図4)

2. 強制遊泳負荷後の血中コレステロン値に及ぼす紅参の影響

図5に示すように、強制遊泳負荷後の血中コレステロン値は、正常マウスと比較して、有意に血中コレステロン値の上昇が認められた。この事実は、強制遊泳によってストレスが引き起こされたことを示している。この遊泳ストレス負荷による血中コレステロン値の上昇は、紅参の経口投与(1g/kg)によって、コントロール群と比較して、有意に正常群の活性レベルまで回復した。

(図5)

また、ストレスによって免疫機能、特にNK活性が低下することがよく知られているが、その科学的なエビデンスがほとんど無い。従って、抗疲労作用および血中コルチコステロンの上昇を抑制した紅参について、NK活性に及ぼす影響を検討した。

3. 強制遊泳負荷後のNK活性に及ぼす紅参の影響

図6に示すように、強制遊泳負荷後のNK活性は、正常マウスと比較して、有意にNK活性の低下が認められた。この事実は、強制遊泳ストレスによる免疫機能低下を示している。この遊泳ストレス負荷によるNK活性の低下に関して、紅参はコントロール群および正常群との間にNK活性値に有意な差異は認められず、むしろ、コントロール群よりもわずかにNK活性の回復が認められる傾向を示した。

(図6)

以上の実験結果から、コントロール群は遊泳時間が短いのに、NK活性が低下し、さらに血中コルチコステロン値が上昇し、強いストレスを受けていることが判明した。紅参は、強制遊泳実験において、抗疲労作用を示し、さらに強制遊泳下のストレス暴露による血中コルチコステロン値の上昇を抑制し、NK活性の低下を抑制する傾向を示した。

謝辞 市販の紅参を提供して頂きました日本粉末薬品(株)に深謝致します。

文 献

- 1) Flint, M.S. & Tinkle S.S.: C57BL/6 Mice Are Resistant to Acute Restraint Modulation of Cutaneous Hypersensitivity. *Toxicolog. Sciences* 62, 250-256, 2001.
- 2) Ishihara, Y., Iijima, H., Yagi, Y. and Matsunaga, K.: Enhanced recovery of NK cell activity in mice under restraint stress by the administration of a biological response modifier derived from the mycelia of the basidiomycete *Tricholoma matsutake*. *Stress*, 6, 141-148, 2003.

紅参エキス投与3日目の遊泳時間に及ぼす影響

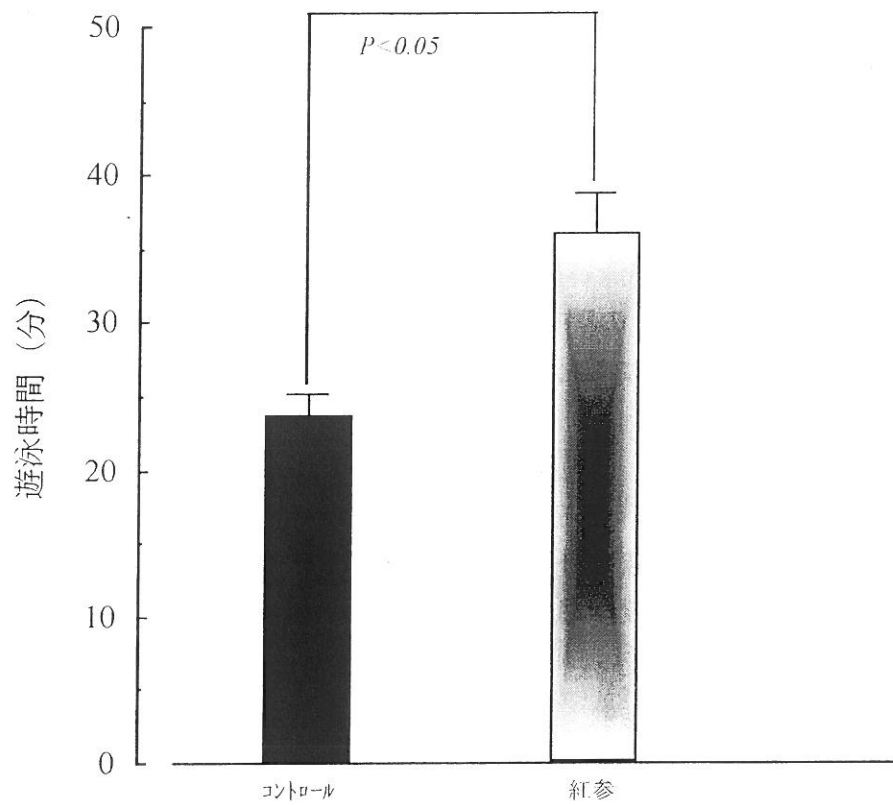


Fig.1

紅参投与5日目の遊泳時間に及ぼす影響

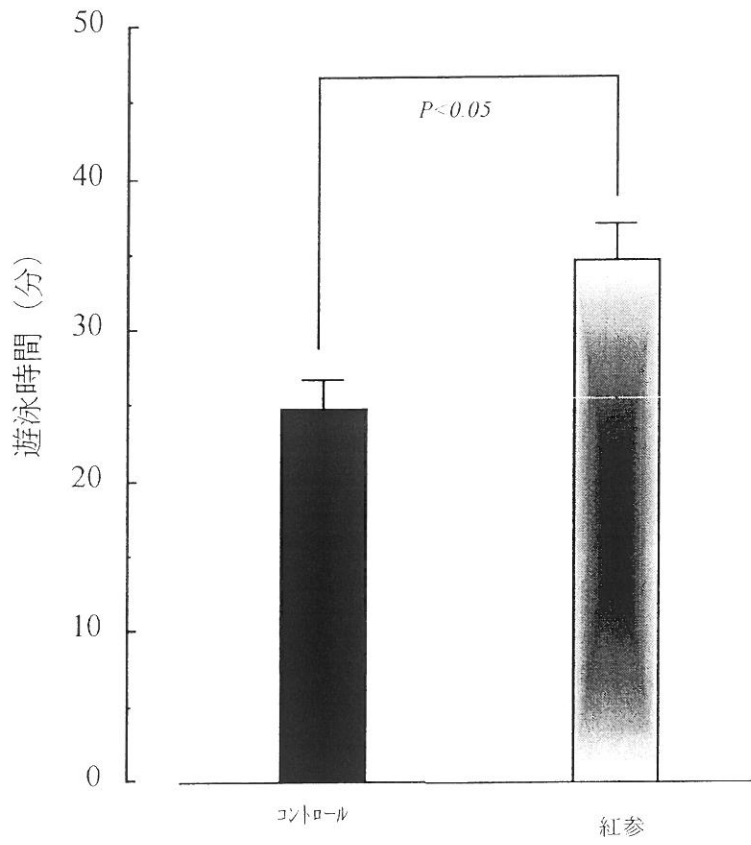


Fig. 2

紅参投与7日目の遊泳時間に及ぼす影響

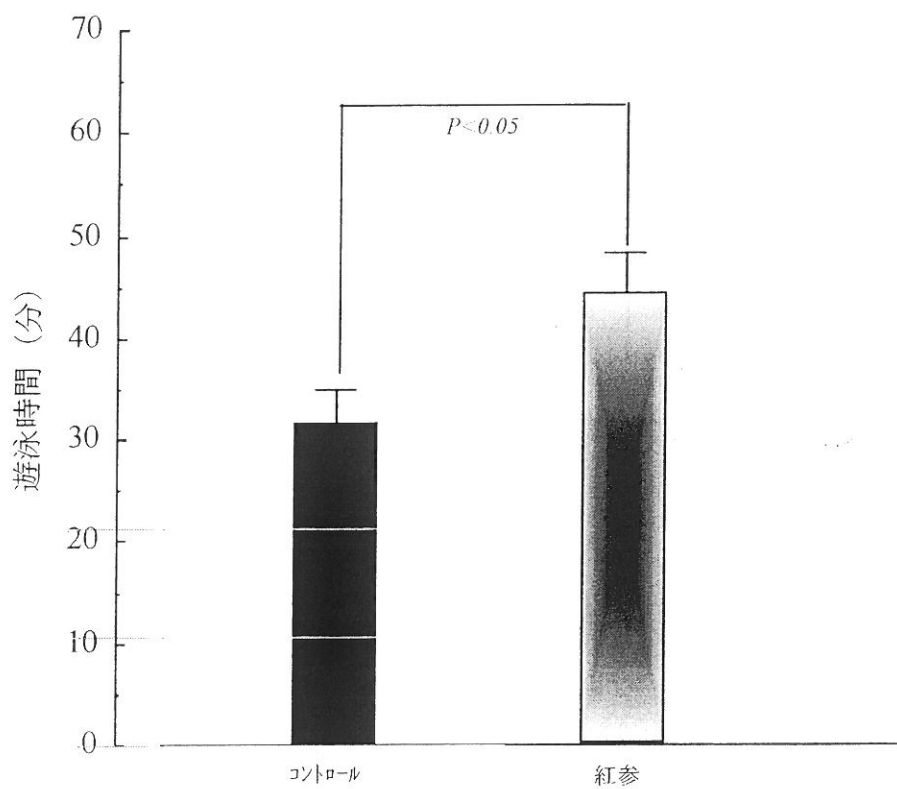


Fig. 3

紅参投与9日目の遊泳時間に及ぼす影響

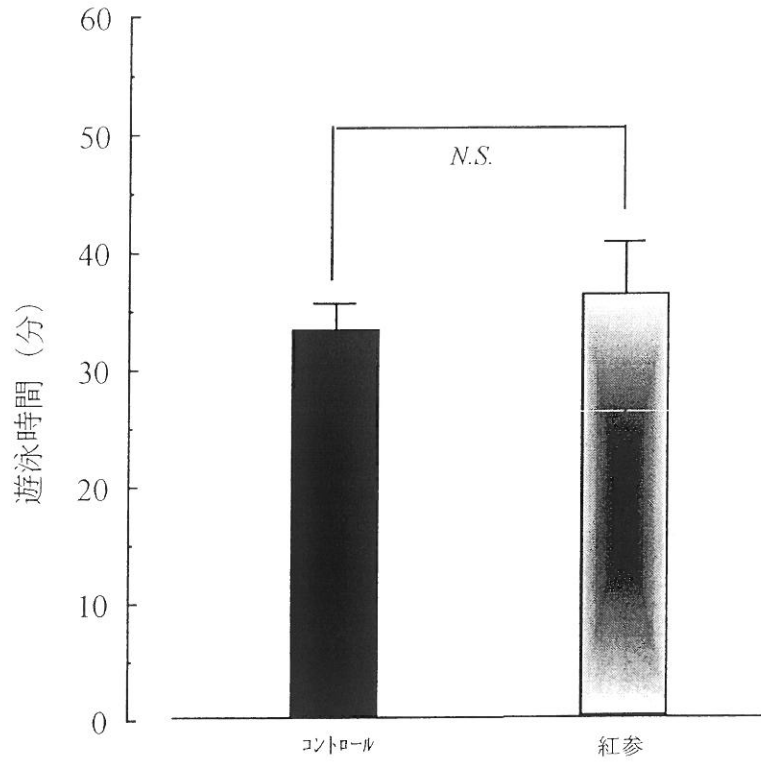


Fig. 4

強制遊泳マウスにおける紅参投与10日間後の
血中コルチコステロン値に及ぼす影響

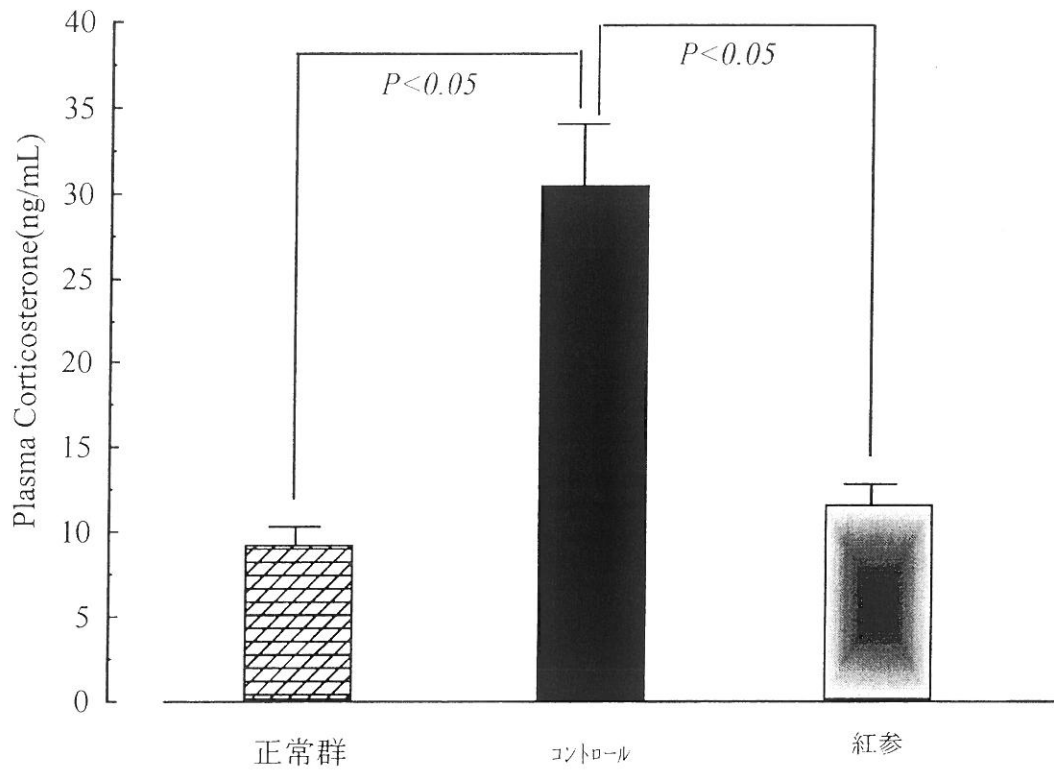


Fig. 5

強制遊泳マウスにおける紅参投与10日間後の
ナチュラル・キラー(NK)活性に及ぼす影響

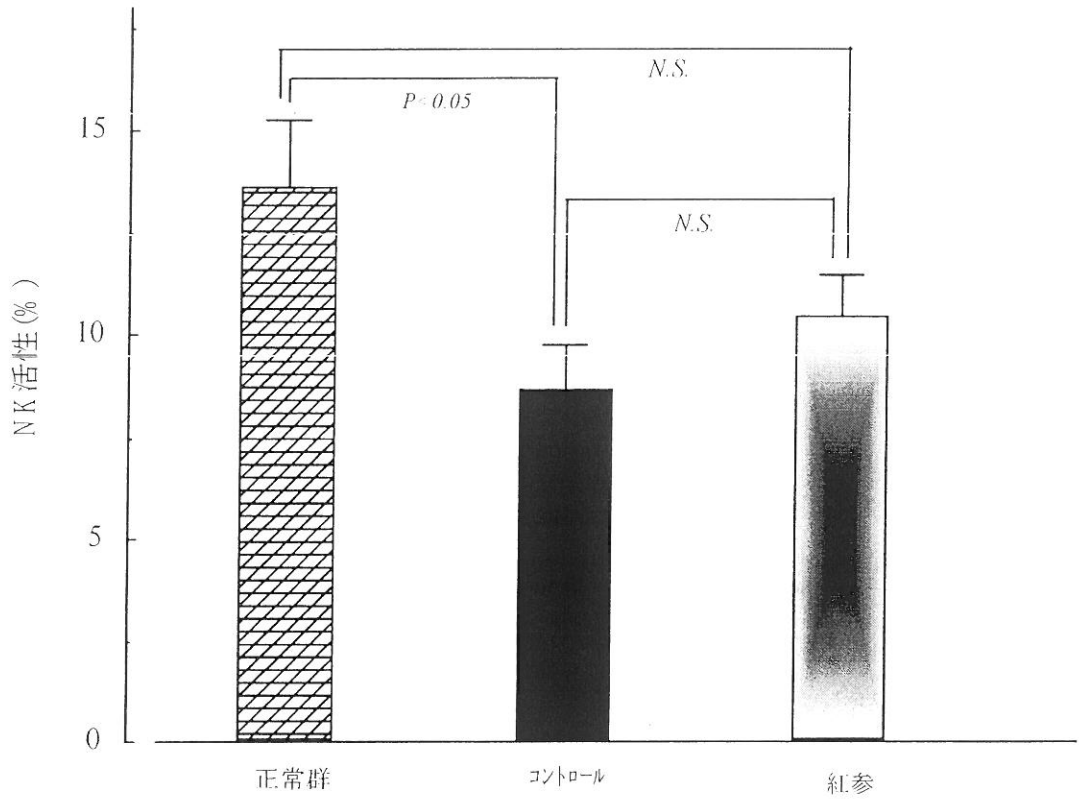


Fig. 6