



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬科学）
報告番号	甲第1926号
学位記番号	第389号
氏名	丁 科文
授与年月日	令和4年9月26日
学位論文の題名	生薬ニンジンの修治に関する研究～免疫賦活作用の増強について
論文審査担当者	主査： 山村 寿男 副査： 牧野 利明， 肥田 重明， 梅澤 直樹

名古屋市立大学学位論文

生薬ニンジンの修治に関する研究～免疫賦活作用の増強  
について

令和4年度（2022年9月）

名古屋市立大学大学院薬学研究科

創薬生命科学専攻 生薬学分野

丁 科文



① 本論文は、2022年9月名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 山村 寿男 教授

副査 牧野 利明 教授

肥田 重明 教授

梅澤 直樹 准教授

② 本論文は、学術情報雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

Kewen Ding, Yoshiaki Tabuchi, and Toshiaki Makino

Effect of steam-processing of the *Panax ginseng* root on its inducible activity on granulocyte-colony stimulating factor secretion in intestinal epithelial cells *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology*, 287, 114927, 2022

③ 本論文の基礎となる研究は、牧野 利明 教授の指導の下に名古屋市立大学大学院薬学研究科において行われた。

# 目次

序論	1
本論	
第一章 中国吉林省産オタネニンジン蒸製産物の G-CSF 産生誘導活性	4
第二章 中国吉林省産オタネニンジン側根エキスのギンセノシド類の分析	8
第三章 中国吉林省産オタネニンジン側根エキスの G-CSF 産生誘導活性の活性成分	14
第四章 G-CSF 産生誘導活性出現におけるオタネニンジン側根の含水量および産地の差異	18
第五章 オタネニンジン側根エキスの G-CSF 産生誘導活性のメカニズム	24
考察	28
結論	34
実験の部	35
引用文献	41
謝辞	45

本論文では、以下の略号を用いた。

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
ANOVA	analysis of variance
C <sub>T</sub>	threshold cycle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles medium
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	fetal bovine serum
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
HPLC	high performance liquid chromatography
IL	interleukin
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MyD88	myeloid differentiation factor 88
MCE301	murine normal epithelial 301 cells
NF- $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B cells
OD	optical density
ODN 2088	oligonucleotide 2088
PBS	phosphate buffered saline
PPR	pattern recognition receptor
PPT	protopanaxatriol
PWM	pokeweed mitogen
QOL	quality of life
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
TCM	traditional Chinese medicine
TLR	toll-like receptor
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$

## 序 論

生薬ニンジン（人参）は、ウコギ科オタネニンジン *Panax ginseng* C. A. Meyer の細根を除いた乾燥した根を基原として、第十八改正日本薬局方<sup>1)</sup>に収載されている生薬である。しかし、中華人民共和国薬典<sup>2)</sup>、韓国薬局方<sup>3)</sup>、欧州薬局方<sup>4)</sup>、米国薬局方<sup>5)</sup>では、ニンジンの基原としてオタネニンジンの乾燥した根と規定しており、細根を除く規定はない。オタネニンジンは、主に中国の吉林省、朝鮮半島および日本では福島県、島根県と長野県で栽培されている<sup>6)</sup>。漢方医学におけるニンジンの薬味薬証は、甘温、中医学では甘、微苦、微温、薬能別分類では補気薬に分類され<sup>6)</sup>、薬能は大補元気、腹脈固脱、補脾益肺、生津養血、安神益智とされている<sup>2)</sup>。ニンジンには、六君子湯や補中益気湯、十全大補湯などの漢方方剤に配合されるだけでなく<sup>7)</sup>、民間薬としても汎用されており、滋養強壮、疲労回復、体力回復、風邪の予防、クオリティオブライフ（QOL）の向上、記憶能力改善など、様々な目的で使用されている<sup>8)</sup>。ニンジンに含まれるギンセノシド類や酸性多糖類は、抗菌、抗腫瘍、抗酸化および免疫調節作用など、様々な薬理活性を持つことが、報告されている<sup>9-14)</sup>。

漢方医学、中医学を含む東アジア伝統医学では、生薬の薬効の増強や副作用を軽減することを目的として、生薬に対して修治（中国語では炮製）と呼ばれる加工が行われている。そのうち、生薬原料を蒸した後に乾燥させるという「蒸製」は、新鮮なオタネニンジン根からコウジン（紅参）を調製する際に使用される修治方法である。コウジンも日本薬局方に収載され、その基原として、オタネニンジンの根を蒸して乾燥したものと規定し、細根を除くという規定はない<sup>1)</sup>。日本薬局方では、ニンジンおよびコウジンの品質確保のための指標成分としてギンセノシド Rg<sub>1</sub> と Rb<sub>1</sub> の最低含有量を規定しているが、ニンジン、コウジンどちらもそれぞれ 0.1 と 0.2%以上と規定しており、その間には差はない。また、加熱時間、使用される容器の形状などの具体的な蒸製の条件については、一切記載されていない<sup>1)</sup>。オタネニンジン根からコウジンを調製するときは、一般的には、1.5～3 時間、蒸製するとされているが<sup>15,16)</sup>、実際の市場には加工方法の異なる様々なコウジンが流通している<sup>17)</sup>。Jin らの報告に依れば、オタネニ

ンジン根を蒸製することにより、ギンセノシド Rg<sub>1</sub>、Rb<sub>1</sub>、Re などの含有量が減少した一方で、強い抗炎症、神経保護作用を持つジンセノサイドである Rg<sub>3</sub>、Rg<sub>5</sub>、F<sub>2</sub> の含量が増加することが報告されている<sup>18-20</sup>。それ以外にも、蒸製により酸性多糖類、総フェノール類などの含有量も増加することが報告されている<sup>18</sup>。Kim らは、マウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞に対する分裂促進因子活性化プロテインキナーゼ (MAPK) 経路を介する炎症性サイトカインであるインターロイキン (IL) -6 と腫瘍壊死因子 (TNF) - $\alpha$  の産生促進活性は、ニンジンエキスよりもコウジンエキスの方が強いことを示している<sup>21</sup>。以上のように、オタネニンジン根を蒸製することで、より強い薬理活性を示すことが認められている。

伝統医学における「気」は、生体内で機能している目に見えないエネルギーとされ、中医学ではその役割として、推動、温煦、防御、固澁、気化作用があるとされている<sup>22</sup>。そのうちの防御作用は、現代医学では免疫系を意味することが予想される。また、生体内で「気」を作る器官は、現代医学での消化管を意味する「脾」とされている<sup>22</sup>。太田らは、古文献にある記載の解析から、「蒸製」の目的は生薬の「補脾」作用を増強することであると考証した<sup>23</sup>。「補脾」とは、「気」を生み出す「脾」の機能を高め、結果的に生体における「気」を活性化させることにつながる<sup>22</sup>。従って、「補気」により「気」の防御作用が活性化されるならば、それは現代医学では免疫賦活作用と翻訳することができる。

顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) は、顆粒球の増殖、分化および成熟に促進し<sup>24-26</sup>、がん化学療法の副作用である発熱性好中球減少症に対する治療薬としても使用されている<sup>27</sup>。これまでに、G-CSF はマウスにおいてマクロファージを腸管膜に動員することで大腸炎を改善したり<sup>28</sup>、マウス消化管バリア損傷モデルに対して G-CSF がその腸陰窩と絨毛の形態を再構築して症状を改善する<sup>29</sup>ことが、報告されている。松本らは、補中益気湯エキスや LPS で刺激した培養マウス結腸上皮由来 MCE301 細胞についてマイクロアレーを用いて解析した結果、様々なサイトカイン類のうち G-CSF のみ有意に発現が増加することを見いだした<sup>30</sup>。その結果を受け、筆者が所属する研究室では、補中益気湯を構成する生薬

の1つであり、補気薬に分類されるビャクジュツのエキスが、MCE301細胞においてG-CSFの産生を誘導する活性を持つことを明らかにした<sup>31)</sup>。さらに筆者が所属する研究室では、蒸製により「補気」作用が増強するとされる生薬のジオウについても検討を行い、確かに蒸製によりそのエキスのG-CSF産生誘導活性が増強することが報告した<sup>23)</sup>。生薬のカンゾウは、ハチミツに生薬を浸してから炙るという蜜炙と呼ばれる修治を施してシャカンゾウとすることで、「補気」作用が増強することが予想されるが、確かにカンゾウのエキスのG-CSF産生誘導活性は蜜炙により増強し<sup>32)</sup>、その増強はハチミツに含まれるイソマルトースによることが明らかとなっている<sup>33)</sup>。さらに、加熱したイソマルトースをマウスに経口投与した時、腸間免疫系を担うパイエル板における各種サイトカイン類や核内因子(NF)κBのmRNA発現が誘導された<sup>34)</sup>。以上のことから、MCE301細胞を用いたG-CSF産生誘導活性試験は、伝統医学における「補気」作用を評価できる実験系であると言える。

そこで本研究では、以上の知見<sup>23, 32, 33)</sup>に基づき、補気薬の代表とも言える生薬のニンジンにおいて、蒸製してコウジンとすることにより、その「補気」作用が増強するかどうか、さらに、蒸製時間や産地の異なるコウジンのサンプル間でその活性を比較することで、コウジンを原料とした滋養強壮剤や保健食品を開発する際に利用できる、優良品種の選別法や至適加工条件に関する科学的なエビデンスを提供する目的とした研究を行った。

# 本論

## 第一章 中国吉林省産オタネニンジン蒸製産物の G-CSF 産生誘導活性

2019年10月、中国吉林省より新鮮なオタネニンジン根 (Sample A) 12本を入手した。それらを3本ずつ分け、それぞれ0、1.5、3および6時間蒸製した。乾燥させた後、側根と主根を分け、刻んだ。各群の主根と側根の写真を Fig. 1 に示す。蒸製時間が長くなるほど、主根、側根ともに、表皮の色が赤くなったことが確認できた。

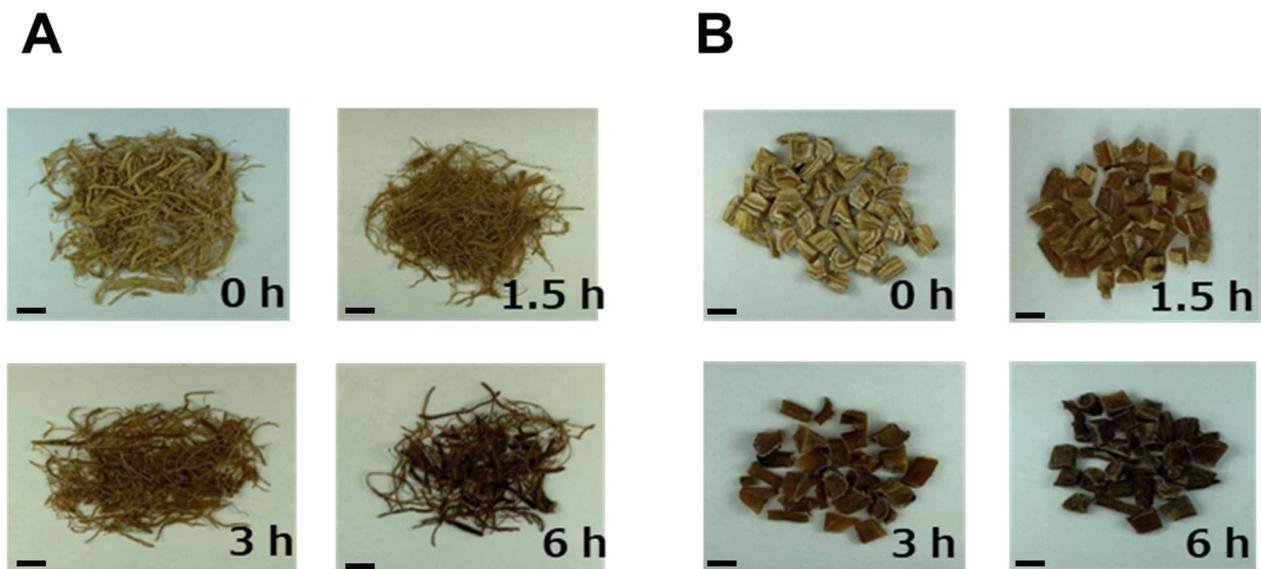


Fig. 1 蒸製時間の異なる刻んだ側根(A)と主根の写真(B)

**Table 1 中国産オタネニンジン根 (Sample A) のエキスの抽出効率**

蒸製時間	側根の抽出効率 (%)	主根の抽出効率 (%)
0	22.4 ± 1.3	32.8 ± 3.7
1.5	27.9 ± 2.5	28.3 ± 1.1
3	29.6 ± 1.1	27.0 ± 0.9
6	31.2 ± 6.7*	27.4 ± 0.7

データは、個体数 ( $n = 3$ ) あたりの平均 ± 標準誤差を示す。

Dunnett の多重比較検定で、\* $p < 0.05$  vs 0 時間 (未蒸製) 群。

その後、各群サンプルにつき、熱水エキスを調製し、それぞれの抽出効率を計算した。その結果、側根において、抽出効率が蒸製時間依存性的に増加し、6 時間まで有意な変化を見出した。一方、主根では有意な変化は認められなかった (Table 1)。

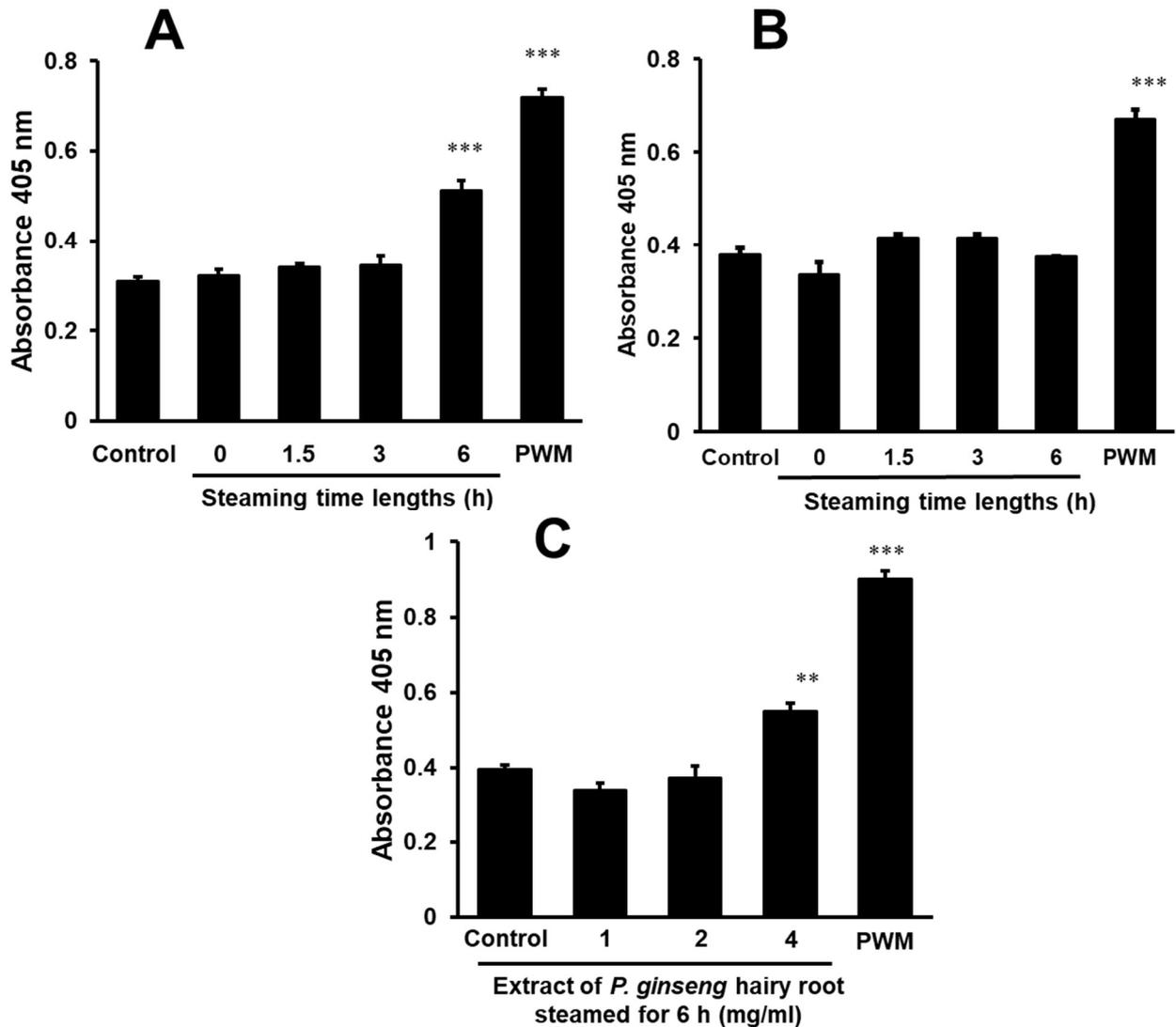


Fig. 2 各種蒸製時間の異なるオタネニンジン側根エキスの G-CSF 産生誘導活性

蒸製時間の異なるオタネニンジン側根 (A) および主根 (B) エキスの G-CSF 産生誘導活性。6 時間蒸製オタネニンジン側根エキスの G-CSF 産生誘導活性の濃度依存性 (C)。データは、オタネニンジン根、個体あたりの結果を 3 wells 分の平均とし、個体数  $n = 3$  における平均  $\pm$  標準誤差を示した。Control 群は、培地のみで培養した 3 wells の結果、陽性コントロールである PWM (pokeweed mitogen) <sup>31)</sup>は、100  $\mu\text{g/ml}$  添加した培地で培養した 3 wells の結果における平均  $\pm$  標準誤差を示した。統計処理は、Bonferroni-Dunnnett の多重比較検定を行った。\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs control 群。

得られた各群の熱水エキスを含む培地で MCE301 細胞を 24 時間培養し、培養上清中の G-CSF の量を酵素結合免疫吸着法 (ELISA) を用いて測定した。その結果、6 時間蒸製した側根サンプルで有意な G-CSF 産生誘導活性が認められた (Fig. 2A) 一方、主根では有意な活性は認められなかった (Fig. 2B)。6 時間蒸製したサンプルでは、4 mg/ml から有意な活性を見出した。 (Fig. 2C)。

6時間蒸製オタネニンジン側根エキスの G-CSF 産生誘導活性の出現の時間依存性を評価した。6時間蒸製コウジン側根エキスを含む培地で、MCE301 細胞を 6~24 時間培養し、培地中の G-CSF 量を測定した。その結果、陽性コントロールである PWM は、6 時間の培養で有意な G-CSF 産生誘導活性の出現が見られ、その後、培養時間を伸ばしても有意な変化は認められず、6 時間の培養でその活性が飽和した一方で、6 時間蒸製コウジン側根エキスでは、9 時間の培養から有意な活性が出現し、24 時間後まで増加し続けた (Fig. 3)。

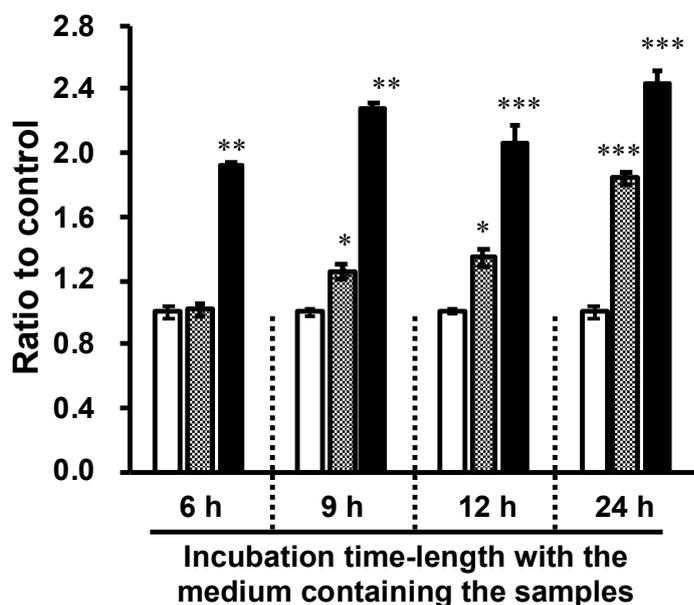


Fig. 3 6 時間蒸製オタネニンジン側根エキスの G-CSF 産生誘導活性の時間依存性

6 時間蒸製オタネニンジン側根エキス 4 mg/ml (グレー) または PWM (100  $\mu$ g/ml, 黒) を含む培地で、MCE301 細胞を 6、9、12 および 24 時間、培養した。データはサンプルを添加しなかった control 群 (白) に対する 405 nm における吸光度の割合を平均  $\pm$  標準誤差 ( $n = 3$ ) 示した。統計処理は、Bonferroni-Dunnnett の多重比較検定を行った。 $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  vs control 群。

## 第二章 中国吉林省産オタネニンジン側根エキスのギンセノシド類の分析

オタネニンジン根には、これまで 50 種類以上のトリテルペノイドサポニンであるギンセノシド類が発見されている<sup>35)</sup>。それらは、ダンマラン骨格に結合する水酸基の違いにより、大きく protopanaxadiol 系と protopanaxatriol 系に分けられる。Protopanaxadiol 系にはギンセノシド Rb<sub>1</sub>、Rg<sub>3</sub>、Rd、Rc、F<sub>2</sub>、compound K などが、protopanaxatriol 系にはギンセノシド Rg<sub>1</sub>、Rg<sub>2</sub>、Rh<sub>1</sub> などがある。日本薬局方では、ニンジンの指標成分としてギンセノシド Rb<sub>1</sub> とギンセノシド Rg<sub>1</sub> を規定している<sup>1)</sup>。

トリテルペノイドサポニンの化学構造内には、疎水性の高いトリテルペノイドからなるアグリコンと親水性の高いグルコースが含まれ、配糖体と呼ばれる化学構造をしている。新鮮なオタネニンジン根を蒸製すると、根の pH が低下し酸性度が高まり、エーテル結合、エステル結合部が加水分解することにより、ギンセノシド類の脱マロニル化、脱カルボキシル化、脱グリコシル化が見られる他、脱水反応も起こる<sup>36)</sup>。脱グリコシル化は、ダンマラン骨格における 3 または 6 位よりも、20 位において発生しやすい<sup>36)</sup>。

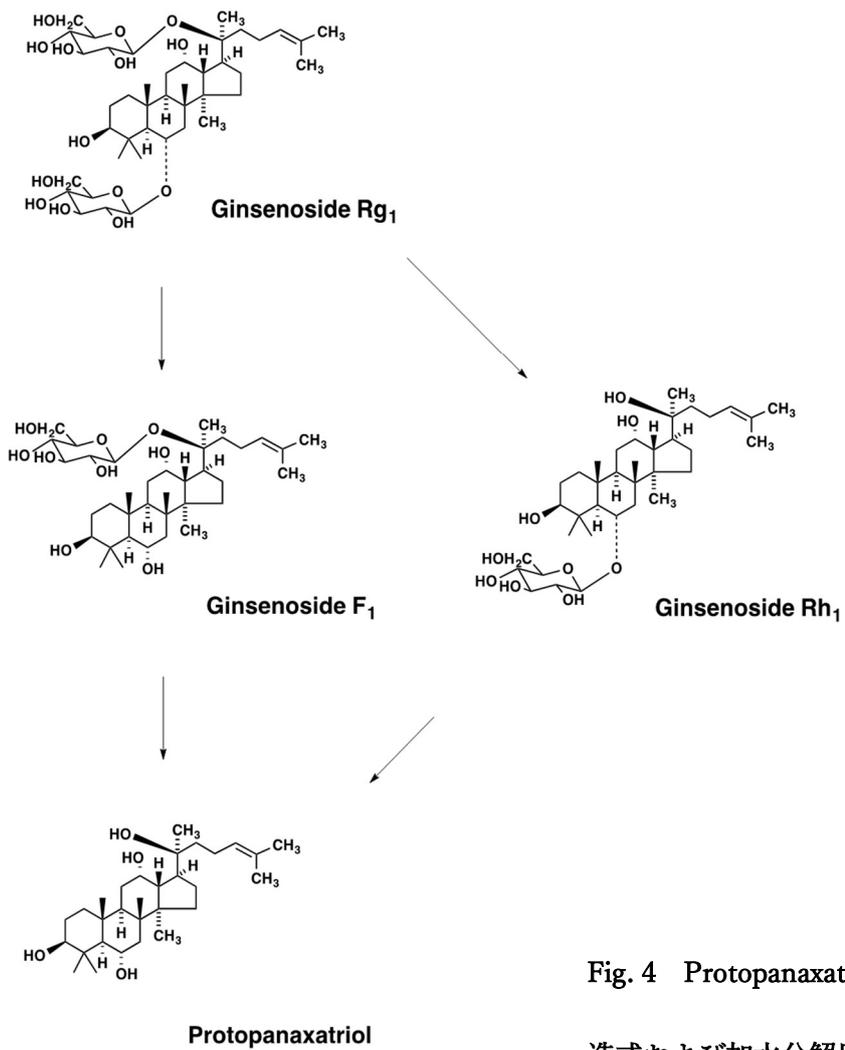


Fig. 4 Protopanaxatriol 系ギンセノシド類の化学構造式および加水分解反応

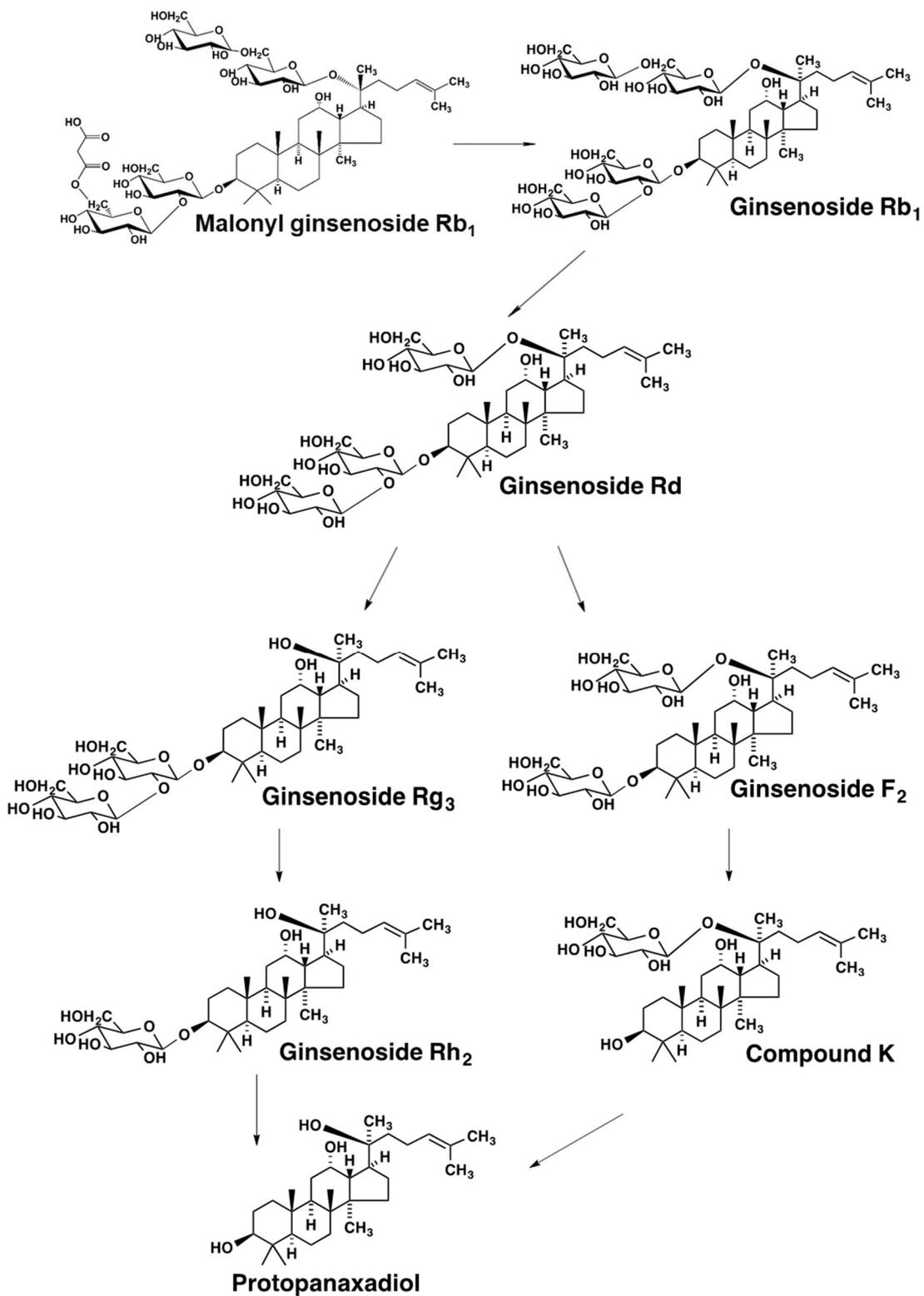


Fig. 5 Protanaxadiol系ギンセノシド類の化学構造式および加水分解反応

このことから、蒸製により、ギンセノシド Rg<sub>1</sub> と Rb<sub>1</sub> は、糖部が脱離し、より極性の低いギンセノシ

ド類へ変換され (Fig. 4、5)、このことがニンジンよりもコウジンの方がより高い有用性を持つという、伝統医学的知識の根拠とされている<sup>37)</sup>。

そこで、蒸製時間の異なるオタネニンジン側根エキス中のギンセノシド類の変化を、HPLCにより分析した。その結果、各種蒸製したオタネニンジン側根エキスに含まれるギンセノシド Rg<sub>1</sub>、Rb<sub>1</sub> の含有量は、いずれも日本薬局方<sup>1)</sup>におけるコウジン、中国薬典<sup>2)</sup>における紅参の規定を満たしていた。また、蒸製時間が長くなるにつれ、ギンセノシド Rg<sub>1</sub> の含有量が減少し、その加水産物であるギンセノシド Rd/F<sub>1</sub>、Rg<sub>3</sub> と、グルコース部がすべて脱離した protopanaxatriol の含有量の増加が見られた。一方、ギンセノシド Rb<sub>1</sub> の含有量は有意な変化は認められなかった。特に、他のサンプルと比較して、6 時間蒸製コウジン側根エキスにおいて 40.0～48.0 分にかけて、いくつか新たなピークが現れた。そのうち、過去のデータ<sup>19,38)</sup>と比較した結果、溶出時間 46.5 と 46.9 分に現れたピークは、それぞれギンセノシドと Rk<sub>1</sub> と Rg<sub>5</sub> 推定された (Fig. 6、7、8)。



Fig. 6 蒸製時間の異なるオタネニンジン側根エキス  
のクロマトグラム  
HPLC 条件は、実験の部に記す。  
Rg<sub>1</sub>, Rb<sub>1</sub>, Rd, F<sub>1</sub> および Rg<sub>3</sub> は、  
それぞれギンセノシド Rg<sub>1</sub>, Rb<sub>1</sub>, Rd, F<sub>1</sub> および Rg<sub>3</sub>  
である。PPT は、protopanaxatriol である。

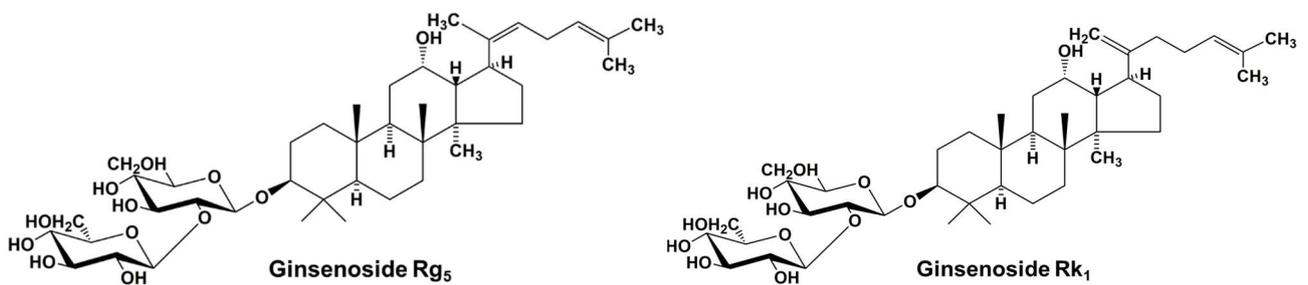


Fig. 7 Ginsenoside Rg<sub>5</sub> と Rk<sub>1</sub> の化学構造式

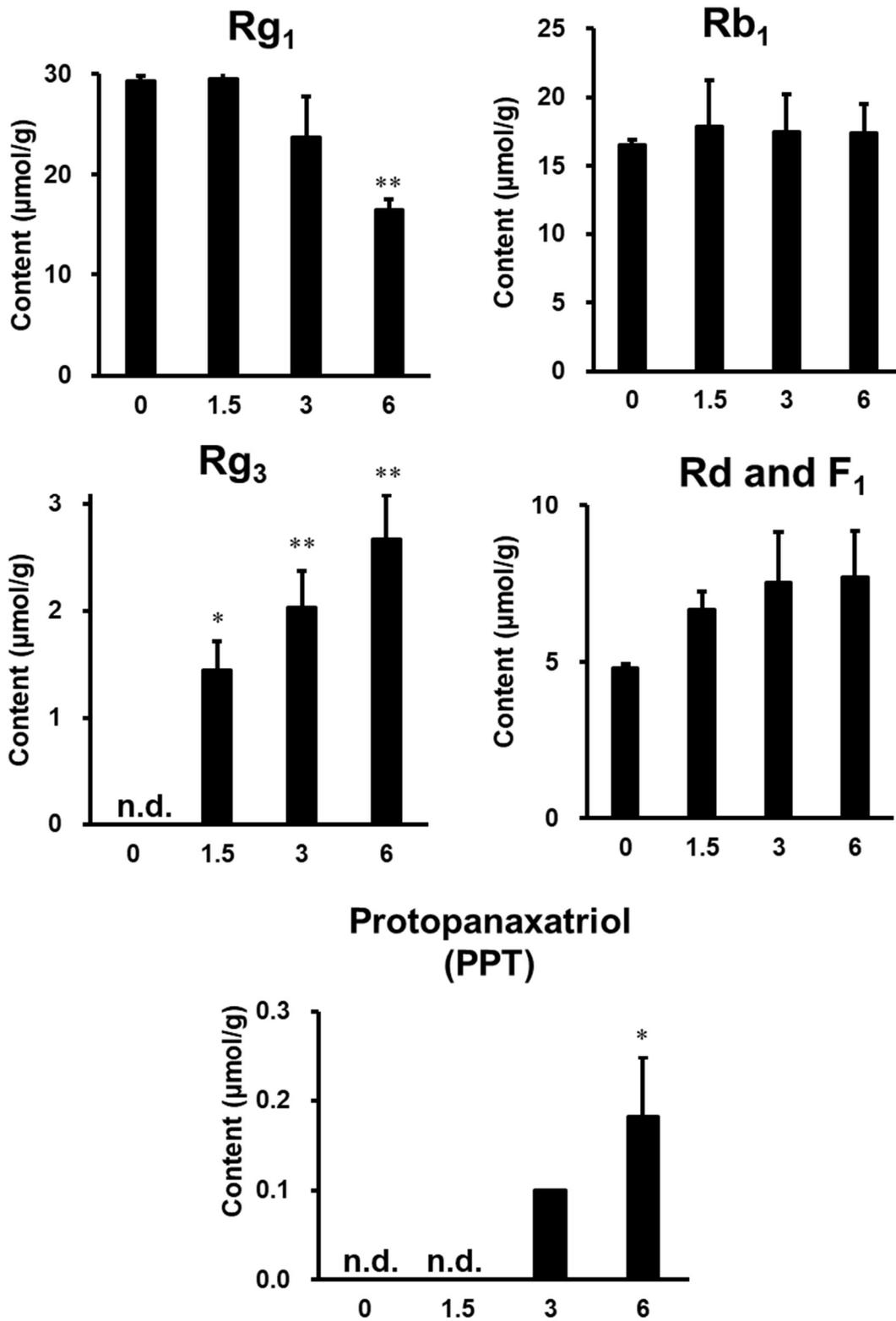


Fig. 8 蒸製時間の異なるオタネニンジン側根エキス中のギンセノシド類含有量の変化  
 データは、オタネニンジン根、個体あたりの結果を 3wells 分の平均とし、個体数  $n=3$  における平均±標準誤差を示した。n.d.は未検出。統計処理は、Dunnnett の多重比較検定を行った。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs 0 h 群。

### 第三章 中国吉林省産オタネニンジン側根エキスの G-CSF 産生誘導活性の活性成分

筆者が所属する研究室では過去に行われた研究で、イソマルトースを加熱したときに出現する G-CSF 産生誘導活性の活性成分は、平均分子量が 790 kDa であるグルコース重合体から成る高分子化合物であった<sup>32)</sup>。そこで、オタネニンジン側根エキスを蒸製したときに出現する G-CSF 産生誘導活性成分も、高分子化合物が関与している可能性について検討した。

有意な活性が認められた 6 時間蒸製オタネニンジン側根エキスを、透析により高分子画分と低分子画分に分画した。それぞれの分画物をサイズ排除 HPLC で分析した結果、未蒸製オタネニンジン側根エキスと比較して、6 時間蒸製オタネニンジン側根エキスでは、5.5 分をトップとする新たなピークが出現し、透析によりそのピークと、他のピークと分離することができた。分子量マーカーを分析した時の溶出時間より分子量を計算した結果、5.5 分のピークの平均分子量は 758 kDa と算出された (Fig. 9)。

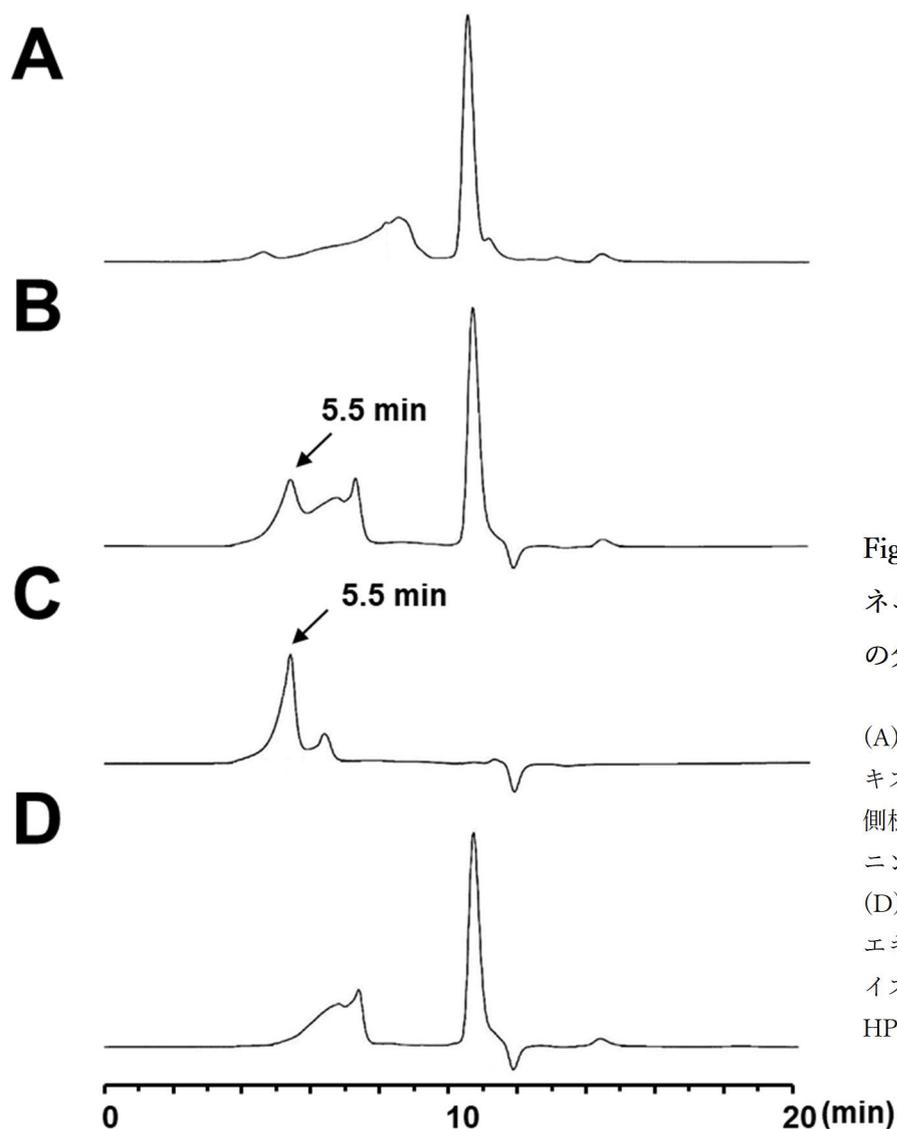


Fig. 9 未蒸製、6時間蒸製オタネニンジン側根エキスおよびその分画物のクロマトグラム

(A) 未蒸製オタネニンジン側根のエキス、(B) 6時間蒸製オタネニンジン側根エキス、(C) 6時間蒸製オタネニンジン側根エキスの高分子画分、(D) 6時間蒸製オタネニンジン側根エキスの低分子画分、それぞれをサイズ排除 HPLC により分析した。HPLC 条件は実験の部に記載した。

6時間蒸製オタネニンジン側根エキス高分子画分と低分子画分、それぞれの G-CSF 産生誘導活性を評価した。その結果、高分子画分に有意な活性を認め、6時間蒸製オタネニンジン側根エキスの G-CSF 産生誘導活性成分は高分子画分に移行したことが確認できた一方で、低分子画分では対照群と比較して有意に低い値が見られた (Fig. 10)。その原因として細胞毒性の可能性と考え、トリパンプルー法で高分子画分と低分子画分、それぞれの生細胞数を測定した。その結果、高分子画分または低分子画分を含む培地で処理した時の対照群に対する生細胞数の割合は、それぞれ 116%と 78%であった。

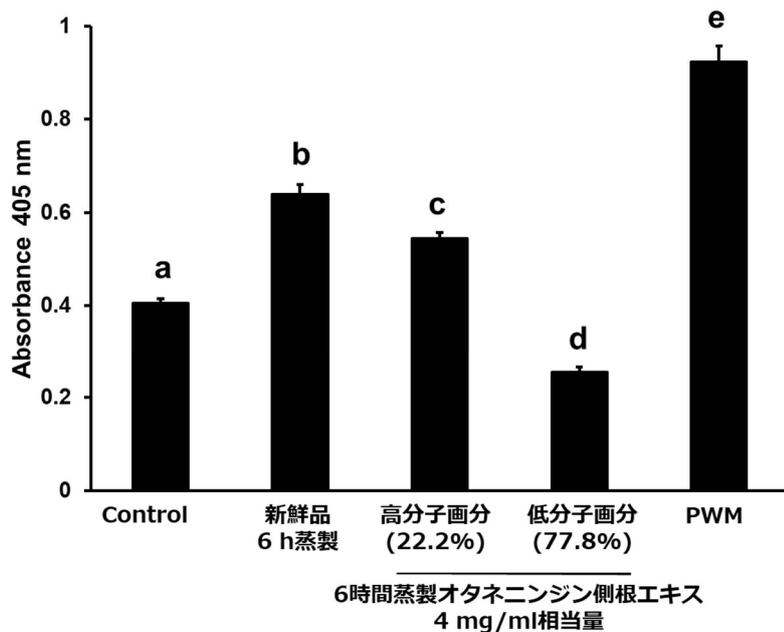


Fig. 10 6時間蒸製オタネニンジン側根エキスの透析分画物のG-CSF産生誘導活性

6時間蒸製オタネニンジン側根エキスの高分子画分および低分子画分(それぞれ元のエキス4 mg/ml相当量、割合は元のエキスに対する収率を示す)またはPWM (100 µg/ml)を含む培地で、MCE301細胞と24時間培養し、培養上清中のG-CSF量を測定した。データは平均±標準誤差 (n=6)で表記した。統計処理は、Bonferroni-Dunnettの多重比較検定を行い、異なるアルファベットの間で  $p < 0.05$  の差がある。

G-CSF産生誘導活性が、イソマルトースなどの低分子糖類が酸化重合したものである可能性について検討した。未蒸製オタネニンジン側根エキスの低分子糖類の組成についてHPLCによる分析した結果、フルクトース、グルコース、スクロースおよびマルトースが検出された一方で、イソマルトースは検出限界以下であった (Fig. 11)。

そのうち、相対的に含有量が高かったスクロースとマルトースを6時間蒸製し、それぞれのG-CSF産生誘導活性を評価した。その結果、6時間蒸製スクロースエキスは有意な活性を認められず、マルトースを6時間蒸製することで、有意なG-CSF産生誘導活性が現れたが、その活性はごくわずかであった (Fig. 12)。

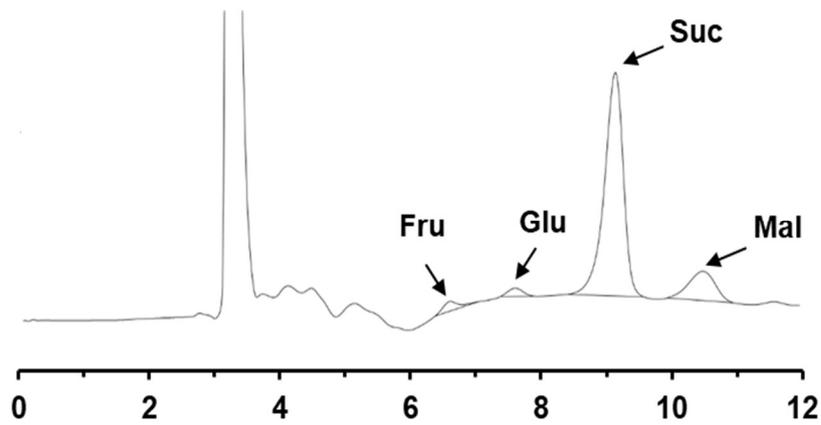


Fig. 11 未蒸製オタネニンジン側根エキスの低分子糖類のクロマトグラム

HPLC 条件は実験の部に記した。Fru、Glu、Suc および Mal は、それぞれフルクトース、グルコース、スクロース、マルトースを示す。標品の分析から、イソマルトースは 11.0 分に溶出するはずであったが、ピークは検出されなかった。

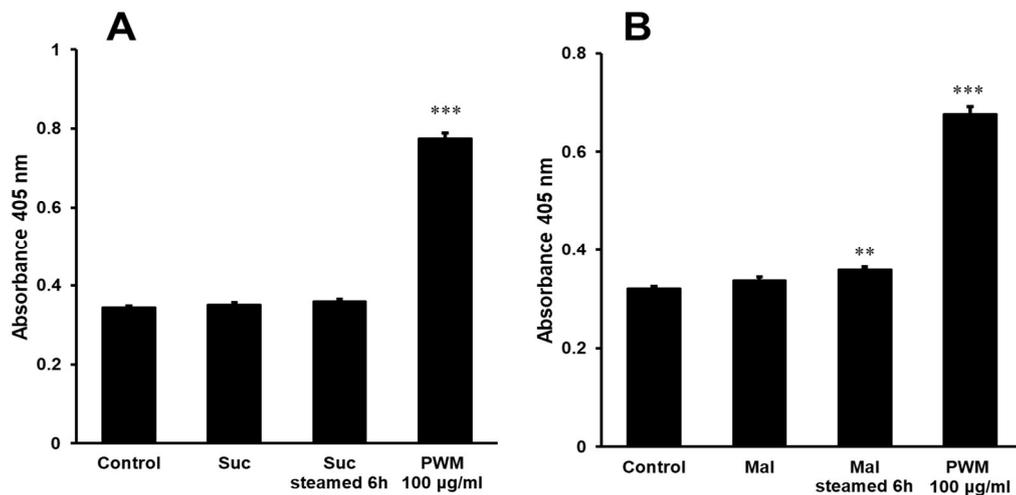


Fig. 12 6時間蒸製スクロースとマルトースエキスの G-CSF 産生誘導活性

未蒸製、6時間蒸製スクロース (Suc) とマルトース (Mal) エキス (4 mg/ml) または PWM (100 µg/ml) を含む培地で、MCE301 細胞を 24 時間培養し、培養上清中の G-CSF 量を測定した。データは平均±標準誤差 ( $n = 6$ ) で表記した。統計処理は、Dunnnett の多重比較検定を行った。\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs control 群。

#### 第四章 G-CSF 産生誘導活性出現におけるオタネニンジン側根の含水量および産地の差異

一般的に、コウジン(コウジン)は新鮮なオタネニンジン(オタネニンジン)の根から調製されるが、それでは年1回しかサンプルの入手ができないため、研究の継続性に問題があった。そこで、中国吉林省産オタネニンジン側根(サンプル A) の新鮮品を乾燥後、室温で保存したものを原料として、6 時間、蒸製したもののエキスを作製し、オタネニンジン側根の新鮮品と乾燥品との間の G-CSF 産生誘導活性を比較した。その結果、オタネニンジン側根を 6 時間蒸製したもののエキスは、乾燥品と新鮮品と同程度の活性が認められ、乾燥品と新鮮品との間に差はなかった (Fig. 13)。

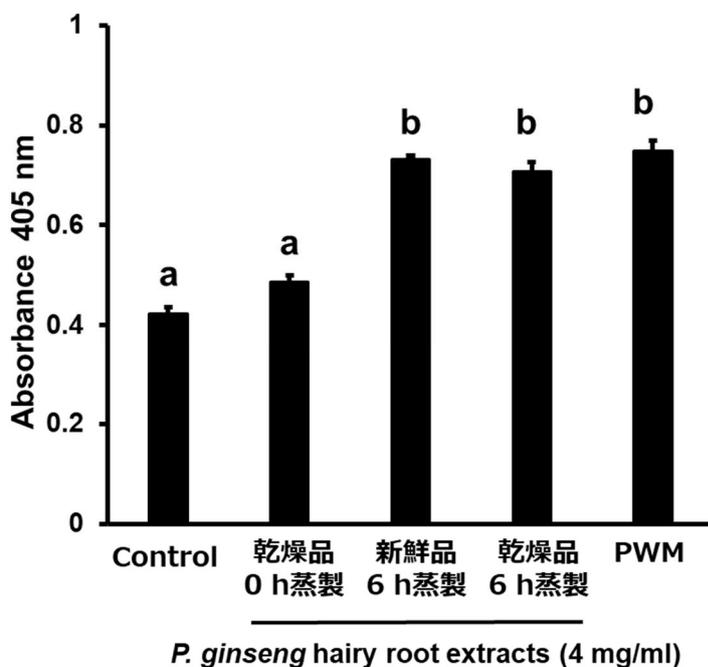


Fig. 13 含水量の異なるオタネニンジン側根エキスの G-CSF 産生誘導活性

含水量の異なるオタネニンジン側根エキス (Sample A, 4 mg/ml) または PWM (100  $\mu$ g/ml) を含む培地で、MCE301 細胞を 24 時間培養し、培地上清中の G-CSF 量を測定した。データは、オタネニンジン根、個体あたりの結果を 5 wells 分の平均とし、個体数  $n=3$  における平均 $\pm$ 標準誤差を示した。統計処理は、Bonferroni-Dunnett の多重比較検定を行い、異なるアルファベットの記号間で  $p < 0.05$  の差がある。

第一章の結果では、新鮮なオタネニンジン側根を 6 時間の蒸製による有意な G-CSF 産生誘導活性が現れたが、飽和に達していなかったため、至適蒸製時間がそれ以上である可能性があった。しかし、吉林省産オタネニンジン側根 (Sample A) の追加入手は困難であった。そこで、長野県産オタネニンジン側根 (Sample D) 新鮮品 1 ロットを、ランダムに 4 群に分け、それぞれ 0、6、9 および 12 時間蒸製し

た。乾燥後、約 1 cm 程度の長さに切断した。各群の写真を Fig. 14 に示す。吉林省産オタネニンジン側根と同様、蒸製時間が長くなるほど、各群、表皮の色が赤くなったことが確認できた。未蒸製品と比較して 6 時間蒸製品では、高い抽出効率が認められたが、それ以上の蒸製で抽出効率の増加は認められなかった (Table 2)。

得られた各熱水エキスを含む培地で MCE301 細胞を 24 時間培養し、培養液中の G-CSF の量を測定した。その結果、オタネニンジン側根の G-CSF 産生誘導活性は、9 時間の蒸製時間まで時間依存的に増加し、そこで飽和した (Fig. 15)。このことから、G-CSF 産生誘導活性を指標としたときのオタネニンジン側根の至適蒸製時間は、9 時間と示された。

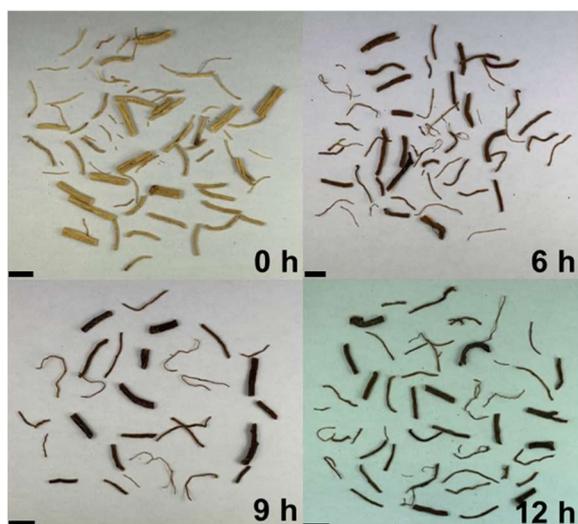


Fig. 14 蒸製時間の異なるオタネニンジン側根 (Sample D) の写真

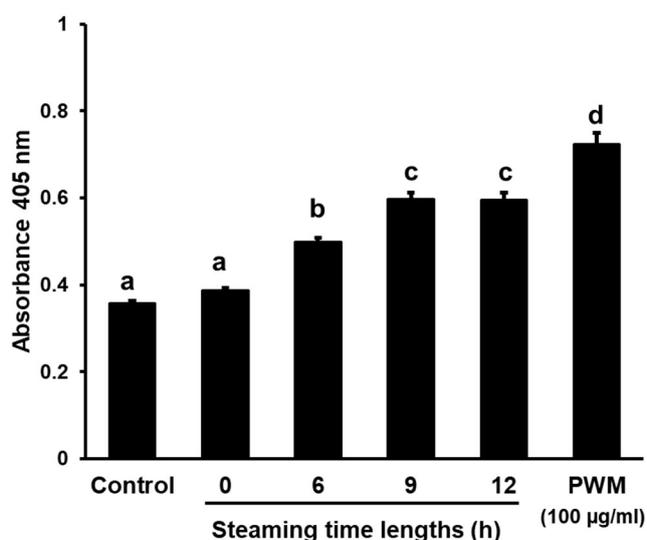


Fig. 15 蒸製時間の異なる日本産オタネニンジン側根エキスの G-CSF 産生誘導活性

蒸製時間の異なる日本産オタネニンジン側根エキス (Sample D, 4 mg/ml) または PWM (100 µg/ml) を含む培地で、MCE301 細胞を 24 時間培養し、培地の G-CSF 量を測定した。データは平均±標準誤差 ( $n=6$ ) で表記した。統計処理は、Bonferroni-Dunnnett の多重比較検定を行い、異なるアルファベットの記号間で  $p < 0.05$  の差がある。

産地による G-CSF 産生誘導活性の差を評価するため、日本でのニンジンの産地である長野と福島県からオタネニンジン側根の新鮮品と乾燥品 (Sample D~I、M-O)、名古屋市立大学薬学部に標本として保管された中国産オタネニンジン側根の乾燥品 (Sample B)、栃本天海堂で市販されている乾燥ヒゲニンジン (Sample C) それぞれの熱水エキスを調製し、未蒸製のままでのそれぞれの G-CSF 産生誘導活性を評価した。

各サンプルに関する情報は Table 2 に表記した。産地の異なる未蒸製のオタネニンジン側根エキスの抽出効率は、およそ 20%程度であった。産地の異なるオタネニンジン側根エキスは、いずれも蒸製前では有意な G-CSF 産生誘導活性を認められなかった (Fig. 16)。

**Table 2 オタネニンジン側根に関する情報とそれらから得たエキスの抽出効率**

Sample code	産地	状態	蒸製時間	入手元	Lot No. (年)	抽出効率(%)
B	中国吉林省	乾燥品	0	北京同仁堂	— (2017)	26.1
C	中国産	乾燥品	0	栃本天海堂	027919002	24.3
D	日本長野県	新鮮品	0	前忠	— (2021)	22.4
D	日本長野県	新鮮品	6	前忠	— (2021)	44.1
D	日本長野県	新鮮品	9	前忠	— (2021)	44.8
D	日本長野県	新鮮品	12	前忠	— (2021)	44.7
E	日本福島県	乾燥品	0	前忠	— (2019)	21.8
E	日本福島県	乾燥品	9	前忠	— (2019)	39.9
F	日本福島県	乾燥品	0	前忠	— (2020)	24.5
G	日本長野県	乾燥品	0	前忠	— (2013)	18.4
H	日本長野県	乾燥品	0	前忠	— (2019)	18.6
H	日本長野県	乾燥品	9	前忠	— (2019)	51.6
I	日本長野県	乾燥品	0	前忠	— (2020)	24.1
J	中国吉林省	乾燥品	0	前忠	93-16782 (1998)	21.7
J	中国吉林省	乾燥品	9	前忠	93-16782 (1998)	41.2
K	中国吉林省	乾燥品	0	前忠	93-25692 (2004)	17.8
K	中国吉林省	乾燥品	9	前忠	93-25692 (2004)	48.2
L	中国吉林省	乾燥品	0	前忠	93-5496 (2017)	28.6
L	中国吉林省	乾燥品	9	前忠	93-5496 (2017)	46.6
M	日本福島県	乾燥品	0	清水薬草	3618AA (2020)	24.1
N	日本福島県	乾燥品	0	清水薬草	36181B (2020)	21.1
O	日本福島県	乾燥品	0	清水薬草	2618SB (2020)	22.1

北京同仁堂 (北京)、栃本天海堂 (大阪)、前忠 (下市、奈良)、清水薬草 (喜多方、福島)。

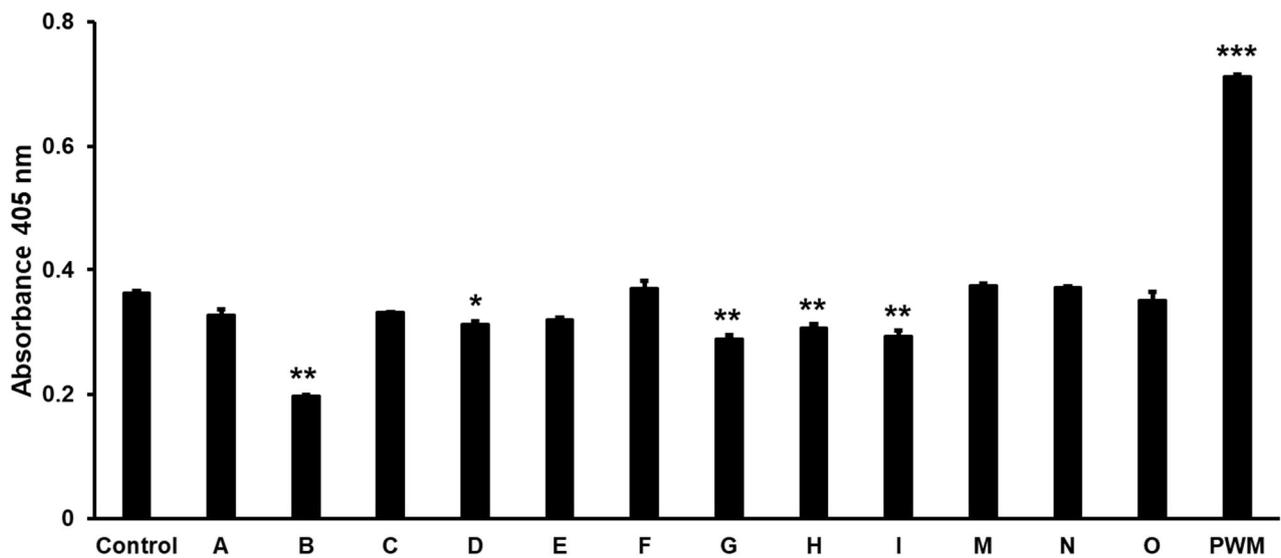


Fig. 16 未蒸製の各種、産地の異なるオタネニンジン側根エキスの G-CSF 産生誘導活性

未蒸製の各種、産地の異なるオタネニンジン側根エキス (4 mg/ml) または PWM (100 µg/ml) を含む培地で、MCE301 細胞を 24 時間培養し、培地上清の G-CSF 放出量を測定した。データは平均±標準誤差 ( $n=3$ ) で表記した。統計処理は、Dunnett の多重比較検定を行った。 $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  vs control 群。

更に、大量で入手できる市販の乾燥オタネニンジン側根 (Sample C) と、乾燥オタネニンジン側根 (Sample E、H、J-L) を、それぞれ 9 時間蒸製した。それらを乾燥させた後、熱水エキスを調製し、各 G-CSF 産生誘導活性を評価した。各サンプルでの抽出効率などに関する情報は Table 2 に表記した。

その結果、9 時間蒸製することで Sample H と L は有意な G-CSF 産生誘導活性を見出した一方、Sample C、E、J、K には活性の出現は認められなかった (Fig. 17)。

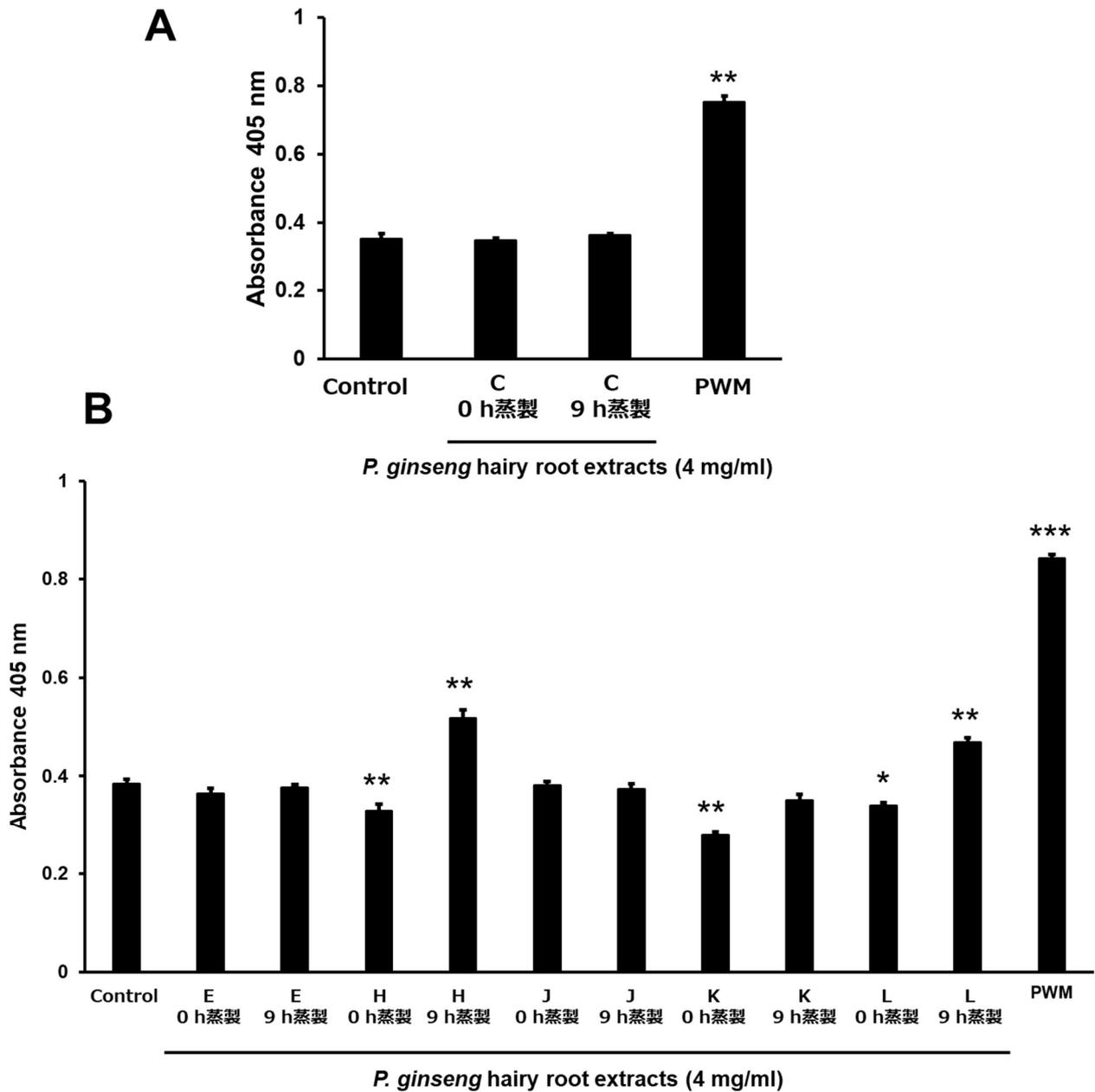


Fig. 17 0、9時間蒸製の各種、産地の異なるオタネニンジン側根エキスのG-CSF産生誘導活性

未蒸製（0時間）または9時間蒸製の乾燥オタネニンジン側根（Sample C）（A）または各種乾燥オタネニンジン側根（Sample E、H、J-L）（B）熱水抽出エキス（4 mg/ml）またはPWM（100 μg/ml）を含む培地で、MCE301細胞を24時間培養し、培地上清のG-CSF放出量を測定した。データは平均±標準誤差（n=6）で表記した。統計処理は、Dunnnettの多重比較検定を行った。 $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  vs control群。

以上のすべて ELISA の結果を確認するため、MCE301 細胞におけるオタネニンジン側根エキスの G-CSF mRNA 発現誘導作用を評価した。蒸製時間を 9 時間に最適化された日本産オタネニンジン側根 (Sample D) エキスを透析し、その高分子画分または PWM を含む培地で、MCE301 細胞と 1、2、4 および 6 時間培養し、G-CSF mRNA 発現量を quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) で測定した。

その結果、PWM では 1 時間の培養から有意な G-CSF mRNA 発現が見られた一方、9 時間蒸製オタネニンジン側根エキス高分子画分は、1 時間の培養では変化せず、6 時間から有意な mRNA 発現の誘導が認められた (Fig. 18)。

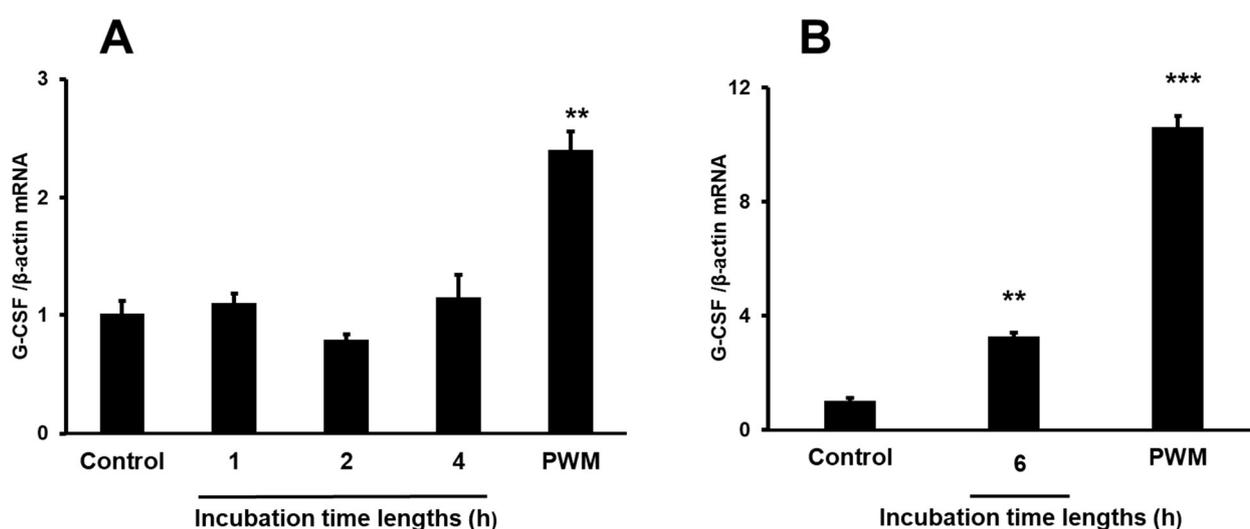


Fig. 18 9 時間蒸製オタネニンジン側根エキスの高分子画分による G-CSF mRNA 発現量の時間依存性

9 時間蒸製オタネニンジン側根 (Sample D) エキス高分子画分 (エキスとして 4 mg/ml) を含む培地で MCE301 細胞を 1、2、4 時間 (A)、または 6 時間 (B) 培養した。また、PWM (100  $\mu$ g/ml) を含む培地では、1 時間 (A) または 6 時間 (B) 培養した。細胞から mRNA を抽出し、G-CSF mRNA 発現量を測定した。内部標準として  $\beta$ -actin を利用し、データはサンプルを添加しなかった control 群に対する G-CSF mRNA の割合を平均  $\pm$  標準誤差 ( $n=6$ ) で示した。統計処理は、Dunnett の多重比較検定を行った。\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs control 群。

## 第五章 オタネニンジン側根エキスの G-CSF 産生誘導活性のメカニズム

近年、自然免疫において特定の分子パターンを認識する受容体の存在が次々と明らかとなり、パターン認識受容体 (PPRs) と名付けられている。PPRs は、その特徴によって、主に分泌型、エンドサイトーシス型、およびシグナル伝達型に分けられている<sup>39)</sup>。その中、マクロファージで発現している、シグナル伝達型に属する Toll 様受容体 (Toll-like receptors; TLRs) と、C 形レクチン受容体 (C-type lectin receptors; CLR) がよく知られているが、消化管上皮細胞にもその一部が発現している。TLRs は、主に細胞膜に局在する TLR1、TLR2、TLR5 と、リソソーム膜やエンドソームに局在する TLR7、TLR8、TLR9 が知られている<sup>40)</sup>。また、ミエロイド系分化因子 (MyD) 88 は、TLR3 以外のすべての TLRs のアダプター分子として動き、NF- $\kappa$ B や MAPKs を活性化させることで、炎症性サイトカイン/ケモカインの産生を誘導する。CLR は、カルシウム依存的に糖類やレクチンと結合する活性を持つ<sup>41)</sup>。多くの CLR は単独で細胞にシグナルを伝達することはできなく、他の PPRs と共同し、細胞内の炎症性サイトカインの産生を促進する<sup>42)</sup>。そのうち代表的な CLR として、 $\beta$ -グルカンを認識する Dectin-1 がある。Dectin-1 に  $\beta$  グルカンが結合すると、アダプター分子であるチロシンキナーゼ syk が活性化、さらにその下流にあるカスパーゼ動員ドメイン含有タンパク (CARD) 9 を経由して、NF- $\kappa$ B 経路が活性化される<sup>43,44)</sup>(Fig. 18)。一方、TLR 2 と TLR9 との間には、共同作用があり、MyD88/NF- $\kappa$ B 経路を活性化することで TNF- $\alpha$ 、IL-10 および IL-12 など炎症性サイトカインの産生を促進する (Fig. 19)<sup>45-47)</sup>。

加熱イソマルトースの G-CSF 産生誘導活性は、TLR2/4 に介することが明らかとなっている<sup>33)</sup>。また、本研究で陽性対象として使用している PWM は、TLR 2/9 を介して B 細胞の増殖を促進することが報告されている<sup>48)</sup>。

そこで、PPRs 阻害剤である spartolonin B (TLR 2/4 阻害薬、50  $\mu$ M)、TAK-242 (TLR4 阻害剤、50 mM)、ODN 2088 (TLR9 阻害薬、10  $\mu$ M)、laminarin (Dectin-1 阻害薬、100  $\mu$ g/ml) をそれぞれ

含む培地で 2 時間前処理した MCE301 細胞に対して、6 時間蒸製オタネニンジン側根 (Sample A) エキス高分子画分を含む培地でさらに 24 時間培養し、各阻害薬の作用を評価した。その結果、6 時間蒸製オタネニンジン側根エキスの高分子画分の G-CSF 産生誘導活性は、spartololin B には影響を受けず、ODN 2088 および laminarin により有意に抑制された。一方、PWM の活性は、spartololin B および ODN 2088 により有意に阻害され、laminarin 影響は認められなかった (Fig. 20)。

続いて、MCE301 細胞における TLR9 と Dectin-1 受容体 mRNA 発現を、qRT-PCR による評価した。陽性対照としてマウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞において同条件で qRT-PCR を行い、TLR9 と Dectin-1 の C<sub>T</sub>値の平均値を 34.2 と 28.5 と検出した一方で、MCE301 細胞では DNA の増幅が認められなかった。

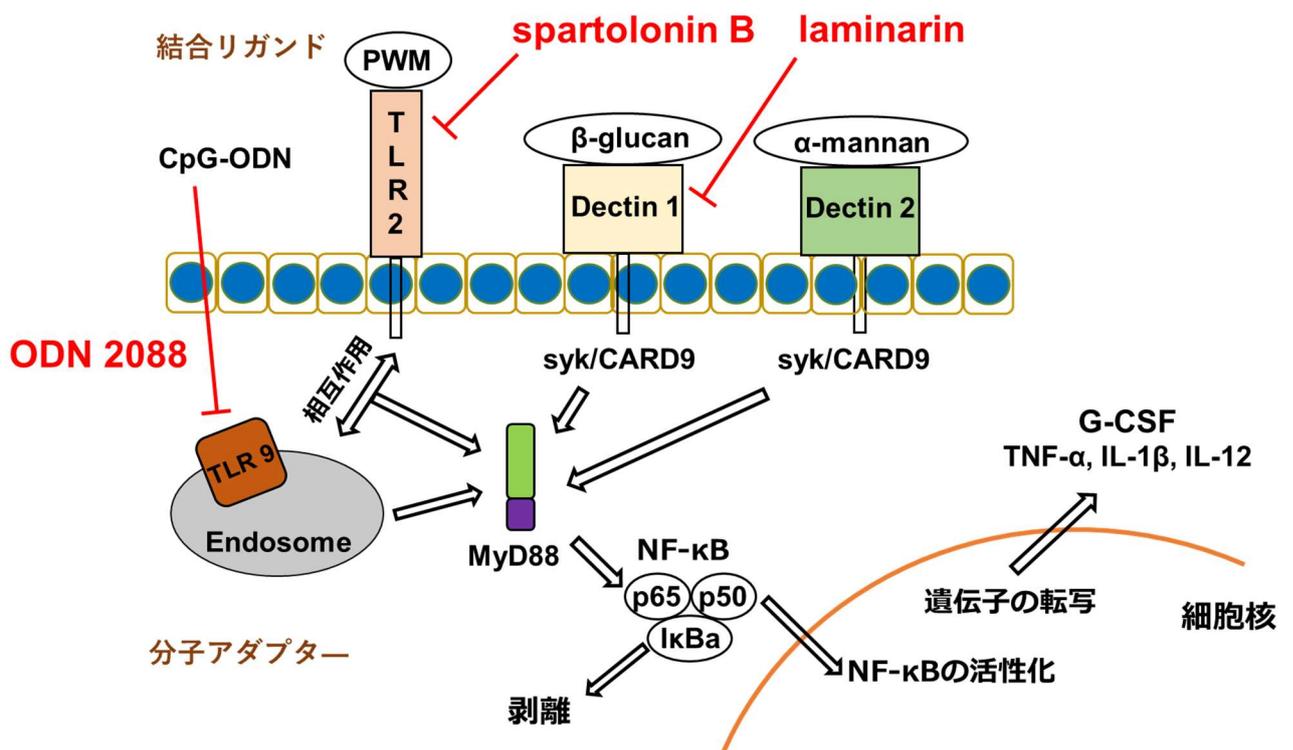


Fig. 19 パターン認識受容体 (PPRs) およびその阻害薬の経路模式図

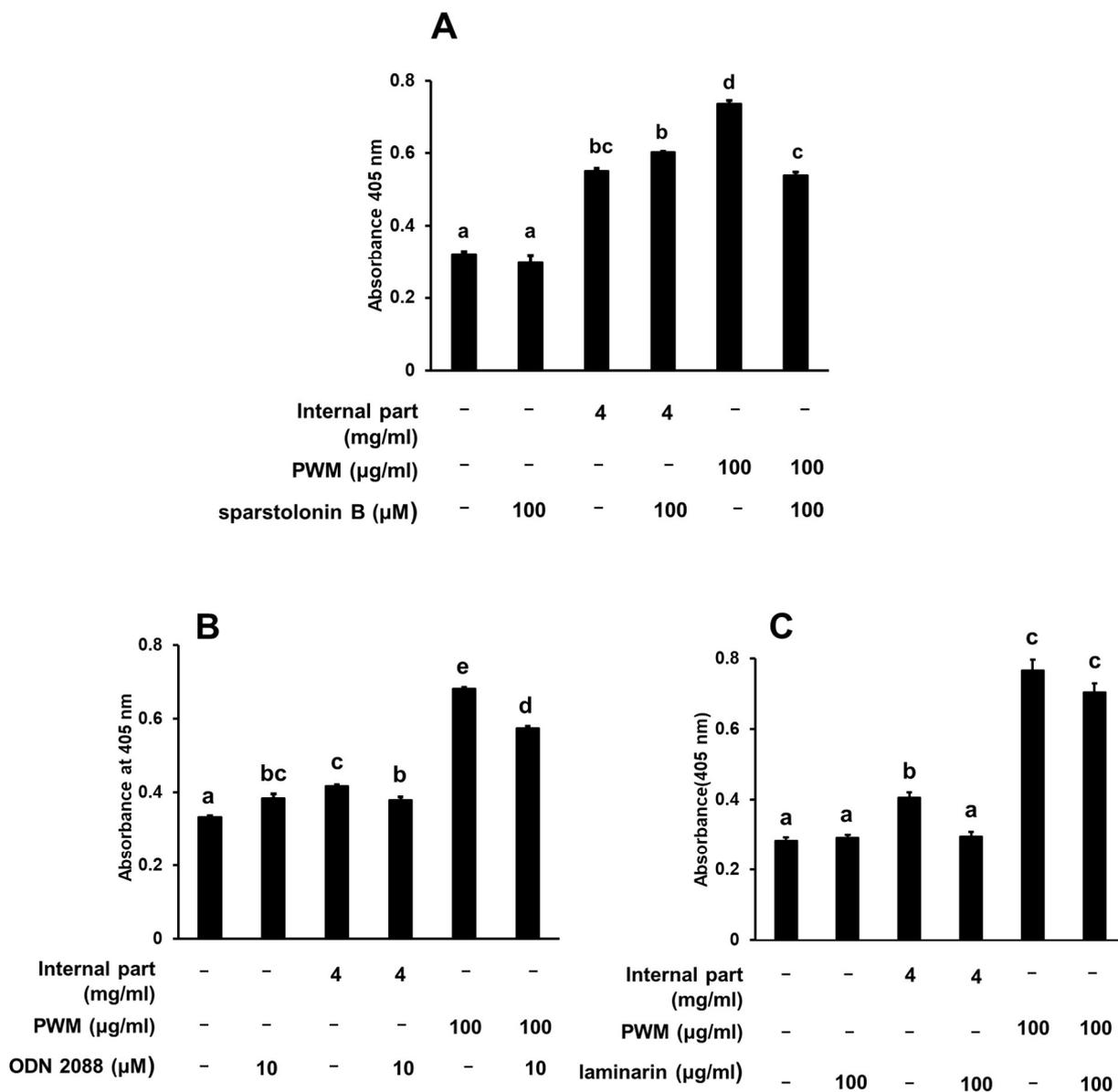


Fig. 20 6時間蒸製オタネニンジン側根エキス高分子画分の G-CSF 産生誘導活性に対する sparstolonin B (A)、ODN 2088 (B) および laminarin (C) の阻害作用

ODN 2088 と laminarin を含む培地で 2 時間の前培養後、各阻害薬と 6 時間蒸製オタネニンジン側根 (Sample A) エキス高分子画分 (エキスとして 4 mg/ml) または PWM を含む培地で、MCE301 細胞を 24 時間培養した。その後、培養上清中の G-CSF 量を測定した。データは平均±標準誤差 ( $n = 4$ ) で表記した。統計処理は、Bonferroni-Dunnnett の多重比較検定を行い、異なるアルファベットの記号間で  $p < 0.05$  の差がある。

この時点で、6時間蒸製中国産オタネニンジン側根 (Sample A) エキスをすべて使い切った。そこで、以降の実験は、9時間蒸製オタネニンジン側根 (Sample D) エキス高分子画分を用いて、TLRs よりも下流の経路への影響を探索した。

9時間蒸製オタネニンジン側根エキス高分子画分を含む培地で MCE301 細胞を6時間共培養し、MyD88 と NF- $\kappa$ B の mRNA 発現量を評価した。その結果、9時間蒸製オタネニンジン側根エキス高分子画分により、MyD88 mRNA では増加傾向 ( $p = 0.09$ ,  $n = 6$ )、NF- $\kappa$ B mRNA では有意な増加が認められた ( $p < 0.02$ ,  $n = 6$ ) (Fig. 21)。

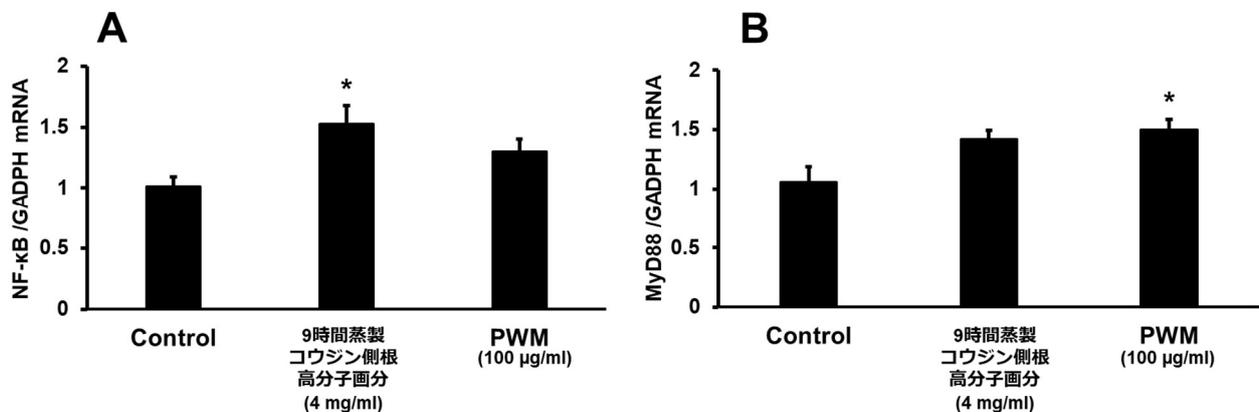


Fig. 21 9時間蒸製オタネニンジン側根エキスの高分子画分による NF- $\kappa$ B (A) と MyD88 (B) mRNA 発現量の変化

9時間蒸製オタネニンジン側根 (Sample D) エキス高分子画分 (エキスとして 4 mg/ml) または PWM (100  $\mu$ g/ml) で、MCE301 細胞と6時間培養した。細胞から mRNA を抽出し、NF- $\kappa$ B と MyD88 mRNA 発現量を測定した。データは、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内部標準として、サンプルを添加しなかった control 群に対する NF- $\kappa$ B と MyD88 の mRNA の割合を平均  $\pm$  標準誤差 ( $n = 6$ ) で示した。統計処理は、Dunnett の多重比較検定を行った。\* $p < 0.05$  vs control 群。

## 考 察

本研究では、G-CSF 産生誘導作用を指標として、古代からオタネニンジンによく行われた蒸製という  
修治方法の科学的な解明にエビデンスを提供した。具体的には、オタネニンジン側根を 6 時間以上蒸製  
することで、新たな顕著な G-CSF 産生誘導活性が出現することが明らかとなった。一方、未蒸製オタ  
ネニンジン側根においてはその活性は認められなかった。また、その活性を担う化合物は、平均分子量  
758 kDa の高分子化合物であった。このことから、6 時間の蒸製により、オタネニンジン側根内に G-  
CSF 産生誘導活性に寄与する新たな高分子化合物が生成したことが予想された。しかし、6 時間蒸製し  
たオタネニンジン主根では、その活性の出現は認められなかった。その理由として、主根は側根と比較  
して根の中心部の割合が多く、デンプンの含有量が相対的に高い一方で、根皮部に存在している低分子  
化合物の含量が少ないことが影響したと推定された。デンプンは多数のグルコースが  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) グリコ  
シド結合により重合した天然高分子化合物であり、免疫活性に関与することは認められていない<sup>49)</sup>。一  
方、根皮部に相対的に多く存在する低分子化合物が、蒸製に伴う加熱により酸化重合し、G-CSF 産生誘  
導活性に関与する高分子化合物へと変換したことが推定された。

これまでの研究では、ニンジンと比較してコウジンには、3 倍以上の酸性多糖類を含有することが知ら  
れている<sup>35)</sup>。その酸性多糖類は、マクロファージにおける NO と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の産生誘導活性や、貪食能を賦  
活する作用を持つ<sup>50-52)</sup>。本研究で明らかになったオタネニンジン側根を 6 時間蒸製したときに生じる化  
合物は、オタネニンジン側根に含まれるクエン酸などの有機酸と、単糖類、二糖類などが酸化重合する  
ことにより生じる酸性多糖類である可能性が考えられた。

ハチミツを加熱したときに出現する G-CSF 産生誘導活性を持つ高分子化合物は、それを加水分解し  
たときにはグルコースのみが検出されたこと、その生成には、グルコースやグルコースの二量体である  
マルトースやツラノースではなく、グルコース二分子が  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) 結合で結合したイソマルトースであ  
ることが明らかになっている<sup>33)</sup>。そこで、オタネニンジン側根においても、イソマルトースが蒸製した

ときの G-CSF 産生誘導活性出現に寄与した可能性を検討したが、分析の結果、オタネニンジン側根からイソマルトースは検出されなかった。イソマルトースを加熱したときに有意な活性が現れるのは、150°Cで4時間、180°Cで30分、200°Cで15分であった<sup>33)</sup>が、実際に100°Cの蒸製を6時間行っても活性は出現しなかった（各群の吸光度は、control群、 $0.52 \pm 0.01$ ；6時間蒸製イソマルトース処理群、 $0.52 \pm 0.01$  ( $p > 0.05$  vs control群)；PWM群、 $0.93 \pm 0.06$  ( $p < 0.001$  vs control群；Dunnetの多重検定により統計処理)。また、検出された低分子糖類のうち相対的に含有量が高かったマルトースを6時間蒸製したとき、僅かに有意な活性を示したが、オタネニンジン側根エキスの活性を説明できるほどの力価はなかった。このことから、6時間蒸製オタネニンジン側根エキスのG-CSF産生誘導活性を担う化合物は、マルトースなどの低分子多糖類と、クエン酸などの酸性化合物が酸化重合することにより生じた高分子化合物によると推定された。

生薬は天然由来医薬品であるため、その品質におけるバラツキは必然である。さらには、同じ天然素材を原料とする食品と比較して薬効を謳うことが出来る分、価格を高く設定できる一方で、一般人はその品質を正しく評価できないことから、偽物や粗悪品が流通しやすい。このことから、医薬品規制当局としては、薬局方などにおいて生薬の品質を一定に確保すること重要となる。

本研究では中国産、日本産それぞれのオタネニンジン側根を12ロット収集し、未蒸製のままでそれらのG-CSF産生誘導活性を評価した。その結果、未蒸製の側根ではすべてのサンプルにおいて有意な活性は認められなかった。この時、いくつかのサンプルではcontrol群より低い活性を示したが、その理由は後述するギンセノシド類による細胞毒性によるものと予想される。

オタネニンジン根の蒸製は、通常は新鮮品を原料にして行われる。そこで、2019年に中国吉林省を訪問してオタネニンジン根を採取して実験材料として使用し、側根を6時間蒸製することにより有意なG-CSF産生誘導活性が出現することを見出したが、6時間の蒸製で活性出現が飽和するかどうかは不明であった。しかし、追加の実験を行うにも、COVID-19の感染拡大に伴い、追加サンプルの再採取のため

に中国現地へ行くことが出来た。そこで、日本産のオタネニンジン側根の新鮮品を入手して、さらに長い時間の蒸製を行い、9時間の蒸製で G-CSF 産生誘導活性の出現が飽和することが明らかとなったことから、至適蒸製時間は9時間であることが示された。伝統的には、生薬を蒸製するときには、蒸製した後に乾燥させる（晒す）ことを9回繰り返す「九蒸九晒」と呼ばれる方法が至適であることが本草書に記載されている<sup>53)</sup>。しかし、時間を正確に記述することが出来なかった古代の本草書では、蒸製時間についての記載がない。オタネニンジンの根からコウジンを調製するときは、一般的には、1.5～3時間、蒸製するとされ<sup>15)</sup>、1934年に日本の生薬学者が旧満州国を調査したときの取材では2時間であったという調査報告がある<sup>16)</sup>。また、2019年にサンプルを入手するために吉林省を訪問したときのオタネニンジン根の加工業者での蒸製時間は1.5時間であった。従って、1回あたり1.5～3時間であれば、「九蒸九晒」を行えば、正味の蒸製時間は13.5～27時間となり、上述した至適蒸製時間の9時間と比較すると過剰となる可能性がある。今回、9時間の蒸製時間として最適化したときのサンプルは、2020年に入手した日本産オタネニンジン根の側根であった。前述したように、オタネニンジン根の品質のバラツキを考慮すると、やや過剰となるように蒸製時間を設定した方が、最終的に得られる修治された生薬の品質が安定すると予想され、古代の医師、薬師の経験が「九蒸九晒」という蒸製方法に反映されたものと考えられる。

産地別のオタネニンジン側根を至適蒸製時間9時間で蒸製することで現れた G-CSF 産生誘導活性は大きなバラつきを見出した。その中で、日本長野県産 Sample D と H は、6時間蒸製からでも有意な活性が出現したことから、他のサンプルよりも品質が高い可能性はある。また、採取年が1998年、2004年および2017年と異なる中国吉林省産 Sample J、K、L では、2017年の Sample L だけ、9時間蒸製で有意な活性が出現した。このことから、乾燥オタネニンジン側根を蒸製する時は、乾燥品でも保存期間が短いものほど蒸製による活性が出現しやすい、すなわち、乾燥状態でも長期間の保管の間に、本活性の出現に寄与する成分が分解・変性する可能性が考えられた。一方、福島県産 Sample E は2019年に取

穫されたものであるが、蒸製により活性が出現した吉林省 2017 年産の Sample L よりも新しいにもかかわらず、活性は出現しなかった。これらのことから、乾燥品においては、産地の違いによっても本活性の出現しやすさが異なる可能性も考えられた。コウジンを生産するときは基本的に新鮮なオタネニンジンの根を原料とするが、本研究では新鮮品は吉林産、長野県産でそれぞれ 1 ロットずつしか入手出来なかったものの、いずれも蒸製により活性が出現したことから、コウジンを生産するときに乾燥オタネニンジン根を原料として使用しない理由として、乾燥による本活性の出現の減弱または消失の可能性を回避するためと推測される。今後、さらに産地別、ロット別の新鮮品を入手して、その仮説を検証できることを期待したい。

蒸製オタネニンジン側根エキスの G-CSF 産生誘導活性は、TLR2 または TLR4 に対する阻害薬である sparsolonin B では阻害されず、TLR9 に対する阻害剤である ODN 2088 により部分的に、Dectin-1 に対する阻害薬である laminarin により完全に阻害された。また、本研究で陽性対照として使用した PWM の G-CSF 産生誘導活性も、ODN 2088 により部分的に有意に阻害された。以上のことから、蒸製オタネニンジン側根エキスの G-CSF 産生誘導活性は、TLR9 および Dectin-1 を介して発現することが予想された。しかし、qRT-PCR による結果では、MCE301 細胞においては TLR9 と Dectin-1 mRNA は検出されなかった。

一方、TLR9 に対する阻害薬として使用した ODN 2088 は、MCE301 細胞に対して単独で作用させたときに、対象群と比較して僅かではあったが有意な G-CSF 産生誘導活性が見られた。ODN 2088 の分子量は 4,874 であり、本化合物も細胞膜を透過しやすいとは言にくい分子サイズであることから、本化合物は TLR9 に直接リガンドとして作用したのではなく、他の細胞膜上に発現している PPRs に対して作用し、そのシグナル伝達経路を介して TLR9 を阻害する可能性が推定された。Dectin-1 に対する阻害薬として使用した laminarin は、昆布などの海藻に含まれる  $\beta$ -グルカンであり、 $\beta$ -1,3 結合により重合したグルコースの主鎖に、 $\beta$ -1,6 結合により重合したグルコース側鎖が枝分れ含まれる構造を持つ

こと<sup>54)</sup>、また、薬理活性として抗酸化、抗腫瘍作用などを持つことが知られている<sup>55,56)</sup>。Laminarin は Dectin-1 にリガンドとして結合し、他のアゴニストの結合を競合的に阻害することが明らかになっている<sup>57)</sup>が、他の PPRs に対する阻害活性については報告がなく、その Dectin-1 に対する結合の選択性は不明である。このことから、蒸製オタネニンジン側根エキスの G-CSF 産生誘導活性は、ODN 2088 および laminarin に阻害される、未知な PPRs を介し、C 型レクチン受容体ファミリーに属する Dectin-2 や CLEC-2 などに介する可能性が推定される。ギンセノシド類は、オタネニンジン根に含まれるトリテルペノイドサポニンであり、そのうちギンセノシド Rg<sub>1</sub> と Rh<sub>3</sub> は、NF- $\kappa$ B 経路に介する炎症性サイトカインの産生に対する抑制作用を持つことが報告されている<sup>9,10)</sup>。本研究では、オタネニンジン側根エキスから、6 種のギンセノシド類が検出された。蒸製によりギンセノシド Rg<sub>1</sub> の含量が低下し、ギンセノシド Rg<sub>3</sub>、Rd および F<sub>1</sub> の含量が増加した一方で、ギンセノシド Rb<sub>1</sub> の含量は蒸製してもほぼ変化しなかった。6 時間蒸製オタネニンジン側根エキスでは、より蒸製時間の短いオタネニンジン側根エキスと比較して、ギンセノシド Rg<sub>3</sub> の脱水産物であるギンセノシド Rg<sub>5</sub> と Rk<sub>1</sub> と推定されるピークを検出したことから、蒸製によりギンセノシド類の加水分解反応と脱水反応が進んだことが推定された。ギンセノシド Rb<sub>1</sub> の加水分解産物であるギンセノシド Rg<sub>3</sub> の含量が蒸製により増加したにもかかわらず、ギンセノシド Rb<sub>1</sub> の含量が変化しなかった理由は、マロニルギンセノシド Rb<sub>1</sub> からギンセノシド Rb<sub>1</sub> への加水分解反応と、ギンセノシド Rb<sub>1</sub> から他のギンセノシド類への加水分解反応とが、平衡関係となっていたことが推定された。近年の研究の結果、微量でマイナーとされるギンセノシドであるギンセノシド Rg<sub>5</sub>、Rg<sub>3</sub> および F<sub>1</sub> は、オタネニンジン根にもともと多く含むギンセノシド Rg<sub>1</sub> と Rb<sub>1</sub> と比較してより強い抗腫瘍作用、抗炎症作用および抗酸化作用などの薬理活性を示すことが明らかになっており<sup>20,38)</sup>、オタネニンジン根を蒸製することにより薬理活性が増強することの根拠と考えられている。しかし、それらマイナーなギンセノシド類の含有量は非常に低く、蒸製オタネニンジン根の薬理活性全体に寄与する可能性は大きくないと考える。本研究で得られた平均分子量 758 kDa の高分子化合物が、マクロファージ食

食能賦活活性を持つ酸性多糖類<sup>49)</sup>と同じであるかどうかは不明であるが、オタネニンジン側根の蒸製により生じる高分子化合物の免疫系に対する賦活作用は、伝統医学における修治の目的を説明するものと考えられる。今後の、G-CSF 産生誘導活性以外の免疫賦活作用を評価できる実験系と統合的に判断を期待したい。

第十八改正日本薬局方<sup>1)</sup>では、ニンジンの基原を「オタネニンジンの細根を除いた根を乾燥したもの」と定義しているが、コウジンの基原は「オタネニンジンの根を蒸して乾燥したもの」としている。すなわち、日本で流通する生薬のニンジンの原料としてオタネニンジンの側根は使用できないが、生薬のコウジンではオタネニンジンの側根を使用できることになる。本研究では、生薬ニンジンの原料としては利用できないオタネニンジン側根について、蒸製することにより有用性を高め、かつ日本薬局方に適合する生薬コウジンの原料として利用できることを見出した。本研究で得られた知見は、蒸製オタネニンジン側根をコウジンとして医薬品および漢方製剤の原料として利用するための基礎的エビデンスを提供するものであり、多いに応用が可能であると考えられる。

## 結 論

オタネニンジン側根を 6 時間以上蒸すことで、蒸製時間依存的に MCE301 細胞における有意な G-CSF 産生誘導活性が出現した。本活性はオタネニンジン主根では出現せず、また、側根での蒸製時間は 9 時間が最適であった。

蒸製により出現した G-CSF 産生誘導活性を担う成分は、平均分子量が 758kDa である高分子化合物であり、ODN 2088 および laminarin により阻害される未知の受容体を介し、その下流の MyD88/NF- $\kappa$ B 経路を経由する可能性が示唆された。

オタネニンジン側根を蒸製することによる本活性の出現は、新鮮品を使う限りではオタネニンジン側根中の水分や、中国産・日本産の差はなかったが、乾燥品を原料とするときには、産地や保管期間の違いに応じて、活性の出現が減弱または消失する可能性があった。コウジンを生産するときに、オタネニンジン根の乾燥品ではなく新鮮品を原料とする慣習には、合理的な理由があると考えられた。

## 実験の部

### 【試薬類】

ギンセノシド Rg<sub>1</sub>、Rb<sub>1</sub>、F<sub>1</sub>、Rd と protopanaxatriol は成都普菲德生物科技有限公司（成都、四川、中国）より、ギンセノシド Rh<sub>1</sub>、Rd、F<sub>2</sub>、Rg<sub>3</sub>、Rh<sub>2</sub>、compound K は四川省成都维克奇生物科技有限公司（成都、四川、中国）より購入した。グルコース、スクロースは富士フィルム和光純薬（大阪）、フルクトース、マルトースはナカライテスク（京都）、イソマルトースは東京化成（東京）より購入した。ヨウシュヤマゴボウ由来レクチン（pokeweed mitogen、PWM）、ドイツ規格協会承認標準デキストラン（分子量 668 kDa）、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、Ham's F-12 培地、ウシ胎児血清 (FBS)、トリプシン、azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid diammonium salt) (ABTS) 溶液と sparsolonin B、laminarin は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)から購入した。ペニシリン・ストレプトマイシン混合溶液とトリパンプルーは、ナカライテスク（京都）から購入した。ヒドロキシエチルデンプン(分子量 1.27 mDa と 2.46 mDa)は、PSS Polymer Standards Service GmbH (Mainz, Germany)から購入した。Spectra/Por 透析膜（カットオフ分子量 1.2-1.4万）は、Spectrum Laboratories (Bridgend, UK) から購入した。ウサギ抗 G-CSF 抗体は、Boster Biological Technology (Pleasanton, CA, USA) から購入した。ペルオキシダーゼ標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体 は、Jackson Immuno Research Laboratories (West Grove, PA, USA) から購入した。Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution は、東洋紡（大阪）から購入した。ODN2088 は、Hycult Biotech (Wayne, PA, USA) から購入した。ブロッケーースは、DS ファーマバイオメディカル（京都）から購入した。

### 【ニンジンの修治および熱水エキスの調製】

2019年10月、12本の新鮮なオタネニンジン根（Sample A）を、吉林省裕盛中药材有限公司（白山、吉林、中国）より入手した。それらを実験室で3本ごとに群分けし、それぞれ100°Cで0、1.5、3およ

び6時間、アルミ鍋にて蒸製した。その後、2日間50°Cで乾燥させ、主根と側根（ヒゲニンジン）を分け、主根は0.5 cm角、側根は1 cm程度の長さに切断した。そのうち、蒸製しなかった側根の乾燥品の一部分を、別に100°C、6時間、蒸製し、同様に乾燥させた。

新鮮な長野県産オタネニンジン側根（Sample D）1ロットを、前忠（下市、奈良）より入手した。それらを実験として4群に分けた。1日目、そのうちの3群を、100°Cで6時間、アルミ鍋にて蒸製した。2日目、そのうちの2群をさらに3または6時間、蒸製した。以上の操作により、6、9および12時間、蒸製したオタネニンジン側根を調製した。その後、蒸製しなかったサンプルとともに、2日間50°Cで乾燥させた。

各種オタネニンジン根由来サンプル（1g、Table 2）を、50 mlのイオン交換水で30分間、沸騰させ、油こし紙（セリア、大垣）でろ過後、ろ液を凍結乾燥することにより、各サンプルの熱水エキスを得た。各種オタネニンジン根サンプルの抽出効率は、元のオタネニンジン根の乾燥重量に対するエキス重量の割合として算出した。乾燥エキスをイオン交換水で100 mg/mlの濃度に調製し、-20°Cで保存した。

スクロース、マルトースおよびイソマルトースは、ガラス試験管底部に50 mgずつ入れ、100°C、6時間蒸し、同様に乾燥させ、イオン交換水で100 mg/mlの濃度に調製し、-20°Cで保存した。

## 【細胞培養】

マウス結腸上皮細胞 MCE301 細胞は、富山大学生命科学先端研究センター 田淵 圭章 教授より共用されたものを使用した。その細胞の培養は、10% FBS、ペニシリン（100 unit/ml）、ストレプトマイシン（100 mg/ml）を添加した DMEM : Ham's F-12 = 1 : 1 を培地として、5% CO<sub>2</sub>、37°Cで培養した。細胞が9-10割コンフルエントに達したところで、0.25%トリプシン/0.02%ETDA-2Naで8分間処理し、セルスクレーパーで剥離し、継代した。

### 【G-CSF 産生誘導活性の評価方法と ELISA】

MCE301 細胞を 96-well plate に  $4 \times 10^4$  cells/well となるように播種し、10%FBS と抗生物質を含む培地で 37°C、24 時間培養した。その後、FBS-free 培地と交換し、さらに 39°C で 3 日間培養することにより、細胞を腸上皮細胞様に分化させた。培地を吸引除去し、サンプルを含む FBS-free 培地を 100  $\mu$ l/well 添加して、39°C、6~24 時間、培養した。陽性コントロールとして PWM (100  $\mu$ g/ml) を使用した。その後、培養上清 50  $\mu$ l を新しい ELISA plate に移し、38°C で一晩、放置することで、乾固させた。各 well をリン酸緩衝生理食塩水 (0.15 M、pH 7.4、PBS) で 5 回洗浄し、ブロックエースを各 well に添加して、室温で 2 時間インキュベートした。その後、Can Get Signal 溶液で希釈したウサギ抗 G-CSF IgG (1:500) を各 well に添加して、室温で 2 時間インキュベートした後、PBS で 5 回洗浄した。Can Get Signal 溶液で希釈したペルオキシダーゼ標識ロバ抗ウサギ IgG (1:2000) を各 well に添加して、室温でさらに 2 時間インキュベートした後、PBS で 5 回洗浄した。ABTS を発色剤として、405 nm の吸光度を測定した。

### 【トリパンブルーを用いた細胞毒性の確認】

MCE301 細胞を 96-well plate に  $4 \times 10^4$  cells/well となるように播種し、10%FBS と抗生物質を含む培地で 37°C、24 時間培養した。その後、FBS-free 培地と交換して、さらに 39°C で 3 日間培養することにより、細胞を分化させた。培地を吸引除去し、サンプルを含む FBS free 培地を 100  $\mu$ l/well 添加して、39°C、24 時間インキュベートした。サンプルを含む培地を吸引除去し、0.02%ETDA-2Na 100  $\mu$ l で各 well を洗浄した。その後、0.25%トリプシン/0.02%ETDA-2Na 100  $\mu$ l を加えて 3 分間、インキュベートし、FBS 入り培地 100  $\mu$ l でトリプシンを失活させた。よくピペッティングした後、0.5%トリパンブルーの PBS 溶液と同体積で混合し、TC20™ 全自動セルカウンター (Bio-rad、Hercules、CA、USA) で生細胞率を測定した。

### 【ギンセノシド類の分析】

0、1.5、3 および 6 時間蒸製オタネニンジン側根エキス (100 mg/ml) を、水でそれぞれ 20 倍希釈し、15,000 rpm、7 分間遠心し、上清を以下の条件の HPLC で分析した。蒸製時間の異なる各オタネニンジン側根エキスに含まれる各ギンセノシドの含有量は、各標準溶液 (0.004, 0.02, 0.1, 0.5 mM) を分析した時のピーク面積を用いた絶対検量線法により定量した。システム、SCL-10A<sub>VP</sub> (島津製作所、京都); カラム、TSKgel ODS 80<sub>TS</sub> (4.6 × 250 mm) (東ソー、東京); 移動相、H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN、20% B (0–5 分)、20–25% B (5–12 分)、25–40% B (12–29 分)、40% B (29–40 分)、40–80% B (40–45 分)、80–100% B (45–50 分)、100% B (50–65 分)、直線勾配、1 ml/分; 検出、UV 203 nm; カラム温度、40°C; 注入量、10 µl; 溶出時間、ギンセノシド Rg<sub>1</sub> (21.7 分)、ギンセノシド Rb<sub>1</sub> (32.3 分)、ギンセノシド Rh<sub>1</sub> (34.1 分)、ギンセノシド F<sub>1</sub> (36.5 分)、ギンセノシド Rd (36.6 分)、ギンセノシド F<sub>2</sub> (40.9 分)、ギンセノシド Rg<sub>3</sub> (42.6 分)、protopanaxatriol (44.9 分)、ギンセノシド Rh<sub>2</sub> (48.3 分)、compound K (47.5 分)、protopanaxadiol (56.9 分)。

### 【透析】

6 または 9 時間蒸製オタネニンジン側根エキス 50 mg を水で希釈し、室温で 3 日間、透析膜を用いて透析した。透析内液 (高分子画分) と透析外液 (低分子画分) をそれぞれ回収、濃縮、凍結乾燥し、6 または 9 時間蒸製オタネニンジン側根エキス 100 mg/ml に相当する水溶液を調製した。−20°C で保存した。

### 【サイズ排除 HPLC】

6 時間蒸製オタネニンジン側根エキス (100 mg/ml) を水で 25 倍希釈し、15,000 rpm、7 分間遠心し、上清を以下の条件の HPLC で分析した。分子量マーカーによる分子量と溶出時間から指数関数で検量

線を引き、ピークの分子量を算出した。システム、SCL-10A<sub>VP</sub> (島津)；カラム、Inertsil WP300 diol (4.6 × 250 mm) (GLサイエンス、東京)；移動相、H<sub>2</sub>O、0.3 ml/分；検出、示差屈折率；カラム温度、40°C；注入量、10 µl；溶出時間、標準デキストラン (668 kDa、6.70 分)、ヒドロキシエチルスターチ (1.27 mDa、5.15 分；2.46 mDa、4.71 分)。

### 【低分子糖類の分析】

未蒸製オタネニンジン側根エキス(100 mg/ml)を同体積の30%アセトニトリルと混合し、15,000 rpm、7分間遠心し、上清を以下の条件のHPLCで分析した。システム、SCL-10A<sub>VP</sub> (島津)；カラム、Sugar-D (4.6 × 250 mm) (ナカライテスク)；移動相、75%アセトニトリル、1 ml/分、検出、示差屈折率；カラム温度、30°C；注入量、10 µl；溶出時間、フルクトース (3.3 分)、グルコース (6.6 分)、スクロース (9.1 分)、マルトース (10.5 分)、イソマルトース (11.0 分)。

### 【Real-time quantitative PCR】

MCE301 細胞から RNA を RNA Iso plus (タカラバイオ、滋賀) を用いて抽出した。RNA を RQ1 RNase-Free DNase (Promega、Madison、WI、USA) を用いて処理し、PrimerScript RT Master Mix (タカラバイオ) を用いて cDNA を作製した。ターゲット遺伝子に対応するプライマー (Table 3)、SYBR™ Select Master Mix (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA) を使用し、StepOne™ または StepOnePlus™ (Applied Biosystems、Waltham、MA、USA) を用いた real-time qPCR を行った。Ct 値から  $-2^{\Delta\Delta C_t}$  法により、ターゲット遺伝子の mRNA 発現量を解析した。

Table 3 使用したプライマー

cDNA	Sequence (5' to 3')	
	Forward	Reverse
Mouse G-CSF	CAACTTTGCCACCATC	CTGGAAGGCAGAAGTGAAGG
Mouse NF- $\kappa$ B	CGCAGTATCCATAGCTTCCA	AATCGGATGTGAGAGGACAG
Mouse MyD88	ATCGGCTTAAGTTGTGTGTG	AATCGTCAGAAACAACCACC
Mouse Dectin-1	GACCCAAGCTACTTCTTC	GCAGCACCTTTGTCATACT
Mouse TLR 9	CAAGAACCTGGTGTCACTGC	TGCGATTGTCTGACAAGTCC
Mouse $\beta$ -actin	CGTGACATCAAGGAGAAGCTG	TCGTTGCCAATAGTGATGACC
Mouse GADPH	GGCCTCCAAGGGAGTAAGAAA	GCCCCTCCTGTTATTATGG

### 【統計解析】

すべての統計処理には Mac Statistical Analysis Ver. 3.0 (エスミ、東京) を使用した。数値は平均±標準誤差 (S.E.) で示した。統計処理は、一元配置分散分析 (ANOVA) を行った後、全群間比較の時 Bonferroni-Dunnett 検定、対照群と他の全群間比較の時は Dunnett 検定により評価し、危険率 5% 未満を統計学的に有意とした。

## 引用文献

- 1) 一般財団法人医薬品医療器械レギュラトリーサイエンス財団編 (2021) 第十八改正日本薬局方. じほう、東京.
- 2) 国家薬典委員会 (2020) 中華人民共和国薬典 2020 年版. 中国医药科技出版社、北京.
- 3) 食品医薬品安全処 (2019) 第十二版大韓民国薬事法.
- 4) European Directorate for the Quality of medicines & Health care, 2020. European Pharmacopoeia, tenth ed. Council of Europe, Strasbourg, France.
- 5) United States Pharmacopoeial Convention, 2020. The United States Pharmacopoeia 43<sup>rd</sup> Edition – the National Formulary, 38<sup>th</sup> Edition. United States Pharmacopoeial Convention, North Bethesda, Maryland, United States.
- 6) 木村 孟淳, 酒井 英二, 牧野 利明 (2018) 新訂生薬学. 南江堂, 東京.
- 7) 厚生労働省医薬・生活衛生局 (2017) 一般用漢方製剤販売承認基準.
- 8) 水野 瑞夫, 太田順康 (2014) 暮らしの薬草と漢方薬 : ハーブ・民間薬・生薬. 新日本法規, 名古屋.
- 9) Kee J. Y., Jeon Y. D., Kim D. S., Han Y. H., Park J., Youn D. H., Kim S. J., Ahn K. S., Um J. Y., Hong S. H., Korean red ginseng improves atopic dermatitis-like skin lesions by suppressing expression of proinflammatory cytokines and chemokines *in vivo* and *in vitro*. *J Ginseng Res*, **41(2)**, 134–143 (2017).
- 10) Kim J., Ahn H., Han B. C., Lee S. H., Cho Y. W., Kim C. H., Hong E. J., An B. S., Jeung E. B., Lee G. S., Korean red ginseng extracts inhibit NLRP3 and AIM2 inflammasome activation. *Immunol Lett*, **158(1-2)**, 143–150 (2014).
- 11) Sohn E. H., Jang S. A., Lee C. H., Jang K. H., Kang S. C., Park H. J., Pyo S., Effects of korean red ginseng extract for the treatment of atopic dermatitis-like skin lesions in mice. *J Ginseng Res*, **35(4)**, 479–486 (2011).
- 12) Shin H. J., Kim Y. S., Kwak Y. S., Song Y. B., Kim Y. S., Park J. D., Enhancement of antitumor effects of paclitaxel (taxol) in combination with red ginseng acidic polysaccharide (RGAP). *Planta Med.*, **70(11)**, 1033–1038 (2004).
- 13) Lim D. S., Bae K. G., Jung I. S., Kim C. H., Yun Y. S., Song J. Y., Anti-septicaemic effect of polysaccharide from *Panax ginseng* by macrophage activation. *J Infect*, **45(1)**, 32–38 (2002).
- 14) Masaki Y., Itoh K., Sawaki T., Karasawa H., Kawanami T., Fukushima T., Kawabata H., Wano Y., Hirose Y., Suzuki T., Sugai S., Umehara H., Urinary pseudouridine in patients with lymphoma: comparison with other clinical parameters. *Clin Chim Acta*, **371(1-2)**, 148–151 (2006).
- 15) 日本大衆薬工業協会生薬製品委員会生薬文献調査部会 (2000) 汎用生薬便覧, pp. 711. 日本大衆薬工業協会, 東京.
- 16) 折原 裕 (2021) 北支関係・満洲関係綴第 3 冊満州関係, pp. 43–77. 不二出版, 東京
- 17) Metwaly A. M., Zhu L. L., Huang L. Q., Dou D. Q., Black ginseng and its saponins: Preparation, phytochemistry and pharmacological effects. *Molecules*, **24(10)**, 1856 (2019).
- 18) Jin Y., Kim Y. J., Jeon J. N., Wang C., Min J. W., Noh H. Y., Yang D. C., Effect of white, red and black ginseng on physicochemical properties and ginsenosides. *Plant Foods Hum Nutr*, **70(2)**, 141–

145 (2015).

- 19) Shin J. H., Park Y. J., Kim W., Kim D. O., Kim B. Y., Lee H., Baik M. Y., Change of ginsenoside profiles in processed ginseng by drying, steaming, and puffing. *J Microbiol Biotechnol*, **29(2)**, 222–229 (2019).
- 20) Sun B. S., Gu L. J., Fang Z. M., Wang C. Y., Wang Z., Lee M. R., Li Z., Li J. J., Sung C. K., Simultaneous quantification of 19 ginsenosides in black ginseng developed from *Panax ginseng* by HPLC-ELSD. *J Pharm Biomed Anal*, **50(1)**, 15–22 (2009).
- 21) Kim H., Kim H. W., Yu K. W., Suh H. J., Polysaccharides fractionated from enzyme digests of Korean red ginseng water extracts enhance the immunostimulatory activity. *Int J Biol Macromol*, **121**, 913–920 (2019).
- 22) 邱 紅梅 (1998) わかる中医学入門. 療原書店, 東京.
- 23) Ota M., Nakazaki J., Tabuchi Y., Ono T., Makino T., Historical and pharmacological studies on rehmannia root processing- Trends in usage and comparison of the immunostimulatory effects of its products with or without steam processing and pretreatment with liquor. *J Ethnopharmacol*, **242**, 112059 (2019).
- 24) Dulon D., Aran J. M., Zajic G., Schacht J., Comparative uptake of gentamicin, netilmicin, and amikacin in the guinea pig cochlea and vestibule. *Antimicrob Agents Chemother*, **30(1)**, 96–100 (1986).
- 25) Metcalf D., The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature*, **339(6219)**, 27–30 (1989).
- 26) Nicola N. A., Begley C. G., Metcalf D., Identification of the human analogue of a regulator that induces differentiation in murine leukaemic cells. *Nature*, **314(6012)**, 625–628 (1985).
- 27) 持続性 G-CSF 製剤ペグフィログラスチム注射液. 医薬品インタビューフォーム (2019).
- 28) Meshkibaf S., Martins A. J., Henry G. T., Kim S. O., Protective role of G-CSF in dextran sulfate sodium-induced acute colitis through generating gut-homing macrophages. *Cytokine*, **78**, 69–78 (2016).
- 29) Kim J. S., Ryoo S. B., Heo K., Kim J. G., Son T. G., Moon C., Yang K., Attenuating effects of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) in radiation induced intestinal injury in mice. *Food Chem Toxicol*, **50(9)**, 3174–3180 (2012).
- 30) Matsumoto T., Moriya M., Sakurai M., Kiyohara H., Tabuchi Y., Yamada H., Stimulatory effect of a pectic polysaccharide from a medicinal herb, the roots of *Bupleurum falcatum* L., on G-CSF secretion from intestinal epithelial cells. *Int Immunopharmacol*, **8(4)**, 581–588 (2008).
- 31) Shimato Y., Ota M., Asai K., Atsumi T., Tabuchi Y., Makino T., Comparison of byakujutsu (*Atractylodes rhizome*) and sojutsu (*Atractylodes lancea rhizome*) on anti-inflammatory and immunostimulative effects in vitro. *J Nat Med*, **72(1)**, 192–201 (2018).
- 32) Ota M., Ishiuchi K., Xu X., Minami M., Nagachi Y., Yagi-Utsumi M., Tabuchi Y., Cai S. Q., Makino T., The immunostimulatory effects and chemical characteristics of heated honey. *J Ethnopharmacol*, **228**, 11–17 (2019).
- 33) Xu X., Asai K., Kato D., Ishiuchi K., Ding K. W., Tabuchi Y., Ota M., Makino T., Honey isomaltose

contributes to the induction of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) secretion in the intestinal epithelial cells following honey heating. *Sci Rep*, **10(1)**, 15178 (2020).

- 34) 王 慶源, イソマルトース加熱産物の *in vivo* 免疫調節作用～名古屋市立大学大学院薬学研究科修士論文 (2022).
- 35) Lee S. M., Bae B. S., Park H. W., Ahn N. G., Cho B. G., Cho Y. L., Kwak Y. S., Characterization of Korean Red Ginseng (*Panax ginseng* Meyer): History, preparation method, and chemical composition. *J Ginseng Res*, **39(4)**, 384–391(2015).
- 36) Xu F. X., Gao Y., Xu Y. S., Liu H., Xue X., Zhang Y., Zhang H., Liu N. M., Lin C. H., L R. X., Remarkable impact of steam temperature on ginsenosides transformation from fresh ginseng to red ginseng. *J Ginseng Res*, **42(3)**, 277–287 (2018).
- 37) Kim W. Y., Kim J. M., Han S. B., Lee S. K., Kim N. D., Park M. K., Kim C. K., Park J. H., Steaming of ginseng at high temperature enhances biological activity. *J Nat Prod*, **63(12)**, 1702–1704 (2000).
- 38) Shin M. S., Song J. H., Choi P., Lee J. H., Kim S. Y., Shin K. S., Ham J., Kang K. S., Stimulation of innate immune function by *Panax ginseng* after heat processing. *J Agric Food Chem*, **66(18)**, 4652–4659 (2019).
- 39) Takeuchi O., Akira S., Recognition of viruses by innate immunity. *Immunol Rev*, **220**, 214–224 (2007).
- 40) Hayashi T., Nakamura T., Takaoka A., Pattern recognition receptor. *Jpn J Clin Immunol*, **34(5)**, 329–345 (2011).
- 41) 井上 克枝. C型レクチン受容体. 血栓止血誌, **26(1)**, 29–34 (2015).
- 42) Osorio F., Reis e Sousa C., Myeloid C-type lectin receptors in pathogen recognition and host defense. *Immunity*, **34(5)**, 651–664 (2011).
- 43) Kerrigan A. M., Brown G. D., Syk-coupled C-type lectin receptors that mediate cellular activation via single tyrosine based activation motifs. *Immunol Rev*, **234(1)**, 335–352 (2010).
- 44) Gross O., Gewies A., Finger K., Schafer M., Sparwasser T., Peschel C., Forster I, Ruland L., Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature*, **442(7103)**, 651–656 (2006).
- 45) Wagener J., Malireddi R. K., Lenardon M. D., Köberle M., Vautier S., MacCallum D. M., Biedermann T., Schaller M., Netea M. G., Kanneganti T. D., Brown G. D., Brown A J., Gow NA., Fungal chitin dampens inflammation through IL-10 induction mediated by NOD2 and TLR9 activation. *PLoS Pathog*, **10(4)**, 1–15, (2014).
- 46) Walachowski S., Tabouret G., Foucras G., Triggering dectin-1-pathway alone is not sufficient to induce cytokine production by murine macrophages. *PLoS One*, **11(2)**, 1–26 (2016).
- 47) Gantner B. N., Simmons R. M., Canavera S. J., Akira S., Underhill D. M., Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med*, **197(9)**, 1107–17 (2003).
- 48) Bekeredian-Ding I., Foermer S., Kirschning C. J., Parcina M., Heeg K. Poke weed mitogen requires Toll-like receptor ligands for proliferative activity in human and murine B lymphocytes. *PLoS One*, **7(1)**, 1–11 (2012).
- 49) Britannica, the Editors of Encyclopaedia. “starch.”: [<https://www.britannica.com/science/starch>.], cited 5 July, 2022.

- 50) Byeon S. E., Lee J., Kim J. H., Yang W. S., Kwak Y. S., Kim S. Y., Choung E. S., Rhee M. H., Cho J. Y., Molecular mechanism of macrophage activation by red ginseng acidic polysaccharide from Korean red ginseng. *Mediators Inflamm*, **2012**, 732860 (2012).
- 51) Choi H. S., Kim K. H., Sohn E., Park J. D., Kim B. O., Moon E. Y., Rhee D. K., Pyo S., Red ginseng acidic polysaccharide (RGAP) in combination with IFN-gamma results in enhanced macrophage function through activation of the NF- $\kappa$ B pathway. *Biosci Biotechnol Biochem*, **72(7)**, 1817–1825 (2008).
- 52) Shin J. Y., Song J. Y., Yun Y. S., Yang H. O., Rhee D. K., Pyo S., Immunostimulating effects of acidic polysaccharides extract of *Panax ginseng* on macrophage function. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, **24(3)**, 469–482 (2002).
- 53) 汪昂 (1694) 本草备要. 中国医药科技出版社, 2021.
- 54) 熊谷裕也, 尾島孝男. 化学と生物, **50(6)**, 396–398 (2012).
- 55) Song K., Xu L., Zhang W., Cai Y., Jang B., Oh J., Jin J. O., Laminarin promotes anti-cancer immunity by the maturation of dendritic cells. *Oncotarget*, **8(24)**, 38554–38567 (2017).
- 56) Rajauria G., Ravindran R., Garcia-Vaquero M., K. Rai D., Sweeney., O’Doherty J., Molecular characteristics and antioxidant activity of laminarin extracted from the seaweed species *Laminaria hyperborea*, using hydrothermal-assisted extraction and a multi-step purification procedure. *Food Hydrocolloid*, **112**, 106332 (2021).
- 57) Smith A. J., Graves B., Child R., Rice P. J., Ma Z., Lowman D. W., Ensley H. E., Ryter K. T., Evans J. T., Williams D. L., Immunoregulatory activity of the natural product laminarin varies widely as a result of its physical properties. *J Immunol*, **200(2)**, 788–799 (2018).

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、様々な御助言、御討論、ご協力をして頂きました名古屋市立大学大学院薬学研究科生薬学分野の皆様へ深く感謝致します。

本研究で使用した MCE301 細胞をご供与いただきました、富山大学生命科学先端研究センター 田渕圭章 教授と、株式会社 FACT に感謝致します。

本研究で使用したオタネニンジン根をご供与いただきました、吉林省裕盛中药材有限公司 安 伟 様、株式会社前忠 前 博友 様、吉林省へオタネニンジン栽培の調査のご協力いただきました、小林製薬株式会社 和田 篤敬 様、山口 能宏 様に、感謝致します。

本研究は、公益財団法人 小林財団 第 8 回研究助成（令和元年度）をご支援いただきました。謹んで深謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、幾多の御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科生薬学分野 石内 勘一郎 准教授、寺坂 和祥 講師に深く感謝致します。

最後に、本研究を遂行するにあたり、終始詳細な御助言、御指導をして頂きました名古屋市立大学大学院薬学研究科生薬学分野 牧野 利明 教授に心より深く感謝致します。