

キラヤサポニン経口投与による 自然免疫の活性化効果

芳賀 泉, 八田 一

Activation of natural immunity by oral administration of quillaja saponins

Izumi Haga and Hajime Hatta

Quillaja saponin (QS) is a food ingredient that contains triterpenoid saponins extracted from the cortex of the South American tree (*Quillaja saponaria Molina*), a member of the family Rosaceae. Aqueous extracts from the bark of the tree have world widely been used as an emulsifier and a foaming agent, particularly in soft drinks.

The present study examined an immunological function of QS as an activating agent for macrophage that is a principal phagocyte in natural immunity to prevent host from infectious pathogens. After 24 hours of oral administration of QS to mice (dose:0.5 mg/kg), both chemotactic and phagocytic activities of the macrophage prepared from either spleen cells or peritoneal exudate cells of mice tested were increased by 2-7 times in comparison to those of control mice. In addition to these results, the mice orally administered the QS shown much higher survival rate for 5 days (80%) than that of control mice (30%), when these mice were infected with *E.coli* (C11 strain) by intraperitoneal injection after 24 hours of the oral administration of the QS.

Since QS is a food additive used in the food industry, these results in the present study might lead to develop new physiological functional foods that activate natural immunity. Thus, taking foods containing QS might prevent human, especially elder people whose natural immunity is weakened by aging, from many infectious diseases.

I. はじめに

我々は体外から侵入した細菌やウイルス、および体内で生じたガン細胞などを異物（抗原）として認識し、それらから自己を守る免疫機能を有する。通常、免疫機能は自然免疫系と獲得免疫系に大別される。自然免疫系は抗原を排除する 1 次的バリアーとして知られ、その主体はマクロファージ、好中球、NK細胞などが非特異的に抗原を認識し消去する。一方、獲得免疫系は 2 次的バリアーで、自然免疫系で消去できなかった抗原を T 細胞や B 細胞が特異的に認識し、これらの細胞が分泌するサイトカインの刺激で分化増殖した B 細胞が特異的抗体を産生し抗原を消去する。

一般的に加齢やストレスなどに伴い自然免疫機能が低下すると、生体の抵抗力が弱まり、感染症やが

んの罹患率が高くなると考えられている。このような状況下、食品の摂取で自然免疫機能を高め、感染症やガンの予防をはかる研究が注目されている。キノコや海藻由来の β -1, 3-グルカンや硫酸多糖類をはじめ、生薬ではあるが柴胡や朝鮮人参の有効成分である種々のサポニン成分が自然免疫機能を活性化する天然物質として知られている¹⁾。また近年、食品添加物であるキラヤ抽出物（キラヤサポニン）が、魚類の自然免疫機能を高めることが見いだされ²⁾、養殖魚の感染症予防を目的として飼料に添加されている。

キラヤサポニンは、南米に自生するバラ科の常緑樹シャボンの木 (*Quillaja Saponaria Mol.*) の樹皮に含まれるトリテルペノイドサポニンである。欧米諸国では、古くからノンアルコール飲料やシェイク飲料の起泡剤として、また、日本でも食品添加物（乳化剤や起泡剤）として、種々の加工食品に利用されている³⁾。近年、キラヤサポニンで抗原タンパク質

を被覆した複合体を経口投与すると、腸管から血中への抗原吸収が高まり、特異的抗体産生能が高まることを見出された^{4,5)}。すなわち、経口投与されたキラヤサポニン抗原複合体が獲得免疫系を刺激する作用を有し、その経口ワクチンとしての応用研究が進められている。

本研究では、起泡剤や乳化剤として世界中で利用されているキラヤサポニンの新しい生理機能として、哺乳動物への経口摂取による自然免疫の活性化効果を検討した。その結果、自然免疫系において重要な役割を担うマクロファージに着目し、キラヤサポニンの経口投与により、マウスの脾臓ならびに腹腔マクロファージの走化性や貪食能が活性化されることを見出した。さらに、キラヤサポニン経口投与による細菌感染予防効果を明らかにした。すなわち、キラヤサポニン経口投与マウスに対して、大腸菌を腹腔内に感染させた後の生存率を指標に、キラヤサポニンの経口投与で細菌感染症を予防できることを示した。

II. 実験材料と方法

1) 実験材料

キラヤサポニン (QS) は、丸善製薬(株)製のキラヤ抽出物 (商品名: キラヤニン) の原末を用いた。この原末はシャボンの木 (*Quillaja saponaria*) の樹皮チップの熱水抽出液を、活性炭で脱色および脱臭処理後、多孔性樹脂で吸着分離して得られるトリテルペノイドサポニン画分を凍結乾燥して調製されたもので、そのサポニン純度は食品添加物公定書のキラヤ抽出物純度試験法 (HPLC 法) で約 45% である⁶⁾。

細胞培養用の培地はナカライテスク(株)の DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 液体培地に、ペニシリン (50 単位/ml) とストレプトマイシン (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加して用いた (以下 DMEM(+) 培地と略記する)。8 チャンバースライドガラスはヌンク・インターナショナル(株)製、ケモタキセルはクラボウ(株)製を用いた。ラテックスビーズはシグマ社製の直径 0.81 μm のもの (LATEX 0.81) を、ギムザ染色液はナカライテスク(株)製のものを用いた。その他の試薬は特級グレードを用いた。

動物は日本 SLC (株) から入手した ICR マウス (SPF グレード) を用いた。飼料はオリエンタル酵母(株)の MF を用いた。大腸菌は国立遺伝学研究所より分与していただいた非病原性 C11 株 (JE5665) を用いた。

2) 動物実験

i) マウス脾臓マクロファージの調製

ICR マウスの雄 5 週齢を一群 3 匹に分けて、1 週間、馴化飼育をした。経口投与はマウスを一夜絶食させて行った。QS を滅菌 PBS に溶解し、ゾンデを用いてマウス一匹あたり 100 μl 経口投与した。QS の投与量はマウス体重 1 kg 当たり、0, 0.5, 5, 50 mg に設定し、投与後は自由摂食および自由飲水させた。経口投与から 24 時間後に、マウスを致死させ、開腹して脾臓を摘出した。摘出脾臓を DMEM(+) 培地で洗浄後、同培地中で眼科ハサミを用いて細片化した。その脾臓の細片をステンレス製のメッシュフィルターを通して、脾臓細胞を分離した。得られた細胞懸濁液を 2000 rpm で 5 分間の遠心分離により細胞を集め、それを DMEM(+) 培地に再浮遊させた。この操作を 3 回繰り返して細胞を洗浄した。細胞数は血球計算板で測定し、 5×10^6 個/ml に調整した。

ii) マウス腹腔マクロファージの調製

ICR マウスの雄、4 週齢を一群 3 匹に分け、1 週間の馴化飼育を行った。経口投与はマウスを一夜絶食させ上記と同様の方法で行った。QS の投与量はマウス体重 1 kg 当たり、0, 0.05, 0.5, 5, 50 mg に設定し、投与後は自由摂食および自由飲水させた。QS 経口投与の 24 時間後にマウスを致死させ、腹部を 70% エタノールで消毒後、腹膜を破らないよう切開し、5 ml 容量の注射筒に 18G の注射針 (テルモ) を付け、マウス 1 匹あたり 5 ml の DMEM(+) 培地を腹腔内に注入した。そして、腹部を 50 回程度マッサージして腹腔滲出液を注射筒に回収した。腹腔滲出液を 15 ml 容量の遠心管 (コーニング) に入れ、2000 rpm で 5 分間の遠心分離で細胞を沈殿させた。上清を捨て、遠心管をタッピングした後、腹腔滲出細胞を 5 ml の DMEM(+) 培地に再浮遊させた。この細胞洗浄操作を 3 回繰り返した後、細胞を 1 ml の DMEM(+) 培地に浮遊させ、血球算定盤で細胞数をカウントし、細胞数を 5×10^6 細胞/ml に調整した。

3) マクロファージの走化性測定法 (ケモタキシスチャンパー法)

24 穴細胞培養プレートの各ウェルに、走化性因子として大腸菌 C11 株のホルマリン死菌 10 mg 湿重量/ml DMEM(+) 培地を 500 μl ずつ分注した。次いで、各ウェルの上に、仕切り膜の孔径 5 μm のケモタキセル (クラボウ) をセットし、マウス脾臓の分離細胞または腹腔滲出細胞 (1×10^6 細胞/ウェル) を分注し、5% 炭酸ガス下、37°C で 18 時間培養した。PBS でケモタキセル内を 3 回洗浄して浮遊細胞を除去した後、ギ

ムザ染色液を 300 μ l 入れ、室温で 15 分間、細胞の染色を行った。それを PBS で 3 回洗浄した後、膜をはずして乾燥した。スライドガラス上に封入剤をガラス棒で 1~2 滴置き、乾燥した膜を走化性因子側の膜面が上になるように置いてカバーガラスで封入した。膜面を顕微鏡でランダムに検鏡 (400 倍または 1000 倍) し、1 視野中の全孔数と膜面の孔を走化性因子側に通過した細胞数をカウントした。走化性の評価は、4 視野あたりの全膜孔数に対する細胞が詰まった膜孔の割合を計算し走化細胞率として表した。

4) マクロファージの貪食活性測定法 (ラテックスビーズ法)

マウス脾臓の分離細胞または腹腔滲出細胞を 8 チャンバースライドガラスの各ウェルに分注 (1 \times 10⁶ 細胞 / ウェル) し、5%炭酸ガス下、37°C で 18 時間培養した。そして、各ウェル内を DMEM(+) 培地で 3 回洗浄して浮遊細胞を除去し、ガラス面への付着細胞をマクロファージとして実験に用いた。DMEM(+) 培地で 50 倍希釈したラテックスビーズ (0.03%液) を 200 μ l とり、ウェル壁面より静かに分注し、5%炭酸ガス下、37°C で 1 時間放置した。各ウェルを、PBS で 3 回洗浄し余剰のラテックスを除去した後、風乾し、冷メタノールで細胞固定を 1 時間行った。細胞はギムザ染色し、スライドガラスを取り外し、顕微鏡でランダムに検鏡 (400 倍または 1000 倍) して 4 視野の細胞数と、その内ラテックスビーズを 5 個以上貪食している細胞数をカウントし、全細胞数に対する貪食細胞数の百分率を貪食率とした。

5) 大腸菌感染予防実験

大腸菌 C-11 株を用い、BHI 培地で 37°C、24 時間、振盪培養した。培養した大腸菌を遠心分離で集菌し、滅菌生理食塩水で希釈してマウスへの感染実験に用いた。ICR マウス雄、5 週齢を一群 10 匹に分け、一夜絶食させた後、QS を滅菌 PBS に溶解し、ゾンデを用いてマウス 1 匹あたり 100 μ l 経口投与した。QS

の投与量はマウス体重 1kg 当たり、0, 0.5, 5, 50 mg に設定し、投与後は自由摂食および自由飲水させた。QS の経口投与 24 時間後に、各群のマウスに対して、滅菌生理食塩水で希釈した致死量の大腸菌液 (5.0 \times 10⁹ 生菌 / ml) を 500 μ l 腹腔投与し、その後 5 日間にわたり各群の生存率を調べた。

III. 結 果

1) マウス脾臓マクロファージの活性化効果

キラヤサポニンの経口投与量とマウス脾臓マクロファージの走化性および貪食能の関係を表 1 に示す。走化性はマウスの体重 1kg 当たり 0.5mg および 5.0 mg の投与区で、無投与区の約 2 倍に、50mg 投与区で約 3 倍に上昇した。また、貪食活性についても、0.5 mg および 5.0mg の投与区で、無投与区の約 2 倍に、50 mg 投与区で約 2.5 倍に上昇した。スチューデント t 検定の結果、0.5 mg および 5.0 mg の投与区の走化性および貪食活性ともに無投与区のそれぞれに対して、1%危険率で有意差が得られた。

2) マウス腹腔マクロファージの活性化効果

QS 経口投与量と腹腔マクロファージ走化性および貪食能の変化を図 1 に示す。走化性は、QS 無投与群 (control 群) に対し、0.05mg/kg 投与群では 6.0 倍、0.5mg/kg 投与群は 7.5 倍、5mg/kg 投与群は 7.1 倍、50mg/kg 投与群では 6.3 倍、活性化された。走化性は、0.05mg/kg 投与の低濃度でも有意差をもって高い活性を示し、0.5mg/kg の投与で活性はピークとなり、高濃度では若干の活性の低下が見られた。

貪食能については、QS 無投与群 (control 群) に対し、0.05mg/kg 投与群では 1.2 倍、0.5mg/kg 投与群は 2.6 倍、5mg/kg 投与群は 1.6 倍、50mg/kg 投与群は 1.8 倍の活性化が得られ、0.5mg/kg の濃度で最も高くなった。control 群に対し、0.05mg/kg 投与マウスでは有意差は見られなかったが、0.5mg/kg QS 投与濃度以上では 1%危険率の有意差をもって活性

表 1 経口投与量と脾臓マクロファージの走化性および貪食能の関係

Dose of Quillaja extract (mg/kg B.W.)	Chemotactic Activity migrated cells.*	Phagocytic Activity (%) \pm SD {n=3}
0	32 \pm 14a	33.7 \pm 21.2a**
0.5	60 \pm 17b	62.5 \pm 15.5b
5	64 \pm 24b	62.3 \pm 19.2b
50	91 \pm 22c	76.2 \pm 11.0c

* Average of migrated cells number in 10 fields (\times 400)

** Value not followed by the same letter (a,b,c) are significantly different (p < 0.01).

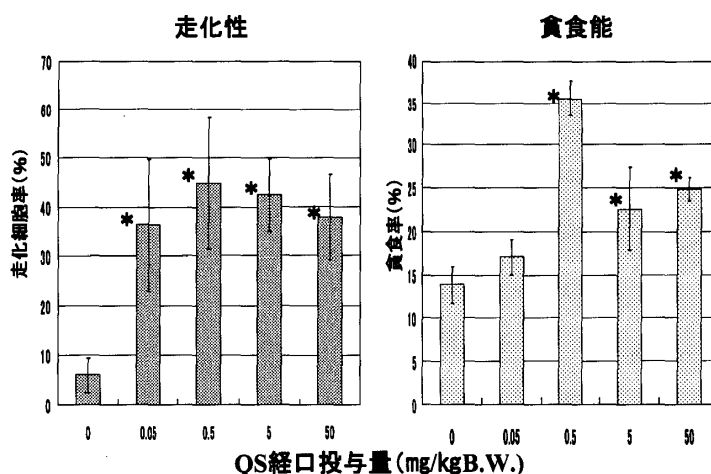


図1 経口投与量と腹腔マクロファージの走化性および貪食能の関係
1群3匹のマウスに対し、0～50mg/kg体重の投与量でQSを経口投与し、24時間後に採取した腹腔マクロファージの走化性および貪食能を示す。
*:1%の危険率でコントロールに対して有意差がある。

の向上が見られた。しかし、5mg/kg、50mg/kgとQS濃度が高くなると0.5mg/kgより活性がやや低くなった。

図2にQS無投与群(control群)および投与群マウスから分離した腹腔マクロファージの写真を示す。

3) キラヤサポニンの感染予防効果

キラヤサポニン経口投与24時間経過後、大腸菌C11株を 2.5×10^9 生菌/マウスの濃度で腹腔注射した結果を図3に示す。QS無投与群(Control群)の生存率は感染2日目に50%、3日目に30%まで低下し、それ以後の変化は無かった。一方、QS経口投与量、0.5mg/kg群と5.0mg/kg群は、感染2日目の生存率がそれぞれ80%、90%を示し、いずれもそれ以後の斃死は無かった。また、経口投与量50mg/kg群は感染1日目から斃死が確認され、2日目の生存率は60%で、その後の変化は無かった。

IV. 考 察

本研究では、キラヤサポニンの新しい生理機能として、経口投与したマウスの脾臓や腹腔マクロファージに対する走化性や貪食能の活性化効果を見いだした。一般的に、サポニンは細胞毒性や溶血性を有することが知られている。これは細胞膜に対してサポニンの両親媒性構造が作用して、その透過性を変化させることに起因し、その毒性や溶血性はサポニンの種類によって著しく異なる⁷⁾。通常、サポニンの溶血活性は血清やコレステロールの存在下で著しく抑制されることが知られ、実際にヒトが食品として摂取できる濃度では溶血の問題はないと言わ

れている⁸⁾。キラヤ抽出物の安全性については、急性毒性試験でLD₅₀が1625mg/kgであった事、亜急性毒性試験での無作用量として約400mg/kg/日であった事、さらに、慢性毒性試験では、マウスに700mg/kg/日の量を84週間にわたり経口投与した結果、マウスに与える悪影響が認められなかった等の報告がある^{6,9,10)}。このような安全性の評価試験の結果、キラヤサポニン(QS)は世界中で食品添加物として認可され、多くの人に食されている。

キラヤサポニン経口投与によるマウスの脾臓および腹腔滲出マクロファージへの影響を検討した結果、体重1kg当たり0.5mgという少量の投与量で、マウス脾臓マクロファージの走化性および貪食能が、いずれも2-3倍に活性化された(表1)。この結果と同様に、腹腔滲出マクロファージの走化性で6-7倍、貪食活性で2-3倍の向上が得られた(図1)。これらの結果から、キラヤサポニン経口投与によるマクロファージ機能の活性化は局所的ではなく、全身性の賦活作用を呈するものと推測される。通常、経口投与されたサポニンは盲腸や大腸の腸内細菌の作用で糖鎖がはずれ、アグリコンの部分が腸管から吸収されて血液中に入ることが報告されている¹¹⁾。また、サイコサポニンの構造に関する研究では、糖鎖がとれたアグリコンであるサイコゲニンでも、マクロファージ活性化効果があることが報告されている^{8,12)}。おそらく、経口投与されたキラヤサポニンも、生薬成分のサポニンと同様に、腸管よりアグリコンの形で吸収され、血液中の単球や局所における常在性マクロファージを活性化するのではないかと

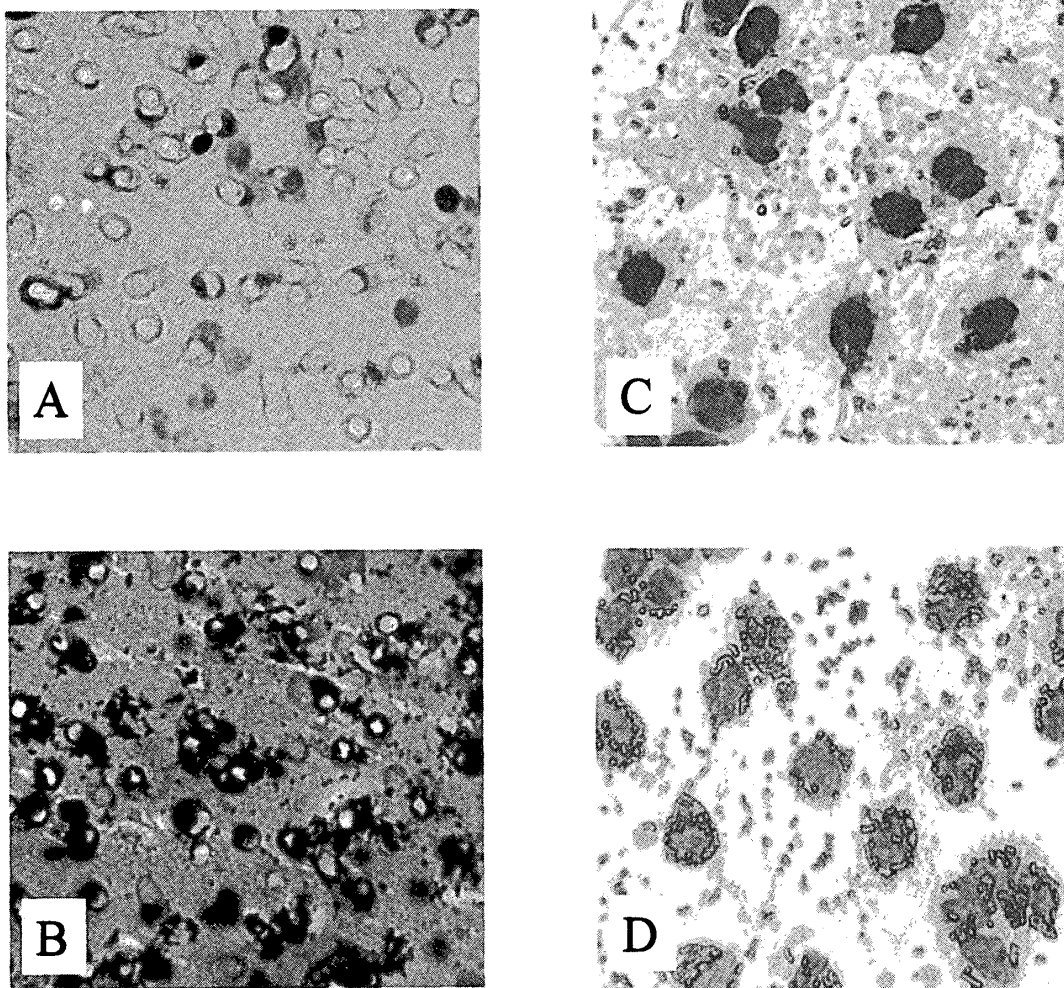


図2 マウス腹腔マクロファージの顕微鏡写真(1000倍)
 A,B) 走化性因子に向かって膜の穴を通り抜けてきたマクロファージ。A) の写真は control 群, B) の写真は QS 0.5 mg/kg B.W. 投与群の一例。
 C,D) ラテックスビーズを貪食したマクロファージ。C) は control 群, D) は QS 0.5 mg/kg B.W. 投与群の一例。

考えられる。

また、マウス腹腔滲出マクロファージの走化性と貪食能に着目すると、それぞれの活性化効果が現れるキラヤサポニン経口投与量が異なった。すなわち、走化性は 0.05 mg/kg の低濃度で有意に活性化され、貪食能の有意な活性化は 0.5 mg/kg 以上で見られた(図1)。このような活性化濃度のちがいは、同一個体のマウスで比較した結果ではないが、脾臓マクロファージでは見られなかった。一般にマクロファージの機能は、感染(炎症)部位への遊走浸潤、異物の認識と貪食、そして貪食した異物の情報を B 細胞やヘルパー T 細胞に伝達するため分泌するサイトカイン類分泌能の順に活性化されると考えられている。脾臓も腹腔マクロファージも常在性のマクロファージに分類されるが、おそらく、それぞれの部位における細

胞の寿命のちがいや内因性の活性化物質の量的および質的なちがいにより、経口投与キラヤサポニンに対する反応性に差が見られたと思われる。

大腸菌感染実験は、小川らの報告を参考に、大腸菌 c-11 株に対して最も感受性の高い ICR マウスを用い、腹腔注射で感染させる方法で行った¹³⁾。この感染方法ではマウス当たり 2.3×10^7 生菌/マウスが致死量であったと報告されているが、本研究の感染実験では 2.5×10^9 生菌/マウスの腹腔投与量を必要とした。マウスの個体差、飼育環境、大腸菌を培養する過程でのリポポリサッカライド(LPS)の性状の違いなどが原因と考えられる。おそらく、本研究では大腸菌の培養をスラント培養ではなく、振とう培養で行ったため、菌表面の LPS に何らかの影響をおよぼし、感染力の低下があったのではと考えられる。

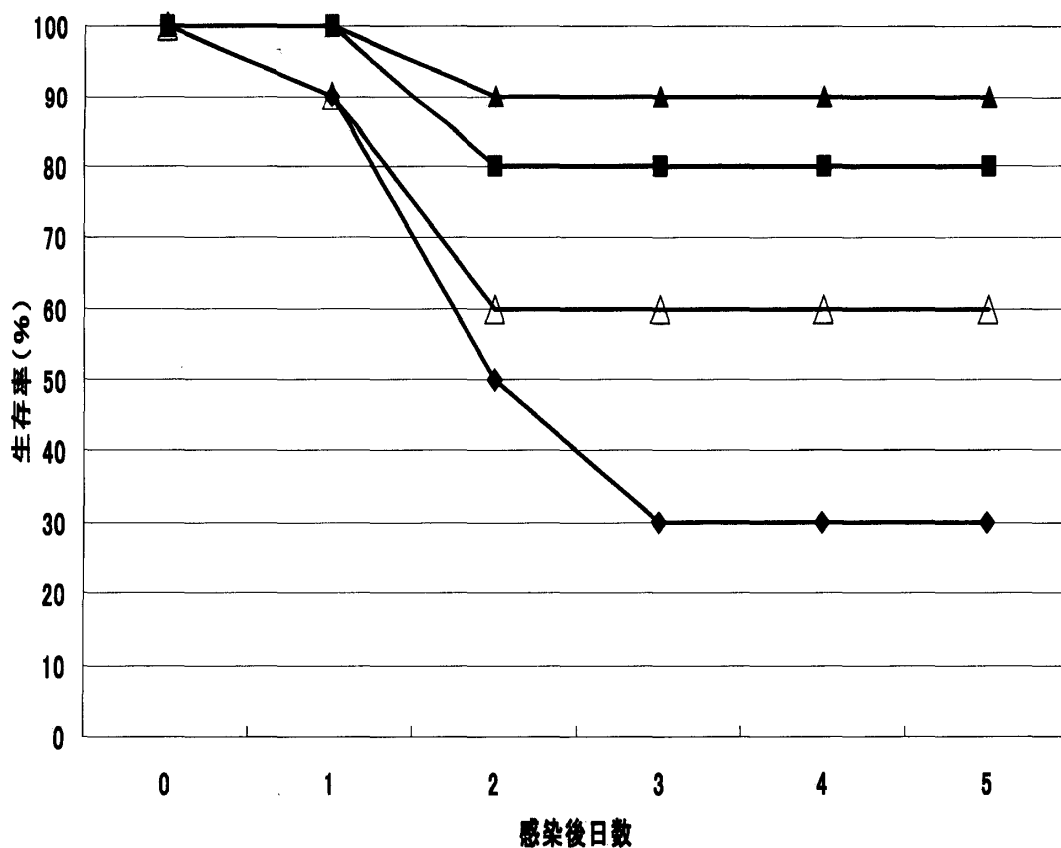


図 3 大腸菌の腹腔感染実験
 一群 10 匹で大腸菌量を 2.5×10^9 腹腔感染させた後 5 日間の生存率を示す。
 QS 経口投与量, ◆: control, ■: 0.5 mg/kg B.W., ▲: 5 mg/kg B.W. △: 50 mg/kg B.W.

しかし、感染したマウスの症状は毛が逆立ち、震えや、目やになど敗血症の症状を呈して斃死したことから、マウス当たりの致死菌量は多くても、腹腔注射による大腸菌感染実験が成立したと言える。

大腸菌感染予防実験の結果として、キラヤサポニン無投与のコントロールが斃死する場合でも、キラヤサポニンを投与したマウスにおいては生存率が有意に高かった(図 3)。キラヤサポニンの経口投与量、マウスへの感染菌量により、ばらつきはあるが、マウスの体重 kg 当たりキラヤサポニン 0.5 mg および 5.0 mg の経口投与で高い生存率を示した。50 mg/kg でも無投与群と比較して感染予防効果が得られたが、キラヤサポニンの経口投与量とマウス生存率には正の相関が得られ無かった。キラヤサポニンは両親媒性の構造であるため、界面活性作用を有し、高濃度の経口投与の場合、粘膜への刺激が強い。マウスへはゾンデを用いて強制的に経口投与したため、50 mg/kg ではマウスへの負担が大きく感染予防効果が低い結果になったと考えられる。今回の実験結果では、マウスの腹腔マクロファージ食食能も 0.5 mg/

Kg の経口投与量で最も強く活性化されたことから、大腸菌の腹腔感染予防効果はマクロファージ食食能の活性化によるものであることが強く示唆された。また、マクロファージなどの食細胞は、抗原提示細胞 (APC: antigen presentation cell) として T 細胞・B 細胞に抗原を提示し、自然免疫系が獲得免疫系へ情報を伝える働きを有する。従って、自然免疫系の活性化は、ひいては獲得免疫系の活性化へも繋がり、総合的な生体防御機能を向上させるであろう¹⁴⁾。

現在、キラヤサポニンは世界中で食品添加物として認可され、多くの人に食されている。今回、マウスを用いた動物実験ではあるが、経口投与キラヤサポニンの新しい生理機能として、マクロファージ活性効果が得られ、さらに大腸菌感染実験でその予防効果が認められた。これから高齢化社会を迎え、ストレス社会でもある現代において免疫力低下による感染症への罹患率の増大が予想される。本結果から推測して、キラヤサポニンの摂取はヒトにおいても自然免疫力の活性化効果が期待される。したがって、安全性の認められた食品添加物であるキラヤサポニ

ンを配合した食品で、加齢やストレスに伴う免疫力低下を抑制できれば、各人の生活の質 (QOL) の向上に役立つものと思われる。

V. 要 約

本研究では、食品添加物であるキラヤサポニンの新しい生理機能として、キラヤサポニン経口投与による自然免疫の活性化効果を検討した。その結果、自然免疫機能において重要な役割を担うマクロファージに着目し、キラヤサポニン経口投与がマウスの脾臓や腹腔マクロファージの走化性や食食能を活性化することを見いだした。すなわち、マウスへのキラヤサポニン経口投与 (0.5 mg/Kg 体重) で、その脾臓から分離したマクロファージの走化性および食食能が 2~3 倍に活性化された。また、腹腔マクロファージの走化性は約 7 倍、食食能が約 3 倍に活性化された。マクロファージの活性化に必要なキラヤサポニンの経口投与は、走化性の場合 0.05 mg/kg 以上、食食能の場合は、0.5 mg/kg 以上であった。さらに、キラヤサポニン経口投与マウスへ大腸菌の腹腔感染後 5 日目の生存率は、無投与群の 30% に対して、キラヤサポニン投与 (0.5 mg/Kg 体重) 群が 80% と有意に高かった。この感染予防効果は、キラヤサポニン摂取によるマクロファージ走化性や食食能の活性化に起因すると思われる。以上の結果より、キラヤサポニンの摂取はヒトにおいても自然免疫力の活性化効果が期待される。安全性の認められた食

品添加物であるキラヤサポニンを配合した食品で、加齢やストレスに伴う免疫力低下を抑制できれば、各人の生活の質 (QOL) の向上に役立つものと思われる。

VI. 引用文献

- 1) 松本 司ら：和漢医薬学会誌, 4, 412 (1987)
- 2) M. Ninomiya et al.: *Fish & Shellfish Immunol.*, 5, 325 (1995)
- 3) 村上文和：フードケミカル, 4, 47-53 (1988)
- 4) S. R. Chavali and J. B. Campbell: *Immunobiol.*, 174, 347 (1987)
- 5) B. Morein et al.: *J. Immunol. Method*, 128, 177 (1990)
- 6) 鈴木 生ら (監修)：第 7 版食品添加物公定書解説書, D-355, 廣川書店 (1999)
- 7) 庄司順三：化学の領域, 35, 414 (1981)
- 8) 熊沢義雄ら：和漢医薬学会誌, 4, 418 (1987)
- 9) I. F. Gaunt: *Food Cosmet. Toxicol.*, 12, 641 (1974)
- 10) J. G. Evans: *Food Cosmet. Toxicol.*, 17, 23 (1979)
- 11) B. Gestetner et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 16, (1968)
- 12) 植村照美ら：薬学雑誌, 115, 528 (1995)
- 13) 小川正俊ら：*Chemotherapy*, 30, 67 (1982)
- 14) 今西二郎, 笹田昌孝 編：感染症とサイトカイン, 医薬ジャーナル社, 11 (1998)