

和漢生薬の抗血栓・抗動脈硬化作用とその機序の解明

—とくにアラキドン酸カスケードを中心に—

平井 愛山

千葉大学医学部第二内科

Study on the mechanisms of anti-platelet and anti-atherosclerotic effects of Sino-Japanese traditional medicines : Focusing arachidonic acid cascade

Aizan HIRAI

The Second Department of Internal Medicine, Chiba University Medical School

(Accepted February 11, 1994.)

Abstract

I demonstrated that Moutan bark and Cinnamon bark have anti-platelet effects among medicinal plants which have been reported to remove blood stasis and thereby improve peripheral blood circulation. Paeonol, one of major constituents of *Moutan* cortex, cinnamic aldehyde, one of major constituents of *Cinnamic* cortex, and trichisanic acid, one of major components of *Trichosanthes japonica*, dose-dependently inhibited human platelet aggregation. In order to clarify the mechanisms of action of these compounds, effects on the metabolism of arachidonic acid in human platelets were investigated. Paeonol inhibited cyclooxygenase activity, resulting in the reduced formation of thromboxane A_2 (TXA $_2$). On the other hand, cinnamic aldehyde reduced TXA $_2$ formation through the inhibition of the release of arachidonic acid, a substrate of TXA $_2$, from the cell membrane. Trichisanic acid also reduced TXA $_2$ formation through the inhibition of cyclooxygenase. *Panax ginseng*, which has been shown to improve peripheral blood circulation, has been reported to inhibit platelet aggregation. In order to clarify the mechanisms of action of *Panax ginseng*, the effects of *Panax ginseng* on platelet activation induced by TXA $_2$ and the formation of prostaglandin I $_2$ (PGI $_2$) in vessel wall were investigated. I demonstrated that 1) ginsenoside Rg $_1$ (G-Rg $_1$) inhibited platelet activation induced by TXA $_2$ through the inhibition of TXA $_2$ -induced Ca $^{2+}$ mobilization; 2) ginsenoside Rg $_3$, a product of ginsenoside Rb $_1$ and ginsenoside Rb $_2$ in the artificial gastric fluid, inhibited TXA $_2$ -induced platelet aggregation; 3) oral administration of ginseng powder for 4 weeks increased the PGI $_2$ formation *in vivo* in the patients with atherosclerotic disorders; 4) ginsenoside Rc stimulate *in vitro* PGI $_2$ formation by cultured rat vascular smooth muscle cells most likely through enhanced gene expression of cyclooxygenase. These results suggest that Sino-Japanese traditional medicines, which have anti-platelet and anti-thrombotic effects, may be very useful for the prevention and the treatment of certain thrombotic and atherosclerotic disorders including vascular dementia.

Key words Moutan cortex, Cinnamon cortex, anti-platelet effect, paeonol, Cinnamic aldehyde, trichosanolic acid, platelet aggregation, cyclooxygenase, *Panax ginseng*, ginseng saponins, thromboxane A_2 , prostaglandin I $_2$.

1. 緒 言

急速な高齢化社会への移行と疾病構造の欧米化にともない、動脈硬化症・血栓症を基盤とした疾患の頻度は年を追って増加しておりその対策が急がれている。これらの疾患の発症進展の過程において血小板はきわめて重要な役割を果たすことが知られている。またこれらの疾患患者においては血小板機能亢進が見られることが報告されている。このような背景から、動脈硬化症・血栓症の予防・治療を目的として、現在までに種々の血小板機能を抑制する薬物、すなわち抗血小板剤の開発が精力的に進められてきた。しかしながら、現在においてもなお、動脈硬化症・血栓症の予防・治療は確立されたとは言いがたい状況であり、病態の解析と平行して優れた薬剤の開発が進められ、病態に即した治療法の確立が急務と考えられている。一方和漢薬は中国三千年の歴史の中で確立された伝統医学の大きな支柱の一つであり、また近年には『新たな薬物の宝庫』として注目されている。しかし、動脈硬化症・血栓症の予防治療の観点から和漢薬について研究した成績はあまり見られず、その知見もきわめて限られていた。私は1980年代の初めより、抗血小板作用を有する和漢薬に注目して、その作用機序の解明ならびに臨床上的有用性を中心に検討を加えてきた。本稿ではいままでに行ってきた一連の研究の背景とその成績をまとめるとともに、今後の課題についてもふれてみたい。

2. 血栓症・動脈硬化とアラキドン酸カスケード

1970年代の後半から、エイコサノイドと総称される多価不飽和脂肪酸由来の一連の生理活性物質に関する研究が急速に進み、従来は不明であった種々の病態を解明する新たな視点が得られるようになった。とくに動脈硬化症・血栓症の研究については以下に述べるトロンボキサン A_2 (thromboxane A_2 : TXA_2) とプロスタグランジン I_2 (prostaglandin I_2 : PGI_2) の新たな発見^{1,2)}によって一変してしまったといっても過言ではない。まずエイコサノイドとはどんなものであるか以下にまとめてみた。

(1) エイコサノイドとアラキドン酸カスケード

エイコサノイドとは、主に多価不飽和脂肪酸の一種であるアラキドン酸 (C20:4, ω -6) を前駆体として種々の細胞で酸素添加反応により産生される一連の生理活性物質であり、その生合成経路が複数あり、しかも多数の代謝産物を産生することから、アラキドン酸カスケードと呼ばれている。Fig. 1 にアラキドン酸カスケードの概要を示した。アラキドン酸は通常細胞膜のリン脂質の2位

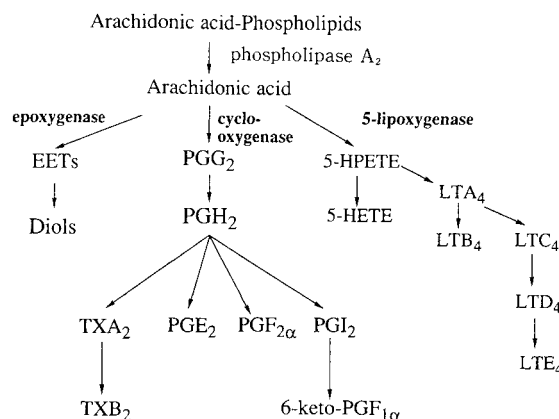


Fig. 1 Arachidonic acid cascade

に組み込まれており、細胞の活性化にともなうリン脂質の分解反応によって細胞膜から切り出されることが知られている。このアラキドン酸の遊離反応に関与する酵素としてホスホリパーゼ A_2 (PLA $_2$) とホスホリパーゼC (PLC)-ジアシルグリセロールリパーゼ (DG-lipase) の二つの経路が知られている^{3,4)} とくに PLA $_2$ に関しては近年そのサブタイプの解析が進みアラキドン酸に特異性の高いタイプが存在することが明らかとなりその活性調節等の詳細が検討されている⁵⁾。

アラキドン酸カスケードは大別してシクロオキシゲナーゼ経路、リポキシゲナーゼ経路およびエポキシゲナーゼ経路の3つに分けられる。シクロオキシゲナーゼ経路ではアラキドン酸から小胞体にあるシクロオキシゲナーゼによりプロスタグランジン G_2 (prostaglandin G_2 : PGG_2) を経てプロスタグランジン H_2 (prostaglandin H_2 : PGH_2) が産生され、ついで細胞によって種々のプロスタグランジンおよびトロンボキサンとその類縁物質が産生される。代表的なものは血小板で産生される TXA_2 と血管壁で産生される PGI_2 である。 TXA_2 は血小板の小胞体にある TXA_2 合成酵素により PGH_2 から産生される。 TXA_2 は血漿中ではきわめて寿命の短い大変不安定な物質であるが、生体内では最も強力な血小板凝集作用と血管収縮作用を有しており、血栓症および動脈硬化症の発症進展の過程において重要な促進因子の一つと考えられる¹⁾。 TXA_2 による血小板活性機構については、血小板膜上にある TXA_2 受容体を介して血小板の活性化が起こることが明らかにされ、さらに TXA_2 受容体の遺伝子が最近クローニングされている⁶⁾。一方 PGI_2 は TXA_2 と同様血漿中では不安定な物質であるが、その作用は TXA_2 とは全く正反対に生体内では最も強力な血小板凝集抑制作用と血管拡張作用を有し、全身の血

流の恒常性の維持において最も重要な役割を果たしていると考えられている。⁷⁾ PGI₂ は血小板膜上にある PGI₂ 受容体を介して血小板の cyclic AMP 産生を増加させて血小板凝集を低下させることが諸家により明らかにされている。⁸⁾

リポキシゲナーゼには酸素添加反応の位置により, 5-, 12-, 15- の各リポキシゲナーゼが存在し, 5- および 15- リポキシゲナーゼは白血球などの炎症性細胞に, 12- リポキシゲナーゼはおもに血小板に分布している。5- リポキシゲナーゼの代表的な代謝産物に一連のロイコトリエン (leukotriene: LT) がある。なかでも LTB₄ は強力な炎症惹起作用を有し, 一方 LTC₄, D₄ は強力な気管支平滑筋収縮作用を有しており, 炎症反応或いはアレルギー反応において重要な役割を果たすことが知られている。また中間代謝産物である hydroperoxyeicosatetraenoic acid (HPETE) にはホルモン分泌促進作用などが知られている。⁹⁾ エポキシゲナーゼ経路については主要な代謝産物である epoxyeicosatrienoic acid (EET) のホルモン分泌促進作用等の多彩な生理作用が報告されている。^{10, 11)}

(2) 血栓症・動脈硬化症におけるアラキドン酸代謝の異常と抗血小板剤の登場

TXA₂ および PGI₂ の発見を契機として, 血栓性および動脈硬化性疾患の発症ならびに進展の過程においてこれらの生理活性物質が重要な役割を果たす可能性が考えられ, 1980 年前後から各種の血栓性および動脈硬化性疾患におけるこれらの生理活性物質の変動に関する検討が精力的に開始された。その結果血栓性および動脈硬化性疾患患者においては, 血小板での TXA₂ 産生が亢進している一方, 血管壁の PGI₂ 産生は不変もしくは逆に低下

しているとの報告が相次ぎ, その機序についても解明が進められている。^{12, 14)} すなわち, これらの疾患患者においては TXA₂/PGI₂ 比が TXA₂ によりシフトしており, 血栓を形成しやすい状態 (易血栓状態) になっていることが明らかになった。そこで, アラキドン酸カスケードに作用する薬剤により血栓症・動脈硬化症の予防・治療を可能ならしめるべく, 血小板機能を抑制する薬剤, すなわち抗血小板剤の開発が開始され, 一部は臨床に応用されるようになった。

Table I に現在開発中および臨床応用されている抗血小板剤について, 作用機序別に示す。この中で, 最も古くから知られているのがアスピリンである。アスピリンは以前から強力な解熱鎮痛作用があり広く用いられていたが, その機序は不明であった。ところがアスピリンにはアラキドン酸カスケードのシクロオキシゲナーゼを不活性化する結果, プロスタグランディン等の炎症惹起作用を有する一連のシクロオキシゲナーゼ代謝産物の産生を低下させ抗炎症効果を発現することが明らかにされて以来, そのシクロオキシゲナーゼ阻害作用がにわかに注目されるようになった。アスピリンは血小板においてシクロオキシゲナーゼを抑制し, TXA₂ の産生を強力に抑制し血小板凝集を低下させることから, 血小板の TXA₂ 産生が増加した患者では有用性が高いとされ, 今日では広く用いられる抗血小板剤の一つである。しかしながら, アスピリンは血小板凝集を抑制する一方で, 血管壁のシクロオキシゲナーゼを抑制し, PGI₂ 産生を抑制するという相反する作用, すなわちアスピリンジレンマがあることはよく知られており, 血小板と血管壁のシクロオキシゲナーゼのアスピリンに対する感受性の相違を利用したいわゆる『low dose aspirin therapy』が試みられている。¹⁵⁾

Table I 抗血小板作用を有する薬剤の分類

(1) 血小板環状ヌクレオチド代謝に関連するもの	
1. cAMP 代謝に関連するもの	
I. cAMP 合成促進	: チクロピジン
II. cAMP 分解抑制	: シロスタゾール, ジビリダモール
2. cGMP 代謝に関連するもの	
I. cGMP 合成促進	: NO 関連物質 (ニトログリセリン)
II. cGMP 分解抑制	: MY-5445
(2) 血小板アラキドン酸代謝に関連するもの	
1. シクロオキシゲナーゼ阻害剤	: アスピリン, インドメサシン
2. トロンボキサン A ₂ 合成阻害剤	: OKY-046, Dazoxiben
3. トロンボキサン A ₂ 受容体拮抗剤	: S-145, SN-309, SQ-29548
(3) プロスタグランディンとその誘導体	
1. PGE ₁ とその誘導体	: PGE ₁ , オバルモン
2. PGI ₂ とその誘導体	: プロサイリン, Iloprost, CS-570
(4) その他	
	: エイコサペンタエン酸

現在我が国で最も多く用いられている抗血小板剤は血小板の環状ヌクレオチド代謝、とくに cyclic AMP を増加させることにより抗血小板作用をあらわす薬剤である。チクロピジンおよびシロスタゾールがこの範疇に含まれる。これらの薬剤の特徴はその作用機序が PGI_2 のそれに類似している点にある。

最近経口投与可能な PGI_2 の誘導体が臨床応用され、抗血小板作用に加えて強力な血管拡張作用を有していることから注目されている。一方、シクロオキシゲナーゼでなく直接 TXA_2 合成酵素を抑制し TXA_2 産生を低下させる試みがなされ、一部は臨床応用されている¹⁶⁾。また TXA_2 受容体の解析が進んだことから、特異的 TXA_2 受容体拮抗剤の開発も進められており一部臨床試験も行われている¹⁷⁾。

このように現在多数の抗血小板を有する薬剤が臨床に応用されつつあるが、魚油由来の eicosapentaenoic acid (EPA)¹⁸⁾を除くといずれも化学合成品であり、抗血小板剤の投与が長期間にわたることを考えるとこれらの薬剤の安全性の確立は不可欠と考えられる。一方和漢薬を初めとする天然物中の生理活性物質の分離・精製および構造決定の技術は近年格段に進み、『未知の薬物の宝庫』ともいえる和漢薬の研究が新たな展開を迎えつつあるのが現状である。その意味でも抗血小板作用を有する天然薬物、とくに和漢薬の研究は大いに意義があると考え、私は 1980 年代初頭に以下に述べる一連の研究に着手した。

3. 和漢生薬の抗血小板作用とその機序について

抗血小板作用を有する和漢薬の研究を開始するに当たって、まずどのような生薬について解析を行うべきかが最初の課題であった。元来漢方医学には『血栓症』という西洋医学的な病態および疾患概念はないけれども、血栓性疾患ないしはそれに近い病態に関する記載はあるであろうと考え、種々検索した結果、末梢循環障害の一種とされる『瘀血』に注目し『瘀血』の治療に用いられる一連の和漢薬すなわち、駆瘀血生薬をとりあげ、その抗血小板作用について解析を行なうこととした。対象となったのは代表的な駆瘀血生薬である、牡丹皮、当帰、川芎、桃仁および桂皮であった。これらの生薬の水性エキスを調製し、健常者より採取した血液から調製した多血小板血漿 (platelet rich plasma: PRP) を種々の血小板凝集惹起物質で刺激した際の血小板凝集に及ぼす影響について *in vitro* の系で検討し、抗血小板作用を有する和漢生薬のスクリーニングを行なった。その結果、牡丹皮と桂皮に強力な抗血小板凝集抑制作用が認められた¹⁹⁾。そこでこの 2 種類の和漢薬の血小板凝集抑制作用の機序

について、とくに血小板凝集に重要な役割を果たしているアラキドン酸代謝経路を中心に検討を開始した。

(1) 牡丹皮および桂皮の抗血小板作用とその機序

スクリーニング試験において強力な血小板凝集抑制作用を有することが判明した牡丹皮および桂皮について、まずどの成分に血小板凝集抑制作用があるのかについて検討を行なった。牡丹皮の有効成分は Fig. 2 に示すような paeonol とその誘導体が知られている。一方桂皮の有効成分としては Fig. 3 に示すような cinnamic aldehyde とその代謝産物である cinnamic acid が知られている。そこで paeonol と cinnamic aldehyde のヒト血小板凝

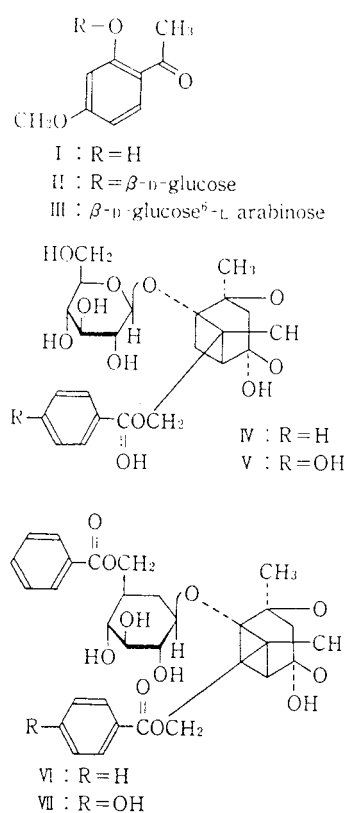


Fig. 2 Paeonol (I), its glucoside paeonoside (II), paeonolide (III), monoterpen glucoside paeoniflorin (IV), oxypaeoniflorin (V), benzoylpaeoniflorin (VI) and benzoyloxypaeoniflorin (VII)

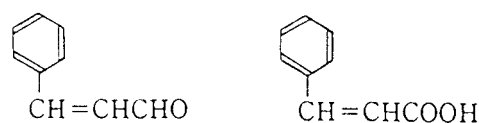


Fig. 3 Structure of cinnamic aldehyde (left) and cinnamic acid

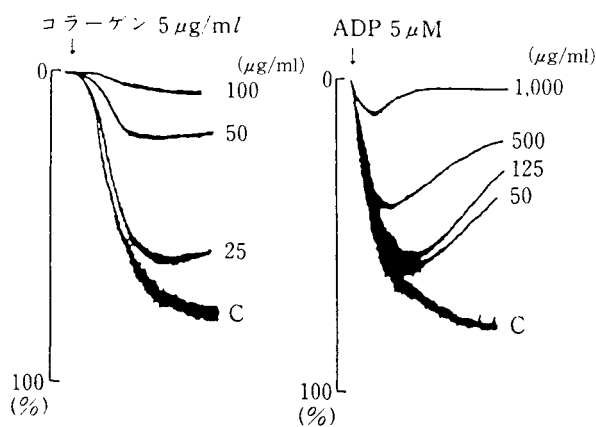


Fig. 4 Effect of paeonol on human platelet aggregation induced by collagen or ADP. C: control

集に及ぼす効果について *in vitro* の系で検討を加えた。その結果, Fig. 4 および Fig. 5 に示すようにいずれの有効成分も濃度依存性にヒト血小板凝集を抑制することが判明し, 牡丹皮および桂皮の抗血小板作用の一部はこれらの有効成分によることが明らかになった。²⁰⁾ なお cinnamic aldehyde の抗血小板作用がそれ自身によるのかあるいはまたその代謝産物の cinnamic acid によるのかについて両者を比較したところ, cinnamic acid の血小板凝集抑制作用が cinnamic aldehyde と比較してきわめて弱いことが明らかになり, cinnamic aldehyde の抗血小板作用はそれ自身によることがわかった。そこで以後の検討に於いては paeonol と cinnamic aldehyde の二者に的を絞って検討を進めることとした。

血小板が種々の刺激物質によって活性化されると, 上述した経路によって血小板アラキドン酸代謝が活性化され, 強力な血小板凝集促進作用を有する TXA_2 が産生される。現在まで報告されている抗血小板の大部分は血小板活性化に伴う TXA_2 の産生を抑制することが知られている。そこで, paeonol および cinnamic aldehyde の存在下で PRP をコラーゲンなどの凝集惹起剤で刺激した際に産生される TXA_2 をその安定な代謝産物である TXB_2 として radioimmunoassay (RIA) にて測定したところ, paeonol と cinnamic aldehyde はいずれも添加量に応じて TXB_2 産生を抑制した。^{21, 22)} この成績が得られた 1983 年当時はいまだ天然薬物の有効成分によるアラキドン酸代謝の抑制に関する報告は世界的に見てもほとんどなく, 和漢薬の有効成分が TXA_2 産生を抑制した成績はきわめて意義の大きいものであった。

つぎに paeonol および cinnamic aldehyde がどのような機序によって TXA_2 産生を抑制したのかを明らかにするため, 洗浄血小板浮遊液を調製し ^{14}C 標識したアラキドン酸と反応させ, 産生された代謝産物を薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて分析する系を確立し, paeonol および cinnamic aldehyde の影響について検討した。血小板でのアラキドン酸代謝の概要を Fig. 6 に示す。血小板膜から遊離したアラキドン酸代謝は小胞体にあるシクロオキシゲナーゼと細胞質にある 12-リポキシゲナーゼによってそれぞれ代謝され, 前者の経路では PGH_2 を経て TXA_2 と HHT が産生され, 後者の経路では 12-HPETE を経て 12-HETE が産生される。 ^{14}C 標識したアラキドン酸の血小板での最終産物である ^{14}C - TXB_2 , ^{14}C -HHT および ^{14}C -12-HETE を TLC で分析

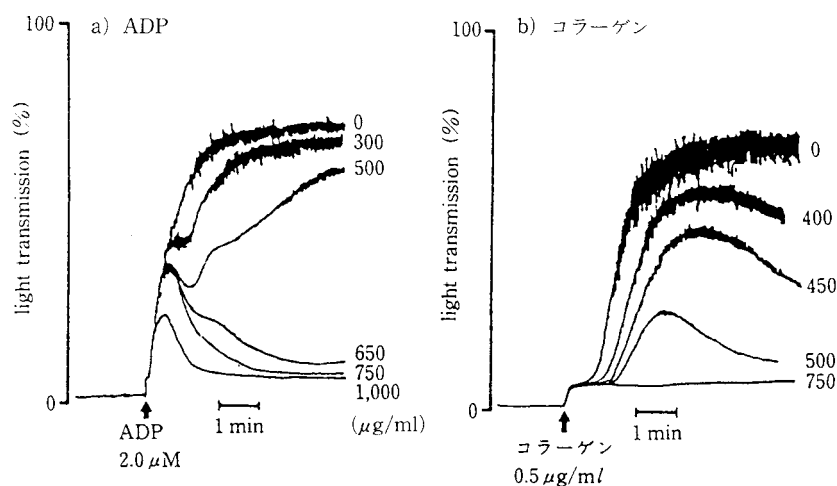


Fig. 5 Effect of cinnamic aldehyde on platelet aggregation induced by ADP or collagen

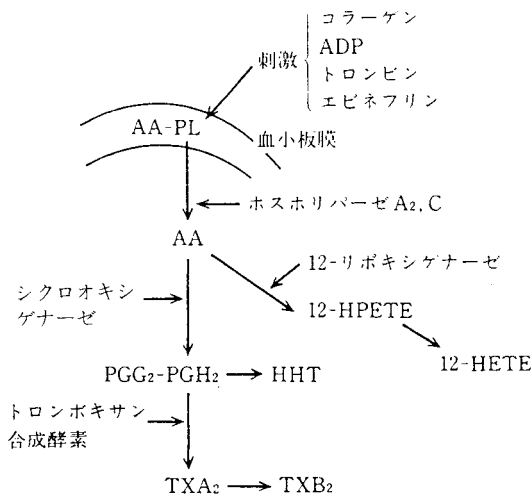


Fig. 6 Metabolism of arachidonic acid in the platelet

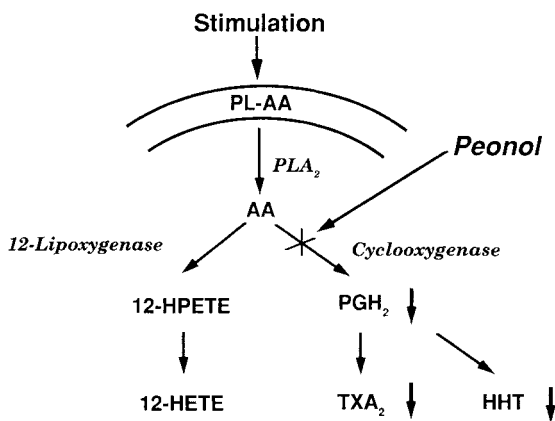


Fig. 7 Site of action of peonol in the metabolism of arachidonic acid

することにより、解析する薬剤がシクロオキシゲナーゼあるいは12-リポキシゲナーゼのいずれの経路に影響を与えているかを明らかにすることが可能となる。この実験系を用いて検討した結果、paeonolはTXA₂産生の律速段階であるシクロオキシゲナーゼを抑制することによりTXB₂産生を抑制することが判明した (Fig. 7)²³⁾。この作用機序はアスピリンのそれと全く同じであり、またpaeonolには抗炎症作用があることを考えあわせると大変興味深いものがある。一方 cinnamic aldehydeはこの実験系では全く添加効果が見られず、シクロオキシゲナーゼあるいは12-リポキシゲナーゼのいずれの経路にも影響を与えないことが明らかになった。²²⁾ このことは cinnamic aldehydeの作用点としてはシクロオキシゲナーゼより上位、すなわち血小板膜からのアラキドン酸の遊

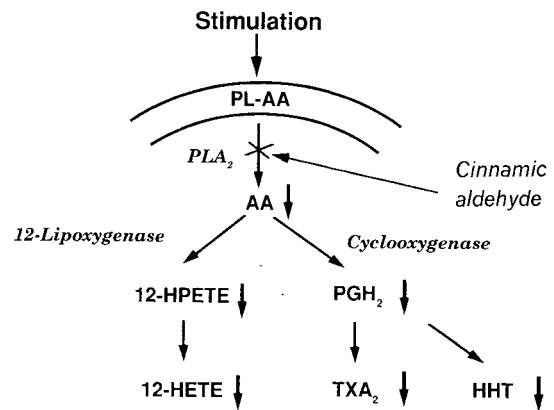


Fig. 8 Site of action of cinnamic aldehyde in the metabolism of arachidonic acid

離過程にある可能性を強く示唆するものである。そこで血小板活性化にともなうアラキドン酸の遊離とその代謝に対する cinnamic aldehydeの影響を検討するため、細胞膜のリン脂質を¹⁴C標識したアラキドン酸でラベルした血小板を調製し、これをコラーゲンなどで刺激した際に産生された代謝産物を解析する系をあらたに確立し、検討を加えた。その結果、cinnamic aldehydeはTXA₂の基質であるアラキドン酸の細胞膜からの遊離を抑制することにより、TXA₂産生を抑制することが明らかになった²²⁾ (Fig. 8)。なおこの cinnamic aldehydeによるアラキドン酸遊離抑制の機序として、従来から報告されている cyclic AMP等の環状ヌクレオチドの増加を介する可能性について、cinnamic aldehydeの血小板 cyclic AMP含量に及ぼす影響を調べたが、なんらの影響も認められずおそらく別の経路を介しているものと考えられた。以上の成績は和漢生薬の特定の有効成分がアラキドン酸代謝の特定の部位に作用し、その薬効・薬理作用を発現することを始めて証明した点で大いに注目された。その後諸家により、いくつかの和漢薬について抗血小板作用が解析され、作用機序を中心に報告がなされている。

(2) 栝楼仁の抗血小板作用とその機序

前述のように駆瘀血生薬の抗血小板作用に関する一連の研究に於いて、和漢薬のなかには確かに血小板アラキドン酸カスケードに作用し、TXA₂の産生を抑制し抗血栓作用を発揮する薬物が存在することが始めて明らかになった。そこでこの成績をふまえて、他にも抗血小板作用を有する和漢薬があるのではないかと考え種々検索した結果、狭心症などの治療に用いられる栝楼仁の主成分である trichosanonic acidに血小板凝集抑制作用があることが明らかになった (Fig. 9)。trichosanonic acidは Fig.

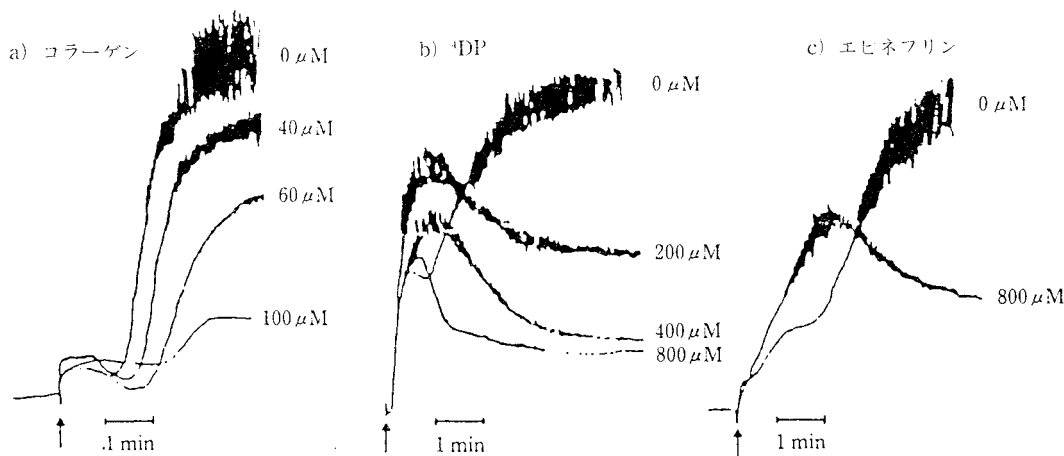


Fig. 9 Effect of trichosanic acid on platelet aggregation induced by collagen, ADP or epinephrine

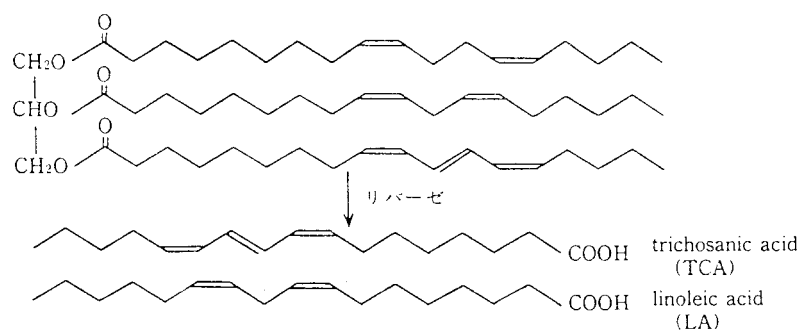


Fig. 10 Major constituents of *Trichosantes japonica*

10に示すように炭素数18個、二重結合3個の構造を持った多価不飽和脂肪酸の一種である。そこで前述の洗浄血小板をもちいた分析系でtrichosanic acidの血小板アラキドン酸代謝に及ぼす影響について検討した。その結果trichosanic acidはシクロオキシゲナーゼによるアラキドン酸代謝を抑制しTXB₂産生を低下させ血小板凝集を抑制することが明らかになった。²⁴⁾ trichosanic acidの異性体とも言うべき他のC18:3の多価不飽和脂肪酸(α -linoleic acidと γ -linoleic acid)について同様の検討を行ないそのシクロオキシゲナーゼ抑制の力価を比較したが三者の間には有意な差は認められなかった。²⁴⁾従ってtrichosanic acidのシクロオキシゲナーゼ抑制作用はこの脂肪酸に特有のものと言うよりはC18:3の多価不飽和脂肪酸に共通して認められる作用と考えられた。

(3) 薬用人参の抗血栓・抗動脈硬化作用とその機序

古来より高貴薬として珍重されてきた薬用人参(高麗人参:紅参)は、中国最古の本草書である『神農本草経』にその薬効が種々記載されており、向精神作用、循環改

善作用、造血促進作用などの効用が経験医学的に知られていた。近年隣国の韓国において、紅参の大規模な栽培が可能となり、わが国へも紅参が医薬品として供給されるようになり、紅参の薬効とその作用機序が見直されつつある。紅参が末梢循環改善作用を有することは以前から知られていたがその詳細は不明であった。中西らは紅参末の投与が健常者において有意の血小板凝集抑制をもたらすことをはじめて報告した。¹⁹⁾そこでこの紅参の抗血小板作用が紅参中のどの成分によるのか、さらにはその作用機序は如何なるものであるかを明らかにすることを目的として検討を開始した。

(A) 薬用人参の血小板に対する作用(人参サポニンの抗血小板作用とその機序)

まず、紅参中のどの成分に抗血小板作用があるのかについて上述したPRPを持ちいる*in vitro*のスクリーニング系を用いて検討を加えた。紅参の有効成分のうち現在もっとも研究が進んでいるのはginsenosideと呼ばれる一連の人参サポニンである。そこでFig. 11に示すような種々の人参サポニンを用いて*in vitro*実験系で、ア

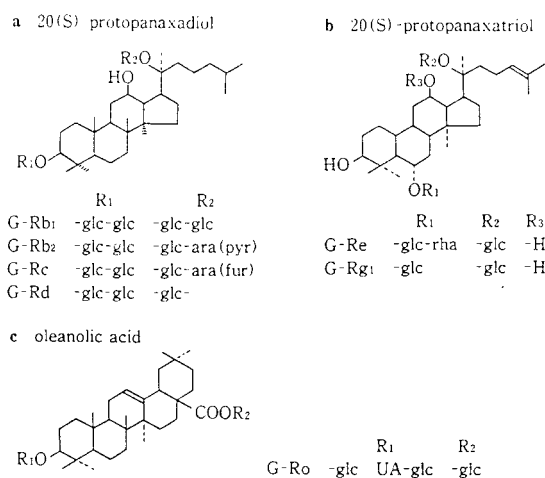


Fig. 11 Structure of ginseng saponins which were used in the present study.

glc: β -D-glucopyranosyl, ara (pyr): α -L-arabinopyranosyl, ara (fur): α -L-arabinofuranosyl, rha: α -L-rhamnopyranosyl, UA: uracil arabinoside

ラキドン酸, コラーゲン, エピエフリンおよびADPによるヒト血小板凝集に及ぼす影響について検討した。その結果, いずれの凝集惹起剤についても ginsenoside Rg₁ (G-Rg₁)に強力な血小板凝集抑制効果が認められ, 紅参の抗血小板作用の一部は G-Rg₁ によることが明らかになった (Fig. 12)²⁵⁾。この基礎試験でとくに注目されたのはアラキドン酸による血小板凝集を G-Rg₁ が強力に抑制した点である。このことは G-Rg₁ がアラキドン酸からの TXA₂ 産生を抑制した可能性を示唆するものである。そこで G-Rg₁ が血小板でのアラキドン酸からの TXA₂ 産生に及ぼす影響について調べたところ, 驚いたことに G-Rg₁ はこの経路にはまったく影響を与えなかった。このことは G-Rg₁ が TXA₂ の産生抑制ではなく, その作用を阻害した可能性を強く示唆するものである。TXA₂ はきわめて不安定な物質であるため, その安定な誘導体である STA₂ を用いて, G-Rg₁ の効果について検討した。その結果, G-Rg₁ は STA₂ によるヒト血小板凝集を濃度依存性に抑制した (Fig. 13)。このことは G-Rg₁ は TXA₂ の産生を低下させるのではなく, その作用を抑制

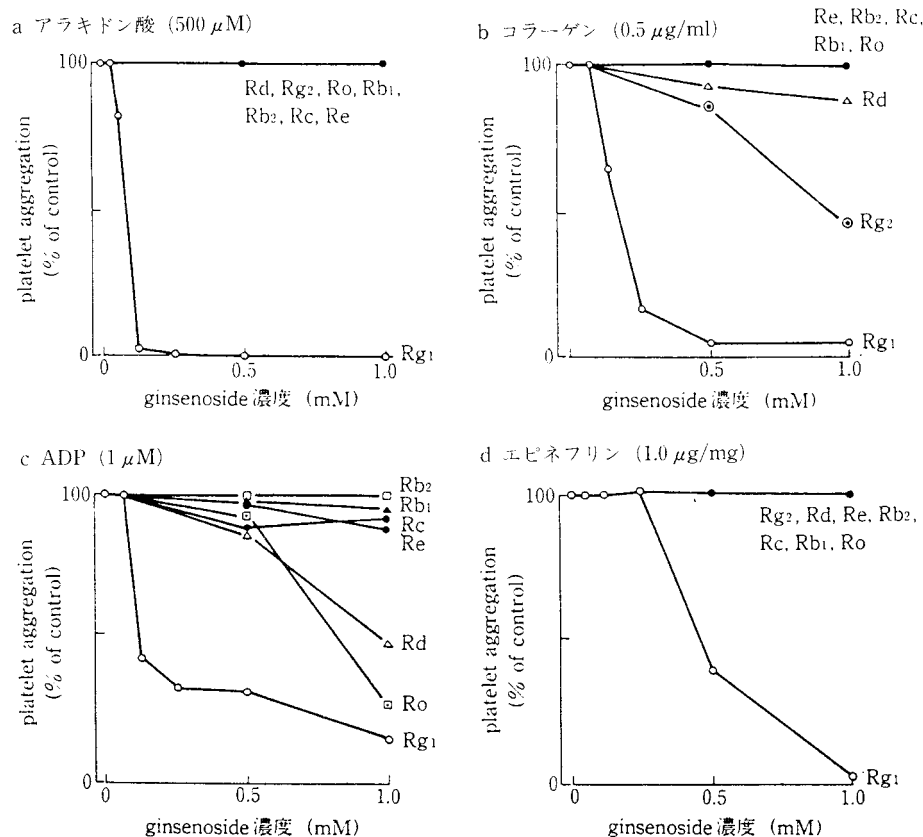


Fig. 12 Effects of various ginseng saponins on human platelet aggregation induced by arachidonic acid, collagen, ADP and epinephrine

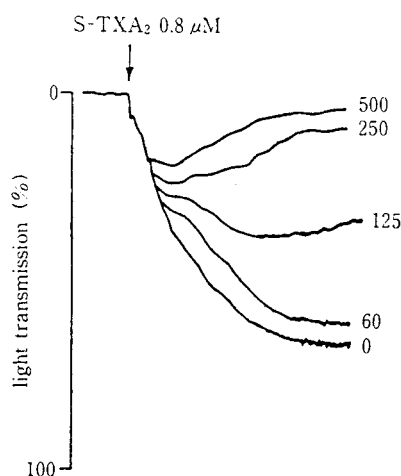


Fig. 13 Effect of G-Rg₁ on platelet aggregation induced by S-TXA₂

する結果血小板凝集を抑制することが初めて明らかになった。それでは G-Rg₁ はどのような機序で TXA₂ による血小板の活性化を抑制したのだろうか？TXA₂ は血小板膜上に存在する受容体に結合し、血小板を活性化することが知られている。その際カルシウムメッセンジャー系が主要な役割を果たすことが明らかにされている。そこで TXA₂ の受容体への結合および受容体以降の活性化プロセスとくに細胞内カルシウム動員におよぼす G-Rg₁ の作用について検討した。その結果、G-Rg₁ は TXA₂ の受容体への結合にはまったく影響を与えず、TXA₂ 刺激時の細胞内カルシウム動員を抑制した。この結果から G-Rg₁ は TXA₂ 受容体以降の活性化機構を阻害する結果、カルシウム動員を抑制することが明らかになった²⁶⁾ (Fig. 14)。この *in vitro* の系で認められた G-Rg₁ の抗 TXA₂ 作用は、高度精製された G-Rg₁ のヒト

への投与試験においても同様に認められた。²⁶⁾ なお G-Rg₁ は 6 位と 20 位にそれぞれ一個ずつのブドウ糖を有する構造をしている。以前よりサポニン等の配糖体の活性には糖鎖が密接に関係していることが知られている。そこで G-Rg₁ の抗 TXA₂ と糖鎖の関係を明らかにするため、G-Rg₁ の 20 位の糖がはずれた ginsenoside Rh₁ (G-Rh₁) と 6 位の糖がはずれた ginsenoside F₁ (G-F₁) を新たに調製し G-Rg₁ と比較検討した。G-Rh₁ はヒト血小板凝集にほとんど影響を与えなかったが、G-F₁ は G-Rg₁ とほぼ同等の血小板凝集抑制作用を示した。このことから G-Rg₁ の抗血小板作用の構造活性相関については 20 位の糖が血小板凝集抑制作用の発現に重要であることが明らかとなった。

近年複数の TXA₂ 受容体拮抗剤が開発され、臨床試験が進められている。和漢生薬には従来 TXA₂ 拮抗作用を有する薬物の報告は全くなく、上述した人參サポニンの G-Rg₁ が初めてのものである。ところで我々は、コレステロールの増加した血小板では TXA₂ に対する反応性が亢進していることをすでに報告している。²⁷⁾ 今回の投与試験は、TXA₂ に対する血小板の反応性が亢進していると考えられる血栓性・動脈硬化性疾患の患者において、“TXA₂ 阻害剤”としての紅参の有用性を示唆する重要な知見と考えられる。

ところで、紅参の投与試験に於いては一日 9 カプセルの投与で有意な血小板凝集の抑制が見られたのに対して、精製 G-Rg₁ を用いて同等の抑制効果を得るには少なくとも 50 ないし 100 mg/日の投与量が必要であるが、9 カプセルの紅参に含まれる G-Rg₁ の量はその数分の 1 であり、紅参の血小板凝集抑制作用を G-Rg₁ のみに帰することには無理がある。最近紅参中に含まれている他の人參サポニンのあるものは、内服後に胃液中で変換反応

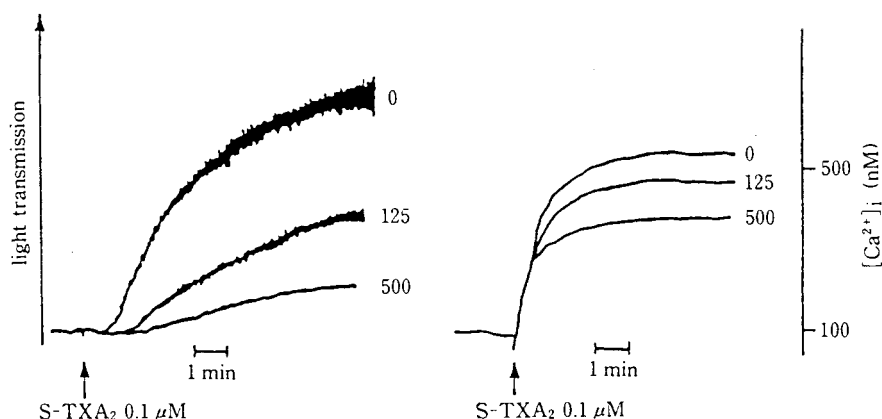


Fig. 14 Effect of G-Rg₁ on S-TXA₂-induced human platelet aggregation (left) and increase in the level of intracellular Ca²⁺

protopanaxadiol

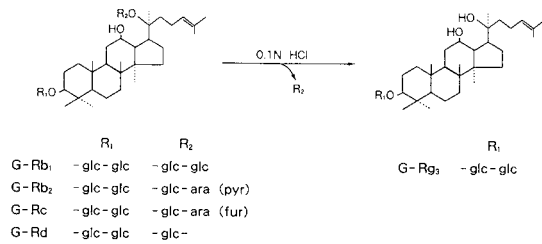
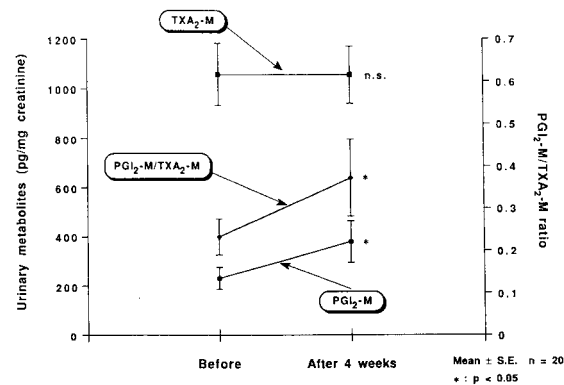


Fig. 15 Transformation of ginseng saponins in the artificial gastric fluid

が起こることが明らかにされた。この点に注目して検討した結果、紅参中に比較的大量に含まれる ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc および Rd は、それ自身にはまったく血小板凝集抑制作用はないが、これらの人参サポニンから人工胃液中で生ずる ginsenoside Rg₃ (G-Rg₃) は G-Rg₁ とほぼ同等の血小板凝集抑制作用を有することが明らかになった (Fig. 15)。このことは G-Rb₁, Rb₂, Rc および Rd はいわば G-Rg₃ の『プロドラッグ』として作用している可能性を示唆するものとして注目される。今後和漢薬の多彩な作用を解析する上で、生薬自身に含まれている有効成分の解析だけでは不十分であり、和漢生薬の有効成分の内服後の代謝により生ずる産物の作用の解析が不可欠であることを今回の成績は示唆している。

(B) 薬用人参の血管壁に対する作用 (PGI₂ 産生の促進作用)

ところで紅参には以前より末梢環境改善作用があり紅参を内服すると手・足が温まる、皮膚温の上昇がみられるとの臨床成績がある。すでに述べたように血管壁から産生される PGI₂ には強力な血管拡張・血小板凝集抑制作用のあることが広く知られている。そこで紅参の末梢環境改善作用の背景には血小板に対する作用のみではなく血管壁への作用、とくに PGI₂ 産生に対し何らかの作用があるのではないかと考え、紅参のヒトへの投与試験を行ない血管壁の PGI₂ 産生に及ぼす作用について検討を開始した。血管壁の PGI₂ 産生の指標としては以前から PGI₂ の安定な代謝産物である 6-keto PGF_{1α} の血漿レベルが測定されてきたが、採血時の血球成分の活性化による産生などの問題がありかならずしも *in vivo* の PGI₂ 産生を反映するものではなかった。近年 PGI₂ の生体内での代謝経路の解明が進み、PGI₂ は 6-keto PGF_{1α} に代謝された後さらに肝臓などでβ酸化されて 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α} (2,3-D, 図中 PGI₂-M) に代謝され尿中に排泄されることが明らかになった。すなわち尿中の 2,3-D を測定することにより *in vivo* の PGI₂ 産生を

Fig. 16 Changes in urinary excretion of PGI₂-M and TXA₂-M during 4 weeks administration of red ginseng capsules

評価することが可能となったのである。そこであらたに RIA 法により尿中の 2,3-D を測定する系を確立し投与試験を行なった。4 週間紅参を動脈硬化性疾患患者に投与し、尿中 2,3-D を測定したところ、紅参投与により、有意の尿中 2,3-D の増加が認められた (Fig. 16)。一方生体内での TXA₂ 産生の指標としてすでにひろく用いられている尿中 11-dehydro-TXB₂ (11-D, 図中 TXA₂-M) も測定したが、有意の変動は見られなかった。この成績は紅参が血管壁での PGI₂ 産生を促進する作用を有していることをはじめて明らかにしたものであり、紅参の末梢循環改善作用の機序の一端を説明するものとして注目された。なお現在用いられている抗血小板剤のなかで、血管壁の PGI₂ 産生を促進する作用が知られているのは、eicosapentaenic acid (EPA : エパデール)²⁸⁾ や TXA₂ 合成酵素阻害剤 (OKY-046 : カタクロット)¹⁶⁾ など一部の薬剤にすぎない。

(C) 人参サポニンによる PGI₂ 産生促進作用とその機序—遺伝子レベルでの解析—

次にこの臨床試験の結果を踏まえて、ラット胸部大動脈より調製した培養血管壁平滑筋細胞を用いて紅参のどの成分に PGI₂ 産生促進作用があるか検討した結果、人参サポニン一種である ginsenoside Rc (G-Rc) が PGI₂ 産生を促進することが判明した (Fig. 17)。つぎに G-Rc の PGI₂ 産生を促進作用の機序を明らかにする目的で培養血管壁平滑筋細胞のアラキドン酸代謝に及ぼす G-Rc の影響について他の人参サポニンと比較検討した。まず PGI₂ 産生の最終段階である PGI₂ 合成酵素について、基質である PGH₂ の ¹⁴C 標識体を合成しその活性を測定した。G-Rc をはじめ 4 種の人参サポニンの存在下で培養した培養血管壁平滑筋細胞では有意な PGI₂ 合成酵素活性促進は認められなかった。このことは G-Rc による

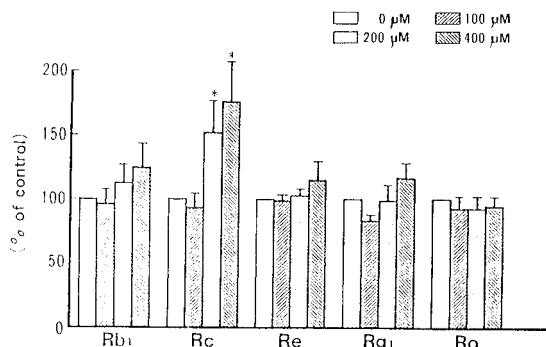


Fig. 17 Effect of ginsenosides on the production of 6-keto-PGF_{1α} in cultured vascular smooth muscle cells. Results represented mean $\pm$ S.E.M. of separate four to eight experiments * $p < 0.05$

PGI₂ 産生促進の作用点が PGI₂ 合成酵素でないことを示している。一方, [¹⁴C]AA をもちいてアラキドン酸からの PGI₂ 産生におよぼす人参サポニンの影響を検討したところ, G-Rc のみが有意にアラキドン酸からの PGI₂ 産生を促進した (Fig. 18)。この成績は前述の PGI₂ 合成酵素に対する成績とも合わせると, G-Rc の作用機序の一つとしてアラキドン酸のシクロオキシゲナーゼによる代謝の促進が考えられる。²⁹⁾ シクロオキシゲナーゼは一般にプロスタグランディンの合成の律速段階とされており, G-Rc の作用点であっても, 不思議ではない。ところで, 培養血管壁平滑筋細胞のシクロオキシゲナーゼによるアラキドン酸代謝が G-Rc により促進された機序としては (1) 酵素蛋白自身の量的増加 (遺伝子発現の増加または酵素蛋白の分解の抑制) あるいは (2) 酵素活性因子などによる酵素量の変動を伴わない活性化などの可能性が考えられる。そこで, G-Rc がどのような機序で培養血管壁平滑筋細胞のシクロオキシゲナーゼによるアラキドン酸代謝を促進したのかを明らかにするため, さらに検討を

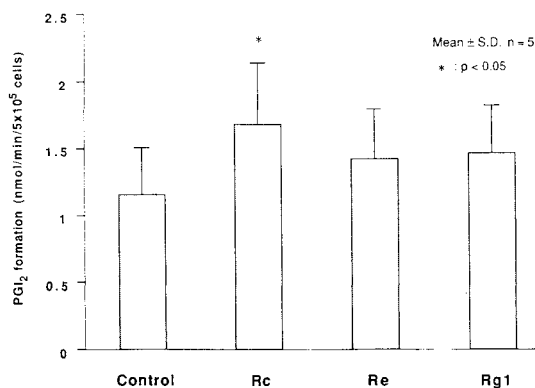


Fig. 18 Effect of ginsenosides on PGI₂ formation by rat vascular smooth muscle cells

加えた。すでにシクロオキシゲナーゼが種々の成長因子によって誘導されることが明らかにされている。³⁰⁾ いままで行なった G-Rc の添加実験はいずれも種々の成長因子を豊富に含有する 10 % の fetal calf serum (FCS) の存在下で行なっていることから, まずシクロオキシゲナーゼの遺伝子発現におよぼす G-Rc の作用について, ラットシクロオキシゲナーゼの mRNA レベルを Northern blot 法をもちいて解析した。ヒツジ精囊腺のシクロオキシゲナーゼの cDNA 配列を基にして, アスピリンによりアセチル化され失活するセリン残基を含む部位をコードするオリゴヌクレオチドを合成し, これを用いて, ラット FRTL-5 細胞のライブラリーからラットシクロオキシゲナーゼの cDNA をクローニングした。³⁰⁾ このクローンの 860 bp の断片を ³²P 標識したものをプローブとして用い, 培養血管壁平滑筋細胞より抽出した total RNA の Northern blot analysis を行なった。また Bio-image analyzer (富士写真フイルム社製) をもちいてバンドの定量的解析を行なった。その結果検討した人参サポニンのうちで G-Rc のみが有意なシクロオキシゲナーゼの mRNA レベルの増加をもたらした²⁹⁾ (Fig. 19)。この成績は G-Rc がシクロオキシゲナーゼの遺伝子発現の増加, すなわちシクロオキシゲナーゼの酵素蛋白の誘導をもたらす可能性を示すきわめて重要な知見である。今後は Western blot 法により G-Rc が実際にシクロオキシゲナーゼの蛋白量の増加をもたらすか否かの検討が不可欠である。さらに今回はじめて認められた, G-Rc によるシクロオキシゲナーゼの遺伝子発現の増加が, G-Rc 自身の直接作用によるのか, あるいはまた成長因子などのシクロオキシゲナーゼ誘導因子の作用を増強したためであるのかについても検討が不可欠である。

これらの一連の研究により, 紅参には血小板に直接作用して抗血栓作用をあらわす G-Rg₁ や G-Rg₃ に加え

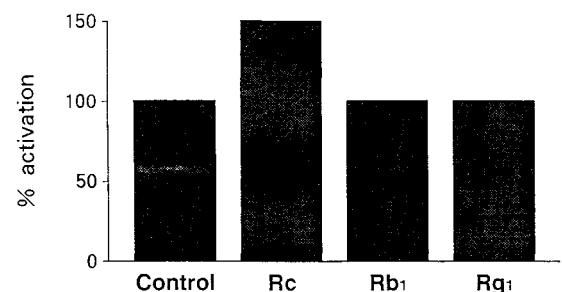


Fig. 19 Effect of ginsenosides on the expression of cyclooxygenase mRNA in rat cultured VSMC; determined by Northern blot analysis (mean of two separate experiments)

て、血管壁に作用して PGI_2 の産生を促進する G-Rc が含まれており、これらの複数の有効成分が協調しあって紅参の抗血栓作用をもたらしていることが明らかになった。和漢薬の特色の一つとして生薬および方剤が多成分系であることがよく指摘されている。今回の紅参の抗血栓作用の機序はまさにこの多成分系の典型例であると言っても過言ではない。今後は各種の血栓性・動脈硬化性疾患での長期間の投与試験により紅参の有用性を明らかにするとともに、遺伝子レベルでの紅参の作用機序の解明を進めたい。

4. 今後の研究課題

現在の日本の医療の特徴の一つに、著しく進歩した西洋医学に加えて東洋医学、または漢方医学と呼ばれる古来からの伝統医学がある。漢方医学で用いられる薬物が和漢薬であり、その起源も薬用植物のみに留まらず、鉱物から動物の種々の臓器まで多彩である。これらの和漢薬はいずれも三千年以上の長い歴史の中で選別淘汰されてきたものである。しかし従来の漢方医学が主として症候論に重点をおいた診断学中心であったために、和漢薬についてはその薬効の解析、有効成分の解析、作用機序の解明にあたっては近代西洋医学の分析的手段の導入が不可欠であった。近年和漢薬を初めとする天然物中の生理活性物質の分離・精製および構造決定の技術が格段に進み、『未知の薬物の宝庫』ともいえる和漢薬の研究が新たな展開を迎えつつあるのが現状である。一方分子生物学および遺伝子工学の著しい発展により成人病をはじめとした各種疾患の病因病態が遺伝子レベルで解析されるようになってきた。和漢薬の作用機序の解析が本稿で述べたように遺伝子レベルでなされる日も遠いことではないように思われる。今後若手の気鋭の研究者が積極的に和漢薬研究に参加されることを切望してやまない。

今日、我が国は世界に例を見ない早さで急速に高齢化社会に移行しようとしている。とりわけ老人性痴呆の急増は大きな社会的問題となりつつある。我が国の老人性痴呆は大部分が血管性痴呆であるとされており、抗血小板作用を有する薬剤の臨床上的有用性が期待される分野の一つである。疾病構造は社会の発展とともに大きく変わるものであり、老人性痴呆の急増といった未曾有の事態に際して、先人の残してくれた和漢薬という貴重な財産に『抗血小板作用を有する薬物の探索』という新たな光を当てることによりこの難局を乗り切る一助になれば幸いと考える次第である。現在までに開発され、臨床応用されてきた抗血小板剤はほとんどが化学合成品であり、和漢薬のような天然物由来の薬剤はきわめて稀である。また抗血小板療法は対象とする疾患の性質から生涯

治療が基本であり、当然のことながら薬剤投与が長期間に及ぶことは自明のことである。抗血小板療法においてはその有効性のみならず、長期投与における安全性の確保は最優先の事項である。このような背景からみても、抗血小板剤としての和漢薬に寄せられる期待は大きい。

謝 辞

本研究を遂行するにあたって終始御指導・御援助下さった富山医科薬科大学熊谷 朗名誉教授、千葉大学薬学部故北川晴雄教授および千葉大学医学部第二内科吉田尚教授、同田村 泰助教授、寺野 隆博士、斉藤博幸博士、田原和夫博士、山本恭平博士、中国科学院葯物研究所張 克堅博士、聖マリアンナ医科大学武永美津子博士ならびに日韓高麗人参株式会社寒川慶一先生に深甚な謝意を表します。また貴重な試薬の御提供ならびに御援助いただいた株式会社ツムラならびに薬用人参研究会に感謝いたします。

References

- 1) Hamberg, M.J., Svensson, B., Samuelsson, B.: *Proc Nat Acad Sci USA*, **72**, 2994-2998, 1975.
- 2) Bunting, S., R. Gryglewski, S. Moncada, and J.R. Vane.: *Prostaglandins*, **12**, 897-913, 1976.
- 3) van den Bosch, H.: *Biochim Biophys Acta*, **604**, 191-246, 1980.
- 4) Berridge, M.J., and R. Irvine F.: *Nature*, **312**, 315-321, 1984.
- 5) Nemenoff, R.A., S. Winitz, N.X. Qian, V. Vanputten, G.L. Johnson, and L.E. Heasley.: *J Biol Chem*, **268** (3), 1960-1964, 1993.
- 6) Hirata, M., Y. Hayashi, F. Ushikubi, Y. Yokota, R. Kageyama, S. Nakanishi, and S. Narumiya.: *Nature*, **349** (6310), 617-620, 1991.
- 7) Moncada, S., and J.R. Vane.: *Adv Prostaglandin Thrombox Leukot Res*, **6**, 43-60, 1980.
- 8) Gorman, R.R., S. Bunting, and O.V. Miller.: *Prostaglandins*, **13**, 377-388, 1977.
- 9) Hirai, A., K. Tahara, Y. Tamura, H. Saito, T. Terano, and S. Yoshida.: *Prostaglandins*, **130** (5), 749-767, 1985.
- 10) Nishimura, M., A. Hirai, M. Omura, Y. Tamura, and S. Yoshida.: *Prostaglandins*, **38** (4), 413-430, 1989.
- 11) Yoshida, S., A. Hirai, Y. Tamura, and S. Yoshida.: *Arch Biochem Biophys*, **280** (2), 346-351, 1990.
- 12) Giovanni, D., A. Maurizio, C. Isabella, B. Carlo, G. Antonella, N. Alberto, C. Giovanni, and P. Carlo.: *Circulation*, **85**, 1792-1798, 1992.
- 13) Patrono, C., P. Patrignani, and G. Davi.: *J lipid Mediator*, **6** (1-3), 411-415, 1993.
- 14) Koudstaal, P.J., G. Ciabattini, J. Vangijn, H.K. Nieuwenhuis, P. G. Degroot, J.J. Sixma, and C. Patrono.: *Stroke*, **24** (2), 219-223, 1993.
- 15) Kearon, D., and J. Hirsh.: *Arch Intern Med*, **153** (6), 700-702, 1993.
- 16) Morio, H., A. Hirai, Y. Tamura, and S. Yoshida.: *Thromb Haemost*, **69**, 276-281, 1993.
- 17) Matsuzaki, T., K. Noguchi, J. Nakasone, K. Uezu, M. Higuchi,

- and M. Sakanashi. : *Arzneimittelforschung*. **42-2** (11), 1318-1322, 1992.
- 18) Hirai, A., T. Terano, Y. Tamura, and S. Yoshida. : *J Intern Med*. **225** (suppl) 731, 67-75, 1989.
- 19) 平田愛山, 田村泰 : 駆瘀血剤生薬とプロスタグランディン. 治療学 **10**, 84-88, 1983.
- 20) 平井愛山, 寺野隆, 浜崎智仁, 田原和夫, 齋藤博幸, 田村泰, 熊谷朗, 吉田尚 : *Proc. Symp. WAKAN-YAKU*. **16**, 114-118, 1983.
- 21) Hirai, A., T. Terano, T. Hamazaki, J. Sajiki, H. Saito, K. Tahara, Y. Tamura, and A. Kumagai. : *Thrombosis Reseach*. **29**, 31-40, 1983.
- 22) Takenaga, M., A. Hirai, T. Terano, Y. Tamura, H. Kitagawa, and S. Yoshida. : *J. Pharma. Dyn.* **10**, 201-208, 1987.
- 23) 平井愛山, 田村泰, 吉田尚 : 牡丹皮とプロスタグランディン代謝. 現代東洋医学 **5** (1), 62-68, 1984.
- 24) Takenaga, M., A. Hirai, T. Terano, Y. Tamura, H. Kitagawa, and S. Yoshida. : *Prostaglandin Leukotriene and Essential Fatty acids*. **31**, 65-72, 1988.
- 25) 田村泰 : 和漢医薬学会誌 **5**, 260-261, 1988.
- 26) Yamamoto, K., A. Hirai, Y. Tamura, and S. Yoshida. : *J. Med. Pharm. Soc. for WAKAN-YAKU*. **5**, 184-190, 1988.
- 27) Tomizuka, T., K. Yamamoto, A. Hirai, Y. Tamura, and S. Yoshida. : *Thromb Haemost.* **64**, 594-599, 1990.
- 28) Hamazaki, T., A. Hirai, T. Terano, J. Sajiki, S. Kondo, T. Fujita, Y. Tamura, and A. Kumagai. : *Prostaglandins*. **23** (4), 557-567, 1982.
- 29) 田村泰, 平井愛山, 寺野隆, 田原和夫, 齋藤淳, 近藤悟, 寒川慶一 : *The Ginseng Review*. **16**, 55-60, 1993.
- 30) Tahara, T., F.F. Grollman, M. Saji, and L.D. Kohn. : *J Biol Chem*. **266**, 440-448, 1991.