

薬用人蔘の抗血栓・抗動脈硬化作用 —血小板および血管壁平滑筋細胞に対する作用—

田村 泰¹⁾ 平井 愛山¹⁾ 寺野 隆¹⁾
田原 和夫¹⁾ 齋藤 淳¹⁾ 近藤 悟¹⁾
寒川 慶一²⁾

1) 千葉大学医学部第二内科*

2) 日韓高麗人蔘株式会社

Anti-thrombotic and anti-atherogenic effects of Korean Red Ginseng — Effects on platelets and vascular smooth muscle cells —

Yasushi TAMURA¹⁾, Aizan HIRAH¹⁾, Takashi TERANO¹⁾, Kazuo TAHARA¹⁾,
Jun SAITO¹⁾, Satoru KONDO¹⁾ and Keiichi SAMUKAWA²⁾

1) The Second Department of Internal Medicine, Chiba University Medical School

2) Japan Korea Red Ginseng Co., Ltd.

Abstract

Korean Red Ginseng has been reported to have anti-thrombotic and anti-atherogenic effects and thereby to be useful in the prevention and the treatment of certain thrombotic and cardiovascular disorders. In the present study, firstly the effect of oral administration of Korean Red Ginseng on platelet aggregation and thromboxane B₂(TXB₂) formation in the patients with thrombotic and atherosclerotic disorders were determined. Secondly the effect of various ginseng saponins on the production of prostacyclin by cultured rat vascular smooth muscle cells (VSMC) was studied.

Four weeks administration of 9 capsules of Korean Red Ginseng significantly decreased collagen-induced platelet aggregation and TXB₂ formation in the patients. U-46619 (a stable analogue of TXA₂)-induced platelet aggregation and TXB₂ formation in the patients was also decreased. It has been reported that platelet activation induced by collagen results in the formation of TXA₂, which is thought to further stimulate platelets in cooperation with collagen. We previously reported that ginsenoside Rg₁(G-Rg₁) and Rg₃ have a potent antagonistic action for TXA₂ and thereby reduce platelet function *in vitro*. Thus the present results suggest that orally administered Korean Red Ginseng reduced collagen-induced platelet aggregation and TXA₂ formation most likely by the inhibition of platelet activation by endogenously produced TXA₂.

We previously reported that oral administration of Korean Red Ginseng increased *in vivo* synthesis of prostacyclin in patients with thrombotic and atherosclerotic disorders and that *in vitro* addition of ginsenoside Rc (G-Rc) stimulated the formation of 6-keto-PGF₁α, a stable metabolite of prostacyclin, in VSMC. In the present study, the conversion of [¹⁴C] arachidonic acid to [¹⁴C]6-ketoPGF₁α by VSMC was enhanced by the addition of G-Rc, while the conversion of [¹⁴C]PGH₂ to [¹⁴C]6-ketoPGF₁α did not change. Northern blot analysis of total RNA prepared from VSMC demonstrated that *in vitro* addition of G-Rc increased mRNA level of cyclooxygenase in VSMC. These results indicate that the enhancement of prostacyclin formation by G-Rc might be partly ascribed to an increased cyclooxygenase activity and that G-Rc enhanced gene expression of cyclooxygenase in VSMC, which may contribute to an increased metabolism of arachidonic acid by cyclooxygenase in G-Rc-treated VSMC.

はじめに

動脈硬化症・血栓症の患者では、血小板機能の亢進がしばしば見られることはよく知られている。われわれは紅蔘の投与により血栓症・動脈硬化症の患者で血小板凝集能が低下することを報告し、その機序として紅蔘の主成分のひとつであるジンセノサイド Rg_1 (G- Rg_1) やジンセノサイド Rg_3 (G- Rg_3) には抗血小板作用があり、強力な血小板凝集物質であるトロンボキサン A_2 (TXA_2) の作用を阻害することを報告してきた¹⁻³⁾。コラーゲン刺激時の血小板凝集に伴う TXA_2 の産生が血栓症および動脈硬化症の患者において亢進していることはすでに諸家により報告されている。一方、紅蔘投与の抗血小板作用については、従来より凝集能の抑制を中心に検討が進められており、血小板凝集時の TXA_2 産生に及ぼす影響については十分な検討がなされていなかった。とくに、血栓症および動脈硬化症などの TXA_2 産生の亢進が予想される患者に紅蔘を投与した際の変化については報告が見られない。そこで今回、コウジン末カプセルを血栓性・動脈硬化性疾患患者に投与し、 TXA_2 産生を中心にその効果について検討した。

一方血管壁から産生され強力な血小板凝集抑制作用が注目されているプロスタサイクリン (PGI_2) について、われわれは現在までの一連の検討により人蔘サポニンのうちジンセノサイド Rc (G-Rc) が培養ラット血管壁平滑筋細胞からの PGI_2 産生を促進することを見出し、さらに最近、 PGI_2 の尿中代謝産物の解析によりコウジン末の投与が血栓症・動脈硬化症の患者において PGI_2 の産生増加をもたらすことをはじめて明らかにした。コウジン末投与に伴う PGI_2 産生の促進は、コウジン末の抗血栓・抗動脈硬化作用の機序を明らかにするうえで、きわめて重要な知見と考えられる。そこで今回、人蔘サポニンによる PGI_2 産生促進作用の機序を明らかにする目的で、 PGI_2 合成に関与する

シクロオキシゲナーゼと PGI_2 合成酵素におよぼす人蔘サポニンの作用について遺伝子工学的手法をまじえて検討を加えた。

材料と方法

1. コウジン末カプセル投与実験

血栓症・動脈硬化性疾患患者 10 名 (男性 4 名, 女性 6 名, 平均年齢 58.5 歳) にコウジン末カプセル (9 カプセル/日) を 4 週間投与し、投与前後で早朝空腹時に採血し、次に述べる方法に従い血小板凝集能を測定した。凝集惹起剤としてコラーゲンに加えて TXA_2 誘導体として広く使われている U-46619 を用いた。

2. 血小板凝集および thromboxane A_2 産生測定

早朝空腹時に、3.8% クエン酸ナトリウムが 1/10 容になるように、真空採血管にて採血し、150 x g にて 10 分間室温で遠心し、多血小板血漿 (platelet rich plasma: PRP) を採取した。さらに残りの血液を 1800 x g にて 10 分間遠心し乏血小板血漿 (platelet poor plasma: PPP) を採取した。血小板数を PPP にて 3×10^8 /ml に調整した。凝集能は Born の方法に従い、4 チャンネル血小板凝集計を用いて既報¹⁾ に従い測定した。凝集惹起剤の濃度は、コラーゲンについては、0.25, 0.5, 0.75 および 1.0 μ g/ml とし、U-46619 については、0.25, 0.375, 0.5, 0.75, および 1.0 μ M とした。凝集惹起剤添加後、5 分まで凝集能を記録したのち、凝集した PRP を 100 μ l 分取し、1% ゼラチンを添加したリン酸バッファー 200 μ l 添加の後凍結保存した。この検体について、既報に準じて、凝集時に産生された TXA_2 を抽出し、RIA 法にて測定し、(ng TXB_2 formed/ml PRP) で表示した¹⁾。

3. ラット培養血管壁平滑筋細胞のアラキドン酸代謝実験

1) [^{14}C]arachidonic acid の代謝

ラット胸部大動脈より調整した培養血管壁平滑筋細胞 (VSMC) を用い、 G_0 にシクロ

ナイズしたのち、10%のFCS存在下で14時間培養した。その際DMSO(終濃度0.2%)に溶解した種々の人蔘サポニン(400 μ M)を添加した。培養終了後、FCS非存在下で10分間 [14 C]arachidonic acid[10 μ M(1 μ Ci/dish)]と反応させた。既報に準じて代謝産物を抽出し、薄層クロマトグラフィーにて分離、測定した。

2) PGI₂合成酵素活性の測定

ヒツジ精囊腺ミクロゾームより精製されたシクロオキシゲナーゼを用いて、宮本らの方法⁴⁾に従って、[14 C]アラキドン酸より[14 C]-PGH₂を生合成した。この[14 C]PGH₂[2 μ M(0.2 μ Ci/dish)]を基質として、上記の方法で種々の人蔘サポニンの存在下で培養したVSMCと10分間反応させ、代謝産物を抽出し、薄層クロマトグラフィーにて分離測定し、PGI₂合成酵素活性を求めた。

4. ラット血管壁平滑筋細胞のシクロオキシゲナーゼ mRNA レベルの解析

前述したVSMCをG₀にシンクロナイズしたのち、10%のFCS存在下で24時間培養した。その際DMSO(終濃度0.2%)に溶解した種々の人蔘サポニン(400 μ M)を添加した。培養終了後、Chomczynskiらの方法⁵⁾に従い、acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC)をもちいてtotal RNAを抽出した。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⁶⁾。このクローンの860 bpの断片を32 P標識したものをプローブとして用い、Sambroockらの方法⁷⁾に従って、上述の方法でVSMCより抽出したtotal RNAのNorthern blot analysisを行った。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った。

結 果

1. 紅蔘カプセルの投与効果

紅蔘カプセルの投与により、血栓性・動脈硬化性疾患患者のコラーゲンおよびU-46619刺激による血小板凝集はいずれも有意に低下した。コラーゲン0.5 μ g/mlおよび0.5 μ MのU-46619刺激時に産生されるTXB₂はいずれも紅蔘投与により、有意に減少した(図1-AおよびB)。

2. 血管壁平滑筋細胞のアラキドン酸代謝に及ぼす人蔘サポニンの影響

1) [14 C]arachidonic acidの代謝

各種人蔘サポニンのうち、G-Rc存在下で培養したVSMCにおいて、[14 C]AAから[14 C]PGI₂への変換が促進された(図2-A)。

2) PGI₂合成酵素活性の測定

いずれの人蔘サポニン存在下で培養したVSMCにおいても、有意なPGI₂合成酵素活性の変動は見られなかった。(図2-B)

3. ラット血管壁平滑筋細胞のシクロオキシゲナーゼ mRNA レベルに及ぼす人蔘サポニンの影響

各種人蔘サポニンのうち、G-Rc存在下で培養したVSMCにおいて、ラットシクロオキシゲナーゼのmRNAレベルの有意な増加が認められた(図-3)。

考 察

紅蔘カプセルの投与によりコラーゲン刺激時の血小板凝集能の低下とともに、TXA₂産生の低下がみられた。コラーゲン刺激時に産生されるTXA₂には、コラーゲン自身の刺激により血小板膜のphospholipase A₂(PLA₂)が活性化されるのにもない遊離されたarachidonic acid(AA)から産生される“first TXA₂”と、このfirst TXA₂が血小板外にてで血小板膜上にあるTXA₂受容体に結合し、血小板を活性化する結果、さらにAAが遊離されその結果産生される“second TXA₂”

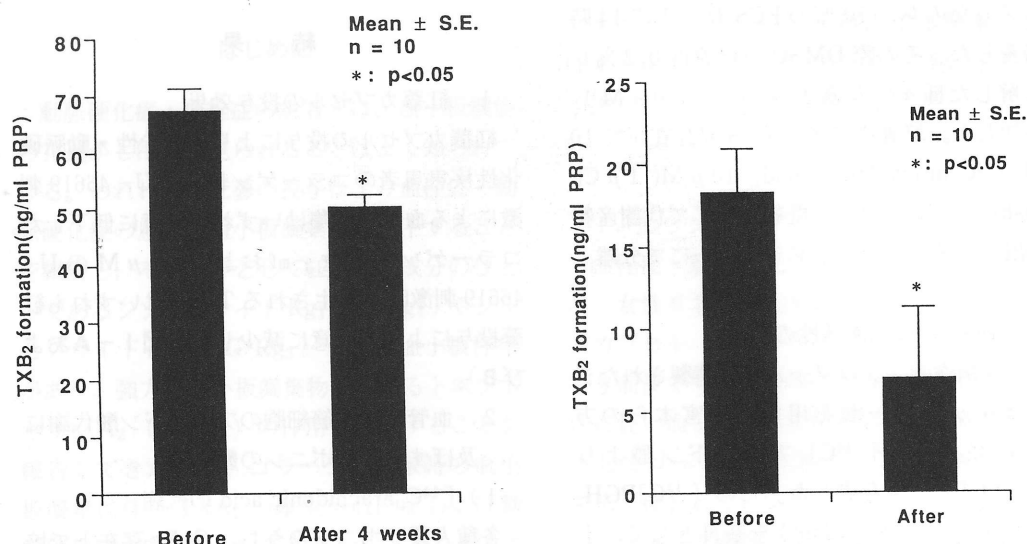


図1 Effect of oral administration of Korean Red Ginseng on TXA₂ formation in the patients with thrombotic and atherosclerotic disorders
(A) collagen
(B) U-46619

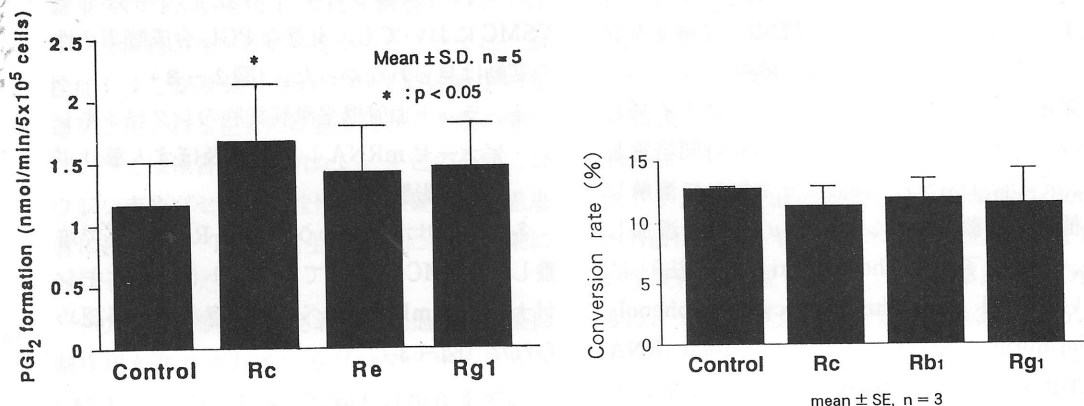


図2 Effect of various ginseng saponins on the metabolism of ¹⁴C-AA and ¹⁴C-PGH₂ by rat VMSC
(A) ¹⁴C-AA
(B) ¹⁴C-PGH₂

の2段階があることが知られている。

すでにわれわれは、紅蔘およびその有効成分の一つである G-Rg₁ の経口投与により、健常者および血栓性・動脈硬化性疾患患者においてコラーゲン刺激だけでなく U-46619 刺激時の血小板凝集が低下することを報告したが¹⁻³⁾、これは紅蔘の投与が TXA₂ による血小板の活性化が抑制される可能性を示唆するものである。

そこで紅蔘投与により低下したコラーゲン刺

激時の TXA₂ 産生は“first TXA₂”と“second TXA₂”のおもにどちらの TXA₂ の低下であったかを明らかにするため、U-46619 刺激時の TXA₂ 産生の変動について検討した。その結果、紅蔘投与は 0.5 μM の U-46619 刺激時の血小板凝集のみならず、TXA₂ 産生をも有意に減少させた。また注目すべきはその際の TXA₂ の減少量が約 12 ng/ml PRP であった点である。この減少量はコラーゲン刺激時の

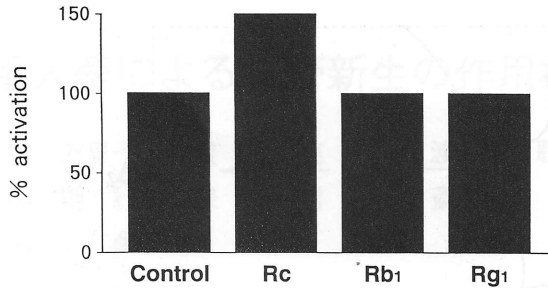


図3 Effect of various ginseng saponins on the level of cyclooxygenase mRNA in rat VMSC

TXA₂ 産生の減少量とはほぼ一致していた点である。

これらの成績は前述の紅参の経口投与が実際に患者において TXA₂ による血小板の活性化を抑制する可能性を支持するとともに、紅参投与により低下したコラーゲン刺激時の TXA₂ 産生はおもに“first TXA₂”ではなくむしろ“second TXA₂”であった可能性を強く示唆するものである。(図4)。

ところでわれわれは、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⁸⁾。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。

われわれは紅参の経口投与により血栓性・動脈硬化性疾患の患者において PGI₂ 産生が増加することを明らかにし、また *in vitro* の成績ではあるが人参サポニンの G-Rc が VSMC の PGI₂ 産生を促進することを明らかにした。しかしその作用機序の詳細は不明であった。そこで今回、G-Rc を中心に人参サポニンの PGI₂ 産生促進作用の機序を解明する目的で、VSMC の AA 代謝に的を絞って検討を加えた。

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

VMSC では有意な PGI₂ 合成酵素活性の変化は認められなかった。このことは G-Rc による 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 AA 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 AA からの PGI₂ 産生を促進した。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 AA 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。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、VMSC のシクロオキシゲナーゼによる AA 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 VMSC のシクロオキシゲナーゼによる AA 代謝を促進したのかを明らかにするため、さらに検討を加えた。

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⁶⁾。いままで行った 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 FCS の存在下で行っていることから、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

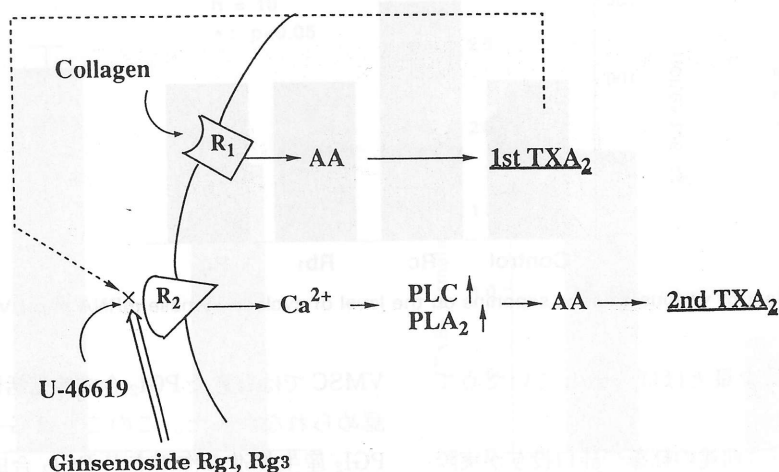


図4 Schema of collagen-induced TXA₂ formation

ナーゼの mRNA レベルを Northern blot 法を用いて解析した。その結果検討した人蔘サポニンのうちで 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。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唆する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は，G-Rc 自身の直接作用であるのか，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。このような一連の解析により，人蔘サポニンの抗血栓・抗動脈硬化作用の一端が解きあかされることを期待したい。

文 献

- 1) Yamamoto K et al In vitro and in vivo effect of ginseng saponins, major components of Korean Red ginseng on human platelet aggregation and arachidonic acid metabolism. *J Med Pharm Soc for WAKANYAKU* 5 : 184-190 (1988)
- 2) 田村 泰ほか：高麗人蔘の抗血栓作用について－Ginsenoside Rg₁の抗血小板作用とその機序の解析。和漢医薬学会誌 5 : 260 - 261 (1988)
- 3) 田村泰ほか：高麗人蔘の抗血小板作用の解析－人蔘サポニンの抗トロンボキサン A₂ 作用について－。高麗人蔘 1989，大浦彦吉，奥田拓道，森澤成司編” pp 108 - 121，共立出版東京 (1989)
- 4) 宮本 積，“プロスタグランディンの生化学－基礎と実験－”，室田誠逸編，p 250，化学同人 東京 (1982)
- 5) Chomczynski P, Sacci N et al : *Analy Biochem* 162 : 156-159 (1987)
- 6) Tahara K, Grollman EF, Saji M, Kohn LD : *J Biol Chem* 266 : 440-448 (1991)
- 7) Tomizuka et al : *Thrombosis and Haemostasis* 64 : 594-599 (1990)