

## 微小透析法によるイチョウ緑葉エキスの 末梢自律神経に及ぼす影響

佐藤 広隆\*, 大川 渡, 萬 秀 憲

花王株式会社栃木研究所

### Effect of Green Leaf Extract from *Ginkgo biloba* L. on Peripheral Autonomic Nervous System in Adult Rats as Measured by Microdialysis

HIROTAKA SATO,\* WATARU OKAWA and HIDENORI YOROZU

Tochigi Research Laboratories, Kao Corporation, 2606, Akabane, Tochigi 321-34, Japan

(Received September 5, 1994)

The effects of a green leaf extract from *Ginkgo biloba* L. on the autonomic nervous system were examined by using *in vivo* microdialysis and high performance liquid chromatography equipped with an electrochemical detector to measure the extracellular levels of catecholamines in rats. The animals were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, *i.p.*) and the thigh was shaved. The microdialysis probe was inserted intracutaneously into the rat thigh through the insertion hole made by a 19G needle. During the infusion of Ringer's solution at a rate of 3  $\mu$ l/min, the extracellular levels of 3-methoxy-4-hydroxyphenyl glycol (MHPG) were monitored (20-min collection period). KCl added to the perfusion fluid at a concentration of 100 mM increased the extracellular MHPG levels to about 1.9-fold, whereas tetrodotoxin (50  $\mu$ M) added to the perfusion fluid, reduced the extracellular MHPG levels. These findings indicate that the extracellular MHPG levels recorded by this method are derived predominantly from peripheral neuronal sources. A green leaf extract from *Ginkgo biloba* L. added to the perfusion fluid increased the extracellular MHPG levels to 1.7 times the control level ( $p < 0.05$ ). The present findings suggest that releases of neurotransmitter from peripheral nerve endings may be stimulated enhanced by green leaf extract from *Ginkgo biloba* L.

**Keywords**—*Ginkgo biloba*; autonomic nerve; microdialysis; 3-methoxy-4-hydroxyphenyl glycol

イチョウ (*Ginkgo biloba* L.) はイチョウ科に属する 1 科 1 属 1 種の落葉性の大高木で、中国原産であり、中国、日本及びヨーロッパに現存している。高さ 30 m、径 2 m にもなり、葉は長枝では互生し短枝では群がっている。イチョウに関する効果は古くは中国の『本草綱目』<sup>1)</sup>に多く記載されており、近年においてはイチョウ葉の抽出物に関する研究がヨーロッパで盛んに行われ、末梢の血行改善や脳の血行障害、動脈硬化などに有効であることが確認されている<sup>2-4)</sup>。葉の抽出物中の成分としては、テルペノイドやフラボノイド、二重フラボンなどが知られており<sup>5)</sup>、その中でもジテルペンであるギンゴリド類の生理活性作用が注目されている<sup>6)</sup>。

このようにイチョウ葉の抽出物の効果について様々な研究が行われているが、末梢の神経系への作用についてはあまり報告されていない。今回、イチョウの緑葉から得られたエキスの効果について、微小透析法を用いてラット大腿部皮内に同エキスを灌流し、神経終末部から放出されるカテコールアミンを測定し末梢神経系に及ぼす影響について

検討したので報告する。

### 実験の部

#### 1. 材料

イチョウ緑葉エキスは高砂香料工業 (株) より入手した。プロピレングリコールは食添品を用いた。リンガー液は日局品 (147 mM Na<sup>+</sup>, 4 mM K<sup>+</sup>, 2.3 mM Ca<sup>2+</sup>, 156 mM Cl<sup>-</sup>) を用いた。NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O は全て和光純薬工業 (株) の特級試薬を用いた。また、テトロドトキシン (TTX) は SIGMA 社のものを、ペントバルビタールナトリウムは Abbott Laboratories 社のネプタールを用いた。

#### 2. 機器

カテコールアミンの測定は、(株) エイコム社製の液体クロマトグラフポンプシステム (EP-10)、デガッサー (DG-100)、オートインジェクター (AS-10)、マイクロシリンジポンプ (EP-50)、恒温水循環器 (CTC-100) 及び電気化学検出器 (ECD-100) を使い、クロマトグラフィー

のデータ解析には (株) 日立製作所製 of データ処理装置 (D-2500) を用いた。

### 3. 方法

1) 試料調製 8月から9月にかけて収穫した日本産のイチョウ (*Ginkgo biloba* L.) の緑葉の乾葉から50%エタノール液で抽出し、ろ過後得られた抽出物を濃縮後プロピレングリコール水溶液に3.5%溶解し、微量の不溶物をろ紙ろ過し精製したエキス (イチョウ緑葉エキス) を高砂香料工業 (株) より入手した。このイチョウ緑葉エキスをリンガー液に0.003%溶解しイチョウ緑葉エキス溶液を調製した。また、イチョウ緑葉エキスを含有しない上記溶液を対照溶液とした。high K<sup>+</sup> リンガー液は2.98 gのNaCl, 7.45 gのKCl, 0.44 gのCaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>Oを1 lの蒸留水に溶解した (51 mM Na<sup>+</sup>, 100 mM K<sup>+</sup>, 2.3 mM Ca<sup>2+</sup>, 156 mM Cl<sup>-</sup>)。また、TTX リンガー液はTTXをリンガー液に溶解し50 μM溶液を調製した。

2) 微小透析法 実験は、Wistar系雄性ラット (体重247±21 g, 平均±S.E.M.; 日本エスエルシー (株) から購入した) を用い、温度25.9±0.4°C, 相対湿度29±5%の環境下で行った。ペントバルビタールナトリウムを腹腔内に投与後 (50 mg/kg), 下肢大腿部を剃毛し皮膚を露出した。大腿部皮内に注射針 (19 G) でプローブ挿入路を設け透析プローブ (直径220 μm, 透析膜の長さ3 mm, カットオフ分子量50,000 Da; BDP-I-8-03, (株) エイコム社製) を挿入しサージカルテープにて固定した。プローブの一方をマイクロシリンジポンプに他の一方をオートインジェクターにテフロンチューブを用いて接続し、リンガー液を毎分3 μlで灌流した。灌流液は20分毎に回収し (60 μl), オートインジェクターを用いて高速液体クロマトグラフィーに直接注入した。分離カラムはCA-ODS (5 μm, 4.6×150 mm, (株) エイコム社製) を用い、電気化学検出器により加電圧+550 mV (vs. Ag/AgCl) でカテコールアミンを分析した。移動相にはEDTA (2Na<sup>+</sup>); 10 mg/l オクタンスルホン酸ナトリウム; 100 mg/l 及び1% (v/v) メタノールを含む0.1 Mリン酸緩衝液 (Na<sup>+</sup>), pH 6.0を用い、流速は毎分1.7 ml付近とした。分離カラムは恒温水循環器を用いて25°Cに保った。実験装置の概略をFig. 1に示した。

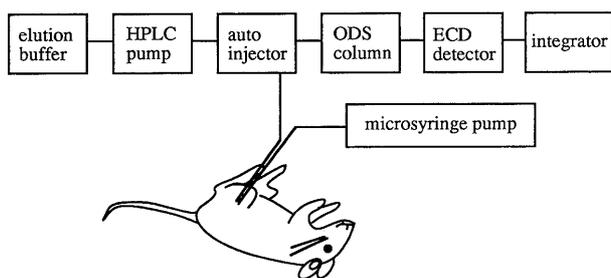


Fig. 1. Schematic Drawing of the Experimental Device

クロマトグラムのピークパターンが安定したことを確認後、灌流液をリンガー液からイチョウ緑葉エキス溶液に替えて40分間 (2画分) 灌流を行い、再びリンガー液にもどしイチョウ緑葉エキス適応時の作用を検討した。対照溶液についても同様に検討した。なお、検出されたカテコールアミンが神経活動由来であるか否かは、high K<sup>+</sup> による遊離促進及びTTXによる遊離抑制を調べ確認した。

### 結 果

高速液体クロマトグラフィーで分析した結果、6.6分付近にノルアドレナリンの代謝産物である3-methoxy-4-hydroxyphenyl glycol (MHPG, SIGMA) と保持時間が一致するピークが検出された (Fig. 2)。このピークは、灌流液をリンガー液からhigh K<sup>+</sup> リンガー液に替えることにより増加し、リンガー液灌流時の3画分の平均ピーク面積を100としたときの相対値で表すと約1.9倍になった。その後灌流液をもとのリンガー液に戻すとピークは減少し、40分後にはほぼベースレベルに戻った (Fig. 3)。また、リンガー液をTTXリンガー液に替えて灌流した場合には同ピークは減少し、もとのリンガー液に戻すとピークは増加に転じた (Fig. 4)。これらのことから、該ピークは神経活動由来のMHPGであることが確認できた。なお、ノルアドレナリンのピークは検出されなかった。

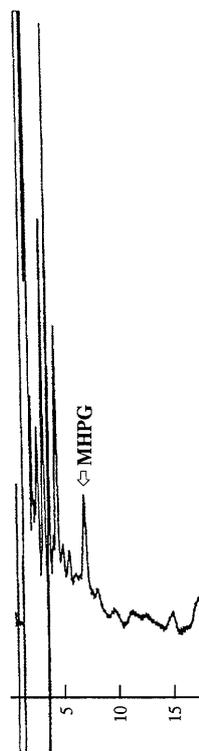


Fig. 2. Typical HPLC Chromatogram  
Catecholamine was separated on an Eicompak CA-50DS column (4.6×150 mm) at 25°C. The graphite working electrode was set at +550 mV vs. an Ag/AgCl reference electrode (EICOM, ECD-100) and the flow rate was 1.7 ml/min.

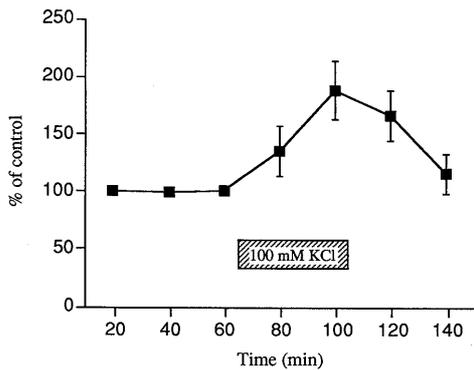


Fig. 3. Effect of KCl Infusion (100 mM for 40 min) on the Content of MHPG ( $n=3$ )

Each sample represents a 20-min collection period. The average of the last 3 samples before the drug treatment was considered as the control and was defined as 100%. Values are expressed as percentages of control and represent mean  $\pm$  S.E.M.

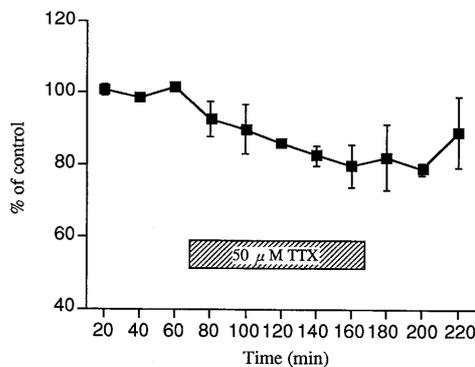


Fig. 4. Effect of TTX Infusion ( $50 \mu\text{M}$  for 100 min) on the Content of MHPG ( $n=3$ )

Each sample represents a 20-min collection period. The average of the last 2 or 3 samples before the drug treatment was considered as the control and was defined as 100%. Values are expressed as percentages of control and represent mean  $\pm$  S.E.M.

イチョウ緑葉エキスについても同様に、灌流液をリンガー液からイチョウ緑葉エキス溶液に替えて検討した (Fig. 5). イチョウ緑葉エキス溶液を40分間 (2画分) 灌流することにより MHPG の増加が認められた。この上昇はイチョウ緑葉エキス溶液の灌流開始から60分後まで続き、その後下降に転じた。イチョウ緑葉エキス溶液灌流直前の値が103%であるのに比べると、最大増加時の値は170%であり有意な増加を示した ( $p < 0.05$ , Student's  $t$ -test)。一方、対照溶液について同様に灌流した場合には MHPG の変化は認められなかった。

## 考 察

本実験ではラット大腿部皮内において、ノルアドレナリンの代謝産物である MHPG (3-methoxy-4-hydroxy-phenyl glycol) のピークが確認された。皮膚の交感神経

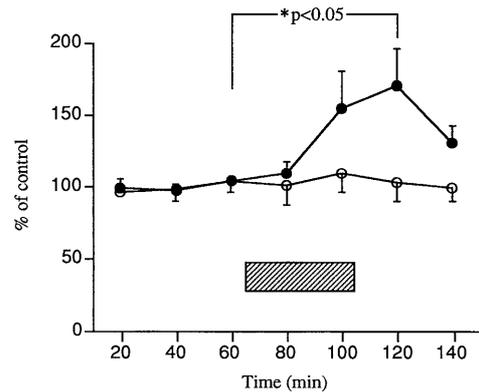


Fig. 5. Effects of *Ginkgo biloba* L. Green Leaf Extract (Closed Circle,  $n=6$ ) and Placebo (Opened Circle,  $n=4$ ) Infusion (40 min) on the Content of MHPG

Each sample represents a 20-min collection period. The average of the last 2 or 3 samples before the drug treatment was considered as the control and was defined as 100%. Values are expressed as percentages of control and represent mean  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$ , Student's  $t$ -test, when compared to control.

(自律神経) の神経伝達物質であるノルアドレナリンは、神経終末から分泌された後、主に神経終末に再び取り込まれるが、それ以外は神経細胞外のモノアミンオキシダーゼ及びカテコール-O-メチルトランスフェラーゼにより MHPG に代謝される。確認された MHPG のピークは high  $\text{K}^+$  リンガー液の灌流により増加し (Fig. 3), TTX リンガー液の灌流では減少した (Fig. 4) ことから神経活動由来であることが確認できた。今回は、この MHPG の挙動について検討した。イチョウ緑葉エキスの作用を検討するため、灌流するイチョウ緑葉エキス溶液の濃度は電気化学検出器を用いた分析に影響を及ぼさない上限の濃度に設定した。

イチョウの葉の抽出物には様々な作用が報告されており<sup>2-4)</sup>、摘出血管を用いた実験から交感神経の興奮作用を有することも示唆されている<sup>7,8)</sup>。イチョウ緑葉エキス溶液を透析プローブの透析膜を通して直接皮内に投与した結果、MHPG 量の増加が認められた。イチョウ緑葉エキスを含んでいない対照溶液を灌流した場合には、MHPG 量の変化は認められなかった。

本実験においては、ペントバルビタールナトリウム睡眠下で透析実験を行った。ペントバルビタールナトリウムを含むバルビツレートは、中枢神経系に対する作用が非常に高いため鎮静或いは睡眠の目的で投与された場合は末梢に対する直接作用は欠如するか無視される<sup>9)</sup>。今回の殆どの実験において、ペントバルビタールナトリウム投与により誘発された睡眠から動物が醒めかけた場合には 15 mg/kg のペントバルビタールナトリウムを腹腔内に投与し灌流を継続したが、前記の理由や対照溶液の灌流実験において MHPG の変化が認められなかったことからこの影響はな

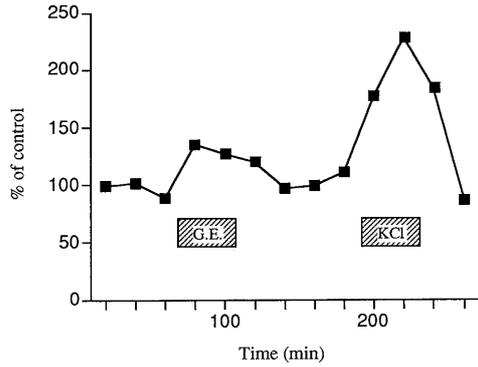


Fig. 6. Effect of *Ginkgo biloba* L. Green Leaf Extract (G.E.) and 100 mM KCl Infusion (for 40 min) on the Content of MHPG

Each sample represents a 20-min collection period. The average of the last 2 samples before the drug treatment was considered as the control and was defined as 100%. Values are expressed as percentages of control.

いと考えられる。また、イチョウ緑葉エキス溶液の灌流が末梢神経細胞の死を招いた可能性については、同溶液の灌流後に high  $K^+$  リンガー液を灌流した場合にも MHPG 量の増加が認められたことから否定される (Fig. 6)。また、イチョウ緑葉エキス溶液中のカリウム及びナトリウムの濃度を原子吸光分析法により、カルシウムの濃度を ICP (inductively coupled plasma) 発光分析法により測定したところ、カリウム及びナトリウムは検出限界の 0.05 ppm 以下、カルシウムは検出限界の 0.01 ppm 以下であった。これらの分析結果より、同溶液に含まれるカリウム、ナトリウム及びカルシウムの無機化合物の影響はないと考えられる。

以上の実験結果から、イチョウ緑葉エキス溶液の灌流に

よる MHPG の増加は、イチョウ緑葉エキスが末梢自律神経に働きかけ神経活動を亢進し、神経伝達物質であるノルアドレナリンの遊離が促進された結果、代謝産物である MHPG が増加したと考えられる。

しかし、神経終末から分泌されたノルアドレナリンのほとんどは神経終末に再取り込みされることを考慮すると、イチョウ緑葉エキス溶液の灌流による MHPG の増加は、ノルアドレナリンの再取り込み抑制による細胞外ノルアドレナリン量の増加の結果、代謝産物である MHPG が増加した可能性も考えられる。また、イチョウ緑葉エキスの灌流による反応が局所的な特異的反応であるか否かを含め、同エキスの濃度依存性、測定部位や動物の種差、有効成分の探索等、今後更なる検討が必要である。

### 引用文献

- 1) 李 時珍, “本草綱目”, 陳兆桓, 文光圖書有限公司, 台北, 1970, p. 1031.
- 2) H. Oberpichler, J. Krieglstein, *Pharm. Unserer Zeit*, **21**, 224 (1992).
- 3) V. D. Petkov, R. Kehayov, S. Belcheva, E. Konstantinova, V. V. Petkov, D. Getova, V. Markovska, *Planta Med.*, **59**, 106 (1993).
- 4) B. Steinke, B. Müller, H. Wagner, *Planta Med.*, **59**, 155 (1993).
- 5) J. Hoelzl, *Pharm. Unserer Zeit*, **21**, 215 (1992).
- 6) P. Braquet, A. Esanu, E. Buisine, D. Hosford, C. Broquet, M. Koltai, *Med. Res. Rev.*, **11**, 295 (1991).
- 7) M. Auguet, F. V. DeFeudis, F. Clostre, *Gen. Pharmacol.*, **13**, 169 (1982).
- 8) M. Auguet, F. V. DeFeudis, F. Clostre, R. Deghenghi, *Gen. Pharmacol.*, **13**, 225 (1982).
- 9) 鈴木郁生監修, “常用医薬品辞典”, 廣川書店, 東京, 1985, p. 46.