

## 紅参, 遠志, サフラン, 羚羊角, 沈香からなる 生薬製剤の薬理学的研究

庄司政満, 土田華代, 清水康晴, 伊藤千尋  
救心製薬(株)総合研究所

### Pharmacological Studies of a Crude Drug Containing Red Ginseng, Polygala Root, Saffron, Antelope Horn and Aloe Wood

Masamichi Shoji, Haruyo Tsuchida, Yasuharu Shimizu and Chihiro Ito

*Research Laboratories, Kyushin Pharmaceutical Co., Ltd.,  
1-31-7, Wada, Suginami-ku, Tokyo 166-0012, Japan*

(Received September 4, 2003)

A crude drug (N-095), containing red ginseng, polygala root, saffron, antelope horn and aloe wood, was studied for its pharmacological effects. N-095 improved the prolongation of escape latency onto the platform in a Morris water maze induced by ibotenic acid injection into the rat brain. N-095 also significantly increased NGF content in the cerebral cortex and the hippocampus of the basal forebrain-lesioned rats induced by ibotenic acid. N-095 also significantly facilitated the neurite outgrowth in the organ culture of the chicken embryonic dorsal root ganglia, and augmented the facilitation of that outgrowth by NGF. Furthermore, N-095 significantly increased NGF secretion in the astrocyte culture of the brain in rat embryo, and improved the decrease in the survival rate of the neuron in the hippocampus in rat embryo brain induced by amyloid  $\beta$ -peptide<sub>1-42</sub>. N-095 also improved the increase in water content and the abnormalities in sodium, potassium and calcium contents in rat brain induced by freezing. These results suggest that N-095 may protect the brain when it is damaged and improve the memory disorders such as the disruption of spatial cognition and amnesia. Moreover, these effects of N-095 may be partially related to increase the NGF content in the brain and facilitation of neurite outgrowth.

**Keywords :** red ginseng ; polygala root ; saffron ; antelope horn ; aloe wood ; NGF ; neurite outgrowth ; memory ; amnesia ; hippocampus ; astrocyte ; neuron ; Morris water maze

本生薬製剤(以後 N-095)はコウジン, オンジ, サフラン, レイヨウカクおよびジンコウの5種生薬の乾燥エキスあるいは末を含有する滋養強壮剤である。これまでニンジンには空間記憶の向上<sup>1)</sup>が, オンジにはアストロサイトからのNGF産生や分泌の増加作用<sup>2)</sup>が, また, サフランにはエタノールによる学習行動障害の改善<sup>3)</sup>や海馬長期増強抑制の改善<sup>4)</sup>が報告されていることから, それら生薬を含有するN-095にも同様の作用を有する可能

性が考えられた。そこで, 学習障害に対する作用や脳内NGF産生に対する作用など, N-095の薬理作用について検討した。

#### 材料及び方法

##### 1. 実験動物

Wistar/ST系雄性および雌性ラットを日本エスエルシー

より入手し、室温  $22 \pm 1$  °C、湿度  $55 \pm 10\%$  に設定し、12 時間（午前 7 時から午後 7 時まで）照明を点灯した飼育室内に 6 日間以上予備飼育した。また、日本系農林白色 102 系鶏有精卵を埼玉実験動物供給研究所より入手し、温度  $36 \pm 2$  °C、湿度 90% 前後のインキュベータ（ヤマト科学）内で飼育した。固形飼料としてラットには CE-2（日本クレア）を、飲料水は水道水を、別に記載しないかぎり自由に摂取させた。

## 2. 使用薬物

N-095（救心製薬；Lot No. 95A044 および 95C051、救心製薬・第二工場製品保管室にて保存）はコウジン乾燥エキス 330 mg、オンジ乾燥エキス 30 mg、サフラン末 90 mg、レイヨウカク粉末 100 mg、ジンコウ粉末 10 mg、また、賦形剤としてシンジュ粉末、トウモロコシデンプンおよび香料としてリュウノウを含有する粉末を使用した。また、オンジ乾燥エキス（以後オンジ；アルプス薬品工業、Lot No. OG102）、サフラン末（以後サフラン；松浦薬業、Lot No. 00042）、レイヨウカク末（以後レイヨウカク；宮忠、Lot No. TP01）を使用した。なお、購入、使用した生薬エキスおよび生薬末は救心製薬・杉並工場原料保管室にて保存した。また特記しないかぎり、被験薬は使用当日に蒸留水にて懸濁し、容量を 10 ml/kg として経口投与した。その他、Dulbecco's modified Eagle medium（以後 DMEM）、trypsin 0.25% liquid, trypsin-EDTA、牛胎児血清（以後 FBS）、馬血清（以後 HS）（以上 Gibco）、ibotenic acid, ginsenoside Rb<sub>1</sub>（以上、和光純薬工業）、deoxyribonuclease I（以後 DNase）、penicillin/streptomycin/amphotericin B（以上、コスモバイオ）、cytosine arabinoside, amyloid  $\beta$ -protein fragments (fragment 1-42, 以後 A $\beta$ <sub>1-42</sub>), bafilomycin A1, thiazolyl blue（以後 MTT）、bovine plasma thrombin（以後 thrombin）、N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]（以後 HEPES）、bovine serum albumin（以後 BSA）、indomethacin（以上、Sigma）、nerve growth factor（mouse submaxillary gland, Chemicon international, 以後 NGF）、ヒピテン液（5%ヒピテン液、住友製薬）、鶏血漿（クエン酸処理、ジャパンラム）、NGF 測定キット（NGF Emax™ ImmunoAssay Systems, Promega）、pentobarbital Na（東京化成）、acetylcholine（注射用塩化アセチルコリン、オピソート™ 注射用）、epinephrine（エピネフリン注射液、ボスミン™ 注）（以上、第一製薬）、スキムミルク（森永乳業）を使用した。

## 3. Morris 水迷路における ibotenic acid 誘発空間認知障害に対する作用

Nitta ら<sup>5)</sup>の方法を参考に実験を行った。すなわち、Wistar/ST 系雄性ラット (230~283 g) を pentobarbital Na 50 mg/ml/kg の腹腔内投与にて麻酔し、脳定位固定装置 (SN-1, 成茂科学) に固定した。ibotenic acid 10  $\mu$ g [0.05 M phosphate buffer, pH 7.4 (以後 PB) 0.5  $\mu$ l に溶解] を、Paxinos and Watson<sup>6)</sup>による脳図譜に従って右前脳基底部の Meynert 基底核付近に注入してこの日を実験 1 日目とし、1 週間後（実験 7 日目）、左前脳基底部にも同様に注入した。ibotenic acid 注入後は針をそのまま 5 分間放置した。また、normal 群の動物には ibotenic acid のかわりに 0.05 M PB 0.5  $\mu$ l を注入した。被験薬は ibotenic acid による左前脳基底部損傷当日（実験 7 日目）から実験 28 日目までの 22 日間、1 日 1 回の合計 22 回投与した。

実験 21 日目から 25 日目まで水迷路試験を行った。すなわち、円形の水槽（プール；直径 153 cm、高さ 31 cm）の 4 分割円の 1 つの中央に、半透明なプラットホーム（直径 10 cm、高さ 18.5 cm）をセットした。プールにはスキムミルクの入った約 23 °C の水をプラットホームの表面が水面下 2 cm になるように満たした。各トレーニングでは、ラットをランダムに 5 つのスタート位置の 1 つから水中に入れ、プラットホームへの到達時間を記録した。ラットが 90 秒以内にプラットホームをみつけた場合は、その時間を記録し、15 秒間留めてからケージに戻し、また、90 秒以内にみつけれない場合は、トレーニングを終了して 90 秒を記録した。このトレーニングを連続 5 日間、各日 2 回実施し、1 回目と 2 回目の合計をその日における latency とした（例えば、1 回目、2 回目ともにプラットホームをみつけれない場合は 90 秒 + 90 秒 = 180 秒をその日における latency とした）。なお、被験薬は 2 回目のトレーニング終了直後に与えた。

実験 28 日目の被験薬最終投与 1 時間後、動物を断頭して小脳を除く脳組織を摘出し、ドライアイス・acetone 中に沈めて凍結させ、使用時まで -80 °C にて保存した。脳の海馬および大脳皮質中の NGF 量を測定するため、まず、左右の脳の海馬および大脳皮質部分をドライアイス上でスライスして切り出し、重量を測定した。それに NGF 測定キット中の Block & Sample 1 × Buffer 1 ml を加えてホモジネートし、1000 rpm にて 3 分間遠心分離した上清を NGF 測定用サンプルとした。サンプル中の NGF 量は、同測定キットを用いて測定した。

#### 4. 神経線維増生に対する作用

Saito ら<sup>7)</sup>の方法を参考にして、日本系農林白色 102 系鶏有精卵（使用開始時重量 52~69 g）の鶏胚後根知覚神経節における神経線維増生に対する作用を検討した。実体顕微鏡下で、9 日鶏胚より後根知覚神経節を摘出した。

##### (1) 被験薬の神経線維増生に対する直接作用

96 穴平底プレート well に、100 U/ml thrombin および 1% BSA を含む DMEM 25  $\mu$ l を入れ、各々 1~3 個の後根知覚神経節を移し、被験薬液あるいは 0.1% BSA を含む PBS (pH 7.2) 12.5  $\mu$ l を加えた。さらに、1% BSA を含む DMEM 12.5  $\mu$ l および鶏血漿 25  $\mu$ l を加えて、37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> の条件下にて 40 時間インキュベーションし、倒立顕微鏡下で神経線維増生度を観察した。

##### (2) NGF による神経線維増生に対する被験薬の作用

96 穴平底プレート well に、100 U/ml thrombin、1% BSA、25 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) を含む DMEM 25  $\mu$ l を入れ、各々 1~3 個の後根知覚神経節を移し、被験薬液あるいは 1% BSA を含む DMEM 12.5  $\mu$ l を加えた。さらに、最終濃度が各々 0、1.33、5.21、20.8、83.3 ng/ml になるように 0.1% BSA を含む PBS で希釈した NGF 液 12.5  $\mu$ l および鶏血漿 25  $\mu$ l を加え、直接作用の場合と同様に神経線維増生度を観察した。

(1) および (2) における神経線維増生度は 0~8 のインデックス<sup>8)</sup>として表した。すなわち、被験薬液のかわりに、最終濃度 0~83.3 ng/ml の NGF 液 12.5  $\mu$ l を加え、各々の NGF 濃度における神経線維の増生度を 0~8 のインデックスで表し、増生度の指標にした。なお、被験薬は (1) においては 0.1% BSA 含有 PBS に、また、(2) においては 1% BSA 含有 DMEM に懸濁あるいは溶解させて 15 分間室温にて放置し、4000 rpm、25  $^{\circ}$ C、25 分間遠心分離した後の上清を、各々ろ過滅菌して調製した。

#### 5. アストロサイト産生 NGF 量に対する作用

Yabe and Yamada<sup>9)</sup>の方法に準拠して実験を行った。すなわち、妊娠 17~20 日目の Wistar/ST 系雌性ラット (247~297 g) をエーテルで麻酔して子宮を摘出し、作業液 (DMEM 50%, PBS 50%) の入った滅菌ガラスシャーレに取り出した。以後、無菌的に胎児を取り出し、脳を摘出した。実体顕微鏡下で大脳皮質部分を摘出し、メスでよく刻んだ後に遠心管に取り、0.25% trypsin-EDTA 10 ml を加えて 37  $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベーションした。900 rpm、10 分、4  $^{\circ}$ C にて遠心後上清を捨て、DMEM を加えて再度遠心分離をした。これを 2 回繰り返した後、10%

FBS 及び penicillin/ streptomycin/ amphotericin B を含む DMEM を加え、5% CO<sub>2</sub> 下 37  $^{\circ}$ C で培養した。この初代培養細胞を DMEM で洗浄した後、0.25% trypsin-EDTA を加えて、5% CO<sub>2</sub> 下 37  $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベーションし、900 rpm、10 分、4  $^{\circ}$ C にて遠心後沈殿した細胞を DMEM で 2 回洗浄した。続いて、10% FBS 及び penicillin/ streptomycin/ amphotericin B を含む DMEM を加え、細胞を十分に分散させた後、培養プレートにまいた。3~4 日後に培地を交換して細胞増殖を誘導し、培養が群集化した後に無血清培地に切り替え、静止期状態となった細胞に被験薬を添加して 24 時間後の培養液中の NGF 量を測定キットを用いて測定した。なお、N-095 およびオンジは DMEM に懸濁して、3000 rpm、5 分、20  $^{\circ}$ C にて遠心分離した上清を、epinephrine は DMEM にて希釈し、各々ろ過滅菌して調製した。

#### 6. アミロイド B ペプチドによる神経細胞毒性に対する作用

Bastianetto ら<sup>10)</sup>の方法に準拠した。すなわち、妊娠 17~20 日目の Wistar/ST 系雌性ラット (322 g) をエーテルで麻酔して子宮を摘出し、作業液 (DMEM 50%, PBS 50%) の入った滅菌ガラスシャーレに取り出した。以後、無菌的に胎児を取り出し、脳を摘出した。実体顕微鏡下で海馬部分を摘出し、メスでよく刻んだ後に遠心管に取り、PBS で 2 回洗浄後 1 ml 残した。そこに 2 ml の trypsin 0.25% liquid を加え、37  $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベーションした。0.1% DNase を 1 滴加えてさらに 5 分間同様にインキュベーションした後、血清 3 ml (FBS 1.5 ml + HS 1.5 ml) および DMEM 3 ml を加えて 10 回程度ピペティングした。この細胞懸濁液をレンズペーパーフィルターでろ過し、ろ液を 1000 rpm で 5 分間、20  $^{\circ}$ C にて遠心し、5% FBS、5% HS 及び penicillin/ streptomycin/ amphotericin B を含む DMEM で再懸濁した。これを 2 回行った後、細胞数を数えて  $5 \times 10^5$  cell/ml の密度に希釈し、96 穴培養プレートに  $5 \times 10^4$  / well の密度で細胞をまき、同培地で 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> にて培養を開始した。48 時間後、グリア細胞の増殖を抑えるために cytosine arabinoside 10  $\mu$ M を添加し、その 24 時間後と 4 日後に培地を半量交換した。96 穴プレートの培地を無血清培地に切り替え、25  $\mu$ M A $\beta$ <sub>1-42</sub> と被験薬を添加し、37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> にて 24 時間培養した後、細胞生存率を MTT 法により測定した。なお、被験薬は DMEM に懸濁あるいは溶解し、懸濁した被験薬は 3000 rpm、5 分間、20  $^{\circ}$ C にて遠心分離し、各々

ろ過滅菌して使用した。

## 7. 凍結損傷脳浮腫形成に対する作用

Yen and Lee<sup>11)</sup>の方法に従って実験を行った。すなわち、Wistar/ST 系雄性ラット(204~235 g)を pentobarbital Na 50 mg/ml/kg の腹腔内投与にて麻酔後、頭部の毛を刈り取り、0.5%ヒビテン液にて消毒した。頭頂部左側を縦方向に 1.5 cm 程度切開して頭頂骨を露出し、矢状縫合の左側および冠状縫合の後方に直径約 5 mm の穴を開け、大脳表面を露出した。ドライアイス・ethanol で -50 °C 以下に冷却した直径 4 mm のアルミ金属棒の先端を大脳表面に 2 分間接触させた後、頭皮を縫合した。なお、normal 群には金属棒の接触以外の同じ操作を行った。手術 24 時間後に断頭して大脳を摘出し、左右半球(左側:損傷部, 右側:非損傷部)に切断後に各々の湿重量を測定した。続いて、110 °C で 24 時間乾燥後に各々の乾燥重量を測定して、脳水分含量を次式により算出した。

$$\text{脳水分含量 (\%)} = \frac{(\text{湿重量} - \text{乾燥重量})}{\text{乾燥重量}} \times 100$$

更に、乾燥させた脳を微粉化し、0.75 N HNO<sub>3</sub> 6 ml を加えてよく攪拌し、室温、暗所にて 1 週間放置した。反応液を 3000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清中の Na, K, Ca 含量を原子吸光度計 (AA-646, 島津製作所) にて測定した。なお、被験薬は、凍結損傷処置 2 日前と前日は 10 時と 16 時に、当日は処置 1 時間前と 4 時間後に投与した。

## 8. 統計学的処理

得られた結果は平均±標準誤差で表した。多群間のデータは Tukey あるいは Bonferroni の多重比較検定法にて解析した。

## 実験結果

### 1. Morris 水迷路における ibotenic acid 誘発空間認知障害に対する作用

ibotenic acid を前脳基底部へ注入したラットに被験薬を連日経口投与し、水迷路における空間認知に対する作用を検討した。ibotenic acid のかわりに PB を注入した normal 群に比べて、control 群ではプラットホーム到達時間の有意な延長がみられた。これに対して、N-095 1000 mg/kg, オンジ 259 mg/kg (N-095 1000 mg/kg に含まれるオンジの量の 10 倍量) を経口投与することにより、延長

した到達時間の有意な短縮がみられ、空間認知障害の改善が認められた (Fig. 1)。さらに、実験最終日に脳を摘出して、大脳皮質および海馬中の NGF 量を測定した結果、N-095 1000 mg/kg 投与群およびオンジ 259 mg/kg 投与群において、大脳皮質および海馬中の NGF 量の増加傾向が認められ、特に N-095 1000 mg/kg 投与群では有意であった (Fig. 2, 3)。

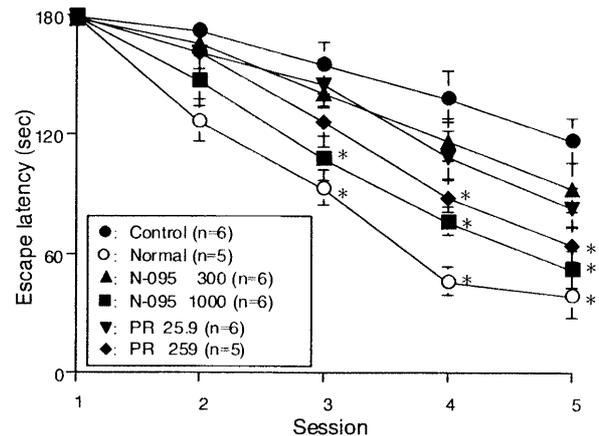


Fig. 1 Effects of N-095 and polygala root (PR) on the performance in the water maze task. The data are expressed as the mean ± S.E. The task was carried out on days 21-25 after the first ibotenic acid treatment. \*: P < 0.05, as compared with the control group using multiple comparison procedures.

N-095 300 or 1000: N-095 300 or 1000 mg/kg, p.o., 22 days.  
PR 25.9 or 259: polygala root 25.9 or 259 mg/kg, p.o., 22 days.

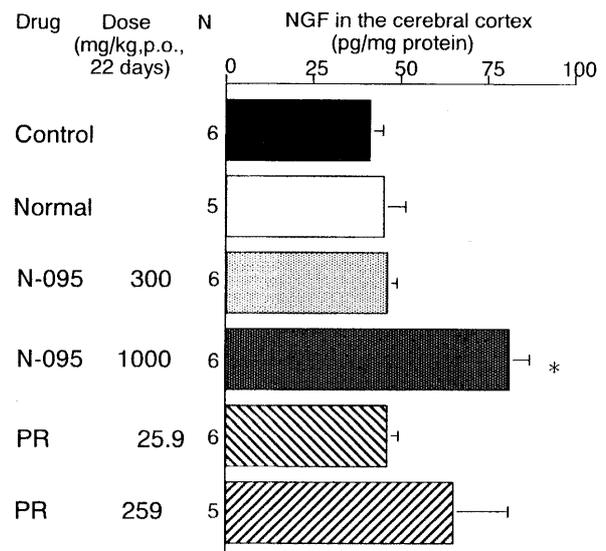


Fig. 2 Effects of N-095 and polygala root (PR) on nerve growth factor content in the cerebral cortex of basal forebrain-lesioned rats.

The data are expressed as the mean ± S.E. \*: P < 0.05, as compared with the control group using Tukey's multiple comparison test.

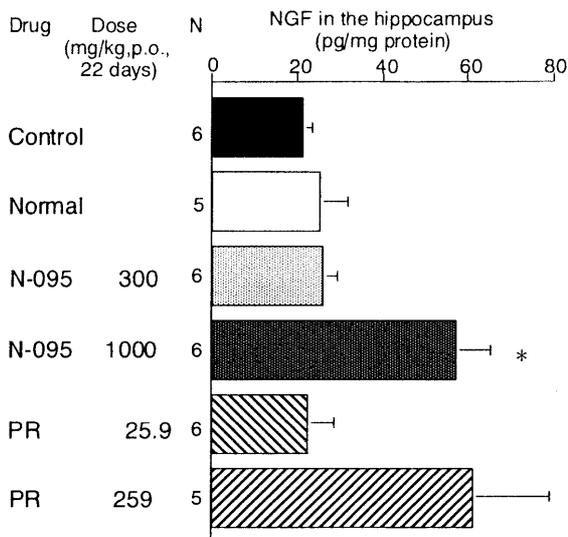


Fig. 3 Effects of N-095 and polygala root (PR) on nerve growth factor content in the hippocampus of basal forebrain-lesioned rats. The data are expressed as the mean  $\pm$  S.E. \*:  $P < 0.05$ , as compared with the control group using Tukey's multiple comparison test.

## 2. 神経線維増生に対する作用

### (1) 被験薬の神経線維増生に対する直接作用

N-095, レイヨウカク, サフラン, オンジおよび陽性対照薬の acetylcholine (以後 ACh) を用いて神経線維増生に対する直接作用を検討した。まず, N-095 の作用の有無を確認するため, 最終濃度が 100, 300, 1000  $\mu\text{g/ml}$  となるように添加し, 神経節に対する作用を観察した。その結果, 1000  $\mu\text{g/ml}$  で ACh よりも強く有意な神経線維増生作用が認められた (Fig. 4)。続いて, 単味生薬の各濃度を N-095 1000  $\mu\text{g/ml}$  に対する構成生薬比から算出し, レイヨウカク 86.2  $\mu\text{g/ml}$ , サフラン 77.6  $\mu\text{g/ml}$ , オンジ 25.9  $\mu\text{g/ml}$  による作用を同様に検討した。その結果, control 群に比べて神経線維の増生傾向はみられるもののその作用は弱く, 有意差は認められなかった (Fig. 4)。

### (2) NGF による神経線維増生に対する被験薬の作用

NGF 各濃度 (0, 1.33, 5.21, 20.8, 83.3  $\text{ng/ml}$ ) 共存下での被験薬の神経線維増生に対する影響について検討した。薬物の代わりに溶媒のみを添加した群を control 群とし, また, ginsenoside Rb<sub>1</sub> 30  $\mu\text{M}$  を陽性対照群として用いた。被験物質の濃度は直接作用で増生作用のみられなかった濃度とし, N-095 100  $\mu\text{g/ml}$ , また, 単味生薬は N-095 1000  $\mu\text{g/ml}$  に含まれるレイヨウカク 86.2  $\mu\text{g/ml}$ , サフラン 77.6  $\mu\text{g/ml}$ , オンジ 25.9  $\mu\text{g/ml}$  とした。各被験薬の作用を検討した結果, N-095 100  $\mu\text{g/ml}$  及び ginsenoside Rb<sub>1</sub> を加えた群では control 群に比べ, 有意な

神経線維増生の促進作用が認められた (Fig. 5)。一方, 単味生薬での有意な作用はみられなかった。

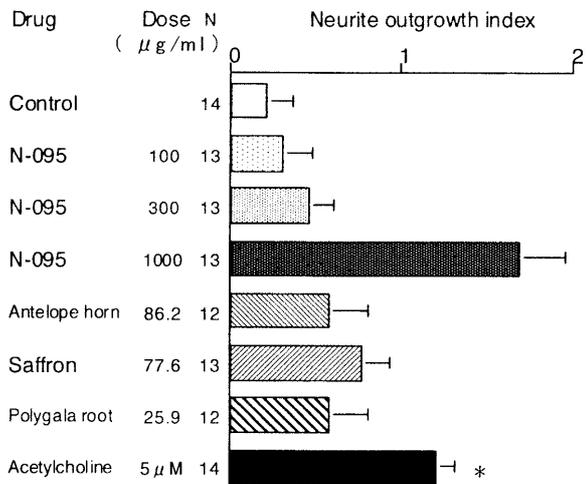


Fig. 4 Effects of N-095, antelope horn, saffron, polygala root and acetylcholine on the neurite outgrowth in the organ culture of the chicken embryonic dorsal root ganglia. The data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.

\*:  $P < 0.05$ , as compared with the control group using Bonferroni's multiple comparison test.

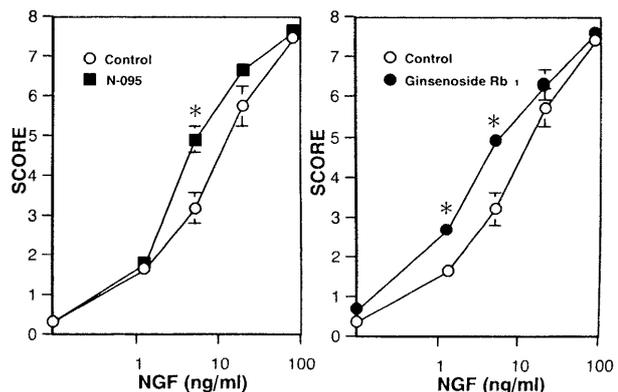


Fig. 5 Effects of N-095 and ginsenoside Rb<sub>1</sub> on the NGF-induced neurite outgrowth in the organ culture of the chicken embryonic dorsal root ganglia.

The data are expressed as the mean  $\pm$  S.E. ( $n=10\sim 14$ ). \*:  $P < 0.05$ , as compared with the control group using Bonferroni's multiple comparison test.

N-095; 100  $\mu\text{g/ml}$ , ginsenoside Rb<sub>1</sub>; 30  $\mu\text{M}$ .

## 3. アストロサイト産生 NGF 量に対する作用

N-095 300  $\mu\text{g/ml}$  添加により有意な NGF 産生の増加が認められた。また, N-095 300  $\mu\text{g/ml}$  中のオンジ 7.76  $\mu\text{g/ml}$  および epinephrine 5  $\mu\text{M}$  では NGF の増加傾向は見られたものの有意差は認められなかった (Fig. 6)。また, N-095, オンジ, epinephrine のアストロサイト増殖性に対する影響を MTT 法により測定した結果, どの被験薬もアストロサイトを有意に増加させなかった。

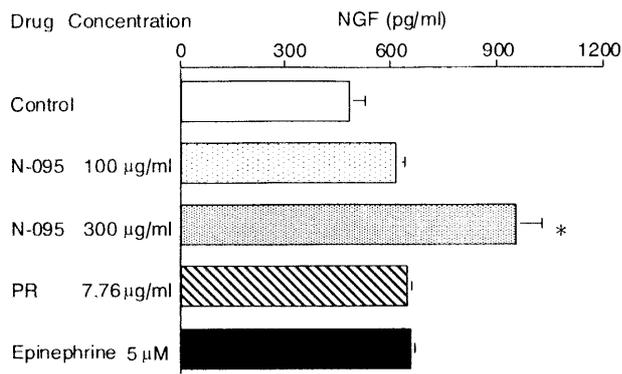


Fig. 6 Effects of N-095, polygala root (PR) and epinephrine on NGF secretion in rat embryo astrocyte cultures. After 24-hr incubation with indicated concentrations of N-095, PR or epinephrine, medium was collected, and the NGF content was determined by ELISA. The data are expressed as the mean  $\pm$  S.E. (n=5). \*:  $P < 0.05$ , as compared with the control group using Bonferroni's multiple comparison test.

#### 4. アミロイド $\beta$ ペプチドによる神経細胞毒性に対する作用

$A\beta_{1-42}$ の添加によって神経細胞生存率の有意な低下が認められた。また、 $A\beta_{1-42}$ と同時に N-095 300  $\mu$ g/ml または bafilomycin A1 30 nM を添加することにより神経細胞生存率の上昇がみられ、 $A\beta_{1-42}$ の神経細胞毒性の抑制が認められた (Fig. 7)。

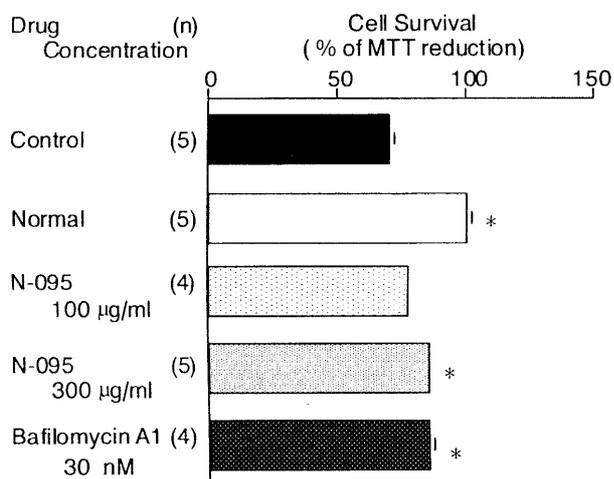


Fig. 7 Neuroprotective effects of N-095 and Bafilomycin A1 on toxicity induced by a 24hr exposure of  $A\beta_{1-42}$  (25  $\mu$ M), as estimated by the MTT assay. The data are expressed as the mean  $\pm$  S.E. \*:  $P < 0.05$ , as compared with the control group using Tukey's multiple comparison test.

#### 5. 凍結損傷脳浮腫形成に対する作用

凍結損傷により、損傷側脳半球の水分含有量の有意な

増加と、Na, Ca 含有量の有意な増加および K 含有量の有意な減少が認められた。N-095 投与群では3日間の600 mg/kg/day, 分2投与より、また、indomethacin 投与群では3日間の20 mg/kg/day, 分2投与により、損傷側脳半球の増加した水分、Na および Ca 含有量の有意な減少と、減少した K 含有量の有意な増加がみられた。なお、非損傷側脳半球における水分、Na, K および Ca 含有量については、どの被験薬投与群の間でも有意差はみられなかった (Table 1)。

#### 考 察

コウジン、オンジ、サフラン、レイヨウカクおよびジンコウを含有する生薬製剤、N-095 の薬理作用について検討した。

ニンジンには空間認知の向上<sup>1)</sup>が、オンジにはアストロサイトからの NGF 産生や分泌の増加作用<sup>2)</sup>が、また、サフランにはエタノールによる学習行動障害の改善<sup>3)</sup>や海馬長期増強抑制の改善<sup>4)</sup>が報告されていることから、まず脳神経細胞に障害を与えて空間認知障害を誘発し、それに対する N-095 の作用を検討した。神経毒の一つである ibotenic acid を前脳基底部に注入すると、そこに多く存在するコリン作動性神経系の機能が低下し、記憶障害などアルツハイマー型痴呆にみられる症状を引き起こすことが知られている<sup>5)</sup>。そこで ibotenic acid を前脳基底部に注入したラットに被験薬を22日間連日経口投与し、水迷路における空間認知に対する作用を検討した。

control 群ではプラットホーム到達時間の有意な延長がみられ、ibotenic acid による空間認知障害が認められたが、これに対して、N-095 あるいはオンジを投与することにより、延長した到達時間の有意な短縮がみられ、空間認知障害の改善が認められた。ibotenic acid による記憶障害は、ibotenic acid 注入後4週間を経過しても継続しており、ibotenic acid による障害の長期化が報告されている<sup>5)</sup>。一方、大脳皮質および海馬の NGF 量は、神経細胞障害に対応するように、注入3日目ぐらいをピークに一過性で顕著な上昇を示すが、以後その上昇率は低下し、まだ記憶障害が認められる28日目では、normal 群とほぼ同じか、むしろ少し低い値を示すことが報告されており、NGF 産生の低下と記憶障害の関連性が示唆されている<sup>12)</sup>。我々の ibotenic acid 注入28日目の結果でも、control 群における NGF 量は normal 群のそれと比較して、大脳皮質および海馬ともにやや低値であり、報告と一致している。

Table 1 Effects of N-095 and indomethacin on water, sodium, potassium and calcium contents in lesion and contralateral unlesioned areas in rat brain 24 hour after lesion by freezing

Drug	Dose (mg/kg, p.o. 3 days)	Water content (%)		Sodium		Potassium (mEq/kg dry weight)		Calcium	
		L	C	L	C	L	C	L	C
		Control	83.2±0.2	79.7±0.1	425±7	194±5	415±5	493±3	28.1±0.9
Normal	79.6±0.1*	79.9±0.2	200±4*	192±3	501±3*	499±2	9.3±0.5*	9.2±0.6	
N-095	100×2	82.8±0.3	79.9±0.1	419±7	196±4	424±6	494±4	28.0±1.3	9.7±0.2
	300×2	81.9±0.2*	79.7±0.1	339±9*	189±6	447±4*	497±5	22.7±1.4*	9.4±0.4
	1000×2	80.9±0.2*	79.9±0.1	282±7*	191±5	469±5*	494±4	17.6±1.0*	9.4±0.3
Indomethacin	10×2 (i.p.)	81.1±0.3*	79.8±0.1	299±10*	191±4	470±4*	496±3	17.4±1.2*	9.1±0.4

The data are expressed as the mean ± S.E. (n=8). \*:P<0.05, as compared with the control group using the multiple comparison procedure. L:lesion area, C:contralateral unlesioned area.

N-095 1000 mg/kg 投与群およびオンジ 259 mg/kg 投与群では、大脳皮質および海馬における NGF 量の増加傾向が認められたことから、これら被験薬による空間認知障害の改善要因の一つに、NGF 量の増加があるものと考えられる。また、N-095 1000 mg/kg におけるこれらの作用がそれに含まれるオンジ 25.9 mg/kg の作用より強かったことから、N-095 による作用の発現にはオンジ以外の生薬や、オンジと他の生薬との相乗作用などが関与しているものと考えられる。

ニンジン<sup>13)</sup> やサフラン<sup>14)</sup> は神経細胞の生存、再生、再成長などに関与する神経栄養因子と類似した作用を有する生薬として紹介されている。そこで、N-095 自身にも NGF 様の作用があるのか、また、NGF の作用を強める作用があるのか検討するため、鶏胚後根知覚神経節を用いて、N-095 の神経線維増生に対する作用を検討した。まず、N-095 自身による神経線維に対する作用を検討した結果、有意な神経線維増生作用が認められた。また、作用がみられた N-095 1000 μg/ml に含有されるサフラン 77.6 μg/ml、オンジ 25.9 μg/ml、レイヨウカク 86.2 μg/ml による作用についても同様に検討したが、若干神経線維増生作用を示したものの、N-095 に比べて作用は弱く、有意差は認められなかった。次に、NGF 各濃度 (0, 1.33, 5.21, 20.8, 83.3 ng/ml) 共存下での被験薬の神経線維増生に対する作用について検討した。被験物質の添加濃度は、神経線維増生作用を示さなかった濃度とし、各

被験薬の作用を検討した結果、N-095 100 μg/ml 及び ginsenoside Rb<sub>1</sub> を加えた群では control 群に比べ、有意な神経線維増生の促進作用が認められた。また、サフラン、オンジ、レイヨウカクについては作用が弱く有意差は認められなかった。このことから N-095 の神経線維増生に対するこれらの作用は他の生薬の関与や、あるいは生薬どうしの相互作用による可能性が考えられる。また、N-095 自身による神経線維増生の作用形態が、NGF のそれとは異なっていることから、NGF とは違ったメカニズムを介して神経線維の増生及び伸長を誘導しているの可能性が考えられる。

オンジ自身には N-095 の作用濃度の含有量あるいはその 10 倍量を添加しても NGF 様の作用や NGF による神経線維増生を促進する作用がほとんどみられなかったが、その一方で、ラットの脳のアストロサイトからの NGF 産生や分泌を増加する作用があると報告されている<sup>21)</sup>。そこで、N-095 の NGF 産生に対する作用を、ラット胎児脳のアストロサイトを用いて検討した。その結果、N-095 に有意な NGF 産生の増加作用が認められた。また、N-095 300 μg/ml 中のオンジ 7.76 μg/ml でも NGF 量の増加傾向はみられたが、有意差は認められなかった。このことから、N-095 による NGF 産生増加作用についても、オンジ以外の生薬も関与しているものと考えられる。また、陽性対照として用いた epinephrine 5 μM でも NGF 量を増加させる傾向を示したのみであった。ただし、N-095

300  $\mu\text{g/ml}$ を除いた4群において、上記のごとく多重比較検定を行ったところ、N-095 100  $\mu\text{g/ml}$ 、オンジ 7.76  $\mu\text{g/ml}$ 、epinephrine 5  $\mu\text{M}$ で有意差（すべて危険率5%以下）が認められたことから、epinephrine 5  $\mu\text{M}$ でもNGF量を増加させるものの、その作用は、N-095 300  $\mu\text{g/ml}$ よりも弱いものであると考えられた。また、N-095によってアストロサイトの数の有意な増加はみられなかった。このことから、N-095によるNGF産生増加作用は、アストロサイトにおけるNGFの産生や分泌を促進した結果によるものと考えられる。中枢神経系においてNGFは、海馬、大脳皮質、嗅球といった前脳基底野コリン作動性神経細胞の投射部位に多く発現し、細胞の成長、分化、生存維持に貢献している。N-095にNGF産生増加作用が認められたことは、NGF産生低下により生じる脳神経系の異常に対して改善を促す可能性が考えられる。

現在、痴呆症の治療の一つに、脳内のNGFを増やす薬物の研究が進められているが、アルツハイマー型痴呆症ではA $\beta$ が原因であるとするアミロイド仮説が提唱されている。A $\beta$ は39~43個のアミノ酸から成り、C末端の切断部位の違いによりA $\beta_{1-40}$ とA $\beta_{1-42}$ の2種類の主要な分子種が存在する。A $\beta_{1-42}$ はその存在比がA $\beta_{1-40}$ の約1/10と少ないが、A $\beta_{1-40}$ に比べて疎水性が高く凝集しやすく、アルツハイマー型痴呆症では最も早期に蓄積する<sup>15)</sup>。また、アルツハイマー型痴呆症患者の早期からみられる老人斑は、A $\beta$ が凝集してできたアミロイド線維が集まって形成されたものと考えられている。本実験ではA $\beta_{1-42}$ を用い、海馬神経細胞に対するA $\beta_{1-42}$ の毒性とその神経細胞毒性に対するN-095の作用について検討した。また、陽性対照として、選択的にvacuolar-typeのATPaseを抑制することによってリソソームの酸化性能を阻害し、A $\beta$ による影響に対して防御作用を示すことが報告されているbafilomycin A1<sup>16)</sup>を使用した。その結果、A $\beta_{1-42}$ の添加によって神経細胞生存率の有意な低下が認められ、A $\beta_{1-42}$ による細胞毒性が確認された。一方、A $\beta_{1-42}$ と同時にN-095あるいはbafilomycin A1を添加することにより、神経細胞生存率の上昇がみられ、A $\beta_{1-42}$ の神経細胞毒性の抑制が認められた。A $\beta$ とNGFの関係についてはまだ解明途中のように思われるが、Guo and Mattson<sup>17)</sup>はNGFがA $\beta$ によって引き起こされる酸化ストレスやミトコンドリアの機能不全を抑制する作用があると報告している。NGFは正常状態では主に神経細胞で合成され、損傷を受けた脳部位では活性化されたアストロサイトでも合成される。N-095によるこの作

用がNGF産生促進などによる神経細胞の保護や安定化に関連するものなのか、あるいはA $\beta_{1-42}$ 凝集の抑制に関連するものなのか、機序について今後更に研究していきたいと考えている。また、引用文献<sup>10)</sup>で報告されているA $\beta_{1-42}$ 単独添加時の神経細胞毒性（細胞生存率約63%）に比べて、本実験によるA $\beta_{1-42}$ 添加時の毒性（細胞生存率約70%）が若干弱いように思われた。これがA $\beta_{1-42}$ のLotの違いによるものなのか、あるいは他に起因するものなのか現在のところ不明であり、他のLotや他のメーカーのものなど、様々な種類のA $\beta_{1-42}$ を用いて今後も検討を続けたいと考えている。

脳卒中および脳損傷の急性期に出現する脳浮腫の早期治療は、生命を確保するために重要であるのみならず、後遺症の軽減や脳血管性痴呆発症の抑制にも関連してくる。脳浮腫の治療には、グリセオールおよびマンニトールの高浸透圧溶液による点滴治療や、抗炎症作用を有するindomethacin等COX阻害剤を用いた脳温管理法などが実施されている。また近年、ラット脳内側中隔野への電気刺激によって作成した脳浮腫モデルに対して、その部位へのNGF 5  $\mu\text{g}$ の単回注入によって脳浮腫の抑制が認められたことが報告され<sup>18)</sup>、脳内のNGFを高めることによる浮腫の抑制が注目されてきている。そこで、N-095の脳浮腫形成に対する作用について検討した。凍結損傷により、損傷側脳半球の水分含有量の有意な増加と、Na, K-ATPase活性の低下に伴うと考えられる<sup>11)</sup> Na, Ca含有量の有意な増加およびK含有量の有意な減少が認められたが、N-095投与群では損傷側脳半球の増加した水分、NaおよびCa含有量の有意な減少と、減少したK含有量の有意な増加がみられた。上記のごとくN-095にはアストロサイトの産生するNGF量を増加する作用や、ibotenic acidによる脳損傷ラットにおけるNGF量を増加する作用が認められていることから、今回の凍結脳損傷ラットにおいても、その改善要因の一つに、N-095の投与によって脳内のNGF量が増加し、その結果、脳浮腫形成の抑制が認められた可能性が考えられる。

以上、N-095はibotenic acidによる空間認知障害、A $\beta$ による脳神経細胞障害、また、凍結損傷による脳浮腫の形成など幾つかの脳に関する障害に対して改善作用を示し、その機序の一部に、脳内のNGF量の増加や神経線維の増生の促進があるものと考えられた。今後は、これら障害に対する別の機序についての探索も含めて、さらにN-095の作用を検討したいと考えている。

## 引用文献

- 1) Jin S.H., Park J.K., Nam K.Y., Park S.N., Jung N.P., *J. Ethnopharmacol.*, **66**, 123-129 (1999).
- 2) Yabe T., Iizuka S., Komatsu Y., Yamada H., *Phytomedicine*, **4**, 199-205 (1997).
- 3) Sugiura M., Shoyama Y., Saito H., Nishiyama N., *Proc. Japan. Acad.*, **71** (Ser B), 319-324 (1995).
- 4) Sugiura M., Shoyama Y., Saito H., Abe K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **271**, 703-707 (1994).
- 5) Nitta A., Murase K., Furukawa Y., Hayashi K., Hasegawa T., Nabeshima T., *Eur. J. Pharmacol.* **250**, 23-30 (1993).
- 6) Paxinos G., Watson C., "The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates", Academic Press, San Diego, 1982.
- 7) Saito H., Suda K., Schwab M., Thoenen H., *Japan. J. Pharmacol.*, **27**, 445-451 (1977).
- 8) Saito H., Nishiyama N., "Iyakuhin No Kaihatsu Vol. 2, Yakuri Kassei Busshitsu [II]" ed. by Shibata S., Hirokawa Publish Co., Tokyo, 1989, pp. 328-337.
- 9) Yabe T., Yamada H., *Phytomedicine*, **3**, 361-367 (1996/97).
- 10) Bastianetto S., Ramassamy C., Dore S., Christen Y., Poirier J., Quirion R., *Eur. J. Neurosci.*, **12**, 1882-1890 (2000).
- 11) Yen M.H., Lee S.H., *Eur. J. Pharmacol.*, **144**, 369-373 (1987).
- 12) Nitta A., Furukawa Y., Hayashi K., Hasegawa T., Nabeshima T., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 34-38 (1994).
- 13) Rudakewich M., Ba F., Benishin C.G., *Planta Med.*, **67**, 533-537 (2001).
- 14) Abe K., Saito H., *Phytother. Res.*, **14**, 149-152 (2000).
- 15) Watanabe A., Tabira T., *Molecular Medicine*, **38**, 1228-1234 (2001).
- 16) Kane M.D., Schwarz R.D., Pierre L.S., Watson M.D., Emmerling M.R., Boxer P.A. and Walker G.K., *J. Neurochem.*, **72**, 1939-1947 (1999).
- 17) Guo Z.H., Mattson M.P., *Cereb. Cortex.*, **10**, 50-57 (2000).
- 18) Janis L.S. and Stein D.G., *Neurosci. Lett.*, **214**, 21-24 (1996).