

平成10年度厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）研究報告書

薬用人参成分ジンセノサイドRb1の脳梗塞抑止作用に関する研究
(H-10-長寿-111)

阪中 雅広 愛媛大学医学部解剖学第二講座教授

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）（総括）研究報告書

薬用人参成分ジンセノサイドRb1の脳梗塞抑止作用に関する研究

（主任研究者） 阪中 雅広 愛媛大学医学部解剖学第二講座教授

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）（分担）研究報告書

中大脳動脈皮質枝永久閉塞ラットに対するジンセノサイドRb1の効果

（主任研究者） 阪中雅広 愛媛大学医学部解剖学第二講座教授

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）（分担）研究報告書

培養神経細胞に対する薬用人参成分ジンセノサイドRb1の保護効果に関する研究

（分担研究者） 佐藤康二 愛媛大学医学部解剖学第二講座助教授

薬用人参成分ジンセノサイドRb1の脳梗塞抑止作用に関する研究

（主任研究者） 阪中 雅広 愛媛大学医学部解剖学第二講座教授

研究要旨

薬用人参成分ジンセノサイドRb1の脳梗塞抑止作用について解析するため、脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（SH-SPラット）の中大脳動脈皮質枝(MCA)永久閉塞モデルを用いた。また、培養細胞を用いた実験系において、ジンセノサイドRb1の神経細胞保護効果を検討した。ジンセノサイドRb1はスナネズミの一過性前脳虚血モデルよりも重篤でかつヒトの病態に近いMCA永久閉塞ラット（脳梗塞ラット）においても、また培養実験系においても強力な神経保護作用を示すことが判明した。

〔研究組織〕

- 阪中雅広（愛媛大学医学部解剖学第二講座 教授）
佐藤康二（愛媛大学医学部解剖学第二講座 助教授）

室内投与により改善するか否かを検討した。更に培養実験系を用いジンセノサイドRb1の作用機序について解析した。

B. 研究方法

A. 研究目的

薬用人参は古来より漢方処方において重要な役割を果たしており、脳梗塞・脳血管性痴呆を始めとする多くの神経疾患に有効であると東洋実地医家に考えられてきたが、その薬効を実験医学的見地より立証した例はほとんどない。また、薬用人参が前記の神経疾患の予防あるいは治療のため臨床の現場で処方されているという事実もない。我々は、これまでスナネズミ一過性前脳虚血モデルを用いて、遅発性神経細胞死に対するジンセノサイドRb1の抑制効果を明らかにしてきた^{1, 2)}。しかしながら、スナネズミ一過性前脳虚血モデルは必ずしもヒト脳梗塞・脳血管性痴呆の病態を反映するとは言い難く、ジンセノサイドRb1の虚血脳保護作用を実験医学的見地より検証するためには、より重篤で、かつヒトの病態に近いモデル動物での薬効解析が必須となる。そこで、本研究では脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（SH-SPラット）の中大脳動脈皮質枝永久閉塞モデルを用いて、同動物の大脳皮質梗塞巣、場所学習能力障害、視床二次変性がジンセノサイドRb1の脳

1. 中大脳動脈皮質枝(MCA)永久閉塞モデル実験

SH-SPラットの左側中大脳動脈皮質枝(MCA)を永久閉塞した直後あるいは、その2時間前より4週間ジンセノサイドRb1 (0.006-6 μ g/day)を脳室内へ持続注入し、実験動物の場所学習能力を水迷路実験（脳虚血後2週目と4週目に実施）にて判定した。対照動物には生理食塩水を注入して同様の実験を行った。水迷路実験後に各々の動物を灌流固定し、大脳皮質梗塞巣を写真撮影したのち、脳をパラフィンに包埋した。その後、大脳皮質梗塞巣を含むパラフィン切片を作成して、視床変性の程度を画像解析装置を用いてしらべた。

2. 培養実験

胎生17日のラット脳より、無菌的に大脳皮質および海馬を摘出し、常法に従い神経細胞を分離した。10%胎仔血清を含むDMEM培地を用い、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂の条件下で神経細胞を培養した。二日目に培養液の半分を、各種濃度（0-10 ng/ml）のジンセノサイドRb1を含む無血清培地と置換

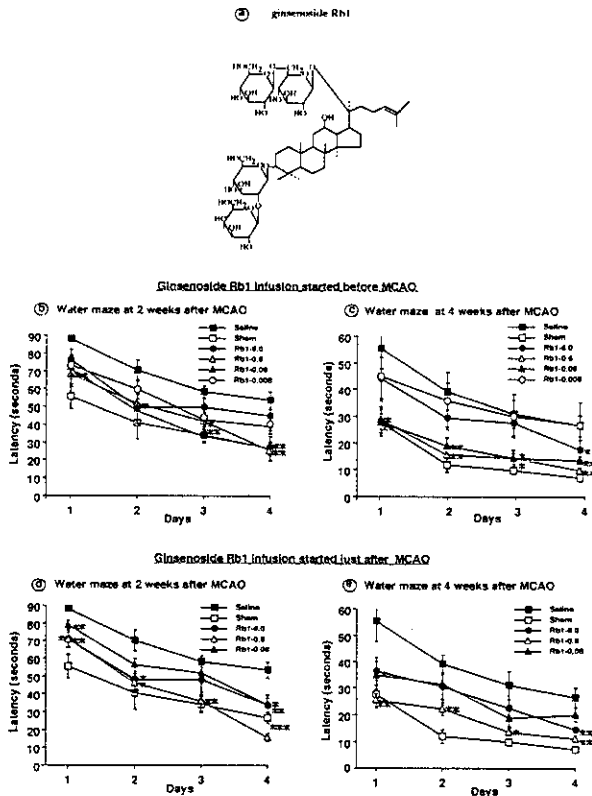


図1 (a)ジンセノサイドRb1の化学構造 (b,c)MCA永久閉塞2時間前からジンセノサイドRb1を脳室内投与した群における二週間目(b),及び四週間目(c)の水迷路実験(d,e)MCA永久閉塞直後からジンセノサイドRb1を脳室内投与した群における二週間目(d),及び四週間目(e)の水迷路実験

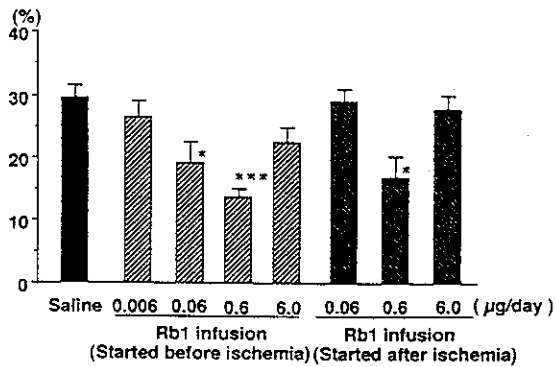


図2 大脳皮質梗塞巣面積率に対するジンセノサイドRb1脳室内投与の効果。梗塞巣面積を大脳半球面積で除することにより大脳皮質梗塞巣面積率を算出

| | Ratio of area (%) | VP neuron number |
|-------------|-------------------|------------------|
| Saline(n=8) | 85.1 \pm 5.6 | 10.4 \pm 3.9 |
| Rb1(n=8) | 95.9 \pm 5.1* | 36.6 \pm 5.6** |
| Sham(n=8) | 98.8 \pm 5.3 | 58.5 \pm 4.7 |

表1 視床面積の左右比率と視床腹側後側核の神経細胞数に対するジンセノサイドRb1の効果

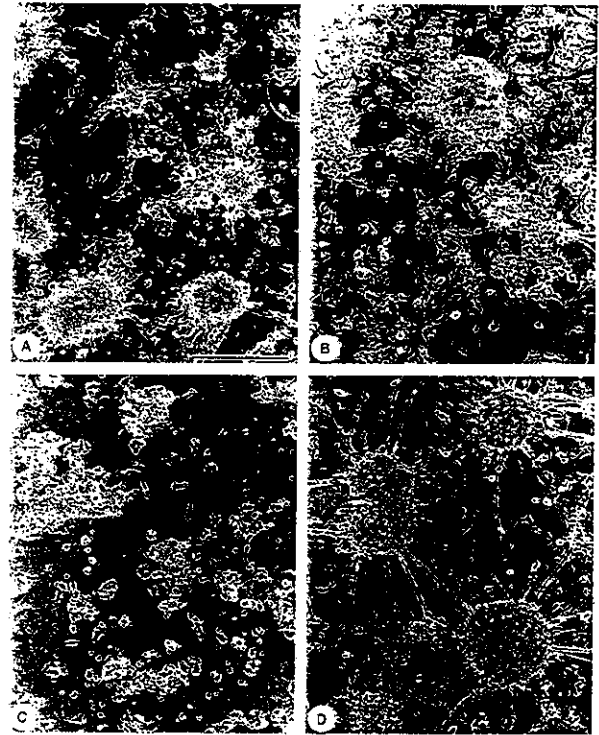


図3 ラット大脳皮質神経細胞培養 (A)コントロール (B)30 μM FeSO₄にて16時間処理(C)ジンセノサイドRb1 (10ng/ml) 前処置後、30 μM FeSO₄にて16時間処理 (D)ジンセノサイドRb1 (1fg/ml) 前処置後、30 μM FeSO₄にて16時間処理

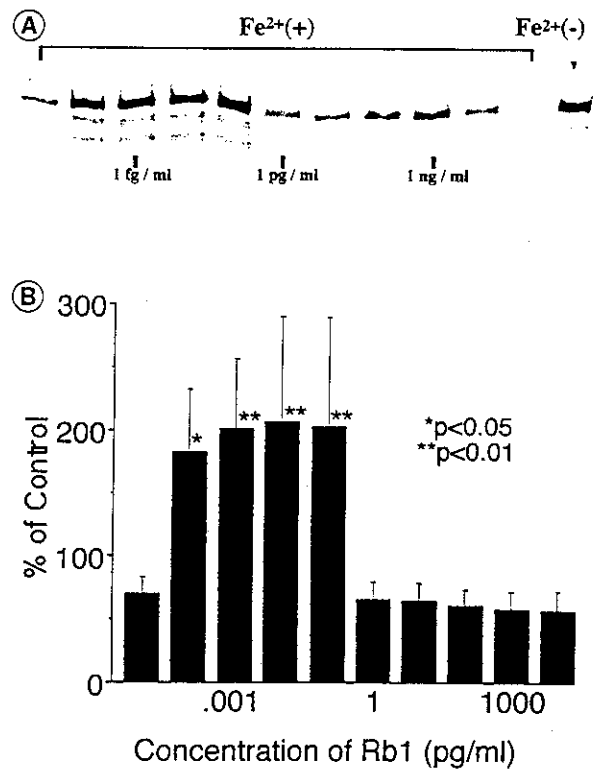


図4 大脳皮質培養神経細胞に対するジンセノサイドRb1の保護効果 (A)MAP2ウエスタンブロットティング (B)半定量的解析

した。酸化障害を引き起こすために四日目に30 μ M又は90 μ Mの硫酸第一鉄を培養液中に加えた。形態学的な観察に使用する細胞は、4%パラホルムアルデヒドを含む緩衝液で固定した。ウエスタンブロットリングに使用する細胞はLaemmli's溶液にて可溶化した。

C. 研究結果

1. 中大脳動脈皮質枝(MCA)永久閉塞実験

ジンセノサイドRb1を0.6 μ g/dayの用量でMCA永久閉塞直後あるいはその2時間前より脳室内へ4週間持続注入すると、生理食塩水注入虚血群と比べて有意に場所学習能力が改善し脳梗塞巣が縮小した(図1, 2)。さらに、ジンセノサイドRb1 (0.6 μ g/day)投与により視床の二次変性も有意に軽減した(表1)。ジンセノサイドRb1を0.06 μ g/dayの用量でMCA永久閉塞動物に投与したときの効果は0.6 μ g/day投与群と比べて軽微であった。

2. 培養神経細胞に対するジンセノサイドRb1の保護効果

大脳皮質神経細胞を四日間培養したところ、神経細胞が多く突起を伸ばしている様子が観察された(図3A)。硫酸第一鉄を培養液に加えフリーラジカルを産生させると、神経突起は4時間以内に断裂し始め、16時間後には殆どの神経細胞が変性した(図3B)。さて、大脳皮質神経細胞を1 μ g/mlもしくはそれ以上の濃度のジンセノサイドRb1で前処理すると神経突起の伸長はむしろ阻害された(図3C)。しかし、低濃度(約1 fg/ml)のジンセノサイドRb1は神経突起の伸長を促進し、更に硫酸第一鉄によって引き起こされる神経細胞傷害をも阻止できた(図3D)。

硫酸第一鉄処理に対するジンセノサイドRb1の保護効果を定量的に解析するため、培養神経細胞を用い、神経細胞のマーカー蛋白であるMAP2のウエスタンブロットリングを実施した。硫酸第一鉄処理を施していない群では、豊富なMAP2の発現が観察された(図4A)。一方硫酸第一鉄処理を施した群では非常に低レベルのMAP2発現しか観察されなかった(図4A)。

しかし、0.1から100 fg/mlのジンセノサイドRb1を前投与しておく、硫酸第一鉄負荷後でも神経細胞はMAP2を豊富に発現していた。従って、微量のジンセノサイドRb1により、有意に神経細胞死が抑制されていることが明らかとなった(図4A)。この結果を定量的に解析した結果を図4Bに示す。また、海馬神経細胞の培養実験でも同様の結果が得られた。

D. 考察

以上のことより、スナネズミの一過性前脳虚血モデルよりも重篤でかつヒトの病態に近いMCA永久閉塞ラットにおいて、ジンセノサイドRb1の脳室内投与は強力な神経保護作用を示すことが判明した。また、本研究において、0.1-100 fg/mlのジンセノサイドRb1が、大脳皮質及び海馬神経細胞を硫酸第一鉄処理による致死的酸化障害から保護することが明らかとなった。更に、無細胞系ではジンセノサイドRb1がフリーラジカル消去剤として作用することが明らかとなった。以上の結果より、ジンセノサイドRb1は脳虚時に過剰産生されるフリーラジカルの神経毒性を軽減することにより神経細胞保護作用を発揮するものと考えられた。

E. 結論

ジンセノサイドRb1の脳室内注入はMCA永久閉塞ラット(脳梗塞ラット)において、強力な神経保護作用を示すことが明らかとなった。また、ジンセノサイドRb1が虚血脳においてフリーラジカル消去剤として働く可能性が示唆された。

(引用文献)

1. Wen T-C et al., Ginseng root prevents learning disability and neuronal loss in gerbils with 5-minute forebrain ischemia. *Acta Neuropathol.* 91: 15-22, 1996.
2. Lim J-H et al. Protection of ischemic hippocampal neurons by ginsenoside Rb1, a main ingredient of ginseng root. *Neurosci. Res.* 28: 191-200, 1997.

F. 研究発表

1. Zhang B et al. Ginsenoside Rb1 prevents image navigation disability, cortical infarction, and thalamic degeneration in rats with focal cerebral ischemia, J. Stroke Cerebrovasc. Dis. 7: 1-9, 1998.
2. Sakanaka M, Wen T-C, Sato K, and Zhang Bo, Neurotrophic actions of ginsenoside Rb1, peptide growth factors and cytokines. In: Huh H, Choi JK, Kim YC eds. Proceedings of the 7th International Symposium on Ginseng, Advances in Ginseng Research. The Korean Society of Ginseng (Seoul), 21-30, 1998.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許出願

- (1) 特願平10-365560号
発明者：阪中雅広、田中潤也、
佐藤康二
出願人：科学技術振興事業団
- (2) 特願平11-41517号
発明者：阪中雅広、田中潤也、
佐藤康二
出願人：科学技術振興事業団

中大脳動脈皮質枝永久閉塞ラットに対するジンセノサイドRb1の効果

（主任研究者） 阪中雅広 愛媛大学医学部解剖学第二講座教授

研究要旨

脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（SH-SPラット）の中大脳動脈皮質枝(MCA)永久閉塞モデルを用いて、同動物の大脳皮質梗塞巣、場所学習能力障害、視床二次変性がジンセノサイドRb1の脳室内投与により改善するか否かを検討した。ジンセノサイドRb1を0.6 μg/dayの用量でMCA永久閉塞直後あるいはその2時間前より脳室内へ4週間持続注入すると、生理食塩水注入虚血群と比べて有意に場所学習能力が改善し脳梗塞巣が縮小した。さらに、ジンセノサイドRb1 (0.6 μg/day)投与により視床の二次変性も有意に軽減した。上記の結果より、ジンセノサイドRb1はスナネズミの一過性前脳虚血モデルよりも重篤でかつヒトの病態に近いMCA永久閉塞ラットにおいて、強力な神経細胞保護作用を示すことが判明した。

A. 研究目的

薬用人参は古来より漢方処方において重要な役割を果たしており、脳梗塞・脳血管性痴呆を始めとする多くの神経疾患に有効であると東洋実地医家に考えられてきたが、その薬効を実験医学的見地より立証した例はほとんどない。また、薬用人参が前記の神経疾患の予防あるいは治療のため臨床の現場で処方されているという事実もない。我々は、これまでスナネズミ一過性前脳虚血モデルを用いて、遅発性神経細胞死に対するジンセノサイドRb1の抑制効果を明らかにしてきた^{1, 2)}。しかしながら、スナネズミ一過性前脳虚血モデルは必ずしもヒト脳梗塞・脳血管性痴呆の病態を反映するとは言い難く、ジンセノサイドRb1の虚血脳保護作用を実験医学的見地より検証するためには、よりヒトの病態に近いモデル動物での薬効解析が必須となる。そこで、本研究では脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（SH-SPラット）の中大脳動脈皮質枝永久閉塞モデルを用いて、同動物の大脳皮質梗塞巣、場所学習能力障害、視床二次変性がジンセノサイドRb1の脳室内投与により改善するか否かを検討した。

B. 研究方法

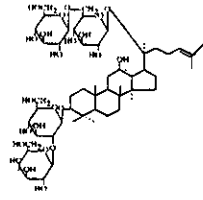
本研究ではSH-SPラットの左側中大脳

動脈皮質枝（MCA）を永久閉塞した直後あるいは、その2時間前より4週間ジンセノサイドRb1 (0.006-6 μg/day)を脳室内へ持続注入し、実験動物の場所学習能力を水迷路実験（脳虚血後2週目と4週目に実施）にて判定した。対照動物には生理食塩水を注入して同様の実験を行った。なお、MCA閉塞前後にジンセノサイドRb1 (0.6 μg/day)投与群と生理食塩水投与群において血圧ならびに脳温を測定した。水迷路実験後に各々の動物を灌流固定し、大脳皮質梗塞巣を写真撮影したのち、脳をパラフィンに包埋した。その後、大脳皮質梗塞巣を含むパラフィン切片を作成して、視床変性の程度を画像解析装置を用いてしらべた。

C. 研究結果

ジンセノサイドRb1を0.6 μg/dayの用量でMCA永久閉塞直後あるいはその2時間前より脳室内へ4週間持続注入すると、生理食塩水注入虚血群と比べて有意に場所学習能力が改善し脳梗塞巣が縮小した（図1, 2）。さらに、ジンセノサイドRb1 (0.6 μg/day)投与により視床の二次変性も有意に軽減した（表1）。ジンセノサイドRb1を0.06μg/dayの用量でMCA永久閉塞動物に投与したときの効果は0.6 μg/day投与群と比べて軽微であった。ジ

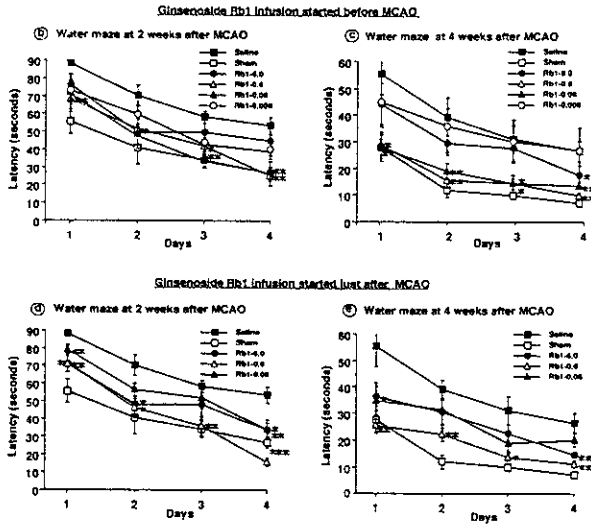
① ginsenoside Rb1



Ratio of area(%) VP neuron number

| | | |
|-------------|------------|-------------|
| Saline(n=8) | 85.1±5.6 | 10.4±3.9 |
| Rb1(n=8) | 95.9±5.1 * | 36.6±5.6 ** |
| Sham(n=8) | 98.8±5.3 | 58.5±4.7 |

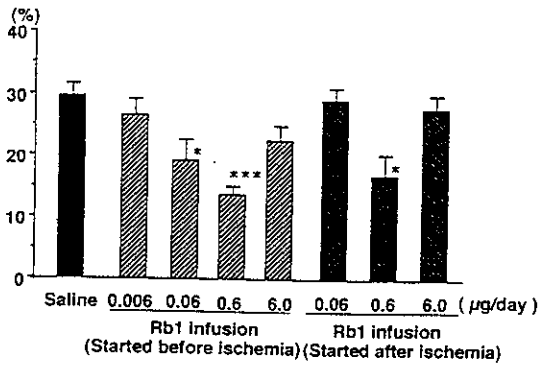
表1 視床面積の左右比率と視床腹側後側核の神経細胞数に対するジンセノサイドRb1の効果



| | Saline (n=8) (mm Hg) | Rb1 (n=8) (mm Hg) |
|--------------------|-------------------------|----------------------|
| before MCAO | 202.6±9.6 | 204.4±10.5 |
| 2 hours after MCAO | 186.1±12.6 | 191.1±13.3 |
| 1 day after MCAO | 189.6±15.5 | 196.8±11.4 |
| 2 days after MCAO | 193.1±11.9 | 198.6±18.6 |
| 3 days after MCAO | 191.5±16.8 | 199.4±11.4 |
| 4 days after MCAO | 195.5±10.6 | 203.5±14.4 |
| 5 days after MCAO | 197.6±14.3 | 197.3±30.9 |
| 6 days after MCAO | 195.6±10.5 | 204.8±20.4 |
| 7 days after MCAO | 202.8±13.4 | 198.1±21.2 |

図1 (a)ジンセノサイドRb1の化学構造 (b,c) MCA永久閉塞2時間前からジンセノサイドRb1を脳室内投与した群における二週間目(b), 及び四週間目(c)の水迷路実験 (d,e) MCA永久閉塞直後からジンセノサイドRb1を脳室内投与した群における二週間目(d), 及び四週間目(e)の水迷路実験

表2 MCA永久閉塞実験におけるラット血圧の経時変化



| Time after infusion (hours) | Saline(n=8) (°C) | Rb1 (n=8) (°C) |
|-----------------------------|------------------|----------------|
| 0.5 | 35.9±0.5 | 36.1±0.7 |
| 1.0 | 36.3±0.8 | 36.3±0.8 |
| 1.5 | 36.3±0.5 | 36.7±0.6 |
| 2.0(ischemia) | 37.0±0.2 | 37.0±0.2 |
| 4.0 | 36.5±0.5 | 36.8±0.8 |
| 8.0 | 37.1±0.6 | 36.9±0.6 |
| 12.0 | 37.4±0.3 | 37.1±0.6 |
| 24.0 | 37.6±0.6 | 37.1±0.8 |
| 48.0 | 37.3±0.3 | 37.5±0.3 |
| 64.0 | 37.5±0.7 | 37.5±0.8 |
| 88.0 | 37.1±0.6 | 37.2±0.7 |
| 112.0 | 37.2±0.9 | 37.3±0.4 |
| 136.0 | 37.3±0.7 | 37.3±0.6 |
| 160.0 | 37.5±0.4 | 37.2±0.4 |

図2 大脳皮質梗塞巣面積率に対するジンセノサイドRb1脳室内投与の効果。梗塞巣面積を大脳半球面積で除することにより大脳皮質梗塞巣面積率を算出

表3 MCA永久閉塞実験におけるラット脳温の経時変化

ンセノサイドRb1 (0.6 µg/day)脳室内注入によって血圧および脳温には有意な変化はみられなかった(表2, 3)。

D. 考察

以上のことより、ジンセノサイドRb1の脳室内投与はスナネズミの一過性前脳虚血モデルよりも重篤でかつヒトの病態に近いMCA永久閉塞ラットにおいて、強力な神経保護作用を示すことが判明した。今後、ジンセノサイドRb1の作用機構を解明するとともに、ジンセノサイドRb1の静脈内投与や経口投与が同様の虚血脳保護効果を発揮するか否かを検討すべきと思われる。

E. 結論

ジンセノサイドRb1の脳室内注入はMCA永久閉塞ラットにおいて、強力な神経保護作用を示すことが明らかとなった。

(引用文献)

1. Wen T-C et al., Ginseng root prevents learning disability and neuronal loss in gerbils with 5-minute forebrain ischemia. *Acta Neuropathol.* 91: 15-22, 1996.
2. Lim J-H et al. Protection of ischemic hippocampal neurons by ginsenoside Rb1, a main ingredient of ginseng root. *Neurosci. Res.* 28: 191-200, 1997.

F. 研究発表

1. Zhang B et al. Ginsenoside Rb1 prevents image navigation disability, cortical infarction, and thalamic degeneration in rats with focal cerebral ischemia, *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 7: 1-9, 1998.
2. Sakanaka M, Wen T-C, Sato K, and Zhang Bo, Neurotrophic actions of ginsenoside Rb1, peptide growth factors and cytokines. In: Huh H, Choi JK, Kim YC eds. *Proceedings of the 7th International Symposium on Ginseng, Advances in Ginseng Research.* The

Korean Society of Ginseng (Seoul), 21-30, 1998.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許出願

- (1) 特願平10-365560号
発明者：阪中雅広、田中潤也、佐藤康二
出願人：科学技術振興事業団
- (2) 特願平11-41517号
発明者：阪中雅広、田中潤也、佐藤康二
出願人：科学技術振興事業団

培養神経細胞に対する薬用人参成分ジンセノサイドRb1の 保護効果に関する研究

（分担研究者） 佐藤康二 愛媛大学医学部解剖学第二講座助教授

研究要旨

本研究では培養実験系を用い、ジンセノサイドRb1の神経細胞保護効果及びその作用機構について検討した。ジンセノサイドRb1は、0.1-100 fg/mlの濃度で大脳皮質及び海馬神経細胞を硫酸第一鉄処理による致死的酸化的障害から保護した。更にフェントン反応を用いた検討でジンセノサイドRb1が無細胞系でフリーラジカル消去剤として働くことを明らかにした。ジンセノサイドRb1は、脳虚血時過剰に産生されるフリーラジカルの神経毒性を軽減することにより神経細胞保護作用を発揮するものと考えられた。

A. 研究目的

我々は、これまで薬用人参精製サポニン“ジンセノサイドRb1”（分子式C₅₄H₉₂O₂₃，分子量1109.46）の神経細胞保護作用について検討を加えてきた^{1,2)}。更に最近、ジンセノサイドRb1の神経細胞保護作用は表皮成長因子やエリスロポエチンと比較しても遜色ないことをつきとめた^{3,4)}。しかし、どのようなメカニズムでジンセノサイドRb1が神経細胞保護作用を発揮するのは未だ明らかではない。従って、本研究では培養実験系を用いジンセノサイドRb1の作用機序について解析した。

B. 研究方法

1. 培養実験

胎生17日のラット脳より、無菌的に大脳皮質及び海馬を摘出し、常法に従い神経細胞を分離した。10%胎仔血清を含むDMEM培地を用い、37℃、5% CO₂の条件下で神経細胞を培養した。二日目に培養液の半分を、各種濃度（0-10 ng/ml）のジンセノサイドRb1を含む無血清培地と置換した。酸化的障害を引き起こすために四日目に30 μM 又は90 μMの硫酸第一鉄を培養液に加えた。形態学的な観察に使用する細胞は、4%パラホルムアルデヒド

を含む緩衝液で固定した。ウエスタンブロットティングに使用する細胞はLaemmli's溶液にて可溶化した。

2. ウエスタンブロットティング

可溶化した蛋白を6%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。この膜と抗MAP2抗体を反応させ、アルカリフォスファターゼ法にて可視化し、デンシトメトリーを用い半定量した。

3. フェントン反応

940 μlのジンセノサイドRb1溶液に20 μlの5 mM *p*-nitrosodimethylaniline (*p*-NDA)と23 μlの88 mM過酸化水素を加えた。更に20 μlの10 mM 硫酸第一鉄を加え440 nmにおける吸光度を経時的に測定し、ジンセノサイドRb1のフリーラジカル消去作用を無細胞系でしらべた。

C. 研究結果

1. 大脳皮質神経細胞に対するジンセノサイドRb1の保護効果

胎生17日のラットから得た大脳皮質神経細胞を四日間培養したところ、神経細胞が多く突起を伸ばしている様子が観

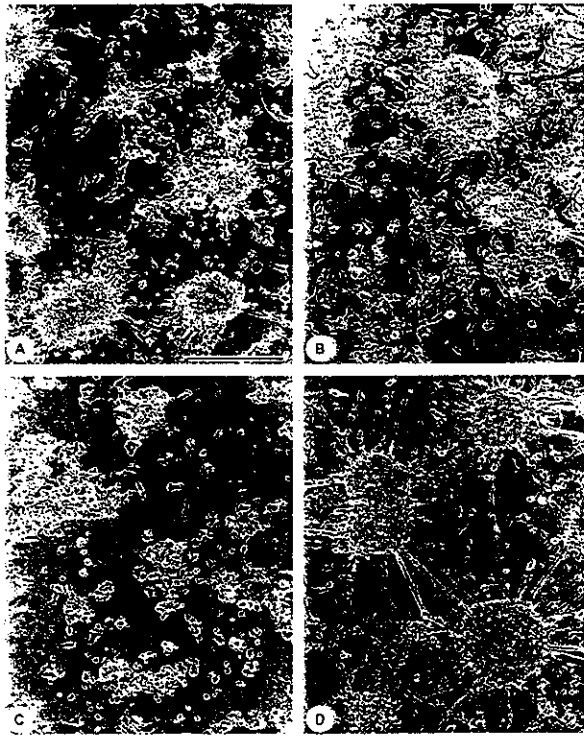


図1 ラット大脳皮質神経細胞培養 (A) コントロール (B) 30mM FeSO₄にて16時間処理 (C) ジンセノサイドRb1 (10ng/ml) 前処置後、30mM FeSO₄にて16時間処理 (D) ジンセノサイドRb1 (1fg/ml) 前処置後、30mM FeSO₄にて16時間処理

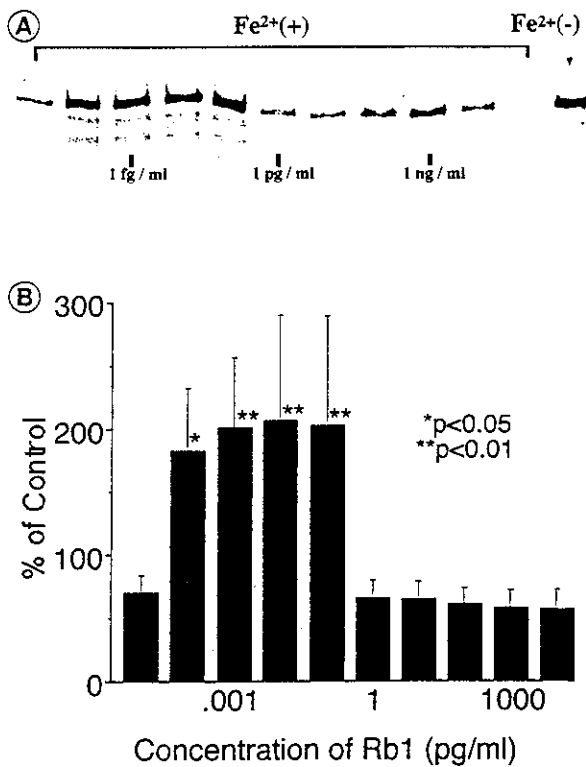


図2 大脳皮質培養神経細胞に対するジンセノサイドRb1の保護効果 (A) MAP2ウエスタンブロッティング (B) 半定量的解析

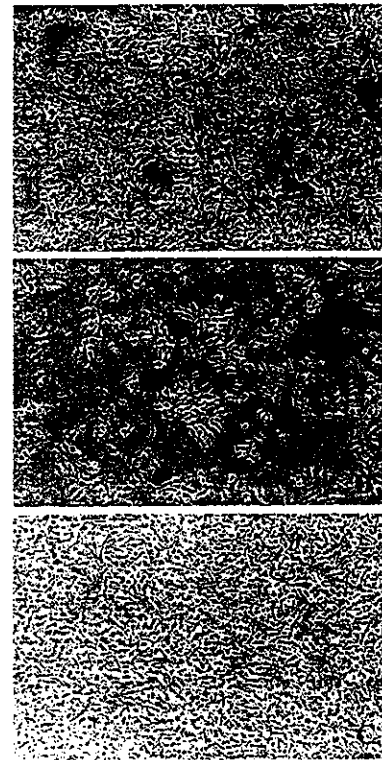


図3 ラット海馬神経細胞培養 (A) コントロール (B) 90mM FeSO₄にて処理 (C) ジンセノサイドRb1 (1fg/ml) 前処置後、90mM FeSO₄にて24時間処理

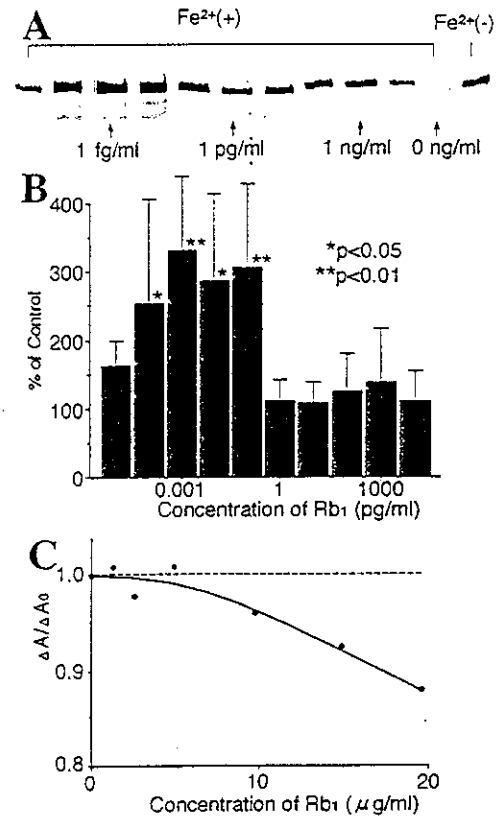


図4 海馬培養神経細胞に対するジンセノサイドRb1の保護効果 (A) MAP2ウエスタンブロッティング (B) 半定量的解析 (C) フェントン反応

察された(図1A)。硫酸第一鉄を培養液に加えフリーラジカルを産生させると、神経突起は4時間以内に断裂し始め、16時間後には殆どの神経細胞は変性した(図1B)。さて、大脳皮質神経細胞を1 pg/mlもしくはそれ以上の濃度のジンセノサイドRb1で前処理すると神経突起の伸長はむしろ阻害された(図1C)。しかし、低濃度(約1 fg/ml前後)のジンセノサイドRb1は神経突起の伸長を促進し、更に硫酸第一鉄によって引き起こされる神経細胞傷害をも阻止した(図1D)。

硫酸第一鉄処理に対するジンセノサイドRb1の保護効果を定量的に解析するため、培養神経細胞を用い、神経細胞のマーカー蛋白であるMAP2のウエスタンブロッティングを実施した。硫酸第一鉄処理を行っていない群では、豊富なMAP2の発現が観察された(図2A)。一方、硫酸第一鉄処理を行った群では非常に低レベルのMAP2発現しか観察されなかった(図2A)。しかし、0.1から100 fg/mlのジンセノサイドRb1を前投与しておく、神経細胞は硫酸第一鉄処理後もMAP2を豊富に発現していた。従って、微量のジンセノサイドRb1により、有意に神経細胞死が抑制されていることが明らかとなった(図2A)。この結果を定量的に解析した結果を図2Bに示す。

2. 海馬神経細胞に対するジンセノサイドRb1の保護効果ならびにジンセノサイドRb1のフリーラジカル消去作用

海馬神経細胞を四日間培養したところ、多くの突起を有する神経細胞が観察された(図3A)。硫酸第一鉄を培養液に加えフリーラジカルを産生させると、神経突起は16時間後には断裂し(図3B)、24時間後には殆どの神経細胞が変性した。さて、海馬神経細胞を1 pg/mlもしくはそれ以上の濃度のジンセノサイドRb1で前処理すると神経突起の伸長はむしろ阻害された。しかし、低濃度(1 fg/ml前後)のジンセノサイドRb1は神経突起の伸長を促進し、更に硫酸第一鉄によって引き起こされる海馬神経細胞障害をも阻止した(図3C)。硫酸第一鉄処理に対するジンセノサイドRb1の海馬神経細胞保護効果を定量的に解析するため、培養神経細胞を用い、神経細胞のマーカー蛋白であるMAP2

のウエスタンブロッティングを実施した。硫酸第一鉄処理を施していない群では、豊富なMAP2の発現が観察された(図4A)。一方、硫酸第一鉄処理を施した群では殆どMAP2の発現は観察されなかった(図4A)。しかし、0.1から100 fg/mlのジンセノサイドRb1を前投与しておく、神経細胞は硫酸第一鉄処理後もMAP2を豊富に発現していた。従って、大脳皮質神経細胞の場合と同様に、微量のジンセノサイドRb1により、有意に神経細胞死が抑制されていることが判明した(図4A)。この結果を半定量したのが図4Bである。次にジンセノサイドRb1のフリーラジカル消去剤としての作用を無細胞系で検討するため、*p*-nitrosodimethylaniline (*p*-NDA)を用いてフェントン反応を実施した。ジンセノサイドRb1をこの反応に加えると、用量依存的に*p*-NDAのbleaching反応は減弱し、ジンセノサイドRb1がフリーラジカル消去剤として作用することが明らかとなった(図4C)。

D. 考察

本研究において、0.1-100 fg/mlのジンセノサイドRb1が、大脳皮質及び海馬神経細胞を硫酸第一鉄処理による致死的酸化的障害から保護することが明らかとなった。この濃度はこれまで報告されているペプチド性成長因子のものよりかなり低いものであった。さて、その神経細胞保護メカニズムを解明するため、フェントン反応を用いたところ、無細胞系ではジンセノサイドRb1がフリーラジカル消去剤として作用することが明らかとなった。以上の結果より、ジンセノサイドRb1は脳虚血時に過剰に産生されるフリーラジカルの神経毒性を軽減することにより、神経細胞保護作用を発揮するものと考えられた。

また、本研究において明らかとなったことは、高濃度のジンセノサイドRb1は神経細胞保護作用を示さないということである。このことは、微量のジンセノサイドRb1を投与するだけで脳梗塞を治療できる可能性を物語っており、今後ジンセノサイドRb1の臨床応用を考える上で非常に興味深い。

E. 結論

ジンセノサイドRb1の神経細胞保護作用メカニズムについて検討したところ、低濃度のジンセノサイドRb1がフリーラジカルの神経毒性を軽減することが判明した。

(引用文献)

1. Lim J-H et al. Protection of ischemic hippocampal neurons by ginsenoside Rb1, a main ingredient of ginseng root. *Neurosci. Res.* 28: 191-200, 1997.
2. Zhang B et al. Ginsenoside Rb1 prevents image navigation disability, cortical infarction, and thalamic degeneration in rats with focal cerebral ischemia, *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 7: 1-9, 1998.
3. Peng H et al. Epidermal growth factor protects neuronal cells in vivo and in vitro against transient forebrain ischemia- and free radical-induced injuries. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18: 349-360, 1998 .
4. Sakanaka M et al. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 4635-4640, 1998.

F. 研究発表

Sakanaka M, Wen T-C, Sato K, and Zhang Bo, Neurotrophic actions of ginsenoside Rb1, peptide growth factors and cytokines. In: Huh H, Choi JK, Kim YC eds. *Proceedings of the 7th International Symposium on Ginseng, Advances in Ginseng Research. The Korean Society of Ginseng (Seoul)*, 21-30, 1998.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許出願

- (1) 特願平10-365560号
発明者：阪中雅広、田中潤也、
佐藤康二
出願人：科学技術振興事業団
- (2) 特願平11-41517号
発明者：阪中雅広、田中潤也、
佐藤康二