

和漢薬およびその成分の抗腫瘍効果とTNF誘導能の検討

原中瑠璃子^{*a)}, 岡田奈緒子^{a)}, 小林茂三郎^{a)}原中 勝征^{b)}, 里見 信子^{b)}, 桜井 明子^{b)}日本大学医学部生化学教室^{a)} 東京大学医科学研究所内科病態薬理研究部^{b)}Studies on the antitumor activity and tumor necrosis factor
producibility of traditional chinese medicines or
their components.Ruriko HARANAKA,^{*a)} Naoko OKADA,^{a)} Mosaburo KOBAYASHI,^{a)}
Katsuyuki HARANAKA,^{b)} Nobuko SATOMI,^{b)} and Akiko SAKURAI^{b)}Department of Biochemistry, Nihon University School of Medicine^{a)}Department of Internal Medicine, Institute of Medical Science, University of Tokyo^{b)}

(Received September 17, 1984)

Abstract

The antitumor activities and tumor necrosis factor (TNF)producibility of traditional Chinese preparations (*Tyorei-tô* (Zhu-Ling-Tang), *Syô-saiko-tô* (Xiao-Chai-Hu-Tang), crude drugs (*Bupleuri Radix*, *Angelica Radix*, *Cnidii Rhizoma*, *Cinnamomum Cortex*, *Polyporus*, *Hoelen*), and PSK were investigated using mice. These drugs were given to the DDY mice via drinking water before and after the transplantation of Ehrlich ascites tumor cells, and development of intradermally transplanted Ehrlich tumors and survival rate were investigated.

Good survival rate and sometimes complete cure were observed in the groups given *Bupleuri Radix*, *Syô-saiko-tô*, PSK, *Angelica Radix* or *Cinnamomum Cortex*, while the group given *Hoelen* revealed poor results.

To observe the TNF producibility these drugs were given to the DDY mice orally as the first stimulating agents, which can stimulate the reticuloendothelial system (RES), prior to lipopolysaccharide injection. TNF activity was tested by cytotoxicity against L cells.

Significant differences were observed in TNF producibility among the drugs. Relatively high levels of TNF inducing activities were found in the groups given *Angelica Radix*, *Bupleuri Radix* or *Cinnamomum Cortex*, very low activities in the groups given *Syô-saiko-tô*, *Tyorei-tô* or *Cnidii Rhizoma*, PSK, and no TNF inducing activities in the groups given *Polyporus* or *Hoelen*. The TNF producibility of these materials was correlated to the degree of the survival rates of mice transplanted with Ehrlich tumor cells. Based on our findings, it is considered that one of the mechanisms of the antitumor activities of these drugs was due to the induction of a host-mediated factor like TNF as the RES stimulant.

Keywords antitumor activity, Ehrlich ascites tumor, Tumor necrosis factor**Abbreviations** LPS; Lipopolysaccharide, PSK; polysaccharide Krestin,TNF; 腫瘍壊死因子, *Syô-saiko-tô* (Xiao-Chai-Hu-Tang); 小柴胡湯,*Tyorei-tô* (Zhu-Ling-Tang); 猪苓湯

* 〒173 東京都板橋区大谷口上町30-1
30-1, Oyaguchikami-cho, Itabashi-ku, Tokyo,
173, Japan

緒 言

漢方方剤は生体のホメオスターシスの維持に関与すると考えられ、最近免疫学の分野においても種々の角度から研究されるようになった。和漢薬から得られた多糖成分にはインターフェロン誘発能¹⁾、抗腫瘍活性²⁾、抗体産生増強³⁾、リンパ球幼若化能⁴⁾、抗補体活性⁵⁾などがあることが報告されており、和漢薬の成分が免疫系に作用する可能性が示唆されている。1975年、Oldらによって初めて発表された腫瘍壊死因子(TNF)^{6,7)}はほかのcytokineと同様に多彩な生物活性を示し、その抗腫瘍活性が特に強力であることはその後の我々の研究からも明らかとなっている。TNFは原則として2回の刺激すなわちBCG、Corynebacterium pавumなどの第一次刺激と大腸菌由来のエンドトキシン(Lipopolysaccharide, 以下LPS)や混合細菌ワクチンなどの第二次刺激によってマクロファージ系細胞により産出される。今回我々は広く用いられている漢方方剤(小柴胡湯、猪苓湯)と猪苓、茯苓、当帰、桂枝、柴胡、川芎などの生薬およびPSK(Krestin呉羽化学)の抗腫瘍効果とこれらを第一次刺激剤とした場合のTNF産生について検討し、若干の知見を得たので報告する。

材料と方法

実験動物としてはDDY系の雌性マウス(日本クレー)を用いた。漢方方剤は小柴胡湯エキス原末、猪苓湯エキス原末(ツムラ順天堂)を用い、生薬の猪苓、茯苓、当帰、桂枝、柴胡、川芎はいずれもツムラ順天堂より入手し、水抽出エキス物からスプレイ乾燥末を作成して実験に供した。PSKはカワラタケの菌子体より得られた多糖体で呉羽化学の製品を使用した。

これらの各種試料はいずれも飲料水に混合し、〈小柴胡湯〉Xiao-Chai-Hu-Tang (640mg/kg/day)、〈猪苓湯〉Zhu-Ling-Tang (560mg/kg/day)、〈猪苓〉Polyporus (中国産)サルノコシカケ科、チョレイマツタケ菌核 (400mg/kg/day)、〈茯苓〉Hoelen (韓国産)サルノコシカケ科、マツホド菌核 (400mg/kg/day)、〈当帰〉Angelica Radix (北海道産)セリ科の当帰 (640mg/kg/day)、〈桂枝〉Cinnamomum Cortex (ベトナム産)クスノキ科のCassia桂枝 (560mg/kg/day)、〈柴胡〉Bupleuri Radix (韓国産)セリ科ミシマサ

イコノ根 (640mg/kg/day)、〈川芎〉Cnidii Rhizoma (群馬産)セリ科の川芎の根茎 (560mg/kg/day)、〈PSK〉Krestin (500mg/kg/day)を連日投与した。これらの投与量は常用量に対し猪苓湯、小柴胡湯は40倍、その他の生薬については成人常用量の約40~50倍、PSKは成人常用量の約10倍相当量を投与した。これらの投与は癌移植2週間前から開始し、その後は同量を継続して投与した。TNF産生に及ぼすこれらの薬剤の実験においても同様に活性測定2週間前から連日投与を行った。

移植癌に対する抗腫瘍効果を見る場合にはEhrlich腹水癌細胞 (1×10^6 /mouse)を上記の薬剤投与開始2週間後にマウス腹壁皮下に移植し、腫瘍重量の増加を週3回、1カ月間測定するとともに延命効果を検討した。また移植腫瘍の完全消失、80日以上延命効果を得た個体を完全治癒群と判定し完全治癒率を求めた。

TNF産生能は上記の薬剤を2週間投与したマウスに20 μ gのLPS (*Escherichia coli* 0111:B4W由来, Difco Lab., Mich.USA)を静注し、2時間後に採血して測定した。また採血後直ちに肝および脾臓の重量を測定した。TNF活性の測定にはL細胞を用いる *in vitro*の方法を用いた。すなわち稀釈血清検体を 2×10^5 /ml L cellとともに37℃で48時間、5%CO₂を含む高湿度の空気を通気しながら培養し、50%の細胞障害を示す稀釈倍数(D₅₀)を求めてTNF活性として表現した。

結 果

Fig.1はEhrlich腹水癌移植マウスにおける延命率と完全治癒率を示したものである。最も良好な延命効果と完全治癒を示したのは当帰、桂枝、柴胡、小柴胡湯を投与した群でPSK、猪苓湯、川芎投与群がそれにつぎ、茯苓投与群では完全治癒は認められなかった。

Table IはTNF活性値、TNF活性測定時の肝および脾重量を示したものである。TNF活性値は桂枝投与群に最も高値を示し、これについて柴胡、当帰、川芎に比較的高い活性が認められた。小柴胡湯、猪苓湯、PSK投与群ではそれぞれ少数例に比較的高いTNF活性が認められた。猪苓および茯苓投与群ではTNF活性はほとんど認められなかった。表からも分るようにTNF活性には非常に個体差が認められればらつきが多かった。脾重量は各薬剤投与群で1.5~3倍の増加を認めたが、かなり個体差が見られた。脾重量増加の程度の大きい個体ほど

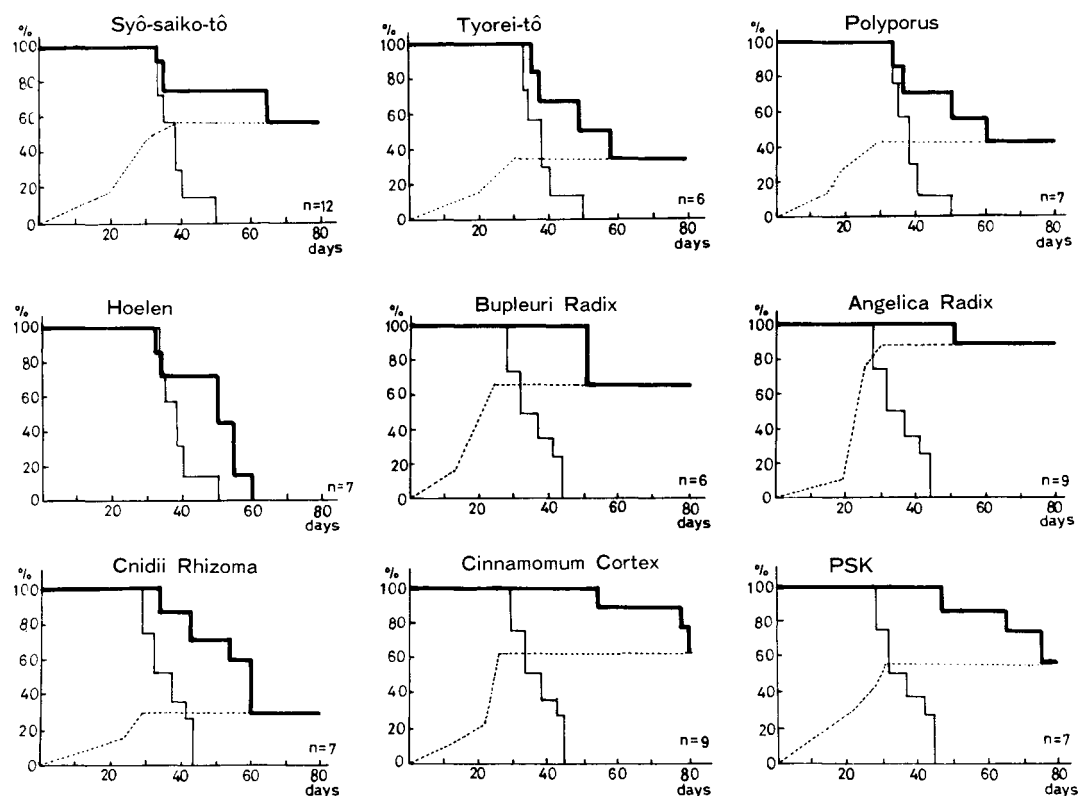


Fig. 1 Survival and complete cure rates of the mice intradermally transplanted Ehrlich tumor cells.

The drugs were administered 2 weeks before transplantation and continued after the transplantation.

— Survival rate — Survival rate of control
 Complete cure rate

Table I TNF producibility, spleen and liver weights in mice administered various drugs for 2 weeks prior to LPS injection

Group (n)	Sp. wt. (mg)	Liv. Wt. (g)	TNF activity (DF) ^a	% TNF positive (High titer)
Control	(5) 109.9 ± 16.9 ^b	1.34 ± 0.07	0	0
Syô-saiko-tô	(8) 258.4 ± 86.8	1.56 ± 0.19	44.1 ± 116.6	12.5 (352.6)
Tyorei-tô	(8) 157.7 ± 25.4	1.58 ± 0.17	16.5 ± 43.6	12.5 (131.9)
Polyporus	(7) 200.9 ± 21.3	1.63 ± 0.04	5.0 ± 12.1	14.3
Hoelen	(6) 287.3 ± 107.8	1.82 ± 0.11	1.2 ± 2.6	16.7
Bupleuri Radix	(8) 198.8 ± 75.6	1.28 ± 0.21	613.2 ± 803.6	62.5 (1769.0, 1062.8, .977.4)
Angelica Radix	(13) 302.2 ± 100.8	1.40 ± 0.15	350.7 ± 361.9	76.0 (1737.4, 976.6, 171.6, 117.3)
Cnidii Rhizoma	(8) 267.3 ± 109.2	1.46 ± 0.20	425.6 ± 594.6	50.0 (431.1, 788.7, 1445.9, 215.4)
Cinnamomum Cortex	(9) 194.2 ± 63.8	1.14 ± 0.23	803.7 ± 1510.7	44.4 (4490.1, 284.7, 2479.4)
PSK	(8) 186.1 ± 57.8	1.35 ± 0.20	62.7 ± 127.4	25.0 (384.1, 117.2)

a = TNF activity was assessed from the DF (dilution factor which revealed 50% L cell cytotoxicity, individually.⁸⁾

b = Values are mean ± SD.

TNF活性値が高値を示す傾向にあった。肝重量も桂枝、柴胡、PSK投与群以外は軽度の増加傾向を示した。またTNF活性値の高いものほど延命効果も良好な傾向にあった。

考 察

近年和漢薬の研究分野に近代科学的方法が導入され、2000年余の歴史を持つ種々の漢方方剤などに対して徐々に客観的裏付けがされるようになった。また和漢薬の癌免疫に対する効果も研究されるようになっていく。和漢薬および和漢薬より得られた成分が生体の免疫系に作用し、¹⁻⁴⁾制癌効果を発揮することがいくつか報告されている。古くから臨床的に広く用いられている漢方方剤である小柴胡湯および猪苓湯について検討した結果によると、⁹⁻¹⁰⁾これらの方剤は細網内皮系およびマクロファージを活性化してEhrlich腹水癌の増殖を抑制するとされている。小柴胡湯構成生薬中の柴胡にはサイコサポニンが含まれ、これはACTHやコルチコステロンの分泌増強作用、抗炎症効果などがあると報告されている。また免疫応答に対するサイコサポニンの作用も報告され、¹¹⁾免疫系に対する作用が示唆されている。猪苓および茯苓はサルノコシカケ科に属する植物に由来し、猪苓湯の中に含まれている生薬である。これらより抽出された¹²⁻¹⁴⁾glucanに抗腫瘍効果があることが報告されている。同じサルノコシカケ科のかわらけ菌糸体より得られた多糖体であるPSK (Krestin) は *in vivo*, *in vitro*の実験で制癌効果を示すとされ、抗悪性腫瘍剤として市販されている。このため我々の実験でも抗腫瘍効果を有する生薬由来の多糖体としてPSKを用いて比較した。

当帰、川芎および桂枝は漢方方剤の構成生薬として常用されている生薬である。当帰より抽出された多糖体は免疫系に作用し、細網内皮系活性化作用などを有することが報告されている。¹⁵⁾川芎についても抗腫瘍効果が検討され、補体感受性を増強することによってtumor sensitizing活性を有することが報告されている。¹⁶⁾桂枝の抗腫瘍効果に関する報告は見あたらないが、桂枝湯がマイトジェンに対するリンパ球の応答に影響を与え、¹⁷⁾桂枝が抗補体作用によって抗アレルギー的に作用するという報告がある。¹⁸⁾

腫瘍壊死因子 (TNF) はOldらによって、腫瘍壊死を誘導する物質として初めて報告されたが、それ以来強力な抗腫瘍活性を有する物質として注目されている。^{19,20)}TNFはマクロファージから産生され、インターフェロン等とは異なり種を越えて抗腫瘍活

性を発揮し、⁷⁾腫瘍細胞に直接に作用するとともに宿主の免疫機構を刺激して間接的に抗腫瘍作用を示す特徴を持っている。TNFの産生は前に述べたように第一次 (B.C.G, Propionibacteriumなど) と第二次 (LPSなど) 刺激によって産生される物質で、第一次刺激によって一般に細網内皮系の活性化が起こり、²¹⁾著明な脾腫大が認められる。今回の実験においても和漢薬投与後、ばらつきはあったが肝、脾の重量の増加が認められた。また組織学的にもLPS投与後、肝および脾臓に種々の程度にマクロファージの増加、腫大、空胞化、一部壊死所見が認められた。血清GOT, GPTその他リソゾーム系酵素もLPS投与後上昇を認めたが組織学的所見をも含め詳細は追って報告する予定である。これらの所見からも各薬剤のマクロファージ活性化能が推定された。漢方方剤、生薬及びその抽出成分には細網内皮系の活性化を引き起こす作用を有するものも少なくないとされており、我々の今回の実験でも第一次刺激剤としてこれらを用いてTNF産生を検討した。その結果、桂枝、当帰、川芎、柴胡を第一次刺激剤として用いると比較的高いTNF産生が見られ、漢方方剤として使用されている小柴胡湯および猪苓湯にもわずかながらそのような作用が認められた。これらを第一次刺激剤としてマクロファージ等を活性化するとTNF産生を介する抗腫瘍効果が期待される。Ehrlich腹水癌を用いた延命試験ではTNFの誘導活性が高いほど延命効果、腫瘍の増殖抑制効果が強い傾向を認めた。我々の実験における和漢薬のTNF誘導能は第一次刺激剤として見たものであるが、TNF産生能は生体内のマクロファージ等の活性化による抗腫瘍効果を判定するうえである程度目安になるものと考えられる。しかしながらTNF活性と抗腫瘍効果との関連についてはさらに今後検討すべきである。また表1からも明らかに漢方方剤および生薬投与によるTNF誘導能は第一次刺激剤として細菌製剤を用いた場合に比較して、非常に個体差とばらつきが大きい。飲料水混合による自由投与のため個体の摂取量の差も考えられたので、ゾンデを用いる投与方法も試みたがストレスなどによる条件の悪化などがあるためかばらつきはさらに大きくなった。個体差は漢方方剤、生薬投与の際、一つの大きな特徴と考えられた。なお抗悪性腫瘍剤として使用されてきているPSKは比較的良好な延命効果、腫瘍抑制効果をみたにもかかわらず、TNF誘導活性は非常に低い値を示していた。今後さらに種々の漢方方剤、生薬およびそれらの抽出成分などについてEhrlichのほか種々の腫瘍に対する効果お

よび *in vivo*, *in vitro* における TNF 産生能を検討し, TNF 産生活性と抗腫瘍効果の関連性について研究をすすめていく予定である。

文 献

- 1) 小島保彦, 渋谷信之, 水之江公英, 大塚敬節, 熊沢義雄: 漢方薬のインターフェロン誘起能とマイトジェン活性について. *Proc. Symp. WAKAN-YAKU* **13**, 101-103, 1980
- 2) 千原呉郎: 癌に対する宿主抵抗性の増強と免疫賦活物質. *Proc. Symp. WAKAN-YAKU* **16**, 44-50, 1983
- 3) Kumazawa, Y., Mizunoe, K. and Otsuka, Y.: Immunostimulating polysaccharide separated from hot water extract of *Angelica acutiloba* Kitagawa (Yamato Toki). *Immunol.* **47**, 75-83, 1982
- 4) 進藤美由記, 丁 宗鉄, 山田陽城, 清原寛章, 大塚恭男: 和漢薬の抗補体活性の解析. *Proc. Symp. WAKAN-YAKU* **16**, 76-80, 1983
- 5) Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N. and Williamson, B.: An endotoxin induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72**, 3666-3670, 1975
- 6) Haranaka, K. and Satomi, N.: Cytotoxic activity of tumor necrosis factor (TNF) on the human cancer cells *in vitro*. *Jpn. J. Exp. Med* **51**, 191-194, 1981
- 7) Haranaka, K., Satomi, N. and Sakurai, A.: Antitumor activity of murine tumor necrosis factor (TNF) against transplanted murine tumors and heterotransplanted human tumors in nude mice. *Int. J. Cancer* **34**, 263-267, 1984
- 8) Haranaka, K., Satomi, N. and Sakurai, A.: Differences in tumor necrosis factor producibility among rodents. *Br. J. Cancer* **50**, 471-478, 1984
- 9) 伊藤 均, 志村圭志郎: 漢方方剤の抗腫瘍効果と細胞内皮系活性に及ぼす影響. *漢方医学* **8**, 14-17, 1984
- 10) 北村瑞穂, 森沢成司, 溝口靖紘, 山本祐夫: 小柴胡湯の抗腫瘍作用について. 第1回和漢医薬学会要旨集 P. 200, 1984
- 11) 甲野裕之, 太原充子, 小田島肅夫, 山口宣夫: 免疫応答に対するサイコサポニンの作用. 第1回和漢医薬学会要旨集 P. 144, 1984
- 12) Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., Arai, Y. and Fukuoka, F.: Antitumor polysaccharide derived chemically from natural glucan (Pachyman). *Nature* **225**, 943-944, 1970
- 13) Miyazaki, T., Oikawa, N., Yadamae, T., Yamada, H. and Yamada, Y.: Structural examination of antitumor, water-soluble glucans from *Grifola umbellata* by use of four types of glucanase. *Carbohydr. Res.* **65**, 235-243, 1978
- 14) Miyazaki, T., Oikawa, N., Yadamae, T., Yamada, H. and Yamada, Y.: Relationship between the chemical structure and antitumor activity of glucans prepared from *Grifola umbellata*. *Carbohydr. Res.* **69**, 165-170, 1979
- 15) 熊沢義雄, 渡辺陽子, 福本 亮, 大塚恭男, 西村千昭, 水之江公英: 当帰成分中の多糖体 (A I P) による免疫担当細胞の賦活化. *Proc. Symp. WAKAN-YAKU* **16**, 30-34, 1983
- 16) 岡田秀親: 川芎抽出液に認められる Tumor Sensitizing 活性について. *漢方医学* **8**, 15-19, 1984
- 17) 中野 護, 井上恭一, 佐々木博, 寺沢捷年: 桂枝湯の T cell subsets, mitogen 活性におよぼす効果について. 和漢医薬学会誌 **1**, 94-95, 1984
- 18) 永井博式, 市川昌和, 渡辺茂勝, 江田昭英: 和漢薬の抗アレルギー作用—桂皮水性エキスの実験的腎炎治療についての試み—. *Proc. Symp. WAKAN-YAKU* **11**, 51-55, 1978
- 19) Männel, D.N., Moore, R.N. and Mergenhagen, S. E.: Macrophage as a source of tumoricidal activity (Tumor necrotizing factor). *Infect. Immun.* **30**, 523-530, 1980
- 20) Satomi, N., Haranaka, K. and Kunii, O.: Research on the production site of tumor necrosis factor (TNF). *Jpn. J. Exp. Med.* **51**, 317-322, 1981