

小柴胡湯の抗腫瘍作用について (第2報)

柴田 悠喜,*^{a)} 大橋 仁満,^{a)} 藤井喜一郎,^{a)} 溝口 靖紘,^{b)} 森沢 成司^{c)}^{a)}浜松医科大学医学部附属病院薬剤部, ^{b)}大阪市立大学医学部第三内科学教室, ^{c)}大阪市立大学医学部第一生化学教室

Effects of Syô-saiko-tô on antitumor activities

Yuhki SHIBATA, Hitomitsu OHASI, Kiichiro FUJII, Yasuhiro MIZOGUCHI and Seiji MORISAWA

^{a)}Pharmacy of Hamamatsu University School of Medicine Hospital^{b)}The Third Department of Internal Medicine, Osaka City University Medical School^{c)}The First Department of Biochemistry, Osaka City University Medical School

(Received October 31, 1986. Accepted December 15, 1986.)

Abstract

In our previous study, we reported that Syô-saiko-tô (SST; Xiao-Chai-Hu-Tang) directly activated peritoneal exudate macrophages in some experiments, and that the activated macrophages exhibited a potent antitumor activity. In the present study, the antitumor effects of SST were examined using Ehrlich carcinoma (EC), Sarcoma 180 and MH-134 in mice. As the basic research on the action mechanism of SST, the antitumor activity of peritoneal exudate cells (PEC) which were induced by SST was measured.

As a result, the antitumor effects of SST were clearly observed in all three kinds of tumors, but SST-induced PEC had no antitumor activity. The mice were thereupon inoculated intraperitoneally with MMC-treated EC, and we measured the antitumor activity of PEC on EC. This time, a marked activity was observed. The above suggested that the antitumor activity of SST was given by PEC which were activated by some factor and SST in mice. This factor was requisite for the activation of PEC. Also, the antitumor activity was detected in the culture supernatant of the activated PEC and EC mixture. These results suggested that SST might suppress tumor cell growth through the activation of PEC and production of cytotoxic factors from the activated PEC.

Key words Syô-saiko-tô, peritoneal exudate cells, Ehrlich carcinoma, Sarcoma 180, MH-134

Abbreviations EC, Ehrlich carcinoma; MMC, mitomycin C; PEC, peritoneal exudate cells; S-180, Sarcoma 180; SPM, *Sargassum* polysaccharide Mie; SST, Syô-saiko-tô (Xiao-Chai-Hu-Tang), 小柴胡湯; TGC, thioglycollate medium

緒 言

前回の報告において, *in vitro* の実験系で, 小柴胡湯が腹腔浸出マクロファージを直接的に活性化す

ること, その活性化マクロファージは腫瘍細胞障害性を有することを示した¹⁾。今回は, *in vivo* の実験系において小柴胡湯の抗腫瘍効果を検討した。また, 作用機序解明の第一歩としてマウスに小柴胡湯エキスを投与し, 腹腔浸出細胞 (PEC) を採取し

*〒431-31 浜松市半田町 3600

て、その抗腫瘍活性を測定することによって、小柴胡湯の抗腫瘍活性がPECに起因するものであるか否かを検討し、若干の知見を得たので報告する。

材料と方法

(1) **実験材料**：実験動物は静岡県実験動物農業協同組合より購入した5週齢のddY系およびC3H/He系雄マウスを使用した。腫瘍はddYマウスに継代維持しているEhrlich腹水癌細胞(EC)とSarcoma 180細胞(S-180)およびC3H/Heマウスに継代しているMH-134腹水肝癌細胞を用いた。小柴胡湯エキスは津村順天堂より供与されたエキス原末を用い、滅菌蒸留水に溶かして使用した。

(2) **in vivoでの抗腫瘍実験**：マウスに小柴胡湯エキス(以後SST)50, 100, 250, 500 mg/kgを5日間連日i.p.投与し、controlとしては生理食塩水を投与した。投与終了5日後に、腫瘍細胞を 1×10^5 cells/0.2 ml/mouseとなるように調整し、マウス腹腔内に移植した。効果判定は生存日数を観察することによって行った。

(3) **PECの抗腫瘍活性**：マウスにSST 100, 250, 500 mg/kgを5日間連日i.p.投与し、controlとしては最終投与日にチオグリコール酸培地(TGC; thioglycollate medium DIFCO) 2 ml/mouseをi.p.投与した。投与終了5日後にPECを採取し、遠心洗浄後 2×10^6 cells/mlに調整した。一方継代移植7日後のマウス腹腔内よりECおよびS-180を採取し、 2×10^6 cells/mlに調整した。各々の細胞浮遊液を0.5 mlずつ培養びんに分注し、37°C 5% CO₂存在下で24時間培養して³H-チミジン(TRK61; 27 Ci/mmol)によるパルスラベル法(1 μCi/ml 2時間パルス)で抗腫瘍活性を測定した。

(4) **生体内でECを作用させたPECの抗腫瘍活性**：(3)と同様の方法でマウスにSSTおよびTGCを投与した。5日後に25 μg/mlのマイトマイシンC(MMC; 協和発酵社製)で30分間処理して不活化したEC 1×10^5 cells/mouseをそれらのマウスにi.p.投与した。その3日後PECを採取し、(3)と同様の方法で抗腫瘍活性を測定した。また同時に、別の試験管に同じ培養液を準備し、そのPEC:EC混液を24時間培養した後、遠心分離して培養上清を得た。この上清を別に調整したEC細胞液と0.5 mlずつ混合し、さらに24時間培養して、上清中に含まれる可溶性因子の抗腫瘍活性を測定した。

結 果

1. in vivoでの抗腫瘍効果

SSTの単独前投与によりFig.1に示すように抗腫瘍効果が認められた。ECではcontrolの平均生存日数は 21.0 ± 0.94 (100%)であり50, 100, 250, 500 mg/kg投与群ではそれぞれ 21.4 ± 0.71 (102%), 24.1 ± 3.50 (115%), 25.9 ± 4.14 (123%), 34.4 ± 6.29 (164%)であった。S-180投与群ではcontrolの平均生存日数は 19.8 ± 0.76 であり、以下同様に表すと 19.8 ± 1.04 (100%), 25.1 ± 3.65 (127%), 25.3 ± 4.98 (128%), 24.9 ± 3.35 (126%)となった。MH-134ではcontrolの平均生存日数は 21.0 ± 0.62 であり、以下 25.6 ± 1.73 (122%), 22.6 ± 1.04 (107%), 22.5 ± 2.51 (107%), 38.1 ± 5.37 (134%)であった。以上の結果より、SSTは腫瘍によってその効力が増減はあるものの、少なくともi.p.投与によればある程度の抗腫瘍効果を発現することが示唆された。

2. PECの抗腫瘍活性について

SSTをマウスにi.p.投与し、in vivoにおいて抗腫瘍効果を発現するときと同様の条件で処理したマウスからPECを採取して、腫瘍細胞とcell-to-cell contactさせた。その結果をTGCによって遊出したPECを腫瘍細胞に作用させた場合の³H-チミジンの腫瘍細胞内取込みを100%とした時の比率で表すと、ECに対してはSST 100 mg/kg投与群で111%, 250 mg/kgでは128%, 500 mg/kgでは157%とin vivoの結果とほぼ相反して、TGCによって遊出したPECの方が強い抑制を示した。S-180に対してもほぼ同様の傾向で、100 mg/kgで97%, 250 mg/kgで83%, 500 mg/kgで138%という結果であり、それらのPECは抗腫瘍活性を示さなかった(Table I)。

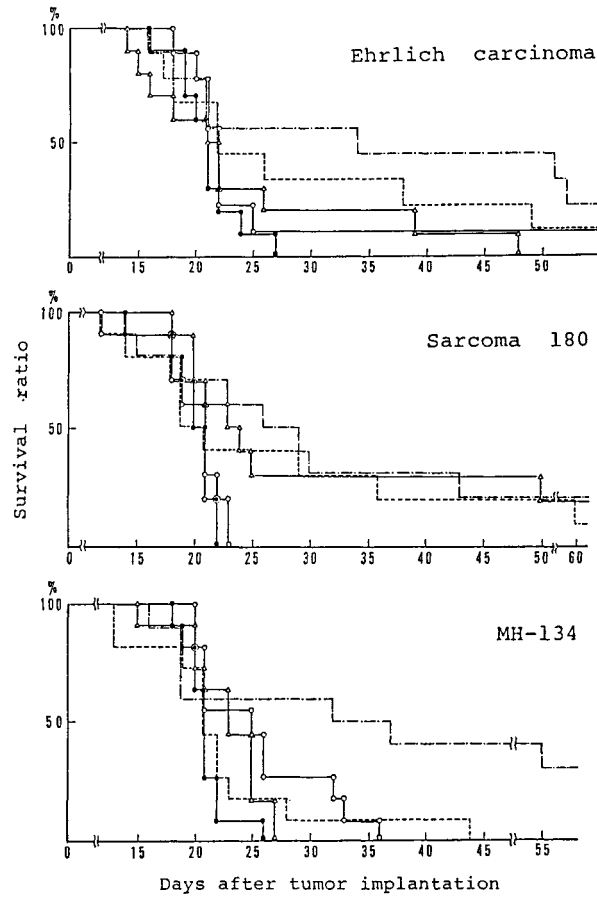


Fig. 1 Antitumor effects of Syō-saiko-tō (SST) on Ehrlich carcinoma, Sarcoma 180 and MH-134 in mice.

Mice were given i.p. each dose of SST on 5-9 days before the implantation. Each mouse was inoculated i.p. with 1×10^5 tumor cells. Ehrlich carcinoma and Sarcoma 180 implanted in ddY mice, and MH-134 implanted in C3H/He mice. ●-●-● : control, ○-○-○ : 50 mg/kg, △-△-△ : 100 mg/kg, : 250mg/kg, -.-.- : 500 mg/kg.

Table I Antitumor activity of Syō-saiko-tō (SST) induced peritoneal exudate cells on tumor cells.

Pretreatment	³ H-thymidine incorporation (cpm) ^{a)}	
	Ehrlich carcinoma	Sarcoma 180
TGC 2 ml/mouse ^{b)}	138501 ± 16033.80 ^{d)} (100.00 ± 11.58)	136031 ± 6406.11 (100.00 ± 4.71)
SST 100 mg/kg ^{c)}	154325 ± 14762.90 (111.42 ± 9.57)	131762 ± 13255.10 (96.86 ± 10.06)
SST 250 mg/kg	176839 ± 10275.40 (127.68 ± 5.81)	113516 ± 12639.40 (83.45 ± 11.13)
SST 500 mg/kg	216857 ± 13840.10 (156.57 ± 6.38)	188162 ± 10524.70 (138.32 ± 5.59)

a) Incubation mixtures were pulsed with 1 μCi/ml ³H-thymidine for 24 to 26 hr at the end of incubation.

b) Control mice were given i.p. 2 ml of TGC on 5 days before the experiment.

c) Mice were given i.p. each dose of SST on 5-9 days before the experiment.

d) Mean ± S.E. (n=8).

Table II Antitumor activity of sensitized^{a)} peritoneal exudate cells induced by Syō-saiko-tō (SST) on Ehrlich carcinoma cells.

Pretreatment	³ H-thymidine incorporation (cpm) ^{b)}	
	cell to cell	supernatant
TGC 2 ml/mouse ^{c)}	35289±1062.26 ^{e)} (100.00±3.01)	60896±3103.54 (100.00±5.10)
SST 100 mg/kg ^{d)}	14728±1527.27 (41.74±10.37)	30010±2590.87 (49.28±8.63)
SST 250 mg/kg	20518±1724.07 (58.14±8.40)	24261±2476.22 (39.84±10.21)
SST 500 mg/kg	16050±1734.16 (45.48±10.80)	34772±2962.05 (57.10±8.52)

a) Mice were inoculated i.p. with MMC treated Ehrlich carcinoma cells 3 days before the experiment.

b) Incubation mixtures were pulsed with 1 μ Ci/ml ³H-thymidine for 24 to 26 hr at the end of incubation.

c) Control mice were given i.p. 2 ml of TGC on 8 days before the experiment.

d) Mice were given i.p. each dose of SST on 8–12 days before the experiment.

e) Mean±S.E. (n=8).

3. 生体内で EC を作用させた PEC の抗腫瘍活性

実験 2 の結果、マウスから PEC を採取して腫瘍細胞に作用させても抗腫瘍活性は認められなかった。そこで、さらに *in vivo* に近い条件を再現させるため、SST 投与終了 5 日目に MMC によって不活化した EC をマウス腹腔内に移植して抗原認識させ、その後 PEC を採取して *in vitro* で抗腫瘍活性を測定した。EC 作用後、PEC を採取するまでの日数については予備実験の結果 3 日後とした。その結果を前述と同様に表現すると SST 100 mg/kg 投与群では 42%、250 mg/kg で 58%、500 mg/kg で 45% であった (Table II)。この結果から、マウスの体内で PEC に EC 細胞を作用させ、抗原認識をさせたところ明らかに抗腫瘍活性が発現したものと考えられる。

また PEC の産生する可溶性因子の抗腫瘍活性についても検討した。すなわち前項と同じ条件でマウスを処理し、遊出した PEC を EC 細胞に *in vitro* で作用させ、24 時間共存させた後遠心して培養上清のみを分離した。この上清液を別に調製した EC 細胞液と混合してさらに 24 時間培養し、上清液中の可溶性因子の抗腫瘍活性を測定した。その結果 cell-to-cell contact の場合とほぼ同程度の腫瘍細胞の DNA 合成抑制作用が認められた (Table II)。

考 察

小柴胡湯の抗腫瘍効果についてはいくつかの報告がある。小田島は Meth-A 移植癌に対し 5-Fu 20

mg/kg i.p. と小柴胡湯 100 mg/kg p.o. の併用によって 5-Fu 単独群に比して 156% の延命効果が得られたと報告している²⁾。伊藤らは EC に対し移植後から 10 日間の i.p. 投与により 300 mg/kg 投与群において 140.8% の延命効果が得られたと報告している³⁾。また原中らは、皮下移植した EC に対して SST 1600 mg/kg を 2 週間前から p.o. 投与させることにより 58.3% の完全退縮を認めている⁴⁾。今回の我々の実験からも、小柴胡湯にはある程度の抗腫瘍効果があるものと考えられる結果であった。前回の報告で触れた腫瘍による抗腫瘍活性の差は今回もほぼ同様に認められ、EC > S-180 > MH-134 という傾向であった。この点については、さらに多種の腫瘍についてスクリーニングをする必要があると考える。

一方、*in vitro* において SST をマクロファージに作用させたところ直接的な活性化が行われること、それによって活性化されたマクロファージは抗腫瘍活性を有することを先に報告している¹⁾。そこで SST の前投与によって浸出した PEC は抗腫瘍活性を有しているものと予想して実験 2 を行ったが、*in vivo* の抗腫瘍効果と相反して腫瘍の DNA 合成を全く抑制しなかった。これと同一の実験系において、OK-432 あるいはウミトラノオ抽出多糖 (SPM; *Sargassum polysaccharide* Mie) は著明な抑制作用を示すことから⁵⁻⁷⁾ SST が抗腫瘍作用を発理するにはさらに別の因子が関与していることが考えられた。

そこで、*in vivo* の条件をより忠実に再現するために、MMC によって不活化した EC をマウス生体内で PEC に作用させ、抗原認識をさせた後に *in*

in vitro の系に移し、抗腫瘍活性を測定した。その結果、明らかな腫瘍抑制作用が認められた。このことから、SST 投与によって遊出する PEC は生体内において腫瘍を認識すれば抗腫瘍活性を有すること、また OK-432 や SPM によって遊出する PEC と異なり、生体内で腫瘍を認識しなければ全く抗腫瘍活性を発現しないことが明らかとなった。これは、SST の抗腫瘍作用は生体内の何らかの因子、例えば補体系などの存在が必要であると考えられる。

その点について川喜多らは、小柴胡湯がリンパ球とマクロファージを誘導すること、リンパ球の誘導が他の刺激剤と異なって特異的であること、また補体系との関わりや抗体産生増強作用などについて報告している⁸⁾。その報告の中で、補体 C5 欠損マウスではリンパ球の誘導が認められない点に着目し、補体系と深く関わっていると言及している。前回の報告では、マクロファージの *in vitro* における挙動にのみ着目して抗腫瘍活性を測定したのであるが、今回は PEC という細胞複合体としての活性を測定している。そのために一見矛盾するような結果が得られたのだと考えられる。現在のところ、小柴胡湯の抗腫瘍効果発現における補体系との関係を証明するには到っていないが、今後重視すべき点であると考えられる。

さらに、その抗腫瘍活性の作用本態が何であるのかを検討するために、培養液上清を腫瘍細胞に作用させ抗腫瘍活性を測定した。その結果 cell-to-cell contact の場合とほぼ同程度の抗腫瘍活性が認められた。このことより、SST によって活性化された PEC は腫瘍障害性の可溶性因子を放出していることが示唆された。

結 論

小柴胡湯はマウス実験腫瘍に対し抗腫瘍効果を示

した。その作用機序は、SST によって賦活された PEC がマウス生体内で腫瘍を認識し、何らかの生体内因子の関与を受けて活性化し、抗腫瘍作用を発現するものと考えられる。その作用発揮のメカニズムの少なくとも一部には、PEC が放出する可溶性の腫瘍障害因子が関与しているものと考えられる。

本研究の一部は昭和60年度文部省科学研究費補助金（奨励研究 B）の援助を受けて行われた。

文 献

- 1) 北村瑞穂, 溝口靖紘, 山本祐夫, 柴田悠喜, 森沢成司: 小柴胡湯の抗腫瘍作用について, 和漢医薬学会誌 **2**, 32-38, 1985
- 2) 小田島爾夫: 和漢薬の併用による制癌剤の制癌効果増強の試み, 漢方医学 **7**, 15-20, 1983
- 3) 伊藤 均, 志村圭志郎: 漢方方剤の抗腫瘍性に関する研究 (第1報), 癌と化学療法 **12**, 2145-2148, 1985
- 4) Haranaka, K., Satomi, N., Sakurai, A., Haranaka, R., Okada, N. and Kobayashi, N.: Antitumor activities and tumor necrosis factor producibility of traditional Chinese medicines and crude drugs. *Cancer Immunol. Immunother.* **20**, 1-5, 1985
- 5) 柴田悠喜, 姉崎 健, 名倉弘明, 藤井喜一郎: ウミトラノオ抽出成分の抗腫瘍作用について (第4報), 第41回日本癌学会総会記事, p. 251, 1982
- 6) 藤井喜一郎, 伊藤 均, 志村圭志郎, 堀口吉重: 海藻多糖類の抗腫瘍作用について: 褐藻類ウミトラノオの産生する多糖類の抗腫瘍作用, 三重医学 **18**, 245-250, 1975
- 7) 藤井喜一郎, 本間郁代, 姉崎 健: 海藻成分の抗腫瘍作用, 病院薬学 **5**, 5-12, 1979
- 8) 川喜多卓也, 山田 亮, 野本亀久雄, 熊沢義雄: 医療用漢方製剤の免疫薬理作用, 日本薬学会第106年会講演要旨集, pp. 253-254, 1986