

十全大補湯, 桂皮の抗腫瘍作用に関する研究

原中瑠璃子,*^{a)} 小曾戸 洋,^{a)} 平馬 直樹,^{a)} 花輪 寿彦,^{a)} 長谷川律子,^{a)} 玄 松子,^{a)}
中川 滋木,^{a)} 原中 勝征,^{b)} 里見 信子,^{b)} 桜井 明子,^{b)} 安川 憲,^{c)} 滝戸 道夫^{c)}

^{a)} 日本大学医学部生化学教室, ^{b)} 東京大学医科学研究所内科学教室

^{c)} 日本大学理工学部薬学科生薬学教室

Antitumor activities of Zyūzen-taiho-tô and Cinnamomi Cortex

Ruriko HARANAKA,^{a)} Hiroshi KOSOTO,^{a)} Naoki HIRAMA,^{a)} Toshihiko HANAWA,^{a)} Ritsuko HASEGAWA,^{a)}
Song Ja HYUN,^{a)} Shigeki NAKAGAWA,^{a)} Katsuyuki HARANAKA,^{b)} Nobuko SATOMI,^{b)}
Akiko SAKURAI,^{b)} Ken YASUKAWA^{c)} and Michio TAKIDO^{c)}

^{a)} Department of Biochemistry, Nihon University School of Medicine

^{b)} Department of Internal Medicine, Institute of Medical Science, Tokyo University

^{c)} Department of Pharmacy, College of Science and Technology, Nihon University

(Received January 12, 1987. Accepted May 6, 1987.)

Abstract

The antitumor activities and capacity for tumor necrosis factor (TNF) production of traditional Chinese herbal preparations and crude drugs have been investigated in our laboratories, and some kinds of drugs revealed to have antitumor activities and tumor necrosis factor producibility. In the present study further investigation was undertaken using Zyūzen-taiho-tô (Shi-Quan-Da-Bu-Tang) and Cinnamomi Cortex extracts which had been observed to have antitumor activities and tumor necrosis factor producibility. These drugs were given to the mice mixing in the drinking water before and after the intradermal transplantation of Ehrlich tumor cells to DDY mice or Meth A sarcoma cells to Balb/c mice, and the development of the transplanted tumor cells and survival time were compared with those in the animals administered OK-432 or MMC. These two drugs showed good inhibition against transplanted Ehrlich and Meth A tumors, while the combination of OK-432 and MMC revealed an increased antitumor activities against these transplanted tumors. Relatively high levels of TNF activities were noted in the groups given Cinnamomi Cortex and low levels were in the groups given Zyūzen-taiho-tô. In the combination with OK-432 increased in the groups given Zyūzen-taiho-tô or Cinnamomi Cortex, while no TNF activities were detected in the combination with MMC. In the microscopic findings, hyperplasia and hypertrophy of Kupffer's cells and lymphocytosis in liver were observed in the groups which showed good inhibition of the development of the transplanted tumors and relatively good TNF production. In the two-step carcinogenesis experiment treated with DMBA plus TPA using ICR mice, Cinnamomi Cortex tended to be effective in inhibition of papilloma formation, whereas these inhibitory effects seemed to be dose dependent. Delayed type hypersensitivity to DNFB was suppressed 10 weeks after DMBA initiation, but this suppression was improved by the administration of these two drugs. These results suggests that Zyūzen-taiho-tô and Cinnamomi Cortex have a possible immunopotentiative effect in the view of their inhibitory effects on the several experimental carcinoma. The antitumor activities of these drugs are probably partly due to stimulation of RES, including macrophages, and the induction of a host-mediated antitumor agents like TNF.

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

Journal of Medical and Pharmaceutical Society for
WAKAN-YAKU 4, 49-58, 1987

Key words Zyūzen-taiho-tō, Cinnamomi Cortex, TNF activity, Ehrlich carcinoma, Meth A sarcoma, OK-432

Abbreviations Cinnamomi Cortex, 桂皮; DMBA, dimethylbenzanthracene; DTH, delayed type hypersensitivity; LPS, lipopolysaccharide; TNF, tumor necrosis factor; TPA, 12-*o*-tetradecanoylphorbol-B-acetate; Zyūzen-taiho-tō (Shi-Quan-Da-Bu-Tang), 十全大補湯

緒 言

東洋医学で用いられている漢方方剤およびその構成生薬の中に免疫増強作用や抗腫瘍効果を示すものがあることが臨床的研究または、動物実験によって報告されている。

BRM (biological response modifier) に免疫増強剤として植物由来の polysaccharide のいくつかに加わっている事実も和漢薬に抗腫瘍効果を示すものが存在する可能性を示唆するものである。

著者らも^{1,2)} マウスを用いて種々の漢方方剤およびその構成生薬の抗腫瘍効果と TNF (tumor necrosis factor, 腫瘍壊死因子) 産生能について検討し、十全大補湯、小柴胡湯、猪苓湯などの漢方方剤および柴胡、桂皮、当帰、川芎に Ehrlich 移植腫瘍の抑制効果を認めた。また、これらの和漢薬を1次刺激剤として用いた場合に誘導される TNF 活性は柴胡、桂皮、当帰、川芎で比較的高い値を示し、十全大補湯、小柴胡湯、猪苓湯で1次刺激した場合においても低値ではあるが、TNF 活性が認められた。以上の結果からこれらの和漢薬はその複雑な総合効果を通して抗腫瘍効果を示すことが推定され、そのメカニズムの1つとして macrophage の活性化と一部には TNF 産生を介する抗腫瘍効果が考えられた。

今回は臨床的に繁用されその抗腫瘍効果が臨床的にも実験的にも認められている十全大補湯³⁻⁸⁾ およびその構成生薬の1つである桂皮について Ehrlich および Meth A 移植癌、化学的誘発癌に対する抗腫瘍効果と TNF 産生能を関連づけて検討した。また、OK-432 および MMC との併用効果についても検討し、若干の結果を得たので報告する。

材料と方法

(1) 実験動物および薬剤投与方法: 各々8週齢の DDY, Balb/c, ICR 雌性マウスを静岡実験動物社から購入した。使用和漢薬は十全大補湯エキス原末、桂皮エキス原末であり、いずれも津村順天堂よりス

ブレードドライ水抽出エキスとして提供された。これらの和漢薬はいずれも飲料水に混合し、自由経口投与により十全大補湯 (Zyūzen-taiho-tō) では 1600, 800, または 400 mg/kg/day, 桂皮 (Cinnamomi Cortex, ベトナム産) では 560, 280 または 140 mg/kg/day 連日投与した。和漢薬などは Ehrlich および Meth A 腫瘍移植2週間前より投与を開始し、移植後も継続投与した。

(2) 移植癌に対する抗腫瘍効果: Ehrlich 腹水癌細胞 (1×10^6 /mouse) は DDY 系マウス腹壁皮下に、Meth A 肉腫細胞 (5×10^5 /mouse) は Balb/c 系マウス腹壁皮下に移植し、腫瘍重量の増加を経時的に週2回2週間測定した。腫瘍重量は、

$$W = \frac{\pi}{6} \times \left(\frac{A+B}{2} \right)^2 \times \frac{\pi}{6} \times \left(\frac{nA+nB}{2} \right)^2$$

の算定式で求めた。この式において、Wは腫瘍重量を、Aは腫瘍の横径を、Bは腫瘍の縦径を、 nA は腫瘍内壊死部の横径を、 nB は腫瘍内壊死部の縦径をそれぞれ表わす。

(3) OK-432 および MMC の投与: 和漢薬投与 DDY マウスに OK-432 (1 KE/mouse, 中外製薬製)、MMC (3 mg/kg, 協和醗酵社製) をそれぞれ腫瘍細胞腹壁皮下に移植後週2回 (移植と同時に、4日目、7日目、10日目) 筋注し、和漢薬との併用効果を検討した。さらに Ehrlich 腹水癌細胞 (1×10^6) を腹腔内に移植する2週間前から和漢薬の投与を開始し、継続投与を行った際の生存日数を算定した。

(4) 化学的発癌^{9,10)} と DTH 反応: ICR 系マウス背部にイニシエーターとして dimethyl benzanthracene (DMBA, Sigma) 50 μ g (100 μ l acetone 液に溶解) を塗布し、1週間後に 12-*o*-tetradecanoylphorbol-B-acetate (TPA, Chemicals for Cancer Research Inc.) 2.5 μ g (100 μ l acetone に溶解) を週2回12週間塗布して発生する papilloma 数を調べた。また、DMBA および TPA 処理10週目に Fig. 4 に示すように DTH 反応¹⁰⁾を行った。すなわち、ICR 系マウス背部 (DMBA および TPA 塗布部) に dinitrofluorobenzene (DNFB, Tokyo Kasei Chemical Co.) の 0.25% acetone

溶液 (w/v) 100 μ l を塗布し、さらに4日後同量の DNFB 溶液を右後足 (先端より足関節部位まで) に塗布し24時間後に右後足の厚さを測定した。DMBA, TPA 処理を行っていない同系マウスについても同様 DNFB 処理を行って、control 群とした。DTH 反応は control 群と実験群の右後足の厚さの比を算出して求めた。

(5) **TNF 産生能の測定**: DDY マウスを用いて行った。すなわち、1次刺激剤として和漢薬 (十全大補湯 1600 mg/kg または桂皮 560 mg/kg) を2週間投与した後採血し、TNF 活性を測定した。また、1次刺激剤を与えてから、2次刺激剤として 20 μ g の LPS (*Escherichia coli* 0111:B4W 由来, Difco Lab., Mich., U.S.A.) を静注し2時間後に採血して血清中の TNF 活性¹¹⁾ を測定した。さらに採血後直ちに肝および脾重量を測定した。

このほか比較の意味で1次刺激剤として、*P. acnes* (2 mg/mouse) を第2次刺激剤投与9日前に、BCG (2 mg/mouse) は14日前に、レンチナン (250 μ g/mouse) は9日前に腹腔内に投与し、2次刺激剤として LPS (10 μ g), PPD (50 μ g) または OK-432 (1 KE) を静脈投与した。ついで2時間後に採血を行い血清中の TNF 活性を測定した。

担癌動物における TNF 産生能の測定は十全大補湯 (1600 mg/day), 桂皮 (560 mg/day) を2週間投与後 Ehrlich 腹水癌細胞 (1×10^6 /mouse) および Meth A 細胞 (5×10^5 /mouse) を腹腔皮内に移植し、その後もひきつづき和漢薬を投与して2週間目に LPS 20 μ g を静注し、2時間後の血清中の TNF 活性を測定した。TNF 活性の測定には L 細胞を用いる *in vitro* の方法¹¹⁾ を用いた。すなわち、希釈血清検体を 2×10^5 /ml の L Cell に加えて 37°C 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% の細胞障害を示す希釈倍数 (DF) を求めて TNF 活性として表現するとともに各群について TNF 陽性群の百分率を求めた。

(6) **血清酵素測定**: 和漢薬を2週間投与した後、マウス血清を分離して LPS 静注前後の lactate dehydrogenase (lactate dehydrogenase CII-test Wako, 乳酸基質・ジアホラーゼ法), acid phosphatase (acid phosphatase B-test Wako, *p*-ニトロフェニルリン酸法) および β -glucuronidase¹²⁾ の活性値を測定した。

(7) **組織学的検討**: 和漢薬投与2週目に Ehrlich 腹水癌細胞を腹壁皮下に移植し、2週後に肝および脾臓を抽出して組織切片を作り HE 染色を行って

組織学的に検討した。この場合、細網内皮系細胞の変化を中心に検討し、LPS 投与前後における肝組織の focal necrosis, Kupffer's cells hypertrophy および hyperplasia lymphocytosis についてその程度により病理学的に (−) absence, (±) minimal, (+) slight, (++) moderate, (+++) marked の5段階に分類した。図における各群 (A~I) はそれぞれ1群について5検体の標本を作って検討した。

結 果

Fig. 1 は DDY マウス腹壁皮内に移植した Ehr-

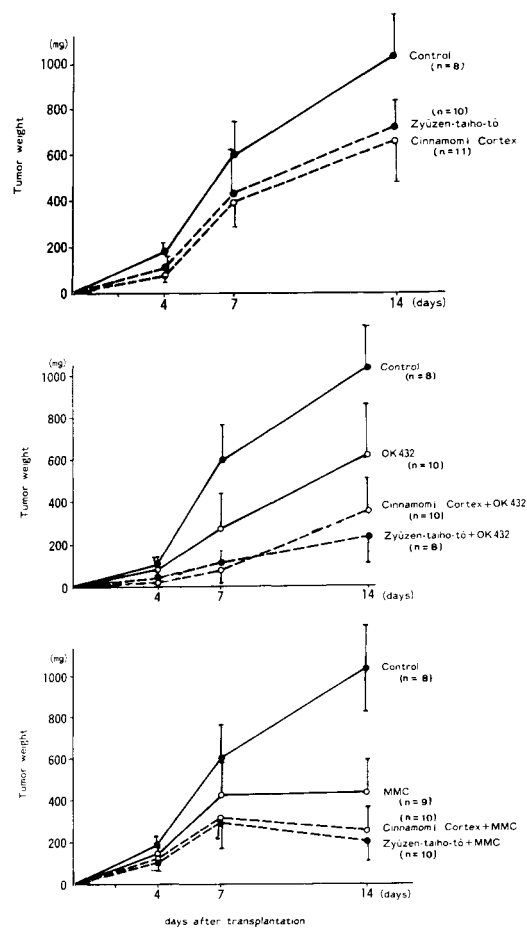


Fig. 1 Changes in transplanted Ehrlich tumor weights.

Zyūzen-taiho-tō (1600 mg/kg) and Cinnamonomi Cortex (560 mg/kg) were given to the mice orally 2 weeks before and after the transplantation. Tumor weights in milligrams were estimated from the linear dimensions. OK-432 (1 KE) and MMC (3 mg/kg) were injected intramuscularly twice a week.

lich 腹水癌の重量の経時的变化を示したものである。コントロール群に比較して和漢薬単独投与群、OK-432 または MMC 単独投与群、和漢薬と OK-

432 または MMC 併用群のいずれにおいても有意の腫瘍発育抑制が認められた。特に MMC または OK-432 と和漢薬を併用した群ではそれぞれの単独投与群に比較して腫瘍発育が強く抑制される傾向を示した。

Fig. 2 は Balb/c マウス 腹壁皮内に移植した Meth A 肉腫の重量変化を示したものである。コントロール群に比較し、和漢薬単独投与群、OK-432, MMC 単独投与群、和漢薬と OK-432, MMC 併用群にはいずれも有意の腫瘍発育の抑制が認められた。また OK-432 単独投与群に比較し、和漢薬と OK-432 併用群では腫瘍の発育は強く抑制される傾向を示した。

Ehrlich 腹水癌を腹腔内に移植したマウスの生存日数は Table I に示すように和漢薬投与群および OK-432 併用群で延長傾向にあったが統計学的には有意差はなかった。また MMC 併用群では延命効果は認められずコントロールよりむしろ短くなる傾向を示した。

Fig. 3 は、和漢薬のほか種々の 1 次刺激剤および 2 次刺激剤をくみあわせて用いた場合に誘導される TNF 活性値を示したものである。1 次刺激剤として *P. acenes*, 2 次刺激剤として LPS, PPD, または fibrinogen を用いた場合に高い活性値が得られた。また BCG を 1 次刺激剤とし、LPS を 2 次刺激剤とした場合も高い活性の TNF が誘導された。レンチナンと LPS の組み合わせによっても比較的高い TNF 活性が認められ、十全大補湯または桂皮と LPS の組み合わせによっても 10~100 倍 (dilution

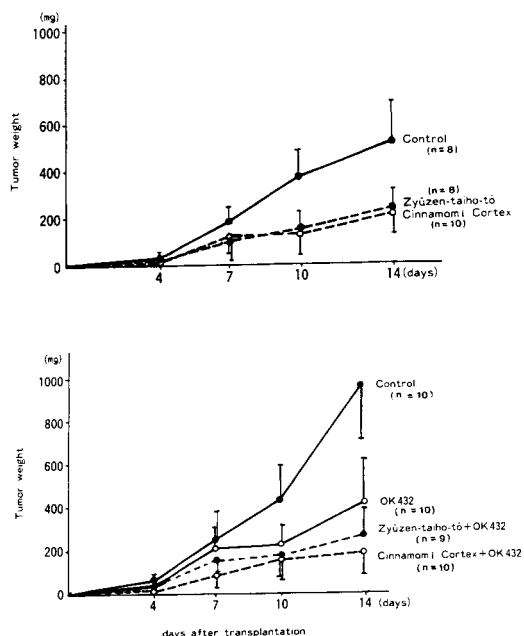


Fig. 2 Changes in transplanted Meth A sarcoma weights.

Zyūzen-taiho-tō (1600 mg/kg) and Cinnamomi Cortex (560 mg/kg) were given to the mice orally 2 weeks before and after the transplantation. Tumor weights in milligrams were estimated from the linear dimensions. OK-432 (1 KE) was injected intramuscularly twice a week.

Table I Survival days of DDY mice with Ehrlich carcinoma.

	Groups	days	(n)	Dose (mg)	Route
* 1	A Control	20.5±5.8	(11)		
* 2	B OK-432	22.1±6.9	(9)	1 KE×4	(i.m.)
	C MMC	19.4±8.1	(11)	3/kg×4	(i.m.)
	D Syō-saiko-tō	26.8±9.0	(8)	1600/kg/day	(p.o.)
	E Zyūzen-taiho-tō	21.8±7.1	(11)	1600/kg/day	(p.o.)
	F Cinnamomi Cortex	24.5±9.8	(9)	560/kg/day	(p.o.)
* 3	G Zyūzen-taiho-tō+OK-432	23.7±6.2	(8)	1600/kg/day, 1 KE×1	(p.o., i.m.)
	H Cinnamomi Cortex+OK-432	24.2±8.0	(8)	560/kg/day, 1 KE×4	(p.o., i.m.)
	I Zyūzen-taiho-tō+MMC	17.8±6.0	(11)	1600/kg/day, 3/kg×4	(p.o., i.m.)
	J Cinnamomi Cortex+MMC	20.3±5.1	(8)	560/kg/day, 3/kg×4	(p.o., i.m.)

Ehrlich tumor cells (1×10^6 /mouse) were transplanted intraperitoneally in the group B-J.

* 1 Group A was not treated with Ehrlich tumor cells.

* 2 OK-432 and MMC were injected twice a week for 2 weeks after transplantation.

* 3 These drugs were administered 2 weeks before and after transplantation and continued administration.

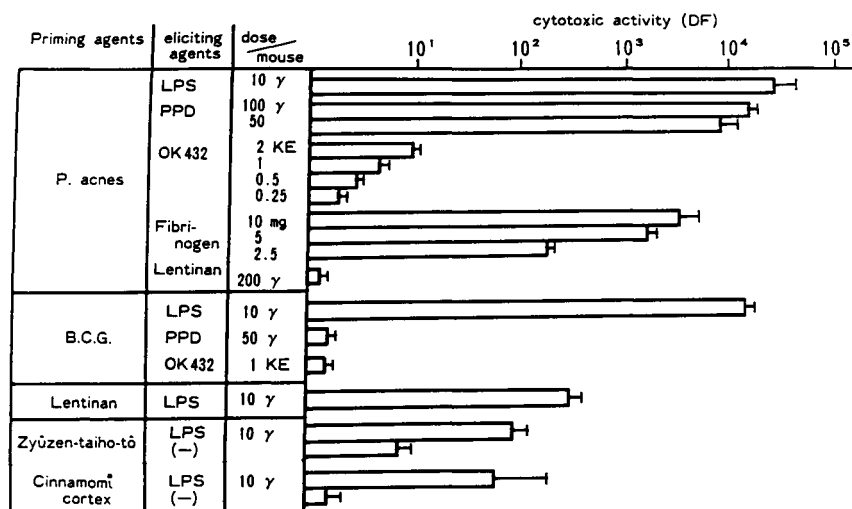


Fig. 3 TNF producibility with various combinations of priming agents and eliciting agents.

TNF activity was assessed from the DF (dilution factor) which showed 50% L cell cytotoxicity. Zyūzen-taiho-tō (1600 mg/kg) and Cinnamomi Cortex (560 mg/kg) had been given to the mice 2 weeks before intravenous injection of LPS, and blood was collected 2 hours after the injection for TNF assay.

Table II TNF producibility and spleen, liver weights in the DDY mice bearing Ehrlich carcinoma.

Group	(n)	Dose (mg)	Route	Sp. wt. (mg)	Liv. wt. (g)	TNF activity* ⁵ (DF)	% TNF* ⁶ positive
*1 A Control	(5)			136.0±11.88	1.50±0.30	0	0
*2 B Control	(9)			140.0±10.6	1.45±0.21	6.4±19.3	11
*3 C OK-432	(10)	1KE×4	(i.m.)	287.9±50.2	1.91±0.41	10.1±15.6	40
D Zyūzen-taiho-tō	(10)	1600/kg×28	(p.o.)	148.0±46.5	1.79±0.37	14.5±19.1	70
E Cinnamomi Cortex	(10)	560/kg×28	(p.o.)	255.9±48.6	1.84±0.24	65.4±38.1	100
*4 F Zyūzen-taiho-tō+OK-432	(9)	{ 1600/kg×28 1KE×4	{ (p.o.) (i.m.)	225.5±30.4	1.71±0.28	29.4±18.8	89
G Cinnamomi Cortex+OK-432	(10)	{ 560/kg×28 1KE×4	{ (p.o.) (i.m.)	325.7±40.1	1.87±0.38	57.0±31.9	100

*1 Group A was not treated with Ehrlich cells.

*2 Group B—G were transplanted Ehrlich tumor cells (1×10^6) intradermally.

*3 OK-432 was injected twice a week for 2 weeks after transplantation.

*4 These drugs were administered 2 weeks before and after transplantation.

*5 The TNF activity was assessed 2 weeks after the Ehrlich tumor transplantation using 20 μ g of LPS as an eliciting agent. The DF (dilution factor) revealed 50% L cell cytotoxicity.

*6 Percentage of individuals who showed positive TNF activity in each group.

factor) 程度の TNF 活性が血清中に観察された。十全大補湯または桂皮投与群においては 2 次刺激剤を用いなくても低値ながら TNF 活性が血清中に認められた。

Table II は, Ehrlich 担癌マウスにおける和漢薬投与した場合, または和漢薬と OK-432 を投与した場合における肝, 脾重量及び TNF 活性を示したものである。TNF 活性はいずれも 2 次刺激剤として

LPS 10 μ g を投与した場合の値である。和漢薬投与群および OK-432 投与群では全般的に肝, 脾の重量の増加および TNF 活性が認められた。脾臓の重量および TNF 活性値, また TNF 活性の陽性率は桂皮投与群では十全大補湯投与群に比較して高い値を示した。桂皮投与群では TNF 活性値にばらつきはあるが, すべてのマウスに TNF 活性が認められたのが特徴的である。OK-432 単独投与によっても

Table III Microscopic findings of liver in tumor (Ehrlich) bearing mice.

	Focal necrosis		Kupffer's cells hypertrophy and hyperplasia		Lymphocytosis	
	LPS (-)	LPS (+)	LPS (-)	LPS (+)	LPS (-)	LPS (+)
A Control	(-)-(+) (5)	(+) (5)	(+) (5)	(+) (5)	(-) (5)	(+)-(++) (5)
B OK-432	(+) (5)	(+) (5)	(+) (5)	(++) (5)	(+) (5)	(+) (5)
C MMC	(-)-(+) (5)	(+) (5)	(-) (5)	(+) (5)	(-) (5)	(-) (5)
D Zyūzen-taiho-tō	(-)-(+) (5)	(+)-(++) (5)	(+)-(++) (5)	(+)-(++) (5)	(+) (5)	(+) (5)
E Cinnamomi Cortex	(+) (5)	(+)-(++) (5)	(+)-(++) (5)	(+)-(++) (5)	(+) (5)	(++) (5)
F Zyūzen-taiho-tō+OK-432	(+) (5)	(+) (5)	(++) (5)	(++) (5)	(+) (5)	(++) (5)
G Cinnamomi Cortex+OK-432	(+) (5)	(+) (5)	(++) (5)	(++) (5)	(+) (5)	(++) (5)
H Zyūzen-taiho-tō+MMC	(-) (5)	(+) (5)	(+) (5)	(+) (5)	(+) (5)	(+) (5)
I Cinnamomi Cortex+MMC	(-) (5)	(+) (5)	(+) (5)	(+) (5)	(+) (5)	(+) (5)

Remarkable changes were not found in spleen except MMC administered group. In MMC groups (C, H, I), leucocytosis and increased phagocytosis of debris by macrophages were found. (-), absence; (±), minimal; (+), slight; (++), moderate; (+++), marked.

Table IV Activities of enzymes in serum.

		Lactate dehydrogenase (Wroblewski unit)		Acid phosphatase (Bessey-Lowry unit)		β -glucuronidase (μ moles/ml/hr)	
			(n)		(n)		(n)
Control	(LPS -)	785 $\pm$ 58	(5)	1.42 $\pm$ 0.11	(5)	0.21 $\pm$ 0.18	(5)
Control	(LPS +)	1231 $\pm$ 133	(10)	9.14 $\pm$ 1.63	(11)	1.26 $\pm$ 0.34	(5)
Zyūzen-taiho-to	(LPS -)	746 $\pm$ 65	(5)	1.50 $\pm$ 0.28	(5)	0.18 $\pm$ 0.11	(5)
Zyūzen-taiho-tō	(LPS +)	1236 $\pm$ 72	(11)	11.12 $\pm$ 1.36	(11)	1.68 $\pm$ 0.21 ^{B*}	(6)
Cinnamomi Cortex	(LPS -)	748 $\pm$ 68	(5)	1.50 $\pm$ 0.21	(5)	0.23 $\pm$ 0.14	(5)
Cinnamomi Cortex	(LPS +)	1574 $\pm$ 238 ^{B***}	(10)	9.13 $\pm$ 1.92	(10)	1.37 $\pm$ 0.21	(6)

20 μ g of LPS was injected intravenously after the administration of drugs for 2 weeks, and blood was collected 2 hours later. Mean $\pm$ SD, * p <0.05, *** p <0.001.

肝、脾の著明な増加が認められたが、TNF 活性は低値であった。しかしながら桂皮および十全大補湯投与群では OK-432 併用により脾重量の増加および十全大補湯投与群では TNF 活性の増加が認められた。TNF 活性値は担癌マウスでは非担癌マウスに比較して非常に低値であるが、和漢薬を投与しないにもかかわらず10%のマウスに認められた。本実験系で TNF 活性と腫瘍重量間には移植後14日目について負の相関が認められた ($r=0.743$, $p<0.05$)。

表には示していないが MMC と和漢薬併用群および Balb/c マウスに Meth A を移植した群ではいずれも腫瘍の抑制効果が認められたにもかかわらず TNF 活性はほとんど認められなかった。また MMC 投与群は他の群に比較し全身状態は悪い傾向にあった。

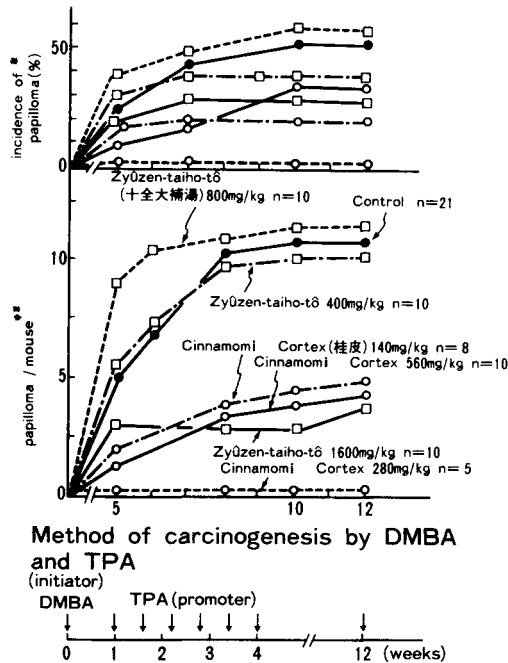
Table III は、Ehrlich 移植 2 週間後の肝組織所見で、和漢薬および OK-432, MMC 投与量および投与法は前述した通りである。Kupffer 細胞の hyper-

trophy および hyperplasia, lymphocytosis は担癌 control 群 (Ehrlich 移植 2 週間後、薬剤非投与群) においても軽度には認められたが、十全大補湯および桂皮投与群、OK-432 投与群では中等度に認められた。特に、OK-432 と和漢薬併用群ではこれらの所見は強い傾向にあったが、MMC 投与群では control 群とはほぼ同様の所見であった。

Table IV は、十全大補湯および桂皮投与 2 週間目の血清中の LDH、ライソゾーム酵素である acid phosphatase および β -glucuronidase 活性を示したものである。対照群および和漢薬投与群に LPS を投与すると、軽度ではあるが増加傾向にあった。桂皮投与群では LPS 投与により LDH が有意に増加し、十全大補湯を投与して LPS を投与した群では β -glucuronidase 活性の上昇が認められた。

Fig. 4 は、DMBA および TPA によって腫瘍を誘発した場合における十全大補湯または桂皮の抑制効果を示したものである。Papilloma の発生は和漢

薬の投与量によってもかなりの差が認められ、十全大補湯 1600 mg/kg、桂皮 280 mg/kg で著しく抑制



され、桂皮 500 mg/kg、460 mg/kg がそれに次ぎ十全大補湯 400 mg/day の効果は認められず 800 mg/day ではむしろ腫瘍発生の促進傾向が認められた。また、papilloma 発生率も Fig. 2 に示したようにかなり個体差とばらつきが認められ最も高い群でも 60% に発生が認められたにすぎなかった。

Fig. 5 は、DMBA と TPA を投与した 10 週目における DTH 反応の結果である。未処置正常 control 群を 100% とすると、DMBA、TPA 処理群では、18.5% に減少していた。これに比較し十全大補湯および桂皮投与群は 23.5~51.5% と減少率は少なかった。

Fig. 4 Inhibitory effects on two-step carcinogenesis.

Drugs were administered orally to ICR mice just after DMBA treatment and continued for 12 weeks.

*Percentage of individuals with papilloma in each group.

**Average number of drug induced papillomas per mouse.

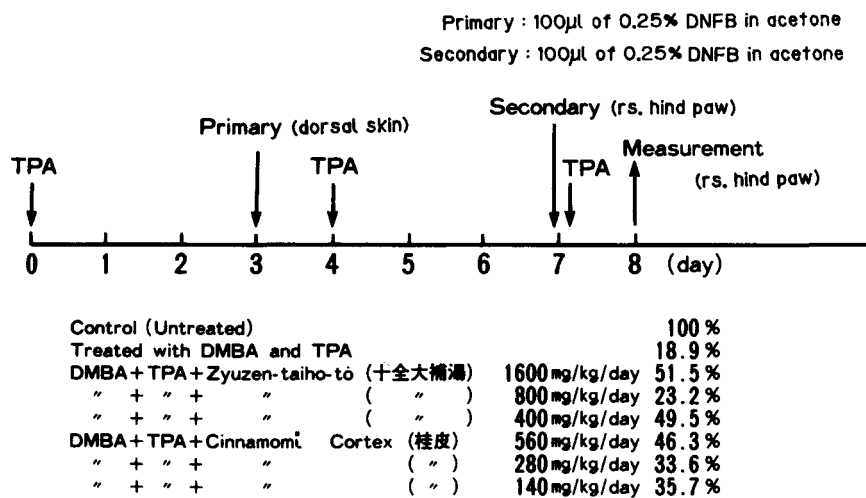


Fig. 5 DNFB-delayed type hypersensitivity reaction 10 weeks after the treatment of the two-step carcinogenesis using DMBA and TPA.

0.1 ml of 0.25% DNFB solution in acetone was applied into the dorsal skin and after 4 days, delayed type hypersensitivity was elicited by painting 0.1 ml of 0.25% DNFB solution in acetone on the right hind paw. After 24 hrs, the resulting edema with the elicitation in the hind paw was measured, and these values were expressed by percentage as compared with the untreated control group. Drugs were administered orally to ICR mice just after the DNFB treatment and continued.

考 察

漢方方剤のなかには古くから悪性腫瘍患者の治療に用いられたものがあり、その抗腫瘍効果を認めた報告も散見される。しかし、その詳細は不明であり客観的なパラメーターで抗腫瘍効果を検討した報告は少ない。

動物実験によって十全大補湯、小柴胡湯、補中益気湯、人參湯などに抗腫瘍効果が見られており、^{3-5,7,13)} また漢方方剤を構成する種々の生薬および民間伝承薬の中にも抗腫瘍効果を有するとされているものは少なくない。また、その中から現在臨床的に使用されその効果が認められているものも少なくない。すでに述べたように、著者らも一部の漢方方剤ならびにそれを構成するいくつかの生薬について抗腫瘍効果を検討したが、今回はその中で比較的強い抗腫瘍効果を示した方剤である十全大補湯およびその構成生薬の中でも比較的強い抗腫瘍効果を示し、しかも一般食品としても広く使用されている桂皮について検討した。

十全大補湯は実験的腹水胞瘍や固形腫瘍の一部に効果を有し、MMC, ADR, CY などの抗癌剤と併用することにより抗腫瘍効果は増強するとされている。臨床的にも種々の抗癌剤や放射線療法と併用し、それらの副作用を防止して抗腫瘍効果を増強すると報告されている。^{6,8)}

十全大補湯の構成生薬中、著者らの実験結果^{1,2)} から桂皮、川芎、当帰に抗腫瘍効果が認められた。この中で比較的著明な抗腫瘍作用を示した桂皮について検討したが、現在のところ桂皮の抗腫瘍効果に関する報告はほとんど見あらず、僅かに桂皮の免疫系に対する作用^{14,15)} が検討されているにすぎない。

著者らの成績から Ehrlich 腹水癌および Meth A 腹壁皮内移植腫瘍の増殖に対して十全大補湯、桂皮は著明な抑制が示された。また両和漢薬と OK-432 (1KE) または MMC (3 mg/kg) を併用したところ、これらの単独投与に比して抗腫瘍効果は増強した。さらに OK-432 投与群に比較して MMC 投与群では全身状態が著しく悪くなる傾向が認められた。しかしながら、Ehrlich 腹水癌腹腔内移植後の生存日数に関しては Table I に示すように OK-432, MMC および和漢薬併用群いずれについても統計学的有意差を認めなかった。この結果は、著者らの Ehrlich 腹水癌細胞皮内移植固形腫瘍における生存日数の成績²⁾ とかなりの差があることが分つ

た。前回の結果²⁾ では Ehrlich 固形腫瘍に対して和漢薬は著明な延命効果が認められた。これに比較し、今回の Ehrlich 腹水癌に対する和漢薬の延命効果が認められなかったことは第一に腹水癌の場合同量の癌細胞を移植したさい癌細胞の増殖が非常にすみやかで全身状態が急激に悪化し生存日数が短く有意差が出なかったものと考えられた。

OK-432 は溶連菌製剤で免疫賦活剤とされており interferon γ , interleukin 1, interleukin 2 誘導能を有し、また macrophage, NK 細胞, cytotoxic T リンパ球などを活性化して抗腫瘍作用を示すことが報告¹⁶⁾ されてきている。しかしながら、著者らの経験によると OK-432 を 2 KE に増量併用した場合、抗腫瘍効果はむしろ減弱傾向を示した。現在にいたるまでいくつかの免疫賦活物質が臨床的に実験的に使用されてきており、それらの多くは投与のタイミング、投与量により効果に差があり、むしろ逆効果を呈することもあるとされている。例えば、レンチナン、BCG など大量投与すればかえって免疫抑制的に働くと考えられており、癌免疫療法における生体内の複雑な反応メカニズムには未知の問題が多い。

DDY マウスにおける TNF 誘導能を調べると、担癌マウスの TNF 活性は和漢薬と OK-432 の併用によって増強される傾向を示し、TNF 活性値と腫瘍抑制効果とは相関することが観察された。TNF は macrophage, 単球が産生する monokine の一種であり種特異性がない。このため、最初は動物で大量生産して精製し、臨床的效果を検討する試みがなされた。最近、ヒト遺伝子組み換え TNF が作成され臨床試験が進められているが、一部には動物実験での副作用が報告されている。これらのことから担癌体内で TNF 誘導 (内因性 TNF) を行うことができれば有用な治療法となり得ると考えられ、現在研究が進められている。内因性 TNF の場合は持続時間が長いために低濃度の TNF が誘導されれば抗腫瘍効果の得られることが予想される。TNF の第 2 次刺激剤として一般的に LPS が使用されているが、内因性 TNF の誘導には強い副作用のため不适当である。しかしながら十全大補湯、桂皮の場合、第 2 次刺激剤なしでも僅かではあるが TNF 活性値が認められる。したがって内因性 TNF 誘導能を有することが充分考えられ、臨床応用への可能性が示唆された。

十全大補湯および桂皮投与担癌 DDY マウスにおける肝の病理所見は Table III に示したように lymphocytosis, Kupffer 細胞の hypertrophy および hyperplasia が中等度に認められた。Table II に示

したように十全大補湯、桂皮投与による肝および脾重量の増加および組織所見から両薬剤の細胞内皮系賦活作用が示唆された。特に Kupffer 細胞などの macrophage 系細胞の増生所見は、macrophage の細胞障害活性、貧食能その他種々の生理活性面から考えると、和漢薬の抗腫瘍効果の少なくとも一部が macrophage への作用を介すると推定される。

Macrophage および単球の貧食や細胞障害機構において種々の酵素が関与しており、なかでも lysosomal enzyme である加水分解酵素はそのほとんどが macrophage 内に存在し、癌細胞障害に重要な役割をはたしていると考えられている。加水分解酵素の代表で主に macrophage に存在していると考えられている acid phosphatase, β -glucuronidase の多くは macrophage から血中に遊離されるとされている。TNF を誘導する刺激を与えると、これらの活性値は、TNF 活性とはほぼ相関し、macrophage の活性化による加水分解酵素の遊離と TNF 産生は密接な関係にあると考えられる¹⁷⁾。したがって、著者らの実験では和漢薬を 1 次刺激剤として TNF 誘導する場合における血清中 acid phosphatase および β -glucuronidase を測定した。また cytosol 酵素である lactate dehydrogenase (LDH) を細胞破壊の程度を知るために測定した。これらの酵素は、和漢薬投与群で Table IV に示したように LPS 投与後軽度の増加を示し、わずかではあるが macrophage など細網内皮系細胞が活性化されていることが推定された。

また、DMBA, TPA による化学的発癌に対し十全大補湯および桂皮は投与量によってかなりの差が認められたものの一定濃度の投与によって papilloma 発生の抑制が認められた。しかしながら、十全大補湯のように量によってはむしろ papilloma 発生を促進するように働く場合もあり、和漢薬の投与のさいの dose response は今後検討すべき重要な問題であると考えられた。

DMBA および TPA による処理を行った皮膚の部位においては DTH 反応の著明な抑制が認められたのに対し、十全大補湯および桂皮投与群では抑制の程度がやや少ない傾向を示した。植物由来の物質が化学的発癌を抑制するとの報告は、例えばレンチナンがメチルコラントレンによる発癌を強く抑制するとされ、著者の滝戸らは生薬からの抽出成分が DMBA, TPA による発癌抑制効果を有することを報告している (45 回日本癌学会総会)。著者らの結果からも十全大補湯、桂皮は何らかの免疫機構を介して化学的発癌を抑制することが推定された。

和漢薬は細網内皮組織活性化能、インターフェロン誘導能、抗体産生能増強等々広く生体の免疫系への関与が報告されてきているがその複雑なメカニズムに関してはほとんど不明の状態である。著者らの実験結果からも和漢薬のいくつかは細網内皮系を刺激し TNF 誘導能を有することがわかったが、和漢薬の抗腫瘍効果はインターフェロン、リンホカインなど他の cytokine を介する作用によるものも当然考えられる。

文 献

- 1) 原中瑠璃子, 岡田奈緒子, 小林茂三郎, 原中勝征, 里見信子, 桜井明子: 和漢薬およびその成分の抗腫瘍効果と TNF 誘導能の検討. 和漢医薬学会誌 **1**, 279-283, 1984
- 2) Haranaka, K., Satomi, N., Sakurai, A., Haranaka, R., Okada, N. and Kobayashi, M.: Antitumor activities and tumor necrosis factor producibility of traditional Chinese medicines and crude drugs. *Cancer Immunol. Immunother.* **20**, 1-5, 1985
- 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 II 報), 漢方方剤の抗腫瘍機作について, 癌と化学療法 **12**, 2149-2154, 1985
- 4) 油田正樹, 竹田茂文, 森田敏美, 伊藤英子, 松下もえ, 細谷英吉, 鎌谷直之, 松多邦雄, 宮本昭正: 制癌剤の補助剤としての漢方薬の研究. 十全大補湯のマイトマイシン C の副作用軽減効果. 和漢医薬学会誌 **1**, 68-69, 1984
- 5) 升野博志, 奥田拓道: 癌毒素-トキシホルモン L に対する十全大補湯の影響. *Proc. Symp. WAKAN-YAKU* **16**, 36-37, 1983
- 6) 三浦二三夫, 齊藤寿一, 中村 潔, 田内克典: 胃癌手術後化学療法に対する十全大補湯の併用投与. 外科診療 **27**, 825-828, 1985
- 7) 伊藤 均: 漢方方剤の抗癌効果. 医薬ジャーナル **21**, 1503-1508, 1985
- 8) 谷口一郎, 岩里桂太郎, 佐藤充弘, 寺脇信二, 友成正路, 安部明雄, 羽田野邦和, 肥田木敏: 子宮頸癌の放射線治療における十全大補湯の臨床効果について. 漢方医学 **8**, 21-23, 1984
- 9) Berenblum, I.: The mechanisms of carcinogenesis. A study of the significance of cocarcinogenic action and related phenomena. *Cancer Research* **1**, 807-814, 1941
- 10) Takeuchi M. Letter to the Editor: Cell-mediated immune response in mice doing the two step carcinogenesis experiment by 7, 12-dimethylbenzanthracene and 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Japan. J. Exp. Med.* **56**, 131-134, 1986
- 11) Haranaka, K., Satomi, N. and Sakurai, A.: Differences in tumor necrosis factor producibility among rodents. *Br. J. Cancer* **50**, 471-478, 1984
- 12) Fishman, W.H.: β -glucuronidase, phenolphthalein- β -D-glucuronide as substrate. In "Methods of enzymatic analysis," Second Edition (Ed. by H. Bergmeyer, U.),

- Academic Press Inc., London, pp. 930-931, 1974
- 13) 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
 - 14) 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, 1985
 - 15) 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
 - 16) Hoshino, T., Uchida, A., Ito, S., Kura, F. and Takahashi, T.: Immunopharmacological aspect of OK-432 in the treatment of malignant diseases with a special reference to an induction of autologous tumor killing activity. In "Host defense mechanisms and immunopotentiators," Proceedings of a workshop held at the 14th International Congress of Chemotherapy, Kyoto, 1985 (Eds. by N. Ishida and G. Klein) University Tokyo Press, Tokyo, pp. 5-13, 1986
 - 17) Sakurai, A., Satomi, N. and Haranaka, K.: Tumor necrosis factor and the lysosomal enzyme of macrophages or macrophage-like cell line. *Cancer Immunol. Immunother.* **20**, 6-10, 1985