

ヒト皮膚線維芽細胞に対する人參養榮湯の影響について

内山 靖彦*, 中嶋 重勝, 加来 秀彦, 吉田 一男, 水川 廣海, 春木 英一

神奈川県総合リハビリテーションセンター・研究部障害医学研究室

Effect of Ninjin-yoei-to on human skin fibroblasts

Yasuhiko UCHIYAMA*, Shigekatsu NAKAJIMA, Hidehiko KAKU,
Kazuo YOSHIDA, Hiromi MIZUKAWA and Eiichi HARUKI*The Kanagawa Rehabilitation Institute**(Received October 31, 1988. Accepted March 3, 1989.)*

Abstract

Effect of Ninjin-yoei-to (Ren-Shen-Yang-Rong-Tang) on human skin fibroblasts was investigated. The cells were incubated for 72 hr with Ninjin-yoei-to. The results obtained showed that there is an increase in cell density with a maximum of 100 ng/ml of Ninjin-yoei-to and also showed increases of fibroblast MDA and SOD levels and LDH, PHI and G6P-DH activities. These results suggest that Ninjin-yoei-to stimulates anaerobic glycolysis.

Key words Ninjin-yoei-to (Ninjin-yōei-tō), human fibroblasts, anaerobic, glycolysis.

Abbreviations Ac-P, acid phosphatase; ATP, adenosine triphosphate; Chol, cholesterol; FCS, fetal calf serum; G6P-DH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; LDH, lactate dehydrogenase; MDA, malondialdehyde; MEM, minimum essential medium; PBS, phosphate buffered saline; PL, phospholipid; PHI, phosphohexose isomerase; SOD, superoxide dismutase; TBA, thiobarbituric acid; TG, triglyceride; TP, total protein; Ninjin-yoei-to (Ren-Shen-Yang-Rong-Tang), 人參養榮湯.

緒 言

漢方薬は、その効果として生体内の糖質、脂質、蛋白質代謝の促進あるいは改善作用を有していることが示唆されている。中でも *Panax ginseng* は不老、長生、体力増強、疲労回復、鎮静作用、精神安定に卓効を示すことが知られており、方剤の重要な一成分として用いられている。他方、従来より多面的に発現してくる老化という現象に関する研究は個体レベルから細胞レベルに到るまで数多く検討され、特に生体内より単離した細胞を用いる実験系¹⁾は長期培養することにより細胞レベルでの老化を *in vitro* に誘導再現させ、その機構解析を検討する方向で進められていることはもとより、細胞機構だけではなく各種のホルモンや薬剤等の細胞老化に対する効果についても検討されている。そこで今回著

者らは漢方方剤の1つである人參養榮湯を用いて、初代培養し得られたヒト皮膚線維芽細胞に対する影響について検討した。

材料と方法

(1) ヒト皮膚線維芽細胞：ヒト皮膚線維芽細胞は手術時に採取した(60才、女性)皮膚片を1 cm² 当たり1~2個になるよう培養デッシュの底面に置いて貼り付け、そこから遊走増殖してくる細胞を分離する方法で得た。Growth mediumは10%のFCS(v/v)を添加した正常二倍体用のEagle's MEMを用い、細胞用 mycoplasma 除去剤(MC-110)も同時に添加した。このmediumに抗生物質としてpenicillin(100 U/ml)・streptomycin(100 µg/ml)を加えた。CO₂ incubatorを用い37℃、95% air 5% CO₂で初代培養し得られた細胞を継代培養法で15

*〒243-01 厚木市七沢1304
1304, Nanasawa, Atsugi-shi 243-01, Japan

継代培養して, control 群, 人參養榮湯群共に同継代のものを使用した。

(2) 漢方方剤: 漢方方剤として人參養榮湯 (ツムラ) を用いた。この人參養榮湯は, 人參, 地黄, 当歸, 白朮, 茯苓, 桂皮, 遠志, 芍薬, 陳皮, 黄耆, 甘草, 五味子の生薬から成る方剤である。この人參養榮湯を medium に溶解し, $0.45 \mu\text{m}$ - Millex HA Milipore filter を通して使用した。

(3) Cell density: Cell density は duplicate で行った。 25 cm^2 の培養フラスコを使用し, medium に 0, 50, 100, 200, 300, 500 ng/ml の人參養榮湯を添加して, 8×10^4 cells と共に CO_2 incubator で培養した。培養条件は 37°C , 95% air 5% CO_2 である。72時間後, 0.025% の trypsin で培養フラスコより細胞を遊離させ, medium を加えて得た細胞浮遊液に trypan blue を用いて生細胞を計測した。

(4) 生化学測定法: 生化学の測定には継代培養で増殖させた細胞を使用した。 175 cm^2 の培養フラスコに 1 検体当たり 9.3×10^5 cells に調整したものを 10 検体作成し, これを 5 検体ずつに分け control 群と人參養榮湯群とした (人參養榮湯は 100 ng/ml を medium に溶解したものを使用)。これらの細胞群は 37°C , 95% air 5% CO_2 で 72 時間培養し, trypsin で細胞を遊離させ medium を加えて細胞浮遊液を得た。この細胞浮遊液に PBS を加え遠心分離, 洗浄を数回行った後, PBS 1 ml を加え, sonicator で破碎 ($3 \times 10 \text{ s}$ bursts) し, 5000 rpm で遠心分離して測定に用いた。細胞膜脂質は, 遠心分離後の

沈澱した細胞膜に PBS 1 ml を加えて測定した。生化学測定は次のキットを使用した。TP (Pierce), glucose (国際試薬), lactate (Boehringer), LDH (国際試薬), PHI (Sigma), ATP (ラボサイエンス), G6P-DH (Boehringer), Ac-P (ダイヤトロン), PL (セロテック), Chol (セロテック), TG (セロテック), SOD (和光純薬)。過酸化脂質 (MDA) は TBA 蛍光法で行った。

結 果

Cell density については Fig. 1 の如く, control $5.27 \pm 0.33 \times 10^5$ cells, 人參養榮湯添加 50 ng/ml $2.20 \pm 0.13 \times 10^5$ cells, 100 ng/ml $7.02 \pm 0.19 \times 10^5$ cells, 200 ng/ml $5.51 \pm 0.39 \times 10^5$ cells, 300 ng/ml $3.90 \pm 0.33 \times 10^5$ cells, 500 ng/ml $2.43 \pm 0.33 \times 10^5$ cells であり, 50, 300, 500 ng/ml の人參養榮湯添加では control に比し, それぞれ 56, 23, 53% と減少を示し, 100 および 200 ng/ml の添加では 39, 9% と増加を示した。

生化学測定値において各種酵素は細胞 $1 \times 10^6 \text{ mm}^3$ の TP 量に換算し, 脂質は細胞 $1 \times 10^6 \text{ mm}^3$ 当りとした。

Glucose は control 群 $0.46 \pm 0.10 \text{ mg/mg}$, 人參養榮湯群 $0.40 \pm 0.11 \text{ mg/mg}$ で, control 群が人參養榮湯群より高値傾向を示したが有意の差はみられなかった。

Lactate は control 群 $1.04 \pm 0.10 \text{ mg/mg}$, 人參養榮湯群 $1.43 \pm 0.44 \text{ mg/mg}$ で, 人參養榮湯群が

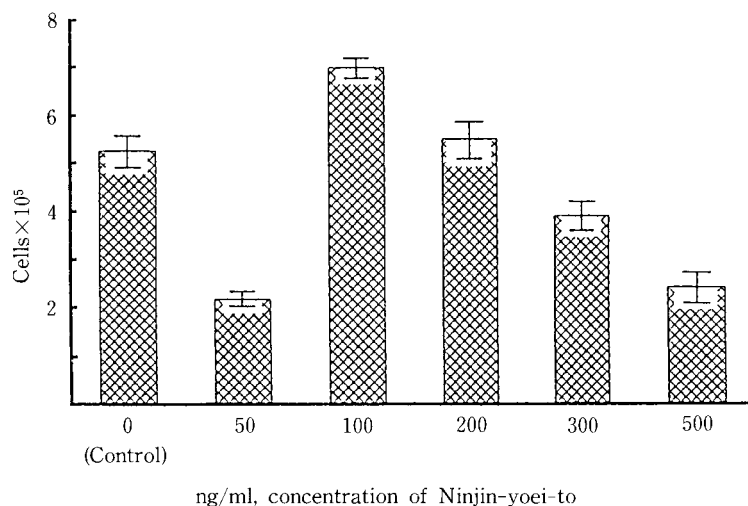


Fig. 1 Effect of Ninjin-yoei-to on cell density of human skin fibroblasts.

8×10^4 cells were inoculated and duplicate dishes were cultured at each addition of Ninjin-yoei-to. The cells were incubated for 72 hr.

control 群に比べ高値傾向を示したが有意の差はみられなかった (Table I)。

Table I Effects of Ninjin-yoei-to on glucose and lactate concentrations of human skin fibroblasts.

	Glucose	Lactate
Control cells	0.46±0.10	1.04±0.10
Ninjin-yoei-to treated cells	0.40±0.11	1.43±0.44

(Milligram per milligram cell protein)

細胞 1×10^6 mm³ 当りの TP は control 群 0.140 ± 0.020 mg/ml, 人參養榮湯群 0.149 ± 0.010 mg/ml で、ほぼ同じ値を示した。

LDH は control 群 8.24 ± 1.56 IU/mg, 人參養榮湯群 13.75 ± 2.12 IU/mg で、人參養榮湯群が control 群に比べ有意に高値を示した ($p < 0.005$)。

PHI は control 群 128.34 ± 22.06 U/mg, 人參養榮湯群 210.16 ± 37.11 U/mg で、人參養榮湯群が control 群に比べ有意に高値を示した ($p < 0.005$)。

ATP は control 群 $3.53 \pm 1.91 \times 10^{-10}$ mol/mg, 人參養榮湯群 $4.23 \pm 1.87 \times 10^{-10}$ mol/mg で、人參養榮湯群が高値を示したが有意の差はみられなかった。

G6P-DH は control 群 63.82 ± 11.72 mU/mg, 人參養榮湯群 136.30 ± 33.01 mU/mg で、人參養榮湯群が control 群に比べ有意に高値を示した ($p < 0.005$)。

Ac-P は control 群 10.13 ± 2.49 KA/mg, 人參養榮湯群 15.89 ± 1.26 KA/mg で、人參養榮湯群が control 群に比べ有意に高値を示した ($p < 0.005$) (Table II)。

細胞膜の脂質は Table III の如く、PL は control 群 16.49 ± 2.43 μg/ml, 人參養榮湯群 17.13 ± 0.62 μg/ml で、人參養榮湯群が control 群に比べ高値を示したが有意の差はみられなかった。

Chol は control 群 9.02 ± 1.87 μg/ml, 人參養榮湯群 9.57 ± 0.20 μg/ml で、人參養榮湯群が control 群に比べ高値を示したが有意の差はみられなかった。

TG は control 群 7.75 ± 2.04 μg/ml, 人參養榮湯群 6.85 ± 0.33 μg/ml で、人參養榮湯群が control 群に比べ低値を示したが有意の差はみられなかった。

細胞膜における MDA および SOD は Table IV の如く、MDA は control 群 0.13 ± 0.03 μmol/mg, 人參養榮湯群 0.17 ± 0.07 μmol/mg で、人參養榮湯群が control 群に比べ高値を示したが有意の差は

Table II Effect of Ninjin-yoei-to on various enzymes, ATP and protein in human skin fibroblasts.

	Control cells	Ninjin-yoei-to treated cells
LDH (IU/mg cell protein)	8.24±1.56	13.75±2.12*
PHI (U/mg cell protein)	128.34±22.06	210.16±37.11*
ATP (10^{-10} mol/mg cell protein)	3.53±1.91	4.23±1.87
G6P-DH (mU/mg cell protein)	63.82±11.72	136.30±33.01*
Ac-P (KA/mg cell protein)	10.13±2.49	15.89±1.26*
TP (mg/ 10^6 cells)	0.140±0.020	0.149±0.010

(* : $p < 0.005$)

Table III Effect of Ninjin-yoei-to on lipid concentrations in human skin fibroblasts.

	PL	Chol	TG
Control cell membranes	16.49±2.43	9.02±1.87	7.75±2.04
Ninjin-yoei-to treated cell membranes	17.13±0.62	9.57±0.20	6.85±0.33

(Microgram per 10^6 cells)

みられなかった。

SOD は control 群 16.66 ± 7.11 U/mg, 人參養榮湯群 21.19 ± 12.59 U/mg で, 人參養榮湯群が control 群に比べ高値を示したが有意の差はみられなかった。

Table IV Effect of Ninjin-yoei-to on lipid peroxide (MDA values) and SOD of human skin fibroblasts.

	MDA	SOD
Control cell membranes	0.13 ± 0.03	16.66 ± 7.11
Ninjin-yoei-to treated cell membranes	0.17 ± 0.07	21.19 ± 12.59

(MDA : Micromoles per 10^6 cells)

(SOD : Unit per milligram cell protein)

考 察

従来より比較的容易に培養できる線維芽細胞等を用いて、細胞老化の研究が行われ、*Panax ginseng* 抽出物や saponin の細胞老化に対する影響についても検討されている。

Yuan らは²⁾ primary human amnion cell による corticosteroid と *Panax ginseng* の影響について検討し *Panax ginseng* が amnion cell の衰退を遅らす効果があると報告している。Fulder は³⁾ male fetal lung fibroblast に対して hydrocortisone と *Panax ginseng* の抽出物の薬効について比較検討し、*Panax ginseng* のもつ配糖体が hydrocortisone よりも老化を遅らすと報告している。また Shia ら⁴⁾ は human fibroblast に対する ginseng saponin の影響について検討し、PHI, LDH 活性の有意の上昇を認め、嫌氣的解糖系の促進作用を明らかにしている。著者らはこれらの報告を踏まえて漢方方剤である人參養榮湯のヒト皮膚線維芽細胞に対する影響について検討した。通常、細胞老化の特徴として増殖速度の低下、増殖する細胞の割合の減少、細胞密度の低下、細胞容積の増大があげられているが^{1,5)} これらのうち著者らは cell density について測定を行った。人參養榮湯濃度における cell density maximum は、*Panax ginseng* で行なった Fulder の 0.75 mg/ml や、Shia らの 0.2 mg/ml の使用量よりもはるかに少ない 100 ng/ml であった。この結果は ginseng の抽出法の違い、ヒト同一線維芽細胞で肺と皮膚では性質が異なること⁶⁾ 人參養榮湯が各種の生薬との方剤でありその作用が相乗効果をもたらしているためと考えられる。ヒト線維芽細胞は

血管新生に関与しており、増殖刺激状態にある線維芽細胞だけが血管内皮細胞成長因子を分泌しているとの報告もある⁷⁾。これらの点を鑑みて、人參養榮湯は ginseng saponin 単独よりはるかに有効性が強いことが示唆された。

線維芽細胞の TP は、*in vitro* における細胞老化で増加する parameter とされているが⁸⁾ 本実験では control 群と比較して変化がなかった。人參養榮湯で cell density が高まったにもかかわらず細胞が老化には至っていないことが推察された。PHI および LDH 活性は control 群に比べ人參養榮湯群が有意に高値を示した。この結果は糖質代謝における嫌氣的解糖系の促進作用と推測した Shia らの報告⁴⁾ と同様であった。また LDH は *in vitro* の細胞老化で減少する parameter とされており⁸⁾、この酵素が高い活性を示したことにより人參養榮湯が細胞に対し抗老化作用を有することが推察された。

Ac-P は control 群に比べ人參養榮湯群が有意に高値を示した。従来、Ac-P は *in vitro* の細胞老化で増加する parameter とされている。しかし、ここで用いられている WI-38 細胞はヒト女性胎児肺線維芽細胞であり、先に述べた肺と皮膚による細胞性質の違いが考えられ、また Ac-P が lysosome 酵素であることから人參養榮湯が細胞へ吸収される刺激により、ゴルジ装置の機能亢進が起っているものと推察された。G6P-DH は、control 群に比べ人參養榮湯群で有意に高値を示した。この結果は、人參養榮湯群の cell density が高くなっている点を考え、G6P-DH の増加⁹⁾ が pentose phosphate cycle の活性増加となり、DNA の成分である五炭糖の供給増加をもたらしていることが推察された。

以上、ヒト皮膚線維芽細胞に対する人參養榮湯の影響について検討を行った。今後、本方剤がヒト皮膚線維芽細胞に特異的に働いているかについて、更に検討する予定である。

結 論

ヒト皮膚線維芽細胞における人參養榮湯の影響について検討を行った。Cell density について人參養榮湯の添加量は、従来の報告より遙かに少量であった。また *in vitro* での細胞老化で減少する parameter である LDH が増加し、老化を通じて変化しない parameter である PL, Chol, MDA, SOD は増加傾向を示した。嫌氣的解糖系の亢進が示唆される LDH, PHI は有意に高値を示した。G6P-DH は有意に増加し、ATP, PL, Chol は高値傾向を示した。

これらの点より人参養栄湯は嫌気の解糖系を促進させ、*in vitro* の細胞において抗老化作用を有しているものと推察された。

文 献

- 1) 三井洋司：1細胞培養を用いた老化実験系，トキシコロジーフォーラム 8(6)，675-683，1985.
- 2) Yuan, G.C. and Shang, R.S.：Testing of compounds for capacity to prolong postmitotic life-span of cultured human amnion cells. Effect of steroids and *Panax ginseng*. *J. Geront.* **24**, 82-85, 1969.
- 3) Fulder, S.J.：The growth of cultured human fibroblasts treated with hydrocortison and extracts of the medical plant *panax ginseng*. *Exp. Geront.* **12**, 125-131, 1977.
- 4) Shia, G.T.W., Sheila, A. and Bittles, A.H.：The effect of ginseng saponins on the growth and metabolism of human diploid fibroblasts. *Gerontology* **28**, 121-124, 1982.
- 5) 松岡耕二，三井洋司：老化細胞表面膜における増殖制御因子. 組織培養研究 4(2)，128-134，1985.
- 6) Schneider, E.L., Mitsui, Y., AW, K.S. and Shorr, S.S.：Tissue-specific differences in cultured human diploid fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **108**, 1-6, 1977.
- 7) 菅 幹雄，佐藤 威：線維芽細胞由来血管内皮細胞成長因子. 組織培養 11(12)，501-506，1985.
- 8) 近藤 晃：ヒト正常二倍体線維芽細胞の老化. 組織培養 10(9)，320-329，1984.
- 9) Shindo, Y., Akiyama, J., Matsumoto, K., Takase, Y. and Matsumoto, T.：Low glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cultured skin fibroblasts from Werner's syndrome. *The Journal of Dermatology* **13**, 396-398, 1986.