

婦人科癌における小柴胡湯の抗腫瘍効果 及び作用機序に関する検討

安井 敏之*, 苛原 稔, 鎌田 正晴, 青野 敏博

徳島大学医学部産科婦人科

Inhibitory effect of Sho-saiko-to on the growth of gynecological cancer cell lines by autocrine mechanism of transforming growth factor- β

Toshiyuki YASUI*, Minoru IRAHARA, Masaharu KAMADA, Toshihiro AONO

Department of Obstetrics and Gynecology, The University of Tokushima, School of Medicine

(Received May 9, 1994. Accepted August 24, 1994.)

Abstract

The effects of Sho-saiko-to and its ingredient drugs on the growth of HeLa cell (human uterine cervical cancer) and HOC cell line (human ovarian cancer) were examined *in vitro*. HeLa and HOC cells were cultured each in DM160 containing Sho-saiko-to or its ingredient drugs, and the survival rate was measured by MTT assay. The survival rates of HeLa cell and HOC cell reduced to 45.9 % and 48.8 %, respectively. Scutellariae radix and Glycyrrhizae radix inhibited significantly ($p < 0.01$) the growth of both HeLa and HOC cells. To study the mechanism of inhibition on the cell growth, we examined the concentration of transforming growth factor-beta (TGF- β) of the cultured medium after incubation of the cells with Sho-saiko-to's crude drugs. The activity of TGF- β in the cultured medium of cell lines was increased in a dose-dependent manner when incubated with Scutellariae radix. Thus, it was suggested that Sho-saiko-to inhibits the growth of gynecological cancer cell lines by inducing TGF- β , which is known as one of the autocrine factors that can inhibit cell growth.

Key words Sho-saiko-to, gynecological cancer, TGF- β , MTT assay.

Abbreviations Sho-saiko-to (Xiao-Chai-Hu-Tang), 小柴胡湯 : TGF- β , transforming growth factor- β ; MTT, 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazoliumbromide.

緒 言

癌における化学療法の補助療法として種々の漢方薬が用いられ、その抗腫瘍効果について基礎的検討がなされるとともに、¹⁻⁷⁾臨床的にも、抗癌剤との併用療法や化学療法時の副作用を軽減させる方法として使用されている。しかし、これら漢方薬の作用機序はいまだ解明されていない。そこで今回我々は、抗腫瘍効果が報告されている漢方薬として小柴胡湯ならびに十全大補湯、人參養榮湯、補中益気湯を選び、婦人科癌培養細胞株における抗腫瘍

効果について検討するとともに、その作用機序についても検討を加えた。また作用機序を明らかにする目的で、最近癌細胞の増殖を調節する因子として注目されている transforming growth factor- β (TGF- β) の産生誘導について検討し、興味ある知見を得たので報告する。

材料と方法

(1) 実験材料

1) 細胞培養 : 癌細胞はヒト子宮頸癌由来の細胞株である HeLa 細胞およびヒト卵巣癌由来細胞株である

*〒770 徳島県徳島市蔵本町3丁目18-15
3-18-15, Kuramoto, Tokushima 770, Japan

HOC細胞を用い、2% ウシ胎児血清、5000 IU/ml のペニシリン、5000 µg/ml のストレプトマイシン、250 µg/ml のアンホテリシン B を含む DM160 培地で、37°C、5% CO₂ の培養器で維持した。

2) 漢方薬および生薬の調整：用いた漢方薬および生薬はいずれも株式会社ツムラより供与をうけた原末を用いた。漢方薬としては抗腫瘍効果があるとされている小柴胡湯、十全大補湯、人参養榮湯、補中益気湯を用い、生薬については小柴胡湯の構成生薬である柴胡、黄芩、人参、半夏、甘草、生姜、大棗について検討を行った。エキス原末 0.1 g を生理食塩水 10 ml に加え、30 分間室温で振盪することにより可能な限り溶解した。溶解液は 3000 回転で 15 分間遠心沈殿し、その上清を 0.22 µm のフィルターを用いて濾過滅菌したのち使用した。

最終濃度は 20, 100, 500 µg/ml の濃度になるように DM160 培地により調整した。

3) 抗癌剤：抗癌剤として、シスプラチン（ランダ、日本化薬）を用い、最終濃度は 0.1 µg/ml になるように調整した。

(2) 実験方法

1) MTT assay：今回細胞増殖能を検討するために、Mosmann によって報告された¹⁰⁾ MTT assay を用いた。この MTT assay は酵素活性法の一種で、細胞増殖能を比色定量する方法であり、最近各種悪性腫瘍培養細胞株の制癌剤感受性試験として広く応用されている。¹¹⁾ 各細胞を 96 穴マルチプレートに撒き、37°C、5% CO₂ 下で 96 時間インキュベートしたのち、培養終了 4 時間前に MTT 溶液を各 well に 10 µl ずつ添加した。培養終了後イソプロパノールを 100 µl ずつ添加し、よく混和させ、MTT formazan を溶解させ、scanning multiwell spectrophotometer (Microplate reader) を用いて 550 nm にて吸光度を測定した。これらの assay は triplicate で 3 回施行し、medium のみを添加した場合を対照として、この対照に対する比率を survival rate として示した。

2) 各種漢方薬および生薬を添加した場合の細胞増殖能：HeLa 細胞および HOC 細胞を 96 穴マルチプレートに 4 × 10⁴ 個/ml の濃度で 135 µl ずつ撒き、24 時間後に各種漢方薬を最終濃度が 20, 100, 500 µg/ml の濃度に、生薬については 500 µg/ml の濃度になるように 15 µl ずつ添加し、MTT assay を施行した。

3) シスプラチンと各種漢方薬を併用した場合の細胞増殖能：500 µg/ml の漢方薬を含んだ DM160 培地に浮遊させた HeLa 細胞および HOC 細胞を、96 穴マルチプレートに 4 × 10⁴ 個/ml の濃度で 135 µl ずつ撒き、24 時間後にシスプラチンを最終濃度が 0.1 µg/ml になるよう

に 15 µl ずつ添加し、MTT assay を施行した。

4) 細胞培養上清中の TGF-β1 の測定：HeLa 細胞および HOC 細胞を 4 × 10⁴ 個/ml の濃度で 32 穴プレートに 1 ml ずつ撒き、24 時間後、培養液を除去し、1 回洗浄したのち新たに血清の入っていない DM160 培地に交換した。その後、各生薬を 500 µg/ml の濃度で添加したのち、6, 12, 24, 48, 96, 120 時間後に上清を回収し、TGF-β1 の測定を行った。細胞培養上清中の TGF-β1 の測定については TGF-β1 ELISA システム（アマシャム・ジャパン、東京）を用いた。まず回収した培養液を 1N 塩酸にて 1 時間 4°C 酸処理したのち、1N 水酸化ナトリウムを加え中性化し、これを測定に供した。このサンプルおよび標準品を 100 µl ずつ抗ヒト TGF-β1 鶏卵抗体を固相化してある 96 穴マイクロタイタープレートに加え、1 晩室温にてインキュベーションしたのち洗浄し、抗ヒト TGF-β ウサギ抗体を 100 µl ずつ各 well に添加した。4 時間室温にてインキュベーションしたのち洗浄し、ビオチン標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体を 100 µl ずつ各 well に添加した。1.5 時間室温にてインキュベーションしたのち洗浄し、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを 100 µl ずつ各 well に添加した。1 時間室温にてインキュベーションしたのち洗浄し、0.02% 過酸化水素溶液を 100 µl ずつ各 well に添加した。30 分室温、遮光下にてインキュベーションしたのち、2N 硫酸を 100 µl ずつ添加して反応を停止し、492 nm で吸光度を測定した。

結 果

1. HeLa 細胞および HOC 細胞における各種漢方薬の効果

HeLa 細胞では、各種漢方薬の添加により、生細胞数の割合が濃度依存性に減少した。500 µg/ml の濃度での漢方薬を加えた場合の生細胞数の割合は小柴胡湯、十全大補湯、人参養榮湯、補中益気湯でそれぞれ 49.8, 65.7, 69.3, 67.6% であり、小柴胡湯の添加により有意に ($p < 0.01$) 抑制が認められた。また HOC 細胞については、十全大補湯、人参養榮湯、補中益気湯では各濃度で有意な変動が認められなかったが、小柴胡湯では 500 µg/ml の濃度では 48.8% と、有意に ($p < 0.01$) 抑制が認められた (Fig. 1)。すなわち小柴胡湯は、HeLa 細胞、HOC 細胞ともに 500 µg/ml の濃度で有意な抑制を示した。

2. HeLa 細胞および HOC 細胞における各種漢方薬とシスプラチンの併用効果

シスプラチンを単独で添加した場合、生細胞数の割合は HeLa 細胞 63.2%, HOC 細胞 82.1% であったが、小柴胡湯を併用するとそれぞれ 13.2% および 19.7% と有

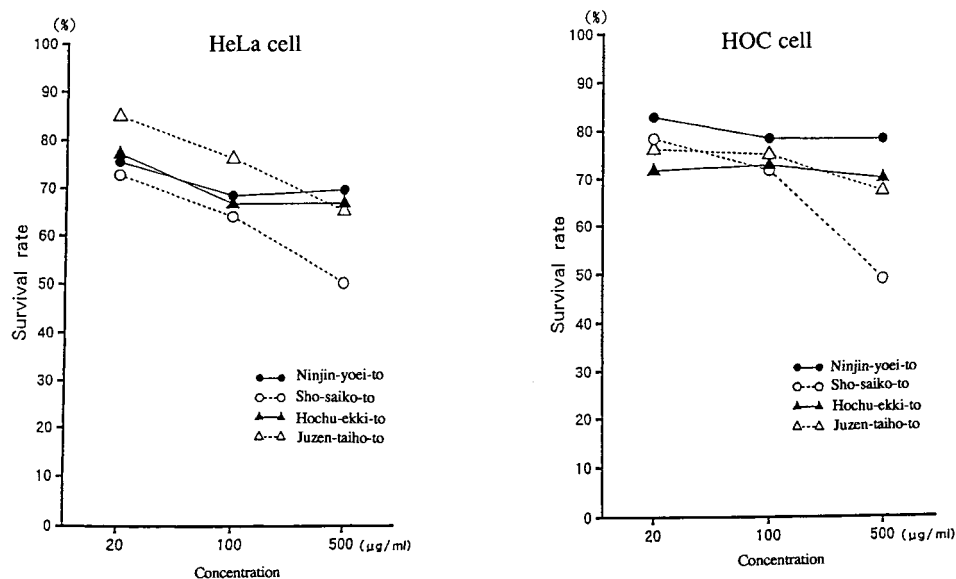


Fig. 1 Inhibitory effect of Kampo medicine.

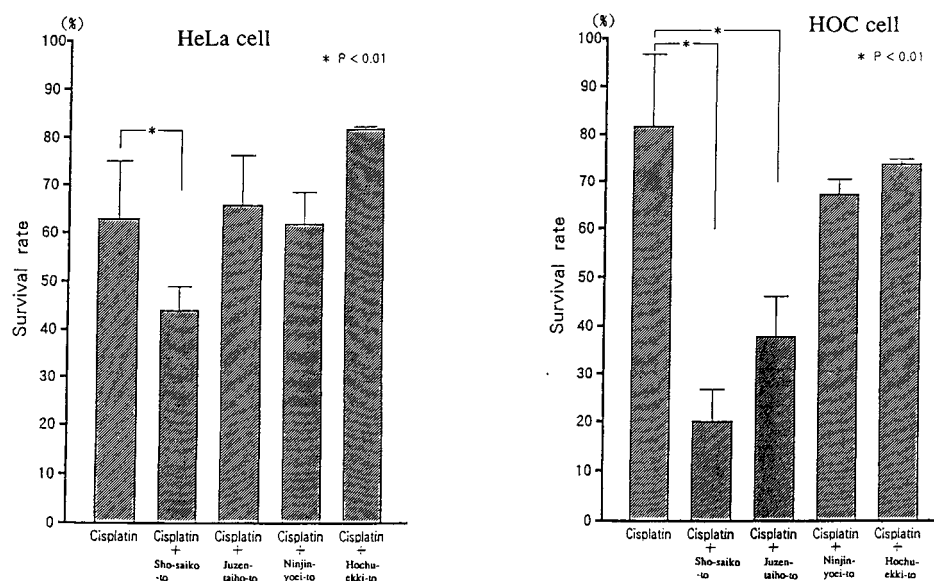


Fig. 2 Inhibitory effect of Cisplatin and Sho-saiko-to.

意に ($p < 0.01$) 抑制された (Fig. 2)。

3. HeLa 細胞および HOC 細胞における小柴胡湯構成生薬の効果

4 種の漢方薬のうち小柴胡湯に特に抑制効果が強く認められたため、この構成生薬である柴胡、黄芩、大棗、半夏、甘草、人參、生姜について、500 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で、

同様に MTT assay を用いて検討した。その結果、HeLa 細胞の増殖は、Fig. 3 に示したように、黄芩および甘草の添加でそれぞれ 38.8 および 32.4 % と他の生薬に比べて有意に ($p < 0.01$) 抑制された。一方 HOC 細胞について同様の検討を行ったところ、黄芩および甘草でそれぞれ 58.7, 38.1 % とやはり有意に ($p < 0.01$) 抑制された。

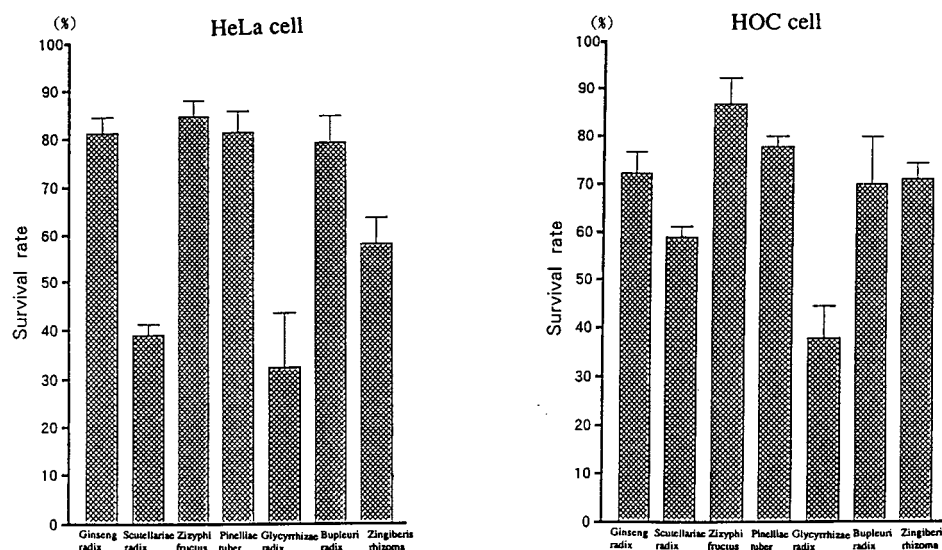


Fig. 3 Inhibitory effect Sho-saiko-to's ingredient drugs.

4. 各種構成生薬の TGF- β 1 活性の検討

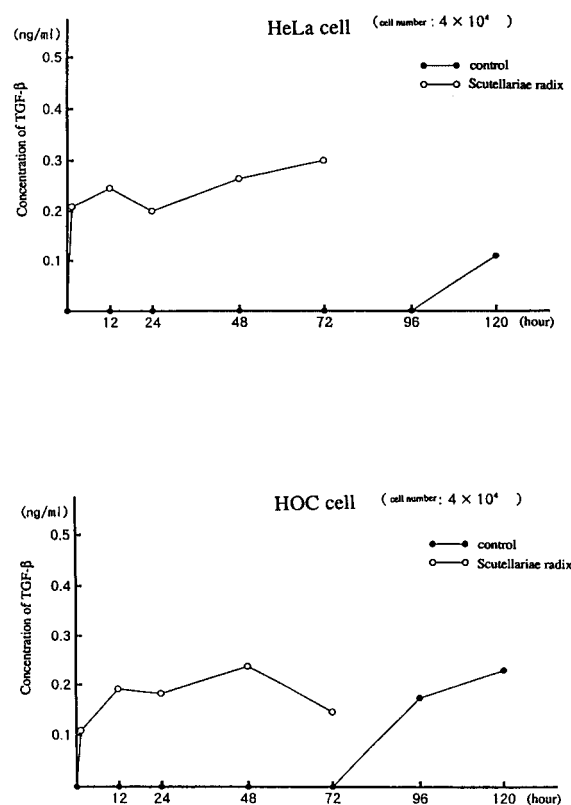
小柴胡湯の構成生薬のうち、黄芩および甘草に有意な抑制効果が認められたため、作用機序を知る目的で、培養細胞上清中の TGF- β 1 活性を ELISA 法により測定した。小柴胡湯の構成生薬のうち上記の黄芩、甘草の他、柴胡、生姜について検討を行った。HeLa 細胞および HOC 細胞の培養系にそれぞれ 500 μ g/ml 添加し、24 時間後の TGF- β 1 活性を測定したところ、黄芩を添加した場合にのみ同活性が認められ、対照および甘草、柴胡、生姜については TGF- β 1 活性を認めなかった。(Table I)

Table I The activity of TGF- β 1 in the cultured medium with Sho-saiko-to's ingredient drugs.

Ingredient drugs	TGF- β activity
Control	—
Glycyrrhizae radix	—
Bupleuri radix	—
Zingiberis rhizome	—
Scutellariae radix	+

5. 黄芩添加時の TGF- β 1 活性の経時的変化

HeLa 細胞、HOC 細胞に黄芩を添加した時の TGF- β 1 活性を経時的に検討した (Fig. 4)。HeLa 細胞、HOC 細胞ともに、黄芩添加 1 時間後よりすでに TGF- β 1 活性が認められ、48 時間後にはそれぞれ、0.26 および 0.23 ng/ml の活性が認められた。しかし、medium のみを添加した場合には HeLa 細胞では培養 96 時間まで、HOC 細

Fig. 4 The time course of TGF- β 1 of the cultured medium with Scutellariae radix.

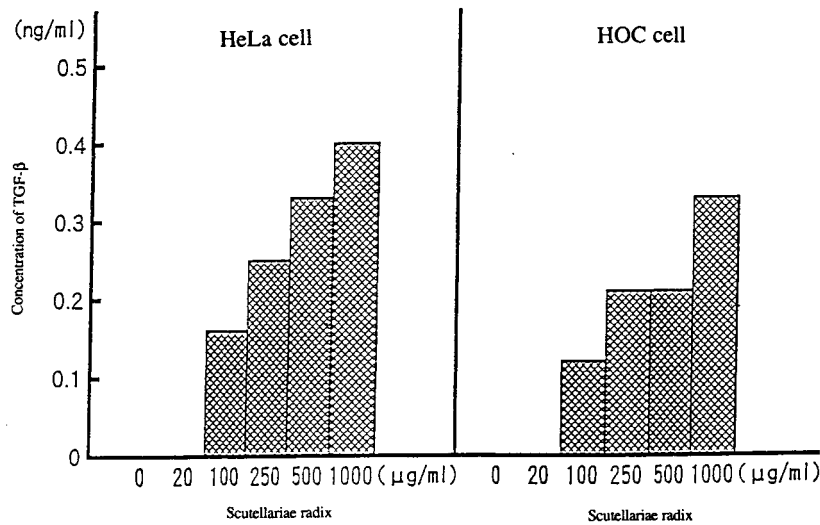


Fig. 5 A dose-dependent manner when incubated with Scutellariae radix.

胞では培養 72 時間までは TGF- β 1 活性は検出されず、いずれも感度以下であった。

6. 黄芩の濃度を変化させた時の TGF- β 1 活性

黄芩を、20, 100, 250, 500, 1000 μ g/ml の濃度でそれぞれ HeLa 細胞, HOC 細胞に添加し、培養上清中の TGF- β 1 活性を検討した (Fig. 5)。いずれの細胞においても、100 μ g/ml の濃度から濃度依存性に TGF- β 1 活性の増加が認められた。

考 察

小柴胡湯は柴胡、黄芩、大棗、半夏、甘草、人参、生姜の 7 種の生薬から構成される漢方薬であり、従来から慢性肝疾患に広く用いられているが、抗腫瘍作用についても基礎的あるいは臨床的に検討されてきている。沖田は化学発癌剤である 2-acetyl-aminofluorene (AAF) による肝癌発生を抑制すると報告しており¹⁾、また溝口はマクロファージの活性化、インターロイキン 1 の産生増強、NK 細胞の活性化により抗腫瘍作用を誘導すると報告している²⁾。さらに乳癌の発生においても、坂本らはマウス乳腺の前癌状態にみられる過形成葉状結節が小柴胡湯投与群で有意に減少したとして、小柴胡湯が乳癌発生を抑制できる可能性を示唆している³⁾。次に、その構成生薬の検討では、黄芩に含まれるバイカレンにはヒト培養肝癌細胞の増殖抑制効果があること⁴⁾、甘草に含まれるグリチルリチンには皮膚癌のプロモーションを阻止する作用があることなどが報告されている⁵⁾。また最近では、溝口は小柴胡湯の作用機序についてフローサイトメトリーを用

いた細胞周期の解析から、小柴胡湯は G₀/G₁ 期において抑制をきたすと報告しており、癌細胞に対する直接増殖抑制効果を示唆している⁶⁾。さらに、抗癌剤との併用効果についても、原中らはマウスの Ehrlich 腹水癌細胞移植癌において、小柴胡湯の併用によりアドリマイシン、シスプラチンの効果を増強すると報告している⁷⁾。一方臨床的にも、岡らは 260 例の肝硬変の患者を小柴胡湯投与群と対照群の 2 群に分け、60 カ月間にわたって肝癌の発生率を検討した結果、対照群の 37.7 % に比べ、小柴胡湯投与群の肝癌発生率は 24.7 % と低いことから、小柴胡湯投与により肝癌の発生を予防できる可能性を示唆している⁸⁾。このように、小柴胡湯の抗腫瘍作用が証明される中で、化学療法による副作用に対しても効果があることも報告されている。森らは、婦人科癌 89 例において化学療法時に小柴胡湯を併用することにより、血小板減少を抑制したと報告している⁹⁾。以上のように癌化学療法における小柴胡湯の役割についてみると、抗腫瘍作用および副作用軽減の両面からその有効性が報告されている。

今回我々は抗腫瘍作用が報告されている小柴胡湯、十全大補湯、人参養栄湯、補中益気湯について婦人科癌培養細胞株に対する作用を検討した。その結果、小柴胡湯に抗腫瘍作用が強く認められ、シスプラチンとの併用において有意に併用効果が認められた。また構成生薬でみると黄芩、甘草に特に強い抗腫瘍作用が認められた。この小柴胡湯の効果については、黄芩、甘草を初めとした各構成生薬の synergistic action も考えられ、今後これらのブレンド効果については検討を要するものと思われる。また今回の実験において、小柴胡湯のエキス原末を

生理食塩水で可能な限り溶解し、その可溶成分について検討を行ったが、不溶成分については今後の検討課題と思われる。

近年、細胞増殖をオートクラインあるいはパラクライン的に抑制するサイトカインとして TGF- β が注目されている。TGF- β は 1983 年に軟寒天培地での正常のラット線維芽細胞の増殖を促進する因子として発見された分子量 25,000 の蛋白質である。その後の研究により、TGF- β は細胞の増殖、分化、機能を制御し、細胞の恒常性を維持する multifunctional regulator として作用することが明らかになってきた。¹²⁾ 最近では卵巢癌細胞株において、増殖抑制効果が認められ、そのレセプターも存在することも知られている。¹³⁾ そこで我々は小柴胡湯による婦人科癌細胞株の増殖抑制が TGF- β を介している可能性を検討し、黄芩に HeLa 細胞および HOC 細胞の TGF- β 分泌誘導作用があることを明らかにした。すなわち小柴胡湯に認められる癌細胞の増殖抑制の機構の 1 つは、その構成生薬である黄芩を中心とした癌細胞の TGF- β 産生の誘導であり、その TGF- β がオートクライン的に自己の細胞に作用して抗腫瘍効果が発現されると推察された。今回対照においても 72~96 時間経過すると、TGF- β の産生がみられているが、腫瘍細胞の時間の経過に伴う細胞死についてもこの TGF- β によるアポトーシスの関与が推察され、黄芩はこの TGF- β の産生を早期に誘導する可能性があるのではないと思われる。

最近、神代からは、肝細胞癌株に小柴胡湯を添加することにより、DNA の fragmentation が観察されることから、小柴胡湯による癌細胞増殖抑制機序として、小柴胡湯のアポトーシスを誘導する可能性について示唆している。¹⁴⁾ アポトーシスとはプログラム化された細胞死であり、形態的には細胞の縮小、細胞質の凝集、核の断片化などの特徴を呈し、分子レベルでは DNA の断片化が認められる。癌治療の分野においても各種の抗癌剤がアポトーシスでの癌細胞破壊をきたすことが知られてきており注目されている。さらに、肝細胞においては TGF- β 1 がアポトーシスを誘導することが報告されており、¹⁵⁾ 小柴胡湯(特に黄芩)により産生された TGF- β が癌細胞にアポトーシスを誘導し、細胞破壊をきたすという機構が推測される。このように小柴胡湯による増殖抑制効果は肝細胞株においても認められ、婦人科癌細胞株に特異的なものではないと思われる。今後多くの癌細胞株においても検討する価値があると思われる。なお今回の検討において甘草についても増殖抑制効果が認められたが、この場合は黄芩と異なり TGF- β 活性がみられなかった。この抑制機序については黄芩とは異なる別の作用の関与も考えられ、極めて興味深いところと思われる。

癌治療における漢方薬の役割については、① 抗癌剤との併用による抗腫瘍効果の増強と ② 癌化学療法や放射線治療の副作用の予防や軽減に大きく分けられる。抗腫瘍作用のメカニズムについては、現在のところまだ不明な点が多いが、免疫調節機構を介する抗腫瘍性免疫活性の賦活、すなわち BRM として作用する可能性が注目されてきた。その点で本研究で癌細胞への直接作用が明らかにされた意義は大きい。今後小柴胡湯を初めとする漢方薬についてさらにその生理作用が明らかになれば、臨床的にも抗癌剤と漢方薬を組み合わせた新たな治療法が確立される可能性がある。

結 論

- (1) 小柴胡湯は婦人科癌細胞株に対して増殖抑制効果を示した。構成生薬を用いた検討では、黄芩および甘草に有意な抑制効果が認められた。
- (2) 小柴胡湯の抗腫瘍作用の機序の 1 つとして、黄芩を中心とした癌細胞への直接作用が、TGF- β の産生を誘導することによりオートクライン的に増殖を抑制する可能性が示唆された。

References

- 1) Okita, K., Kurokawa, N., Yamasaki, T.: Sho-saiko-to niyoru kanhatsuganyobou no kanousei. *Shoukakika* 12, 152-156, 1990.
沖田 極, 黒川典枝, 山崎隆浩: 小柴胡湯による肝発癌予防の可能性. *消化器科* 12, 152-156, 1990.
- 2) Mizoguchi, Y., Shibata, Y.: Koushuyoumenekikikou ni oyobosu Sho-saiko-to no eikyou. *Kanpouigaku* 11, 19-26, 1987.
溝口靖雄, 柴田悠喜: 抗腫瘍免疫機構に及ぼす小柴胡湯の影響. *漢方医学* 11, 19-26, 1987.
- 3) Sakamoto, S., Mori, T., Nagasawa, H., Kuwa, K., Namiki, H.: Nyuugan no hassei - zoushoku ni ataeru kanpouseizai no eikyou. *Sanfujinkakanpoukenkyunoyumi* No 11, 25-31, 1994.
坂本 忍, 守 隆夫, 長沢 弘, 桑 克彦, 並木秀男: 乳癌の発生・増殖に与える漢方製剤の影響. *産婦人科漢方研究のあゆみ* No 11, 25-31, 1994.
- 4) Ri, S., Okita, K., Murakami, T.: Sho-saiko-to ni fukumareru yakkouseibun Baikaren no baiyohitokangansaibou (HuH-7) ni taisuru zoushokuyokuseikouka. *Biotherapy* 4, 1664-1670, 1990.
李 千, 沖田 極, 村上知之: 小柴胡湯に含まれる薬効成分パイクレンの培養ヒト肝癌細胞 (HuH-7) に対する増殖抑制効果. *Biotherapy* 4, 1664-1670, 1990.
- 5) Takizawa, H., Konishi, S., Nishino, H.: Glycyrrhetic acid: A potent inhibitor of tumor promotion in two-stage carcinogenesis of mouse skin. *J. Kyoto. Pref. Univ. Med.* 94, 999-1004, 1985.
- 6) Mizoguchi, A.: Inhibitory effect of the aqueous soluble fraction of Sho-saiko-to on the growth of various human cancer cell lines established from the hepatobiliary system. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* 9, 110-117, 1992.
- 7) Haranaka, R., Hasegawa, R., Okato, H., Nakagawa, S., Satomi, N., Sakurai, A., Iimura, F., Haranaka, K.: Juzen-taiho-to, Sho-

- saiko-to to seiganzai no heiyoukouka ni kansuru kenkyu. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* **5**, 368-369, 1988.
- 原中瑠璃子, 長谷川律子, 岡戸英之, 中川滋木, 里見信子, 桜井明子, 飯村二三男, 原中勝征: 十全大補湯, 小柴胡湯と制癌剤の併用効果に関する研究. 和漢医薬学会誌 **5**, 368-369, 1988.
- 8) Oka, H., Yamamoto, S.: Sho-saiko-to niyoru kanhatsuganyobou-kouka no rinshoutekikentou. *Biotherapy* **5**, 1867-1873, 1991.
- 岡 博子, 山本祐夫: 小柴胡湯による肝発癌予防効果の臨床的検討. *Biotherapy* **5**, 1867-1873, 1991.
- 9) Mori, T., Tauchi, K., Yokoyama, S., Nakamura, R., Tateyama, I., Ozawa, M., Kyosige, A., Sato, S., Morishita, Y., Takashima, H., Sakai, Y., Korida, Y., Miyamoto, N.: Effects of Sho-saiko-to on thrombocytopenia bei therapy with anticancer drugs. *Obstetrical and Gynecological therapy* **65**, 102-105, 1992.
- 10) Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63, 1983.
- 11) Iijima, N., Sekiya, S., Tokita, H., Takamizawa, H.: Basic study on in vitro chemosensitivity tests. *Acta Obst. Gynec. Jpn* **43**, 191-196, 1991.
- 12) Sporn, M.B., Roberts, A.B., Wakefield, L.M.: Transforming growth factor- β : Biological function and chemical structure. *Science* **233**, 532-534, 1986.
- 13) Joza, S., Guerrin, M., Mazars, P., Dutaur, M., Monsarrat, B., Cheutin, F., Bugat, R., Martel, P., Valette, A.: Transforming growth factor β 1 (TGF β 1) inhibits growth of a human ovarian carcinoma cell line (OVCCR1) and is expressed in human ovarian tumors. *Int. J. Cancer* **52**, 766-770, 1992.
- 14) Kamishiro, M., Yano, H., Mizoguchi, A.: Sho-saiko-to niyoru ganyokuseikijo tositeno gansaibou no apoptosis yuudou. "21 seiki no iryou to kanpou", Medical Tribune, Tokyo, pp. 51-58, 1994.
- 神代正道, 矢野博久, 溝口充志: 小柴胡湯による癌増殖抑制機序としての癌細胞のアポトーシス誘導. "21世紀の医療と漢方", メディカルトリビューン, 東京, pp. 51-58, 1994.
- 15) Bursch, W., Oberhammer, F., Jirtle, R.L., Askari, M., Sedivy, R., Grasl-Kraupp, B., Purchio, A.F., Schulte-Hermann, R.: Transforming growth factor-beta 1 as a signal for induction of cell death by apoptosis. *Br. J. Cancer* **67**, 531-536, 1993.