

## 小柴胡湯の抗腫瘍作用について

北村 瑞穂,<sup>a)</sup> 溝口 靖紘,<sup>\*b)</sup> 山本 祐夫,<sup>b)</sup> 柴田 悠喜,<sup>c)</sup> 森沢 成司<sup>a)</sup>大阪市立大学医学部第一生化学教室,<sup>a)</sup> 大阪市立大学医学部第三内科学教室<sup>b)</sup>  
浜松医科大学附属病院薬剤部<sup>c)</sup>Anti-tumor activities of the Syô-saiko-tô-activated  
macrophages in miceMizuho KITAMURA,<sup>a)</sup> Yasuhiro MIZOGUCHI,<sup>\*b)</sup> Sukeo YAMAMOTO,<sup>b)</sup>  
Yuhki SHIBATA<sup>c)</sup> and Seiji MORISAWA<sup>a)</sup>*The First Department of Biochemistry, Osaka City University Medical School<sup>a)</sup>*  
*The Third Department of Internal Medicine, Osaka City University Medical School<sup>b)</sup>*  
*Department of Pharmacy, Hamamatsu University School of Medicine<sup>c)</sup>*

(Received January 21, 1985)

## Abstract

Peritoneal exudate macrophages were activated by Syô-saiko-tô and exhibited a significantly potent anti-tumor activity in mice. A marked inhibition of DNA synthesis in tumor cells was observed when tumor cells were co-incubated with the activated peritoneal exudate cells. The inhibition of DNA synthesis in tumor cells was also shown by incubating tumor cells with the culture supernatant of activated peritoneal exudate cells. Interestingly a different anti-tumor activity of the activated peritoneal exudate cells was observed by changing target tumor cells in both parameters. The activated cells from ddY mice were shown to have the more potent anti-tumor activity to Ehrlich ascites tumor cells than Sarcoma 180 cells. These results suggested that Syô-saiko-tô might suppress the tumor cell growth through activation of macrophages and production of cytotoxic factors from the activated macrophages.

**Keywords** Syô-saiko-tô, activated macrophage, macrophage-mediated cytotoxicity

**Abbreviations** MAF; macrophage activating factor, MCF; macrophage cytotoxic factor, Syô-saiko-tô (Xiao-Chai-Hu-Tang); 小柴胡湯

## 緒 言

最近、マクロファージがeffector細胞として腫瘍細胞障害性を示すことが明らかになり、種々の実験

系で研究が進められている。すなわち、抗体の存在下でマウスの腹腔マクロファージが腫瘍細胞を破壊することが示され<sup>1)</sup>、一方、抗体非存在下でも、活性化マクロファージが特異的または非特異的に腫瘍細胞の増殖を抑制することが明らかにされている。

\*〒545 大阪市阿倍野区旭町1-5-7  
1-5-7, Asahi-machi, Abeno-ku, Osaka 545, Japan

このようなマクロファージの抗腫瘍性は“armed”マクロファージ、活性化マクロファージまたは“angry”マクロファージなどと呼ばれている<sup>2)</sup>

これらのうち、活性化マクロファージによる腫瘍細胞の破壊ないし増殖抑制の機序として、著者らはさきにマクロファージと標的腫瘍細胞の間における cell-to-cell contact によって起こるばかりでなく、活性化マクロファージから産生放出される可溶性の活性因子によっても腫瘍細胞障害が誘導されることを示した<sup>3)</sup>

しかしながら、活性化マクロファージによる抗腫瘍性について必ずしも十分な知見が得られているとはいえない。

一方、著者らは小柴胡湯, Syô-saiko-tô (Xiao-Chai-Hu-Tang) が *in vivo* の実験系において抗腫瘍性があることを報告した<sup>4)</sup>

そこで、著者らは ddY 系マウスに継代移植して維持した Ehrlich 腹水癌細胞および Sarcoma 180 細胞を標的細胞として、マウスの腹腔滲出マクロファージを小柴胡湯で活性化し、*in vitro* で活性化マクロファージと腫瘍細胞の直接接触および活性化マクロファージの培養上清によって抗腫瘍性を検討した。

## 材料と方法

### 1. 動物および腫瘍細胞

実験に用いた動物は ddY 系マウス (雄 6 週令, 日本クレア) であり、標的細胞として用いた腫瘍細胞は ddY 系マウスに維持した Ehrlich 腹水癌細胞および Sarcoma 180 細胞 (浜松医科大学附属病院薬剤部 藤井善一郎部長より供与) である。

### 2. 小柴胡湯エキス原末の調製法

柴胡, *Bupleurum falcatum* L. (日本産) 7.0g, 半夏, *Pinellia ternate* Breitenbach (中国産) 5.0g, 黄芩, *Scutellaria baicalensis* Georgi (中国天津産) 3.0g, 大棗, *Zizyphus jujuba* Miller (中国天津産) 3.0g, 人參, *Panax ginseng* C.A. Meyer (韓国産) 3.0g, 甘草, *Glycyrrhiza glabra* L. var. *glan-dulifera* Regel et Herd. (中国東北産) 2.0g, 生姜, *Zingiber officinale* Roscoe (中国雲南産) 1.0g の割合で混合した生薬に約 10 倍量の水を加え、100℃にて 90 分間加熱抽出した後濾過し、減圧濃縮した後粉霧乾燥し、黄かっ色の粉末を約 10% の収率で得た。なお、小柴胡湯エキス原末は株式会社津村順天堂より供与された。

### 3. マウスの腹腔滲出細胞の採取

マウスの腹腔内に 3 ml の滅菌 marcol 52 を注入し、4 日後に腹腔を Hanks 液 30 ml で灌流して腹腔滲出細胞を採取した。この灌流液から marcol 52 を除去した後、低温遠心 (2000rpm, 10分) によって細胞を集め、Hanks 液で洗浄および遠心を 2 回くりかえして細胞を分離した。ついで、細胞をウシ胎児血清 10%, ストレプトマイシン 100  $\mu$ g/ml およびペニシリン 100 単位/ml を含むイーグル MEM 培養液に懸濁して細胞浮遊液 ( $5 \times 10^6$  個/ml) を作り、マクロファージとして実験に供した。

### 4. マクロファージ活性化の測定

マウス腹腔滲出細胞浮遊液 ( $5 \times 10^6$  個/ml) 1 ml に種々の濃度の小柴胡湯を添加して 3 日間培養した後、 $^3\text{H}$ -グルコサミン (比活性 20 Ci/mmol) 1  $\mu$ Ci を加えてさらに 6 時間培養し、細胞にとりこまれた放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。対照としては小柴胡湯を添加することなく同様の実験を行い、小柴胡湯添加群に対する  $^3\text{H}$ -グルコサミンのとりこみと比較してマクロファージ活性化を判定した。なお、多くの対照実験から、対照の  $^3\text{H}$ -グルコサミンのとりこみを 100% とした場合、180% 以上のとりこみを認めたとき、活性化陽性と判定し、このようなマクロファージを活性化マクロファージとして用いた。

### 5. macrophage-mediated cytotoxicity における cell-to-cell の検討

マウス腹腔滲出細胞浮遊液 ( $1 \times 10^6$  個/ml) に小柴胡湯を加えて 24 時間培養し、細胞を洗浄後腫瘍細胞との比が 10:1 となるように添加して 24 時間培養した。ついで、 $^3\text{H}$ -チミジン (比活性 5 Ci/mmol) 1  $\mu$ Ci を加えて 2 時間培養し、放射活性の酸不溶性分画へのとりこみを液体シンチレーションカウンターで測定した。対照としては、腹腔浸出細胞を小柴胡湯で刺激することなく腫瘍細胞浮遊液に加え、同様に処理して  $^3\text{H}$ -チミジンのとりこみを比較した。

### 6. 活性化マクロファージ培養上清に含まれる腫瘍細胞障害因子の検討

マウス腹腔浸出細胞浮遊液 ( $5 \times 10^6$  個/ml) に小柴胡湯を添加して 6 時間培養し、洗浄後、細胞に新鮮な培養液を加えて、 $5 \times 10^6$  個/ml の細胞濃度に調整し、さらに 2 日間培養した。ついで、遠心に

よって細胞培養上清を採取し実験に供した。

この腹腔滲出細胞培養上清0.5mlを腫瘍細胞浮遊液 ( $2 \times 10^5$ 個/ml) 0.5mlに加えて24時間培養し、その後、 $^3\text{H}$ -チミジン(比活性 5 Ci/mmol)を  $1 \mu\text{Ci}$  添加して、さらに1時間培養した後、 $^3\text{H}$ -チミジンの放射活性の細胞不溶性分画へのとりこみを液体シンチレーションカウンターで測定した。なお、対照としては腹腔滲出細胞に小柴胡湯を添加することなく同様に培養して、その培養上清を腫瘍細胞浮遊液に添加培養し、 $^3\text{H}$ -チミジンのとりこみを測定して小柴胡湯で活性化した場合と比較した。

また、癌細胞のviabilityを検討するため、同時に trypan-blue dye exclusion testで測定した。

## 結 果

### 1. 小柴胡湯によるマクロファージの活性化

ddY系マウスの腹腔滲出細胞に種々の濃度の小柴胡湯を加えて培養し、 $^3\text{H}$ -グルコサミンの細胞へのとりこみを検討すると、非添加群 ( $100.0 \pm 9.2\%$ ) に比して、 $200 \mu\text{g/ml}$ の小柴胡湯群では  $181.1 \pm 25.0\%$  となり、有意に $^3\text{H}$ -グルコサミンのとりこみが増加した ( $P < 0.005$ ) (Fig. 1)。

### 2. 腫瘍細胞のviabilityに及ぼす小柴胡湯の影響

Ehrlich腹水癌細胞に種々の濃度の小柴胡湯を加えて48時間培養し、viabilityをtrypan-blue dye exclusion testで検討した。その結果、Fig. 2に示すように10, 50, 100, 200, 300および $400 \mu\text{g/ml}$ の小柴

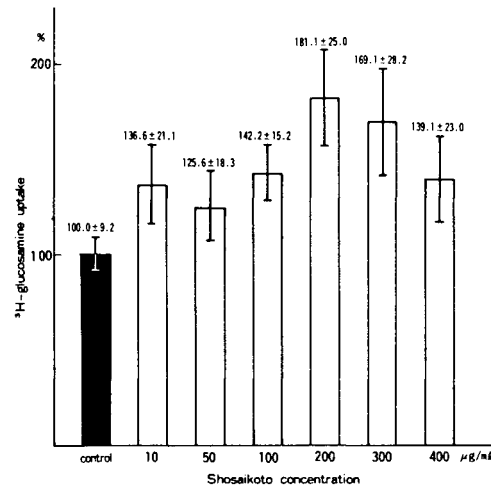


Fig. 1 Effects of Syδ-saiko-tō on  $^3\text{H}$ -glucosamine uptake in peritoneal exudate macrophages ( $n=10$ ). Activation of macrophages was determined by the increased uptake of  $^3\text{H}$ -glucosamine.

胡湯を加えた場合のviabilityは非添加群 ( $100.0 \pm 7.5\%$ ) に比して、それぞれ  $84.5 \pm 5.1\%$ ,  $75.3 \pm 3.1\%$ ,  $87.8 \pm 2.0\%$ ,  $77.4 \pm 5.0\%$ ,  $84.4 \pm 12.6\%$  および  $85.9 \pm 3.2\%$  に低下し、危険率0.5%, 0.5%, 0.5%, 0.5%, 1%, 0.5%で有意差を示した。

同様に、Sarcoma 180細胞について小柴胡湯のviabilityにおよぼす影響について検討したが、Fig.

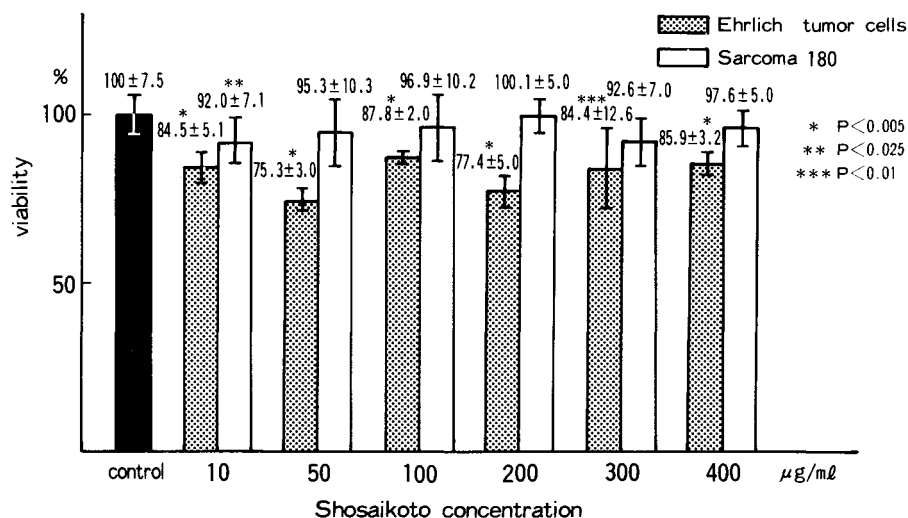


Fig. 2 Effects of Syδ-saiko-tō on viability of tumor cells ( $n=10$ ).

Viability of tumor cells was estimated by trypan-blue dye exclusion test.

2に示すように非添加群に比して10 $\mu$ g/mlの濃度を除いて有意差を認めなかった。

### 3. macrophage-mediated cytotoxicityにおける cell-to-cell contactの検討

腹腔滲出細胞を小柴胡湯で活性化し、その活性化細胞による腫瘍細胞の障害を $^3\text{H}$ -チミジンのとりこみの低下から判定した。対照としては小柴胡湯で活

性化しない腹腔滲出細胞を用いて同様の実験を行ない、その場合の $^3\text{H}$ -チミジンのとりこみを100%として、活性化腹腔滲出細胞の腫瘍細胞障害性を表現した。その結果、Fig.3に示すように、200~300 $\mu$ g/mlの小柴胡湯でマクロファージを活性化し、その活性化マクロファージを Ehrlich 腹水癌細胞に添加すると、DNA 合成は対照群に比して最も強く低下した。

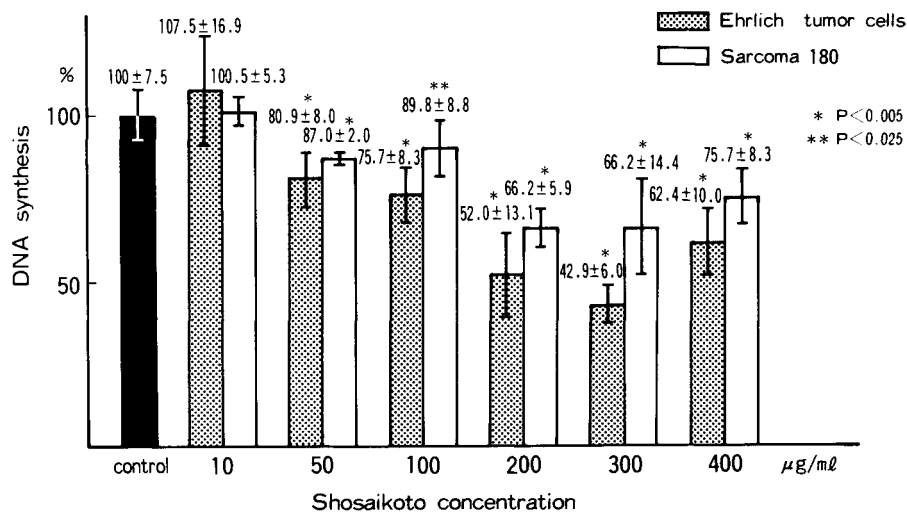


Fig. 3 Effects of Sy $\delta$ -saiko-t $\delta$ -treated macrophages on tumor cell-toxicity (n=10). Cytotoxicity was estimated by the decreased uptake of ( $^3\text{H}$ )-thymidine in tumor cells.

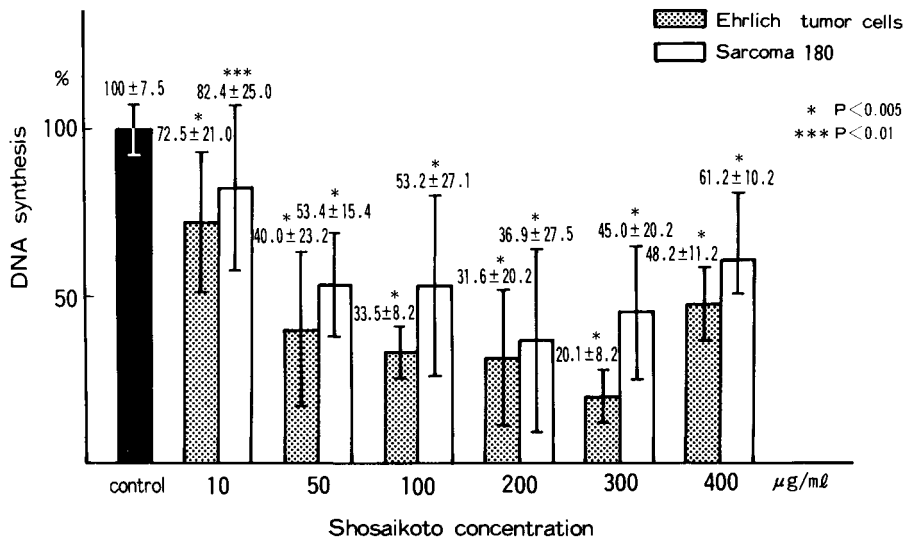


Fig. 4 Effects of the culture supernatant from Sy $\delta$ -saiko-t $\delta$ -treated macrophages on tumor cell-toxicity (n=10). Cytotoxicity was estimated by the decreased uptake of ( $^3\text{H}$ )-thymidine in tumor cells.

同様に、小柴胡湯で処理したマクロファージをSarcoma 180細胞に添加すると、DNA合成はEhrlich腹水癌細胞の場合と同様に著明に低下した。

しかしながら腫瘍細胞に対する活性化マクロファージの抗腫瘍作用には腫瘍差が認められた。すなわち、Ehrlich腹水癌細胞はSarcoma 180細胞に比較して、活性化マクロファージの添加によってDNA合成はより低下した。

#### 4. 活性化マクロファージ培養上清の抗腫瘍作用の検討

ddYマウスの腹腔浸出マクロファージを *in vitro* で小柴胡湯で活性化し、その培養上清をEhrlich腹水癌細胞に添加培養して、 $^3\text{H}$ -チミジンの癌細胞酸不溶性分画へのとりこみで細胞障害性を検討した。その結果、Fig. 4に示すように小柴胡湯 $300\mu\text{g}$ による活性化ではEhrlich癌細胞のDNA合成は不活性化

27.5%を示し、最も強く低下した。しかしながら、Ehrlich腹水癌細胞に比較して、活性化マクロファージによるDNA合成の低下は少なかった。

また、一部の細胞を採取して腫瘍細胞のviabilityを検討するため、同時にtrypan-blue dye exclusion testで測定した。

その結果、Fig. 5に示すように小柴胡湯 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ による活性化マクロファージではEhrlich腹水癌細胞のDNA合成は不活性化腹腔浸出マクロファージ対照群( $100.0\pm 7.5\%$ )に比して $63.8\pm 8.8\%$ 、Sarcoma 180細胞群では $68.1\pm 5.0\%$ を示し、共にviabilityも低下した。

この結果から、活性化腹腔浸出マクロファージの培養上清には抗腫瘍作用を有する可溶性因子が含まれていることが示唆された。また、活性化マクロファージ培養上清による抗腫瘍作用にも腫瘍差が認められた。

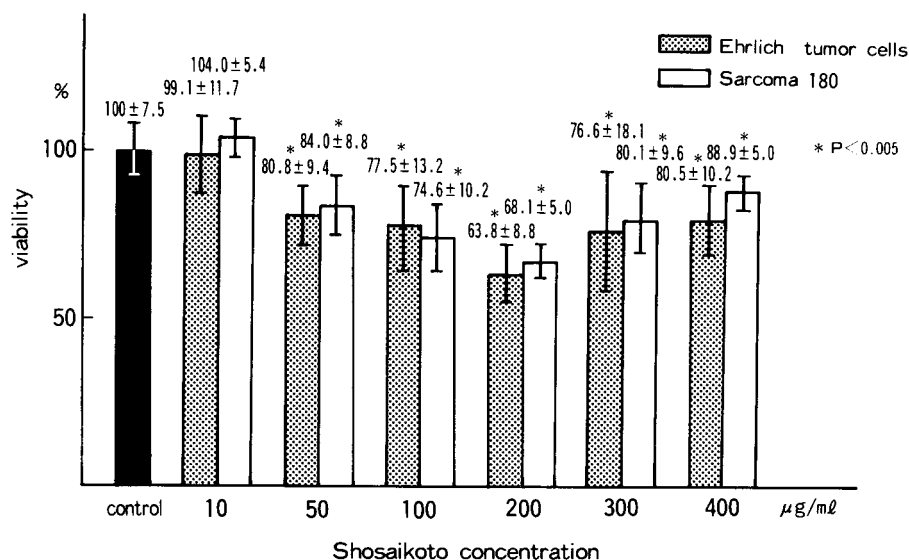


Fig. 5 Effects of the culture supernatant from Syō-saiko-tō-treated macrophages on viability of tumor cells ( $n=10$ ).

Viability of tumor cells was estimated by trypan-blue dye exclusion test.

腹腔浸出マクロファージ培養上清を添加した場合( $100.0\pm 7.5\%$ )に比して $20.1\pm 8.2\%$ を示し、最も強く低下した。

同様に、ddY系マウスの腹腔浸出マクロファージを小柴胡湯で活性化し、その培養上清のSarcoma 180細胞に対する細胞障害性を検討すると、小柴胡湯 $200\mu\text{g}$ による活性化では腫瘍細胞のDNA合成は非活性化培養上清を添加したときに比して $36.9\pm$

#### 考 察

マクロファージが抗腫瘍作用のeffector細胞として作用することは多くの実験によって示唆されている<sup>1)</sup>。免疫学的にマクロファージ活性化にはリンホカインの一種であるマクロファージ活性化因子(MAF)やmacrophage cytotoxic factor (MCF)

が関与することも知られている。本研究においては、これらのリンホカインの代りに小柴胡湯を用いてモデル実験を行った。これは小柴胡湯にマクロファージ活性化作用を有すること、また、小柴胡湯が*in vivo*の実験系において抗腫瘍性を有することが判明したためである<sup>4)</sup>。

多くの場合、活性化マクロファージは腫瘍細胞を破壊することが示されているが、正常細胞には作用しない<sup>5)</sup>。その機序は明らかではないが、マクロファージが活性化されると、形態学的にも、生化学的にも著明な変化が誘導される。このような活性化マクロファージは正常細胞とは異なる腫瘍細胞の表面構造を認識するか、または親和性を増すことによって腫瘍細胞に結合し、その結果、腫瘍細胞の破壊または増殖抑制をひき起こすと考えられる。活性化マクロファージをneuraminidaseで処理するとその抗腫瘍作用が上昇することも、活性化マクロファージと腫瘍細胞の接触が抗腫瘍性を増強するのに必要と考えられる<sup>6)</sup>。Hibbs<sup>7)</sup>は腫瘍細胞と活性化マクロファージが一過性に接触して部分的に融合し、活性化マクロファージの二次リソゾームの内容物が直接腫瘍細胞に移されることによって腫瘍細胞の破壊を誘導すると考えている。

また、活性化マクロファージの培養上清には腫瘍細胞を障害する可溶性因子が存在することが明らかにされている。この可溶性因子の本体については補体成分に由来するもの<sup>8)</sup>、plasminogen activator<sup>9)</sup>、種々の加水分解酵素<sup>10)</sup>などがあげられているが、それらのうち、どれが主役を演ずるか必ずしも明らかではない。

著者らの実験によって、活性化マクロファージの抗腫瘍作用にはcell-to-cell contactによるものと、活性化マクロファージから遊離する可溶性因子の両方があることが示唆されたが、そのどちらが*in vivo*において主役を演じるか、優劣の決定は今後の検討を待たねばならない。また、活性化マクロファージに由来すると考えられる抗腫瘍因子についても、今後分離精製してその実体を明らかにしなければならない。

今回の著者らの実験により、小柴胡湯にはマクロファージを活性化して抗腫瘍性を誘導する成分が含まれていることが明らかになった。しかも、その有効性は濃度によってかなり異なり、200~300 $\mu$ g/mlの小柴胡湯によって、最も強く抗腫瘍活性が誘導された。有地らは血清トランスアミナーゼ値を指標としてD-ガラクトサミンによる肝障害を検討し、サイコサポニンが肝障害を強く抑制することを示して

いるが、D-ガラクトサミンを投与する2時間前にサイコサポニン腹腔内に投与した場合には2 mg/kgの方が、20mg/kgのサイコサポニンを投与した場合より有効であると報告している<sup>11)</sup>したがって、小柴胡湯の作用には一定の有効濃度があると考えられる。また、本実験において得られた最も重要な知見は小柴胡湯により活性化されたマクロファージの抗腫瘍作用には腫瘍差があることである。すなわち、ddYマウスの活性化マクロファージはEhrlich腹水癌細胞により強い細胞障害性を示した。この関係は活性化マクロファージ培養上清を用いた場合も同様であった。この腫瘍差に組織適合性などの因子が関与するか否かについて今後詳細な検討が必要である。さらに、小柴胡湯には柴胡のほか、半夏、黄芩、大棗、人参および生姜が含まれており、これらのうち有効成分は不明であり、今後有効成分の同定も検討しなければならない。

## 結 論

小柴胡湯でマウスの腹腔浸出マクロファージを活性化し、その抗腫瘍性をcell-to-cell contactおよび活性化マクロファージ培養上清に含まれる因子の作用から検討した。その結果、ddYマウスの活性化腹腔浸出マクロファージのEhrlich腹水癌細胞およびSarcoma 180細胞に対する抗腫瘍性はcell-to-cell contactにおいても、培養上清においても著明に認められた。しかし、Ehrlich腹水癌細胞は活性化マクロファージによって強く障害されるが、Sarcoma 180細胞の障害性は低かった。以上の結果から、小柴胡湯はマクロファージを活性化し、活性化されたマクロファージが抗腫瘍性に作用すると推測された。また、この抗腫瘍作用には腫瘍差が認められた。

本論文は、第1回和漢医薬学会総会（1984年9月、富山）において発表した。

## 文 献

- 1) Bennett, B., Old, L.J. and Boyse, E.A.: The phagocytosis of tumor cells in vitro. *Transplantation* **2**, 183-202, 1964
- 2) Fink, M.A.: The macrophage in neoplasia. (Ed. by Fink, M.A.), Academic press, 1976
- 3) 溝口靖紘, 田村恭子, 筒井ひろ子, 志波 孝, 東森俊博, 大西文明, 門奈丈之, 山本祐夫, 中井賢治, 大谷周造, 森沢成司: 活性化マウス腹腔浸出細胞の腹水肝癌細胞

- (MH134) に対する細胞障害性. 肝臓 **21**, 562—566, 1980
- 4) 柴田悠喜, 姉崎 健, 名倉弘明, 藤井喜一郎, 溝口靖  
紘: 小柴胡湯の抗腫瘍作用について. 第43回日本癌学会  
総会記事, 173—173, 1984
- 5) Currie, G.A. and Basham, G.: Activated macrophages  
release a factor which lyses malignant cells but not  
normal cells. *J. Exp. Med.* **142**, 1600—1605, 1975
- 6) Martin, F. and Martin, M.S.: Modification of macro-  
phage cytotoxicity to rat intestinal cancer cells by  
chemical and biological agents. The proceedings of the  
Eures symposium on the macrophage and cancer. (Ed.  
by James, K., McBride, B. and Stuart, A.), University of  
Edinburgh Medical School, Scotland, p78—85, 1978
- 7) Hibbs, J.B.Jr.: Heterocytolysis by macrophages ac-  
tivated by bacillus Calmette-Guerin: Lysosome ex-  
ocytosis into tumor cells. *Science* **184**, 468—471, 1974
- 8) Ferluga, J., Schorlemmer, H.U., Baptista, L.C. and  
Allison, A.C.: Production of the complement cleavage  
product, C3a, by activated macrophages and its tumor-  
olytic effects. *Clin. Exp. Immunol.* **31**, 512—517, 1978
- 9) Newman, W., Gordon, S., Hämmerling, U., Senik, A.  
and Bloom, B.R.: Production of migration inhibition  
factor (MIF) and an inducer of plasminogen activator  
(IPA) by subsets of T cells in MLC. *J. Immunol.* **120**,  
927—931, 1978
- 10) Allison, A.C. and Davies, P.: Mononuclear phagocytes  
in immunity, infection and pathology. (Ed. by Furth  
and R., Blackwell), Oxford, p487, 1975
- 11) 有地 滋, 小西啓悦, 阿部博子: Saikosaponinの作用機  
作の解析. I. D-galactosamine 肝障害に対する Saikosapo-  
nin の作用. 肝臓 **19**, 430—435, 1978