

数種生薬の抗腫瘍作用についての検討

徐 強,*^{a)} 手島 浩慈,^{a)} 崔 洙亨,^{a)} 森 裕志^{a)}
江田 昭英,^{a)} 西岡 五夫^{b)}

^{a)}岐阜薬科大学薬理学教室, ^{b)}九州大学薬学部生薬学教室

Antitumor activity of some kinds of crude drugs

Qiang XU,*^{a)} Koji TESHIMA,^{a)} Soo Hyung CHOI,^{a)} Hiroshi MORI^{a)}
Akihide KODA^{a)} and Itsuo NISHIOKA^{b)}

^{a)}Department of Pharmacology, Gifu Pharmaceutical University

^{b)}Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

(Received January 16, 1986. Accepted March 24, 1986.)

Abstract

A study was carried out to examine the antitumor activity of aqueous extracts from 8 kinds of crude drugs. The drugs used in this study were as follows: *A. capillaris*, *S. doederleinii*, *A. macrocephala*, *S. subprostrata*, *C. zedoaria*, *L. erythrorhizon*, *S. glabra* and *C. acuminata*.

1) BALB/c mice were transplanted with Meth A sarcoma s.c. into their flanks and drugs were given p.o. for 20 days from 4 days before the tumor transplantation. *A. capillaris*, *S. doederleinii*, *A. macrocephala* and *S. subprostrata* inhibited the tumor growth and prolonged the survival time. The others did not show such an antitumor activity.

2) Among 4 drugs showed the antitumor activity *in vivo*, *A. capillaris* and *S. doederleinii* exhibited the *in vitro* cytotoxicity against Meth A sarcoma and L-929 cells in a dose dependent fashion. The concentrations required for 50 % inhibition of the tumor proliferation were $1.25 \sim 2.5 \times 10^{-4}$ g/ml in *A. capillaris* and $0.5 \sim 1.5 \times 10^{-3}$ g/ml in *S. doederleinii*. *A. macrocephala* and *S. subprostrata* did not show any *in vitro* cytotoxicity even in such a high concentration of 2.5×10^{-3} g/ml.

3) *A. capillaris* exhibited a significant inhibition of the growth of Meth A sarcoma inoculated in BALB/c-nu/nu mice but the other 3 drugs did not. All the 4 drugs, however, showed the antitumor activity in BALB/c-nu/+ mice inoculated with Meth A sarcoma.

These results suggest that *A. capillaris* shows the antitumor activity through mainly a direct cytotoxic action, and the other 3 kinds of crude drugs display the activity through the host-mediated action.

Key words *Artemisia capillaris*, *Selaginella doederleinii*, *Atractylodes macrocephala*, *Sophora subprostrata*, antitumor activity, cytotoxicity, host-mediated action

*〒502 岐阜市三田洞東5-6-1
6-1, Mitahora-higashi 5 chome, Gifu 502, Japan
本論文の内容の一部は第2回和漢医薬学会(昭和60年
9月, 京都)において発表した。

緒 言

がんの化学療法剤はがん細胞を障害するのみならず正常細胞をも障害するので、その有効性と副作用は不可分である。一方、がんの免疫療法剤は殺細胞性の制がん剤にみられるような副作用を示さない。近年、中国では、種々の漢方方剤または生薬を単独あるいは化学療法剤と併用してがんの治療が試みられている。¹⁻⁴⁾ 一般に、これらの漢方方剤や生薬の作用は緩和であり、副作用は少ない。漢方療法の理論は生体の陰陽、気血、虚实、寒熱などを調節し、生体の諸機能を改善することにある。したがって、漢方方剤や生薬は直接的な抗腫瘍作用よりもむしろ腫瘍免疫を促進する可能性が考えられる。しかし、その抗腫瘍作用の科学的証明はほとんど行われていない。

本研究では、数種生薬の抗腫瘍作用をsyngeneicな宿主-腫瘍系であるBALB/c-Meth A腫瘍を用いて検討し、ついで、抗腫瘍作用が認められたものについては、その作用機序についても若干の検討を行った。

材料と方法

(1) 被検生薬：被検生薬はTable Iに示すような8種であり、喜樹以外の生薬は中国産のものを用いた。喜樹は岐阜薬科大学薬草園で栽培したものであり、その葉、皮および材を用いた。これらの材料から常法により水性エキスを作製した。

Table I Crude drugs used for the experiment.

<i>Artemisia capillaris</i> THUNB. (茵陳蒿)
<i>Selaginella doederleinii</i> HIERON. (石上柏)
<i>Atractylodes macrocephala</i> KOIDZ. (白朮)
<i>Sophora subprostrata</i> CHUN et T. CHEN (山豆根)
<i>Curcuma zedoaria</i> ROSC. (莪朮)
<i>Lithospermum erythrorhizon</i> SIEB. et ZUCC. (紫根)
<i>Sarcandra glabra</i> NAKAI (九節風)
<i>Camptotheca acuminata</i> DECNE. (leaf) (喜樹葉)
<i>Camptotheca acuminata</i> DECNE. (cortex) (喜樹皮)
<i>Camptotheca acuminata</i> DECNE. (timber) (喜樹材)

(2) 実験動物および培養細胞：8週齢雌性のBALB/c, BALB/c-nu/+およびBALB/c-nu/nuマウス(静岡実験動物センター)を用いた。細胞は

BALB/cマウスに腹水型で継代維持したMeth A腫瘍細胞および*in vitro*で維持したL-929細胞を用いた。

(3) 腫瘍移植および薬物投与：10⁶個のMeth A腫瘍細胞をBALB/cマウスの側腹部皮下に移植し、移植4日前から連続20日間、被検エキスの250または500 mg/kg/dayを経口投与した。腫瘍移植後5日ごとに腫瘍の大きさを測定するとともに、生存日数を観察した。腫瘍はノギスを用いて長径および短径を測定し、次式によって大きさを求めた⁵⁾。

$$\text{Tumor size (cm}^3\text{)} = \frac{4}{3} \pi \times \left(\frac{\text{長径}}{2}\right) \times \left(\frac{\text{短径}}{2}\right)^2$$

(4) 細胞培養：ミリポアフィルター(0.45μm)を用いて無菌化した被検薬物とともに2×10⁴個/wellのMeth AまたはL-929細胞を37℃、5% CO₂下で24時間あるいは48時間培養した。培養液は100U/ml penicillin G(明治製薬)および100μg/ml streptomycin(明治製薬)を加えたRPMI-1640(日水製薬)に10% ウシ胎児血清(Gibco)および0.6% N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic Acid (HEPES)を添加したものを用いた。培養後、Hank's Balanced Salt Solution(BSS)で2回洗浄し、伊藤ら⁶⁾の方法に従って、

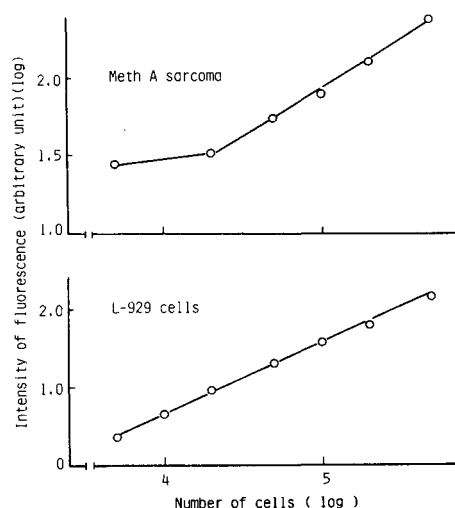


Fig. 1 Relationship between intensity of fluorescence and number of Meth A sarcoma and L-929 cells by fluorometric assay using ethidium bromide.

0.1% SDS 溶液の 2.0 ml を加えて細胞を溶解し、さらに、6 μ g/ml ethidium bromide 溶液の 2.0 ml を加えて蛍光強度 (Ex 525 nm, Em 600 nm) を測定した。あらかじめ Meth A および L-929 細胞を用いて作成した標準曲線 (Fig. 1) から細胞数を算出した。

(5) 統計：成績は Wilcoxon の U-test を用いて処理した。

結 果

1. BALB/c マウスに移植した Meth A 腫瘍に対する作用

BLAB/c マウスに移植した Meth A 腫瘍細胞の増殖は、Fig. 2 に示すように、茵陳蒿、石上柏、白朮および山豆根によって抑制された。その他の被検

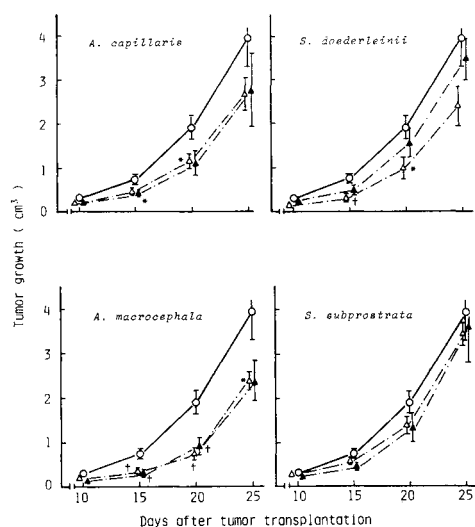


Fig. 2 Effect of *A. capillaris*, *S. doederleinii*, *A. macrocephala* and *S. subprostrata* on tumor growth in BALB/c female mice.

Animals, 8 weeks old, were transplanted with 10^6 cells of Meth A sarcoma s.c. into their flanks. Drugs were given p.o. for 20 days from 4 days before the tumor transplantation. Each point indicates the mean $\pm$ S.E. of 8 animals except for 6 animals in 500 mg/kg group of *S. doederleinii*.
○—○: control, △—△: 250 mg/kg, ▲—▲: 500 mg/kg. *, †: Statistical significance from the control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

エキスでは増殖抑制作用はみられなかった。すなわち、control 群に比して、茵陳蒿ではいずれの用量群ともに、石上柏では 250 mg/kg 群に、白朮ではいずれの用量群ともに有意な抑制作用がそれぞれみられた。また、山豆根では抑制傾向がみられた。この場合の宿主の生存期間は Fig. 3 に示すように、control 群に比して、茵陳蒿では 500 mg/kg 群に延命がみられ、石上柏では 500 mg/kg 群に有意な延命がみられた。白朮ではいずれの用量群ともに延命傾向がみられ、山豆根では 250 mg/kg 群に有意な延命がみられた。その他の被検エキスでは延命はみられなかった。

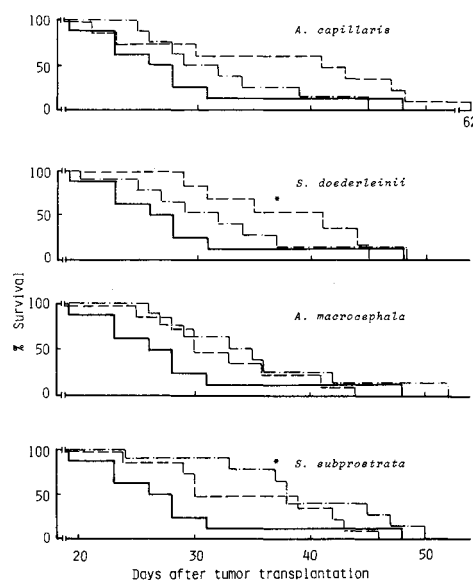


Fig. 3 Effect of *A. capillaris*, *S. doederleinii*, *A. macrocephala* and *S. subprostrata* on survival time of BALB/c female mice bearing Meth A sarcoma.

—: control, ---: 250 mg/kg, ···: 500 mg/kg.

*: Statistical significance from the control at $p < 0.05$.

2. Meth A および L-929 細胞に対する *in vitro* での細胞障害作用

in vivo で抗腫瘍作用を示した 4 種の被検エキスが直接的な腫瘍細胞障害作用を有するか否かについ

て検討した。 2×10^4 個/wellの細胞を培養した場合、control群では時間の経過とともに細胞数は増加し、48時間後ではMeth A細胞は 8.3×10^4 個に、L-929細胞は 5.7×10^4 個にそれぞれ増殖した。種々の濃度の被検エキスを培養液中に添加した場合、茵陳蒿ではMeth AおよびL-929細胞のいずれに対しても用量依存的な細胞増殖の抑制がみられ、50%増殖抑制濃度はいずれの細胞に対しても $1.25 \sim 2.5 \times 10^{-4}$ g/mlであった (Fig. 4)。石上柏でもMeth AおよびL-929細胞に対して用量依存的な増殖抑制がみられ、50%増殖抑制濃度はMeth A細胞に対しては $0.5 \sim 1.0 \times 10^{-3}$ g/mlであり、L-929細胞に対しては $1.0 \sim 1.5 \times 10^{-3}$ g/mlであった。(Fig. 5)。一方、白朮および山豆根では $5 \times 10^{-5} \sim 2.5 \times 10^{-3}$ g/mlの濃度でいずれの細胞に対しても増殖抑制作用はみられなかった。

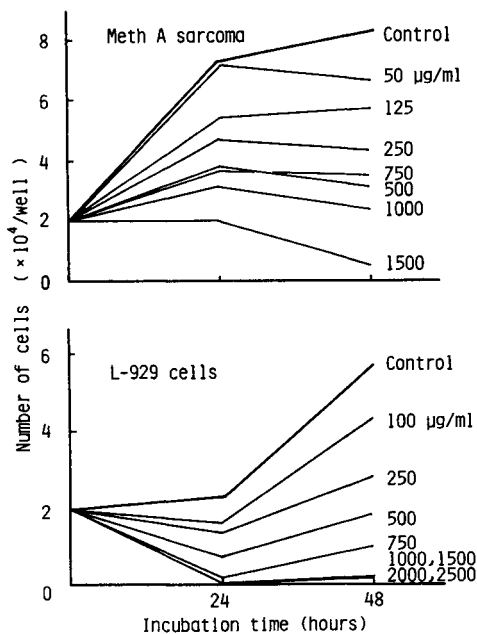


Fig. 4 Effect of *A. capillaris* on proliferation of Meth A sarcoma and L-929 cells *in vitro*.

Cells (2×10^4 /well) were incubated with various concentrations of *A. capillaris* in a well of microplate at 37°C for 24 and 48 hours. The measurement was carried out by fluorometric assay using ethidium bromide.

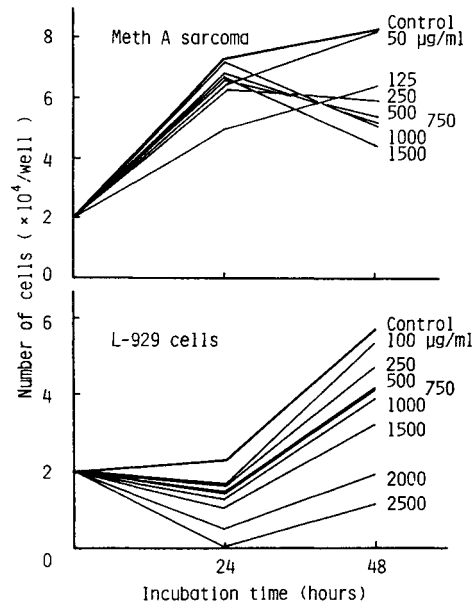


Fig. 5 Effect of *S. doederleinii* on proliferation of Meth A sarcoma and L-929 cells *in vitro*.

Cells (2×10^4 /well) were incubated with various concentrations of *S. doederleinii* in a well of microplate at 37°C for 24 and 48 hours. The measurement was carried out by fluorometric assay using ethidium bromide.

3. BALB/c-nu/nuおよびBALB/c-nu/+マウスに移植したMeth A腫瘍に対する作用

Meth A腫瘍細胞を移植したBALB/c-nu/nuマウスに茵陳蒿、石上柏、白朮または山豆根エキスの250 mg/kgを移植日の4日前から20日間投与し、移植後10および15日目の腫瘍増殖を測定した。茵陳蒿は10日目および15日目の腫瘍増殖を明らかに抑制し、その抑制作用の強さはFT-207の40 mg/kgの作用にほぼ匹敵した。その他の被検エキスは10日目では腫瘍増殖にほとんど影響を及ぼさず、15日目では軽度の抑制傾向を示した。一方、Meth Aを移植したBALB/c-nu/+マウスに対しては、いずれの被検エキスも10日目では抑制傾向を示し、特に白朮および山豆根は強い作用を示した。15日目では白朮および山豆根は有意な抑制作用を示し、これらの作用はFT-207のそれに比して強力であった (Fig. 6)。

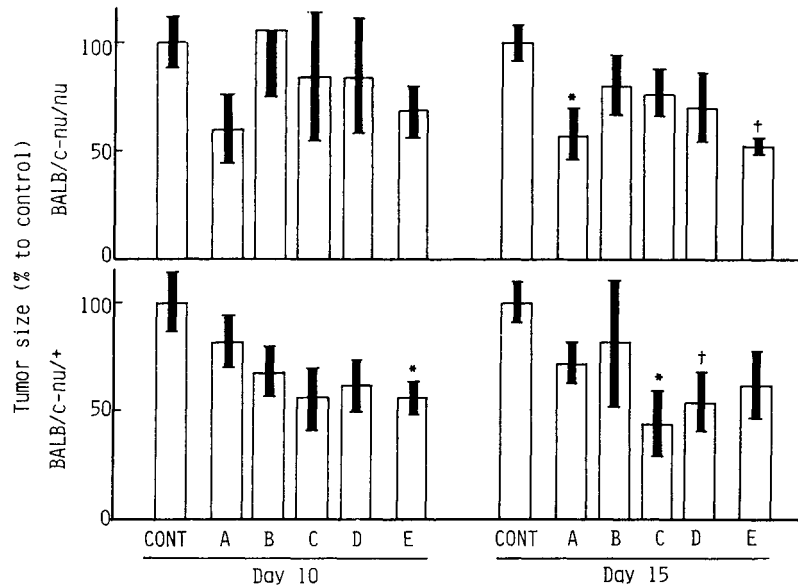


Fig. 6 Effect of *A. capillaris* (A), *S. doederleinii* (B), *A. macrocephala* (C), *S. subprostrata* (D) and FT-207 (E) on tumor growth in BALB/c-nu/nu and BALB/c-nu/+ female mice.

Animals, 8 weeks old, were transplanted with 10^6 cells of Meth A sarcoma s.c. into their flanks. Drugs (250 mg/kg for crude drugs and 40 mg/kg for FT-207) were given p.o. for 20 days from 4 days before the tumor transplantation. Each column represents the mean $\pm$ S.E. of 5 animals. The average tumor size of control group was 399 and 1582 mm³ in BALB/c-nu/nu mice, 272 and 477 mm³ in BALB/c-nu/+ mice 10 days and 15 days after tumor transplantation, respectively.

*, †: Statistical significance from the control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

考 察

漢方療法の歴史は古く、その中心をなすものは陰陽理論である。漢方方剤や生薬の作用は陰陽、虚実などを調節する、すなわち、生体機能の平衡を維持することにあると考えられている。しかし、これらの理論の科学的証明はほとんど行われていない。近年、漢方方剤や生薬の治療効果を科学的に裏付けするための研究が活発に行われるようになり、ある種の生薬は免疫系に作用することが報告されている。⁷⁻¹²⁾

本研究では、BALB/cマウスに移植した Meth A 腫瘍の増殖に対して茵陳蒿、石上柏、白朮および山豆根が抑制作用を示し、また、宿主の延命効果を示すことを認めた。Berendt *et al.*^{13,14)} は BALB/c マウスは Meth A 腫瘍に対して比較的強い抗腫瘍免疫

を惹起しうることを報告している。抗腫瘍作用を示した4種生薬のうちで白朮および山豆根は BALB/c-nu/+ 移植した Meth A 腫瘍に対しても強い抗腫瘍作用を示したが、*in vitro* で直接的な細胞障害作用を示さず、また、BALB/c-nu/nu マウスに移植した Meth A 腫瘍の増殖に対してもほとんど抑制作用を示さなかった。したがって、白朮および山豆根は T cell 依存性の腫瘍免疫を促進することにより抗腫瘍作用を示すことを示唆する。一方、茵陳蒿は直接的な細胞障害作用を示し、また、BALB/c-nu/+ マウスの場合と同様に BALB/c-nu/nu マウスにおいても明らかに Meth A 腫瘍の増殖を抑制した。したがって、茵陳蒿の抗腫瘍作用は直接的な腫瘍細胞障害作用によることを示唆する。石上柏は茵陳蒿に比して軽度ではあるが、直接的な細胞障害作用を示した。しかし、BALB/c-nu/nu マウスでは

抗腫瘍作用を示さなかった。したがって、その抗腫瘍作用は主として腫瘍免疫の促進により、これに直接的な腫瘍細胞障害性が一部加わることを示唆する。石上柏の抗腫瘍作用は他の3種に比して軽度であった。

現在、4種の生薬の抗腫瘍作用について、さらに詳細な検討を続行中である。

一方、本研究で用いた他の生薬の菝葜¹⁵⁾、紫根¹⁶⁾、九節風¹⁷⁾および喜樹¹⁸⁾についての抗腫瘍効果の報告があり、菝葜の有効成分は揮発油中に存在すること¹⁵⁾、また、喜樹の有効成分はalkaloidである¹⁸⁾ことなどについても報告されているが、本研究に用いたこれらの生薬エキスでは抗腫瘍作用はみられなかった。

本研究に用いた喜樹は岐阜薬科大学生薬学教室・水野瑞夫教授から提供されたものであり、その他の生薬は(株)津村順天堂より提供されたものである。

文 献

- 1) 江蘇新医学院編：山豆根，“中薬大辞典 上冊”，上海科学技术出版社，上海，p181-183，1977
- 2) 王 浴生主編：白花蛇舌草，“中薬薬理と応用”，人民衛生出版社，北京，p343-352，1983
- 3) 王 浴生主編：冬凌草，“中薬薬理と応用”，人民衛生出版社，北京，p360-370，1983
- 4) 王 浴生主編：青木香，“中薬薬理と応用”，人民衛生出版社，北京，p604-608，1983
- 5) 森 裕志，済木育夫，江田昭英： α -Mercaptopropionylglycine (α -MPG) および Sodium dipropylacetate (DPA) の抗体産生におよぼす影響 (第4報)，日本薬理学雑誌 74, 907-923, 1978
- 6) 伊藤喜久，深町 勇，中嶋克行，河合 忠，中野康平：ethidium bromide蛍光法による新しいリンパ球幼若化機能検定法，医学のあゆみ 126, 21-22, 1983
- 7) 志村圭志郎，伊藤 均：漢方方剤の補体活性系に対する作用とマクロファージに対する影響，漢方医学 8(4), 13-17, 1984
- 8) 伊藤 均，志村圭志郎：漢方方剤の抗腫瘍効果と細胞内皮系活性に及ぼす影響，漢方医学 8(5), 14-17, 1984
- 9) 北京結核病研究所同位素実験室：中薬対非特异性免疫作用的研究，新医学雑誌 1974年第8期，13-18
- 10) 駱 和生：中草薬と免疫，新医学通訊 1976年第3期，46-封3
- 11) 王 浴生主編：山豆根，“中薬薬理と応用”，人民衛生出版社，北京，p98-106，1983
- 12) 王 浴生主編：白朮，“中薬薬理と応用”，人民衛生出版社，北京，p326-330，1983
- 13) Berendt, M. J., North, R. J. and Kirstein, D. P.: The immunological basis of endotoxin-induced tumor regression. Requirement for T-cell-mediated immunity. *J. Exp. Med.* 148, 1550-1559, 1978
- 14) Berendt, M. J., North, R. J. and Kirstein, D. P.: The immunological basis of endotoxin-induced tumor regression. Requirement for a pre-existing state of concomitant anti-tumor immunity. *J. Exp. Med.* 148, 1560-1569, 1978
- 15) 王 浴生主編：菝葜，“中薬薬理と応用”，人民衛生出版社，北京，p870-875，1983
- 16) 江蘇新医学院編：紫根，“中薬大辞典 下冊”，上海科学技术出版社，上海，p2342-2346，1977
- 17) 王 浴生主編：九節風，“中薬薬理と応用”，人民衛生出版社，北京，p29-36，1983
- 18) 王 浴生主編：喜樹，“中薬薬理と応用”，人民衛生出版社，北京，p1142-1149，1983