

小柴胡湯水可溶成分における培養ヒト肝・胆道系癌細胞株  
に対する増殖抑制効果の検討

溝口 充志\*

久留米大学医学部第一病理教室

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

Atsushi MIZOGUCHI

*The First Department of Pathology, Kurume University School of Medicine**(Received January 27, 1992. Accepted May 25, 1992.)*

## Abstract

The direct effect of Sho-saiko-to on the growth of 11 human cancer cell lines established from the hepatobiliary system was examined *in vitro*. Dose-dependent inhibitory effect of Sho-saiko-to was identified in all cell lines, however, it was more predominant in adenocarcinoma cell lines. There was no relationship between the inhibitory effect and the degree of differentiation of cells in hepatocellular carcinoma cell lines. The mechanism of growth inhibition was investigated by flowcytometry using KIM-1 cells 48 hours after continuous contact with Sho-saiko-to, and it revealed the accumulation of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase. Sho-saiko-to also inhibited the secretion of  $\alpha$ -fetoprotein/10<sup>5</sup> KIM-1 cells in proportion to its concentration.

Thus, it was suggested that Sho-saiko-to might have some direct inhibitory effects on the growth and function of cancer cells.

**Key words** Sho-saiko-to, hepatocellular carcinoma, cell cycle, growth inhibitory effect.

**Abbreviations** AFP,  $\alpha$ -fetoprotein; BRM, biological response modifier; Sho-saiko-to (Xiao-Chai-Hu-Tang), 小柴胡湯.

## 緒 言

小柴胡湯は、柴胡、半夏、黄芩、大棗、人參、甘草および生姜などの植物由来の生薬を含む漢方薬であり、抗炎症作用、細胞膜の安定化作用、抗アレルギー作用、免疫賦活作用により各種慢性肝疾患の治療に用いられている<sup>1,3)</sup>。沖田<sup>4)</sup>らは、ラット実験肝癌において小柴胡湯が癌発生を抑制することを報告し、また、岡ら<sup>5)</sup>は小柴胡湯の肝細胞癌（肝癌）発生予防効果を検討するため、prospectiveに肝硬変患者を追跡、小柴胡湯投与群において肝癌の発生が有意に低かったと報告しており、chemoprevention

として、あるいは biological response modifier (BRM) としての小柴胡湯の有用性が注目されている。

近年、佐々木ら<sup>6)</sup>、李ら<sup>7)</sup>は小柴胡湯の癌細胞増殖抑制効果に注目し、小柴胡湯の薬効成分であるグリチルリチンやバイカレンのヒト肝癌細胞株 (HuH-7) に対する増殖抑制効果を報告している。しかし、小柴胡湯の全成分による増殖抑制効果についての報告は未だないようである。

今回、小柴胡湯に含まれるバイカレンやグリチルリチン等といった各成分による相乗・相加効果の働きでの抗腫瘍効果の増強を考慮にいれ、単一の成分ではなく小柴胡湯原末の水可溶性成分を用い、教室

\*〒 830 福岡県久留米市旭町67  
67 Asahi-machi, Kurume, Fukuoka 830, Japan

で独自に樹立に成功し、維持している組織型、及び分化度の異なる11種類のヒト肝胆道系癌細胞株に対する小柴胡湯の増殖抑制効果を検討したので報告する。

材料と方法

(1) 小柴胡湯添加培地の調製：細胞培養の基礎培地としては、ダルベッコ変法イーグル培地に5%の牛胎児血清、ペニシリン (100 U/ml) 及びストレプトマイシン (100 µg/ml) を加えたものを用いた。同培地に Fig. 1 に示すごとく、小柴胡湯 (TJ-9, 株式会社ツムラより供与) のエキス原末を 10 mg/ml の濃度になるように加え、エキス溶液から難溶成分を除いた遠心上清をとり実験に供した。この濃縮培地を同上の基礎培地で 10000, 2000, 1000, 400, 80, 20 µg/ml の6種類の濃度に調製し実験に供したが、そのうち 1000 µg/ml が小柴胡湯のヒトにおける1日常用量に相当する。各濃度の小柴胡湯添加培地及び非添加培地 (コントロール) の浸透圧、及び pH は Table I に示す通りである。なお、小柴胡湯添加培地は使用時毎に調製した。

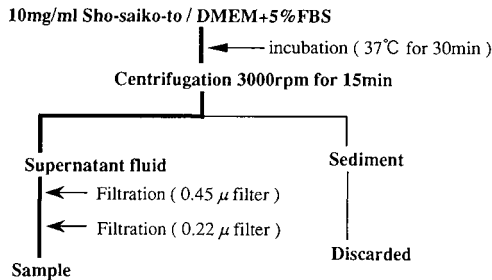


Fig. 1 Method for dissolution of Sho-saiko-to in a medium.

Table I Osmotic pressure and pH of DMEM +5% FBS containing various concentrations of Sho-saiko-to.

Concentration (µg/ml)	10000	2000	1000	400	80	20	0*
Osmotic pressure (mOsm/l)	305	293	290	292	287	285	287
pH	7.9	7.6	7.6	7.6	7.6	7.5	7.5

\*Control

(2) 細胞株の種類：実験に使用した癌細胞株は、何れも当教室で独自に樹立したもので、Table II に

Table II Original tumor and histologic characteristics of the cell lines used in the experiment.

Cell line	Original tumor	Character
KIM-1	HCC	mod.~well-diff.
KYN-1	HCC	mod.-diff.
KYN-2	HCC	mod.-diff.
KYN-3	HCC	mod.~poorly-diff.
HAK-1A*	HCC	well-diff.
HAK-1B*	HCC	poorly~mod. diff.
KMC-1	CCC	adenocarcinoma, mod.-diff.
KMBC	BDC	adenocarcinoma, mod.-diff.
KMG-C	GBC	adenocarcinoma, mod.-diff.
KMCH-1	CHC	HCC<adenocarcinoma#
KMCH-2	CHC	HCC>adenocarcinoma*
Fibroblast	Skin	normal fibroblast

\*Two different cell lines established from a single nodule of HCC showing a three-layer structure with three different histologic types. #the characteristics of adenocarcinoma are predominant *in vitro* \*the characteristics of HCC are predominant *in vitro* HCC: hepatocellular carcinoma; CCC: cholangiocellular carcinoma; BDC: extrahepatic bile duct carcinoma; GBC: gallbladder carcinoma; CHC: combined hepatocellular and cholangiocarcinoma; Well-diff.: well-differentiated; mod-diff.: moderately differentiated; poorly: poorly differentiated.

示すごとく肝癌株6種 (KIM-1,<sup>8)</sup> KYN-1,<sup>9)</sup> -2,<sup>10)</sup> -3,<sup>11)</sup> HAK-1A, -1B<sup>12)</sup>) 肝胆道系由来の腺癌細胞株3種 [肝内胆管癌株 (KMC-1<sup>13)</sup>), 肝外胆管癌株 (KMBC<sup>14)</sup>), 胆嚢癌株 (KMG-C<sup>15)</sup>)] 及び、混合型 (肝細胞癌・胆管細胞癌) 肝癌2種 (KMCH-1,<sup>16)</sup> -2<sup>17)</sup>) の11種類である。なお、混合型肝癌株のうち KMCH-1 は、より腺癌の性格を強く示し、KMCH-2 は、より肝癌の性格を強く示している。又、非癌細胞に及ぼす影響をみる目的で、皮膚真皮由来の線維芽細胞 (FibroPack, クラボウ) を用いた。

(3) 小柴胡湯の細胞増殖に及ぼす影響：上記12種類の細胞を6 well-plate (Falcon) に11日前後で confluent 状態になるように細胞数を調製、そのまま接種し、基礎培地で1日培養した。翌日に、6種類 (KYN-2 及び KYN-3 は4種類) の濃度の小柴胡湯添加培地、あるいは非添加培地とそれぞれ交換し、以後培地交換と Trypan-blue die exclusion test、一部は Coulter counter, ZM (Coulter Electronics, INC., FL.) による細胞数の算定を2日毎に11日目まで行なった。小柴胡湯の持続接触による細胞増殖抑制効果の判定は、コントロールの細胞数と各種濃度の小柴胡湯添加群の細胞数とを11日目に比

較し、50%以上の細胞数の減少を認めたものを有効と判定した。

また、cytotoxic濃度との関連を見る目的でKIM-1、KMC-1細胞株を用いて10000、2000、400  $\mu\text{g/ml}$ の濃度の小柴胡湯を添加させ、それぞれ48時間及び144時間の持続接触の後に小柴胡湯を含まない培養液と交換し細胞数の算定を2日毎に11日目まで上記の方法で行なった。

(4) 小柴胡湯のKIM-1細胞株の細胞周期に及ぼす影響：KIM-1細胞株をT-25 flaskに $2.0 \times 10^6$ 個ずつ接種し、24時間基礎培地で培養後400、2000  $\mu\text{g/ml}$ の濃度に調製した小柴胡湯添加培地と交換し、KIM-1株の細胞周期に与える影響を48時間の持続接触後にCYTRON (Ortho Japan)を用い、フローサイトメトリーにより検討した。即ち、Tris Bufferで細胞を洗浄後0.1% Triton X-100を用い

て裸核化し、RNase (Sigma) 添加後、Etidium bromide (Wako) によりDNAを染色後解析した。

(5) 小柴胡湯によるKIM-1細胞の $\alpha$ -fetoprotein (AFP) 分泌能に及ぼす影響：KIM-1細胞株のspent medium中に含まれるAFP量をradioimmunoassay法で測定し、その経時的变化を検討し、小柴胡湯によるKIM-1株単位細胞当たりのAFP分泌能に及ぼす影響をみた。

## 結果

### 1. 肝癌細胞株の増殖抑制効果

肝癌細胞株に対する増殖抑制効果は濃度依存性であったが、有効濃度は細胞間で異なり分化度と一定の関係は認められなかった。増殖抑制効果は、KIM-1でもっとも顕著で400  $\mu\text{g/ml}$ 以上 (Fig.

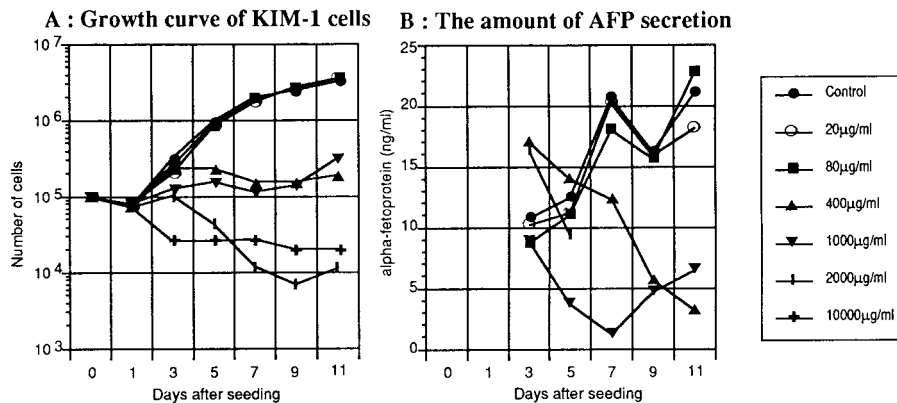


Fig. 2 Effects of Sho-saiko-to on the growth and AFP secretion in KIM-1 cells.

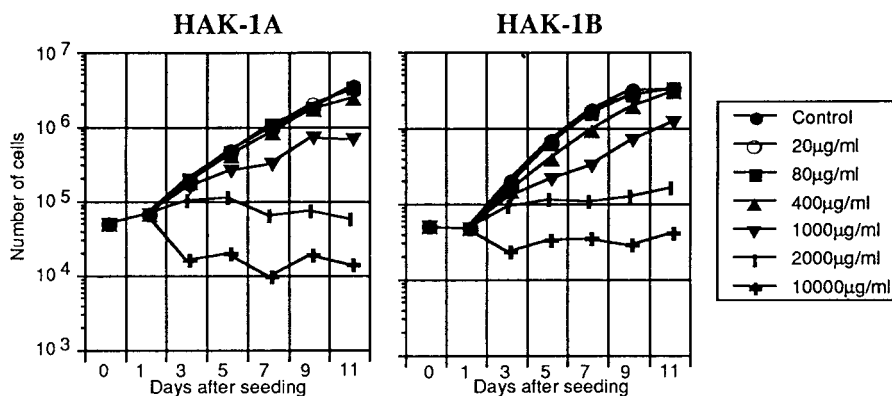


Fig. 3 Effect of Sho-saiko-to on the growth of HAK-1A and HAK-1B cells.

2A), その他 HAK-1A, -1B (Fig. 3), KYN-3 は 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上, KYN-1 2000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上, KYN-2 は 10000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のみで有効性が認められた (Table III)。

2. 肝胆道系由来腺癌細胞株の増殖抑制効果

肝内胆管癌株 KMC-1 (Fig. 4A) 及び肝外胆管癌株 KMBC では 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上で, 胆嚢癌株

KMG-C は 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上の濃度で増殖抑制効果を認めた (Table III)。

3. 混合型肝癌細胞株の増殖抑制効果

腺癌の性格がより強い KMCH-1 は 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上, 肝癌の性格がより強い KMCH-2 では 2000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上の濃度で増殖抑制効果を認めた (Fig. 5)。

4. 正常ヒト線維芽細胞に及ぼす影響

正常ヒト線維芽細胞では 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上で増殖抑制効果を認めた (Fig. 4B)。

5. KIM-1, KMC-1 細胞株における小柴胡湯の cytotoxic 濃度の検討

KIM-1, KMC-1 細胞株共に, 400, 2000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  において 48 時間持続接触後に小柴胡湯を除く事により, 持続接触の群に比較して細胞数の増加を認めしたが, 144 時間持続接触では持続接触の群に比較して優位な差は認めなかった (Fig. 6)。又 10000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  では 48 時間持続接触後に小柴胡湯を除いても 400, 2000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のような細胞数の増加は認められなかった。

6. KIM-1 細胞株の細胞周期に及ぼす影響

KIM-1 細胞では, S 期の細胞が減少し,  $G_0/G_1$  期の細胞が増加していた。又, 全細胞数もコントロールに比べ 43% に減少していた (Fig. 7)。なお, 小柴胡湯濃度 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で培養した KIM-1 細胞の解析では, コントロールとの間に差は認めなかった。

Table III Effect of Sho-saiko-to on the growth of various tumor cell lines.

	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )					
	20	80	400	1000	2000	10000
KIM-1	102	103	6.3	9.5	0.3	0.6
KYN-1	104	100	85	68	1.9	0.4
KYN-2	85	93	100	112	94.3	1.3
KYN-3	-	-	86	32	16.7	1.0
HAK-1A	91	90	68	18	1.5	0.4
HAK-1B	100	97	95	36	4.7	1.2
KMC-1	110	85	0.8	0.5	0.2	0.2
KMG-C	104	96	58	15	1.2	0.2
KMBC	116	68	23	5.5	2.0	0.5
KMCH-1	111	109	75	16	3.2	0.4
KMCH-2	109	104	103	78	17	1.1
Fibroblast	68	58	42	17	5.1	2.4

Each value is the ratio (%): the number of viable cells cultured with Sho-saiko-to is divided by the number of control cells.

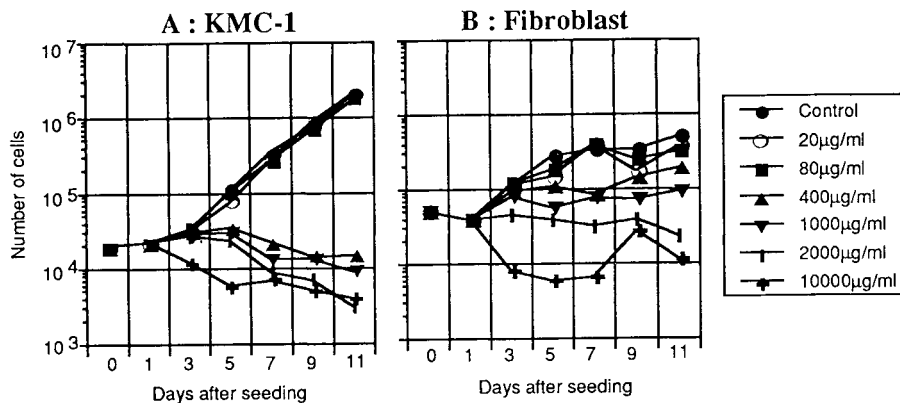


Fig. 4 Effect of Sho-saiko-to on the growth of KMC-1 and fibroblast cells.

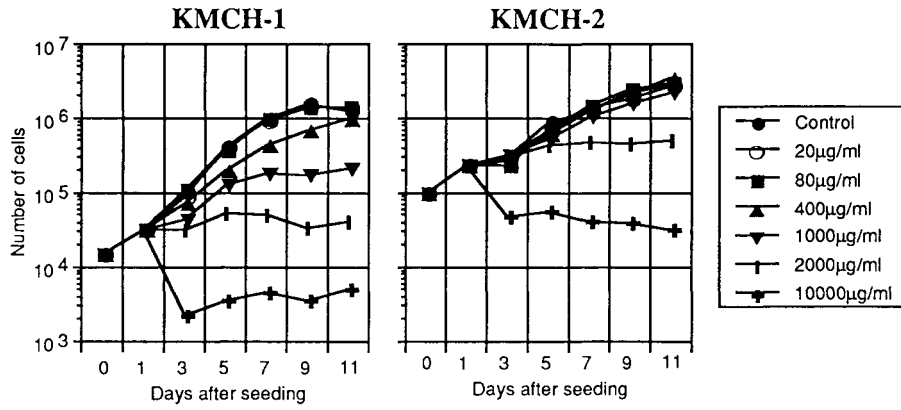


Fig. 5 Effect of Sho-saiko-to on the growth of KMCH-1 and KMCH-2 cells.

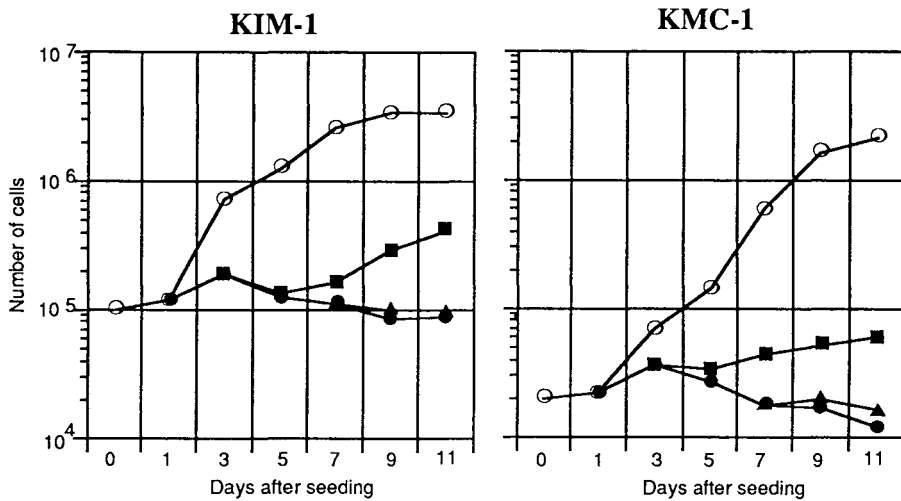


Fig. 6 Regrowth of cancer cells after the replacement of Sho-saiko-to-containing medium (2000 µg/ml) with basic medium.

Sho-saiko-to-containing medium was replaced with basic medium 48 hours (■) or 144 hours (▲) after initial contact (day 1). Open circles (○) and closed circles (●) represent the number of cells cultured with basic medium only and those continuously cultured with Sho-saiko-to-containing medium, respectively.

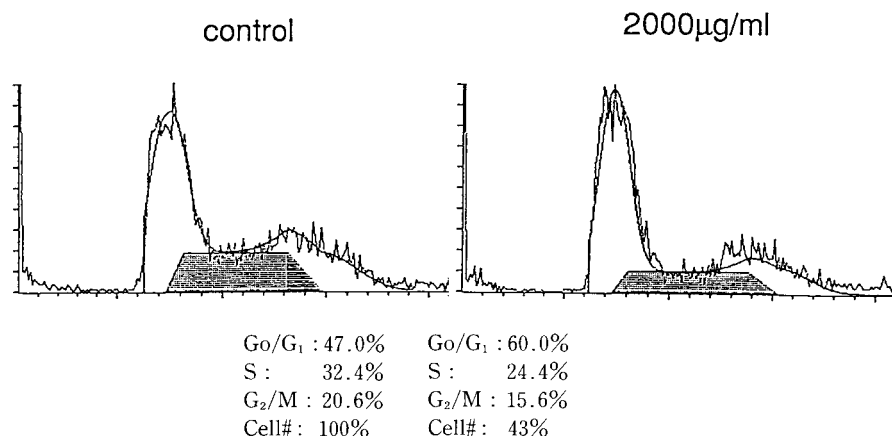


Fig. 7 Flow cytometric analysis of KIM-1 cells 48 hours after adding Sho-saiko-to.

#### 7. 小柴胡湯による KIM-1 細胞株の AFP 分泌能に及ぼす影響

KIM-1 細胞株は、小柴胡湯濃度 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上で増殖抑制効果を認め、10 万個当たりの AFP 分泌量は、20 及び 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ではコントロールとほぼ同様に細胞増殖に伴い増加を認めた。しかし、増殖抑制効果を認める小柴胡湯濃度 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上では、KIM-1 細胞の 10 万個当たりの AFP 分泌量は低下した。また、2000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  では 7 日目、10000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  では 3 日目より AFP 分泌量は微量のため検出不能となった (Fig. 2B)。

#### 考 察

小柴胡湯のヒト癌細胞株に対する *in vitro* での増殖抑制効果の検討は、その薬効成分であるグリチルリチンやバイカレンを用いたヒト肝癌細胞株 (HuH-7) についての報告があるが<sup>6)</sup> 組織型、及び分化度の異なる肝胆道系細胞株に対する、小柴胡湯による検討は今まで報告がない。小柴胡湯は、今回検索した 11 種類のヒト肝胆道系癌細胞株に対して濃度依存性に増殖抑制効果を示した。又、同様に小柴胡湯は 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上の濃度で正常ヒト線維芽細胞に対しても増殖抑制効果を示した。しかし、その増殖抑制の程度は 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度での線維芽細胞数がコントロールの細胞数の約 42% であったのに対して、同濃度で有効性が認められた KIM-1、KMC-1 および KMBC の 3 株においては約 1 ~ 23% と、より細胞数が減少しており、癌細胞株が

より高い感受性を示している。しかし、小柴胡湯がラットにおける実験的な肝線維化を直接的に抑制するという報告があり<sup>18)</sup> 小柴胡湯は線維芽細胞に対し選択的な増殖抑制効果を有している事も考えられる。そのため、今後非癌細胞に対する小柴胡湯の影響については、肝細胞をはじめ、他の細胞を用いるべきであるとも考えられる。

6 種の肝癌細胞株では、小柴胡湯の増殖抑制効果は各細胞株間で異なり、組織分化度とは一定の関係は認められなかった。特にこの中で、HAK-1A、-1B の 2 種の肝癌細胞株は当教室の矢野ら<sup>12)</sup> が 3 種の分化度の異なる癌組織から成る、単一癌結節から樹立した 2 種の分化度の異なる細胞株であり、同一個体より樹立され分化度のみが異なるという条件から考えると、分化度の違いによる増殖抑制効果を比較するには最適な細胞株と考えられる。この 2 つの株間の増殖抑制効果に大きな違いを認めなかったことは、小柴胡湯の増殖抑制効果は組織分化度とは無関係であることを支持する結果と考えられる。

肝癌細胞株よりも腺癌細胞株により高い増殖抑制効果を認める傾向にあり、この事は混合型肝癌細胞株 KMCH-1 と KMCH-2 において、肝癌の性格がより強い KMCH-2 株よりも、腺癌の性質がより強い KMCH-1 株により高い増殖抑制効果を認めた事とも相まり興味深い結果である。なお、KYN-1、KYN-2 癌細胞株のように、組織型、及び分化度が同じであるにもかかわらず、増殖抑制効果に違いがみられたことは癌細胞の小柴胡湯に対する感受性に heterogeneity があることが推察される。小柴胡湯

の癌細胞株に対する増殖抑制効果の臓器特異性、及び組織特異性について、今後種々の細胞株を用いて更に検討してみる必要がある。また、方法を変えてMTT-assay法にて再現性の確認を行なっているがほぼ同様の結果を認めている。

cytotoxic濃度との関係について、3種類の濃度の小柴胡湯添加培地で一定期間培養後に小柴胡湯を含まない培養液と交換し検討を行なった。400, 2000  $\mu\text{g/ml}$  では48時間持続接触の後、小柴胡湯を除くとKIM-1, KMC-3細胞株共に細胞数の増加を認めただのに対して10000  $\mu\text{g/ml}$  では持続接触群と変化なく細胞数の増加は認めなかった。このことはcytotoxicとして働く小柴胡湯の濃度は2000  $\mu\text{g/ml}$  から10000  $\mu\text{g/ml}$  の間にあると考えられる。しかし400, 2000  $\mu\text{g/ml}$  においても144時間持続接触では小柴胡湯を除いても優位な細胞数の増加を認めなかった。これは10000  $\mu\text{g/ml}$  で認められた浸透圧等の原因により急激に生じるcytotoxicとしての作用とは異なり、細胞周期における $G_0/G_1$ での抑制や未だ解明されていない小柴胡湯の増殖抑制作用が長期接触により完全に癌細胞の増殖能を抑制した可能性が示唆される。

今回著者は、小柴胡湯の水可溶性成分を実験に用いたが、11種類中8種類の細胞株に対して増殖抑制効果を示した1000  $\mu\text{g/ml}$  という濃度は、ヒトの1日服用量の小柴胡湯が100%吸収されたとした場合の濃度に相当する。佐々木ら<sup>6)</sup>が用いたグリチルリチンや李ら<sup>7)</sup>が用いたバイカレンの癌細胞増殖抑制有効濃度は小柴胡湯1日服用量中の成分濃度の、それぞれ数十倍の濃度に相当することを考慮すると、小柴胡湯では比較的低濃度で増殖抑制効果を認めたことになり、グリチルリチンやバイカレンをはじめとする各種成分による相加あるいは相乗効果の可能性が考えられる。しかし、実際にヒトに投与される場合には、一日量を3分し投与されること、体内で代謝されることを考えると、本研究でみられた増殖効果をそのまま*in vivo*の状態に当てはめることはできないだろう。

小柴胡湯による癌細胞増殖抑制の機序の解析において、今回の実験で特に効果を認めたKIM-1細胞を用いてフローサイトメーターによる解析を行ない、2000  $\mu\text{g/ml}$  の小柴胡湯の48時間持続接触により、DNAヒストグラムにてS期の減少を認め、細胞周期における $G_0/G_1$ での抑制が示唆され、小柴胡湯が細胞周期に抑制を与え、癌細胞増殖抑制に関与しているものと考えられた。一方、400  $\mu\text{g/ml}$  の小柴胡湯の48時間持続接触におけるDNAヒスト

グラムではコントロールに比べ優位な差は認めなかった。しかし、Fig. 2Aに示す様に2000  $\mu\text{g/ml}$  の小柴胡湯添加では48時間で増殖抑制を生じるのに対し、400  $\mu\text{g/ml}$  では増殖抑制が48時間以後に遅れて生じており48時間目のヒストグラムではコントロールに比べて差は認めなかったと考えられる。佐々木ら<sup>6)</sup>もグリチルリチンのHuH-7株に対する持続接触後に、同様の傾向を認めている。また、李ら<sup>7)</sup>はpropidium iodineとbromodeoxyuridineでHuH-7細胞を2重染色し、バイカレンの持続接触後にS期細胞のDNA合成能の著名な抑制を報告している。また、他の増殖抑制メカニズムとして高濃度の小柴胡湯添加により、大部分の癌細胞が早期に死滅することから、小柴胡湯自体の殺細胞効果の存在も示唆され、この事は、これまで数多く検討されているBRMとしての癌細胞の増殖抑制に対する間接的效果<sup>19)</sup>のほかに、直接的効果も存在することが考えられた。

癌細胞の分化誘導、及び細胞増殖抑制と共にAFP産生も減少し、AFP産生と細胞増殖間には密接な関係のあることが言われている<sup>20)</sup>。形態的及び機能的にも定型的な肝癌細胞株であり、比較的高濃度のAFPを培養上清中に分泌するKIM-1細胞株において、400  $\mu\text{g/ml}$  以上の小柴胡湯濃度で細胞増殖抑制のみでなく、単位細胞当たりのAFP分泌量も低下を認めたことは、小柴胡湯が、癌細胞の機能も抑制することが示唆された。

本研究により、小柴胡湯が直接的な癌細胞増殖抑制効果を有することが明らかになったが、その効果は、肝癌に特異的なものでないことから、今後さらに多くの癌細胞を用いた研究が必要と考える。また、*in vivo*においても*in vitro*同様の増殖抑制効果が証明されれば今後の癌治療に大きな光明をもたらすことが期待される。

## 結 論

小柴胡湯は検索したすべての肝胆道系癌細胞株に対して濃度依存性に癌細胞増殖抑制効果を示した。特に胆嚢・胆道系腺癌細胞株に優位な傾向にあったが、肝細胞癌株の分化度の違いによる細胞増殖抑制効果に差はなかった。作用機序としては細胞周期における $G_0/G_1$ での抑制が示唆された。またAFP産生能をもつ肝細胞癌株KIM-1において、単位細胞あたりのAFP分泌能も濃度依存性に減少させた。以上より小柴胡湯は癌細胞に対して直接的増殖抑制効果を示す事が示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導御校閲を賜りました久留米大学第一病理学教室・神代正道教授、本研究の機会を与えていただきました第1内科・大泉耕太郎教授、貴重な御助言を賜りました山口大学第1内科・沖田極教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、直接御指導頂きました矢野博久講師、家村昭日朗先生、研究の補助をして頂いた松尾穂津美、小笠原幸子さんに深謝致します。さらに、小柴胡湯を供与して頂きました株式会社ツムラに感謝致します。

## 文 献

- 1) 溝口靖紘：小柴胡湯の免疫賦活，ホルモンおよび抗炎症作用。消化器科 **12**, 143-151, 1990.
- 2) 各務伸一，藤 明彦：ヒト末梢血リンパ球のIFN  $\gamma$  産生誘導に対する小柴胡湯の効果。和漢医薬学会誌 **4**, 219-222, 1987.
- 3) Abe, H., Sakaguchi, M. and Odashima, S.: Protective effect of saikosaponin-d isolated from *Bupleurum falcatum* L. on ccl<sub>4</sub>-induced liver injury in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* **320**, 266-271, 1982.
- 4) 沖田 極，黒川典江，山崎隆浩：小柴胡湯による肝発癌の可能性。消化器科 **12**, 152-156, 1990.
- 5) 岡 博子，山本祐夫，黒木哲夫，溝口靖紘，小林殉三，貫野 徹，丸毛俊明，中尾昌弘，針原重義，小林雄一，宗 健二，金 守良，門奈丈之：BRMによる肝硬変患者からの肝細胞癌発症予防の試み。診断と治療 **2**, 453-457, 1989.
- 6) 佐々木功典，村上知之，小賀厚徳，高橋 学，沖田極：ヒト肝癌細胞 HuH-7 の増殖ならびに  $\alpha$ -フェトプロテイン産生に及ぼすグリチルリチンの影響。BIOTHERAPY **6**, 1515-1518, 1989.
- 7) 李 千，沖田 極，村上知之：小柴胡湯に含まれる薬効成分バイカ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.
- 8) 村上龍夫：ヒト肝細胞癌細胞株 (KIM-1) の樹立と性状。肝臓 **25**, 532-539, 1984.
- 9) Yano, H., Kojiro, M. and Nakashima, T.: A new human hepatocellular carcinoma cell line (KYN-1) with a transformation to adenocarcinoma. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **22**, 637-646, 1986.
- 10) Yano, H., Maruiwa, M., Murakami, T., Fukuda, K., Ito, Y., Sugihara, S. and Kojiro M.: A new human pleomorphic hepatocellular carcinoma cell line, KYN-2. *Acta Pathol. Jpn.* **38**, 959-966, 1988.
- 11) 村上龍夫，丸岩昌文，福田一典，神代正道：肝癌患者腹水より樹立された肝細胞癌株 (KYN-3) の性状。第47回日本癌学会総会記事，p 292, 1988.
- 12) 矢野博久，家村昭日朗，溝口充志，神代正道：Nodule 像を呈した肝細胞癌結節より樹立した2種の性状の異なるヒト肝細胞癌 HAK-1A, HAK-1B. 第50回日本癌学会総会記事，p 174, 1991.
- 13) Iemura, Maruiwa, M. and Yano H.: Establishment and characterization of new human cholangiocellular carcinoma cell line (KMC-1). *J. Hepatol.* in press
- 14) Yano, H., Maruiwa, M., Iemura A., Mizoguchi A., and Kojiro M.: Establishment and characterization of a new human extrahepatic bile duct carcinoma cell line (KMBC). *Cancer* **69**, 1664-1673, 1992.
- 15) Maruiwa, M.: Establishment of a new human gallbladder carcinoma cell line (KMG-A) from an alpha-feto-protein producing gallbladder carcinoma transplanted into nude mice. *Kurume Med. J.* **34**, 133-142, 1987.
- 16) Murakami, T., Yano, H., Maruiwa, M., Sugihara, S. and Kojiro, M.: Establishment and characterization of a human combined hepatocholangiocarcinoma cell line and its heterologous transplantation in nude mice. *Hepatology*. **7**, 551-556, 1987.
- 17) 矢野博久，村上龍夫，家村昭日朗，神代正道：ヒト混合型肝癌細胞株 (KMCH-2) の樹立とその性状。第26回日本肝臓学会総会記事，p128, 1990.
- 18) Amagaya, S., Hayakawa, M., Ogihara, Y. and Fujiwara K.: Effect of Sho-saiko-to and Dai-saiko-to on experimental hepatic fibrosis in rats. 和漢医薬学会誌 **5**, 137-145, 1988.
- 19) 溝口靖紘，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.
- 20) Sasaki, K., Ogino, T. and Kawasaki S.: Distribution of  $\alpha$ -fetoprotein-producing cells and proliferating cells in human hepatoma cells transplanted into athymic mice. *Tumor Biol.* **8**, 181-185, 1987.