

マウスの乳腺発育および関連形質に対する 紅景天 (*Rhodiola sachalinensis* A.Bor.) の影響

長澤 弘,^{a)}浅井さやか,^{a)} 稲富 秀夫^{b)}

明治大学農学部 ^{a)}実験動物学研究室, ^{b)}天然物有機化学研究室

Effects of Hong-jing-tian (*Rhodiola sachalinensis* A.Bor.) on mammary gland and related parameters in mice

Hiroshi NAGASAWA,^{a)} Sayaka ASAI^{a)} and Hideo INATOMI^{b)}

^{a)}Experimental Animal Research Laboratory, ^{b)}Laboratory of Natural Products Chemistry, Meiji University

(Received October 15, 1998. Accepted January 13, 1999.)

Abstract

The effects of Hong-jing-tian (HJT : *Rhodiola sachalinensis* A. Bor.) on mammary gland and related parameters were examined in SHN mice developing spontaneous mammary tumours. Free access to water-extract of HJT as drinking water (0.5 %) for 12 days resulted in the suppression of the growth of precancerous mammary hyperplastic alveolar nodules, the mammary tumour expression of transforming growth factor α mRNA and an increased necrosis of tumour cells, which was associated with the elevation of blood glutamic-oxaloacetic transaminase level. These would cause the partial inhibition by HJT of mammary tumour growth observed in this study. HJT treatment decreased urea nitrogen level in the circulation. Furthermore, the blood cholesterol level declined and the free fatty acid level was increased by HJT. These suggest that HJT can normalize or stimulate the kidney function and fat metabolism and these systemic effects of HJT may also contribute to its inhibition of the growth of mammary tumours and of uterine adenomyosis, which was also found in this study.

Key words blood components, Hong-jing-tian, mice, mammary gland.

緒 言

紅景天 (Hong-jing-tian ; *Rhodiola sachalinensis* A. Bor.) は、主に中国の長白山系に生育する多年生高山植物で、生理機能の正常化、すなわち心身の疲労回復、酸欠抵抗性増加、物質代謝促進、不妊改善作用などがうかがわれ、^{1,2)} 民間では保健滋養強壮のために紅景天酒などとして利用されているが、その作用および作用機序は不明なところが多い。

我々は、中国産生薬を含む種々の天然生理活性物質の乳腺および子宮に対する作用と作用機序を検討してい

る³⁻³⁰⁾が、その一環として本研究は、紅景天の乳腺の発育およびそれに関連するいくつかのパラメータに対する影響を検討したものである。

材料と方法

(1) 試料：紅景天の根茎を当研究室における定法⁹⁾に従い、熱水で繰り返し抽出、乾固し、(抽出率 約 14.5 %) その 5 g を水道水 1 l に溶かし (0.5 %), 試料とした。

(2) 動物：乳癌早期高発系 SHN 未経産雌マウス³¹⁾を用いた。週 2 回触診により乳癌 (adenocarcinoma) の発生を調べ、その直径が 4.0-7.0 mm になった個体を実験

*〒214-8571 神奈川県川崎市多摩区東三田1-1-1
1-1-1, Higashimita, Tama-ku, Kawasaki, Kanagawa,
214-8571, Japan

に使用した。実験群には試料 (7.1 ± 2.2 g/日/匹) を、対照群には水道水をそれぞれ自由摂取させ、12 日間投与後供試した。

実験期間中、マウスは床敷 (クリーンチップ: 日本クレア, 東京) を敷いたアルミニウム製ケージ ($18 \times 30 \times 16$ cm) に 2-4 匹ずつ収容し、固形飼料 (Lab MR Breeder: 日本農産, 横浜) を自由摂取させた。実験期間中、マウスは週 2 回床敷交換および給水瓶の洗浄、飲水の交換を行い、室温 $22-23^\circ\text{C}$ 、相対湿度 60-70 %, 換気回数 16 回/時間、14 時間照明 (5:00-19:00) の無窓動物室で飼育した。

(3) 乳腺の発育: 片側胸部第三乳腺のホールマウント標本を作製し、10 倍下で鏡検した。正常乳腺の乳腺胞の形成度は 1-7 に rating し、また乳管の発育は乳腺全体の面積として表した。さらに乳腺の前癌症状である HAN (mammary hyperplastic alveolar nodules)^{32,33)} の数および面積を測定し、それぞれ HAN の形成度、および増殖の指標とした。これら正常乳腺および HAN の測定方法は前報¹⁴⁾と同じである。

(4) 乳癌の増殖率: 乳癌の大きさを 0 (実験開始時)、3, 6, 9, 12, (供試日) 日に測定した。癌の大きさは 2 長径の幾何平均で表し、その増殖率を次式により求めた。

$$\text{増殖率}(\%) = \frac{(\text{測定日の癌の大きさ}) - (\text{実験開始日の癌の大きさ})}{\text{実験開始日の癌の大きさ}} \times 100$$

(5) 乳癌および正常乳腺における成長因子の発現: 供試時に採取後、直ちに -70°C に保存された乳癌および両側鼠経部正常乳腺を用い、AGPC 法³⁴⁾により全 RNA を抽出した。

TGF α mRNA, EGFR mRNA の発現は RT-PCR 法により検出し、その発現量は、 β -Actin mRNA 量を基準に TGF α/β -Actin, EGFR/ β -Actin として表した。

cDNA ライブラリーの合成は、RAV-2 reverse transcriptase (Takara, 京都) と Random Primer (Takara, 京都) を用い、反応は、1 サイクル 42°C -60 分、 95°C -5 分の条件で行った。PCR 反応は、Taq DNA polymerase (Takara, 京都) を用い、反応は、1 サイクル 95°C -1 分、 55°C -1 分、 72°C -1 分の条件で 45 サイクル行った。最初のサイクルの前に 95°C で 2 分、最後のサイクルでは伸長反応を 10 分行った。PCR 産物は、エチジウムブロマイド染色した 2 % アガロースゲルで電気泳動後、コンピューターソフト Multi-Analyst (Bio-rad, Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, USA) によって解析した。

TGF α mRNA および EGFR mRNA のプライマーは、Nagasawa *et al.*³⁵⁾ と同様のものを、また β -Actin mRNA のプライマーは、Harigaya *et al.*³⁶⁾ と同様のもの

を用いた。

(6) 子宮腺筋症: 供試時に片側子宮角を Bouin 液で固定、包埋し、 $6 \mu\text{m}$ の連続切片を作製、ヘマトキシリン・エオジン染色し、腺筋症の発生と増殖度 (子宮腺の筋層への浸潤の程度) を Mori and Nagasawa の方法³⁷⁾により 1-5 に rating した。

(7) 臓器重量: Table II に示す 10 臓器の供試直後の湿重量を測定した。

(8) 血液生化学的検査: 実験開始 12 日目の供試直前にエーテル軽麻酔下で、頸動脈切断採血、室温に 6 時間、 4°C で 20 分間遠沈 (3000 rpm) し、血清は -20°C に保存した。血清中の成分は簡易生化学分析システム (ABAX IS EA: 第一化学薬品, 東京) によって測定した。

(9) 血清遊離脂肪酸レベル: 上記保存血清の一部を用い、アシル CoA 法 (NEFA C- テストキット: 和光純薬, 大阪) により測定した。

(10) 統計処理: 対照群と実験群の間の測定値の有意性は Student's-*t* 検定、あるいは χ^2 - 検定によった。

結 果

1. 乳腺の発育 (Table I)

正常乳腺の乳腺胞の形成度 (rating) においては実験群と対照群の間に明らかな差は認められなかった。また前癌症状である HAN の数には明らかな差は認められなかったが、その成長速度の指標である面積は実験群において明らかに抑制された。

Table I Normal and preneoplastic mammary gland growth in each group (Mean $\pm$ S.E.M.).

	Number of estimates	Rating	HAN	
			Number	Area (mm ²)
Control	11	3.0 ± 0.3	13.0 ± 1.8	1.4 ± 0.4
Experimental	11	2.7 ± 0.2	12.8 ± 1.4	$0.8 \pm 0.1^*$

*Significantly different from the control at $p < 0.05$.

2. 乳癌の増殖 (Figure 1)

紅景天投与群は対照群より増殖率が低く推移し、12 日目における乳癌増殖率は実験群 109 %, 対照群 90 % であったが、有意な差は認められなかった。

3. 乳癌および正常乳腺における成長因子の発現 (Figure 2)

乳癌における TGF α mRNA の発現量は、対照群に比べ有意に低かったが、EGFR mRNA の発現量には明らかな差は認められなかった。一方、正常乳腺においては、

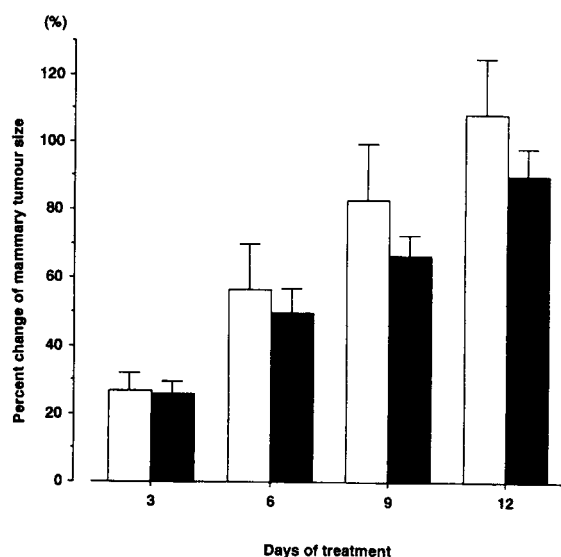


Fig. 1 Mammary Tumour growth in each group (Mean $\pm$ S.E.M.).
 □, Control (n=14); ■, Experimental (n=11). The control group was given tap water and the experimental group received HJT in drinking water at the concentration of 0.5%. There is no significant difference in the percent change of mammary tumour size between groups.

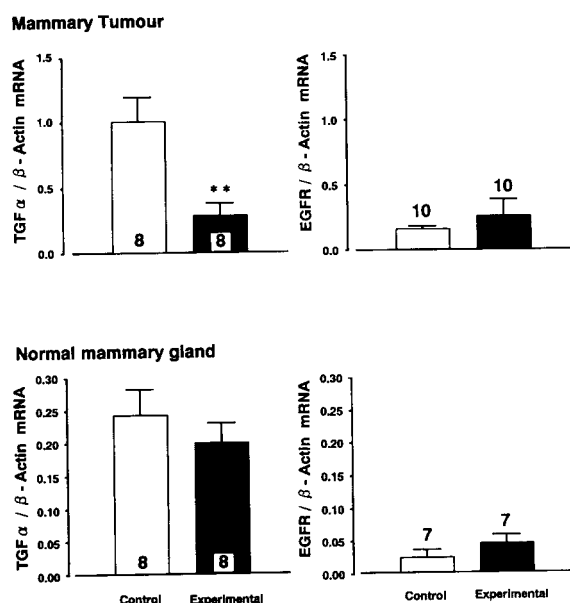


Fig. 2 TGF α and EGFR mRNA expressions in the mammary tumour and mammary gland in each group (Mean $\pm$ S.E.M.). Number of estimates is in each column. **Significantly lower than the control at $p < 0.01$.

どちらの発現量にも明らかな差は認められなかった。また、TGF α および EGFR mRNA の発現量は、正常乳腺に比べ乳癌で若干高い傾向が見られた。

4. 子宮腺筋症

腺筋症の発生率は対照群では 45% (11 例中 5 例)、実験群では 21% (14 例中 3 例) で、統計的に有意ではないが実験群で抑制される傾向が認められた。また増殖率は対照群、実験群でそれぞれ 4.2 ± 0.6 , 3.3 ± 0.3 であった。

5. 臓器重量 (Table II)

乳癌重量、および下垂体前葉、副腎、胸腺、卵巣、脾臓、心臓、肺、腎臓、膵臓の重量において群間に明らかな差は見られなかった。肝臓重量においては、実験群では対照群より有意に低かった。

6. 血液生化学成分 (Figure 3)

実験群の urea nitrogen レベルは、対照群より有意に低かった。また統計的に有意ではないが、実験群の cholesterol レベルは対照群より若干低く、glutamic-oxaloacetic transaminase レベルは高い傾向が見られた。その他の成分では群間に明らかな違いは認められな

Table II Body and organ weights in each group (Mean $\pm$ S.E.M.).

	Control	Experimental
Number of estimates	11	14
Age (month)	11.7 $\pm$ 0.8	11.1 $\pm$ 0.7
Body weight (g)	30.2 $\pm$ 0.4	31.2 $\pm$ 0.6
Mammary tumour weight (g)	1.0 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.2
Organ weight (mg)		
Anterior pituitary	1.9 $\pm$ 0.2 (1.9 $\pm$ 0.2) ^a	2.1 $\pm$ 0.3 (1.9 $\pm$ 0.3)
Adrenal	12.4 $\pm$ 0.4 (11.9 $\pm$ 0.4)	13.0 $\pm$ 0.4 (12.2 $\pm$ 0.4)
Thymus	25.8 $\pm$ 1.9 (24.9 $\pm$ 2.0)	27.4 $\pm$ 2.1 (25.8 $\pm$ 2.1)
Ovary	29.0 $\pm$ 2.8 (27.9 $\pm$ 2.7)	26.9 $\pm$ 1.9 (25.1 $\pm$ 1.7)
Spleen	111 $\pm$ 11 (106 $\pm$ 10)	131 $\pm$ 25 (123 $\pm$ 25)
Heart	144 $\pm$ 4 (138 $\pm$ 3)	144 $\pm$ 13 (134 $\pm$ 10)
Lung	257 $\pm$ 12 (246 $\pm$ 11)	269 $\pm$ 14 (252 $\pm$ 14)
Kidney	344 $\pm$ 12 (330 $\pm$ 10)	343 $\pm$ 10 (320 $\pm$ 7)
Pancreas	433 $\pm$ 39 (413 $\pm$ 35)	433 $\pm$ 22 (402 $\pm$ 16)
Liver	1582 $\pm$ 56 (1518 $\pm$ 51)	1499 $\pm$ 56 (1395 $\pm$ 34)*

^aRelative weights per 30 g body weight.

*Significantly different from the control at $p < 0.05$.

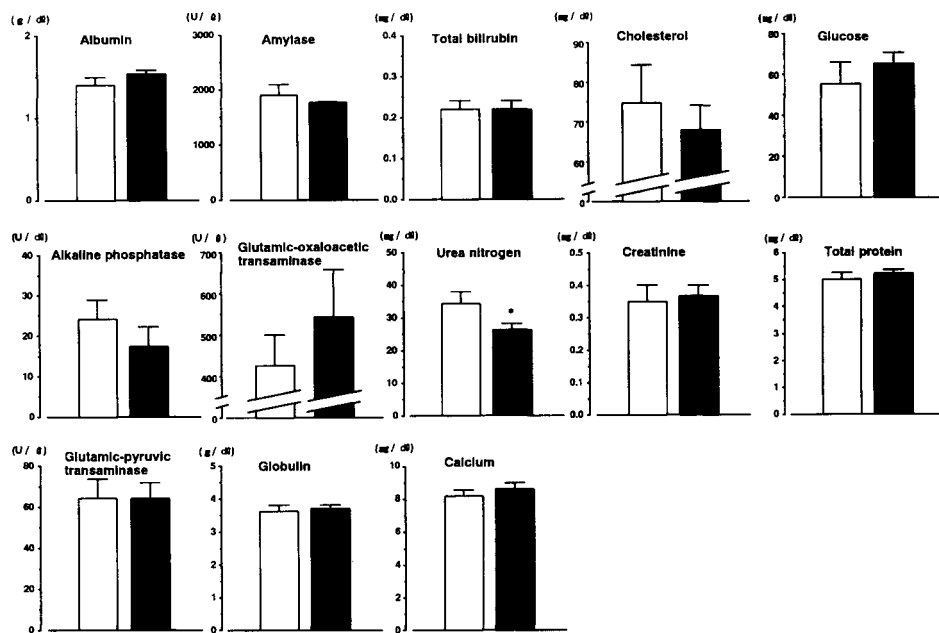


Fig. 3 Serum component levels in each group (Mean±S.E.M.).

□, Control; ■, Experimental. Number of estimates is 5 each. *Significantly different from the control at $p < 0.05$.

かった。

7. 血清遊離脂肪酸レベル

実験群 ($1.9 \pm 0.2 \mu\text{Eq/ml}$; $n=7$) では、対照群 ($1.3 \pm 0.2 \mu\text{Eq/ml}$; $n=8$) より有意に高い値を示した。

考 察

本実験の結果、紅景天の投与により乳線の前癌症状である HAN の増殖および乳癌の増殖因子である TGF α mRNA の発現が明らかに抑制された。乳癌においていずれの群にもアポトーシスはほとんど起こっていなかった(データ示さず)。一方、本実験においてネクローシスにより上昇する glutamic-oxaloacetic transaminase の血中レベルが実験群では対照群に比べ高い傾向にあったこと、および解剖時の肉眼的所見で実験群の乳癌が対照群の乳癌よりネクローシスが顕著に起こっていたことから、紅景天のネクローシス促進作用が示唆された。そしてこれらが本実験で示された紅景天による乳癌増殖の若干の抑制の原因と考えられ、より長期の投与による紅景天の明らかな乳癌抑制効果が期待された。

また腎機能障害によって上昇する urea nitrogen の血中レベルが実験群において明らかに低かったことは、紅景天の腎機能正常化作用をうかがわせる。さらに実験群

の cholesterol レベルが対照群より低く、また遊離脂肪酸の血中レベルにおいて実験群では対照群に比べ顕著に高かったのは紅景天の脂質代謝促進効果を示唆する。そしてこれらの体機能促進(正常化)作用はこれまで言われていた紅景天の機能^{1,2)}を支持するものであり、これら紅景天の全身効果もまたその乳癌の増殖抑制のほか本実験によって示された子宮腺筋症の発生/増殖抑制効果にも寄与していると考えられる。

結 論

紅景天投与による SHN マウスの乳腺発育およびその関連形質に対する影響を検討した。紅景天は乳線の前癌症状である HAN の増殖、および乳癌の増殖因子である TGF α mRNA の発現を抑制し、また glutamic-oxaloacetic transaminase の血中レベルの低下および剖見時の肉眼的所見より紅景天による乳癌細胞のネクローシス促進効果が認められ、これらが本生薬による若干の乳癌増殖抑制効果の原因と考えられた。さらに urea nitrogen レベルの低下により紅景天による腎機能の正常化が、また血中 cholesterol レベルの低下、遊離脂肪酸レベルの上昇などから脂質代謝促進効果が示唆され、これらもまた本実験で得られた紅景天の乳癌および子宮腺

筋症抑制効果の一因と考えられた。

謝 辞

紅景天の恵りにあづかり、種々御助言頂いた中国吉林省延邊大学農学院の金昌鉉教授に深謝する。

References

- 1) 金学培, 金精日: 中国長白山天然薬材, 延邊人民出版社, pp.1 63, 1993.
- 2) 徐志远, 他編著: 長白山植物薬志, 吉林人民出版社, pp.1 1476, 1980.
- 3) Nagasawa, H., Konishi, R., Sensui, N., Yamamoto, K. and Ben-Amotz, A.: Inhibition by beta-carotene rich algae *Dunaliella* of spontaneous mammary tumorigenesis in mice. *Anticancer Res.* **9**, 71-76, 1989.
- 4) Nagasawa, H., Onoyama, T., Suzuki, M., Hibino, A., Segawa, T. and Inatomi, H.: Effects of motherwort (*Leonurus sibiricus* L.) on preneoplastic and neoplastic mammary gland growth in multiparous GR/A mice. *Anticancer Res.* **10**, 1019-1024, 1990.
- 5) Nagasawa, H., Fujii, Y., Kageyama, Y., Segawa, T. and Ben-Amotz, A.: Suppression by beta-carotene rich algae *Dunaliella bardawil* of the progression, but not the development, of the spontaneous mammary tumours in SHN virgin mice. *Anticancer Res.* **11**, 713-718, 1991.
- 6) Nagasawa, H., et al.: Inhibition by lombricine from earthworm (*Lumbricus terrestris*) of the growth of spontaneous mammary tumours in SHN mice. *Anticancer Res.* **11**, 1061-1064, 1991.
- 7) Nagasawa, H., Inatomi, H., Suzuki, M. and Mori, T.: Further study on the effects of motherwort (*Leonurus sibiricus* L.) on preneoplastic and neoplastic mammary gland growth in multiparous GR/A mice. *Anticancer Res.* **12**, 141-144, 1992.
- 8) Nagasawa, H., Nishiyama, H. and Inatomi, H.: Improvement by carrot (*Panax ginseng* CA Mey) of the reproductivity of old SHN male mice. *Bull. Fac. Agr., Meiji Univ.* **99**, 13-18, 1994.
- 9) Wu, G., et al.: Effects of 7 Chinese natural products on normal and preneoplastic mammary gland growth and uterine adenomyosis in SHN virgin mice. *J. Trad. Med.* **11**, 50-56, 1994.
- 10) Nagasawa, H., Yasuda, M., Sakamoto, S. and Inatomi, H.: Protection by coffee cherry against spontaneous mammary tumour development in mice. *Anticancer Res.* **15**, 141-146, 1995.
- 11) Nagasawa, H., Yasuda, M., Ohta, A. and Inatomi, H.: Effects of 1 aminocyclopropane-1 carboxylic acid, a component of *Coprinus comatus*, on reproductivity of male SHN mice. *Bull. Fac. Agr., Meiji Univ.* **102**, 9-15, 1995.
- 12) Wu, G., Yamamoto, K., Mori, T., Inatomi, H. and Nagasawa, H.: Improvement by Guan-mu tong (*Caulis aristolochiae manshurien-sis*) of lactation in mice. *Amer. J. Chinese. Med.* **23**, 159-165, 1995.
- 13) Nagasawa, H., Yasuda, M. and Wu, G.: Pattern of urinary components of virgin mice given Guan-mu-tong (*Caulis aristolochiae manshurien-sis*) as drinking water. *J. Trad. Med.* **12**, 86-88, 1995.
- 14) Nagasawa, H., Mitamura, T., Sakamoto, S. and Yamamoto, K.: Effects of lycopene on spontaneous mammary tumour development in SHN virgin mice. *Anticancer Res.* **15**, 1173-1178, 1995.
- 15) Kobayashi, T., Iijima, K., Mitamura, T., Torizuka, K., Cyong, J. C. and Nagasawa, H.: Effects of lycopene, a carotenoid, on intrathymic T cell differentiation and peripheral CD4/CD8 ratio in a high mammary tumor strain of SHN retired mice. *Anti Cancer Drugs* **7**, 195-198, 1996.
- 16) Nagasawa, H., Yasuda, M., Sakamoto, S. and Inatomi, H.: Suppression by coffee cherry of the growth of spontaneous mammary tumours in SHN mice. *Anticancer Res.* **16**, 151-154, 1996.
- 17) Yasuda, M., Inatomi, H., Sakamoto, S. and Nagasawa, H.: Inhibition by stachydrine of the development of mammary tumours and uterine adenomyosis in mice. *J. Trad. Med.* **13**, 87-93, 1996.
- 18) Kobayashi, T., Yasuda, M., Iijima, K., Torizuka, K., Cyong, J. C. and Nagasawa, H.: Effects of coffee cherry on the immune system in SHN mice. *Anticancer Res.* **16**, 1827-1830, 1996.
- 19) Nagasawa, H., Yasuda, M. and Inatomi, H.: Further study on the effects of coffee cherry on spontaneous mammary tumorigenesis in mice: Effects of methanol extract. *Anticancer Res.* **16**, 3507-3514, 1996.
- 20) Wu, G., Yamamoto, K., Inatomi, H. and Nagasawa, H.: Effects of combined treatment with natural products on uterine adenomyosis and normal and preneoplastic mammary gland growth in SHN virgin mice. *J. Trad. Med.* **13**, 268-273, 1996.
- 21) Nagasawa, H., Bai, S., Jin, Y. and Wu, G.: Effects of mixture of natural products on lactational performance in cows. *Bull. Fac. Agr., Meiji Univ.* **110**, 1-8, 1997.
- 22) Nagasawa, H., Sakamoto, S. and Yamamoto, K.: Effects on mammary gland of mice of mixture of natural products effective on lactational performance in cows. *Bull. Fac. Agr., Meiji Univ.* **111**, 31-40, 1997.
- 23) Nagasawa, H., Wu, G. and Inatomi, H.: Effects of aristoloside, a component of Guan-mu tong (*Caulis aristolochiae manshurien-sis*), on normal and preneoplastic mammary gland growth in mice. *Anticancer Res.* **17**, 237-240, 1997.
- 24) Kobayashi, T., Yasuda, M., Iijima, K., Torizuka, K., Chong, J. C. and Nagasawa, H.: Effects of coffee cherry on the activation of splenic lymphocytes in mice. *Anticancer Res.* **17**, 913-916, 1997.
- 25) Nagasawa, H., Wu, G., Sakamoto, S., Yamamoto, Y. and Inatomi, H.: Effects of Guan-mu tong (*Caulis aristolochiae manshurien-sis*) in combination with other natural products on normal and preneoplastic mammary gland growth in mice. *Amer. J. Chinese Med.* **25**, 79-88, 1997.
- 26) Nagasawa, H., Inoue, H., Yasuda, M. and Yamamoto, Y.: Effects of coffee cherry on lactation in mice: Improvement of nesting behavior. *J. Reprod. Dev.* **43**, 199-204, 1997.
- 27) Nagasawa, H., Yasuda, M., Feng, Z. H. and Kobayashi, T.: Effects of taurine on reproduction and behaviour in GR/A mice. *In Vivo* **11**, 403-408, 1997.
- 28) Tsunoda, S., Kawamoto, H., Inatomi, H., Yamamoto, K. and Nagasawa, H.: Inhibition by guanidino compounds of the growth of spontaneous mammary tumours in SHN mice. *Anticancer Res.* **17**, 3349-3354, 1997.
- 29) Kobayashi, T., et al.: Effects of Sasa Health®, extract of bamboo grass leaves, on the thymic involution and thymocyte phenotypic alterations in SHN female mice. *Bull. Fac. Agr., Meiji Univ.* **115**, 39-44, 1998.
- 30) Tsunoda, S., Yamamoto, K., Sakamoto, S., Inoue, H. and Nagasawa, H.: Effects of Sasa Health®, extract of bamboo grass leaves, on spontaneous mammary tumorigenesis in SHN mice. *Anticancer Res.* **18**, 153-158, 1998.
- 31) Nagasawa, H., Yanai, R., Taniguchi, H., Tokuzen, R. and Nakahara, W.: Two-way selection of a stock of Swiss albino mice for mammary tumorigenesis: Establishment of two new strains (SHN and SLN). *J. Natl. Cancer Inst.* **57**, 425-430, 1976.

- 32) Medina, D.: Preneoplastic lesions in murine mammary cancer. *Cancer Res.* **36**, 2589-2595, 1976.
- 33) Welsch, C.W.: Prophylaxis of early preneoplastic lesions of the mammary gland. *Cancer Res.* **36**, 2621-2625, 1976.
- 34) Chomczynski, P. and Sacchi, N.: Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159, 1987.
- 35) Nagasawa, H., Ikezaki, Y. and Yamamoto, K.: Effects of ovariectomy and prolactin on mammary gland expressions of transforming growth factor α and epidermal growth factor receptor mRNAs in mice. *Zool. Sci.* **15**, 525-529, 1998.
- 36) Harigaya, T., Tsunoda, S., Mizuno, M. and Nagasawa, H.: Different gene expression of mouse transforming growth factor α between pregnant mammary glands and mammary tumors in C3H/He mice. *Zool. Sci.* **11**, 625-627, 1994.
- 37) Mori, T. and Nagasawa, H.: Multiple endocrine syndrome in SHN mice: Mammary tumors and uterine adenomyosis. In "Comparative Aspects of Tumor Development" (Ed. by Kaiser, H.E.), Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, pp. 121-130, 1989.