

生薬の Epstein-Barr Virus 活性化抑制作用および抗発癌
プロモーター作用について (第1報)木島孝夫^{*,a}, 徳田春邦^b, 小塚陸夫^a, 岡本えみ子^a, 田部昌弘^c
^a京都薬科大学, ^b京都大学医学部, ^c長倉製薬株式会社Inhibitory Effects on Epstein-Barr Virus Activation and Antitumor
Promoting Effects of Crude Drugs (I)TAKAO KONOSHIMA^{*,a}, HARUKUNI TOKUDA,^b MUTSUO KOZUKA,^a
EMIKO OKAMOTO^a and MASAHIRO TANABE^c^aKyoto Pharmaceutical University, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607, Japan^bDepartment of Microbiology, Faculty of Medicine, Kyoto University,
Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan^cNagakura Seiyaku Co. Ltd., Nipponbashi, Minami-ku, Osaka 542, Japan

(Received June 12, 1987)

Methanol extracts of Myrobalan (1), knots of *Wisteria brachybotrys* (2), fruits of *Trapa japonica* (3) and Coix seed (4) were assayed for their inhibitory effects on Epstein-Barr virus (EBV) activations by a short term *in vitro* assay in which lymphoblastoid cells (Raji) latently infected with EBV were used. The EBV activation by 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) and teleocidin B was inhibited markedly by 1 and 2 but only weakly by 3. Coix seed (4) was found to show a significant *in vitro* cytotoxic effect on the Raji cells. The methanolic extracts from four mixtures of the crude drugs i.e., 1 and 4, 2 and 3, 2 and 4, and 2, 3 and 4, gave more enhanced inhibitory effects on EBV activation, with less cytotoxicity.

These inhibitory effects on EBV activation suggested that these crude drugs possess antitumor promoting activities.

Keywords—Myrobalan; knots of *Wisteria brachybotrys*; Coix seed; fruits of *Trapa japonica*; inhibitory effect on Epstein-Barr Virus activation; TPA; teleocidin B; antitumor promoter; Raji cell

化学発癌の二段階発癌機構¹⁾における環境中のプロモータならびに抗プロモータの検索については、すでに数多くの報告がなされている²⁻⁴⁾。また数多くの生薬について、その抗腫瘍活性が検討され、抗腫瘍活性を有する化合物についての報告がなされている。さらに、生薬成分における抗発癌プロモータ作用については、小清水ら⁵⁾によって、カキドウシ (*Glechoma hederaceae* L.) から抗プロモータ活性を有する化合物として ursolic acid および oleanolic acid 単離され、堀内ら⁶⁾により、タンニンおよび関連ポリフェノールが、また安川ら⁶⁾によって、sterol 類や flavonoid など広範な検討がなされている^{7,8)}。

発癌予防の見地からしても、生薬ならびに生薬成分のプロモータおよび抗プロモータ活性の検討は今後さらに重要な意義をもつものと考えられる。

一方、トウダイグサ科 (Euphorbeaceae) に広く含有されるジテルペン類、とくに 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)⁴⁾ ならびに放線菌の一種 *Streptomyces mediocidius* より単離されたインドールアルカロイド、teleocidin B⁹⁾ には強力な発癌促進作用があることが知られている。また伊藤ら¹⁰⁾ は、この発癌プロモータならびに抗プロモータの一次スクリーニング法として、Epstein-Barr virus (EBV) の活性化を指標とする synergistic assay 法が有効であることを報告している。

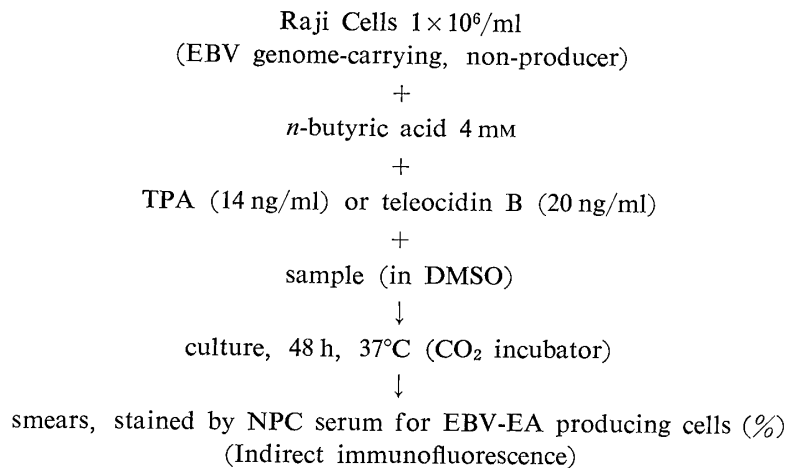


Fig. 1.

そこで、著者らは、生薬の抗プロモータ作用、ならびに生薬の組合せによる抗プロモータ作用への影響を検討し、さらに生薬成分中のプロモータおよび抗プロモータの検索利用を目的とし、まず抗腫瘍の目的で民間に用いられることのある生薬¹¹⁾について、現在最も簡便で有用と考えられる伊藤らの方法に従い、TPA ならびに teleocidin B による EBV の早期抗原 (EBV-EA) の発現を指標として一次スクリーニングを行い、さらに Raji 細胞に対する細胞毒性についても検討した。

今回、薏苡仁、菱実、訶子、藤瘤の各大阪市場品を用いさらに各生薬の種々混合エキスについて検討した。

実験材料および実験方法

1. エキスおよび試料溶液の調製

薏苡仁、藤瘤、菱の実、訶子の大阪市場品を細切し、それぞれ 30 g をメタノール 300 ml にて温浸 3 時間抽出し、減圧濃縮してエキスとする。2 種の生薬混合エキスは、各生薬 15 g ずつを混ぜ、メタノール 300 ml にて温時 3 時間抽出、3 種および 4 種の生薬混合エキスは、各生薬 10 g ずつを混ぜ、メタノール 300 ml にて同様に抽出し、減圧濃縮して各混合エキスとする。(エキス含量は、TABLE に記載) 各エキスは、dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解し、100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml の試料溶液を調製する。

2. アッセイ法

EBV 潜在感染ヒトリンパ芽球様細胞株 Raji 細胞の培養液として RPMI1640 に 4% 胎仔血清および抗生物質 (ペニシリン 200 単位/ml, ストレプトマイシン 0.25 mg/ml) を加えたものを使用した。この条件下で、EBV 自然活性率は、0.1% 以下であった。Raji 活性試験は、Fig. 1 に示すごとく、 1×10^6 細胞/ml の濃度に調製した Raji 細胞に、酪酸 (4 mM) と TPA (20 ng/ml) あるいは teleocidin B (14 ng/ml) の DMSO 溶液を加え、CO₂ インキュベーター中、37°C で 48 時間培養後、塗抹標本を作成し、上咽頭癌患者血清を用いた間接蛍光抗体法にて EBV-EA を染色し、陽性細胞の発現率を 100 とし、これを陽性コントロールとした。試料の発現率は、同じく Raji 細胞株に、酪酸 (4 mM), TPA (20 ng/ml) あるいは teleocidin B (14 ng/ml) と各濃度の試料溶液を加え、同様に培養後算出した。なお毎回、酪酸だけの陰性コントロールと、上記陽性コントロールとを同時に行い、それぞれ EA 陽性細胞 0.25~1.0, 30~40% であった。

実験結果

1) 単一生薬のエキスでは、藤瘤、訶子のメタノールエキスには顕著な抑制作用が認められ、とくに訶子では、10 μ g/ml の濃度でも強い抑制作用を示している。一方菱の実では、弱い抑制作用が認められた。しかしながら、薏苡仁のメタノールエキスには、Raji 細胞に対する強い細胞毒性が認められる。これらは、TPA, teleocidin B いずれによる早期抗原の誘発に対しても同様の結果であった。

2) 混合エキスでは、訶子-薏苡仁、訶子-藤瘤、菱の実-藤瘤の組合せで、TPA ならびに teleocidin B いずれによる早期抗原の誘発に対しても、単一エキスの場合よりさらに強い抑制作用が認められた。とくに菱の実-藤瘤では、10 μ g/ml の濃度でもその抑制効果は顕著であった。藤瘤-菱の実-薏苡仁ならびに藤瘤-菱の実-訶子でも、顕著な抑

TABLE I. Inhibitory Effects on TPA Induced EBV-EA Activation

Sample (% of ext.)	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)		
	100	10	1
	% to control (% viability)		
TPA (20 ng/ml)	100		
藤 瘤 (4)	15.3 (60.0)	66.0 (>80.0)	100
菱の実 (3)	42.0 (70.0)	60.6 (>80.0)	100
訶 子 (40)	10.2 (50.0)	33.0 (>80.0)	100
薏苡仁 (4)	0.0 (0.0)	100	100
藤-菱 (4)	5.1 (60.0)	30.8 (>80.0)	100
藤-薏 (4)	0.0 (30.0)	53.5 (>80.0)	100
藤-訶 (26)	10.2 (50.0)	56.4 (>80.0)	100
菱-薏 (5)	43.6 (80.0)	66.7 (>80.0)	90.0
菱-訶 (14)	25.6 (60.0)	41.9 (>80.0)	100
訶-薏 (14)	0.0 (70.0)	80.6 (>80.0)	100
藤-菱-訶 (14)	12.8 (70.0)	48.7 (>80.0)	88.4
藤-菱-薏 (4)	10.2 (80.0)	71.7 (>80.0)	100
藤-訶-薏 (14)	25.3 (80.0)	100	100
菱-訶-薏 (17)	51.3 (80.0)	53.8 (>80.0)	100
藤-菱-訶-薏 (17)	30.2 (80.0)	50.6 (>80.0)	88.8

藤: 藤瘤, 菱: 菱の実, 薏: 薏苡仁, 訶: 訶子

TABLE II. Inhibitory Effects on Teleocidin B Induced EBV-EA Activation

Sample	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)		
	100	10	1
	% to control (% viability)		
teleocidin B (14 ng/ml)	100		
藤 瘤	20.5 (70.0)	71.5 (>80.0)	100
菱の実	65.7 (80.0)	92.9 (>80.0)	100
訶 子	18.6 (60.0)	40.2 (>80.0)	100
薏苡仁	0.0 (0.0)	100	100
藤-菱	10.5 (60.0)	45.1 (>80.0)	100
藤-薏	0.0 (30.0)	68.4 (>80.0)	100
藤-訶	9.5 (50.0)	55.4 (>80.0)	100
藤-薏	35.2 (70.0)	74.5 (>80.0)	100
菱-訶	33.3 (70.0)	60.1 (>80.0)	100
訶-薏	8.5 (60.0)	55.8 (>80.0)	100
藤-菱-訶	11.0 (70.0)	57.4 (>80.0)	100
藤-菱-薏	15.8 (70.0)	80.5 (>80.0)	100
藤-訶-薏	19.6 (70.0)	85.9 (>80.0)	100
菱-訶-薏	65.4 (80.0)	89.2 (>80.0)	100
藤-菱-訶-薏	40.2 (80.0)	75.2 (>80.0)	100

制作用が認められ、さらに **Raji** 細胞に対する細胞毒性が軽減された。

考 察

近年、伊藤らによって発癌プロモーターの短期検出法の一つである EBV 活性化を指標とする synergistic assay 法が確立された。TPA ならびに teleocidin B により誘発される EBV-EA を指標として本法を利用すれば、短時間で、多量の試料を、安全に処理することができるため、生薬あるいは生薬成分中の抗プロモーターの一次スクリーニングには、最適のアッセイ法であると考えられる。そこで、本報では、生薬の抗プロモーター活性を検討する目的で、上記アッセイ法を用いて、4種の生薬、すなわち民間薬として抗腫瘍の目的で用いられることのある薏苡仁、訶子、菱の実、藤瘤、ならびにそれらの混合エキスについて検討を加えた。

単一生薬のエキスでは、藤瘤、訶子に顕著な EBV 活性化に対する抑制効果が認められた。しかしながら、薏苡仁では **Raji** 細胞に対する細胞毒性が認められた。また2種の混合エキスでは、訶子-薏苡仁、藤瘤-菱の実、藤瘤-訶子には、単一エキスにより顕著な EBV 活性化抑制効果が認められた。とくに菱の実は、単一エキスではその抑制効果が顕著ではないが、藤瘤との混合エキスにすることにより、菱の実、藤瘤いずれの単独エキスの場合よりも強い抑制効果が得られた。さらに、単一エキスで認められた薏苡仁の **Raji** 細胞に対する細胞毒性が、混合エキスでは、いずれの場合もはるかに軽減されている。また3種の混合エキスでは、単一あるいは2種の混合エキスに比較し、同等もしくはそれ以上の抑制効果を維持しながら、**Raji** 細胞に対する細胞毒性は、いくらか軽減される傾向にあることが明らかとなった。これらの作用は、TPA および teleocidin B いずれによる EBV-EA の誘発に対しても、ほぼ同様の結果が得られている。

以上のことより、今回検討を加えた生薬において、訶子、藤瘤は、単独でも強い EBV 活性化抑制作用が認められ、*in vivo* での抗プロモーター作用が期待できるとともに、薏苡仁、あるいは菱の実との組合せにより、さらに強力な、かつ細胞毒性の弱い抗プロモーターとしての効果が期待できるものと思われる。また従来の細胞毒性を一次スクリーニングの指標とする抗腫瘍活性物質の検索とは異なり、本法では、細胞毒性を検討しつつ、なおかつ抗プロモーター活性を検索しうるため、癌予防の見地からも重要な意義をもつものと考えられる。さらに *in vivo* における抗プロモーター作用の検討、すなわち発癌二段階実験を続けるとともに、抗プロモーター作用を有する各生薬中の成分の単離、同定、また混合エキスの調製の際に得られる成分と、単一エキス中の成分との差についてもさらに詳細な検討を加えている。

引用文献および注

- 1) I. Berenblum, *Cancer Res.*, **1**, 807 (1941).
- 2) H. Ohigashi, T. Ohtsuka, M. Hirota, K. Koshimizu, H. Tokuda, Y. Ito, *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1617 (1983); H. Ohigashi, M. Hirota, T. Ohtsuka, K. Koshimizu, H. Fujiki, M. Suganuma, Z. Yamaizumi, T. Sugimura, *ibid.*, **46**, 2605 (1982).
- 3) H. Ohigashi, H. Takamura, K. Koshimizu, H. Tokuda, Y. Ito, *Cancer Lett.*, **30**, 143 (1986).
- 4) A. Rolan, B. Wickberg, *Tetrahedron Lett.*, **1970**, 4261; H. Z. Hausen, G. W. Bornkamm, R. Schmidt, H. Hecker, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **76**, 782 (1979).
- 5) 堀内孝彦, 藤木博太, 山下克美, 菅沼雅美, 杉村 隆, 吉田隆志, 奥田 拓, 日本生薬学会第32年会講演要旨集, p. 11 (1985).
- 6) 安川 憲, 滝戸道夫, 竹内美恵子, 日本生薬学会第32年会講演要旨集, p. 2 (1985); 安川 憲, 滝戸道夫, 中川 滋木, 松本太郎, 竹内美恵子, 日本薬学会第 107 年会講演要旨集, p. 654 (1987).
- 7) H. Okamoto, D. Yoshida, S. Mizusaki, *Cancer Lett.*, **19**, 47 (1983); H. Nishino, K. Kitagawa, A. Iwashima, *Carcinogenesis*, **5**, 1529 (1984); H. Nishino, K. Yoshida, A. Iwashima, H. Takizawa, S. Konishi, H. Okamoto, H. Okabe, S. Shibata, H. Fujiki, T. Sugimura, *Jpn. J. Cancer Res.*, **77**, 33 (1986).
- 8) R. Kato, T. Nakadate, S. Yamamoto, T. Sugimura, *Carcinogenesis*, **4**, 1301 (1983); H. Nishino, A. Iwashima, H. Fujiki, T. Sugimura, *Gann*, **75**, 113 (1984); H. Nishino, E. Naito, A. Iwashima, K. Tanaka, M. Matsuura, H. Fujiki, T. Sugimura, *Gann*, **75**, 311 (1984); S. Saito, H. Okamoto, S. Mizusaki, D. Yoshida, *Cancer Lett.*, **30**, 137 (1986).
- 9) H. Fujiki, M. Mori, M. Nakayasu, M. Terada, T. Sugimura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 976 (1979); K. Irie, M. Hirota, N. Hagiwara, K. Koshimizu, H. Hayashi, S. Murao, H. Tokuda, Y. Ito, *Agric.*

Biol. Chem., 48, 1269 (1984).

- 10) Y. Ito, H. Kawanishi, T. Harayama, S. Takabayashi, *Cancer Lett.*, 12, 175 (1981); Y. Ito, S. Yanase, J. Fujita, T. Harayama, M. Takashima, H. Imanaka, *Cancer Lett.*, 13, 29 (1981).
- 11) 中山恒明, 日本医師会雑誌, 41, 916 (1959); K. Nabeya, Y. Iijima, 第17回日本癌学会総会要旨集, p. 51 (1958); K. Nabeya, M. Nakayama, K. Suzuki, S. Matsuo, K. Makino, K. Okubo, 第19回日本癌学会総会要旨集, p. 61 (1960); 小菅卓夫, 横田正実, 杉山 清, 岡本 厚, 斎藤正志, 山本藤輔, 薬学雑誌, 106, 183 (1986); 横田正実, 杉山 清, 山本藤輔, 倪 慕雲, 巖 述常, 小菅卓夫, 薬学雑誌, 106, 425 (1986).