

半枝蓮と白花蛇舌草の癌細胞増殖抑制効果と 自然発症肝腫瘍マウスの延命効果

游 雪秋^{a)} 鈴木志保子^{b)} 大久保朋一^{a)} 川嶋 一成^{*,c,d)}
津田 道雄^{a)} ナデア エルボライ^{a)} 山村 雅一^{a)}

^{a)}東海大学医学部分子生命科学1教室, ^{b)}鹿屋体育大学,
^{c)}PL病院東京診療所, ^{d)}東海大学医学部形態学教室

Anti-tumor effect of Chinese herbal medicines "Scutellaria barbata and Oldenlandia diffusa" on cancer cell lines and C3H-AVy mouse with spontaneous hepatocellular carcinoma

Hsueh-chiu YU^{a)} Shihoko SUZUKI^{b)} Tomoichi OKUBO^{a)} Issei KAWASHIMA^{*,c,d)}
Michio TSUDA^{a)} N. EL BORAI^{a)} and Masaichi YAMAMURA^{a)}

^{a)}Department of Molecular Life Science 1, Tokai University School of Medicine,
^{b)}Department of Health Education, National Institute of Fitness and Sports in Kanoya,
^{c)}Department of Internal Medicine, PL Tokyo Health Care Center,
^{d)}Department of Morphology, Tokai University School of Medicine

(Received February 18, 2000. Accepted June 9, 2000.)

Abstract

Scutellaria barbata (SB) and Oldenlandia diffusa (OD) have been used in traditional Chinese medicine for treating stomach, colon, liver, breast and ovarian tumors. The anti-tumorigenic effect of SB and OD was examined by various *in vitro* and *in vivo* experimental studies.

The combined effect of SB and OD was examined to determine the anti-tumorigenic effect. Experiments were done *in vitro* on human breast tumor cell line MCF-7 and human prostatic adenocarcinoma cell line DU-145. For *in vivo* experiments, C3H-AVy mice with spontaneous hepatocellular carcinoma were used.

It was found that the herbal extracts inhibited the proliferation of both cell lines as measured by the MTT assay. In the proliferation of both cell lines after addition of various concentrations of herbal extracts in the medium, 50 % inhibition was obtained with 1 % herbal extracts, and 80 % inhibition by 10 % herbal extracts. C3H-AVy mice survived 1.4 times longer than controls after oral administration of the herbal extracts.

In conclusion, the present *in vivo* and *in vitro* results strongly suggest that the combination of OD and SB suppresses tumor growth *in vitro* and increases survival rate in mice with spontaneous hepatocellular carcinoma.

Key words Anti-tumor effect, C3H-AVy mouse, MTT assay, Scutellaria barbata, Oldenlandia diffusa.

*〒150-0047 東京都渋谷区神山町16-1
P L病院東京診療所

16-1 Kamiyama-cho, Shibuya-ku, Tokyo 150-0047, Japan

緒 言

現在、消化器癌、婦人科領域癌治療などにおける治療は外科的療法、放射線療法、化学療法などの単独あるいは組み合わせによる治療が主流となっている。これら近代医学的西洋医学の集学的療法に加え、近年では東洋医学も併用した西洋・東洋集学的医療が行われるようになってきている¹⁾。

古来より、抗腫瘍効果があるといわれている生薬は数多く存在している。その中で半枝蓮 (*Scutellaria barbata*: 以下 SB)、白花蛇舌草 (*Oldenlandia diffusa*: 以下 OD) は台湾や中国では古くから消炎、排膿、解毒、殺菌作用、ヘビによる咬傷を治すなどの効能がある漢方薬として知られているだけでなく²⁾、胃癌、大腸癌、肝癌などの消化器系癌や子宮癌、乳癌などにも薬効がある漢方薬として広く使用されてきている。また本薬剤は、本邦においても入手し易く、生薬の調合も行いやすい薬剤である。近年、本邦においても、癌化学療法の併用療法、補助療法として胃癌患者に SB, OD を使用しその有効性が記載されている³⁾。また SB, OD の制癌作用及び制癌作用成分に関する研究も行われてきている⁴⁾。

今回、我々は SB, OD の *in vitro* における抗腫瘍細胞増殖効果、つづいて *in vivo* における担癌動物延命効果を検討した。

まず、*in vitro* で SB および OD の抽出水可溶性成分を用い、これら薬剤のヒト由来癌細胞培養株に対する癌細胞増殖抑制効果について検討した。さらに、SB および OD の *in vivo* における抗腫瘍効果の有無を自然発症肝腫瘍マウスである C3H-AVy 系統の雄マウス⁵⁾ に長期間に渡り経口投与することにより生存率の面より検討した。*in vitro* での癌細胞増殖抑制効果および *in vivo* での担癌動物の延命効果を得たので報告する。

材料と方法

(1) 漢方薬からの抽出方法

台湾で市販されている乾燥したくき、葉の SB, OD を使用した。台湾民間処方剤の割合 (SB 32.5 g, OD 65 g) に対して蒸留水 4000 ml を加え、培養細胞、及び担癌動物に対し、滅菌的に SB, OD を投与するため、110°C、2.5 気圧、30 分間でオートクレーブ抽出したものを 100% 抽出液と定め、無菌的に 4°C で使用時まで保存した。また SB および OD の単独の抽出液については蒸留水 4000 ml に対してそれぞれ 32.5 g, 65 g で調製した。*Scutellaria* 属などの抽出成分には数種類のフラボノイ

ドやフェニルエタノイドが含まれているといわれている⁶⁾。

(2) 培養癌細胞および培養条件

1. ヒト乳癌細胞 (MCF-7)⁷⁾
2. ヒト前立腺癌細胞 (DU-145)⁸⁾

以上 2 種類の癌細胞株を実験に用いた。

各細胞は 10% ウシ胎児血清 (FCS)、0.13% 重曹、ペニシリン 100 Units/ml、ストレプトマイシン 100 µg/ml を含むダルベッコウ MEM 培地を用い、5% 炭酸ガス、37°C に設定した炭酸ガスインキュベーターで培養した。

(3) 癌細胞増殖抑制測定法 (MTT Methods)

各々の癌細胞は上記の条件で、96well (200 µl/well) のマイクロプレートを用いて培養 (細胞数 1×10^3 /well) した。培養開始と同時に各々 10 well づつ 0.1% から 10% の濃度の SB, OD 漢方抽出液を単独およびコンビネーションでは等量ずつ添加し、コントロールには同量の蒸留水を用いた。3 日から 7 日間のそれぞれの培養後 7.5 mg/ml の 3-(4,5-dimethylthazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 20 µl を加え 4 時間のインキュベーション後、培養液を除去し dimethylsulfoxide (DMSO) 100 µl を加え溶解、特異的吸光度 540 nm で測定する MTT 法で測定した⁹⁾。使用した癌細胞は接着細胞であり、増殖後の細胞数をカウントすることが困難なために細胞数に比例する MTT アッセイを用いて測定し生存細胞数測定の代用とした。

(4) 自然発症肝腫瘍マウスに対する SB, OD 経口投与による延命効果の検討

C3H-AVy 系統の雄マウスは肝細胞癌発生率 98% を示す。生後 6 ヶ月齢の約 30% に肝腫瘍が出現し始め、以後肝腫瘍の発症率は 9 ヶ月齢、12 ヶ月、15 ヶ月でそれぞれ 50%, 68%, 83% に達する。肝腫瘍発生平均年齢は 12 ヶ月である。肝腫瘍の病理形態は結節を伴う hepatocellular carcinoma であるが、ヒト肝細胞癌のように肝硬変の合併は認めない。

本マウスを 24°C で conventional に飼育した。飼料は固形飼料 CE2 を用いた。それぞれ抽出液投与群は 10 匹、コントロール群は 7 匹で実験を開始した。4 週齢より *in vitro* の実験同様、SB, OD の台湾民間処方に合わせた 100% 抽出液を等量混合したものを哺乳ビンから自由に与え飼育した。コントロール群はオートクレーブをした蒸留水を自由に経口摂取させた。月 1 回、control 群の最後の 1 匹の生存が終了するまで体重測定を行いながら生存期間を比較検討した。抽出液経口摂取量は 1 日平均 4-5 ml であり、ヒトの 1 日摂取量の体重換算あたり約 2 倍に相当すると考えられる。

(5) 統計学的処理

本研究によって得られた結果は、コントロール群およびSB, OD群のそれぞれにおいて平均値と標準偏差を求めた。また、癌細胞増殖抑制率および体重の各群間における差は、t-testを用い、有意水準は5%以下とした。

結 果

1. 培養癌細胞の増殖抑制

MCF-7細胞に対するそれぞれの漢方抽出液の効果は、培養7日後に行ったMTTアッセイで測定した。SB, ODは、濃度1%ですでに約50%、濃度10%では約80%の癌細胞増殖抑制効果を示した。SB, ODの等量混合液は、相加効果のみで、相乗効果は認められなかった(図1-a)。

DU-145細胞に於いても、MCF-7細胞と同様の結果であった(図1-b)。

2. 自然発生肝腫瘍マウスに対するSB, OD経口投与

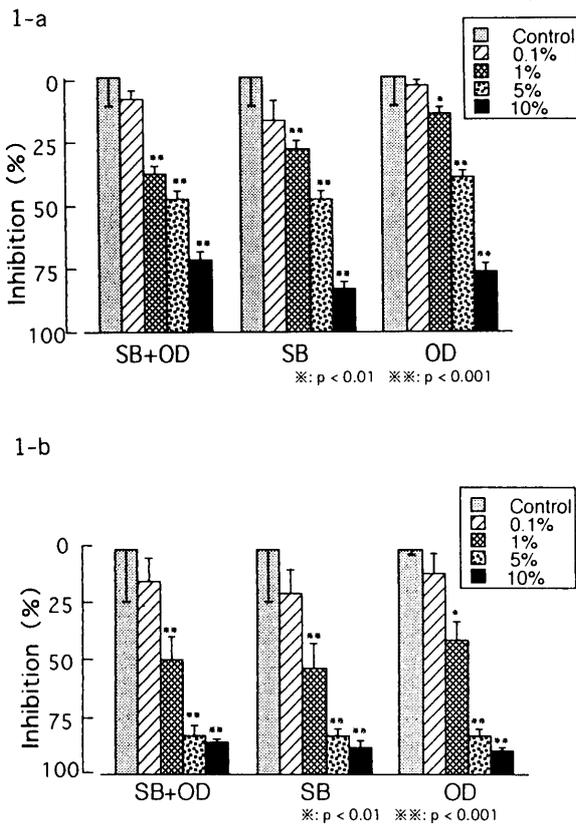


Fig. 1 Inhibitory effect of SB and OD. The proliferation of both cell lines were measured by the MTT assay. Proliferation of MCF-7 (Figure 1-a) and DU-145 (Figure 1-b) cell lines after addition of various concentrations of herbal extracts in the medium. 50% inhibition was obtained with 1% herbal extracts, and 80% inhibition by 10% herbal extracts.
% : medium concentration of herbal extract of SB and OD.

による延命効果の検討

SB+OD投与群、コントロール群においても、マウス死亡後の肝臓病理組織は全例に肝臓癌の発生を認めた。SB+OD投与群の癌組織は孤立性に存在し、脂肪変性を伴った高分化肝細胞癌であり、周辺肝組織に浸潤傾向は見られなかった。コントロール群における組織像も癌組織は孤立性に存在しており、また、周辺肝組織に軽度の浸潤傾向を認め、壊死、腫瘍内出血が認められた。両群の体重は実験開始時における4週齢において、約30gで、その後35週齢で両群とも約60g、その後徐々に体重は減少し始めた。SB, ODを投与していないコントロールでは63週齢で46gまで減少、SB, ODを投与した群の55gに対して有意な体重減少を示した(図2下)。生存率はコントロール群において体重が減少し始めた35週齢頃より低下、60週齢を過ぎた時点で全例死亡した。一方、SB, OD投与群では80週齢を過ぎるまで80%の生存を認めた(図2上)。平均生存期間はSB, OD投与群で76週齢(1.47年)、コントロール群で55週齢(1.05年)でありコントロール群の平均生存期間は文献5と一致した。図3はSB, OD投与群における生存期間の有意な延命効果を示したものである。

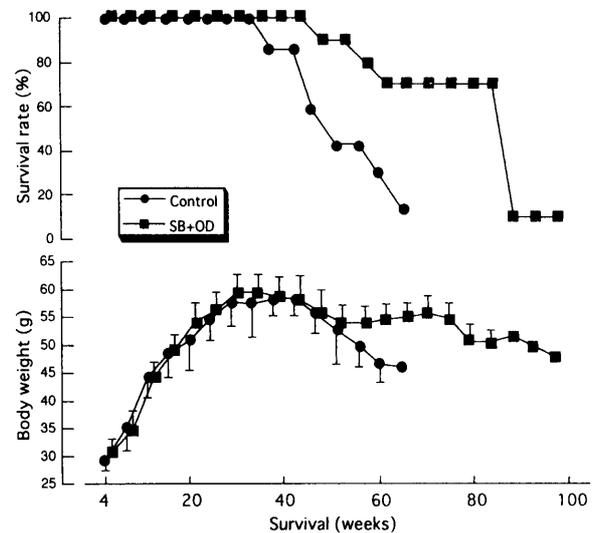


Fig. 2 For *in vivo* experiments, C3H/AVy mice with spontaneous hepatocellular carcinoma were used. SB+OD extracts were taken from water bottle spontaneously. Survival curve (upper) and changes of body weight curve (lower) in mice with spontaneous hepatocellular carcinoma. Body weight in both groups was about 30 g at 4 weeks after birth. At 35 weeks, body weight was about 60 g in both groups. In the control group, body weight decreased at 44 weeks of age as compared with the SB+OD treated group. Furthermore, at 35 weeks, survival curve was decreasing in the non-treated group.

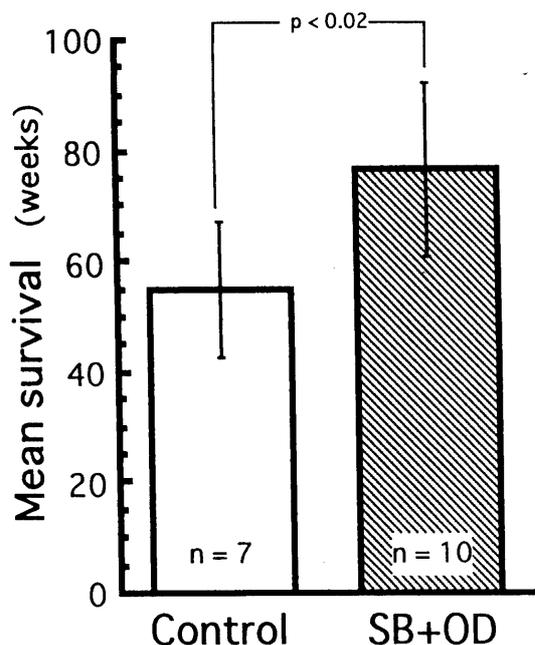


Fig. 3 Average of survival periods in SB+OD treated group was 76 weeks (1.47 year) and the control group was 55 weeks (1.05 year).

考 察

SB, ODは中国では、抗炎症薬、抗癌中草药として臨床にしばしば用いられている。本邦でも横内らはSB, ODをBorrmann3型の手術不能進行癌に抗ガン剤である5'-DFUR, OK432と併用しその有効性を報告している³⁾。また担癌ヌードマウス等を用いた抗癌作用に関する*in vivo*実験系では、しばしば放射線照射の補助療法として使われることが多く、臨床例においても前述した横内らのように抗ガン剤との補助療法に用いている。

作用機序に関連してWongらはSB,OD併用がベンゾピレン誘起発ガンを抑制すること¹⁰⁾、SB,ODがアフラトキシンのDNA結合を抑制することにより抗腫瘍効果をもたらすことを報告している^{11,12)}。また、小川らはヌードマウスに移植したヒト上顎癌株に対する放射線療法と合わせたODの抗腫瘍効果を報告している。その機序としてnatural killer (NK)細胞活性を増強することを報告している¹³⁾。

今回、我々はまず*in vitro*での実験系としてヒト乳癌細胞、ヒト前立腺癌細胞株を用いて、SB,ODおよび両等量混合薬の癌細胞に対する抑制効果をMTT法を使って検討した。SB, ODは共に実験に供した2種の癌細胞に対し直接増殖抑制効果を示した。一方、小菅ら⁴⁾はSB, ODにおける水抽出エキス、メタノール水抽出エキス作

製、凍結乾燥し*in vitro*でHeLa細胞を用いて、*in vivo*ではエールリッヒ腹水担癌マウスを用いて検討し、SBにおいていずれの抽出成分も*vitro*, *vivo*ともに制癌作用をしめさず、ODはエールリッヒ腹水担癌マウスでの*in vivo*の実験で水抽出エキスのみ制癌作用があると報告している。我々の*in vitro*の実験では、SB, ODともに制癌作用を認めており、抽出濃度はほぼ同じであるが、凍結乾燥は我々は施行しておらず、このような、微妙な差が結果の違いをもたらした可能性は否定できない。また、我々の抽出法は滅菌の面よりオートクレーブで行っておりこのような点も影響しているかもしれない。

さらに、生薬を用いた実験は生薬がcrudeであるため経口投与後の腸内細菌叢の影響、吸収後の代謝産物における効果等を考慮しなければならない。また同時に、生薬をある一定期間投与された結果もたらされる免疫系、内分泌系などの長期的生体内の変化をとらえることが必要である。その見地から*in vivo*の実験を今回行った。

*in vivo*における担肝細胞癌動物を用いた実験結果、SB+OD投与群の生存期間がコントロール群の約1.4倍延長し、統計的にSB+ODの直接的延命効果を認めた。しかし、SB+ODを投与した群においても全例に肝細胞癌の発生を認めた。宿主の免疫増強効果・突然変異抑制効果を持つ^{11,13)}SB, ODによる延命作用は認められたが、腫瘍の発生そのものまでは抑えることはできなかった。しかし癌細胞分化度や腫瘍血管新生などの腫瘍構造に差が認められており、その点にマウス生存期間の延長、さらに肝細胞癌細胞増殖速度抑制作用の可能性が推察された。

現在、各種固形癌による死亡率は、外科的治療、放射線療法、化学療法等の進歩にもかかわらずなお高い。放射線療法や化学療法の副作用は周知のことであるが、飲料水と合わせてSB, ODを服用し生存期間を延長できる薬剤は、手術後や放射線療法、化学療法の補助療法として用いるのではなく、癌発見当初より服用する価値が大きいと思われた。

References

- 1) Yokouchi, M.: Gan ni taisuru kanpo heiyō ryōho ni tsuite (dai 3 pou) (癌に対する漢方併用療法について 第三報). *Toyo Igaku* 21, 55-58, 1993. (in Japanese)
- 2) Lau, H.: Treatment of upper respiratory infection with mixt. 716 compound. (in Chinese) *Chung Kuo Chung Hsi His I Chieh Ho Tsa Chih* 13, 730-732, 1993. (in Chinese)
- 3) Tobari, M., Yokouchi M.: Kogan chu-so yaku, 5'-DFUR, OK-432 keiko toyo ga yuko de atta setsujofuno igan no Irei (抗癌中草药, 5'-DFUR, OK-432 経口投与が有効であった切除不能胃癌の1例.) *Gekashinryo* 113, 521-526, 1993. (in Japanese)

- 4) Kosuge, T., Yokota, M., Sugiyama, K., *et al.*: Studies on antitumor activities and antitumor principles of Chinese herbs. 1. Antitumor activities of Chinese herbs. *Yakugaku Zasshi* **105**, 791-795, 1985. (in Japanese)
- 5) Kawamata, J., Matsushita, H. ed.: *Sikkan dobutsu moderu handbook No 2 N shuyo shizenhassho kanshuyo (mouse) (疾患動物モデルハンドブック No2 . N 腫瘍 自然発症肝腫瘍 (マウス) 今井清)* Ishiyaku shuppan, 1982. (in Japanese)
- 6) Matsuura, Y., Miyaichi, K., Tomimori, T. *et al.*: *Nepaaruru yakubutsu no kenkyu (19 ed) Scutellaria repens Buch.-Ham.ex D. Don no neno furabonoido oyobi feniruetanoido seibun ni tsuite. (ネパール薬物の研究 (第19報) Scutellaria repens Buch.-Ham.ex D. Don の根のフラボノイド及びフェニルエタノイド成分について)*, *Yakubutsu Zasshi* **114**, 775-788, 1994. (in Japanese)
- 7) Sonnenschein, C., Papendorp, J.T., Soto, A.: Estrogenic effect of tamoxifen and its derivatives on the proliferation of MCF7 human breast tumor cells. *Life sciences* **37**, 387-394, 1985.
- 8) Katsuoka, Y., Hoshino, H., Shiramizu, M., *et al.*: Autoradiographic and cytochemical localization of androgen in human prostatic cancer cell line. *Urology* **28**, 228-231, 1986.
- 9) Takahashi, S.: In vitro chemosensitivity test using the MTT assay to ovarian malignant tumor. *Tokyo Jikeikai Medical Journal* **108**, 461-470, 1993.
- 10) Wong, BY., Lau, BS., Yamasaki, T., *et al.*: Modulation of cytochrome P-450 [A]-mediated mutagenicity, DNA binding and metabolism of benzo[α]pyrene by Chinese medical herbs. *Cancer letters* **68**, 75-82, 1993.
- 11) Wong, BY., Lau, BS., Yamasaki, T., *et al.*: Inhibition of dexamethasone-induced cytochrome P450-mediated mutagenicity and metabolism of aflatoxin B1 by Chinese medical herbs. *Eur J Cancer Prev* **2**, 351-356, 1993.
- 12) Wong BY., Lau BH., Tadi PP., *et al.*: Chinese medical herbs modulate mutagenesis, DNA binding and metabolism of aflatoxin B1. *Mutat-Res.* **279**, 209-216, 1992.
- 13) Ogawa, Y., Fujii, K. and Tamai, H.: Anti-tumor effect of Chinese herbal medicine "Sheng-Jin-Jie-Du-Yin" on a human maxillary cancer cell line. *Jibirinsho* **88**, 237-249, 1995. (in Japanese)