Glycyrrhizin による唾液腺腫瘍増殖抑制と その作用に関する実験的研究

塩田 覚・船本長一朗・高沢 一良
大平三四郎・松井 勇樹

An experimental studies on the growth inhibition and its action of a salivary gland tumor by glycyrrhizin

Satoru SHIOTA・Choichiro FUNAMOTO・Kazuyoshi TAKAZAWA
Sanshiro OHIRA・Hideki MATSUI

Abstract: Attention has already been directed to the antitumor action of plant glycosides, but the involved mechanism of action is unknown.

In this experimental study, the effect of glycyrrhizin in inhibiting growth of a cultured cell of salivary gland tumor induced by 20-methylcholanthrene (cultured S.G. tumor cell) was investigated.

The following results were obtained:

- 1) Glycyrrhizin inhibited the growth of the cultured S.G. tumor cell.
- 2) Glycyrrhizin inhibited growth at concentrations over 0.4 mg/ml. Growth inhibition at 0.4~0.6 mg/ml of glycyrrhizin was comparable to that at 0.5 μ g/ml of actinomycin D.
- 3) Histopathologically, cultured S.G. tumor cells treated with glycyrrhizin showed signs of degeneration and destruction such as cell atrophy and pyknosis.
- 4) Ultramorphologically, microvilli and branching processes of the cell surface of the cultured S.G. tumor cells were poorly developed and the nucleus was apparently decreased in size.
- 5) Flow cytometric analysis of cultured S.G. tumor cells after 24 hr. of exposure to glycyrrhizin revealed that glycyrrhizin treatment led to marked accumulation of cells in G₁ phase, suggesting that growth inhibition was the result of a block during G₁ which did not permit the cells to enter S phase.

Key words: plant glycoside (植物性配糖体), glycyrrhizin (グリチルリチン), antitumor action (抗腫瘍作用), cultured salivary gland tumor (培養唾液腺腫瘍細胞)

はじめに

昨今、多種の抗腫瘍剤が開発されているが^{1,2)}、口腔悪性腫瘍のなかで、唾液腺腫瘍とか線維肉腫などに対し

ては、感受性が低いといわれている³⁾。

著者らは、植物性配糖体のなかに、上皮性のみならず非上皮性悪性腫瘍に対して、腫瘍増殖および造腫瘍にも抑制作用があることが指摘されているのに関心もち^{4~7)}、実験的に誘発した唾液腺腫瘍で、植物性配糖体 Ginsenoside, Glycyrrhizin の腫瘍増殖抑制について検討し、抑制効果を認めている^{8,9)}。

そこで、本実験では、このなかの Glycyrrhizin の腫瘍増殖抑制作用を検討する目的で、実験的に誘発した唾液腺腫瘍より分離した培養細胞を用い、若干の検索を加

金沢医科大学歯科口腔外科学教室
(主任: 塩田 覚教授)
Department of Oral Surgery, Kanazawa Medical University (Chief: Prof. Satoru Shiota)
受付日: 平成4年10月10日

Ginsenoside Rh₂

Glycyrrhizin

図 1 Glycyrrhizin, Ginsenoside Rh₂ の化学構造

写真 1 マウス唾液腺腫瘍分離，培養細胞の位相差顕像 (×10)

えた。

検 討 方 法

1. 実験的唾液腺腫瘍誘発および腫瘍細胞分離，培養法

被検動物として，生後8週 dd 系マウス（雄）を用い，唾液腺腫瘍誘発は，先の誘発実験を参考に¹⁰⁾，顎下腺を標的臓器に選び，癌原性物質20-Methylcholanthrene (1.0 mg/100 g 相当量) を注入し，誘発をはかった。培養唾液腺腫瘍細胞（以下，培養 S.G. 腫瘍細胞に略）の獲得は，顕現化した唾液腺腫瘍より，通常の分離，培養手技により得た¹¹⁾。細胞培養は，10% 牛胎児血清加，Dulbecco modified Eagle's 培地で，37°C，5.0% CO₂，95.0% O₂ 気相下で培養した。

2. Glycyrrhizin 作用量と添加方法

Glycyrrhizin は（図 1），同じ植物性配糖体で，dammarane 骨格をアグリコンとした Ginsenoside Rh₂ の化学構造と類似した精製剤で，先の動物実験での結果を参考に⁹⁾，以下の方法で作用した。

10%牛胎児血清加，Dulbecco modified Eagle's 培養液 5.0 ml を入れた培養用プラスチックシャーレ（径6.0 cm）に培養 S.G. 腫瘍細胞を 7.0×10^3 /ml 植込み，Glycyrrhizin 0.1~1.0 mg/ml 量添加混入し，5日間培養し，細胞増殖抑制を検討した。

なお，すでに，抗腫瘍剤として使用され，Methylcholanthrene 肉腫に対して抗腫瘍効果の認められている Actinomycin D を検討対比に用いた。

3. 培養 S.G. 腫瘍細胞増殖抑制作用の検討法

5日間の培養中，経時的に細胞増減数の算定，Giemsa 染色による光顕の観察および走査電顕の細胞形態観察に加えて，Flow cytometry 法による細胞周期の解析を行った。細胞周期の解析は，Glycyrrhizin 作用24時間後，細胞をトリプシン・EDTA 液で剥離し，70% Ethanol 固定後，RNase (100 mg/ml) で 37°C，20 分間処理し Propidium iodide (0.05 mg/ml) で染色し，Ortho-Cytograf System で解析した。

写真 2 旺盛な増殖を示す培養 S.G. 腫瘍細胞の光顕像 (Giemsa 染色，×4)

検 討 結 果

1. 培養 S.G. 腫瘍細胞の増殖様相

20-Methylcholanthrene により誘発したマウス顎下腺腫瘍より分離した細胞は，10%牛胎児血清加，Dulbecco modified Eagle's 培地で旺盛な増殖をみた。

これら培養 S.G. 腫瘍細胞は，増殖過程で類円型～紡錘型を示し，樹枝状の突起を進展しながら増殖する所見を得た（写真 1）。細胞核は1～数個よりなり，N/C 比が大であった。Giemsa 染色で豊富な核小体が観察できた（写真 2）。培養 S.G. 腫瘍細胞の doubling time は 12.5 時間で，コロニー形成法による生存率，すなわち，平板効率が 24.0% であった。

2. Glycyrrhizin による培養 S.G. 腫瘍細胞の増殖抑制効果

培養 S.G. 腫瘍細胞増減の数的評価から（表，図 2），Glycyrrhizin 0.3 mg/ml 以下の添加量では，細胞増殖抑制がほとんどみられなかったが，0.4 mg/ml 以上の添加

表 Glycyrrhizin, Actinomycin D 添加による培養 S.G. 腫瘍細胞増減数

添加剤/量 培養日数	各剤添加後, 培養腫瘍細胞増殖数 cells/dish ($\times 10^4$)				
	0	1	2	3	4
Control	3.75 $\pm$ 0.50*	6.25 $\pm$ 0.25*	10.50 $\pm$ 0.25*	16.75 $\pm$ 0.50*	28.50 $\pm$ 0.75*
Glycyrrhizin 0.4 mg/ml		3.50 $\pm$ 0.75*	1.75 $\pm$ 0.75*	0.37 $\pm$ 0.12*	—
0.6 mg/ml		1.75 $\pm$ 0.75*	1.12 $\pm$ 0.37*	—	—
Actinomycin-D 0.5 μ g/ml		1.87 $\pm$ 0.62*	0.62 $\pm$ 0.62*	—	—

*: standard error

図 2 Glycyrrhizin, Actinomycin D 添加による培養 S.G. 腫瘍細胞増殖曲線

量で, 顕著な増殖抑制を認めた. この Glycyrrhizin 0.4 mg/ml 以上 0.6 mg/ml 添加量の細胞増殖抑制効果は, 検討対比に用いた Actinomycin D 0.5 μ g/ml 添加量の効果に匹敵していた.

増殖抑制された培養 S.G. 腫瘍細胞は, 病理組織的検査によれば, Glycyrrhizin 添加量の増量と作用期間の延長により, 位相差顕微鏡に細胞浮遊数の増多が目立つようになった. また, 光顕的に, 培養 S.G. 腫瘍細胞は細胞質に小滴様構造物の増多, 細胞核の異染性ないし濃縮,

写真 3 A, B Glycyrrhizin 0.6 mg/ml (A), および Actinomycin D 0.5 μ g/ml (B) 添加24時間後, 培養 S.G. 腫瘍細胞の光顕像 (Giemsa 染色, $\times 10$)

さらに, 細胞体の萎縮等の変性を通して, ひいては細胞死滅の所見を得た (写真3).

3. 培養 S.G. 腫瘍細胞の走査電顕的観察所見

旺盛な発育中の培養 S.G. 腫瘍細胞は, 類円型~紡錘型を呈し, 細胞の中央部が細胞核の発達による豊隆がみられ, かつ, 樹枝状に細長い細胞突起の伸展が認められる. しかも, 細胞表面は, 多数の微絨毛, 小球型構造物の発達が顕著で, 活発な細胞代謝の所見が得られた (写

写真 4 発育増殖中の培養 S.G. 腫瘍細胞の走査電顕像

写真 5 Glycyrrhizin 0.4 mg/ml 添加 24 時間後、増殖抑制のみられる培養 S.G. 腫瘍細胞の走査電顕像

写真 6 A, B Glycyrrhizin 0.6 mg/ml 添加 24 時間後、増殖抑制された培養 S.G. 腫瘍細胞の走査電顕像 (矢印：大、小孔様陥凹の散在する細胞表面)

真 4)。

これに対して、Glycyrrhizin 添加した培養 S.G. 腫瘍細胞では、添加量の増量と作用期間の延長に伴い、細胞表面の小球型構造物、微絨毛の発達が悪くなり、細長い細胞突起の伸展も貧弱で、ひいては、細胞核部の豊隆もみられなくなった。このような培養 S.G. 腫瘍細胞表面には、径 $1.0 \mu\text{m}$ 以下の大、小孔様陥凹の散在が認められ、Glycyrrhizin の細胞表面または細胞膜を介しての、細胞発育阻害が暗示される所見を得た (写真 5, 6)。他方、Actinomycin D 添加による細胞では、とくに細胞核部の豊隆の扁平化が目立った。

4. 培養 S.G. 腫瘍細胞の Flow cytometry 法による細胞周期の解析結果

Glycyrrhizin 0.6 mg/ml 添加および Actinomycin D $0.5 \mu\text{g/ml}$ 添加作用後、24 時間培養した培養 S.G. 腫瘍細胞を Flow cytometry 法により解析した結果、図 3～5 のごときパターンが得られた。

Glycyrrhizin は、 G_1 期細胞の著しい蓄積がみられ、

図 3 培養 S.G. 腫瘍細胞の DNA ヒストグラム

培養 S.G. 腫瘍細胞の増殖抑制が G_1 期から S 期への移行阻害によることが示唆された。他方、検索対比に用いた Actinomycin D では、 G_2 , M 期細胞の相対的割合が増大し、 G_2 期細胞のみならず M 期細胞にも阻害作用を示していた。Glycyrrhizin と Actinomycin D の抗腫瘍作用には差異が認められた。

図 4 Glycyrrhizin 0.6mg/ml 添加 24 時間後、培養 S.G. 腫瘍細胞の DNA ヒストグラム

図 5 Actinomycin D 0.5 µg/ml 添加 24 時間後、培養 S.G. 腫瘍細胞の DNA ヒストグラム

考 察

すでに、植物性配糖体のなかに、数種の癌細胞に対して、細胞増殖抑制のみならず再分化誘導能もあることがわかってきている^{4,5)}。

Glycyrrhizin は、甘草エキスに含まれている。サポニンの一種で、トリテルペノイド系サポニンの一種グリチルレチン酸と 2 分子のグロクロン酸との抱合物よりなっている。種々の生理、薬理作用が挙げられているなかで、制癌性にも注目されている製精剤である^{6,7,12)}。この制癌性薬理作用として、同じ植物性配糖体より抽出、精製した Ginsenoside Rh₂ と類似の薬理作用をもつとみなされているものの、その作用は未解明な点が多い。

著者らは、すでに唾液腫瘍誘発、増殖の動物実験で、この Glycyrrhizin に誘発抑制効果は認めており⁹⁾、本実験では、同誘発した唾液腺腫瘍から分離、培養細胞を用いて、細胞増殖抑制およびその作用について検索した。

唾液腺腫瘍誘発は、癌原性物質 20-Methylcholanthrene により試みた。20-Methylcholanthrene 唾液腺腫瘍は、榎本 (1964)¹³⁾、生田 (1961)¹⁴⁾、らの実験にもみられるが、比較的高い頻度で発癌し、上皮型ないし非上皮型の多彩な腫瘍組織型が得られる。このなかで非上皮型腫瘍は、増殖能が旺盛で、浸潤性に富み、線維肉腫様腫瘍である。本培養 S.G. 腫瘍細胞は、この細胞型より分離した細胞株である。10% 牛胎児血清加、Dulbeccomodified Eagle's 培地で、旺盛な増殖能を示した。この腫瘍細胞の doubling time は 12.5 時間、平板効率 24.0% であった。

Glycyrrhizin の培養 S.G. 腫瘍細胞に対する増殖抑制の検討に当って、本精製剤が腫瘍増殖抑制に有効な量に関する報告が他に見当たらないため、先の動物実験による誘発抑制有効量を参考に⁹⁾、一応、0.2~1.0 mg/ml 添加量で検討した。その結果、培養 S.G. 腫瘍細胞増殖

は、数的に 0.4 mg/ml 添加以上の濃度で抑制を認めた (表 1, 図 2)。さらに、Glycyrrhizin 0.4~0.6 mg/ml 添加量で細胞増殖抑制効果は、検討対比に用いた Actinomycin D 0.5 µg/ml 添加量での増殖抑制効果に匹敵した結果を得た。

Glycyrrhizin を作用した培養 S.G. 腫瘍細胞は、病理組織学的に、添加の増量と作用時間の延長に伴い、経時的に浮遊細胞が増多し、Giemsa 染色により、細胞質に小滴様構造物の増多、細胞核の異染性ないし濃縮等、細胞の変性、崩壊過程が観察された。

各種抗腫瘍剤は、それぞれ特異的作用機序を有している^{1,2)}。検討対比に用いた Actinomycin D では、DNA の Guanine と結合し複合体をつくり、DNA 依存性の RNA polymerase の作用が阻害され、RNA 生成が抑制される抗腫瘍薬理作用が指摘されている。Glycyrrhizin の抗腫瘍作用機序は、現在のところ、不詳である。しかし、類縁の植物性配糖体 Ginsenoside Rh₂ の抗腫瘍作用機序については、かなり究明されてきており、化学構造的に細胞膜系に対する高い親和性を有することから、細胞膜に一次的作用部位があり、細胞膜機能の変化を与え、抗腫瘍作用を発揮するのではないかと考えられている^{15,16)}。これらから推察し、Glycyrrhizin にも類似的作用機序が思慮される。

そこで Glycyrrhizin により増殖抑制された培養 S.G. 腫瘍細胞の形態的微細構造の変化について走査電顕の観察を加えたところ、対照の旺盛な培養 S.G. 腫瘍細胞に比べて、Glycyrrhizin を作用した細胞は、細胞表面の微絨毛、細長く伸展した細胞突起の発達が悪くなり、ひいては、細胞核相当部の豊隆部も減少し、さらに、小孔様陥凹の散在する所見が得られた。このような細胞変性所見から、Glycyrrhizin の抗腫瘍作用として、まず細胞膜を介しての代謝阻害が強く示唆された (写真 4, 5)。他方、Actinomycin D では、細胞核相当部の豊隆がなくなり、核内代謝阻害が暗示された。

終わりに、この培養 S.G. 腫瘍細胞に対する Glycyrrhizin

rhizin の増殖抑制作用が、細胞周期のどの期に作用しているかを Flow cytometry 法により解析した結果、 G_1 期細胞の著しい蓄積がみられ、増殖抑制が G_1 期から S 期への移行阻害によることが示唆された。 G_2 および M 期に蓄積がみられた Actinomycin D とは、作用機序に差異が認められた。

ま と め

Glycyrrhizin の腫瘍増殖抑制作用について、実験的に誘発した唾液腺腫瘍より分離、培養細胞を用いて検討した結果、

- 1) Glycyrrhizin は培養 S.G. 腫瘍細胞に対して、増殖抑制を示した。
- 2) この細胞増殖抑制作用の Glycyrrhizin 添加量は、0.4 mg/ml 以上の添加量を必要とした。なお 0.4 ~ 0.6 mg/ml 添加量の増殖抑制は、検対比に用いた Actinomycin D 0.5 μ g/ml 添加量に匹敵する効果を示した。
- 3) Glycyrrhizin の細胞増殖抑制作用として、形態的培養 S.G. 腫瘍細胞表面構造の走査電顕的観察から、細胞膜を介しての代謝阻害が強く示唆された。
- 4) Flow cytometry 法による細胞周期の解析から、培養 S.G. 腫瘍細胞は、Glycyrrhizin の G_1 期から S 期への移行阻害が示唆された。

稿を終えるにあたり、本研究に終始ご教示を頂いた本学病理学第 1 講座小田島肅夫教授に深甚の謝意を表する。

なお、本研究の一部は日本私学振興財団学術研究振興資金の援助を受けた。

引 用 文 献

- 1) 藤田 浩：癌化学療法剤作用機序概説 (1) — 各種癌化学療法剤の作用機序 —。臨床化学 16: 1405-1470 1980。
- 2) 仁井谷 久，林原賢治：抗がん剤の適応。吉田清一監修：がん化学療法の副作用対策。先端医

学社，東京，1992，92-102頁。

- 3) 田井信男，天笠光雄，他：ヒト顎下腺由来初代培養細胞に対する各種制癌剤の影響についての電子顕微鏡的研究。日口外誌 31: 1615-1623 1985。
- 4) Odashima, S., Nakayabu, Y., et al.: Induction of phenotypic reverse transformation by ginsenoside in cultured Morris hepatoma cells. Eur J Cancer 15: 885-892 1979。
- 5) 小田島肅夫：脱癌と植物性配糖体—ginsenoside による癌細胞の再分化誘導能を中心に—。日本臨牀 44: 245-253 1986。
- 6) 玉井定美，原 伸一，他：グリチルリチンによる悪性腫瘍の転移抑制現象。Mino Med Rev 13: 47-50 1968。
- 7) 渡 伸三，馬淵良生，他：化学物質による肝がんの発生とその防禦に関する超微形態的研究。Proc Symp WAKAN-YAKU 11: 11-23 1978。
- 8) 塩田 覚，吉田 徹，他：植物性配糖体 ginsenoside の唾液腫瘍の増殖抑制に関する実験的研究。日口外誌 32: 905-912 1987。
- 9) 塩田 覚，吉田 徹，他：植物性配糖体 ginsenoside の唾液腺誘発抑制に関する実験的研究。日口外誌 34: 1548-1556 1988。
- 10) 塩田 覚，南 英治，他：実験的唾液腺腫瘍に関する研究。京大口科紀要 18: 28-29 1978。
- 11) 日本組織培養学会編：組織培養の技術。朝倉書店，東京，1986，40-41頁。
- 12) 熊谷 朗：甘草，特にグリチルリチンの薬理作用と臨床応用への問題点。Mino Med Rev 25: 185-194 1980。
- 13) 榎本昭二：耳下腺における実験的腫瘍形成の研究。口病誌 31: 201-224 1964。
- 14) 生田信孝：顎下腺における実験的腫瘍形成の研究。口病誌 28: 373-386 1961。
- 15) Odashima, S., Ohta, T., et al.: Control of phenotypic expression of cultured B₁₆ melanoma cells by plant ginsenosides. Cancer Res 45: 2781-2784 1985。
- 16) Ohta, T., Maeda, M., et al.: Mechanism of action of ginsenoside Rh₂: Uptake and metabolism of ginsenoside Rh₂ by cultured B₁₆ melanoma cells. J Pharm Sci 80: 1141-1146 1991。