薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
114 (7) 533-538 (1994)

4 種類の生薬エキスの制ガン剤 Cyclophosphamide 投与マウスの 免疫応答に及ぼす影響

金 鋭,^a 万 玲玲,^b 三石俊美,^b 児玉一恵,^b 倉茂達徳^{*,c}
群馬大学医学部微生物学,^a 第三内科学,^b 同・医療短大^c

Immunomodulative Effects of Chinese Herbs in Mice Treated with Anti-tumor Agent Cyclophosphamide

Rui JIN,^a Ling Ling WAN,^b Toshimi MITSUISHI,^b
Kazue KODAMA,^b and Satonori KURASHIGE^{*,c}

*Department of Microbiology,^a Third Department of Internal Medicine,
School of Medicine,^b and Department of Medical Technology,
College of Medical Care and Technology,^c
Gunma University, Maebashi 371, Japan*

(Received February 7, 1994)

Extracts of Chinese herbs were administered with antitumor agent, cyclophosphamide (CY), and their effects on macrophages and lymphocytes were studied. Number of peritoneal macrophages significantly decreased and their chemotactic activity was suppressed by treatment with CY. Blastogenic responsiveness to Concanavalin A and NK cell activity of spleen lymphocytes were suppressed significantly in CY-treated mice.

Extracts of Lithospermi radix, Astragali radix and Glycyrrhizae radix showed protective effects on immunosuppressive mice. The number of macrophages, chemotactic activity of macrophages and blastogenic response of lymphocytes were recovered to the same or more than that of normal levels.

An extract of Ginseng radix showed protective effects on the number and functions of macrophages by treatment with CY but did not show any effects on the lymphocytic blastogenesis. On the contrary it showed a strong inhibitory effect on the NK cell activity.

These results suggest that Chinese herbs could modulate cellular immune response, especially in the activation of macrophages and splenic lymphocytes.

Keywords—cyclophosphamide; chinese herb; macrophage; T-lymphocyte; NK cell

緒 言

中国伝統医療薬は、長期経口投与ができ、副作用の減少のために数種類の生薬を調合して用い、特に体質改善、疾病予防に役立つ。近年、臨床にも病中病後の体力増強、細菌やウイルス感染症改善などに有効な治療法として使用されている。^{1,2)} ガンの化学療法あるいは放射線療法の副作用軽減のため併用されることもある。^{3,4)} また、ガンの手術後の回復にもよい効果を与えることも報告されている。⁵⁾

一方、これら生薬の生体内での作用について特に宿主の免疫機能に対する影響については、科学的な裏付けがまだ少ない。我々は、滋養強壮剤として使われるニンジン、シコン、オウギ、カンゾウの免疫賦活作用を解析することを目的とした研究を進めている。

今回は、4種類の生薬エキスの制ガン剤 Cyclophosphamide 投与マウスのマクロファージ及びリンパ球の機能に対する増強作用を検討した成績を報告する。

実験材料及び方法

動物 実験には、日本チャールスリバー社から購入した6週齢のICR系雌のマウスを用いた。

制ガン剤及び漢方薬とその投与法 制ガン剤として Cyclophosphamide (CY, 塩野義製薬、大阪) を用いた。CY は注射用蒸留水に溶解してマウスの腹腔内に 300 mg/kg を投与した。

実験に使用した各種生薬は、和漢薬研究所(群馬県富士見村)より提供を受けた。各生薬についてオタネニンジン (*Panax ginseng* C. A. MEYER, 中国吉林省) 及びシコン (*Lithospermum erythrorhizon* SIEBOLD et ZUCCARINI, 中国遼寧省) は、生薬 1.0 kg に 30% エタノール 15.0 l を加え、72 時間冷浸、浸出液を濾過し、濃縮エキスとした。オウギ (*Astragalus membranaceus* BUNGE, 中国陝西省) は、1.0 kg に水 15.0 l を加え、温浸の後、浸出液を濾過し、濃縮エキスとした。カンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis* FISHER, 中国内モンゴル) は、粉末として用いた。各生薬のマウスへの毎日投与量は、生薬の乾燥重量としてニンジン 60 mg/kg, シコン 35 mg/kg, オウギ 10 mg/kg, カンゾウ 1 mg/kg で、蒸留水に溶解してマウスに1日1回ずつ経口ゾンデで実験期間中(7日間)投与した。実験開始日に CY 300 mg/kg をマウスの腹腔内に1回のみ投与した。実験マウスを8日目に屠殺し、腹腔内マクロファージ及び脾臓リンパ球の機能を測定した。

腫瘍細胞及び培養培地 NK細胞の標的細胞として、YAC-1細胞を用いた。10% ウシ胎児血清 (FCS; Irvine Scientific, Santa Ana, CA), 50 単位/ml ペニシリン G カリウム (明治製薬, 東京), 50 µg/ml 硫酸ストレプトマイシン (大日本製薬, 東京) を含む RPMI 1640 メディウムを細胞培養用培地とした。

マクロファージの数及び遊走能の測定 ICR マウスの腹腔内に一定量の細胞培養用培地 (RPMI 1640) を注入し、腹腔をよく洗滌して、腹腔内細胞を回収して、各群のマクロファージ数を血球計算板を用いて数えた。計算したマクロファージを培養プレートに1時間、37°C、培養し、張り付けたマクロファージを回収した。⁶⁾ マクロファージ遊走能は、Boyden チャンバー法で測定した。⁷⁾

リンパ球幼若化反応の測定 リンパ球をマウス脾臓より採取し、 2×10^6 /ml に細胞培養用培地で調整した。100 µl のリンパ球浮遊液を 96 well マイクロプレートに分注し、Con A (20 µg/ml, E-Y ラボトリーズ, San Mateo, CA) で刺激し、72 時間培養した。培養の終わる4時間前に [³H]thymidine の 0.5 µCi/ml でリンパ球をラベルし、ハーベスターで細胞をガラスファイバーフィルター上に回収し、シンチレーションカウンターで [³H]thymidine のリンパ球への取り込み量を測定した。⁸⁾

NK細胞活性の測定 NK細胞 (natural killer cell) 活性は、YAC-1細胞を標的細胞として、Eu (europium) リリース法を用いて測定した。⁹⁾ YAC-1細胞を硝酸 europium (Aldrich, Milwaukee) で標識した後、培養液で 5×10^4 /ml に調整し、E/T 比 100/1 になるようにリンパ球浮遊液及び YAC-1細胞浮遊液を 100 µl ずつ当量混合し、500 × g, 5 分間遠心後、5% CO₂, 温度 37°C で、4 時間培養した。培養後、上清 20 µl ずつを採取し、増強試薬 (Wallac Oy, Turku, Finland)

100 μ l を加えて、室温下で 5 分間反応させた後、時間分解蛍光光度計により、上清中に放出された Eu の蛍光強度を測定した。最大放出量は、標的細胞 100 μ l に 0.1% Triton-X100 100 μ l を添加し、標的細胞を完全に溶解させて計測した。細胞傷害活性は、以下のように計算した。

$$\% \text{ 細胞傷害活性} = \{(\text{実験群の Eu 放出量} - \text{自然放出量}) / (\text{最大放出量} - \text{自然放出量})\} \times 100$$

統計処理 各実験成績の有意差検定は、Student *t*-test によって行った。

結 果

腹腔マクロファージ数に対する影響

実験開始 7 日後にマウスを屠殺し、腹腔マクロファージ数を測定した (Fig. 1)。各群 3 匹のマウスを使用した。CY 投与マウスの腹腔マクロファージ数は、正常無処理マウスに対して低下していたが、有意差は認められなかった。それに対して、CY と同時に、シコンを投与した群及びオウギを投与した群では、CY 単独投与群に比して有意に高値を示し、正常レベル以上のマクロファージ数が見られた。CY とともにニンジン及びカンゾウを投与した群では、CY 単独投与群より高値を示したけれども、有意差が認められなかった。これらの成績より、シコンとオウギには、CY 投与の障害によって低下する腹腔マクロファージ数を障害から防ぎ正常に回復する能力があることが認められた。

腹腔マクロファージの遊走活性に対する影響

CY 単独投与群のマクロファージの遊走数は、正常マウスと比して有意に低下していた。それに対して、CY と同時にニンジン投与群、シコン投与群、オウギ投与群、カンゾウ投与群では、CY 単独投与群に比して有意に高値を示し、マクロファージの遊走活性に対する CY による障害を防御していることが示唆された (Fig. 2)。特にニンジンとオウギ投与群では正常とほぼ同じあるいはそれ以上のマクロファージ遊走能を示した。

リンパ球幼若化反応に対する効果

マウスの脾臓よりリンパ球を採取し、各群 2 $\times 10^6$ /ml に培養培地に浮遊させ、Con A で刺激し、幼若化反応を検討した。Fig. 3 に示したように CY が T リンパ球の幼若化能を著しく障害した。CY と同時にシコン及びカンゾウを投与した群では、CY 単独投与群に比して有意に高い幼若化反応を示し、特にカンゾウ投与群で

Fig. 1. Effect on Number of Peritoneal Macrophages

At the beginning of the experiment, mice were given intraperitoneally a single injection of 300 mg/kg Cyclophosphamide. And for 7 d from the day after the administration of CY, the mice were orally given each Chinese herbal extract. At 8th days, the mice were sacrificed and the peritoneal macrophages of mice were counted.

Fig. 2. Effect on Chemotactic Activity of Peritoneal Macrophages

At 8th day after CY injection, the chemotaxis of the peritoneal macrophages were assayed by the method of Boyden chamber.

は正常より高いレベルを示した。オウギ投与群ではCY投与群より高い幼若化反応が見られたが、有意差はなかった。ニンジン投与群では、その効果が認められず、逆にやや抑制傾向が現れた。

NK細胞活性に対する効果

CYとともに各生薬を投与したマウスの脾臓リンパ球中のNK細胞活性をYAC-1細胞を標的とした europium release assay で測定した (Fig. 4)。Europium の最大放出量は、平均値が 305979 cps で、自然放出量は、平均値が 81670 cps だった。CY投与群では、正常より著しく低いNK活性を示した。CYと一緒にシコン又はカンゾウを投与した群では、CY投与群より有意に高いNK活性を示した。オウギとCYを併用すると正常マウスリンパ球のそれより有意に高いNK細胞活性を示した。しかし、ニンジンと併用するとCYの単独投与よりもっと強い抑制傾向が見られた。

考 察

滋養強壮薬としてよく使われている十全大補湯、補中益気湯などには、近年、抗腫瘍、¹⁰⁾ 抗体産生及びサイトカイン産生増強、¹¹⁾ 抗ガン剤の副作用防止¹²⁾ と様々な作用が報告されている。

本稿において使用した滋養強壮生薬、オタネニンジン (Ginseng radix) の主成分は、サポニンとして ginsenoside Ro, Ra—Rh などが分離されており、その真正サポゲニン、Ro は oleanolic acid であるが、その他は、dammarane 系で、Rb1, Rb2, Rc, Rd などのそれは (20S)-protopanaxadiol であり、Re, Rf, Rg1, Rg2, などは、(20S)-protopanaxatriol である。免疫系に対する影響は、ヒトの末梢血培養に ginsenoside Rg1 の enzymes の放出作用、¹³⁾ ヒツジ赤血球に対するマウスの凝集抗体価及び脾プラーク形成細胞数増加並びにインターフェロン誘発増強効果、¹⁴⁾ マウス X 線障害に対する防護並びに回復作用、¹⁵⁾ エーテル及びエタノールエキスには抗腫瘍作用^{16,17)} などが報告されている。我々の実験で、制ガン剤 CY と併用するとマウスのマクロファージ遊走活性が著しく増強し、異物への移動も加速されている。しかし、胸腺由来の T 細胞に対する幼若化反応は、やや低下した作用が見られ、腫瘍細胞 YAC-1 に対する NK 細胞の障害活性がかなり抑制された。ニンジンの使用量は、普通より大きいことが原因となる可能性が考えられている。

生薬のオウギ (Astragali radix) について、いままでの研究では、主な成分がまだはっきり分かっていないが、含有成分として 2',4'-dihydroxy-5,6-dimethoxyisoflavone, 1-canavanine, フェノール配糖体、サポニン、イソフラボンなどが報告されている。免疫薬理学の研究について、

Fig. 3. Effect on Blastogenesis of Lymphocytes

At 8th day after CY injection, the blastogenesis of splenic lymphocytes were assayed with method of [³H]thymidine uptake.

Fig. 4. Effect on NK Cell Activity

At 8th day after CY injection, the cytotoxic activity of NK cell in the splenic lymphocytes were measured by method of the europium release assay.

水溶性エキスにはマクロファージの貪食作用増強効果,¹⁸⁾ 多糖類には腹腔マクロファージ産生促進作用,¹⁹⁾ 抗腫瘍作用及び TNF 産生増強効果¹⁸⁾ などがある。我々の実験では、これらの成分を含んでいるオウギには腹腔内のマクロファージ数及び遊走能ともに増強作用があるので、それは細網内皮系統に刺激を与えると考えられる。また、標的細胞 YAC-1 に対する障害活性の測定結果から、CY による NK 細胞障害活性の降下を完全に回復させた。

カンゾウ (*Glycyrrhizae radix*) の主成分は、glycyrrhizin (glycyrrhizic acid) $C_{42}H_{62}O_{16}$ (甘味成分) である。免疫系に対する薬理作用は、抗アレルギー作用,²⁰⁾ 抗ウイルス作用,²¹⁾ インターフェロン誘起作用,²²⁾ 発ガンプロモーター阻害作用,²³⁾ 多糖類の glycyrrhizan UA, UB, UC には細網内皮系賦活活性²⁴⁾ などが認められている。我々の実験で、カンゾウは、CY により抑制されたマクロファージの遊走能を回復させた。さらに T リンパ球に対する幼若化反応も著しく増強した。またカンゾウは、NK 細胞の CY による抑制も有意に回復させた。

シコン (*Lithospermum radix*) の主成分は、ナフトキノンの色素 acetylshikonin $C_{18}H_{18}O_6$ 及びその同族体, lithospermic acid, 青酸配糖体 lithospermoside, allantoin, 多糖, フリルヒドロキノン誘導体などを含む。免疫薬理作用は、メタノールエキスには EB ウイルス抑制効果及び発ガンプロモータの抑制作用,²⁵⁾ マウス Sarcoma 180 及びエールリッヒ腹水ガンに対する抗腫瘍作用²⁶⁾ などが報告されている。我々の実験では、生薬シコンから抽出したエキスを制ガン剤 CY と併用することにより、CY によって抑制された腹腔内マクロファージ数、遊走能、リンパ球の幼若化活性、及び NK 細胞活性は、全面的に回復された。しかし、正常無処理マウスのレベルにはならなかった。

その作用機序に関しては、現在試験管内でマクロファージ及びリンパ球に対する各生薬エキスの直接作用を検討している。予備実験では、腹腔マクロファージ及びリンパ球に対しては生薬エキスが直接作用して、インターロイキン 1 (IL-1)、腫瘍壊死因子 (TNF)、インターロイキン 2 (IL-2) 及びインターフェロン γ (IFN γ) 産生を促す生薬が認められている。今後、さらに *in vivo* で検討を加え、悪性腫瘍への影響について基礎的及び臨床的意義を明らかにしたいと思う。

引用文献

- 1) J. Cyong, Y. Otsuka, *Acupuncture & Electro-Therapeutics Res. Int. J.*, **7**, 173 (1982).
- 2) 趙 瑾, 中西医结合, **1**, 8 (1990).
- 3) T. Kurokawa, J. Imai, S. Tamakuma, *Biotherapy*, **3**, 789 (1989).
- 4) Y. Hosokawa, 和漢医薬学会誌, **3**, 164 (1986).
- 5) 上村邦紀, *JAMA* (日本語版別冊付録), 1992, 6月号, p. 45.
- 6) 熊谷勝男, 伊東恭悟, 日沼州司, 多田正人, “免疫実験操作法 VIII,” 日免疫学会, 金沢, 1979, pp. 2473—2480.
- 7) S. Kurashige, S. Mitsuhashi, *Gann*, **73**, 85 (1982).
- 8) S. Kurashige, Y. Akuzawa, S. Mitsuhashi, *Scand. J. Immunol.*, **22**, 1 (1985).
- 9) K. Blomberg, C. Granberg, I. Hemmila, T. Lovgren, *J. Immunol. Methods*, **86**, 225 (1986a).
- 10) 伊藤 均, 志村圭志郎, “最新の漢方薬理,” 細谷英吉, 山村雄一, 監修, *Excerpta Medica*, 東京, 1988, pp. 283—290.
- 11) 森澤成司, 生体防御, **7**, 281 (1990).
- 12) 原中瑠璃子, 岡戸英之, 長谷川律子, 玄 松子, 劉 愛民, 中川滋木, 里見信子, 桜井明子, 原中勝征, “最新の漢方薬理,” 細谷英吉, 山村雄一監修, *Excerpta Medica*, 東京,

1988, pp. 303—312.

- 13) Y. Ushino, *Am. J. Chinese Med.*, **20**, 91 (1992).
- 14) V. K. Singh, S. S. Agarwal, B. M. Gupta, *Planta Med.*, **50**, 462 (1984).
- 15) M. Yamamoto, A. Kumagai, Y. Yamamura, *Arzneim.-Forsch.*, **27**, 1404 (1977).
- 16) K. D. Lee, R. R. Huemer, *Jpn. J. Pharmacol.*, **21**, 299 (1971).
- 17) K. Haranaka, N. Satomi, A. Sakurai, R. Haranaka, N. Okada, M. Kobayashi, *Cancer Immunol. Immunother.*, **20**, 1 (1985).
- 18) B. H. S. Lau, P. Ong, J. Tosk, *Phytother. Res.*, **3**, 148 (1989).
- 19) J. Wang, H. Ito, K. Shimura, *Jpn. J. Pharmacol.*, **51**, 432 (1989).
- 20) 三宅健夫, アレルギー, **10**, 131 (1961).
- 21) R. Pompei, O. Flore, M. A. Marcciallis, A. Pani, B. Loddo, *Nature* (London), **281**, 689 (1979).
- 22) N. Abe, T. Ebina, N. Ishida, *Microbiol. Immunol.*, **26**, 535 (1982).
- 23) H. Nishino, K. Yoshioka, A. Iwashima, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **77**, 33 (1986).
- 24) N. Shimizu, M. Tomoda, M. Kanari, R. Gonda, A. Satoh, N. Satoh, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 3069 (1990).
- 25) 木島孝夫, 小塚睦夫, 徳田春邦, 田部昌弘, 薬誌, **109**, 843 (1989).
- 26) U. Sankawa, H. Otsuka, Y. Kataoka, Y. Iitaka, A. Hoshi, K. Kureitani, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 116 (1981).