

## 六味丸のラット膀胱腫瘍に対する抗腫瘍作用及び転移抑制作用の検討

田山 邦昭\*, 高橋 博\*, 矢野 範男\*, 湯澤 勝廣\*,  
長澤 明道\*, 坂本 義光\*, 青木 直人\*

### Studies on Antitumor and Antimetastatic Activities of Rokumi-gan in Rats

KUNIAKI TAYAMA\*, HIROSHI TAKAHASHI\*, NORIO YANO\*, KATSUHIRO YUZAWA\*,  
AKEMICHI NAGASAWA\*, YOSHIMITSU SAKAMOTO\* and NAOTO AOKI\*

**Keywords:** 漢方薬 chinese medicine, 六味丸 Rokumi-gan (Liu-Wei-Wan), 抗腫瘍作用 antitumor activity, 転移抑制作用 antimetastatic activity, ラット膀胱腫瘍, rat bladder tumor

### 緒 言

漢方方剤、六味丸は、熟地黄、山薬、山茱萸、沢瀉、茯苓、牡丹皮の6種類の生薬から構成されている。これら構成生薬の中には抗腫瘍作用に関する報告<sup>1,6)</sup>や免疫賦活化作用の報告<sup>7,8)</sup>などがある。一方、六味丸そのものについては、これらの報告はほとんどなく<sup>9)</sup>、制癌剤との併用による増強作用<sup>10,11)</sup>や癌化防止等の臨床的效果<sup>12)</sup>が指摘されている。著者らは化学物質により誘発したラット膀胱腫瘍の継代移植から、性質を異にする種々の移植株を樹立した<sup>13-17)</sup>。今回その中高転移性株<sup>17)</sup>を用いて、当所東洋医学プロジェクト研究の一環として六味丸の抗腫瘍作用・転移抑制作用について検討したので報告する。

### 実験材料及び方法

**被験物質:** 六味丸は熟地黄 8, 山薬 4, 山茱萸 4, 沢瀉 3, 茯苓 3, 牡丹皮 3 の割合で均一に混合, 粉末化した薬剤を用いた (ウチダ和漢薬株式会社; Lot No. 900830)。

**動物及び飼育条件:** F344/DuCrjラット, 4週齢, 雄を日本チャ-ルス-リバ-(株)より購入, 6週間予備飼育後10週齢で実験に供した。バリア動物飼育室(室温24-25, 湿度50-60%, 換気HEPAフィルター経由10回/時, 照明(6:00-18:00))で個別ステンレスケージを用い, 全て1匹飼いとす。滅菌フィルター経由水道水を自由に与え, 実験開始までは固形飼料CE-2(日本クレア(株))を摂取させた。

**腫瘍細胞:** 著者らが樹立した高転移性ラット膀胱腫瘍株

を用いた。本細胞は2%オルトフェニルフェノ-ルナトリウム添加飼料を雄性F344/DuCrjラットに摂取させ、誘発させた膀胱腫瘍に由来するもので、同系ラットへの皮下移植により、継代維持されている。本移植株は、肺及びリンパ節(腋窩, 肘, 腎門, 腰部, 胸部等)に高率に転移し、浸潤性を有する<sup>17)</sup>。

**腫瘍移植及び薬物投与:** 皮下移植株(30代目)を摘出し, 20% FBS 添加 MEM 培地を用いて腫瘍細胞数が  $5 \times 10^6$  個/ml になるように調整した。その細胞浮遊液 0.2ml ( $10^6$  個) を10週齢のF344ラット右背部皮下に注射(18G注射針使用)した。なお各群間で移植細胞数にバラツキが生じないように、同一細胞浮遊液を用い、各群の一番目の動物から順次各群の二番目, 三番目と移植を行った。皮下移植後注入液が漏れ出さぬように直ちに外科用アロンアルファA(三共(株))で注射口を接着した。

六味丸の投与は、六味丸を0.4, 1.2, 3.6%の濃度で粉末飼料(CE-2; 日本クレア(株)製)に添加し、固形化した飼料を用いて、移植後各群11匹に与えた。対照として粉末飼料CE-2のみを同様に固形化したものを13匹に摂取させた。

**観察及び検査:** 毎週1回体重測定及び皮下を触診し、ノギスで腫瘍の皮膚厚を引いた長径・短径を計測した。本移植腫瘍はおよそ15mm以上になると充実性の増殖をせず嚢胞状になるため、正確な腫瘍サイズの計測は困難である。そこで腫瘍増殖抑制の指標として、長径10mmに達した週及び死亡時の皮下腫瘍重量を比較した。動物は全て死亡するまで飼育し、死亡の有無を毎日観察した。

\* 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

\* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
3-24-1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

延命効果の指標として、各群の平均生存日数を算出した。死亡例は直ちに剖検し、肉眼的観察後、皮下腫瘍、転移した臓器、リンパ節などを含めた主要臓器・組織を摘出し、皮下腫瘍及び肺の重量を測定した。皮下腫瘍重量では、嚢胞性のものは貯留液を除いて計測した。肺重量では、表面結節数の計測を容易にするために以下のように求めた。まず肺と気管を離断せずに摘出・秤量し、ホルマリン液10mlを注入し肺を膨張させた。その後肺から気管を離断し、気管を秤量した。この値を肺と気管を合わせた秤量値から減じて肺重量とした。摘出臓器・組織は直ちに10%緩衝ホルマリン液で固定し、常法によりパラフィン切片を作製し、HE染色を行い、病理組織学的検査材料とした。転移抑制の指標として、肺では、各群における転移を示す動物の割合（転移率）、表面結節数及び重量を、リンパ節では転移率を比較した。統計処理は、一元分散分析を行った。

**結 果**

抗腫瘍作用の検討：皮下移植腫瘍の生着率は100%であった。表1に移植開始時及び死亡動物の剖検時の体重、皮下腫瘍の長径10mmに達する週、皮下腫瘍の重量、平均生存日数を示した。体重は剖検時においても、各群間で有意差（ $p < 0.05$ ）はみられず、またデータは示していないが実験期間中においても、各測定週の群間で有意

差はなかった。腫瘍増殖の指標となる長径10mmに達する週や皮下腫瘍の重量には、各群間で有意差はみられなかった。延命効果の指標である平均生存日数にも、各群間で有意差はみられなかった。皮下腫瘍の組織学的な性状は、対照群と投与群で差はみられず、いずれも原発腫瘍の移行上皮癌（Grade 3）に類似していた。これより、六味丸にはラット膀胱腫瘍に対して抗腫瘍作用を示す成績は得られなかった。

転移抑制作用の検討：表2に肺における転移率、表面結節数（全数、1mm以上）、重量及びリンパ節転移率を示した。肺転移率は各群で100%であり、表面結節数、重量に各群間に有意差はみられなかった。なお1mm以上の表面結節数において投与濃度に依存して、僅かではあるが減少傾向がみられた。リンパ節転移率も各群100%であり、部位別では主に腋窩、肘、腎門、腰部、胸部、兪径等に高率に転移したが、各群間における同一部位のリンパ節間の転移率にも明確な差はみられなかった。組織学的な性状も対照群と投与群とで変化はほとんどみられていない。これより、六味丸に転移率を減じる作用は認められなかった。

**考 察**

六味丸の構成生薬やその抽出物中には、動物実験において延命効果や腫瘍増殖抑制等の抗腫瘍作用が報告され

表1．抗腫瘍作用の検討

群 <sup>a)</sup>	例数 <sup>b)</sup>	体重 <sup>c)</sup> (g)		長径10mmに達する週	皮下腫瘍の重量 (g)	生存日数
		開始時	剖検時			
0% (対照)	13	191 ± 27 <sup>d)</sup>	236 ± 23	4.2 ± 0.4	62 ± 12	120 ± 9
0.4%	11	190 ± 17	244 ± 25	4.3 ± 0.5	67 ± 21	119 ± 9
1.2%	11	193 ± 19	229 ± 33	4.5 ± 0.5	58 ± 18	120 ± 10
3.6%	11	193 ± 18	231 ± 18	4.3 ± 0.5	61 ± 23	115 ± 9

- a) 六味丸の飼料添加濃度, b) 移植した動物数 (移植成立した動物数に一致),
- c) 開始時: 移植開始時, 剖検時: 死亡動物の剖検時, d) 平均値 ± 標準偏差.

表2．転移抑制作用の検討

群 <sup>a)</sup>	例数 <sup>b)</sup>	転移率 <sup>c)</sup>	肺		重量 (g)	リンパ節転移率 <sup>c)</sup>
			結節数			
			全数 <sup>d)</sup>	1mm以上 <sup>e)</sup>		
0% (対照)	13	100 (13/13)	85 ± 23 <sup>f)</sup>	68 ± 25	4.56 ± 1.26	100 (13/13)
0.4%	11	100 (11/11)	75 ± 32	60 ± 28	5.02 ± 1.79	100 (11/11)
1.2%	11	100 (11/11)	69 ± 27	54 ± 24	5.04 ± 2.93	100 (11/11)
3.6%	11	100 (11/11)	75 ± 26	52 ± 24	4.92 ± 2.67	100 (11/11)

- a) 六味丸の飼料添加濃度, b) 移植した動物数 (移植成立した動物数に一致),
- c) %, ( ): 転移した動物数/移植した動物数, d) 全葉の全ての結節数 (1mm以下を含む),
- e) 全葉の1mm以下を除いた結節数, f) 平均値 ± 標準偏差.

ているものがある<sup>1-6)</sup>。一方、六味丸には制癌剤との併用で増強効果<sup>10,11)</sup>や各種化学発癌剤に対して発癌抑制作用<sup>9)</sup>があることが動物実験で示されており、臨床的には食道上皮の癌化を防止する<sup>12)</sup>ことが報告されている。また移植腫瘍に対する延命効果も僅かではあるが指摘されている<sup>9)</sup>。これらのことから六味丸そのものにも何らかの抗腫瘍作用があることが期待された。今回行った高転移性ラット膀胱腫瘍を用いた実験では、六味丸に腫瘍増殖抑制、延命、転移抑制などの抗腫瘍・転移抑制作用は認められなかった。藤井ら<sup>18,19)</sup>は、六味丸の中年期(18ヶ月)からの投与実験や長期毒性試験で、F 344ラットの自然発生腫瘍の発生率に六味丸投与があまり影響しないことを報告している。また横田ら<sup>10)</sup>の Sarcoma 180を用いたマイトマイシンとの併用による制癌作用増強効果の実験において、六味丸単独投与群には延命効果は認められていない。一般に、種々の腫瘍に対する制癌剤の効果において、抗腫瘍スペクトルの違いが知られている。六味丸は少なくとも本実験のラット膀胱腫瘍株やSarcoma 180に対しては顕著な抗腫瘍作用はないように思われる。なお、今回肺転移において、1 mm以上の結節数が僅かではあるが用量相関性に減少する傾向がみられた。六味丸構成生薬の熟地黄に関連した地黄には転移抑制作用<sup>6)</sup>が報告されており、また茯苓の抽出物には抗腫瘍性成分<sup>14)</sup>も発見されている。従って、結節数減少傾向については、地黄や茯苓抽出物あるいは他の微量成分が転移抑制に関係していることも考えられる。なお、今回使用した添加飼料0.4%は、六味丸散剤のヒトの一日常用量180mg/kg体重/日に相当する(大人、1日9g、3回に分けて服用との都立病院の処方から大人の体重を50kgとした場合と200gのラットが1日約10g飼料を摂取することから換算した値)。添加飼料1.2%は540mg/kg体重/日、3.6%は1620mg/kg体重/日となる。従って、今回の実験は、ヒトの一日当たりの常用量の1 - 9倍量をラットに摂取させて抗腫瘍作用・転移抑制作用をみたことになる。

#### まとめ

ラットに高転移性膀胱腫瘍株を移植し、六味丸の0.4 - 3.6%添加飼料(ヒト一日常用量の1 - 9倍量)を投与して抗腫瘍作用・転移抑制作用を調べた結果、六味丸にはそれらの作用は認められなかった。

#### 文 献

- 1) Kanayama, H., Adachi N. and Masatoshi T. : *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 1115-1118, 1983.
- 2) 小菅卓夫, 横田正美, 杉山 清, 他 : 薬学雑誌, **105**, 791-795, 1985.
- 3) 金山久範, 足立典彦, 深井芳和, 他 : 薬学雑誌, **106**, 199-205, 1986.
- 4) 金山久範, 戸上昌紀, 足立典彦, 他 : 薬学雑誌, **106**, 307-312, 1986.
- 5) Miyamoto K., Kishi N., Koshiura R., et al. : *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 814-822, 1987.
- 6) 山口宣夫, 山田 燦, 杉山 清 : *Biotherapy*, **5**, 1840-1849, 1991.
- 7) 久保道德, 長尾孝治, 松田秀秋, 他 : 薬学雑誌, **105**, 26-32, 1985.
- 8) Sasaki H., Nishimura H., Morita T., et al. : *Planta Medica*, **55**, 458-462, 1989.
- 9) Jiang Tingliang, Yan Shuchang, Zhao Liangfu, et al. : 癌と化学療法, **16**, 1511-1518, 1989.
- 10) 横田正美, 杉山 清, 今村公弘, 他 : 日本薬学会第109年会要旨集, 212, 1989.
- 11) Yokota, M., Sugiyama, K., Imamura, K., et al. : *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU*, **8**, 29-33, 1991.
- 12) 福島清吾訳 : 抗癌中薬の臨床応用, 172, 1988, 医歯薬出版.
- 13) 田山邦昭, 中村清純, 平賀興吾 : 東京衛研年報, **33**, 444-450, 1982 .
- 14) 田山邦昭, 井口重孝, 平賀興吾 : 第43回日本癌学会総会記事, 93, 1984 .
- 15) 田山邦昭, 平賀興吾, 志佐 湊 : 第45回日本癌学会総会記事, 86, 1986 .
- 16) Tayama K., Fujii T., and Hiraga K. : *Exp. Anim.*, **35**, 65-76, 1986.
- 17) 田山邦昭, 坂本義光 : 第50回日本癌学会総会記事, 214, 1991 .
- 18) 藤井 孝, 福森信隆, 多田幸恵, 他 : 和漢医薬学会誌, **10**, 149-160, 1993.
- 19) 藤井 孝, 三栗谷久敏, 矢野範男, 他 : 東京衛研年報, **47**, 324-336, 1996.