

機関番号：32525

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590010

研究課題名 (和文) 生薬・漢方方剤による発がん予防は可能か

研究課題名 (英文) Possibility of prevention with crude drugs or Kampo medicine on chemical carcinogenesis

研究代表者

高崎 みどり (TAKASAKI MIDORI)

千葉科学大学・薬学部・准教授

研究者番号：10179434

研究成果の概要 (和文)：漢方方剤「続命湯」、代替甘味料 stevioside 類、中医学で使用されている約 400 種の単味生薬エキスなどについて、抗発がんプロモーター検索の一次スクリーニングである Epstein-Barr virus 活性化抑制試験を実施した。その結果、顕著な抑制効果を示した stevioside、「谷精草」、「蓮房」などについてマウス皮膚二段階発がん実験により発がん予防効果を検討した。これらにはいずれも顕著な発がん抑制作用が認められ、生薬・漢方方剤による発がん予防の可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：In our ongoing studies of anti-tumor promoters from natural products, we have examined a number of chinese medicinal plants, kampo-prescriptions and natural alternative sweeteners. In these experiments, the conventional primary screening test on the inhibitory effects of Epstein-Barr virus early antigen (EBV-EA) induction using Raji cells as an indicator cell and TPA as a promoter have been carried out. More than four hundred crude extracts of Chinese herbal medicines were tested, and seven extracts exhibited the significant inhibitory effects on EBV-EA activation. Of these samples, *Eriocaulon buergerianum*(gu jing cao), *Nelumbo nucifera*(lian fang)and stevioside exhibited the remarkable chemopreventive effects on mouse skin two-stage carcinogenesis test. These results strongly suggested the possibility of the crude drugs and kampo medicines on the prevention of chemical carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生薬学、天然物化学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：発がん予防、生活習慣病、漢方方剤、Epstein-Barr virus

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

近年の超高齢化社会において、がんを含む生活習慣病に対する予防と治療は極めて重要な社会的課題である。現在でも有効な治療薬は同時に深刻な副作用を有していることが多く、有効かつ副作用の少ない抗悪性腫瘍薬の開発が急務でありながら、極めて困難な状況でもある。一方、有効かつ安全な治療法とともに有効な予防法の確立が求められている。発がんの詳細なメカニズム（発がん機構）が徐々に明らかとされつつあり、天然物による抗酸化作用や抗発がん作用などについての研究にも注目が集まっている。

2. 研究の目的

発がん多段階説に基づき、比較的副作用が少なく、長期連用にも耐えうる天然物（特に生薬成分や漢方方剤）による発がん予防作用を検討し、抗発がんプロモーター作用による発がん抑制作用を明らかとして、生薬・漢方方剤によるがん予防の可能性を示唆しようとするものである。

3. 研究の方法

(1) Epstein-Barr virus 活性化抑制作用を指標とする一次スクリーニング

Epstein-Barr virus (EBV) genome を内在するバーキットリンパ腫患者由来の培養細胞 Raji cell を指示細胞とし、発がんプロモーターとして知られる

tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 並びに *n*-butyric acid を加え、48 時間培養する。その後 EBV より誘起される初期抗原 (EBV-EA) を上咽頭がん患者血清を用いた間接蛍光抗体法により検出する。その後 EBV より誘起される初期抗原 (EBV-EA) を上咽頭がん患者血清を用いた間接蛍光抗体法により検出する。被験物質を加えて培養した場合の

EBV-EA の誘発率と、被験物質を加えないコントロールとを比較する。(Fig. 1)

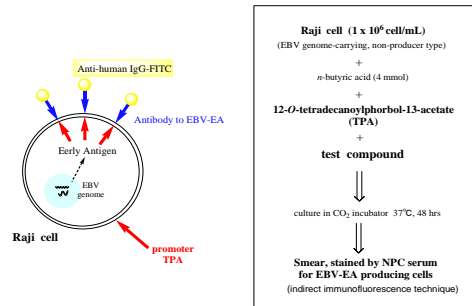


Fig.1

(2) マウス皮膚二段階発がん実験

Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA, 390 nmol) をイニシエーターとして、雌性 ICR マウス (6 週令) 背部に塗布、1 週間後より 20 週間に亘り TPA (1.7 nmol) をプロモーターとして週 2 回同部位に塗布し続け、コントロール群とする。一方、被験群では、毎回 TPA 処理 1 時間前に被験化合物 (50 μg) のアセトン溶液を塗布する。1 週間ごとの腫瘍 (papilloma) 発生率と 1 匹当たりの腫瘍平均発生個数をコントロール群と比較する。

(Fig. 2)

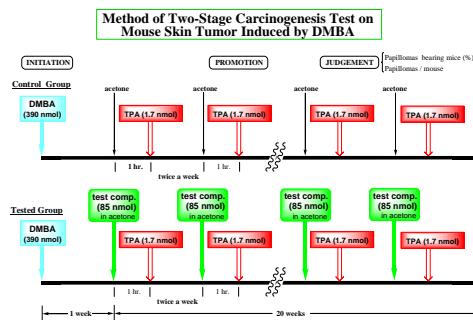


Fig.2

さらに、天然甘味物質 stevioside 類については、雌性 SENCAR マウスを用い、peroxynitrite をイニシエーター、TPA をプロモーターとし、被験化合物を飲料水中に溶解し自由摂取する二段階発がん実験も同様に行った。(Fig. 3)

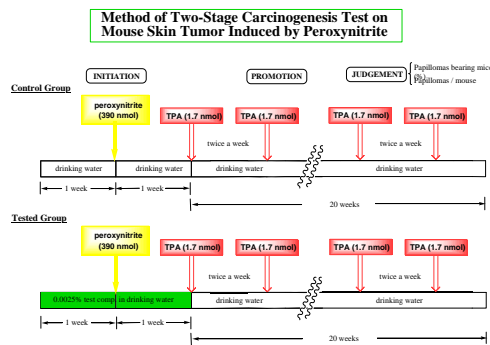


Fig.3

4. 研究成果

(1) 「続命湯」及び構成生薬並びにその去処方について

脳血管障害、高血圧などに適応されることのある漢方方剤「続命湯」について、発がんプロモーターによる Epstein-Barr virus からの初期抗原 (EBV-EA) の誘発を指標とする一次スクリーニングを実施した。「続命湯」は9種の構成生薬 (当帰、人參、生姜、杏仁、川芎、桂皮、麻黄、甘草、石膏) からなる方剤であり、方剤並びに単味煎剤、処方中より構成生薬を1種ずつ除いた (続命湯去当帰 etc.) 煎剤を凍結乾燥エキスとして調製し、検討した。人參、甘草の単味エキスには、他の構成生薬より顕著な抑制効果が認められ、さらに続命湯去人參エキス、同去甘草エキスでは続命湯よりも抑制効果が減弱された。従って、続命湯においては人參、甘草が本活性における重要な役割を担っているものと推定された。

(2) 天然代替甘味物質 stevioside 類について

生活習慣病の代表的な疾患の一つである糖尿病の患者は、同時に発がんのハイリスクグループである。従って、代替甘味料における機能評価の一つとして、発がん予防効果を検討することとした。本研究グループでは既に、天然甘味物質の mogroside 類 (羅漢果の主成分) の発がん予防効果について詳細に検討してきている (科学研究費基盤研究C15590103、代表者: 木島、分担者: 高崎、研究成果報告)。

本研究組織では、さらに stevioside の抗発がんプロモーター作用について詳細に検討し、stevioside 並びにその genin である steviol は、TPA のみならず、窒素酸化物である peroxynitrite に対しても顕著な抑制効果を示すことを見出した。これらの作用は、抗発がんプロモーターとして知られる glycyrrhizin や curcumin の作用よりも強い抑制効果であることを明らかとした。(発表論文③)

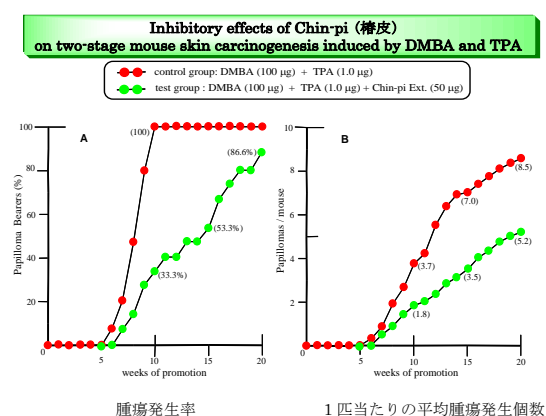
(3) 中国産単味生薬エキスについて

近年、中国において中薬処方に用いられる生薬が、単味エキスとして盛んに利用されるようになってきている。従来は、生薬を組み合わせで煎じる方剤が有効であり、単味の組み合わせでは方剤の効果が期待できないというのが通説であった。しかしながら、最近では利用の簡便性から単味エキスを組み合わせることも多く、中医学病院においても単味エキスで処方されることがでてきている。そこで、本研究組織では、中国における中医学病院で提供されている約 400 種の単味生薬のエキス剤の EBV-EA 抑制活性を検討した。

その結果、「谷精草」、「椿皮」、「仙鶴草」、「功劳葉」、「蓮房」、「金錢草」、「甘松」などに比較的強い EBV 活性化抑制作用 (100 μ g/mL の濃度で 90 % 以上、10 μ g/mL の濃度で 50 % 以上) が認められ、*in vivo* における発がん抑制作用を有する可能性が示唆されたため、「谷精草」、「椿皮」、「蓮房」、「金錢草」について、DMBA をイニシエーター、TPA をプロモーターとする発がん二段階実験を実施した。

DMBA をイニシエーターとしてマウス背部に塗布後、1 週間後より 20 週間に亘り TPA を週 2 回塗布し続けプロモーション処理を行ったコントロール群では、プロモーション開始後 6 週目で腫瘍 (papilloma) が発生し始め、10-11 週目では全てのマウスに腫瘍が発生した。さらに、1 匹当たりの平均腫瘍発生個数においては、10 週目で 3-3.5 個、15 週目で 7 個前後、20 週目では 8 個

以上の papilloma が発生した。一方、単味生薬「椿皮」エキス塗布群は、プロモーション処理開始後 10 週目で、腫瘍の発生率は 33.3%、15 週目でも 53.3%、20 週目で 86.6%であり、顕著に腫瘍の発生を遅延させることが明らかとなった。また、1 匹当たりの平均腫瘍発生個数においても、10 週目で 1.8 個、15 週目で 3.5 個、20 週後でも 5.2 個となり、腫瘍の発生を抑制することが明らかとなった。



さらに、「蓮房」エキス塗布群では、プロモーション処理開始後 10 週目で、腫瘍の発生率は 20.0%、15 週目でも 53.3%、20 週目で全てのマウスに腫瘍が発生した。また、1 匹当たりの平均腫瘍発生個数においても、10 週目で 1.3 個、15 週目で 3.6 個、20 週後でも 5.9 個となり、腫瘍の発生を遅延・抑制することが明らかとなった。

「谷精草」や「金銭草」塗布群においても、ほぼ同等の結果が得られたことから、いずれの生薬も、マウス皮膚発がんに対する発生遅延・発生抑制作用を有することが明らかとなった。

(4) セリ科植物 *Ferula diversivittata* より得られる発がん抑制作用成分について
 セリ科植物 *Ferula diversivittata* の根より得られる数種の化合物の中で、最も顕著な EBV-EA 活性化抑制作用を示した prenylcoumarin 誘導体 diversin について、

DMBA をイニシエーター、TPA をプロモーターとするマウス皮膚二段階発がん実験を実施した。Diversin には、陽性コントロール群に比べて、顕著な発がん遅延・抑制効果が認められた。本化合物は、curcumin、quercetin などと同等の抗発がんプロモーター作用を有することが明らかとなり、化学発がんの予防に対する有用性が示唆された。(発表論文①)

生薬・漢方方剤による発がん予防の可能性を検討し、数種の生薬や生薬成分あるいは漢方方剤には、発がん予防に繋がる生理活性を有するものが見い出された。現在は、本組織で得られた知見を基に、顕著な発がん抑制作用を示した各種単味エキスの生薬について、活性成分の探索が進行中である。

以上のような中薬材としての単味生薬エキスや漢方方剤における発がん予防効果について詳細な検討がなされた報告は本研究グループによるもの以外ほとんど見られない。また、現代では代替甘味料が大量に消費されるが、その機能性の一つとして発がん予防を検討した報告も本研究グループによるものの他は見られない。今後は、がんに対する確実な予防剤の開発が益々重要性を増すものと考えられ、本研究の成果が天然物による発がん予防作用に関する示唆を与えるものと思われる。さらに、これら単味エキスに含有される活性成分の探索ならびに発がん抑制のメカニズムについても詳細に検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Mehrdad Iranshahi, Amirhossein Sahebkar, S.T. Hosseini, Midori Takasaki, Takao Konoshima, Harukuni Tokuda: Cancer chemopreventive activity of diversin from *Ferula diversivittata* *in vitro* and *in vivo*. *Phytomedicine*, 17 (No. 3), 269–273, 2010.

② Mehrdad Iranshahi, Amirhossein Sahebkar, Midori Takasaki, Takao Konoshima, Harukuni Tokuda : Cancer chemopreventive activity of the prenylated coumarin, umbelliprenin, *in vivo*. *European Journal of Cancer Prevention*, **18** (No. 5), 412-415, 2009.

③ Midori Takasaki, Takao Konoshima, Mutsuo Kozuka, Harukuni Tokuda, Junko Takayasu, Hoyoku Nishino, Masazumi Miyakoshi, Kenji Mizutani, Kuo-Hsiung Lee : Cancer prevention agents. Part 8 : Chemopreventive effects of stevioside and related compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **17** (No. 2), 600 - 605, 2009.

〔学会発表〕(計 5 件)

①高崎みどり、北島直希、木島孝夫、南雲清二、徳田春邦：中国製単味生薬エキスの EB virus 活性化抑制作用と発がん抑制作用について(第2報)，日本薬学会第131年会(静岡)，2011，3，31.

②高崎みどり、北島直希、木島孝夫、南雲清二、徳田春邦：中国製単味生薬エキスの EB virus 活性化抑制作用と発がん抑制作用について，日本薬学会第130年会(岡山)，2010，3，29.

③M. Takasaki, J. Takayasu, H. Tokuda, T. Konoshima: Evaluation of the anti-tumor promoting properties of chinese medicinal plants. The 50th Anniversary Meeting of the American Society of Pharmacognosy (Honolulu, Hawaii), 2010, Jun., 28.

④高崎みどり、木島孝夫、高安淳子、徳田春邦：天然甘味物質 Stevioside の発がん抑制作用について (V) . 日本薬学会第129年会(京都)，2009，3，27.

⑤ T. Konoshima, M. Takasaki, J. Takayasu, H. Tokuda : Chemopreventive effects of stevioside against naturally occurring tumor promoter, teleocidin. 7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF (Athens, Greece), 2008, Aug., 6.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高崎 みどり (TAKASAKI MIDORI)
千葉科学大学・薬学部・准教授
研究者番号：10179434

(2) 研究分担者

木島 孝夫 (KONOSHIMA TAKAO)
千葉科学大学・薬学部・教授
研究者番号：80121557
徳田 春邦 (TOKUDA HARUKUNI)

京都府立医科大学・医学部・助教

研究者番号：60111960

(H21-H22:研究協力者)