日本財団助成事業
The Nippon Foundation

２００３年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

—調査・共同研究に対する助成—

平成１６年３月１２日

財団法人　日中医学協会
理　事　長　殿

研究代表者氏名　大　槻　勝　紀　　印

所属機関名　大阪医科大学

部署・役職　医学部・教授

所　在　地　〒569-8686 大阪府高槻市大学町２－７

電話　072-684-6411　　内線

１．研究テーマ

婦人科腫瘍における天龍合剤の治療効果について　—基礎的および臨床的研究

２．研究期間　自　2003　年　5　月　1　日　～　至　2004　年　3　月　１５　日

３．研究組織

日本側研究者氏名　大　槻　勝　紀

所属機関　大阪医科大学　　職名　教授

中国側研究者氏名　唐　勁　天

所属機関　中日友好医院　中日友好臨床医学研究所　　職名　所長

４．研究報告書

別紙「研究報告書の作成について」の体裁に倣い、指定の用紙で作成し添付してください。

※　研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※　発表に当っては、*日中医学協会助成金*による旨を明記して下さい。

－日中医学協会助成事業－

婦人科腫瘍における天龍合剤の治療効果について
―基礎的および臨床的研究―

日本側研究者氏名　大槻　勝紀
所　属　機　関　大阪医科大学　教授
中国側研究者氏名　唐　勁天
所　属　機　関　中日友好医院中日友好臨床医学研究所　所長

要旨：

天龍合剤（本合剤）は、肝癌の治療のために白英・龍葵など複数の薬草によって構成された新たな漢方薬であり、中日友好病院では臨床的に治療効果が認められている。大槻らはこれまで子宮内膜における病態をアポトーシスの観点から研究してきた。そこで子宮内膜癌や子宮頸癌における本合剤の有用性を基礎（大阪医科大学：大槻ら）および臨床的（中日友好病院臨床研究所：唐ら）に明らかにすることを目的としている。基礎研究はエストロゲン反応性を有する子宮内膜腺癌細胞（Ishikawacells）を用いて、天龍合剤の抗癌作用・機序について調べた。天龍合剤をステロイドフリーの培地に添加して、形態的にIshikawa 細胞の細胞死が濃度依存的に誘発することを観察した。WST-1 アッセイで検索した結果、ミトコンドリアの代謝機能が阻害され、細胞の増殖が有意に低下したことが判明した。また、JC-1 と言うミトコンドリアの膜電位変化によって異なる波長の蛍光を発する色素を用いて、蛍光顕微鏡で観察した結果、ミトコンドリア膜の脱分極によって発する緑蛍光が強くなったと同時に、正常な膜電位依存的に発する紅い蛍光が弱くなっていった。さらに、Flow-Cytometry で分析してみると、正常な膜電位を持つ細胞数が濃度依存的に減少した。これらの結果に一致して、天龍合剤投与によって細胞のDNA 合成能が著しく阻害されたことがBrdU 取り込みアッセイで明らかになった。さらに、天龍合剤によるミトコンドリア代謝の阻害・膜電位の脱分極およびDNA 合成の抑制がエストロゲン投与によって拮抗されたことから、天龍合剤は抗エストロゲン作用を有すると考えられる。以上のことから、天龍合剤は子宮内膜腺癌などの悪性腫瘍に有効な治療薬であるといえる。臨床面での本研究は、中国でのSARS の流行によりほとんど進んでおらず、今回は残念ながら基礎的研究に限って報告する。

Key Words：estrogen, endometrium, adenocarcinoma, herbs

緒言：

臨床に投与される抗癌剤の多くは強い副作用のため、その抗癌作用を十分に発揮できないことがある。しかし、長い歴史の間に洗練された漢方薬の殆どは複数の薬草によって構成される合剤で、治療作用を発揮すると同時に、副作用を軽減するといった特性を有する。そこで我々は、中国で他の系統の癌の治療に既に投与されている薬草を幾つか精選し、産婦人科領域における新たな漢方合剤（天龍合剤）を調合した。本研究はエストロゲン反応性を有する子宮内膜腺癌細胞を用いて、天龍合剤の抗癌作用・機序について調べたものである。

対象と方法 ：

対象　エストロゲン反応性を有する子宮内膜腺癌細胞――Ishikawa 細胞株、

材料　天龍合剤、エストロゲン、ステロイドフリーの牛血清、MEM 培地、
培養器具、Chamber－Slides
WST-1 アッセイキット、JC-1、BrdU アッセイキット、Annexin アッセイキット、
免疫組織化学染色用試薬・器具、Flow-Cytometry 用試薬・器具

方法　1．通常の細胞培養法で細胞を増やしたのち、天龍合剤を含むステロイドフリーの培地で以下の実験を行う。

2．培養細胞のミトコンドリアの代謝機能を検討する目的で、９６穴のプレートで培養した細胞に WST-1 を添加し、450 nM 波長の発光量を ELISA Reader で読み取る。

3．９６穴のプレートで培養した細胞に DNA 合成能を検討する目的で BrdU、HRP で標識した抗 BrdU 抗体、および発光基質を順次に添加し、405 nM 波長の発光量を ELISA Reader で読み取る。

4．Chamber－Slides で培養した細胞にミトコンドリアの膜電位の変化を検討する目的で JC-1 を、或いはアポトーシス細胞における細胞膜変化を検討する目的で蛍光標識した Annexin を添加し、蛍光顕微鏡で観察する。

5．Ｆ７５フラスコで培養した細胞に JC-1 或いは蛍光標識した Annexin を添加し、Flow-Cytometry で解析する。

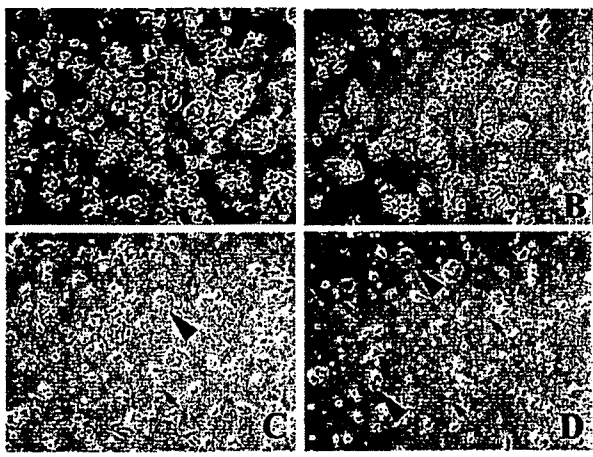
6．天龍合剤とエストロゲンを同時に投与し、その相互作用を以上の方法で観察する。

結果 ：

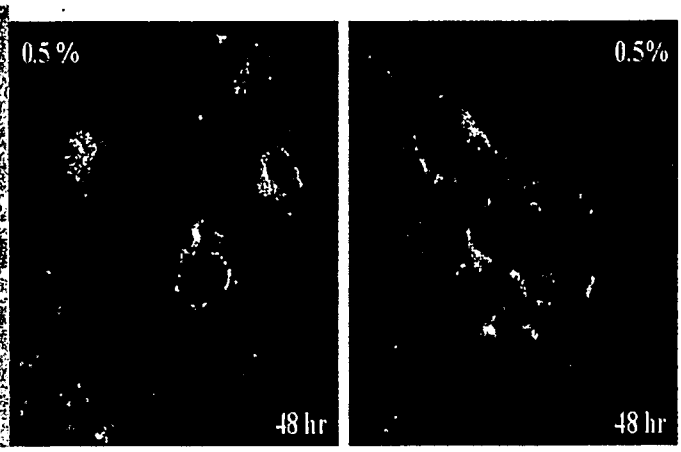
略語：Cont, コントロール；%, TL compound の投与量(v/v)；nM E, extrogen の投与量（nM)。

1．天龍合剤は濃度依存的に細胞死(arrows)を誘発した（図１)。コントロール(A)と比べると、天龍合剤投与群では正常な細胞（arrowheads）が濃度依存的に減少した(B , C, D)。

2．Annexin V-FITC/PI 二重染色で示すように天龍合剤投与によって、アポトーシス早期の細胞では phosphatydyl serine(PS)は細胞表面に露出し、Annexin V-FITC と特異的に結合し、緑色に発色する。アポトーシス後期あるいはネクローシスに陥った細胞は PI で赤く染まる（図２)。

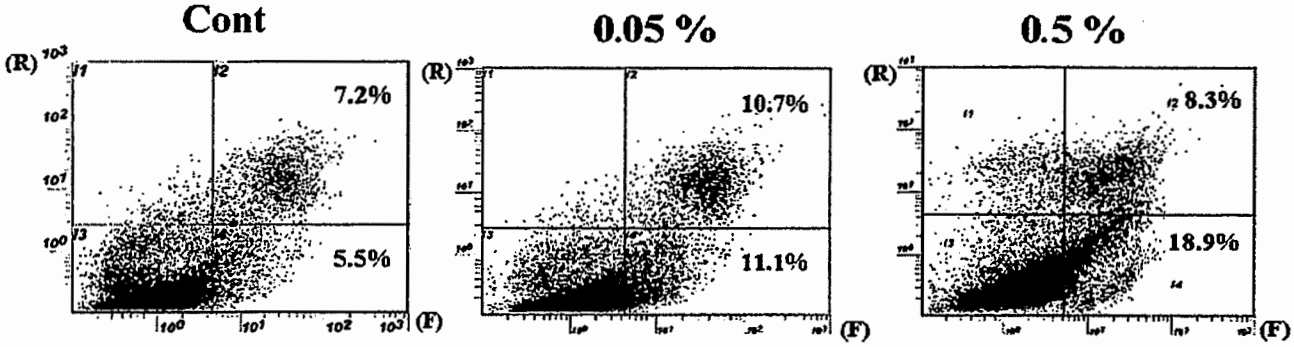


（図１）



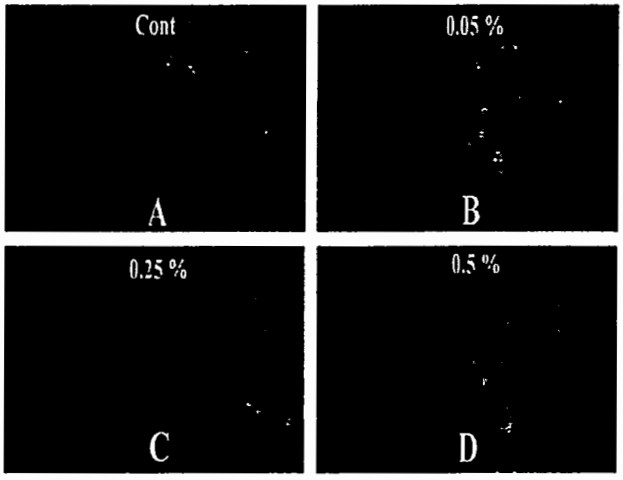
（図２）

3． Annexin V-FITC/PI 二重染色による Flow Cytometry。図 3 のごとく、天龍合剤投与群では PI(縦軸)、Annexin V-FITC(横軸)陽性の細胞がコントロール群より濃度依存的に増加した。

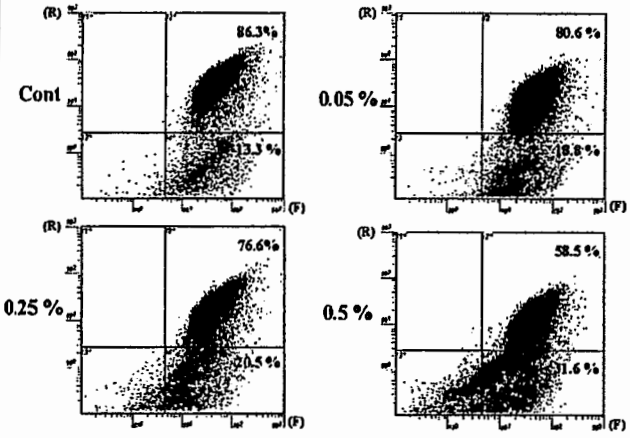


(図 3)

4．JC-1 によるミトコンドリア膜電位の変化（図 4，5）。膜電位が正常な時に JC-1 の赤/緑蛍光は一定に保たれているが（図 4A)、天龍合剤投与によって濃度依存的に膜電位が低下し、赤/緑蛍光の比率が低下した（図 4B, C, D)。Flow Cytometry（図 5）のごとく、天龍合剤投与群では濃度依存的にミトコンドリア膜電位が低下した細胞が増加した。

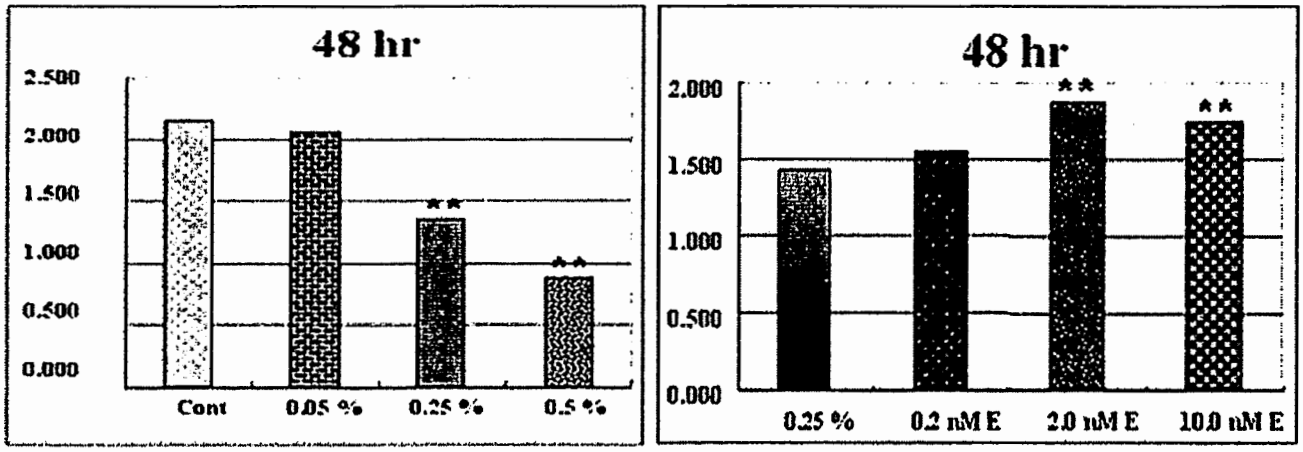


(図 4)



(図 5)

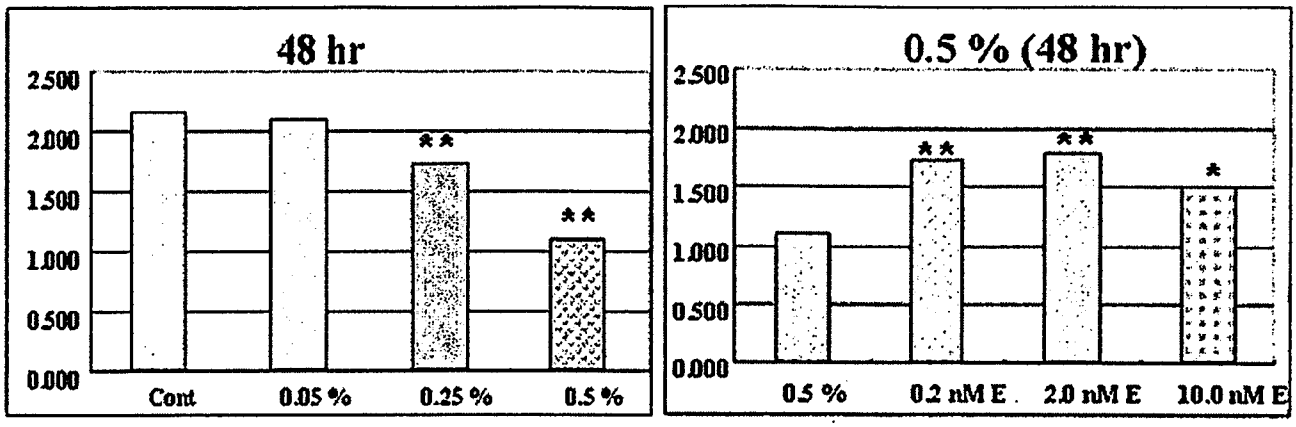
5．WST-1 アッセイで検索した結果（図 6)、天龍合剤の投与により有意に低下した細胞の増殖能はエストロゲン投与で拮抗された。同様の結果は BrdU アッセイ（図 7）でも観察された。



**, $P < 0.01$, compared with Cont

**, $P < 0.01$, compared with 0.25 % and 0.5 %, respectively.

(図 6)



(図7)

考察 ：

天龍合剤投与により子宮内膜細胞癌にアポトーシスが誘導されるが、そのシグナル伝達経路はミトコンドリア経路によることが明らかになった。さらにエストロゲン投与によって天龍合剤によるアポトーシスの誘導が抑制されたことから、天龍合剤の抗腫瘍効果は、抗エストロゲン作用も関与することが示唆された。

今後は子宮悪性腫瘍における本合剤の治験例を増やし、臨床的効果を検討してこれまでの基礎的研究から本合剤の作用機序ならびに有効成分を明らかにしてゆきたい。

作成日：2004年3月12日