

Agrimoniin の抗腫瘍作用および免疫反応に及ぼす影響

徐 強¹⁾, 小野 裕¹⁾, 森 裕志¹⁾, 江田昭英¹⁾

岐阜薬紀要 (1986) 35 : 36-44

要約：キンミズヒキのタンニンの1種である agrimoniin の抗腫瘍作用を検討した。Agrimoniin は C57BL/6 マウスに移植した E.L.4 および BALB/c マウスに移植した Meth A 腫瘍の増殖を有意に抑制し，Meth A を移植したマウスの生存期間の延長傾向を示した。また，agrimoniin は E.L.4, Meth A および L-929 細胞に対して *in vitro* で用量依存的な障害作用を示し，その細胞障害性は4時間以内の incubation によってみられた。一方，agrimoniin はヒツジ赤血球で免疫した hemolytic plaque forming cell および hemolysin の産生に影響を及ぼさず，また，picryl chloride による細胞性免疫の成立に対しても影響を及ぼさなかった。

以上のことから，agrimoniin はキンミズヒキの抗腫瘍成分の一つであり，その作用機序は直接的な細胞障害作用によるものと思われる。

索引用語：アグリモニン，キンミズヒキ，抗腫瘍作用，細胞障害性，液性免疫応答，細胞性免疫応答

Antitumor Activity and the Effect on Immune Responses of Agrimoniin

QIANG XU¹⁾, YUTAKA ONO¹⁾, HIROSHI MORI¹⁾ AND
AKIHIDE KODA¹⁾

Ann. Proc. Gifu Pharm. Univ. (1986) 35 : 36-44

Abstract : Studies were carried out to examine the antitumor activity of agrimoniin, one of tannins isolated from *Agrimonia pilosa Ledeb.*, using syngeneic systems including C57BL/6 mice-E.L.4 lymphosarcoma and BALB/c mice-Meth A fibrosarcoma, and the effect on immune responses. Agrimoniin significantly inhibited the growth of both the tumors and showed a tendency to prolong the survival period of BALB/c mice bearing Meth A fibrosarcoma. In the *in vitro* study the tannin also exhibited a cytotoxic activity against E.L.4 lymphosarcoma, Meth A fibrosarcoma and L-929 cells in a dose-dependent fashion, and the activity was seen within 4 hour-incubation. Agrimoniin, however, neither affected the production of humoral antibodies such as hemolytic plaque forming cell and hemolysin

1) 岐阜薬科大学薬理学教室
岐阜市三田洞東5丁目6-1
1) Department of Pharmacology,
Gifu Pharmaceutical University,
6-1 Mitahora-higashi 5 chome, Gifu 502

Received March 1, 1986
The Annual Proceedings of Gifu
Pharmaceutical University,
ISSN 0434-0094, CODEN : GYDKA 9

against sheep red blood cells nor the formation of cellular immune response induced by picryl chloride in mice.

These results suggest that agrimoniin may be one of the antitumor constituents of *A. pilosa* and display the activity through the direct cytotoxicity rather than host-mediated mechanism.

Keyphrase : agrimoniin, *Agrimonia pilosa*, antitumor activity, cytotoxicity, humoral immune response, cellular immune response

キンミズヒキ (*Agrimonia pilosa* Ledeb.) は中国では止血剤や解毒剤として種々の出血症状や炎症などの治療に用いられている生薬である¹⁻³⁾。江田⁴⁻⁸⁾ はキンミズヒキの薬理作用を広範に検討し, 黄色ブドウ球菌発育阻止作用, 鎮痛作用, 消炎作用などのあることを示し, その有効成分はタンニンであることを示唆している。また, 最近, キンミズヒキの抗腫瘍作用についての検討が行われている^{3,9-11)}。すなわち, キンミズヒキのメタノールエキスはマクロファージの活性化や細胞障害性リンパ球を介する抗腫瘍作用を示し, その有効成分はタンニンである可能性が示唆されている⁹⁾。

本研究では, キンミズヒキの根から単離された加水分解型タンニンである agrimoniin (Fig. 1) の抗腫瘍作用を *in vivo* および *in vitro* で検討し, また, 免疫反応に及ぼす影響についても検討した。

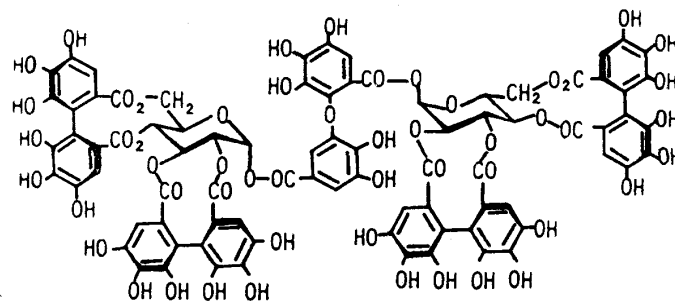


Fig. 1 Chemical structure of agrimoniin.

実験材料および方法

実験動物 : 8週齢の C57BL/6 系および ddY 系の雄性マウス, および BALB/c 系の雌性マウスを用いた。飼育環境は温度 $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度60%の恒温恒湿飼育室とし, 自由給水下に固型飼料を以って飼育した。

薬物 : Agrimoniin は津村研究所より提供されたものである。比較実験のために FT-207 (大鵬製薬), 5-fluorouracil (半井化学), levamisole hydrochloride (Aldrich) および prednisolone acetate (武田薬工) を用いた。いずれも用に臨んで精製水に溶解し, 濃度は *in vivo* 実験では投与量が 0.2 ml/animal となるように調製した。その外, 抗原としてはヒツジ赤血球 (SRBC, 東洋血清) および picryl chloride (PC, 半井化学) を, 反応試薬として ethidium bromide (半井化学) をそれぞれ用いた。

***In vivo* の抗腫瘍作用 :** 移植実験に用いた腫瘍は愛知がんセンターより譲与された E. L. 4 lymphosarcoma および Meth A sarcoma であり, マウスの腹水型として1週間毎に継代維持した。C57BL/6 および BALB/c マウスの側腹部皮下にそれぞれ 10^4 cells の E. L. 4 および 10^6 cells のMeth A 腫瘍を移植した。移植日から10日間,

50, 100 または 200mg/kg/day の agrimoniin を連日経口投与し、腫瘍増殖および生存日数を観察した。腫瘍増殖の観察はノギスを用いて長径および短径を測定し、次式によって腫瘍の大きさを求めた。

$$\text{Tumor size} = 4/3 \times \pi \times (\text{長径}/2) \times (\text{短径}/2)^2 \text{ (cm}^3\text{)}$$

In vitro の抗腫瘍作用 : E. L. 4 lymphosarcoma, Meth A sarcoma および L-929 細胞 (マウス線維芽細胞) を標的細胞とし、直接的な腫瘍細胞障害作用を観察した。すなわち、 10^4 cells/0.1ml の腫瘍細胞浮遊液に作用濃度 25~500 $\mu\text{g/ml}$ の薬物溶液 0.1ml を加えて CO_2 incubator 中で 37°C で 4 時間、24 時間または 48 時間培養した。なお、細胞浮遊液および薬物溶液の作成には以下の培養液を用いた。100U/ml penicillin G (明治製薬) および 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin (明治製薬) を溶解した RPMI-1640 (日水製薬) の 100ml に fetal calf serum (Gibco) 10ml および 6% N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (Hepes) (半井化学) 10ml を加えて調製した。E. L. 4 および Meth A の場合には総細胞数および死細胞数を 0.2% trypan blue で dye exclusion test により測定し、次式によって相対細胞障害度を求めた。

$$\text{Cytotoxic index}(\%) = (D'/T' - D/T) / (100 - D/T) \times 100$$

ただし、T および D は control 実験における総細胞数および死細胞数をそれぞれ示す。また、T' および D' は被検薬物共存下における総細胞数および死細胞数をそれぞれ示す。L-929 細胞の場合には培養後の生細胞数を Fig. 2 に示すような ethidium bromide 蛍光法により測定した。その cytotoxic index は次式によって求めた。

$$\text{Cytotoxic index}(\%) = (I_0 - I_x) / (I_0 - I_{EB}) \times 100$$

ただし、 I_0 は control の蛍光強度、 I_x は被検薬物共存下の蛍光強度、 I_{EB} は ethidium bromide の蛍光強度をそれぞれ示す。

抗体産生 : SRBC を EDTA-gelatin veronal buffer (EDTA-GVB) で洗浄し、ついで Ca^{++} および Mg^{++} を含む GVB で洗浄した後、滅菌生理食塩水溶液を用いて 10^9 cells/ml 浮遊液とし、その 0.2 ml/animal を ddY マウスの尾静脈内に注射して免疫した。被検薬物は感作日から 5 日間経口投与した。免疫後 5 日または 10 日に脱血致死させ、血液は血清を分離して hemolysin の測定に供した。また、脾臓を摘出し、重量、脾細胞数および hemolytic plaque forming cell (PFC) 数を測定した。PFC 数は Cunningham and Szenberg 法¹²⁾ により測定し、脾細胞数は coulter counter (Moder Z. Coulter Electronics Inc.) を用いて測定した。血清は無処置または 2-mercaptoethanol 処置を行って hemolysin を測定し、IgM および IgG 抗体価を求めた。

Picryl chloride による接触性皮膚炎 : Asherson および Ptak¹³⁾ の方法に準拠した。すなわち、あらかじめ剪毛した ddY 系マウスの腹部に 1% PC の ethanol 溶液 0.1 ml を塗布し感作した。6 日後に 1% PC の olive oil 溶液の 15 μl 宛を耳朶の表裏に塗布して誘発した。24 時間後の耳朶の腫脹を dial thickness gauge (尾崎製作所)

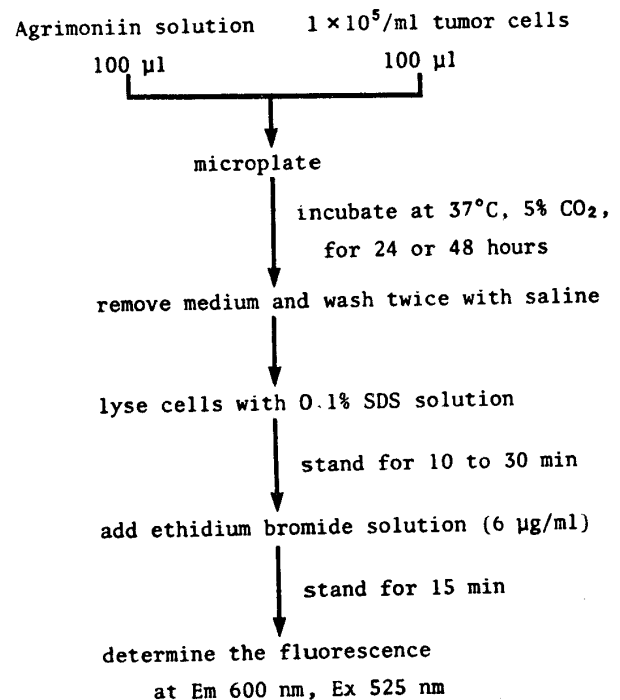


Fig. 2 Method for measuring cytotoxicity using ethidium bromide.

で測定し、一次免疫による腫脹度とした。誘発は両耳朶について行い、成績は平均値を以って示した。初回感作より9日後に同様に感作し、さらに6日後に誘発を行い二次免疫反応による腫脹度とした。被検薬物は一次感作日から5日間経口投与した。

成 績

E. L. 4 腫瘍の増殖および生存期間に及ぼす影響

Fig. 3 に示すように、agrimoniin の 50 mg/kg では腫瘍増殖に対してほとんど影響はみられなかったが、100 mg/kg では抑制がみられ、20および21日後では有意であった。生存期間はいずれの投与群も control 群との間にほとんど差はみられなかった。

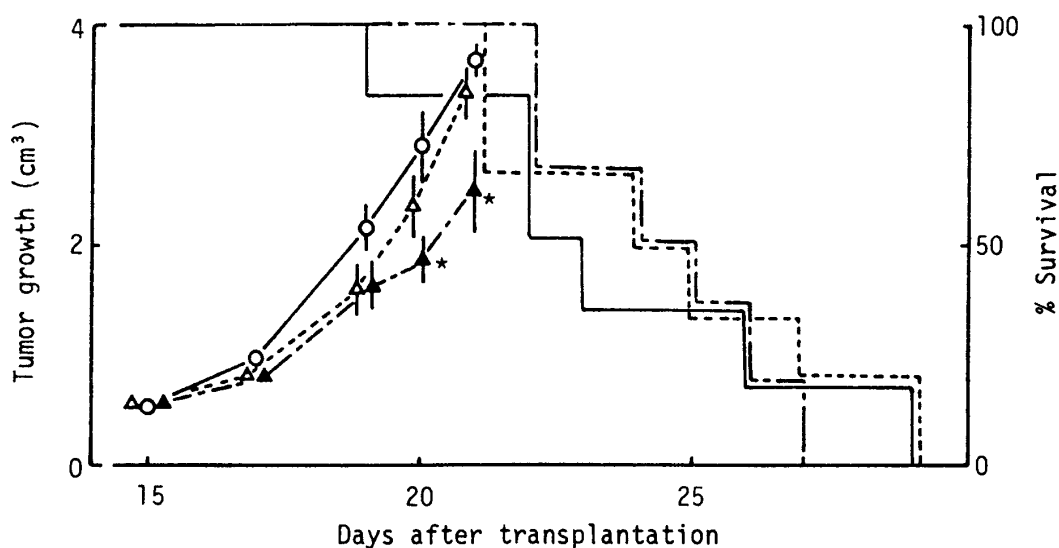


Fig. 3 Effect of agrimoniin on the tumor growth and survival time of C57BL/6 male mice (8-week-old).

Animals were transplanted with 10^4 cells of E.L.4 lymphosarcoma s.c. into their flanks. Drug was given p.o. for 10 days from the tumor transplantation. Each point indicates the mean \pm S.E. of 6 animals. \circ —: Control, Δ -----: agrimoniin 50 mg/kg, \blacktriangle -----: agrimoniin 100 mg/kg. *: Statistical significance from the control at $p < 0.05$ (U-test).

Meth A 腫瘍の増殖および生存期間に及ぼす影響

Fig. 4 に示すように、agrimoniin の 100mg/kg 投与群では Meth A 腫瘍の増殖は有意に抑制され、延命傾向も認められた。その作用は FT-207 の 40mg/kg のそれにほぼ匹敵した。しかし、200 mg/kg 投与群では腫瘍増殖および生存期間にはほとんど影響がみられなかった。

In vitro の抗腫瘍作用

Agrimoniin の E. L. 4, Meth A および L-929 細胞に対する直接障害作用を Fig. 5 に示す。腫瘍細胞は agrimoniin の濃度に依存して死滅した。その50% cytotoxicity は E. L. 4 では4時間値 70 μ g/ml, 24時間値 40 μ g/ml, 48時間値 30 μ g/ml であり、Meth A では4時間値 200 μ g/ml, 24時間値 120 μ g/ml, 48時間値 80 μ g/ml であった。また、L-929 細胞では24時間値 150 μ g/ml, 48時間値 120 μ g/ml であった。いずれの腫瘍に対しても培養時間の延長に伴って細胞障害作用は増強した。

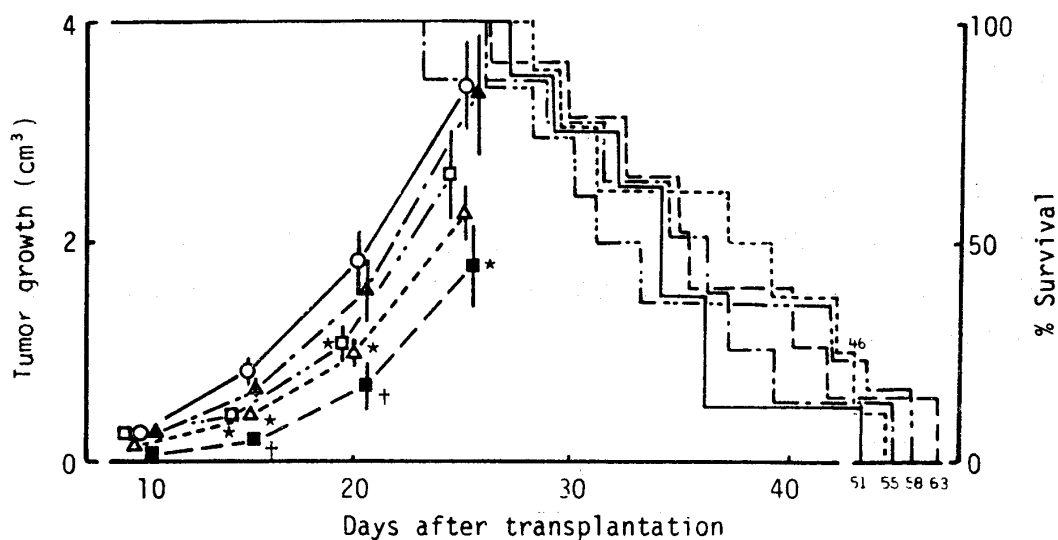


Fig. 4 Effect of agrimoniin, FT-207 and 5-FU on the tumor growth and survival time of BALB/c female mice (8-week-old).

Animals were transplanted with 10^6 cells of Meth A sarcoma s.c. into their flanks. Drugs were given p.o. for 10 days from the tumor transplantation. Each point indicates the mean \pm S.E. of 8 animals. \circ —: Control, \triangle —: agrimoniin 100 mg/kg, \blacktriangle —: agrimoniin 200mg/kg, \square —: FT-207 40 mg/kg, \blacksquare —: 5-FU 13 mg/kg. *, +: Statistical significance from the control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (U-test).

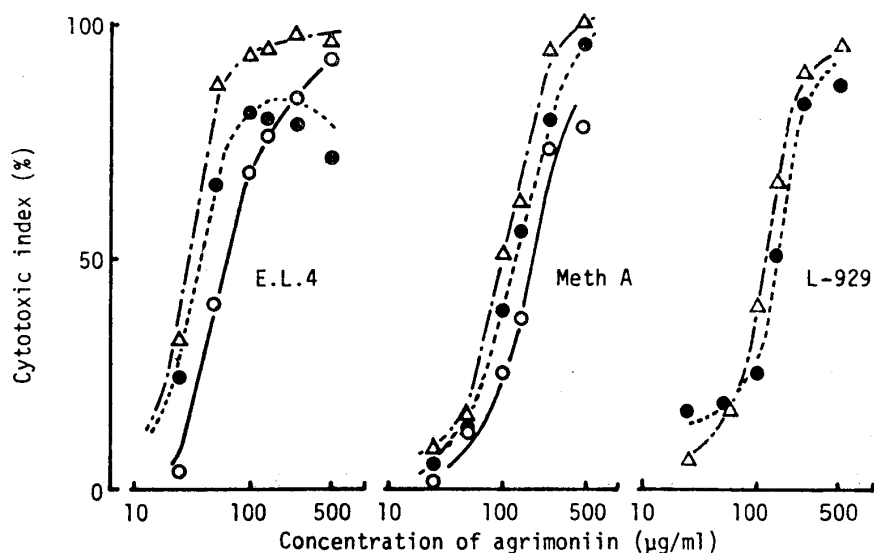


Fig. 5 Cytotoxic activity of agrimoniin against E.L.4 lymphosarcoma, Meth A sarcoma and L-929 cells *in vitro*.

Cells ($1 \times 10^4/0.1$ ml) were incubated with 0.1 ml of agrimoniin in a well of microplate at 37°C for 4 (\circ), 24 (\bullet) and 48 (\triangle) hours. Measurement of cytotoxicity was carried out by the dye exclusion method with 0.2% trypan blue for E.L.4 and Meth A cells, and by the fluorometric assay with ethidium bromide for L-929 cells. Each point indicates the mean of triplicate or quadruplicate sets.

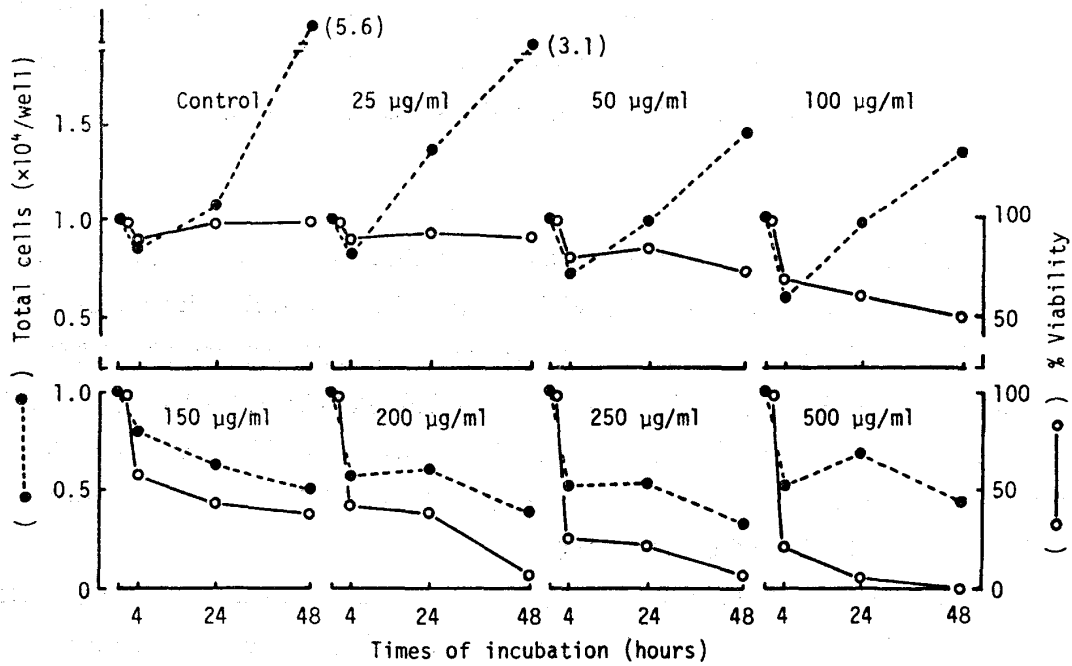


Fig. 6 Time course of the cytotoxic activity of agrimoniin against Meth A sarcoma cells *in vitro*.

Cells ($1 \times 10^4/0.1$ ml) were incubated with 0.1 ml of agrimoniin at 37°C for 4, 24 or 48 hours in a well of microplate. The total and viable cells were determined by the dye exclusion method with 0.2 % trypan blue. Each point indicates the mean of triplicate sets.

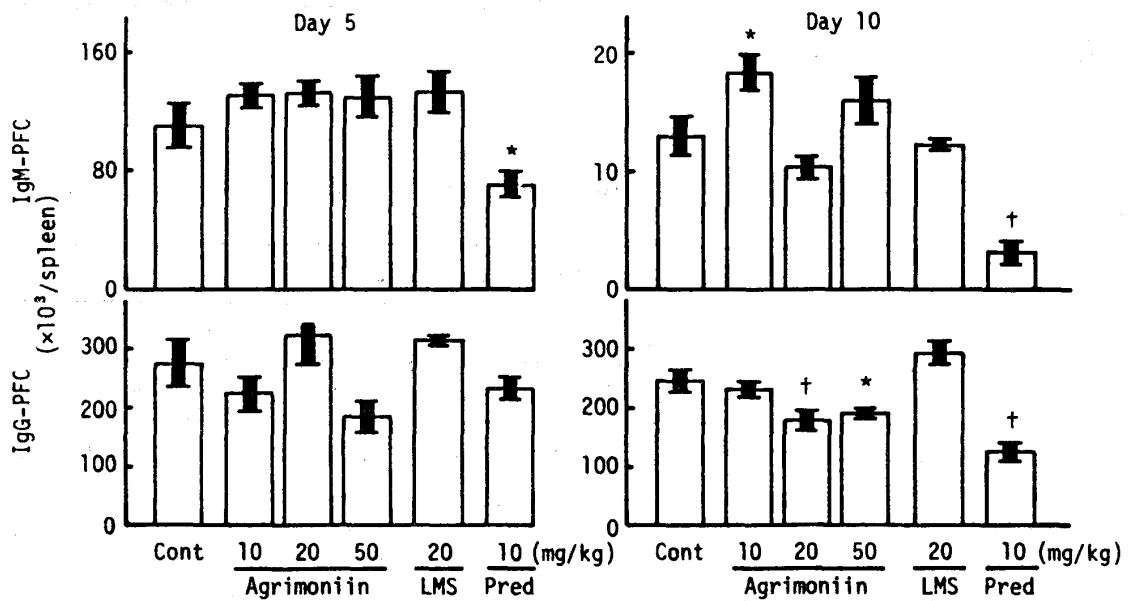


Fig. 7 Effect of agrimoniin, levamisole and prednisolone on the formation of IgM-PFC and IgG-PFC in spleens of mice immunized with sheep red blood cells.

Each column indicates the mean \pm S.E. of 6 to 8 animals. *, + : Statistical significance from the control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (t-test).

つぎに, Meth A に対する agrimoniin の細胞障害作用の time course を検討した。その成績を Fig. 6 に示す。低濃度 (25~100 µg/ml) では control と同様に培養時間の延長に伴って細胞は増殖し, 総細胞数は増加した。150 µg/ml 以上では細胞の増殖はみられず, 濃度依存的に生細胞数は時間の延長とともに減少した。

液性抗体産生に及ぼす影響

Control 群には生理食塩水を投与した。比較実験のために免疫増強剤の LMS および免疫抑制剤の prednisolone を用いた。その成績は Fig. 7 に示す如くである。IgM-PFC 産生は 5 日後では, agrimoniin および LMS 投与群にほぼ同程度の増加傾向がみられたが, 有意ではなかった。prednisolone 投与群は有意な減少がみられた。10 日後では agrimoniin の 10mg/kg 投与群に有意な増加がみられたが, 用量依存性はみられなかった。一方, prednisolone 投与群には有意な減少がみられた。IgG-PFC 産生は 5 日後ではいずれの薬物投与群も明らかな影響はみられなかったが, 10 日後では agrimoniin の 20 および 50mg/kg 群に有意な減少がみられた。また, LMS 投与群では増加傾向が, prednisolone 投与群では有意な減少がそれぞれみられた。

この場合の血清中の hemolysin の力価は Table 1 に示すように, 2-mercaptoethanol 無処置の場合には 5 日後および 10 日後ともに, いずれの薬物によってもほとんど影響がみられなかった。2-mercaptoethanol 処置血清では 10 日後の agrimoniin 50mg/kg 投与群および prednisolone 投与群に有意な減少がみられたが, その他はほとんど影響がみられなかった。なお, 脾重量および脾細胞数に対しては agrimoniin はほとんど影響を及ぼさなかった。

PC による接触性皮膚炎に及ぼす影響

PC による接触性皮膚炎の induction phase に及ぼす影響は Table 2 に示す如くである。すなわち, いずれの薬物も一次および二次免疫後の皮膚炎の強度に対して明らかな影響はみられなかったが, 一次免疫後では LMS 投与群に軽度の促進傾向が, prednisolone 投与群に軽度の抑制傾向がそれぞれみられた。二次免疫後では agrimoniin 50 mg/kg 投与群に軽度の促進傾向がみられた。

Table 1 Effect of agrimoniin, levamisole and prednisolone on hemolysin formation in mice immunized with 2×10^8 SRBC

Group	Dose (mg/kg)	Hemolysin titer (\log_2)			
		Day 5 ^{a)}		Day 10	
		Total	2-ME resistant ^{b)}	Total	2-ME resistant
Control	—	9.81 ± 0.313	5.94 ± 0.240	9.19 ± 0.354	7.88 ± 0.157
Agrimoniin	10	9.50 ± 0.284	5.75 ± 0.250	9.00 ± 0.250	7.31 ± 0.283
	20	9.88 ± 0.227	6.44 ± 0.305	8.75 ± 0.189	7.38 ± 0.263
	50	9.94 ± 0.199	5.50 ± 0.313	8.43 ± 0.297	7.07 ± 0.230 *
Levamisole	20	11.00 ± 0.231 *	6.25 ± 0.423	9.88 ± 0.479	8.00 ± 0.284
Prednisolone	10	10.43 ± 0.229	6.21 ± 0.101	8.71 ± 0.360	6.93 ± 0.071 †

a): Days after the immunization. b): Serum was treated with 2-mercaptoethanol (2-ME). Drugs were given p.o. for 5 days from the immunization. Figures indicate the mean ± S.E. of 7 to 8 animals. *, †: Statistical significance from the control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (U-test).

Table 2 Effect of agrimoniin, levamisole and prednisolone on picryl chloride-induced cellular immune response in mice

Group	Dose (mg/kg)	Ear swelling ($\times 10^{-3}$ cm)	
		1st sensitization	2nd sensitization
Control	—	7.19 \pm 1.658	13.41 \pm 1.563
Agrimoniin	10	6.65 \pm 1.215	10.73 \pm 1.415
	20	5.69 \pm 0.681	11.55 \pm 1.196
	50	6.18 \pm 0.778	15.69 \pm 2.029
Levamisole	20	7.91 \pm 1.029	12.50 \pm 1.284
Prednisolone	10	5.13 \pm 1.119	10.24 \pm 2.415

Drugs were given p.o. for 5 days from the first sensitization.
Figures indicate the mean \pm S.E. of 8 animals.

考 察

キンミズヒキに抗腫瘍作用のあることが報告されており^{3,9-11)}, その有効成分としてタンニンがあげられている⁹⁾。本研究ではキンミズヒキのタンニンの1種である agrimoniin の抗腫瘍作用を検討した。syngeneic system としての C57BL/6 マウスに移植した E. L. 4 lymphosarcoma および BALB/c マウスに移植した Meth A sarcoma の増殖は agrimoniin の用量によって有意に抑制される場合もみられた。生存期間は後者の系に対して 100mg/kg の場合に延命傾向がみられたが, その他の場合には影響はほとんど認められなかった。一方, agrimoniin は腫瘍細胞に対して直接的な障害作用を示した。一般に, タンニンは他の物質と結合し易く, 腫瘍細胞にも結合して直接的な細胞障害性を示すが, キンミズヒキの水エキスはヒトの線維芽細胞に対して全く抑制作用のないことが報告されている³⁾。本研究における *in vitro* の成績では, agrimoniin は用いたいずれの腫瘍細胞に対しても用量依存的な障害作用を示した。

以上のように agrimoniin は E. L. 4-C57BL/6 マウスおよび Meth A-BALB/c マウスの syngeneic system において抗腫瘍作用を示し, その主要な機序は直接的な細胞障害によることを示唆するが, 宿主依存性の関与を検討するために免疫反応に及ぼす影響についても観察した。その結果, agrimoniin は液性免疫および細胞性免疫反応のいずれに対しても著明な影響はみられなかった。

以上のことから, agrimoniin はキンミズヒキの抗腫瘍成分の一つであることが示唆される。キンミズヒキのメタノールエキスは免疫系に関与すると推定されている⁹⁾ が, agrimoniin の免疫系に対する作用はあっても軽度であり, 抗腫瘍作用は直接的な腫瘍細胞障害作用によるところが大きいことを示唆する。

引用文献

- 1) 江蘇新医学院編：仙鶴草, “中薬大辞典 上冊”, 上海科学技術出版社, 上海, p665-667 (1977).
- 2) 南京薬学院編：仙鶴草, “中草薬学 中冊”, 江蘇人民出版社, 南京, p394-396 (1976).
- 3) 王浴生主編：仙鶴草, “中薬薬理与応用”, 人民衛生出版社, 北京, p323-326 (1983).
- 4) 江田昭英：キンミズヒキ (*Agrimonia eupatoria* L. var. *pilosa* Makino) の成分及び薬理作用; paramecium 撲滅作用について. 岐阜医紀, 4, 639 (1957).
- 5) 江田昭英：キンミズヒキ (*Agrimonia eupatoria* L. var. *pilosa* Makino) の成分及び薬理作用; 消炎作用.

- 岐阜医紀, 4, 720 (1957).
- 6) 江田昭英: キンミズヒキ (*Agrimonia eupatoria* L. var. *pilosa* Makino) の成分及び薬理作用; 鎮痛作用. 岐阜医紀, 4, 727 (1957).
 - 7) 江田昭英: キンミズヒキ (*Agrimonia eupatoria* L. var. *pilosa* Makino) の成分及び薬理作用; alcoholic 製水製 extract の一般薬理作用. 岐阜医紀, 5, 159 (1958).
 - 8) 江田昭英: キンミズヒキ (*Agrimonia eupatoria* L. var. *pilosa* Makino) の成分及び薬理作用; 成分の分離及び其作用. 岐阜医紀, 5, 617 (1958).
 - 9) Koshiura, R., Miyamoto, K., Ikeya, Y. and Taguchi H.: Antitumor activity of methanol extract from roots of *Agrimonia pilosa* Ledeb. *Japan J. Pharmacol.*, 38, 9-16 (1985).
 - 10) Koshiura, R., Miyamoto, K., Takada, Y. and Kiriya, N.: Studies on the constituents of *Agrimonia pilosa* Ledeb. I. Biological activities of the acidic fraction soluble in n-hexane of the roots. *Yakugaku Zasshi*, 100, 1167-1170 (1980) (Eng.).
 - 11) 佐藤昭彦: 生薬類の抗腫瘍性に関する研究 (第十二報) 一仙鶴草の抗腫瘍性に就て (其の二); 第四十三回日本癌学会総会記事, p 280 (1984).
 - 12) Cunningham, A. J. and Szenberg, A.: Further improvement in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *Immunology*, 14, 559-602 (1968).
 - 13) Asherson, G. L. and Ptak, W.: Contact and delayed hypersensitivity in the mouse. *Immunology*, 15, 405 (1968).