

# AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

漢方医学 (1993.11) 17巻11号:378～382.

漢方を科学する  
各種生薬の豚表皮DNA合成とcyclic AMP  $\beta$  アドレナリン反応性に与える  
影響  
—特に黄連の作用を中心に—

橋本喜夫、筒井真人、松尾 忍、飯塚 一

# 各種生薬の豚表皮DNA合成とcyclic AMP βアドレナリン反応性に与える影響

## —特に黄連の作用を中心に—

橋本 喜夫 筒井 真人 松尾 忍 飯塚 一

**要 旨** 黄連、柴胡など皮膚疾患に頻用される14種類の生薬の豚表皮DNA合成に与える影響を検討した。黄連、黄柏、連翹は6時間処理(器官培養系)で著明に<sup>3</sup>H-thymidineとり込みを抑制した。黄連のDNA合成抑制効果はDNA-flow cytometryの結果からG<sub>1</sub> blockまたはG<sub>1</sub>/S boundary blockによると推察した。黄連はcyclic AMPのβアドレナリン反応性(β-response)の増強は示さなかったが、連翹、柴胡はβ-responseの増強作用を示した。さらに0.1%黄連軟膏を作成し、実験的豚表皮増殖系(tape-stripping)に対し、1回塗布24時間後の<sup>3</sup>H-thymidineとり込みを検討したが、*in vivo*での抑制効果は認められなかった。

### はじめに

尋常性乾癬は慢性難治性の炎症性角化症で、ステロイド外用療法や、PUVA療法、さらにレチノイド、シクロスポリン内服などが試みられるが、いまだ根治療法はない。表皮細胞増殖亢進<sup>1)</sup>が乾癬の重要な病態のひとつであり、乾癬表皮ではcyclic AMPのβアドレナリン応答性(β-response)が著明に低下していることも報告<sup>2)</sup>されている。われわれは各種抗乾癬効果のある薬剤<sup>3,4)</sup>や、紫外線照射<sup>5,6)</sup>が*in vivo*, *in vitro*で豚表皮細胞のβアドレナリン応答性を上昇させることをすでに報告している。関ら<sup>7)</sup>は、乾癬患者から得た皮膚の器官培養で、生薬の黄連が表皮ターンオーバー抑制、脂質合成抑制作用があることを報告した。また彼ら<sup>8)</sup>は0.1%黄連軟膏を作成し、乾癬患者8例に外用したところ、速効性で劣るものの2ヵ月後にはハルシノイド軟膏と同等の効果を示すことを報告した。

今回われわれは、黄連を中心に各種生薬14種類の表皮細胞動態への作用を検討するため、豚皮膚の器官培養系を用いて、<sup>3</sup>H-thymidine uptakeを測定した。また黄連についてはDNA-flow cytometry (DNA-FCM)を用いて細胞周期に与える影響を検討した。また黄連、黄柏、連翹、柴胡については、cyclic AMP βアドレナリン反応性(β-response)についても検討を加えた。さらに0.1%黄連軟膏を作成し、豚背部皮膚にtape-stripping処理を施した後、同軟膏を塗布し、24時間後の*in vivo*での<sup>3</sup>H-thymidine uptakeへの影響も検討した。

### 方 法

#### 1)材料

豚背部からCastroviejo keratomeを用いて0.2 mmの厚さの皮膚を採取し、5 mm角の皮膚片を多数作成して実験を行った。皮膚片は角層を上にしてRPMI 1640培養液に浮かべて、37°C 5%CO<sub>2</sub> in airの条件下に6時間培養し、各種生薬の作

用を検討した。生薬は黄連、黄柏、黄芩、柴胡、人參、連翹、荊芥、当歸、地黄、山梔子、桔梗、川芎、甘草、芍薬を用い、RPMI 培養液に500 $\mu$ g/ml(0.05%)の濃度になるように添加した。

2)  $^3$ H-thymidine incorporation

各種生薬で6時間培養後の皮膚片を RPMI 培養液で3回洗浄し、 $^3$ H-thymidine を含む RPMI 培養液に角層を上にして、5% CO<sub>2</sub>, 1気圧下で37 $^{\circ}$ C, 2時間浮遊培養した。その後、生食で洗浄し、2M NaBr で2時間処理し、純粹表皮成分を得る。これに200 $\mu$ lの0.5N NaOHを加え、30分間95 $^{\circ}$ C water bath で煮沸後、溶解液の radioactivity を液体シンチレーションカウンターで測定した。蛋白定量は Lowry らの方法により行った。

3) DNA-flow cytometry(DNA-FCM)

黄連で培養後の皮膚片を Hashimoto ら<sup>9)</sup>の方法により、mincing, 0.05% pepsin 処理, RNase 処理で分散後、propidium iodide(PI)で30分間 DNA 染色後、CS-20 cell sorter で10<sup>4</sup>個の細胞につき測定した。各細胞周期の割合は Fried の細胞周期解析モデルを使用し、外部標準には豚リンパ球を使用した。

4) cyclic AMP assay

各生薬で一定時間(6h)培養後の皮膚片を新しい RPMI 培養液に移し、37 $^{\circ}$ C で5分間、50 $\mu$ M

epinephrine で培養後、ドライアイスで反応を止めた。皮膚組織中の cyclic AMP の定量は Yoshikawa ら<sup>10)</sup>の方法により、cyclic AMP を抽出、除蛋白後 Yamasa cyclic AMP kit を用いて radioimmunoassay により定量した。なお cyclic AMP phosphodiesterase の影響を除くため、inhibitor である isobutylmethylxanthine(IBMx)を1mMの濃度になるように添加した。

5) tape-stripping と0.1%黄連軟膏塗布

ネブタール<sup>®</sup>腹腔内投与(30mg/kg)で麻酔した体重5kgの豚の背部皮膚を剃毛、洗浄後、セロファンテープ(ニチバン)をおしつけ、剥す処理を皮膚に光沢がみられるまで行った。通常40~50回の処理で角層の完全除去が得られ<sup>9)</sup>、組織学的にも確認された。stripping部の半分に0.1%黄連軟膏を塗布し、残り半分には基剤(白色ワセリン)のみを塗布した。われわれは stripping 後24時間に増殖のピークがみられることをすでに報告<sup>9)</sup>しているので、24時間後に、豚に再び麻酔し、黄連塗布部、基剤塗布部、無処置部をkeratomeで採皮し、 $^3$ H-thymidine incorporation に供した。

結 果

豚表皮の thymidine とり込みに対する各種生薬の影響は図1に示す。黄連、黄柏、連翹が有意

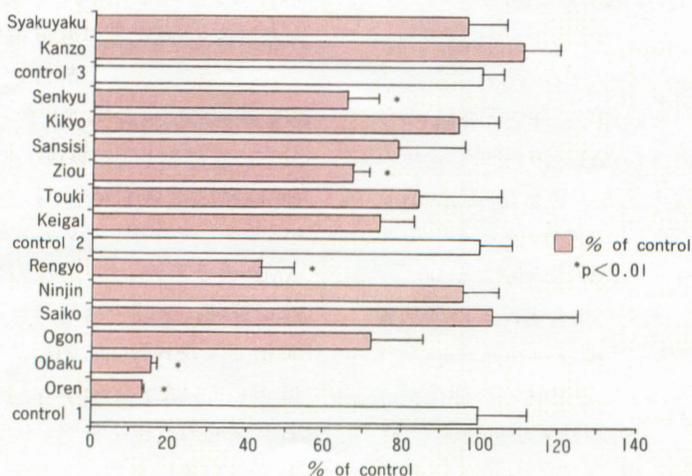


図1 各種生薬の thymidine とり込みに与える影響

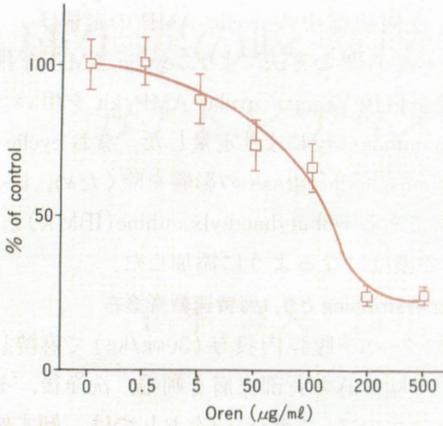


図2 各種濃度の黄連の作用

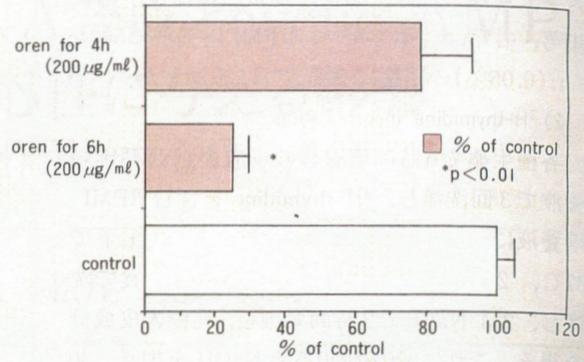


図3 黄連の thymidine とり込みに与える可逆的作用

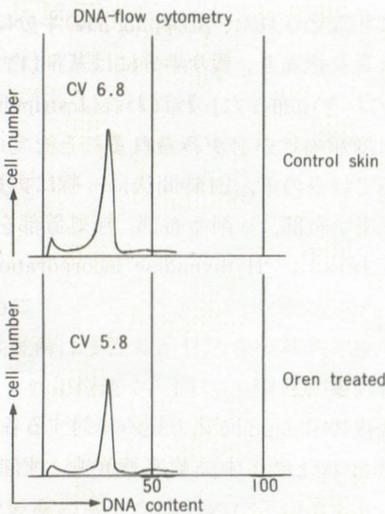


図4 *in vitro* 黄連処理後のDNAヒストグラム

に thymidine とり込みを抑制することがわかる。特に黄連、黄柏は対照の20%以下の抑制がみられる。図2は各種濃度の黄連で6時間培養後の thymidine とり込みに与える影響を% of control で示した。200 µg/ml以上の濃度で thymidine とり込みの著明な抑制がみられた。図3は200 µg/mlの濃度で6時間培養した場合と、4時間培養後、新しい培養液に移した場合の thymidine とり込みをみたものであるが、とり込みの回復がみられ、黄連のDNA合成抑制効果が可逆であることを示唆する。図4は黄連500 µg/ml *in vitro* 処理、6時間後のDNA-histogramの変化を

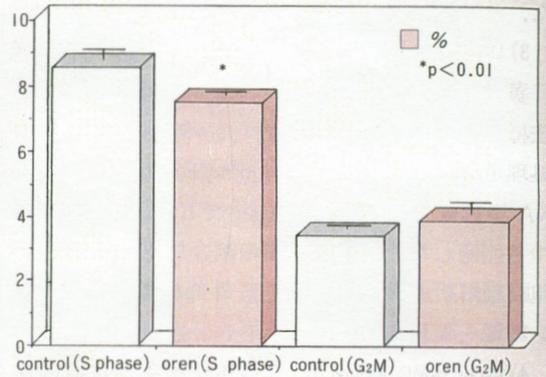


図5 S期、G<sub>2</sub>M期に与える黄連の作用

示した。図5はS期分画、G<sub>2</sub>M期分画への黄連の作用をみたもので、対照に比べ、S期の分画は低下し、G<sub>2</sub>M期は幾分増加を示した。図6に示した moved cellの解析<sup>11)</sup>でもRの値は負となり、黄連処理により、4Cから2Cへの移行が示された。したがって、黄連は豚表皮細胞の cell cycle に対して、G<sub>1</sub> block または G<sub>1</sub>/S boundary block として作用していると推測される。cyclic AMPの $\beta$ アドレナリン反応性は図7に示したように連翹、柴胡では増強がみられるが、黄連、黄柏では $\beta$ -responseの増強はみられず、むしろ低下していた。tape-stripping後24時間で得られる実験の表皮細胞増殖系においては、0.1%黄連軟膏は白色ワセリンと有意差はなく、24時間という short term では黄連軟膏は表皮細胞増殖を

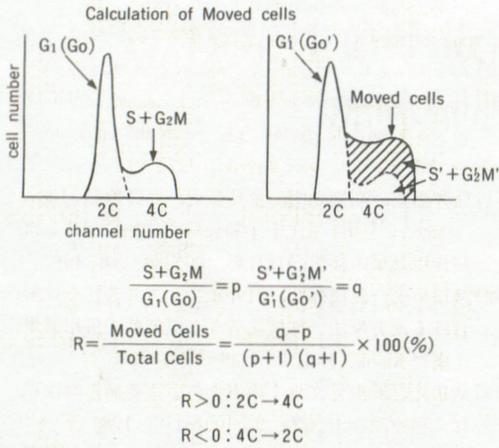


図6

抑制しなかった(図8)。

### 考案

尋常性乾癬は慢性難治性皮膚疾患であり、漢方療法は重要な補助療法のひとつである。また長期ステロイド外用の副作用の軽減の目的で柴胡剤の投与もしばしば試みられる。乾癬に対する漢方薬のopen trialでは温清飲<sup>12)</sup>、オウレンゴドク<sup>13)</sup>、ケイダレンキョウ<sup>14)</sup>、黄連解毒湯<sup>13)</sup>、荊芥連翹湯<sup>14)</sup>などが奏効することが多い。これらの構成生薬である黄連が、今回われわれの結果から、豚表皮細胞のDNA合成を抑制する可能性が示唆された。またこれらの抑制効果が可逆的であったことから、単純な細胞毒性によるものではないと推定される。また他の乾癬用薬剤<sup>3,4)</sup>とは異なり、 $\beta$ adrenergic response 増強を介した作用ではないと推測された。DNA-FCMの解析より、黄連のDNA合成抑制はG<sub>1</sub> blockまたはG<sub>1</sub>/S boundary blockによることを推定させる。また*in vivo*の実験的表皮細胞増殖系(tape-stripping)において、0.1%黄連軟膏の少なくとも1回塗布ではDNA合成抑制は認められなかった。しかし、関ら<sup>8)</sup>の臨床成績をみても効果発現には時間がかかっており、われわれの結果は同軟膏の有効性を無論否定するものではない。

連翹の*in vitro*でのthymidineとり込みの抑制

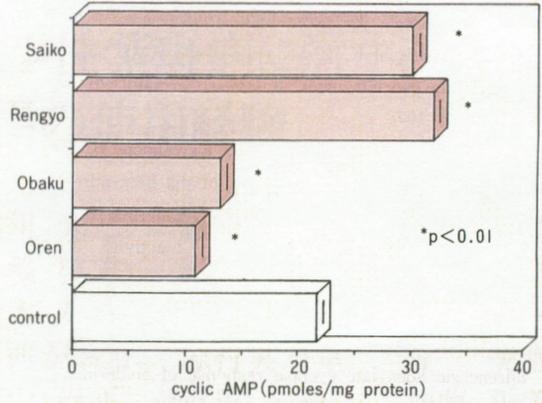


図7 各種生薬の $\beta$ アドレナリン反応性に与える影響

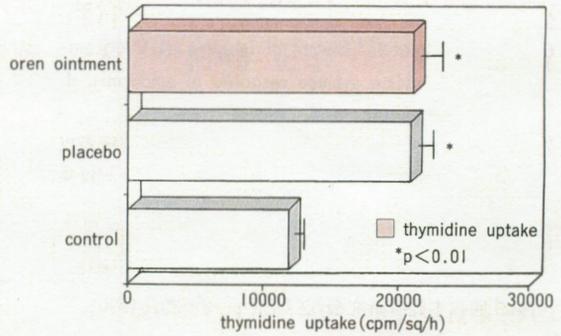


図8 0.1%黄連軟膏1回塗布の影響(*in vivo*)

効果、および cyclic AMP の $\beta$ -augmentation (反応性増強)作用の存在は、連翹も抗乾癬効果の期待できる生薬といえるかもしれない。従来、連翹は phosphodiesterase を阻害して cyclic AMP 濃度を上昇させると報告<sup>15)</sup>されていたが、今回の $\beta$ 増強効果は phosphodiesterase inhibitor である IBMX 存在下になされており、 $\beta$ -adrenergic adenylate cyclase を介する機序も考えられる。さらに、柴胡にも $\beta$ -augmentation が存在するというわれわれの結果は、glucocorticoid が強力な $\beta$ -augmentation 作用を持つという過去の報告<sup>3)</sup>とあわせると、柴胡にステロイド様作用<sup>16)</sup>が存在することの傍証になると思われる。

### 文献

- 1) Weinstein GD, McCullough JL, Ross PA: Cell

- kinetic basis for pathophysiology of psoriasis. *J Invest Dermatol*, 85 : 579~583, 1985
- 2) Iizuka H, Adachi K, Takeda J : Cyclic AMP accumulation in psoriatic skin. *J Invest Dermatol*, 70 : 250~253, 1978
- 3) Iizuka H, Kajita S, Mizumoto T, Kawaguchi H : Glucocorticoid-induced modulation of the beta-adrenergic adenylate cyclase response of epidermis; its relation to epidermal phospholipase A2 activity. *J Invest Dermatol*, 87 : 577~581, 1986
- 4) Iizuka H, Hirokawa M, Ara M, et al : Antipsoriatic and antimetabolic agents as stimulators of the beta-adrenergic adenylate cyclase response of epidermis. *Clin Exp Dermatol*, 11 : 238~245, 1986
- 5) Kajita S, Iizuka H, Hashimoto Y, Ohkawara A : Topical PUVA treatment increases epidermal beta-adrenergic adenylate cyclase responsiveness. *Br J Dermatol*, 114 : 413~418, 1986
- 6) Kajita S, Iizuka H : Effects of *in vitro* PUVA treatment on adenylate cyclase response of epidermis. *J Dermatol*, 14 : 132~136, 1987
- 7) 関 太輔, 井田 充, 崎田茂晃, 他 : 尋常性乾癬表皮に対する黄連の効果. 第4回日本乾癬研究会記録集, p.113~114, 1989
- 8) 関 太輔, 井田 充, 崎田茂晃, 他 : 乾癬に対する0.1%黄連軟膏の効果—特に表皮脂質合成について—. 第5回日本乾癬研究会記録集, p.28~29, 1990
- 9) Hashimoto Y, Tsutsui M, Iizuka H : Flow cytometric analysis of pig epidermal keratinocytes : effects of tape stripping. *J Dermatol Sci*, 4 : 193~201, 1992
- 10) Yoshikawa K, Adachi K, Halprin KM, Levine V : The effects of catecholamine and related compounds on the adenylate cyclase system in the epidermis. *Br J Dermatol*, 93 : 29~36, 1975
- 11) 熊井恵美, 高橋光明, 金井直樹, 海野徳二 : Flow cytometry を用いたヒト上顎癌培養細胞に対する抗癌剤作用効果の検討. *日耳鼻*, 90 : 28~34, 1987
- 12) 濱田稔夫, 高橋邦明, 石井正光, 浅井芳江 : 乾癬における漢方療法—桂枝茯苓丸と温清飲の併用効果—, *皮膚科 Mook*, No.2 : p.245~248, 1985
- 13) 武田克之, 重見文雄 : 漢方薬による乾癬と掌跖膿疱症の治療, *漢方医学*, 9 : 105~110, 1985
- 14) 大東和子 : 荊芥連翹湯が著効を奏した尋常性乾癬の1例. *漢方診療*, 5(2) : 44~46, 1986
- 15) Nikaido T, Ohmoto T, Kinoshita T, et al : Inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase by Lignans. *Chem Pharm Bull*, 29 : 3586, 1981
- 16) Shimizu K, Amagaya S, Ogihara Y : Combination effects of Shosaikoto (Chinese traditional medicine) and prednisolone on the anti-inflammatory action. *J Pharmacobiodyn*, 7 : 891~899, 1984