

柴苓湯の多嚢胞性卵巣症候群に対する作用機序の検討

道原 成和¹⁾、出口 さやか²⁾、範本 文哲¹⁾

クラシエ製薬株式会社 漢方研究所¹⁾

クラシエ製薬株式会社 医薬グループ²⁾

はじめに

柴苓湯は『世医得効方』に記載された処方であり、小柴胡湯(柴胡、半夏、大棗、黄芩、人參、甘草、生姜)に五苓散(沢瀉、猪苓、茯苓、桂皮、白朮)を加えたものである¹⁾。本来、水瀉性下痢、急性胃腸炎およびむくみなどに適応をもつ処方であるが、最近では不妊症や不育症など排卵障害の治療にも応用され、特に多嚢胞性卵巣症候群(Polycystic Ovary Syndrome; 以下PCOS)での有用性が数多く報告されている²⁻³⁾。しかし、その排卵誘発作用機序は明らかになっていない。

PCOSの排卵誘発にはクロミフェン療法やゴナドトロピン療法などが行われているが、卵巣過剰刺激症候群(Ovarian Hyperstimulation Syndrome)や多胎などの問題は依然として残されている。2001年Mitwallyらによりアロマターゼ阻害剤(Aromatase Inhibitor、以下AI)がPCOSに排卵誘発作用を示すことが報告され⁴⁾、近年、PCOSの排卵誘発にAIの応用が良好な治療成績を得られると注目を集めている⁵⁻⁸⁾。AIは乳がんの治療薬として開発された薬剤で、卵巣、乳腺、脂肪、皮膚などに局在しアンドロゲンをエストロゲン

(E)へ転換する酵素(アロマターゼ)に対して阻害作用を示すものである。

今回、このアロマターゼ阻害に着目し、柴苓湯の排卵誘発作用メカニズムを検討した。

方法・結果

柴苓湯のアロマターゼ阻害作用を検討するため、MCF-7細胞増殖試験および酵素阻害試験を行った。

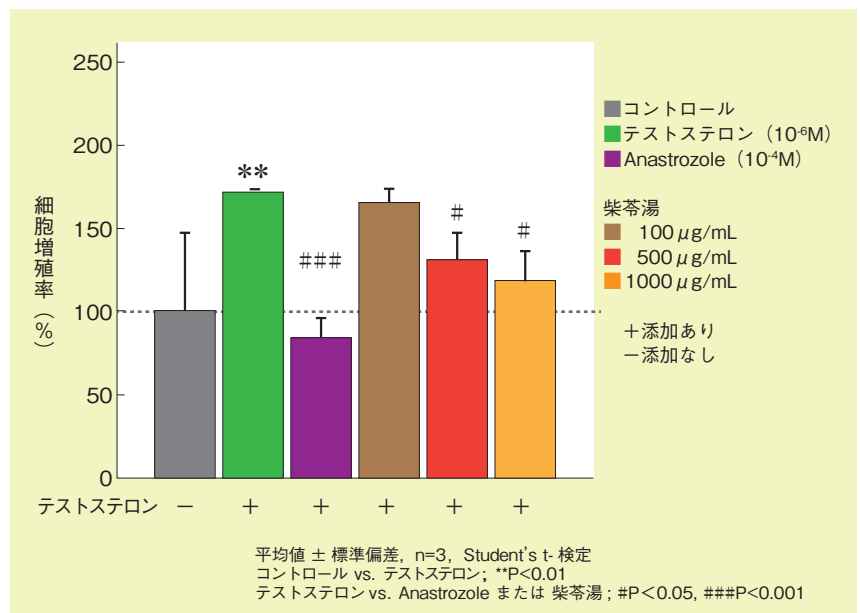
MCF-7細胞はヒト由来乳がん細胞で、E依存的に増殖する細胞である。細胞増殖への影響をみる

ことで、添加した試料のエストロゲン様活性が測定できる。また、この細胞はアロマターゼを発現しているため、テストステロン(T)の添加によりEが生成され、同様の細胞増殖がおこる⁹⁾。したがって、T存在下での細胞増殖を指標としアロマターゼ阻害作用の有無が確認できると考えられている。

1) MCF-7細胞を用いたアロマターゼ阻害作用の検討

MCF-7細胞を24時間培養後、各試料を添加した。その後、7日間培養した後、MTT法¹⁰⁾にて細胞生存率(%)を求めた。なお、陽性対照にはAIであるanastrozole

図1 MCF-7細胞増殖に対する柴苓湯の作用



を使用した。

その結果、T存在下でのMCF-7細胞の増殖は、柴苓湯およびanastrozoleにより有意に抑制された。また、柴苓湯は、濃度依存的に増殖を抑制した(図1)。T存在下にてMCF-7細胞の増殖抑制が認められたことより、柴苓湯はアロマターゼ阻害作用をもつことが示唆された。なお、この濃度での柴苓湯による細胞毒性は認められなかった(データ

開示せず)。

2) 酵素阻害試験

柴苓湯を超純水またはDMSO(<0.2%)で用時調製し、CYP19/MFC High Throughput Inhibitor Screening Kit (BD Biosciences)を用いてアロマターゼ阻害活性を測定した。なお、陽性対照にはaminoglutethimide(第1世代AI)とanastrozole(第3世代AI)、およびchrysin(天然由来AI)を使用した。

その結果、柴苓湯によるアロマターゼ阻害活性は、添加濃度の増加にしたがい増大し、シグモイド曲線を示した。IC₅₀値は158μg/mLであった(図2)。

そこで柴苓湯の構成生薬について、濃度範囲3.7~100μg/mLでアロマターゼ阻害活性を測定したところ、100μg/mLで阻害率50%以上を示し

たのは桂皮(54.9%)、黄芩(95.7%)、甘草(100%)の3種であった。それぞれのIC₅₀値は、88.8、32.1、10.5μg/mLであった。

これら3種の生薬のうち、甘草の成分(glycyrrhizic acid、liquiritigenin)、および黄芩の成分(baicalin、baicalein、wogonin)計5種のアロマターゼ阻害活性を調べた結果、これらの成分はいずれもアロマターゼ阻害活性が認められた(図3)。

中でも、liquiritigenin(IC₅₀値: 0.25μM)はchrysin(IC₅₀値: 0.37μM)に匹敵する阻害活性を示した。

考 察

今回、我々はPCOSでの排卵誘発に有用性が報告されている柴苓湯の作用メカニズムを解明するために、アロマターゼに焦点を絞り実験を行った。その結果、柴苓湯にはアロマターゼ阻害作用が認められた。柴苓湯の構成生薬のうち、

図2 アロマターゼに対する柴苓湯の阻害活性

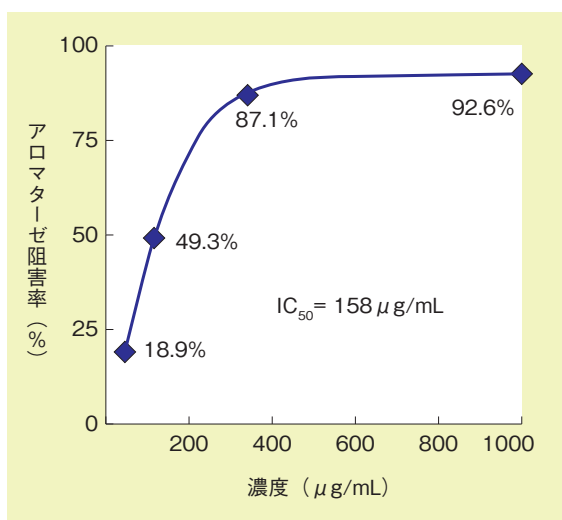
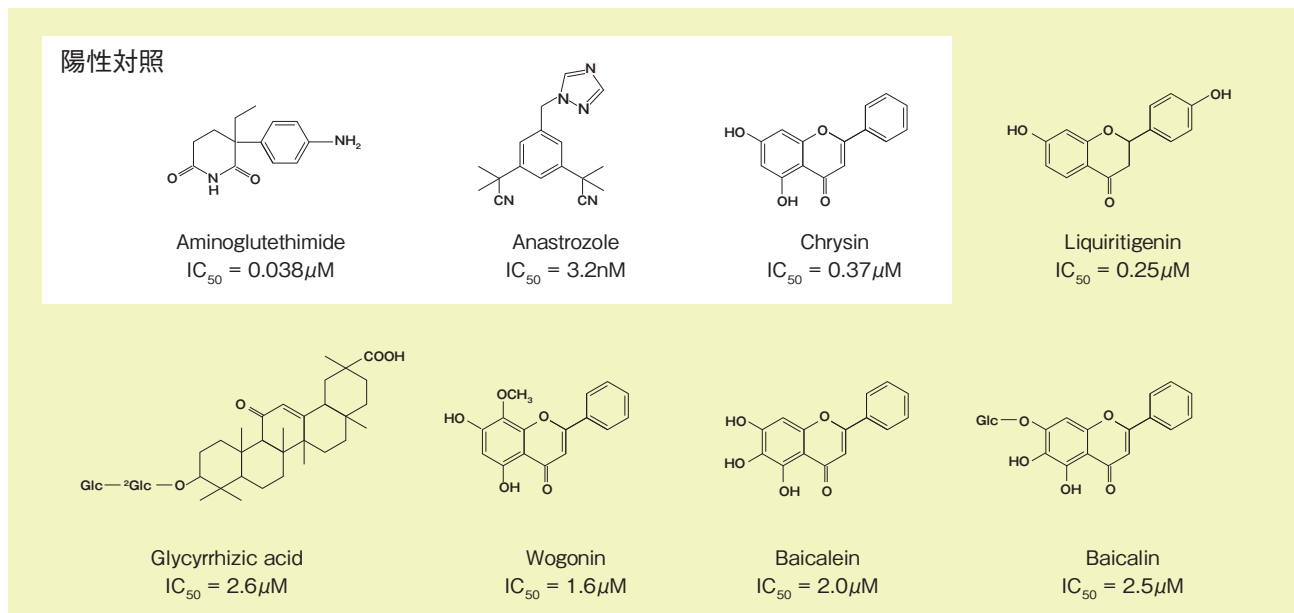


図3 甘草および黄芩に含まれる各成分のアロマターゼ阻害活性



とくに甘草と黄芩に強い阻害活性が認められたことから、これらの生薬は、柴苓湯のアロマターゼ阻害に寄与するものと考えられる。しかし、今回の実験ではこれらの生薬に含まれている成分の一部を調べたにすぎず、今後、その他の活性成分についても調べる必要があるといえる。

PCOSにおけるAIの排卵誘発作用機序は、アンドロゲンからEへの転換酵素（アロマターゼ）を阻害することによりE産生が低下し、視床下部－下垂体－卵巣系に

かかるnegative feedbackが解除されることでFSHが増加し、卵巣発育が促進するといわれている（図4）。

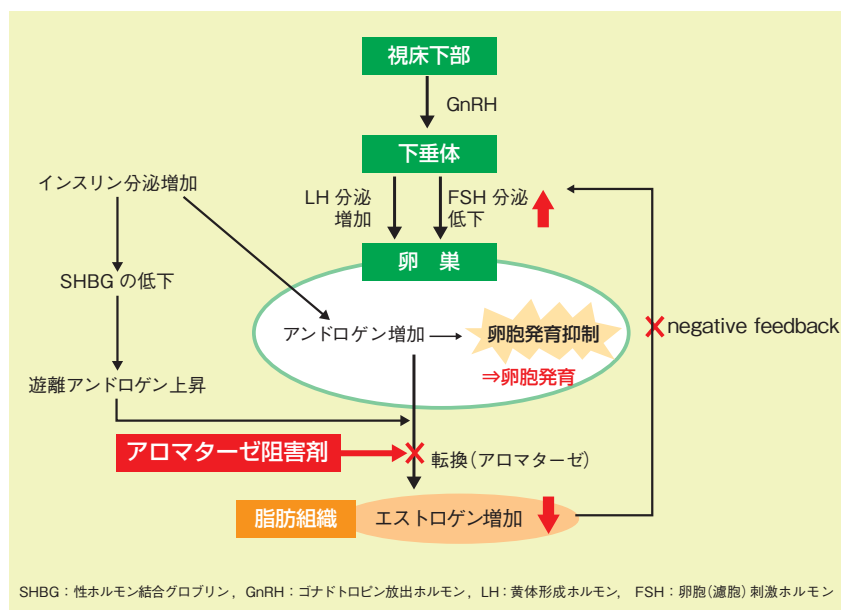
AIでは、クロミフェン抵抗例での排卵や、卵巣期のみ投与のため単一卵巣排卵が報告されている^{5~8)}。柴苓湯でもクロミフェン抵抗例での排卵や単一卵巣の発育傾向が報告されており^{2~3)}、これらの報告からも柴苓湯の排卵誘発作用には、アロマターゼ阻害作用が関与する可能性が示唆される。しかし、柴苓湯は継続投与にも関わらず単

一卵巣の発育がみられる。MCF-7細胞に単独添加すると細胞増殖がみられたことから、柴苓湯はエストロゲン様作用を有することも示唆された（データ開示せず）。これらのことから、柴苓湯は生体内環境に応じた反応を示す可能性やインヒビリンなどによるnegative feedbackへの影響が推察される。

さらに、柴苓湯はPCOSの高LH値を有意に低下させたと報告されている^{2~3)}。視床下部－下垂体－卵巣系への調整作用が推測されLH分泌異常の改善も卵巣の発育に関与するのかもしれない。

しかし、いずれも*in vitro*での実験結果であり、今後は*in vivo*での検討が必要といえる。

図4 PCOSにおけるアロマターゼ阻害剤の作用機序



まとめ

柴苓湯は、アロマターゼ阻害作用を有することが示唆された。その作用は aminoglutethimide や anastrozole と比較すると弱いものの、柴苓湯の排卵誘発作用機序の1つとして、アロマターゼ阻害作用が関与している可能性が示唆された。

引用文献

- 1) 伊藤良ほか：中医処方解説。神戸中医学研究会 編著。第1版：p235。医歯薬出版株式会社 東京、1996。
- 2) 酒井淳ほか：多嚢胞性卵巣症候群に対する柴苓湯の有用性に関する検討。臨婦産 54：p1330-1333, 2000。
- 3) Okamoto M et al. : Effects of Saireito on the ovarian function of patients with polycystic ovary syndrome. Reprod Med Biol 9 : p191-195, 2010.
- 4) Mitwally MF et al. : Use of an aromatase inhibitor for induction of ovulation in patients with an inadequate response to clomiphene citrate. Fertil Steril 75 : p305-309, 2001.
- 5) 水口雅博ほか：アロマターゼ阻害剤による治療の試み(2)排卵誘発。Hormone Frontier in Gynecology 15 : p67-73, 2008.
- 6) 北脇城：婦人科領域におけるアロマターゼ阻害剤の応用。京府医大誌 118：p3-12, 2009.
- 7) 瀬川智也ほか：多嚢胞卵巣症候群患者に対するアロマターゼ阻害剤の臨床応用。産婦人科の実際 56：p1193-1198, 2007.
- 8) 生水真紀夫：アロマターゼ阻害剤の不妊治療への応用－PCOS・ホルモン依存性癌患者における排卵誘発。医学のあゆみ 223：p27-30, 2007.
- 9) John H. Macindoe : Estradiol formation from testosterone by continuously cultured human breast cancer cells. J. Clinical Endocrinology and metabolism 49 : p272-277, 1979.
- 10) Mosmann T : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. 65 : p55-63, 1983.