

研究報告書

パプラール製剤のがん細胞増殖抑制作用  
に関する研究

安田女子大学 薬学部  
森本 千恵

京都工芸繊維大学大学院 生体分子工学部門  
田嶋 邦彦

## 【目的】

パプラール製剤は、白金およびパラジウムが混合したコロイド溶液であり、その主な効能は、急性胃炎や胃粘膜損傷といった胃障害に対する修復効果である<sup>1)</sup>。これらの効能におけるパプラール製剤の作用機序は、胃障害の一因であるスーパーオキシドラジカルやヒドロキシラジカルといった活性酸素の消去作用にあることが、最近の研究で示唆されてきた<sup>2-4)</sup>。一方、初期がんを併発している患者がパプラール製剤を飲用することによって、がんが軽減、あるいは消滅するという傾向が観察されている。しかし、その科学的データは未だ得られていない。

そこで、がん細胞の増殖に対するパプラール製剤の影響を検討することによって、民間で言われている症状軽減が科学的に証明されるか否かを検討することを目的として本研究を行った。

## 【実験方法】

### 1) 細胞培養

実験には、ヒト子宮頸癌の細胞株である HeLa 細胞を用いた。10%ウシ胎児血清を含む Eagle's minimal essential 培地に、非必須アミノ酸を加えた培養液 (culture medium) を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下、培養を行った。

### 2) 細胞増殖に対するパプラール製剤の影響

96 well plate に、 $1.2 \times 10^4$  cells/well in 200  $\mu$ l culture medium になるように HeLa 細胞をまき、約 12 時間後、culture medium を除き、種々の濃度のパプラール製剤を含む medium を 100  $\mu$ l/well 加え、incubation した (37°C/5% CO<sub>2</sub>)。Incubation 後、20  $\mu$ l/well の CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Reagent (Promega) を加え、1 時間 incubation した (37°C/5% CO<sub>2</sub>)。その後、プレートリーダー (PerkinElmer) を用いて 490 nm における吸光度を測定した。

## 【実験結果および考察】

### 1) 24 時間培養におけるパプラール製剤の添加効果

まず、培養液中、0、0.1、0.5、1.0%になるようにパプラール製剤を添加し、24 時間での細胞増殖の変化を検討した。

細胞量の程度は、試薬の吸光度の値によって示されるが、図 1 に示すように、パプラール製剤を加えた時点での細胞量をそれぞれ 1 とすると、製剤を加えない細胞の細胞量は、24 時間後に約 2.4 倍に増加した。パプラール製剤を加えた細胞では、いずれの濃度においても、製剤を加えなかった細胞に比べて増殖の程度が抑制された。また、培養液中での製剤の濃度依存的に細胞量の増加傾向が認められた。すなわち、培養液中のパプラール製剤濃度が低いほど、細胞増殖を抑制するという結果が得られた。

## 2) 72 時間培養におけるパプラール製剤の添加効果

先の結果を踏まえて、次に、さらに低濃度のパプラール製剤を添加した細胞の増殖について、72 時間まで観察した。

培養液 100  $\mu$ l 中、0、0.01、0.05、0.1、0.5、1.0%になるようにパプラール製剤を添加した時間を 0 時間とし、添加後から 72 時間までの細胞増殖の変化を図 2 に示した。

今回は、細胞増殖の程度を試薬の吸光度で示した。すなわち、パプラール製剤を加えた時点での波長 490nm での吸光度と、それぞれの時間における吸光度との差を求め、増加した細胞量とした。パプラール製剤を加えない細胞だけでなく、いずれの条件の細胞においても、24 時間以降、急激な細胞増殖はみられなくなった。0.01、0.05、0.1%のパプラール製剤を加えた細胞は、0.5 および 1.0%の添加に比べて、細胞増殖を抑制した。この結果は、前回、パプラール製剤を 0.1、0.5、1.0%で用いた際の、培養液中のパプラール製剤濃度が低いほど、細胞増殖を抑制するという結果と一致する。しかし、0.01、0.05、0.1%の中で、濃度依存性は認められず、0.5 および 1.0%の添加でも、濃度依存性は認められなかった。

以上の結果より、パプラール製剤によって、ヒト子宮頸癌の細胞株である HeLa 細胞の増殖が抑制されることが示唆された。その至適濃度は、培養液中濃度として、0.01~0.1%という低濃度であった。一般に、体内に過剰に発生した活性酸素は、細胞膜を損傷し、また遺伝子を損傷することによって細胞の癌化に関与すると考えられている。従って、活性酸素を除去する働きを助けることによって、細胞の癌化、さらに癌細胞の浸潤を防御できる可能性が考えられる。パプラール製剤の活性酸素消去作用が、癌細胞の増殖抑制効果を持つことは十分考えられる。

今後、パプラール製剤の活性酸素消去作用と、癌細胞増殖抑制作用との関係を詳細に検討すると共に、癌細胞のアポトーシスに対する影響や他の癌細胞および正常細胞における効果を検討したい。

## 【参考文献】

- 1) 曲 曉非：薬理と臨床, **8**: 215, 1998.
- 2) 田嶋邦彦、渡部るしる、金折賢二：薬理と臨床, **14**: 247, 2004.
- 3) 田嶋邦彦、渡部るしる、金折賢二：薬理と臨床, **15**: 635, 2005.
- 4) 田嶋邦彦、小松るしる、櫻井康博他：薬理と臨床, **18**: 217, 2008.

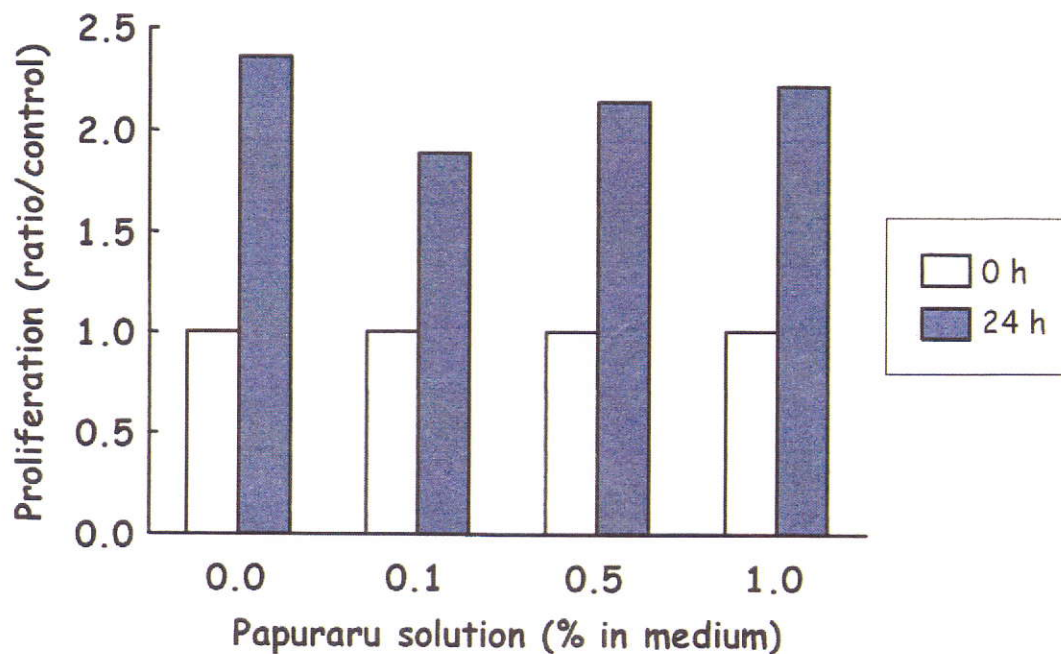


図1 24時間培養におけるパプラール製剤の添加効果

96 well plate に、 $1.2 \times 10^4$  cells/well in 200  $\mu$ l culture medium になるように HeLa 細胞をまき、12 時間後、culture medium を除き、medium 中の濃度がそれぞれ 0.1、0.5、1.0% になるようにパプラール製剤を添加した medium を 100  $\mu$ l/well 加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下、incubation した。Incubation 後、20  $\mu$ l/well の CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent (Promega) を加え、1 時間 incubation した後、490 nm における吸光度を測定した。それぞれのカラムは、4 well ずつ行った平均値を示した。各濃度において、パプラール製剤を加えた時点での細胞量を 1 として、24 時間後の細胞増殖の程度を表した。



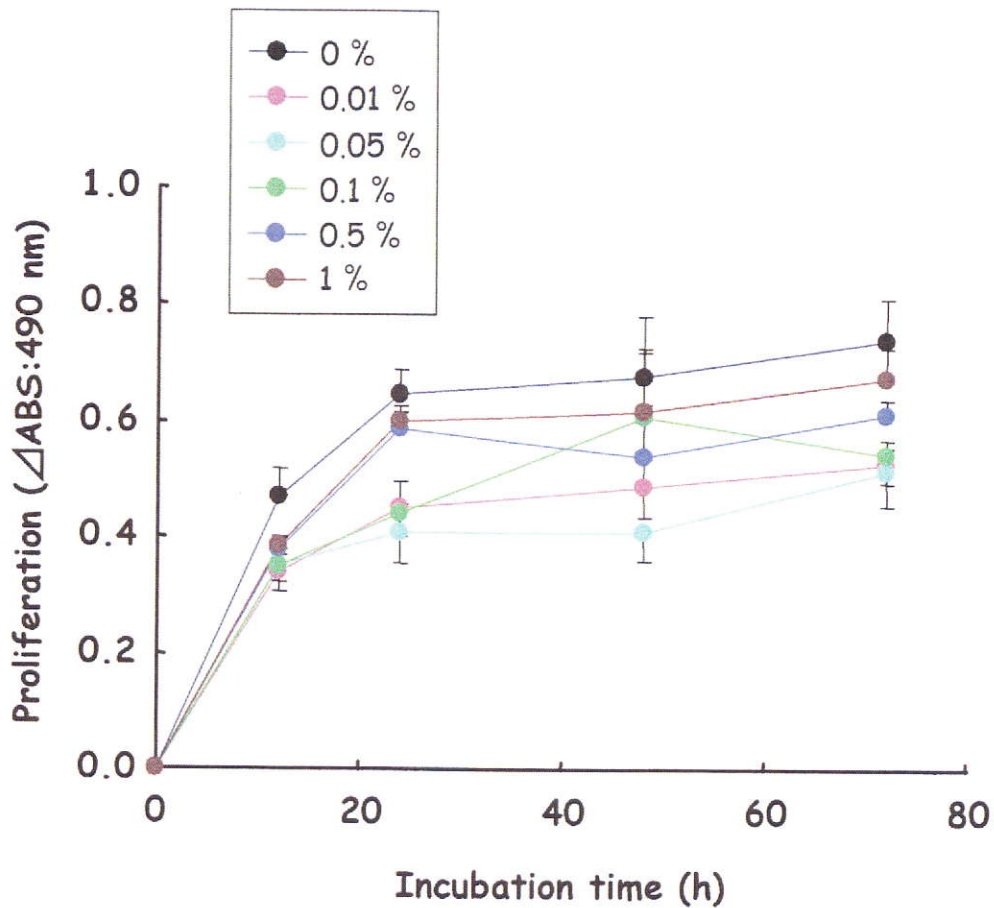


図2 72時間培養におけるパプラール製剤の添加効果

96 well plate に、 $1.2 \times 10^4$  cells/well in 200  $\mu$ l culture medium になるように HeLa 細胞をまき、12 時間後、culture medium を除き、medium 中の濃度がそれぞれ、0.01、0.05、0.1、0.5、1.0%になるようにパプラール製剤を添加した medium を 100  $\mu$ l/well 加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下、incubation した。12、24、48 および 72 時間の incubation 後、20  $\mu$ l/well の CellTiter 96<sup>®</sup> AQ<sub>ueous</sub> One Solution Reagent (Promega) を加え、1 時間 incubation した後、490 nm における吸光度を測定した。それぞれのポイントは、6 well ずつ行った平均値±標準誤差で示した。各濃度における吸光度からパプラール製剤を加えた時点での吸光度を back ground として差し引いた値を細胞量として示した。