

北海道産野生植物などの抗がん活性スクリーニング試験と 活性成分の単離・同定

An *In Vitro* Screening Test for Anti-cancer Components of Wild Plants in Hokkaido

兼俊 明夫 井上 勝一* 姉帯 正樹
藤本 啓 青柳 光敏 佐藤 正幸

Akio KANETOSHI, Shoichi INOUE, Masaki ANETAI,
Toru FUJIMOTO, Mitsutoshi AOYAGI and Masayuki SATO

Key words : screening test (スクリーニング試験) ; anti-cancer component (抗がん活性成分) ; wild plant (野生植物) ; lung cancer cell (肺がん細胞)

これまでに著者らは、抗がん剤及びその代謝活性物質の血中濃度モニタリングによる副作用軽減のための研究¹⁾や抗がん剤の作用機序²⁾及び薬剤耐性機序の解明³⁾について研究を行ってきた。これらの成果は抗がん剤によるがん治療のための基礎的資料となったが、より安全で有効な新規抗がん剤の開発や臨床応用は現在も強く望まれているものと考えられる。これまでに開発された抗がん剤には植物活性成分に由来するものも多く、本道に自生する多種・特異な植物資源中には未利用の新規活性物質の存在が期待される。北海道に自生する野生植物にはアイヌ民族が伝承有用植物(薬用・食用植物など)として利用したものが多いが、それらについて抗がん活性のスクリーニング試験が行われたという報告はない。そこで、本研究では、抗がん剤開発のための基礎的知見を得ることを目的として、アイヌ民族の伝承有用植物 129 種 243 試料及び本道に導入が期待される薬用植物の未利用部位など 28 種 29 試料について、肺がん培養細胞を用いたインビトロでの抗がん活性スクリーニング試験を行い、活性成分の単離・構造決定を行うとともに、活性成分の作用機作についても若干の検討を行った。

方 法

1. 試 料

アイヌ民族伝承有用植物：胆振管内白老町、江別市大麻、札幌市篠路及び定山溪で採取した野生植物など 129 種類を部位別に分けた 243 試料について、重量比約 5 倍量の 70%アセトンに 24 時間浸漬し、エキスを抽出した。抽出液をロータリーエバポレーターで、濃縮乾固した後、残渣

を 10 mg/mL DMSO 溶液としスクリーニング試験に供した。

薬用植物の未利用部位など：衛生研究所薬用植物園にて、植栽されている薬草の未利用部位など 28 種 29 試料を同様に 70%アセトン抽出した。アセトン留去後水層を塩析し、酢酸エチル層にエキスを転溶した。酢酸エチルを乾固し、残渣を 10 mg/mL DMSO 溶液とし、スクリーニング試験に供した。

2. 培養肺がん細胞

スクリーニング試験には 3 種類のヒト肺がん細胞株^{4,5)}、PC-3 腺がん細胞、PC-6 小細胞がん細胞及び PC-10 扁平上皮がん細胞を用いた。いずれの細胞も 10%ウシ胎児血清添加 RPMI1640 培養液を用いて 37°C の 5%炭酸ガス培養器で維持培養した。

3. 抗がん活性スクリーニング試験法 (MTT アッセイ)

2.2×10^4 個/mL に調製した細胞浮遊液 90 μ L を、96 穴マイクロプレートの各ウェルに播種した。37°C の炭酸ガス培養器で 48 時間前培養した後、段階希釈した抽出エキスを 10 μ L ずつ加え、さらに 48 時間培養後に新鮮な培養液を 100 μ L ずつ添加した。72 時間培養後 (エキス添加 5 日後) に 0.1 M のコハク酸を含有する 4 mg/mL の 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 溶液 20 μ L を各ウェルに加え、さらに 4 時間培養した。培養上清を吸引除去し、DMSO を 100 μ L ずつ加え、細胞内に生成した MTT のホルマザン体を可溶化した。生成したホルマザン量 (生細胞数に比例する) は、マイクロプレートリーダーを用い、450 nm の吸光度を測定することで求めた。各抽出エキス濃度における生細胞の割合を半対数グラフ上にプロットし、対数関数の近似式を算出し、IC₅₀ 値 (細胞生存率が 50%となるよう

*北海道大学大学院地球環境科学研究科 (現 札幌東徳州会病院オンコロジーセンター)

なエキス濃度)を求めた。

4. 活性物質の分離精製法及び HPLC 条件

エキスは、ワコーゲル C-200 によるシリカゲルカラムクロマトグラフィー (45 mmφ×180 mm), キーゼルゲル 60HF254 アルミシートによるシリカゲル薄層クロマトグラフィー及び分取用 HPLC で、順次分画操作を行った。

分取用 HPLC 条件 カラム: Inertsil Prep-ODS カラム (20 mmφ×250 mm), 移動相: アセトニトリル/水/リン酸=90:10:0.1, 流速: 4.0 mL/min, 検出波長: 240 nm.

分析用 HPLC 条件 (フェオホルビド誘導体の分析) カラム: TSKgel ODS-80Ts カラム (4.6 mmφ×250 mm), 移動相: アセトニトリル/水=80:20, 流速: 1.0 mL/min, 検出波長: 240 nm, カラム温度: 40°C.

5. 質量分析及び NMR 測定

β-ペルタチンの質量分析は島津 QP-5050 型ガスクロマトグラフ質量分析計を用いて直接導入法にて、EI-MS 分析を行った。また、フェオホルビド誘導体 I の NMR 測定は DMSO-d⁶ に溶解し、日本電子製 ECP400 型 NMR を用いて行った。

6. フローサイトメトリーを用いた細胞周期の測定

細胞を 2.2×10⁵ 個/mL に調製し、20 mm ディッシュに 1.8 mL ずつ播種した後、37°C で 48 時間前培養した。培養後、抗がん活性スクリーニング試験の 10 倍濃度の活性画分を含む培養液を 200 μL ずつ加え、24 時間後にトリプシン処理により細胞を単離し、75%エタノールで 4°C、一夜固定した。洗浄後、100 μg/mL の RNase で RNA を消化し、さらに 100 μg/mL のヨウ化プロピジウムで DNA を染色した。フローサイトメーターはコールター社の EPICS を用い、約 1 万個の細胞を測定して DNA ヒストグラムを得た。DNA ヒストグラムは付属のコンピューターソフトを用い解析した。

結果及び考察

1. スクリーニング試験

アイヌ民族伝承有用植物 129 種 243 試料について、3 種のヒト肺がん培養細胞を用いてインビトロでの抗がん活性スクリーニング試験を行った結果、38 種 51 試料に抗がん活性が認められた (表 1)。なお、細胞生存率が 50% となるようなエキス濃度 (IC₅₀ 値) が 20 μg/mL 以下の場合を活性ありと判定した。

このスクリーニング試験の結果、インビトロではあるが、3 種類の肺がん細胞すべてに抗がん活性を示したのは、No.7 エゾノサワアザミ (根) と No.29 シャク (根茎) の 2 種であった。ついで、No.12 オニシモツケ (地上部) には PC-6 と PC-10 細胞に、No.20 クサノオウ (地上部) には PC-3 と PC-6 細胞に対するインビトロでの抗がん活性が認められた。さらに、PC-6 細胞に対しては、イチイ (葉, 枝), エゾノウワミズザクラ (枝), ウラジロタデ (根), クリ (果実, 葉, 枝), トチノキ (種子), チョウセ

ンゴミシ (蔓), ナナカマド (若葉・若芽), ニガキ (葉), ハマナス (果実) など 46 試料がインビトロでの抗がん活性を示した。また、No.33 チシマアザミ (地上部) は PC-10 細胞にのみインビトロで抗がん活性を示した。近年、シャク (根茎) からは、インビトロでのスクリーニング試験で抗がん活性物質としてデオキシポドフィロトキシンが単離されており⁶⁾, クサノオウからはウクラインという抗腫瘍活性を持つアルカロイドが単離されている⁷⁾。これらのことから、本報における 3 種の肺がん細胞を用いたインビトロでのスクリーニング試験法は抗がん活性を有する植物成分の探索に有用であることが示唆された。

ついで、薬用植物の未利用部位など 29 試料について同様に抗がん活性スクリーニング試験を行った。薬用植物群にはタンニンなどの非特異的に細胞毒性を発現する成分が多く含まれるため、70%アセトン抽出液のアセトンを留去した後、酢酸エチル層にエキスを転溶させた。酢酸エチル抽出によりエキス成分は数倍程度濃縮されることから、IC₅₀ 値が 10 μg/mL 以下の場合を有効とした。その結果、4 試料に抗がん活性が認められ、セイヨウオキナグサ (地上部) エキスが最も強い抗がん活性を示した (表 2)。その IC₅₀ 値は、PC-3 で 0.7 μg/mL, PC-6 で 0.7 μg/mL 及び PC-10 で 1.0 μg/mL であった (2 回測定の平均値)。モッコウに関しては Jung ら⁸⁾ や Sun ら⁹⁾ が、シコキオール類やコスツノライドなどに培養がん細胞に対する抗がん活性が認められたことを報告している。

2. 活性成分の分画と同定

スクリーニング試験結果や野生植物の資源量などを勘案し、アイヌ民族の有用植物ではナナカマド (若葉・若芽) 及びチシマアザミ (地上部) の 2 種について、薬用植物の未利用部位についてはセイヨウオキナグサ (地上部) 及びカラスビシャク (地上部) の 2 種について活性物質の分画を行った。

セイヨウオキナグサ地上部 3.9 kg から 70%アセトン抽出エキスを調製し、アセトン留去後水層を塩析して酢酸エチル層にエキスを転溶し、酢酸エチル抽出エキス 42.3 g

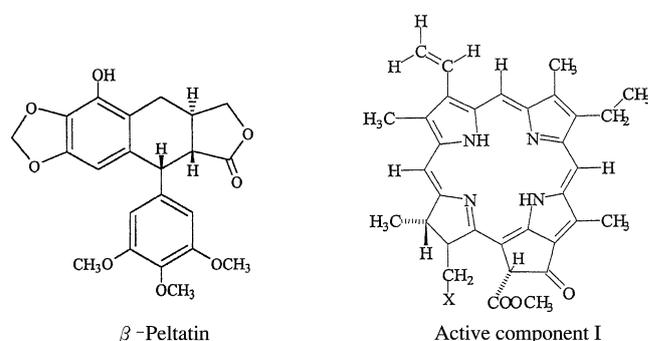


図 1 β-ペルタチン及び活性成分 I の推定化学構造

β-Peltatin: β-ペルタチン, Active component I: カラスビシャクエキスの抗がん活性成分 I, X: 未詳部分

表1 抗がん活性を示したアイヌ民族伝承有用植物名及び部位 (38種 51試料)

No.	植物名及び部位	学名	PC-3	PC-6	PC-10
1	イケマ (果実)	<i>Cynanchum caudatum</i>	N	+	N
2	イチイ (葉)	<i>Taxus cuspidata</i>	N	+	N
3	イチイ (枝)		N	+	N
4	ウラジロタデ (根)	<i>Polygonum weyrichii</i>	N	+	N
5	エゾノウワミズザクラ (枝)	<i>Prunus padus</i>	N	+	N
6	エゾノコリンゴ (果実)	<i>Malus baccata</i> var. <i>mandshurica</i>	N	+	N
7	エゾノサワアザミ (根)	<i>Cirsium pectinellum</i>	+	+	+
8	エゾミソハギ (地上部)	<i>Lythrum salicaria</i>	N	+	N
9	エゾミソハギ (根)		N	+	N
10	エビガライチゴ (果実)	<i>Rubus phoenicolasius</i>	N	+	N
11	オオイタドリ (種子)	<i>Reynoutria sachalinensis</i>	N	+	N
12	オニシモツケ (地上部)	<i>Filipendula kamtschatica</i>	N	+	+
13	カシワ (果実)	<i>Quercus dentata</i>	N	+	N
14	カシワ (葉)		N	+	N
15	ガマ (穂)	<i>Typha latifolia</i>	N	+	N
16	カラハナソウ (花穂)	<i>Humulus lupulus</i> var. <i>cordifolius</i>	N	+	N
17	カラハナソウ (根)		N	+	N
18	カラハナソウ (根茎)		N	+	N
19	クサソテツ (地上部)	<i>Matteuccia struthiopteris</i>	N	+	N
20	クサノオウ (地上部)	<i>Chelidonium majus</i> var. <i>asiaticum</i>	+	+	N
21	クリ (果実)	<i>Castanea crenata</i>	N	+	N
22	クリ (葉)		N	+	N
23	クリ (枝)		N	+	N
24	クロミノウグイスカグラ (果実)	<i>Lonicera caerulea</i> var. <i>amphyllocalyx</i>	N	+	N
25	ゲンノショウコ (地上部)	<i>Geranium nepalense</i> subsp. <i>thunbergii</i>	N	+	N
26	コウホネ (根)	<i>Nuphar japonicum</i>	N	+	N
27	サンショウ (葉)	<i>Zanthoxylum piperitum</i>	N	+	N
28	サンショウ (枝)		N	+	N
29	シャク (根茎)	<i>Antheriscus aemula</i>	+	+	+
30	ショウブ (地上部)	<i>Acorus calamus</i>	N	+	N
31	ダイコンソウ (地上部)	<i>Geum japonicum</i>	N	+	N
32	ダイコンソウ (根)		N	+	N
33	チシマアザミ (地上部)	<i>Cirsium kamtschaticum</i>	N	N	+
34	チョウセンゴミシ (蔓)	<i>Schisandra chinensis</i>	N	+	N
35	ツリフネソウ (地上部)	<i>Impatiens textori</i>	N	+	N
36	ツルコケモモ (果実)	<i>Vaccinium oxycoccus</i>	N	+	N
37	トチノキ (種子)	<i>Aesculus turbinata</i>	N	+	N
38	トドマツ (種子)	<i>Abies sachalinensis</i>	N	+	N
39	ナナカマド (若葉・若芽)	<i>Sorbus commixta</i>	N	+	N
40	ニガキ (葉)	<i>Picrasma quassioides</i>	N	+	N
41	ノダイオウ (塊根)	<i>Rumex longifolius</i>	N	+	N
42	ノリウツギ (地上部)	<i>Hydrangea paniculata</i>	N	+	N
43	ハマナス (果実)	<i>Rosa rugosa</i>	N	+	N
44	ハマナス (果実)		N	+	N
45	ハマナス (果実)		N	+	N
46	ハマナス (葉)		N	+	N
47	ハマナス (枝)		N	+	N
48	ホザキナナカマド (枝)	<i>Sorbaria sorbifolia</i> var. <i>stellipila</i>	N	+	N
49	ヤブマメ (地上部)	<i>Amphicarpaea edgeworthii</i> var. <i>japonica</i>	N	+	N
50	ヤマブドウ (蔓)	<i>Vitis coignetiae</i>	N	+	N
51	ワラビ (根)	<i>Pteridium aquilinum</i> var. <i>latiusculum</i>	N	+	N

PC-3: PC-3 腺がん細胞, PC-6: PC-6 小細胞がん細胞, PC-10: PC-10 扁平上皮がん細胞.

N: 影響なし, +: IC50 値が 20 µg/mL 以下.

表2 抗がん活性を示した薬用植物名と部位

No.	植物名及び部位	学名	PC-3	PC-6	PC-10
1	セイヨウオキナグサ (地上部)	<i>Pulsatilla vulgaris</i>	+	+	+
2	カラスビシャク (地上部)	<i>Pinellia ternata</i>	+	+	+
3	モッコウ (地上部)	<i>Saussurea lappa</i>	N	+	+
4	モッコウ (根)		+	+	+

PC-3: PC-3 腺がん細胞, PC-6: PC-6 小細胞がん細胞, PC-10: PC-10 扁平上皮がん細胞.

N: 影響なし, +: IC50 値が 10 µg/mL 以下.

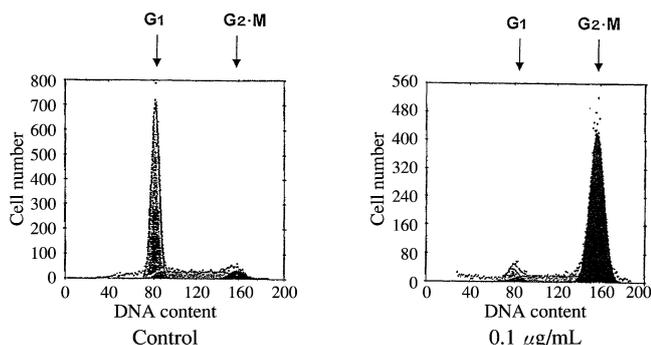


図2 フローサイトメトリーによるデオキシポドフィロトキシンの細胞周期に及ぼす影響

Control: 対照群, 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$: デオキシポドフィロトキシ添加群, G_1 : G_1 期 (DNA 合成準備期) 細胞群, $G_2 \cdot M$: $G_2 \cdot M$ 期 (細胞分裂準備期・細胞分裂期) 細胞群

を得た。n-ヘキサン/80%メタノールで分配した後、活性画分である80%メタノール層画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィー、HPLCにて順次精製した。質量分析における M^+ ピーク (m/z 414) 及びEIマスマフラメントグラムから β -ペルタチン(図1)と推定される活性成分36.3 mgを単離した。近年、Mimakiら¹⁰⁾は、ヒロハオキナグサ(根)から、 β -ペルタチン及び数種のサポニンを抗がん活性成分として単離している。

ついで、カラスビシャク地上部の3.5 kgから酢酸エチル抽出エキス16.9 gを得た。エキスをn-ヘキサン/80%アセトニトリルを用いて分配操作を行った。80%アセトニトリル層をロータリーエバポレーターで溶媒留去し、残った水層を塩析して酢酸エチル層に転溶し、活性画分2.8 gを得た。この活性画分から分取用HPLCにて活性成分I及びIIを分離した。収量は活性成分Iが約220 mg、活性成分IIが約90 mgであった。活性成分IはNMRスペクトルより図1に示すような化学構造を有するフェオホルビド誘導体であることが推定された。活性成分IIもほぼ同様の構造を有するものと推測された。

ついで、チシマアザミ地上部及びバナナカマド(若葉・若芽)エキスの活性画分をHPLCにて分析したところ、カラスビシャクで認められた抗がん活性成分I及びIIをそれぞれ、5:2及び18:1の割合で含有していた。このことからチシマアザミ及びバナナカマドの抗がん活性成分はカラスビシャクの活性成分と同じ2種のフェオホルビド誘導体であることを確認した。

3. 活性成分による細胞周期に及ぼす影響

これまでに著者らはヒノキアスナロ葉から抗がん作用を示すリグナン化合物、デオキシポドフィロトキシ及び β -ペルタチン-Aメチルエーテルを単離し、その作用機作について検討した結果を報告している¹¹⁻¹⁴⁾。さらには本研究においても、セイヨウオキナグサ地上部から同様に抗がん活性を示すリグナン類の β -ペルタチンを単離した。

図2及び図3はデオキシポドフィロトキシ及びカラス

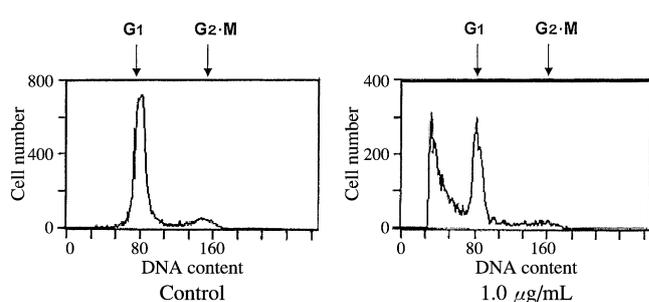


図3 フローサイトメトリーによるカラスビシャク活性画分の細胞周期に及ぼす影響

Control: 対照群, 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$: カラスビシャク活性画分添加群, G_1 : G_1 期 (DNA 合成準備期) 細胞群, $G_2 \cdot M$: $G_2 \cdot M$ 期 (細胞分裂準備期・細胞分裂期) 細胞群

ビシャク(地上部)エキスの活性画分のPC-6肺がん細胞の細胞周期に及ぼす影響をフローサイトメトリーにて調べたものである。その結果、デオキシポドフィロトキシでは、 $G_2 \cdot M$ 期(細胞分裂準備期・細胞分裂期)の細胞が増加し、 G_1 期(DNA合成準備期)のがん細胞が減少していくことが示された。増殖中の細胞は G_1 期(DNA合成準備期)→S期(DNA合成期)→ G_2 期(細胞分裂準備期)→M期(細胞分裂期)の細胞周期を繰り返している¹⁵⁾。このことから、デオキシポドフィロトキシなどの抗がん活性を有するリグナン化合物は $G_2 \cdot M$ 期で細胞増殖を停止させがん細胞を死滅させていく作用機作が考えられた。

一方、2種のフェオホルビド誘導体を含有する活性画分では、 $G_2 \cdot M$ 期の細胞は増加せず、 G_1 期の細胞のみが一定時間後に減少していくことが明らかとなった。このことから、2種のフェオホルビド誘導体はデオキシポドフィロトキシなどとは全く異なった作用機作により抗がん活性を示していることが明らかとなった。

なお、本研究の一部は平成14~16年度の北海道立衛生研究所一般試験研究「抗がん剤によるがんの化学療法に関する研究—新規抗がん剤開発のための基礎的研究—」として行われたものである。

文 献

- 1) 高田寛也, 兼俊明夫, 高岡和夫, 井上勝一: 基礎と臨床, 30, 51 (1996)
- 2) 大塚公彦, 井上勝一, 兼俊明夫: 第56回日本癌学会総会記事, 56, 617 (1997)
- 3) Ohtsuka K, Inoue S, Kameyama M, Kanetoshi A, Fujimoto T, Takaoka K, Araya Y, Shida A: Lung Cancer, 41, 187 (2003)
- 4) Inoue S, Ito M, Mizuno S, Isobe H, Miyamoto H, Kawakami Y, Ohnuma T; Anal. Quant. Cytol. Histol., 10, 243 (1988)
- 5) Inoue S, Takaoka K, Endo T, Mizuno S, Ogawa Y, Yoshida M, Ohnuma T: Lung Cancer, 17, 85 (1997)
- 6) 中村光博, 梅原 薫, 宮瀬敏男, 黒柳正典, 野口博司: 日

- 本薬学会第 116 年会講演要旨集第 2 分冊, 182 (1996)
- 7) Uglyanitsa KN, Nefyodov LI, Doroshenko YM, Nowicky JW, Volchek IV, Brzosko WJ, Hodysh YJ : *Drugs Exp. Clin. Res.*, **26**, 341 (2000)
 - 8) Jung JH, Kim Y, Lee CO, Kang SS, Park JH, Im KS : *Arch. Pharm. Res.*, **21**, 153 (1998)
 - 9) Sun CM, Syu WJ, Don MJ, Lu JJ, Lee GH : *J. Nat. Prod.*, **66**, 1175 (2003)
 - 10) Mimaki Y, Kuroda M, Asano T, Sashida Y : *J. Nat. Prod.*, **62**, 1279 (1999)
 - 11) Kanetoshi A, Fujimoto T, Hayashi T, Hori Y, Aoyama M, Saito N, Tsuda M, Mori M : *Natural Medicines*, **52**, 444 (1998)
 - 12) 綿貫郷子, 井上勝一, 兼俊明夫 : 第 56 回日本癌学会総会記事, **56**, 596 (1997)
 - 13) 綿貫郷子, 井上勝一, 兼俊明夫 : 第 57 回日本癌学会総会記事, **57**, 645 (1998)
 - 14) Watanuki S, Masuzaki T, Inoue S, Kanetoshi A : Abstract of 3rd International Congress on Lung Cancer, 263 (1998)
 - 15) 日本生化学会編 : 新生化学実験講座 18 巻, 東京化学同人, 東京, 1990, p.325