

## 2002年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

－在留中国人研究者研究助成－

2003年 3月 13日

財団法人 日中医学協会  
理事長 殿



研究者氏名 王立岩

所属機関名 日本大学薬学部生薬学研究室

指導責任者氏名 北中 進

職名 教授

所在地 〒274-8555 千葉県船橋市習志野台7-7-

電話 047-465-5356

内線 \_\_\_\_\_

### 1. 研究テーマ

生薬甘遂中の抗癌成分の探索と作用機序の解明

### 2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における発表  有 ・ 無 (学会名・演題)

日本生薬学会第49回年会

*Euphorbia kansui* L. の生物活性物質に関する研究 (3): euphane/tirucallane 型新規  
トリテルペンの構造と生物活性

日本薬学会第123年会 H15/3/27 発表予定

*Euphorbia kansui* L. の生物活性物質に関する研究 (4): アニマルキャップ細胞に対す  
る分裂抑制活性

(2) 学会誌等に発表した論文  有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

*J. Nat. Prod.* 65, 1246-1251, 2002.

Diterpenes from the Roots of *Euphorbia kansui* and Their in Vitro Effects on the Cell  
Division of *Xenopus*

—日中医学協会助成事業—  
生薬甘遂中の抗癌成分の探索と作用機序の解明

研究者氏名	王 立岩
中国所属機関	瀋陽薬科大学天然薬物教研室
日本研究機関	日本大学薬学部生薬学研究室
指導責任者	教授 北中 進
共同研究者名	姚 新生, 王 乃利

### 要 旨

生薬甘遂はトウダイクサ科の植物 *Euphorbia kansui* の根であり、山西、河北省など中国北西部に産出される。古来、甘遂は利尿剤として知られ、神農本草経では「下品」に分類されて、毒性の強い生薬として知られている。近年、中国での臨床報告によると、甘遂は慢性気管支炎、気管支喘息などのアレルギー性疾患や食道癌、乳癌、肝癌などの悪性腫瘍の治療薬としてしばしば使用される。<sup>1-5</sup> 甘遂の成分研究は 1943 年から現在まで、十数種のジテルペン及びトリテルペンが報告されている。<sup>6-11</sup> その中の ingenane 型ジテルペン類化合物には抗ウイルス活性（特に抗 HIV 活性）や癌細胞に対する細胞毒性など様々な強い生物活性が認められ、注目されている。

我々は甘遂について、アフリカツメガエルのアニマルキャップ細胞を用い、細胞分裂阻害活性を指標として活性成分の探索を行なった。今まで 10 種類の新規化合物を含む 34 種類の化合物を単離し、それらの構造決定と後期胞胚より得たアニマルキャップ細胞の細胞分裂に対する阻害活性について検討した。

さらに、機能解明と医薬品のリード化合物の開発を目指した生理活性の研究についても検討したので、報告する。

### 緒 言

最近の中国での臨床報告によると甘遂は慢性気管支炎、気管支喘息などのアレルギー疾患及び食道がん乳癌などの悪性腫瘍に適用されています。例えば、甘遂甘草散を晩期食道がん患者に投与して、12 例の症例中に 9 人の症状が改善され、6-15 ヶ月の延命効果が認められました。肝癌の治療に甘遂は大戟、天南星、麝香、アギなどの生薬と配合して、湿布剤として用いられている。また、甘遂は糊砂などと一緒に細かく粉碎して鼻腔に噴射して咽頭癌の治療にも使われます。われわれは甘遂の抗腫瘍成分を明らかにするために、アフリカツメガエルアニマルキャップアッセイ法を用いて甘遂の活性成分の検索をしました。

### Key Words:

甘遂(*Euphorbia kansui*), 抗癌成分, アニマルキャップアッセイ, 細胞増殖阻害活性, DNA 合成活性

### 研究方法:

#### アニマルキャップアッセイ法<sup>12</sup>

胞胚後期のアニマス細胞をピンセットで培養液中分離する。その、動物極組織から  $Ca^{2+}$  の培養液中で分散細胞を調整する。

0.2 mg/ml の  $\gamma$ -globulin を含む 50% アニマルメデイウムを用い、テラサキプレート中で増殖に対する影響を調べた。翌日、顕微鏡で個々の細胞が分裂しているかどうかを観察する。

### DNA 合成に対する影響 (免疫蛍光実験法)

アニマルキャップ細胞は 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) を含む培養液中で 37℃、30 分培養する。BrdU に対する蛍光染色剤を入れて 37℃、30 分染色する。蛍光顕微鏡で DNA の合成を観察する。

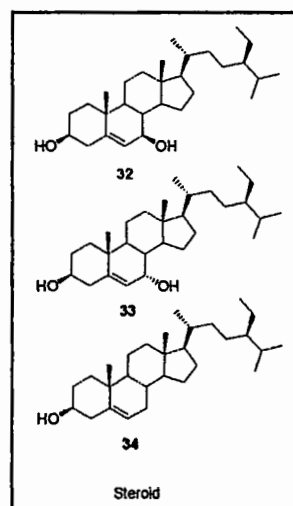
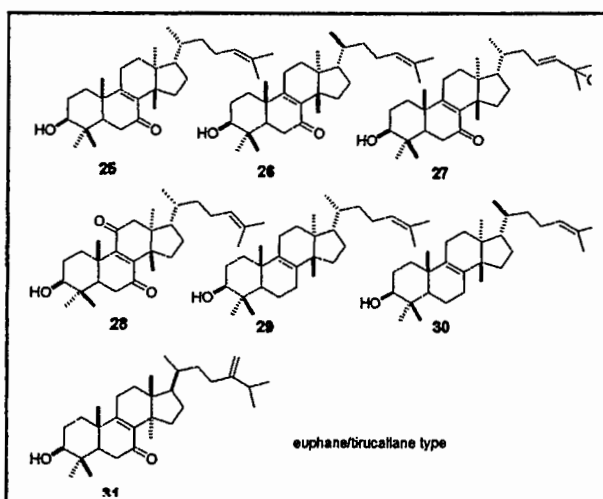
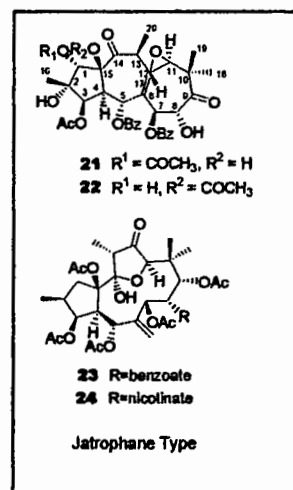
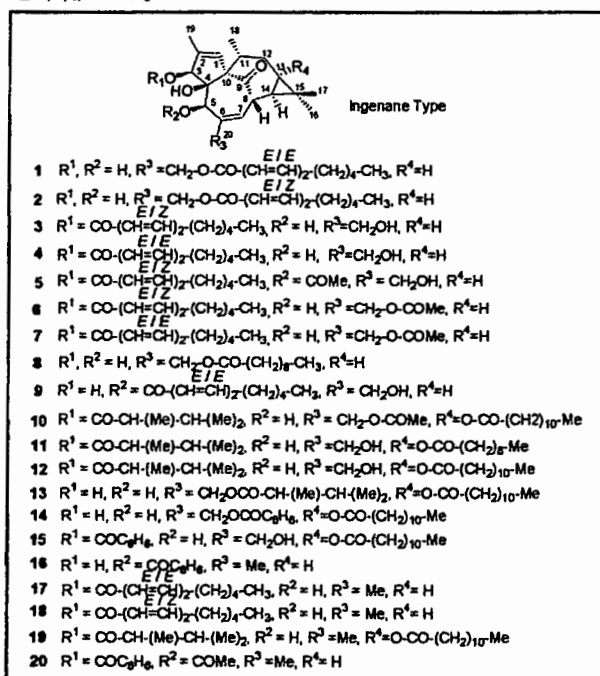
### 細胞増殖阻害アッセイ

培養された MMT (mouse mammary tumor cells)、LC540 (rat testicular tumor cells)、3T3 (mouse normal 3T3-Swiss albino cells) 細胞は microculture plates (2-3 × 1000 cells/0.1ml) に移し、37°C、10% CO<sub>2</sub> で 3-4 日培養し、固定、発色した後、顕微鏡で細胞数を数える。

### 活性成分の分離

中国産の甘遂 15 kg を 60% エタノールにより 45 L の溶液とし、これを 2 回温浸した後、減圧下で濃縮して 1200 g のエキスを得た。これを水 4L に溶解し、クロロホルム、酢酸エチル、及びブタノールの各 4 L で、順次それぞれ 3 回ずつ抽出した。これらを減圧濃縮し、クロロホルム画分からは 165 g (G-1)、酢酸エチル画分からは 23 g (G-2)、ブタノール画分からは 64 g (G-3)、水層画分からは 800 g (G-4) を得た。

上記各画分のうち、もっともアニマルキャップ細胞に対する増殖阻害活性の強い G-1 画分濃縮エキス 150 g をシリカゲルカラム、ODS-C18 カラム、sephadex-LH20 カラム、及び各種順相及び逆相の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて繰り返し精製を行い、化合物 1~34 を単離した。



活性結果：

1. アニマルキャップアッセイ結果

甘遂エキス及び各化合物のアニマルキャップ細胞増殖に対する影響を調べた。その結果(阻害率)を、Figure 1、2、3に示す。甘遂の各層エキスの中、CHCl<sub>3</sub>層(G-1)の活性が一番強かった。化合物には、一つの脂肪酸の置換基を持つ Ingenane 型のジテルペン 1-4、8-9 と 17-18 は一番強い活性を示した(0.5 μg/mL の阻害率は 60%以上)。二つの脂肪酸の置換基を持つ Ingenane 型のジテルペン 5-7 の活性は一桁落ちると見えますが(10 μg/mL の阻害率は 50%以上)、jatrophone 型のジテルペンより強い活性が認められた。16 位に脂肪酸の置換基を持つ Ingenane 型のジテルペンは特に活性が弱くなった。ただ化合物 12 と 13 は 10 μg/mL の阻害率は 60%以上を示した。jatrophone 型のジテルペンの中、22 番の化合物はある程度の活性を示した(10, 50, 200 μg/ml の阻害率は 57%, 87%, 98%だった)。Eupahne/tirucallane 型のトリテルペンも 10 μg/mL の阻害率は 50%以上を示した。

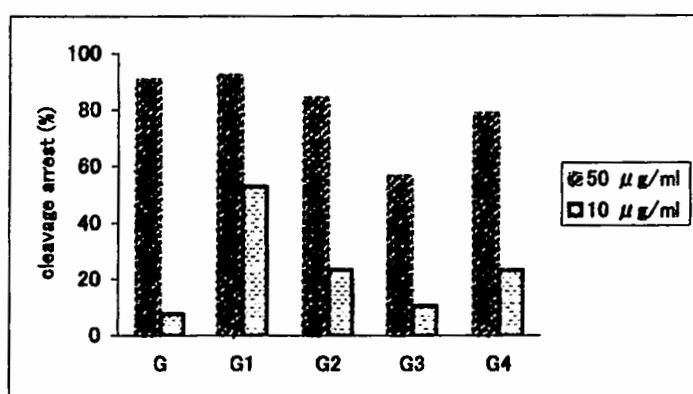


Fig. 1 Effects of G, G-1, G-2, G-3 and G-4 treatment on the proliferation of cells isolated from blastula embryos of *Xenopus*

Isolated cells from *Xenopus* blastulae were cultured in a medium containing G (70% EtOH extract of *E. kansui*), G-1, G-2, G-3 or G-4. After 16 hours, blastomere cleavage was observed under a microscope. The percentage of non-proliferating cells out of the total (non-proliferating cells and proliferating cells) number of cells is shown as a function of the concentration of extracts.

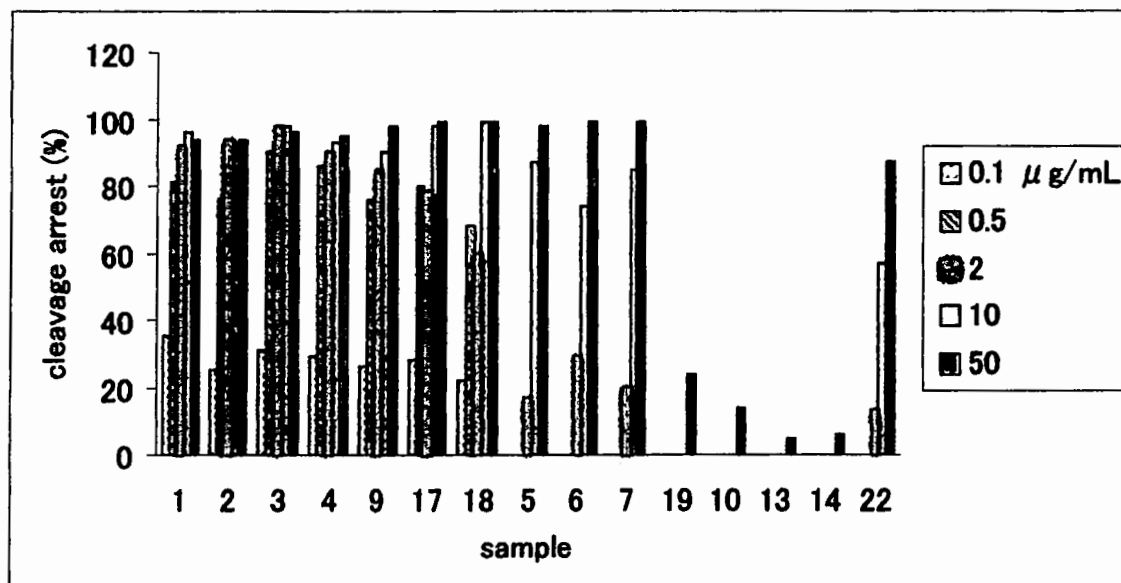


Fig. 2 Effects of Compounds 1-7, 9-10, 13-14, 17-19, and 22 treatment on the proliferation of cells isolated from blastula embryos of *Xenopus*

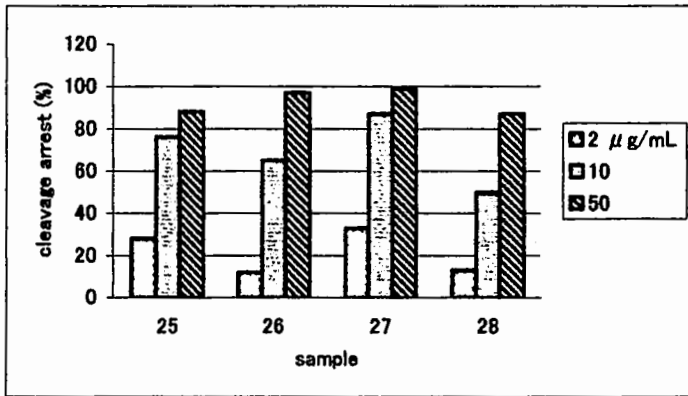


Fig. 3 Effects of Compounds 25-28 treatment on the proliferation of cells isolated from blastula embryos of *Xenopus*

2. DNA 合成に対する影響 (免疫蛍光実験法) :

化合物 22 について、BrdU の取り込み実験をやった結果、対象細胞と比べて、DNA に BrdU の取り込みの差が認められなかったから、化合物 22 は細胞の DNA 合成に影響をしなかったと判明した。



A, B: 蛍光顕微鏡写真

C, D: 顕微鏡写真

A, C: 化合物22を200 μg/ml加えた後、さらにBrdUを加え、培養、固定し、発色させた細胞

B, D: 対象細胞

3. 細胞増殖阻害アッセイ結果 :

化合物 1, 2 と 22 それぞれの MMT (mouse mammary tumor cells)、LC540 (rat testicular tumor cells)、3T3 (mouse normal 3T3-Swiss albino cells) 細胞に対する増殖阻害作用を調べた。化合物 22 は選択的に 3T3 細胞の増殖を阻害した (figure 4)。化合物 2 は選択的に MMT 細胞の増殖を阻害した。さらに、MMT 細胞培養液に化合物 2 を入れて一日培養してから、PBS で細胞を流し、新しい培養液でまた 2 日間培養した後、細胞の数と形は対象細胞と同じ様になった (figure 5)。これは、2 の MMT 細胞に対する阻害作用は可逆的だと考えられる。化合物 1 は 3 種類細胞の増殖を全て阻害した (figure 6)。

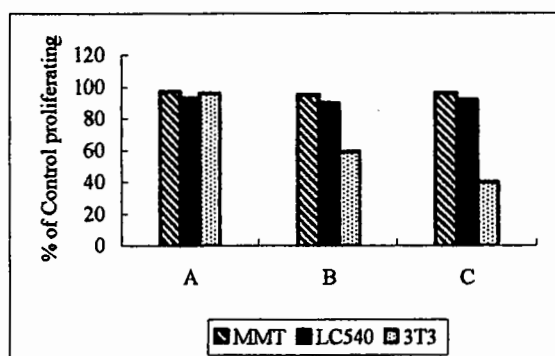


Fig. 4 Effects of 22 on the proliferation of MMT, LC 540 and 3T3 cells.

MMT, LC 540 and 3T3 cells were cultured at 37°C for 3 days in the presence of 10 μg, 50 μg, and 100 μg/ml of 22 or absence of 22 in microplates. The cells were then fixed, stained with Giemsa, and counted under a light microscope. The percentage of proliferating cells versus the control regard to the concentration of 22 is shown. A: 10 μg/ml of drug, B: 50 μg/ml, C: 100 μg/ml.

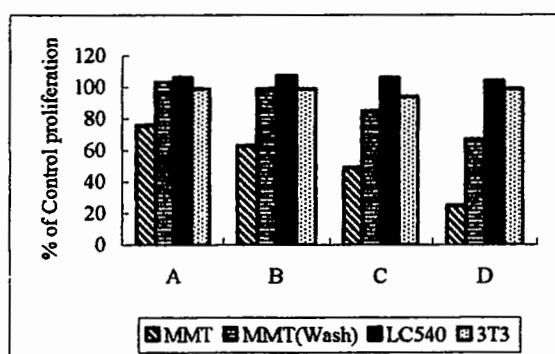


Fig. 5 Effects of 2 on the proliferation of MMT, LC 540 and 3T3 cells.

MMT, LC 540 and 3T3 cells suspended in MEM supplemented with 10% fetal calf serum were cultured with or without 2 in microplates for 3-4 days. MMT cells were also cultured at 37°C for 24 hours in the presence of 0.5 μg, 2 μg, 10 μg, and 50 μg/ml of 2 or absence of 2 in microplates. After washing in PBS, the cells were cultured without the drug for 48hours. The cells were then fixed, stained with Giemsa, and counted under a light microscope. The percentage of proliferating cells versus the control regard to the concentration of 2 is shown. A: 0.5 μg/ml of drug, b: 2 μg/ml, c: 10 μg/ml, d: 50 μg/ml.

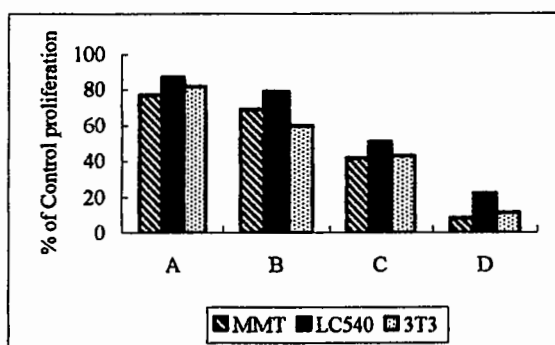


Fig. 6 Effects of 1 on the proliferation of MMT, LC 540 and 3T3 cells.

MMT, LC 540 and 3T3 cells were cultured at 37°C for 3 days in the presence of 0.5 μg, 2 μg, 10 μg, and 50 μg/ml of 1 or absence of 1 in microplates. The cells were then fixed, stained with Giemsa, and counted under a light microscope. The percentage of proliferating cells versus the control regard to the

concentration of **1** is shown. A: 0.5  $\mu$  g/ml of drug, b: 2  $\mu$  g/ml, c: 10  $\mu$  g/ml, d: 50  $\mu$  g/ml.

考察：

アニマルキャップアッセイ法によって活性追跡分離を行う、34種の化合物を得た。単離された ingenane 型ジテルペンはアニマルキャップ細胞の分裂をもっとも低濃度で阻害した。化合物 **22** について、BrdU の取り込み実験をやった結果、細胞の DNA に BrdU の取り込みが認められたことから、化合物 **22** は DNA 合成を阻害して細胞の増殖を阻害したのではなく、他のルートで細胞増殖を阻害したと分った。アニマルキャップ細胞の分裂は S と M 期の二期しかないから、**11** は DNA 合成期の S 期ではなく、分裂自身 (M 期) を阻害したのではないかと推測した。化合物 (**1**, **2**, **22**) について、さらに MMT (mouse mammary tumor cells)、LC540 (rat testicular tumor cells)、3T3 (mouse normal 3T3-Swiss albino cells) 細胞に対する増殖阻害作用を調べたところ、3種類の化合物は別々に特異的な細胞に対して特異な作用が認められたので、科学修飾により、有望的な抗がん剤のリード化合物になれると期待されている。

参考文献：

- (1) *Zhong Guo Yao Dian* (Chinese Pharmacopoeia); People's Health Press: Beijing, 1985, p 68.
- (2) *Zhong Yao Da Zhi Dian* (Dictionary of Chinese Drugs); Shanghai Science and Technology Press: Shanghai, 1977, Vol. 1; p 573.
- (3) Kondo, K.; Sugi, M. *Cancer Therapy in Modern China*; Shi Zen Sha; Tokyo, 1977, p 254.
- (4) Xia, G. C.; Li, D. H. *Color Atlas of Anticancer Animals, Plants and Mineral Preparations and Their Application*; Tianjin Science, Technology and Translation Publishing Corp: Tianjin, 1999, p 289.
- (5) Xu, G. J.; Wang, Q.; Yu, B. Y.; Pan, M. G. *Coloured Illustrations of Antitumour Chinese Traditional and Herbal Drugs*; Fujian Science and Technology Press: Fujian, 1997, p 218.
- (6) Uemura, D.; Ohwaki, H.; Chen, Y. P.; Hsu, H. Y. *Tetrahedron Lett.* 1974, 2527-2528.
- (7) Uemura, D.; Hirata, Y.; Chen, Y. P.; Hsu, H. Y. *Tetrahedron Lett.* 1974, 2528-2529.
- (8) Uemura, D.; Hirata, Y. *Tetrahedron Lett.* 1975, 1701.
- (9) Wu, T. S.; Li, Y. M.; Hirana, M.; Pan, D. J.; Shingu, T. *J. Nat. Prod.* 1991, 54, 823-829.
- (10) Pan, D. J.; Hu, C. Q.; Chang, J. J.; Lee, T. Y.; Chen, Y. P.; Hsu, H. Y.; Mcphail, D. R.; Mcphail, A. T.; Lee, K. H. *Phytochemistry* 1991, 30, 1018-1020.
- (11) Matsumoto, T.; Cyoun, J. C.; Yamada, H. *Planta Med.* 1992, 58, 255-258.
- (12) Godsave S. F. and Slack J. M. W. (1989) *Dev. Biol.* 134: 486-490

注：本研究は2002年9月「日本生薬学会」にて口演発表、*J. Nat. Prod.* 65, 1246-1251, 2002.に掲載。

作成日：2003年3月7日