

## アントラキノン類の抗変異原性

中杉 徹\*・西田 憲司\*\*・駒井 功一郎\*\*

## Antimutagenicity of Anthraquinones

Tohru NAKASUGI\*, Kenji NISHIDA\*\* and Kōichirō KOMAI\*\*

## Synopsis

Aloe-emodin isolated from *Aloe arborescens* Mill. inhibits frameshift mutations caused by 3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3*b*]indole in *Salmonella typhimurium* TA98. We examined the relationship between the antimutagenicity of aloe-emodin and its derivatives by a modification of the Ames test. All but anthraquinone itself could inhibit frameshift mutation by at least 80% if the amount used was at least  $10^{-3}$  mol/plate, but the numbers of revertant colonies was almost unchanged at this dose. The pattern of inhibition suggested that substitutions such as hydroxyl and hydroxymethyl groups on aromatic rings were important for the activity. Furthermore, five species of medicinal plants contained anthraquinones that also inhibited frameshift mutation.

## I 結 言

ヒトの発癌の大部分が食餌や喫煙といった環境要因に由来することが疫学調査<sup>1)</sup>の結果から推定されている。また、発癌の生化学的研究の結果からこれら環境中には数多くの発癌物質や変異原物質などのイニシエーター<sup>2,3)</sup>やプロモーター<sup>4,5)</sup>が存在することが知られるようになった。化学物質による癌化は、イニシエーション過程、プロモーション過程とプログレッション過程と呼ばれるそれぞれ機構的に異なる多段階の過程を経て起こることが明らかにされている。イニシエーション過程は化学物質(イニシエーター)がDNAと不可逆的に結合することでDNAに障害を与え、突然変異を誘起し、正常細胞を潜在的癌細胞に誘導する段階であり、プロモーション過程はそれ自身発癌性も変異原性も全く持たない物質(プロモーター)が潜在的癌細胞に繰り返し反復刺激を与え、細胞の増殖を促進し腫瘍を形成させる可逆的な段階である。そしてこのプロモーション

過程で形成された腫瘍細胞が引き続いてプログレッション過程と呼ばれる悪性化の段階を経た場合癌へと発展していく。ヒトの発癌の場合にはこれらの過程がより複雑に起こると考えられている。

このように癌化の機構が明らかになる一方、近年イニシエーションやプロモーションの過程を抑制する物質も環境から多数見いだされている。これらはそれぞれ抗変異原物質<sup>6,7)</sup>抗プロモーター<sup>4,8)</sup>と呼ばれ、癌予防の面から注目されている。発癌を予防するには環境からすべての発癌関連物質を取り除くことが最も望ましい方法であるが、実際には不可能である。そこで、抗変異原物質や抗プロモーターを積極的に摂取することで最終的に発癌のリスクを軽減するという考え方が最近注目されつつあり、この考えに基づいた食品も開発され始めている。

そこで、これら発癌を抑制する物質を広く環境に求め、その抑制物質を明らかにし、その抑制機構を究明することは発癌予防を目的とした食品開発に有

\* 農芸化学科研修員、稲畑香料株式会社生薬研究部(Research Lab. of Medicinal Products of Plant Origin, Inabata Kōryō Co., Ltd., Tagawa 3-5-20, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan)

\*\* 農芸化学科農薬化学研究室 (Lab. of Pesticide Chemistry, Dept. of Agricultural Chemistry, Kinki Univ., Nara 631, Japan)

用であると考えられる。

筆者らは前報<sup>9)</sup>でキダチアロエに含まれるアントラキノン類の一種、aloe-emodinがS-9 mix(7週令のSprague-Dawleyラットの雄に誘導剤としてphenobarbitalおよび5,6-benzoflavoneを併用投与した肝臓のホモジネートを9,000×gで遠心分離した上清分画にcofactor Iを加えたもの)の存在下で*Salmonella typhimurium* TA98に誘導されたフレームシフト型突然変異を顕著に抑制することを述べた。そこで今回は、aloe-emodinに関連するアントラキノン類の抗変異原性についてより明確な知見を得るため、その誘導体の抗変異原性について検討した。また、これまでにアントラキノン類を含むことが知られている数種の生薬についてもその抗変異原性を検討した。

## II 材料および方法

### 1. 材料

a. 試薬: Anthraquinone, rhein, aloe-emodin, emodin, quinizarin, chrysazin, chrysofanol はフナコシ株式会社 (Extrasynthese 製), 1-hydroxyanthraquinone, 2-hydroxymethylanthraquinone, alizarin は東京化成工業株式会社, anthrarufin, purpurin は関東化学株式会社, quinalizarin は和光純薬工業株式会社, anthraflavic acid は Aldrich Chemical Company, Inc. からそれぞれ購入した。変異原物質として用いた3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3b]indole (Trp-P-2) は和光純薬工業株式会社から、Trp-P-2の代謝活性化に用いたS-9およびcofactor I はオリエンタル酵母株式会社からそれぞれ購入した。

b. 生薬: ケツメイシ (種子), ダイオウ (根茎), センナ (葉), カシユウ (塊根), ハブソウ (葉) は日本粉末薬品株式会社から購入した。

#### c. 抽出および濃縮

生薬のダイオウ, センナ, カシユウ, ハブソウ, ケツメイシはそれぞれ500gに対しメタノール5lを加えて40°C, 2h抽出した後、濾過、減圧濃縮、凍結乾燥を行い乾燥粉末とした。

### 2. 抗変異原試験

試料の活性評価はAmes法変法によった。以下に検定培地の組成, 供試菌株, 方法を示す。

#### a. 供試培地とその組成

検定用培地の組成は下記の通りで調製後, 120°C, 20分間オートクレーブで滅菌した。

SDB培地: Bacto nutrient broth powder (Difco) 8g, NaCl 5gに蒸留水1,000mlを加え, pH 7.0に調整した。MM培地: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2g, trisodium citrate 10g, KOH 47gに蒸留水800mlを加え, 1規定KOHでpH 7.0に調製後, 全量を1,000mlとした。DB培地: Bacto nutrient broth powder 400mgを蒸留水40mlに溶解し, 1規定KOHでpH 6.8~7.0に調製した。MBB培地: Bacto agar (Difco) 15gを蒸留水930mlに加え滅菌後, MM培地50ml, DB培地10ml, 40% glucose水溶液10ml, biotin水溶液 (100μg/ml) 1mlを無菌的に加えよく攪拌し, 25mlずつ径9cmシャーレに分注した。ソフトアガー: NaCl 3.0g, agar powder 3.5gに蒸留水500mlを加え溶解後, 試験管に3mlずつ分注した。Phosphate buffer (PB): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 14.3g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.6gに蒸留水1,000mlを加えpH 7.0に調整した。

#### b. 供試菌株

抗変異原試験にはヒスチジン要求の変異株であるサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) TA98を用いた。サルモネラ菌 TA98をSDB培地中に接種し37°Cで18時間振とう培養後, 遠心分離(0°C, 1,500×g, 15min)によって菌体を分離した。菌体をPBに懸濁し, 600nmにおけるOD値が0.5になる希釈率を求めた。その希釈法に従いPBおよびMe<sub>2</sub>SO(最終12%)で懸濁しTA98菌原液を調製した。TA98菌原液の生菌数, 自発ミューテーション, 膜変異(rfa)特性, アンピシリン耐性を検定した後, 抗変異原試験に供試するまで-80°Cで保存した。

#### c. S-9 mixの調製

抗変異原の試験にはTrp-P-2の代謝活性化をするためS-9 mixを用いた。

S-9およびcofactor Iを所定の方法によって調製し抗変異原試験に用いた。すなわち, 蒸留水9mlに溶解したcofactor I (1バイアル)をS-9 1mlに加え, 遠心分離(6,000×g, 15min, 0°C)後, 上清をcellulose acetate メンブランフィルター (Advantec Toyo社製 Dismic 25CS, 孔径0.20μm)で濾過滅菌した。

#### d. Trp-P-2の調製

変異原物質としてアミノ酸の加熱分解生成物であるTrp-P-2の1.5μg/ml水溶液を前記同様のcellulose acetate メンブランフィルターで濾過滅菌した。

#### e. 試料溶液の調製

抗変異原試験に供試するアントラキノン類はそれ

ぞれ $10^{-2}$  M に、また生薬類は30 mg/ml と20 mg/ml の濃度になるよう  $\text{Me}_2\text{SO}$  で稀釈し、四フッ化エチレン樹脂 (PTFE) メンブランフィルター (Sartorius 社製, Minisart SRP15) で濾過滅菌した。また、 $\text{Me}_2\text{SO}$  を同様に濾過滅菌したものを対照区として用いた。

#### f. 抗変異原試験の方法

試験方法は TA98 菌原液 0.1 ml, 各試験液または対照区として  $\text{Me}_2\text{SO}$  0.1 ml, Trp-P-2 0.1 ml, S-9 mix 500  $\mu\text{l}$  を  $50^\circ\text{C}$  に保温したソフトアガー 3 ml 中に加えて速やかに攪拌後、MBB 寒天平板培地上に重層した。突然変異抑制率 (%) は  $37^\circ\text{C}$ , 3 日間培養後に復帰変異したヒスチジン非要求性株 ( $\text{His}^+$ ) のコロニー数を肉眼でカウントし、次式によって求めた。

$$\text{突然変異抑制率 (\%)} = \frac{C - S}{C} \times 100$$

C : 対照区のコロニー数

S : 試料区のコロニー数

また、同時に TA98 菌原液を PB で  $10^5$  に段階希釈した液 0.1 ml および各試料溶液 0.1 ml を  $50^\circ\text{C}$  に保温したソフトアガー 3 ml 中に加え上述方法で培養した。供試菌に対する試料の生育抑制は培養後、プレート上に生じた供試菌のコロニー数 (生菌数) を肉眼でカウントして求めた。なお、対照区には試料溶液の代わりに同様に滅菌処理した  $\text{Me}_2\text{SO}$  を用いた。

### III. 結果および考察

本実験の結果から、anthraquinone には強い抗変

Table 1. Effects of anthraquinone and its derivatives on frameshift mutation caused by 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3b]indole in *Salmonella typhimurium* TA98

Chemicals used	Numbers of $\text{His}^+$ revertants/plate	Antimutagenic activity (%)	Numbers of surviving cells/plate
$\text{Me}_2\text{SO}$	1708	0	260
Anthraquinone	987	42.2	242
1-Hydroxyanthraquinone	232	86.4	246
2,6-Dihydroxyanthraquinone (anthraflavic acid)	249	85.4	207
2-Hydroxymethylanthraquinone	252	85.2	238
1,8-Dihydroxy-3-methylanthraquinone (chrysophanol)	326	80.9	249
1,8-Dihydroxy-3-carboxyanthraquinone (rhein)	79	95.4	263
1,8-Dihydroxy-3-hydroxymethylanthraquinone (aloe-emodin)	153	91.0	289
1,6,8-Trihydroxy-3-methylanthraquinone (emodin)	132	92.3	233
1,2-Dihydroxymethylanthraquinone (alizarin)	103	94.0	256
1,4-Dihydroxyanthraquinone (quinizarin)	133	92.2	246
1,5-Dihydroxyanthraquinone (anthrarufin)	239	86.0	258
1,8-Dihydroxyanthraquinone (chrysazin)	121	92.9	273
1,2,4-Trihydroxyanthraquinone (purpurin)	64	96.3	128
1,2,5,8-Tetrahydroxyanthraquinone (quinalizarin)	58	96.6	214

Chemicals were used at the dose of  $10^{-3}$  mol/plate.

The numbers of revertants and of surviving cells are means of three plates.

異原性は認められなかった。しかし、調査した他のアントラキノン類には $10^{-3}$  M/plate で80%以上の強い抗変異原性 (抑制) を示した。このことからアントラキノン類に認められた強い抑制はアントラキノン骨格に由来するものではなく、芳香環上に結合したそれぞれの置換基の効果、例えば変異原の不活化、酵素の阻害などによるものと考えられる。置換基の種類およびその数の相違による抑制の差は今回の結果からは明らかでないが、より詳細な濃度レベルにおける比較実験を行うことによって明らかにすることが可能であると考えられる。また、今回調査したアントラキノン類の大半が芳香環上に水酸基を有していることから、抑制の発現にそれがどの様に係わっているかを検討する必要がある。

生薬類について抗変異原試験を行った結果、2.0 mg/plate においていずれの抽出物も80%以上の抑制を示した。このことは Table 1 の結果と合わせて考えると、これら生薬に含まれるアントラキノン類

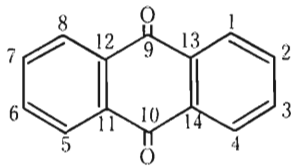


Fig. 1 Structure of anthraquinone

の効果による可能性が大きい。また、これら生薬中には今回試験をした代表的なアントラキノン類のみならず多種多様の置換基を持つアントラキノン類が微量成分として含まれており、それら成分の抗変異原活性についても興味深いものがある。

#### IV. 要 約

筆者らはアロエ植物の抗変異原性を検討し、その活性成分がアントラキノン一種で寫下活性成分としてよく知られている非糖体 aloe-emodin であって、その配糖体の barbaloin には全く活性が認められないことを前報<sup>9)</sup>で述べた。そこで本研究では、非糖体アントラキノン類の抗変異原活性をより明らかにするため aloe-emodin 関連のアントラキノン類の抗変異原活性を Ames 法変法によって調べた。その結果、芳香環上に置換基を持たない anthraquinone を除き、供試した他のすべてのアントラキノン類に aloe-emodin と同様の非常に強い抗変異原性が認められた。これら強い活性を示したアントラキノン類の大半のものは芳香環上に水酸基を有していることから、活性発現にそれがどの様に係わっているかをさらに詳しく調べる必要がある。また、今回強い抗変異原性の認められたアントラキノン類のいくつかを含むことが知られている5種類の生薬を用いその抗変異原活性を検討した。その結果、いずれも非常に強い抗変異原性を示した。これら生薬

Table 2. Effects of medicinal plants on frameshift mutation caused by 3-amino-1-methyl-5H-pyrido [4,3-b] indole in *Salmonella typhimurium* TA98

Sample	Amount (mg/plate)	Numbers of His <sup>+</sup> revertants/plate	Antimutagenic activity (%)	Numbers of surviving cells/plate
Me <sub>2</sub> SO	0	1919	0	172
Kashū	3.0	81	95.8	174
	2.0	118	93.9	187
Daiō	3.0	62	96.8	217
	2.0	68	96.5	203
Senna	3.0	123	93.6	163
	2.0	265	86.2	193
Ketsumeishi	3.0	69	96.4	178
	2.0	71	96.3	142
Habusō	3.0	197	89.7	170
	2.0	204	89.4	170

The numbers of revertants and of surviving cells are means of three plates.

には本実験で供試したアントラキノン類以外にも多種多様なアントラキノン類が微量成分として含まれているので、それらの活性についても検討する必要がある。

#### 引用文献

- 1) H. OHHIGASHI: 農化誌, 67, 23 (1993)
- 2) H. HASHIMOTO and Y. SUZUKI: 衛生化学, 26, 275-285 (1980)
- 3) K. SHIMOJ and I. TOMITA: *ibid.*, 37, 149-178 (1991)
- 4) R. KATO, T. NAKADATE, S. YAMAMOTO and T. SUGIMURA: *Carcinogenesis*, 4, 1301-1305 (1983)
- 5) K. YASUKAWA, M. TAKIDO, M. TAKEUCHI and S. NAKAGAWA: 薬学雑誌, 108, 794-796 (1988)
- 6) K. MORITA, M. HARA and T. KADA: *Agric. Biol. Chem.*, 42, 1235-1238 (1978)
- 7) C.M. STEELE, M. LALIES and C. LOANNIDES: *Cancer Res.*, 45, 3573-3577 (1985)
- 8) H. NISHINO, K. KITAGAWA, H. FUJIKI and A. IWASHIMA: *Oncology*, 43, 131-134 (1986)
- 9) T. NAKASUGI and K. KOMAI: 本誌, 27, 47-54 (1994)