

## タイ国産食用植物の発癌抑制活性とその活性物質

村上 明<sup>1</sup>, 中村宜督<sup>2</sup>, 大東 肇<sup>2</sup>, 小清水弘一<sup>1</sup>

## 要 旨

現在、癌の化学予防は癌撲滅のための一つの有力な手段と考えられている。なかでも、多段階発癌におけるプロモーション過程の抑制は特に有効である。なぜなら、プロモーションは、多段階にわたる発癌過程において、唯一、可逆性を示す過程であり、しかもその成立に長い期間を要することが動物実験の結果から示唆されているからである。このような背景から、タイ国産食用植物112種(122試料)を無作為に選び、発癌プロモーション抑制活性の短期検定法である、Epstein-Barr virus (EBV) 活性化抑制活性をスクリーニングした。プロモーターとして12-O-hexadecanoylphorbol-13-acetate (HPA) を用い、細胞は Raji (ヒトBリンパ芽球様細胞) を使用した。試験の結果、全体の60%の試料が200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で30%以上の抑制活性を示した。この抑制活性の発現割合は、以前に行った和産食用植物の試験で得られた割合(26%)を有意に上回るものであった。次いで、8種のタイ国産食用植物から10種の活性化合物を見出した。なかでも、コブミカン (*Citrus hystrix*、ミカン科) から単離した1, 2, -O-di- $\alpha$ -linolenoyl-3-O- $\beta$ -galactopyranosyl-sn-glycerol (DLGG) とナンキョウ (*Languas galanga*、ショウガ科) から得られた1'-acetoxychavicol acetate (ACA) のEBV 活性化抑制活性は特に高いものであった。7, 12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) と12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) を用いたマウス皮膚発癌2段階実験では、DLGGはTPAの10倍の塗布量で腫瘍の発生数を50%抑制し、ACAはTPAと同じ塗布量でも有効(抑制率44%)であった。DLGGの重要な作用機構は、プロスタグランジン類生成系の抑制作用であり、ACAのそれは、白血球による過剰な活性酸素の産生の対する抑制作用であると推察された。タイ国産食用植物が示す高い発癌抑制作用、活性物質、その作用機構を中心に述べた。

## 序 論

1981年以来、癌は日本における死亡原因の第1位である。近年の発生部位別の傾向をみると、胃がんは米国と同様に減少傾向にあり、肺、膵臓、大腸がんの発生は着実に増加してい

1. 近畿大学生物理工学部生物工学科  
2. 京都大学農学部食品工学科

る<sup>1, 2)</sup>。前者の傾向は、食料保存技術の進歩による塩蔵食品摂取の低下が原因であり、後者は、日本人の食スタイルの欧米化（高脂肪、高カロリー食）によるものと考えられている。癌は加齢に従ってその発生が増加する疾病であるため、高い医療技術を有し、寿命の長い国では、癌の発生をどのようにコントロールするかについての大きな関心が寄せられている。癌を含めたすべての疾病に関して、その予防は治療より有効である。Sporn によって1976年に定義された「Cancer chemoprevention (癌の化学予防)」<sup>3)</sup>という概念は、天然あるいは合成物質を積極的に摂取することにより、まず癌にならない、癌の発生を遅らせる、というものである。実際に、莫大な数の疫学調査によって、食品と発癌との明確な相関が示されてきている<sup>4)</sup>。例えば、喫煙は肺がんの発生率を高める一方で、緑黄色野菜の摂取が、いくつかの癌の発生を抑制することは有名である。疫学研究と並行して、動物実験でも、多くの天然あるいは合成化合物がモデル発癌を抑制することが知られている<sup>5-7)</sup>。

可逆的であり、また長期間にわたるプロモーション過程では、プロモーターはDNA変異を受けたイニシエート細胞のクローナルな増殖を促進する。すなわち、プロモーターはこの潜在的腫瘍細胞を良性腫瘍細胞へと導く<sup>8)</sup>。この間、様々な生物化学的応答が誘起される。発癌プロモーションに関する研究は、1967年に Hecker らがクロトン油から TPA を単離したことに端を発する<sup>9)</sup>。TPA の興味深い生物学的活性の中に、EB ウイルス (EBV) の活性化が挙げられる。EBV は、ヘルペスウイルスの1種で、アフリカのバーキットリンパ腫や中国の上咽頭癌の原因であることが知られている。

我々はこれまでに、混合物中から効果的に発癌プロモーション抑制物質を検索するために、EBV活性化抑制試験を導入してきた<sup>10)</sup>。特に熱帯産薬用植物に含まれるポリフェノール類は本試験系で高い活性を有し、その後動物試験でも発癌抑制活性を示すことを報告した<sup>11-15)</sup>。次いで、食による発癌予防の重要性から、和産野菜類や海草類のスクリーニングも行った<sup>16, 17)</sup>。さらに、アオジソからは ursolic acid、ゴボウからは mokko lactone を単離し、動物試験で発癌抑制活性があることを証明した<sup>18)</sup>。

これまでに、多くの研究者によって、一般的な食素材から数え切れないほどの発癌抑制物質が単離されてきたが、特殊な食素材に対しては、あまり検索例がない。近年我々は、薬味や香り付けに用いられているタイ国産食用植物を強力な発癌プロモーション抑制物質の検索対象と捉えている<sup>19)</sup>。それらが、栄養的要素ではなく、ときとして薬用の目的で伝承的に利用されてきた事実は、有効な生理活性物質が含まれている可能性を示唆する。

本稿では、1) タイ国産食用植物の EBV 活性化抑制活性、2) *in vitro* および *in vivo*

の活性物質、3) これまでに検討したそれらの作用機構、について論述した。

## 実験材料および方法

### 試薬

EBV 活性化抑制試験のための HPA は既報の方法で *Sapium sebiferum* から単離した<sup>20)</sup>。TPA は Research Biochemicals International から購入した。NPC 患者由来の抗 EBV 血清は、大里博士（現・北海道医療大）より供与して頂いた。FITC 標識抗ヒト IgG は Dako より、Determiner LPO は Kyowa Medics より、RPMI1640 と牛胎児血清は Gibco RBL より、phytochrome *c* と ethyl linoleate は Sigma より、その他の試薬は Wako Pure Chemical Industries から購入した。

### 動物と細胞

ICR マウス雌（7 週齢）は Japan SLC より購入した。Raji 細胞と HL-60 細胞は、それぞれ、大里博士（現・北海道医療大）および佐々木博士（京都大学農学部）より供与して頂いた。

### EBV 活性化抑制スクリーニング

43 植物科から構成される総計 112 種（122 試料）の食用植物は 1993 年にタイ国のバンコクあるいはチェンマイの市場にて購入した。試料は、小さく刻み、室温でメタノール抽出した。抽出物は減圧濃縮した後に、最終濃度  $200 \mu\text{g}/\text{mL}$  になるように DMSO 溶解した。対数増殖期の Raji 細胞を、 $5 \times 10^5 \text{ cells}/\text{mL}$  となるように調製し、その 1 mL の懸濁液に、HPA ( $40 \text{ ng}/\text{mL}$ )、n-butyric acid ( $88 \mu\text{g}/\text{mL}$ )、さらに試料を加え、 $37^\circ\text{C}$  で 48 時間培養した。トリパンブルー色素排除法で細胞生存率を算出したのち、塗沫標本を作製した。次いで、NPC 患者血清、FITC 標識抗ヒト IgG で EBV-early antigen (EA) を標識したのち、蛍光顕微鏡で EA 産生細胞数を計数した。抽出物の EBV 活性化抑制活性は次の 4 段階に分けて評価した。+++：（高活性、抑制率  $\geq 70\%$ ）、++：（中活性、 $70\% >$  抑制率  $\geq 50\%$ ）、+：（低活性、 $50\% >$  抑制率  $\geq 30\%$ ）、-：（無活性、 $30\% >$  抑制率）。

### マウス皮膚発癌プロモーション抑制試験

1 つの飼育ケージに 5 匹ずつ、1 群 15 匹のマウスを用いた。7 週齢時に、背部の毛をバリ

カンで剃り、DMBA (0.19  $\mu$ mol/0.2mLアセトン溶液) を塗布した。1週間放置後、TPA (1.6nmol/0.2mLアセトン溶液) を塗布し、この操作を週に2回行った。この間、被検物質は毎回のTPA塗布の40分前に行った。試料の塗布量を以下に示した。DLGG (1.6, 16, あるいは160nmol) :  $\alpha$ -linolenic acid (16, あるいは160nmol) : ACA (1.6, あるいは160nmol)。発癌プロモーション抑制活性は、マウス1匹あたりの平均発生腫瘍数と腫瘍の発生率で行った。統計処理は、前者では Student *t*-test、後者では  $\chi^2$ -testを用いた。

#### マウス耳炎症抑制試験

8週齢のICRマウス雌5匹を一群とした。片側の耳に被検物質 (810nmol/20  $\mu$ L 15%メタノール・クロロフォルム溶液)、もう一方に15%メタノール・クロロフォルム溶液のみを加えた。20分後、両側の耳にTPA (8.1nmol/20  $\mu$ L 15%メタノール・クロロフォルム溶液) を加え、6時間放置した。両側の耳から直径6mmのdiskを打ち抜き、双方の耳重量を測定することにより抗炎症活性を算出した。

$$\text{抑制率 (\%)} = [(TPA \text{ のみ}) - (\text{被検物質} + TPA)] / [(TPA) - (\text{溶媒のみ})] \times 100$$

#### 分化HL-60細胞における $O_2^-$ 産生抑制試験

HL-60細胞は、10% FBSを加えたRPMI1640培地中で培養し、1.25%のDMSOを加えた後に4日間培養し、顆粒球様細胞に分化させた。PBSで洗浄後、密度を1  $\times 10^6$  cells/mLに調製し、被検物質を加え、37°Cで15分間加温した。5  $\mu$ LのTPA (20  $\mu$ M)を加えた90秒後に50  $\mu$ Lのcytochrome *c* 溶液 (20mg/mL) を加えさらに15分間加温した。反応は、5  $\mu$ LのSOD溶液 (15,000units/mL) を加えることによって停止した。反応生成物は2000gで30秒間遠心し、上清の560nmの吸光度を測定し、次式により $O_2^-$ 産生量を測定した。

$$O_2^- \text{ (nmol/mL)} = 47.7 \times A_{560 \text{ nm}}$$

統計処理は、Student *t*-testを用いた。

#### xanthine/xanthine oxidase (XA/XOD) 系における阻害活性

XOD阻害活性は、市販の実験キットSOD Test Wakoを用いて行った。本試験系では、 $O_2^-$ はNBT還元法で検出され、XOD阻害作用と $O_2^-$ 消去作用の双方が阻害活性に寄与する。それぞれの試験法を以下に記す。

### 1) NBT 還元阻害試験

500  $\mu$ L の XOD 溶液 (0.049units/mL) と 500  $\mu$ L の NBT 溶液 (0.24mM)、XA (0.4 mM) を混合し、50  $\mu$ L の ACA 溶液を加え、37°C で 20 分加温した。反応は、SDS 溶液の添加により停止させた。560nm の吸光度を測定し、NBT 還元阻害率を求めた。

### 2) XOD 阻害率

反応は同様にいき、反応停止は沸騰水に 5 分間浸漬することによって行った。2,000g で 5 分間の遠心を行い、上清を以下の HPLC 分析に供することにより、XA と尿酸の量を測定した。

カラム :  $\mu$ Bondasphere C<sub>18</sub>、移動層 : 1 % acetonitrile / リン酸 buffer (20mM, pH 4.5)、検出波長 : 290nm、流速 : 1.0mL/min

この条件で、XA と尿酸はそれぞれ、保持時間 3.9 および 5.7 分に検出される。

O<sub>2</sub><sup>-</sup> 除去活性 (SOS 活性) は、以下の式で得られる。

SOS 活性 (%) = NBT 還元阻害活性 (%) - XOD 阻害活性 (%)

### リノール酸エチルの自動酸化抑制試験

被検物質 (DMSO 溶液) は KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH buffer (50mM, pH7.0) に溶解し、リノール酸エチルは 5.8mM の濃度で添加した。37°C の暗所で放置し、hydroperoxide (LOOH) と malondialdehyde (MDA) を以下の方法で検出した。

#### 1) LOOH

実験キット Determiner LPO を使用した。24 時間加温後の被検液 50  $\mu$ L を取り、0.5mL の 5 % KI 溶液か PBS を加えた。その後暗所で、50°C で 20 分加熱した。放冷後、10-*N*-methylcarbamoyl-3,7-dimethylamino-10H-phenothiazine (40  $\mu$ M) と hemoglobin (64.5mg/mL) を含んだ溶液 1 mL を加えた。30°C で 10 分間放置後、675nm の吸光度を測定することにより LOOH 生成量を算定した。統計処理は、Student *t*-test を用いた。

2) 1 週間ごの反応液 100  $\mu$ L を、10% Tween 20、75  $\mu$ L の 13% KI、25  $\mu$ L の 13% BHA、15  $\mu$ L の EDTA (0.2M)、および 675  $\mu$ L の 50  $\mu$ M の酢酸 buffer (pH3.5) の混合溶液に添加した。その後、750  $\mu$ L の 0.67% TBA 溶液を加え 80°C で 1 時間加熱した。水冷後、1,000g で 10 分間遠心して、その上清の 532nm における吸光度を測定した。統計処理は、Student *t*-test を用いた。

## 分化 HL-60細胞における LOOH 生成抑制試験

HL-60細胞を、 $O_2^-$ 産生抑制試験と同様の方法で分化させ、 $1 \times 10^6$  cells/mL に調製した。5  $\mu$ L の 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) 溶液 (200  $\mu$ M) を細胞懸濁液に加え、37°C で15分加温した。被検物質を加えたのち、10  $\mu$ L の TPA 溶液 (10  $\mu$ M) を加え、15分後、50  $\mu$ L の EDTA (800  $\mu$ M) を加えることにより反応を停止した。PBS で洗浄後、flow cytometer (JASCO, CytoAce 150) を用いることにより蛍光標識細胞を検出した。

## 結果と考察

### タイ国産食用植物の EBV 活性化抑制活性スクリーニング

43植物科から構成される総計112種 (122試料) の食用植物を室温でメタノール抽出した。抽出物は減圧濃縮した後に、最終濃度200  $\mu$ g/mL になるように DMSO 溶解した。抽出物の EBV 活性化抑制活性は次の4段階に分けて評価した。+++ : (高活性、抑制率 $\geq$ 70%)、++ : (中活性、70% $>$ 抑制率 $\geq$ 50%)、+ : (低活性、50% $>$ 抑制率 $\geq$ 30%)、- : (無活性、30% $>$ 抑制率)。結果を表1に示した。これらのうち、9種は以前に我々が行ったタイ国産薬用植物のスクリーニング試験で取りあげた種と重複している<sup>2)</sup>。39種は高活性、34種は中あるいは弱活性と評価された。有為な抑制活性を示した種の割合は、和産での試験のそれを上回った (図1)。この結果は、タイ国産食用植物が、発癌抑制物質の検索対象として、和産のそれと比して有用であることを示唆している。

以前のタイ国産薬用植物のスクリーニング試験<sup>2)</sup>では、ミカン科とショウガ科植物に高い活性が検出されたが、今回、それらに加え、シソ科 (4種中、++が1種、+++が3種) とコショウ科 (3種中3種とも++) に顕著な活性が認められた。

表1に示されている植物は、世界で広く食されている種も含まれている。これらの種を次の2つに分類して活性を比較した。(A) 日本でも得られる、あるいは栽培されている種、(B) タイ国、あるいは他の東南アジアに独特な種。(A) および (B) のグループに分類された数はそれぞれ、34および88であった。また、30%以上の有為な抑制活性を示す種の割合が、(B) では69%であったのに対し、(A) では35%であった。この結果は、東南アジアに特徴的な植物種に活性が高頻度で検出できることを示している。さらに興味深いことに、(A) のグループで高活性を示した種は、シヨングク、ニガウリ、バジル、コショウ、セロリ、ショウガなど、香味、あるいは薬味として利用される類の種であった。以上を総括する

と、独特な味や香り、あるいは薬用利用といった性質を示す種に着目して、発癌予防物質を検索するという我々の戦略が有効であると推察された。

今回の研究で試験した20種は、以前の和産の試験でも取り上げていた<sup>16)</sup>。試験条件は全く同じであったが、そのうち9種の活性は、タイ国産と和産では異なっていた。この原因の一つとして考えられるのは、品種の問題である。あるいは、収穫時期や、保存、あるいは温度、湿度、日照、肥料などの栽培条件が指摘できる。このことに関連して、追熟したショウガが100%近い抑制率を示すのに対し、未熟なそれは50%の活性しか示さない。このような傾向はピンロウジュにも見られ、新鮮な試料では全く活性を有さないが、乾燥したものは62%の抑制活性を示す。以上の結果は、植物内の2次代謝産物の量や内容が環境要因によって左右されることを示唆している。従って、より高い発癌予防効果を示す野菜類の創製には、活性物質の含有量や質的変動を念頭においた品種改良が必要であろう。

### in vitro 活性物質

これまでに、8種のタイ国産食用植物から10種のEBV活性化抑制物質を単離した。これらが示すIC<sub>50</sub>値は、 $\alpha$ -linolenic acid ( $\alpha$ -LA, C<sub>50</sub>=27  $\mu$ M)、 $\beta$ -carotene (IC<sub>50</sub>=30  $\mu$ M)、(-)-epigallocatechin gallate (IC<sub>50</sub>=68  $\mu$ M)などの代表的発癌抑制物質よりもかなり低いものであった(表2)。特にDLGG (IC<sub>50</sub>=0.63  $\mu$ M)とACA (IC<sub>50</sub>=1.3  $\mu$ M)は、*in vivo*でも有効な発癌抑制活性を示すことが期待された。

### DLGGのマウス皮膚発癌プロモーション抑制活性

上記試験では、活性比較のため $\alpha$ -LAも用いた。 $\alpha$ -LAはDLGGの部分構造である $\alpha$ -linolenoyl基に類似している。発癌プロモーション抑制活性の評価は、マウス1匹あたりの平均発生腫瘍数と腫瘍の発生率で行った。表3に示したように、160nmolのDLGGを塗布した群では、20週後の腫瘍発生率(抑制率39%)と腫瘍数(抑制率67%)の双方に関して発癌抑制効果があった。16nmolの塗布量でもDLGGには、腫瘍数に関して抑制効果が見られた(抑制率50%)。同じ塗布量では、 $\alpha$ -LAは全く無効であった。

### 想定されるDLGGの作用機構

#### 1) 抗炎症活性

発癌プロモーションは炎症過程と密接に関連する<sup>25)</sup>ことから、DLGGと類縁体LPGGの

表1 タイ国産食用植物のEBV活性化抑制活性

植物科名 学名	試験部位	抑制活性
Acenthaceae		
<i>Asystasiella nusiata</i>	葉	-
Agaricaceae		
<i>Lentinus praegridus</i> Berk	全体	-
<i>Pleurotus sajor-caju</i> (Fr.) Singer	全体	-
Alizoaceae		
<i>Glinus oppositifolius</i>	葉	+++
Amaranthaceae		
<i>Amaranthus gracilis</i> Desf.	葉	+++
Anacardiaceae		
<i>Mangifera foetida</i> Lour.	葉	+++
<i>Spondias pinnata</i> Kurz	果実	-
Araceae		
<i>Colocasia esculenta</i> Schotta	葉柄	-
<i>Lasia spinosa</i> Thw.	花	-
Asclepiadaceae		
<i>Atherolepis pierrei</i> Cost. var. <i>Glabra</i> kerr	果実	+
Basellaceae		
<i>Basella rubra</i> L.	花 葉	- -
Bignoniaceae		
<i>Oroxylum indicum</i> Vent.	若鞘	+++
Bromeliaceae		
<i>Ananas comosus</i> c L. <sup>a</sup>	果実	-
Caricaceae		
<i>Carica papaya</i> L. <sup>a</sup>	果実	-
Compositae		
<i>Artemisia lactiflora</i> var. <i>gennina</i>	葉	+++
<i>Chrysanthemum coronarium</i> L. <sup>a</sup>	葉	+++



表1 (続き)

<i>Lactuca sativa</i> L. <sup>a</sup>	葉	-
<i>Pluchea eupatorioides</i>	葉	++
	花	+++
Convolvulaceae		
<i>Ipomea purpurea</i> L.	葉、茎	+
Cruciferae		
<i>Brassica oleracea</i> L.		
var. capitataa (緑)	葉	-
var. capitataa (紫)	葉	-
var. capitataa	葉	+++
<i>Raphanus sativus</i> L. <sup>a</sup>	根	++
	芽	-
Cucurbitaceae		
<i>Benincasa hispida</i> Thunb. <sup>a</sup>	果実	-
<i>Citrullus lanatus</i> Thunb. <sup>a</sup>	果実	-
<i>Coccinia indica</i>	果実	-
<i>Cucurbita maxima</i>		
Duch. ex. Lam	葉	++
<i>Luffa acutangula</i> L.	果実	+
<i>Secium edule</i> SW.	果実	+
<i>Tricisanthus anguina</i> L. <sup>b</sup>	果実	-
<i>Momordica charantia</i> L. <sup>a</sup>	葉	+++
	果実	+
	果実	-
Gnetaceae		
<i>Gnetum gnemon</i> L.	葉	+++
Gramineae		
<i>Cymbopogon citratus</i> Stapt. <sup>b</sup>	葉	+++
<i>Zea mays</i> L. <sup>a</sup>	果実 (加熱後)	-
	果実	-
Guttiferae		
<i>Garcinia atroviridis</i>	乾燥果実	+
<i>Garcinia cowa</i> Roxb.	葉	+++
<i>Garcinia schamburgkiana</i>	果実	+
Labiatae		
<i>Mentha cordifolia</i>	葉	++

表1 (続き)

<i>Ocimum basilicum</i> L. <sup>a,b</sup>	葉	+++
<i>Ocimum canum</i> Sims	葉	+++
<i>Ocimum gratissimum</i> L.	葉	+++
Lauraceae		
<i>Persea americana</i> Mill. <sup>a</sup>	果実	-
Leguminosae		
<i>Cassia siamiae</i> Lam.	花	++
	葉	+
<i>Leucaena leucocephala</i> De wit	果実	+
<i>Parkia speciosa</i> Hassk.	種子	-
<i>Phaseolus vulgaris</i> SL. <sup>a</sup>	種子	-
<i>Pisum sativum</i> L. <sup>a</sup>	種子	+++
<i>Pithecellobium dulce</i> Benth	果実	+
<i>Pithecellobium jiringa</i>	種子	-
<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	果実	-
	DC.	
<i>Rhynchosia bracteata</i> Lour.	鞘	-
<i>Tamarindus indica</i> L.	未熟果実	+
	完熟果実	+
	葉	-
<i>Sesbania grandiflora</i> Desv.	葉	+++
	花	++
<i>Sesbania javanica</i>	花	-
Liliaceae		
<i>Allium ampeloprasum</i> L.	蕾	+
<i>Allium ascalonicum</i> L. <sup>a</sup>	蕾	-
<i>Allium cepa</i> L. <sup>a</sup>	蕾	-
<i>Allium porrum</i> L. <sup>a</sup>	葉	-
<i>Allium tuberosum</i> Rottl.	茎、花	-
	ex Spreng	
<i>Asparagus officinalis</i> L. <sup>a</sup>	茎	-
Malvaceae		
<i>Abelmoschus esculentus</i>	果実	+
	Moench <sup>a</sup>	
<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	花	-

表 1 (続き)

Marsileaceae		
<i>Marsilea crenata</i> Presl	葉	+++
Melastomataceae		
<i>Diplectria barbata</i>	花	+++
Meliaceae		
<i>Aglaia odorata</i> Lour. <sup>c</sup>	葉	+++
<i>Azadirachta indica</i> Juss.	花	
	新鮮	++
	加熱後	+++
Moraceae		
<i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.	果実	-
<i>Ficus lacor</i> Buch.	葉	+
<i>Musa</i> sp.	茎	++
Nelumbonaceae		
<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn.	果実	-
Nymphaeaceae		
<i>Nymphaea lotus</i> L. var. <i>pubescens</i> hook. f. & th.	茎	-
Palmae		
<i>Areca catechu</i> L.	新鮮種子	-
	乾燥種子	++
Pandanaaceae		
<i>Pandanus odoratus</i> Ridl.	葉	+
Piperaceae		
<i>Piper nigrum</i> L. <sup>a</sup>	果実	+++
<i>Piper sarmentosum</i> Roxb.	葉	+++
<i>Piper betel</i> L.	葉	+++
Pleutotaceae		
<i>Lentinus edodes</i>	全体	-
Polygonaceae		
<i>Polygonum odoratum</i> Lour.	葉	+++
Rubiaceae		
<i>Morinda citrifolia</i>	葉	+++
Rutaceae		
<i>Citrus hystrix</i> D.C.	葉	+++

表1 (続き)

	種子	-
	皮	+++
<i>Zanthoxylum limonella</i>	乾燥種子	+++
Saruraceae		
<i>Houttuynia cordata</i> Thunb.	葉	+++
Scrophulariaceae		
<i>Limnophila aromatica</i> Merrill	葉	+++
Solanaceae		
<i>Capsicum annuum</i> L. <sup>a,b</sup> (緑)	果実	-
<i>Capsicum annuum</i> L. <sup>a</sup> (赤)	果実	-
<i>Capsicum grossum</i> Sendt. <sup>a</sup>	果実	++
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. <sup>a</sup>	果実	+
<i>Solanum melongena</i> L.	果実	+
<i>Solanum</i> sp. (purple, large)	果実	+
<i>Solanum</i> sp. (purple, slender)	果実	+
<i>Solanum stramonifolium</i>	果実	+
<i>Solanum torvum</i> Sw.	果実	+
<i>Solanum trilobatum</i> L.	果実	-
<i>Solanum tuberosum</i> L. <sup>a</sup>	根	-
Trapaceae		
<i>Trapa bicornus</i> Osbeck	種子	-
Umbelliferae		
<i>Apium graveolens</i> var. Dulce Pers.L. <sup>a</sup>	葉	+++
<i>Centella asiatica</i> Urban	葉	+++
<i>Coriandrum sativum</i> L.	葉	+++
<i>Coriamdrum</i> sp.	葉	++
<i>Daucus carota</i> L. <sup>a</sup>	根	-
<i>Daucus carota</i> L. <sup>a</sup>	根	-
<i>Erygium foetidum</i> L.	葉	+++
<i>Trachyspermum</i> roxburghianum Craib	葉	+++
Zingiberaceae		
<i>Boesenbergia pandurata</i> Holttt <sup>b</sup>	根	+++

表1 (続き)

<i>Languas galanga</i> Swartz <sup>b</sup>	根茎	+++
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe <sup>a</sup>	根茎 (未熟)	++
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe <sup>a</sup>	根茎 (完熟)	+++

<sup>a</sup>日本でも栽培、あるいは入手できる種。

<sup>b</sup>文献<sup>21)</sup> 参照。

<sup>c</sup>伝承薬として利用される。

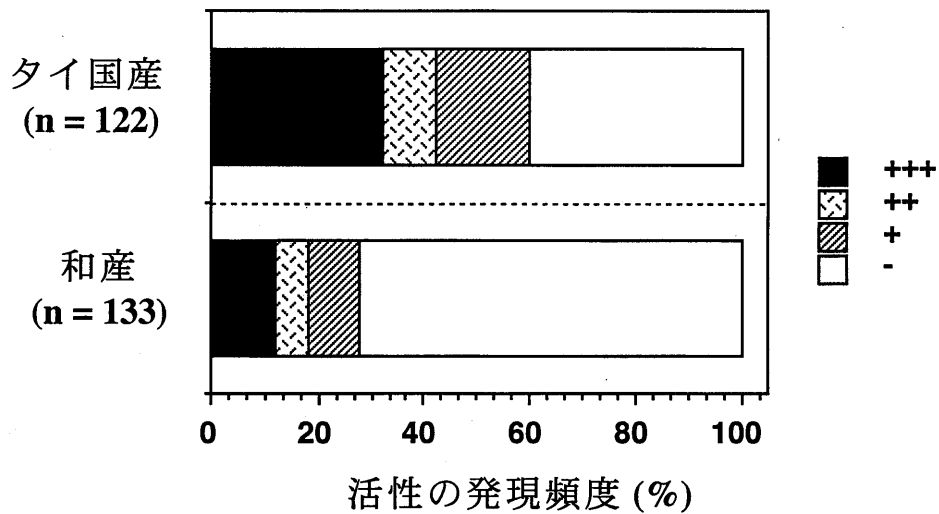


図1 和産およびタイ国産食用植物抽出物のEBV活性化抑制活性  
200  $\mu$ g/ml における抑制活性を次の4種に分類した。

+++ : (抑制活性) IE  $\geq$  70%

++ : 70% > IE  $\geq$  50%

+ : 50% > IE  $\geq$  30

- : 30% > IE

表2 タイ国産野菜類から単離した EBV 活性化抑制物質

化合物名	起源植物 (部位)	IC50値 (μM)
ACA <sup>a</sup>	<i>Languas galanga</i> (根茎)	1.3
DLGG <sup>b</sup>	<i>Citrus hystrix</i> (葉)	0.63
LPGG <sup>c</sup>	<i>Citrus hystrix</i> (葉)	0.43
pheophorbide a	<i>Neptunia oleraceae</i> (葉)	3.3
geranial	<i>Cymbopogon citratus</i> (葉)	16
neral	<i>Cymbopogon citratus</i> (葉)	130
curcumin	<i>Zingiber cassumunar</i> (根茎)	5.4
cardamonin	<i>Boesenbergia pandurata</i> (根茎)	3.1
niaziminin	<i>Moringa oleifera</i> (葉)	1.3
ursolic acid	<i>Morinda citrifolia</i> (葉)	20

<sup>a</sup> 1'-Acetoxychavicol acetate.

<sup>b</sup> 1,2-di-O-α-linolenoyl-3-O-β-galactopyranosyl-sn-glycerol.

<sup>c</sup> 1-O-α-linolenoyl-2-O-palmitoyl-3-O-β-galactopyranosyl-sn-glycerol と 1-O-palmitoyl-2-α-linolenoyl-3-O-β-galactopyranosyl-sn-glycerol の 1 : 1 の混合物。

表3 DLGG と ACA のマウス皮膚発癌プロモーション抑制作用<sup>d</sup>

化合物 (用量, nmol)	腫瘍発生率	腫瘍数/匹
	% inhibition (P-value)	% inhibition (P-value)
DLGG <sup>b</sup> (160)	39 (<0.005)	67 (<0.001)
DLGG <sup>b</sup> (16)	15 (<0.1)	50 (<0.01)
DLGG <sup>b</sup> (1.6)	15 (<0.1)	0 (NS <sup>e</sup> )
α-linolenic acid (160)	48 (<0.005)	56 (<0.002)
α-linolenic acid (16)	7 (NS <sup>e</sup> )	0 (NS <sup>e</sup> )
ACA <sup>d</sup> (160)	42 (<0.005)	90 (<0.001)
ACA <sup>d</sup> (1.6)	22 (NS <sup>e</sup> )	44 (<0.05)

<sup>a</sup> 統計処理は、χ<sup>2</sup>-test (腫瘍発生率) と Student *t*-test (腫瘍発生数) により行った。

<sup>b</sup> 1,2-di-O-α-linolenoyl-3-O-β-galactopyranosyl-sn-glycerol.

<sup>c</sup> 統計学的に有意差なし。

<sup>d</sup> 1'-Acetoxychavicol acetate.

マウス耳炎症抑制活性を検討した。図2に示した様に、DLGGとLPGGは既知の抗炎症剤であるindomethacinよりも高い炎症抑制活性を示した。

## 2) phospholipase A2 (PLA2) 阻害活性

発癌プロモーターによる炎症作用の発現は、細胞膜からのアラキドン酸の遊離により開始され、この現象はPLA2によって触媒される。アラキドン酸から生成するプロスタグランジン類やロイコトリエン類は、chemical mediatorとして白血球の集積などを促す。炎症部位に蓄積した白血球は、TPAの投与により $O_2^-$ を過剰に産生し、周辺組織の損傷やDNAの変異を誘起する。DLGGとLPGGの*Crotalus atrox* Venom由来のPLA2阻害活性を検討したところ、100  $\mu$ Mの濃度でそれぞれ、32%、44%の阻害率を示した。

## 3) 分化HL-60細胞における $O_2^-$ 産生抑制活性

炎症部位に集積したマクロファージ、好中球、顆粒球などの白血球はNADPH oxidaseの活性化により $O_2^-$ を産生する<sup>26)</sup>。HL-60細胞はDMSO処理により顆粒球様細胞に分化し、 $O_2^-$ 産生能を獲得する。 $O_2^-$ 産生量は、cytochrome c還元法により測定した。図4に示した様に、DLGGは10  $\mu$ Mの濃度で $O_2^-$ の産生を37%抑制し、 $IC_{50}$ 値は18  $\mu$ Mと算定された。この $O_2^-$ 産生抑制能は、ダイズ由来のgenisteinの活性を( $IC_{50}=100 \mu$ M)はるかに上回るものであった。

## 4) DLGGの作用機構に関する考察

前述したように、TPAによる炎症過程は、PLA2によるアラキドン酸の遊離により開始される。従って、DLGGのPLA2阻害作用は、 $O_2^-$ 産生抑制能とともに、抗炎症、ひいては発癌プロモーション抑制機構の機序として重要であろう。DLGGは $O_2^-$ 消去作用や、XOD阻害活性を持たないことから、NADPH oxidase系の抑制作用が想定される。NADPH oxidaseは、p47、Rac1あるいはRac2、p67、cytochrome  $b_{558}$ などのタンパクから構成される複合系である<sup>27)</sup>。p47のセリン残基は、おそらくprotein kinase C (PKC)によって活性化されると、細胞膜へ移行する<sup>28-29)</sup>。一方、リン酸化したp47の脱リン酸化はprotein phosphatase 1Aあるいは2Aによって触媒される<sup>28)</sup>。さらに、NADPH oxidaseの活性化にはPLA2が必要であるとの報告もある<sup>30)</sup>。DLGGは以上に挙げた作用点のいずれかを阻害していることが示唆された。

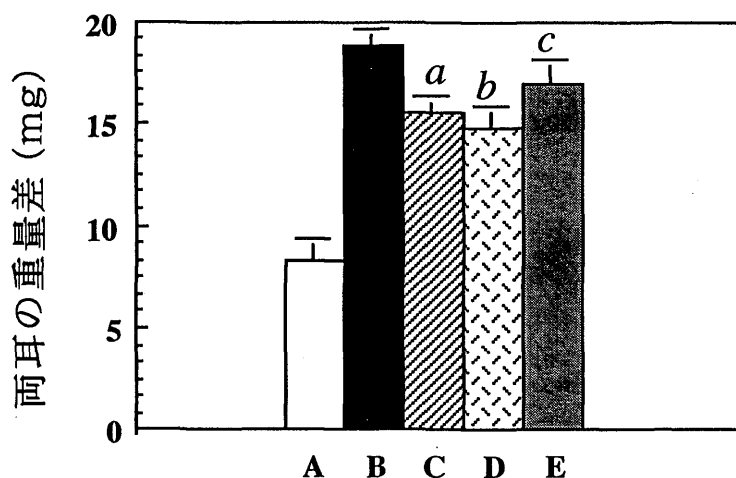


図2 DLGG、LPGG および indomethacin の ICR マウス耳抗炎症活性  
 A: 溶媒のみ; B: TPA; C: DLGG; D: LPGG; E: indomethacin  
<sup>a</sup> $P < 0.001$  (vs TPA),  $P < 0.05$  (vs indomethacin).  
<sup>b</sup> $P < 0.01$  (vs TPA),  $P < 0.01$  (vs indomethacin).  
<sup>c</sup> $P < 0.05$  (vs TPA).

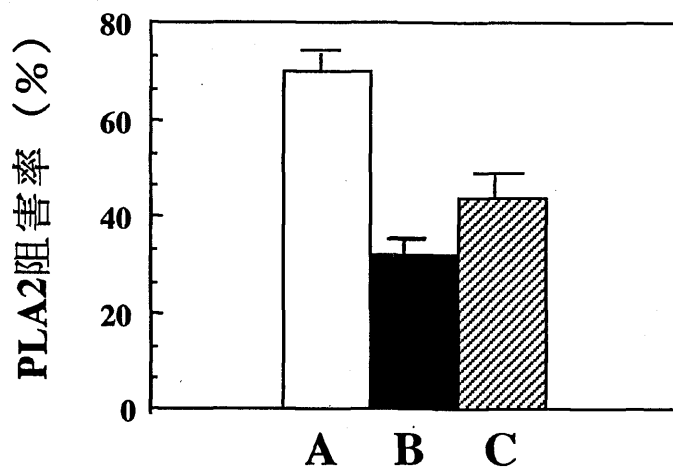


図3 *p*-bromophenacyl bromide、DLGG および LPGG の PLA2 阻害活性  
 PLA2 は *Crotalus atrox* Venom 由来のものを使用した。試料の濃度は全て  $100 \mu\text{M}$ .  
 A: *p*-bromophenacyl bromide; B: DLGG; C: LPGG.



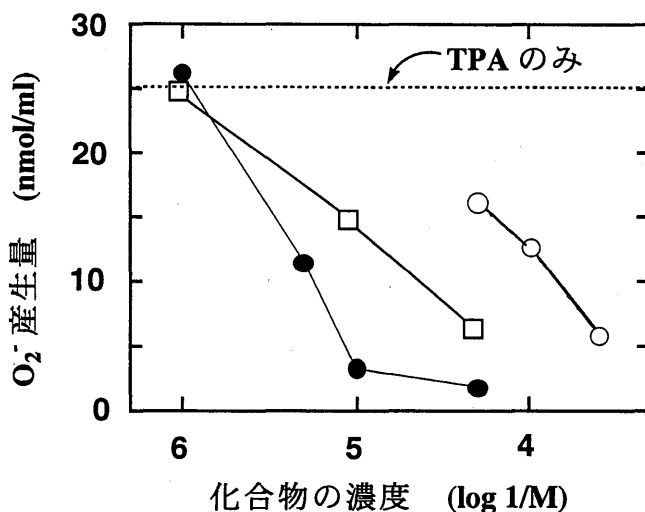


図4 分化HL-60細胞におけるDLGG、ACAおよびgenisteinのsuperoxide生成抑制作用

●: ACA, □: DLGG, ○: genistein.

superoxide量は、次式に従って算出した。

$$\text{O}_2^- \text{ (nmol/ml)} = 47.7 \times A_{550\text{nm}}$$

#### ACAの Maus皮膚発癌プロモーション抑制活性

発癌プロモーション抑制活性は、マウス1匹あたりの平均発生腫瘍数と腫瘍の発生率で評価した。表3に示したように、160nmolのACAを塗布した群では、20週後の腫瘍発生率（抑制率42%）と腫瘍数（抑制率90%）の双方に関して特に高い発癌抑制効果があった。また、TPAと同等の塗布量でも、腫瘍数に関して抑制効果が見られた（抑制率44%）。実験条件には多少の差異があるものの、ACAが示した発癌プロモーション抑制効果は、食素材由来の活性物質（quercetin<sup>31)</sup>、glycyrrhetic acid<sup>32)</sup>、EGCG<sup>33)</sup>と比較しても、最も強いもののひとつとして評価できた。さらに最近、4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO)を用いたラット口腔発癌試験でも、対照群では58%のラットに腫瘍が生成したのに対し、ACAを餌中100ppmの用量で添加した群では、腫瘍の形成は全くなかった<sup>22)</sup>。この試験系での成績は、米国で臨床試験に用いられている difluoromethylornithine (DFMO)、β-carotene、curcuminのそれらより高いものであった<sup>23)、24)</sup>。

## 想定される ACA の作用機構

### 1) XA/XOD 系における $O_2^-$ 生成抑制作用

Noro らは以前、ACA を *Alpinia galanga* に含まれる XOD 阻害物質として報告した<sup>34)</sup>。しかしながら、 $O_2^-$  消去作用の有無は検討されていなかったもので、検討したところ、殆ど消去作用はないことが判明した。一方、ACA には10および100  $\mu$ M でそれぞれ34、70%の XOD 阻害作用があり、Noro らの結果を確認できた。

### 2) 分化 HL-60細胞における $O_2^-$ 産生抑制活性

$O_2^-$  産生量は chytochrome *c* 還元法により測定した。ACA は10  $\mu$ M の濃度で  $O_2^-$  の産生を86%抑制し、 $IC_{50}$ 値は4.3  $\mu$ M と算定された。

### 3) リノール酸エチルの自動酸化抑制試験

$O_2^-$  は、その後過酸化水素 ( $H_2O_2$ )、ヒドロキシルラジカル ( $OH\cdot$ ) などに変換され、過酸化脂質 (LOOH) が蓄積する。さらに、LOOH が化学的に分解するとマロンジアルデヒド (MDA) などの毒性アルデヒド化合物が生成し、DNA 変異を生じる。本研究では、リノール酸エチルの自動酸化抑制試験<sup>36)</sup> を用いて、LOOH と MDA の生成に対する ACA の抑制効果を検討した。図5に示す様に、ACA は50  $\mu$ M の濃度で24時間後の LOOH の生成を42%抑制したが、MDA の生成は抑制しなかった。

### 4) 分化 HL-60細胞における LOOH 生成抑制試験

$O_2^-$  産生抑制試験と同様の方法で HL-60細胞を分化させ、2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) により、細胞内 LOOH を標識した。DCFH-DA は細胞内エステラーゼによって加水分解を受け、DCFH へ変換し細胞内にトラップされる。DCFH は LOOH と反応し、蛍光を発する DCF へと変化する。この蛍光細胞を flow cytometer で検出した。図6に示した様に、ACA は50  $\mu$ M の濃度で細胞内の LOOH の生成を抑制した。

### 5) ACA の作用機構に関する考察

前述したように、ACA は以前 XOD 阻害物質として報告され、そのことは本研究でも確認できた。TPA をマウス背部皮膚に塗布すると、XOD 活性が上昇し、その結果、腫瘍マーカーである ornithine decarboxylase (ODC) 活性が上昇することが報告されている。一方、

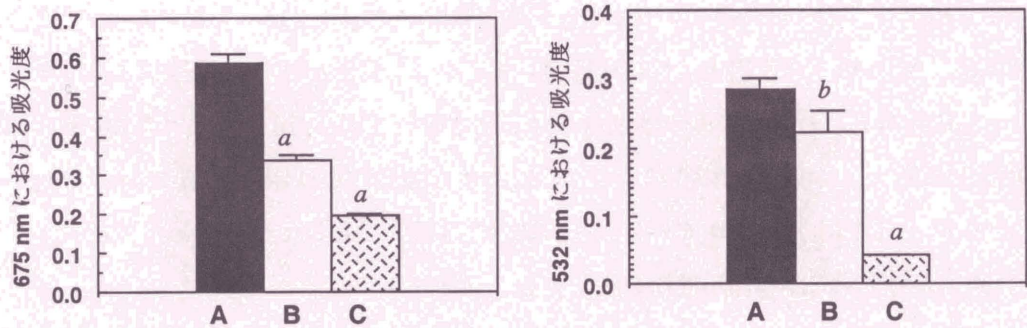


図5 ACAのリノール酸エチル自動酸化抑制作用

左: methyleneblue-hemoglobin法により評価した24時間後の LOOH 量

右: TBA法により評価した1週間後のMDA量

A: コントロール; B: 50  $\mu$ M ACA; C: 50  $\mu$ M  $\alpha$ -tocopherol.

<sup>a</sup> $P < 0.001$ . <sup>b</sup>統計学的に有意差なし。

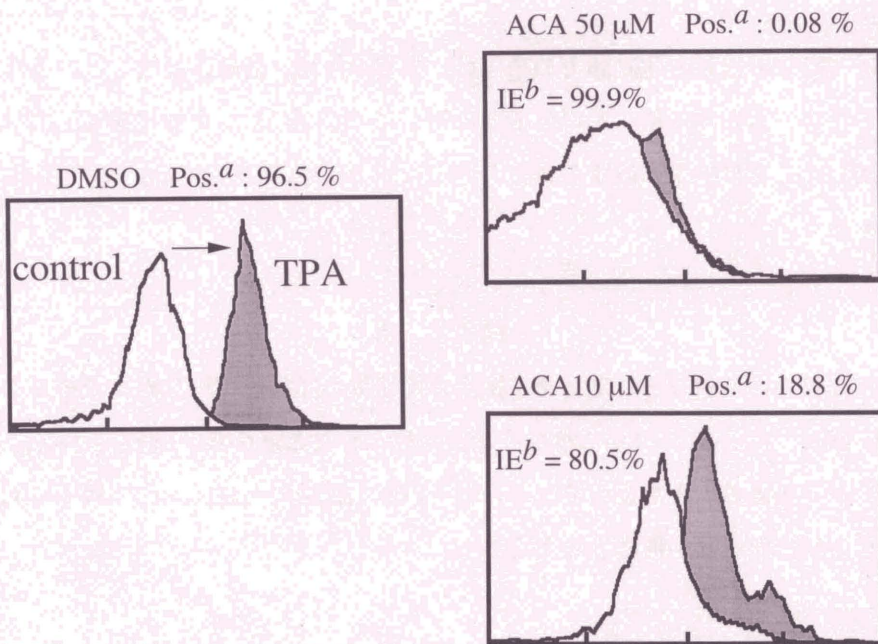


図6 分化HL-60細胞内におけるACAの過酸化生成抑制作用

<sup>a</sup>TPA処理した細胞のうち、「DMSO処理(或いは試料処理)した際の細胞が発する蛍光強度の平均+標準偏差の3倍以上」の強さの蛍光を発している細胞が占める割合を示す。

<sup>b</sup>抑制効果(%)。

TPAの塗布は、SODやcatalase活性の低下を招き、レドックスバランスの乱れから酸化ストレスが生じ、これが発癌プロモーション過程において重要な役割を果たしている<sup>37, 38)</sup>。それゆえ、ACAのXOD阻害活性は発癌プロモーション抑制活性の作用機構として寄与しているものと考えられるが、その活性はさほど高くない ( $IC_{50}=10.7 \mu M$ )<sup>39)</sup> ため、抑制機構の中核とは考えにくい。というのも、ACAよりも強いXOD阻害物質であるapigenin ( $IC_{50}=0.74 \mu M$ )<sup>40)</sup> の発癌プロモーション抑制活性は微弱なものだからである<sup>40)</sup>。従って、XOD阻害だけでACAの作用機構を説明することはできない。

これとは対照的に、ACAの分化HL-60細胞における $O_2^-$ 産生抑制活性 ( $IC_{50}=4.3 \mu M$ ) は、genisteinの活性を ( $IC_{50}=18 \mu M$ ) はるかに上回る高いものとして評価できる。ACAは $O_2^-$ 消去作用を示さないので、その抑制様式はDLGGの場合と同様、NADPH oxidase系の抑制と推察される。 $O_2^-$ は引き続き多様な活性酸素種を生成するが、LOOHやMDAはその代表的な例である。TPAの塗布により、マウス皮膚での系でもLOOHの産生が確認されている。よって、ACAのLOOH生成抑制作用も発癌抑制機構に関与していると想定できる。

一般的に、脂質の自動酸化試験での結果は、脂質の種類、溶媒、温度などの条件によって左右されるため、客観的な結果を得ることは難しいが、ACAが実際に細胞内でLOOHの生成を抑制したことは特筆に値する。この作用はおそらく、ACAの $O_2^-$ の産生抑制に由来するのであろう。

## 結 論

発癌抑制物質の検索対象として、タイ国産食用植物が非常に有用な素材であることが示唆された。実際に、DLGGやACAの様な成功例が得られたことから、同様な手法によりさらに活性成分を究明するとともに、それらの種々の動物試験でも評価や作用機構に関する多様な角度からの解析が必要があると考えられる。

## 謝 辞

本研究の成果の一部は、平成8年度厚生省科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）によるものである。また研究助成金を賜った武田食品工業株式会社に深謝致します。

## 参考文献

- 1) H.C. Pitot and Y. P. Dragan, *FASEB J.*, 5, 2280-2286 (1991).
- 2) S. Broder, *Jpn. J. Cancer Res.*, 84, 821-830 (1993).
- 3) M. B. Sporn, *Cancer Res.*, 36, 2699-2702 (1976).
- 4) R. Doll, *Cancer Res.*, 52 (Suppl.), 2024s-2029s (1992).
- 5) C. W. Boone, V. E. Steele, and G. J. Kelloff, *Mutat. Res.*, 267, 251-255 (1992)
- 6) L.W. Wattenberg, *Cancer Res.*, 52, 2085-2091 (1992).
- 7) S. M. Lippman, S. E. Benner, and W. K. Hong, *J. Clin. Oncol.*, 12, 851-873 (1994).
- 8) H.C. Pitot, Y.P., *FASEB J.*, 5, 2280-2286 (1991).
- 9) E. Hecker, *Naturwissenschaften*, 54, 282-284 (1967).
- 10) A. Murakami, H. Ohigashi, K.Koshimizu, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1-8 (1996).
- 11) A. Murakami, H. Ohigashi, H. Nozaki, Y Tada, and K. Koshimizu, *Agric. Biol. Chem.*, 55, 1151-1153 (1991).
- 12) A. Murakami, S. Tanaka, M. Hirota, R. Irie, N. Takeda, A. Tatematsu, H. Ohigashi, K. Koshimizu, *Phytochemistry*, 31, 2689-2693 (1992).
- 13) A. Murakami; H. Ohigashi; M. Jisaka.; M. Hirota; R. Irie; and K. Koshimizu *Cancer Lett.*, 58, 101-106 (1991).
- 14) A. Murakami, S. Tanaka, H. Ohigashi, M. Hirota, R. Irie, N. Takeda, A. Tatematsu, K.Koshimizu, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 769-772 (1992).
- 15) H. Ohigashi, A. Murakami, K. Koshimizu In: Ho C-T, Osawa T, Huang M-T, Rosen RT (eds) Food phytochemicals for cancer prevention II. The American Chemical Society, Washington, DC, pp 251-261 (1994).
- 16) K. Koshimizu, H. Ohigashi, H. Tokuda, A. Kondo, and K. Yamaguchi, *Cancer Lett.*, 39, 247-257 (1988).
- 17) H. Ohigashi, Y. Sakai, K. Yamaguchi, I. Umezaki, and K. Koshimizu, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 994-995 (1992).
- 18) K. Koshimizu, H. Ohigashi In *Advances in New Drug Development*, B.-K. Kim, E.B. Lee, C.-K.Kim (eds); Harl Rim Won printing Co, Ltd, Seoul, pp 438-447 (1991).

- 19) A. Murakami, H. Ohigashi, K.Koshimizu, *Asia Pacific J. Clin. Nutr.*, 3, 185-191 (1994).
- 20) H. Ohigashi, T. Ohtsuka, M. Hirota, K. Koshimizu, H. Tokuda, Y. Ito, *Agric. Biol. Chem.*, 47, 1617-1622 (1983).
- 21) A. Murakami, A. Kondo, Y. Nakamura, H. Ohigashi, and K. Koshimizu, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 1971-1973 (1993).
- 22) M. Ohnishi, T. Tanaka, H. Makita, T. Kawamori, H. Mori, K. Sato, A. Hara, A. Murakami, H. Ohigashi, K. Koshimizu, *Jpn. J. Cancer Res.*, 87, 349-356 (1996).
- 23) T. Tanaka, T. Kojima, A. Hara, H. Sawada, H. Mori, *Cancer Res.*, 47, 772-776 (1993).
- 24) T. Tanaka, H. Makia, M. Ohnishi, Y. Hirose, A. Wang, H. Mori, K. Satoh, H. Ogawa, *Cacner Res.*, 54, 4653-4659 (1994).
- 25) S.M.Fischer, G.S.Cameron, J.K.Baldwin, D.W Jasheway, K.E.Patrick, Belury M.A. In Skin carcinogenesis, mechanisms and human relevance; T.J.Slaga, A. J.P.Klein-Szanto, R.K.Boutwell, D.E.Stevenson, H.L.Spitzer, B.D'Motto, Eds; Alan R. Liss, Inc: New York, pp 249-264 (1989).
- 26) A.R. Cross, O.T.G. Jones, *Biochem. Biophys. Acta.*, 1057, 281-298 (1991).
- 27) J.T. Curnutte, R.W. Erichson, J. Ding, *J. Biol. Chem.*, 269, 10813-10819 (1994).
- 28) P.G.Heymorth, J.A., *J. Bioenerg. Biomembr.*, 22, 1-26 (1990).
- 29) J.Ding, J.A. Badwey, *J. Biol. Chem.*, 267, 6442-6448 (1992).
- 30) R.Dana , H.Malech, R. Levy, *Biochem. J.*, 297, 217-223 (1994).
- 31) H. Nishino, A. Iwashima, H. Fujiki, T. Sugimura, *Jpn. J. Cancer Res.*, 75, 113-116 (1984).
- 32) H. Nishino, K. Yoshioka, A. Iwashima, *Carcinogenesis*, 5, 1529-1530 (1984).
- 33) S. Yoshizawa, T. Horiuchi, H. Fujiki, *Phytother. Res.*, 1, 44-47 (1987).
- 34) T. Noro, T. Sekiya, M. Katoh (nee Abe), Y.Oda, T. Miyase, M. Kuroyanagi, A. Ueno, S. Fukushima, *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 244-248 (1988).
- 35) M.Markert, P.C.Andrews, B.M.Babior, *Meth. Enzymol.*, 105, 358-365 (1984).
- 36) X.-Y.Li, C.K.Chow, *Lipids*, 29, 73-75 (1994).

- 
- 37) J.J.Reiners Jr., B.C.Pence, M.C.S. Barcus, *Cancer Res.*, 47, 1775-1779 (1987).
  - 38) S.M.Fischer, G.S.Cameron, J.K.Baldman, *Lipids*, 23, 592-597 (1988).
  - 39) V. Solanki, R.S.Rana, T.J.Slaga, *Carcinogenesis*, 2, 1141-1146 (1981).
  - 40) T.Noro, Y.Oda, T. Miyase, *Chem. Pharm. Bull.*, 31, 3984-3987 (1983).
  - 41) H. Wei, L. Tye, E.Bresnick, *Cancer Res*, 50, 499-502 (1990).
  - 42) E.M.Perchellet, N.L.Abney, J.-P.Perchellet, *Cancer Lett.*, 42, 169-177 (1988).
  - 43) T.W.Kensler, P.A.Egner, B.G.Taffe, In: Skin carcinogenesis. Mechanisms and human relevance. T.J.Slaga, A.P.J.Klein-Szanto, Boutwell (eds), Alan R Liss, Inc, 1989, vol 298, pp 233-248.