

マウス二段階発がん試験と EBV 早期抗原誘導活性を指標とした *Jatropha curcas* 種子抽出物の発がんプロモーション活性評価

松川 哲也¹, 正田 将大¹, 玉置 恵子¹, 村上 ひかる¹, 梶山 慎一郎¹

要旨

トウダイグサ科の落葉低木である *Jatropha curcas* は、種子に豊富な中性脂質を含み、荒廃地でも生育可能であるため、次世代バイオディーゼル原料植物として有望視されている。しかし一方で、本植物の種子には発がんプロモーターである phorbol ester 類を含んでおり、生産者や消費者の健康に与える負の影響が懸念されている。本研究では *J. curcas* 種子抽出物の発がんプロモーション活性を、マウスを用いた二段階発がん試験および EBV 早期抗原誘導活性を指標としたアッセイ系により評価した。その結果、*J. curcas* 種子抽出物の発がんプロモーション活性は、発がんプロモーション活性を有する代表的なホルボールエステルである phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) より低いことが見いだされた。また、種子抽出物は PMA の発がん活性を抑制することが示された。これらの結果から、*J. curcas* 種子抽出物には化学発がんを抑制する物質が含まれることが示唆された。

キーワード: *Jatropha curcas*, ホルボールエステル, 発がんプロモーション活性, マウス二段階発がん試験, EBV 早期抗原誘導試験

緒論

近年、化石燃料の使用が環境に与える負荷の大きさから、持続可能な代替エネルギーの構築が求められている。中でも植物由来のバイオ燃料は、再生可能なカーボンニュートラル燃料として大きな期待が寄せられている。しかし、現在生産されている代表的なバイオ燃料はトウモロコシやサトウキビなどの食用植物を原料としており、原料植物の競合による食糧価格の高騰や生産地域の拡大に伴う環境破壊など新たな社会問題が生じている。このような社会的背景から、非食用植物を原料としたバイオ燃料の実用化が試みられている。

トウダイグサ科の落葉低木である *Jatropha curcas* (和名、ナンヨウアブラギリ) は、種子中にバイオディーゼル燃料に適した流動性の高い油脂成分を約 40–60% 含む非食用油脂生産植物であり、新たなバイオディーゼル燃料資源植物として近年注目を集めている⁽¹⁾。また、本植物は半乾燥地や貧栄養土壌でも栽培可能であることから食用植物の生産地を避けて栽培可能であり、また、病害虫にも強いことから、他のバイオ燃料植物には見られない大きな利点を有している⁽²⁾。しかし、本植物はこれらの利点を有する一方で産業レベルでの生産には留意すべき問題点も有している。本植物の種子には発がんプロモーターである phorbol ester 類 (PEs) を含むことである。PEs は比較的安定性が高く、加熱処理や漂白処理を行っても分解されず、また、バイオディーゼル製造工程で排出される廃棄物や最終生産品であるバイオディーゼル燃料にもわずかながら含まれることがこれまでの研究から示唆されている^(3,4)。そのため、産業レベルでの大量生産にあたり、PEs が生産者や消費者の健康に与える負の影響が懸念されている。

PEs は *tiglane* 型の多環式ジテルペンである phorbol の脂肪酸エステルであり、トウダイグサ科の植物に

原稿受付 2013 年 11 月 21 日

本研究は近畿大学生物理工学部戦略的研究 No.11-II-1, 2011 の助成を受けた。

1. 近畿大学生物理工学部 生物工学科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

広く分布する化合物である。PEs は多様な化合物群であり、*J. curcas* からはこれまでに6種の PEs が同定されている (図 1)。これらはいずれも 12-deoxy-16-hydroxyphorbol を基本骨格としており、脂肪酸側鎖が異なる構造異性体であることが明らかになっている⁽⁵⁾。これまでの研究から、PEs に暴露したマウスでは腫瘍形成が促進されることが報告されており、PEs は発がんプロモーション活性を有することが示唆されている^(6,7)。

発がんプロモーターは、現在、化学発がんの発生機構として知られている化学発がん多段階説において、DNA 損傷による変異に伴う「イニシエーション」が起こった細胞に対してがん化を促進する物質のことである。発がんプロモーターはそれ単独では発がん活性を示さないが、イニシエーションを起こした細胞が低濃度でも継続的に暴露することによって確実にがん化を引き起こす物質であるため、これらの扱いは細心の注意が必要である。PEs は細胞内で生理的基質である diacylglycerol のミミック (疑似物質) として作用し、主に protein kinase C の C1 ドメインに結合しこれを活性化させることにより細胞内の情報伝達を攪乱し、細胞の過剰増殖や活性酸素の増加などの様々な生理現象を引き起こすと共に発がんに至らしめると考えられている^(5,8)。したがって、PEs を高濃度で含有する *J. curcas* の大規模栽培を必要とする本植物由来のバイオ燃料の実用化は、生産地域において新たな環境問題や健康問題を引き起こす可能性が考えられる。このような背景から、*J. curcas* の普及には安全性の評価が喫緊の課題である。

そこで本研究では、安全性評価の一助となるべく、実際に栽培者やバイオ燃料生産者が触れる機会の多い種子の粗抽出物を対象とし、その発がんプロモーション活性の検討を行った。PEs の発がんプロモーション活性の評価は、パーキットリンパ腫由来細胞である Raji 細胞を用いた Epstein-Barr virus (EBV) 早期抗原誘導活性試験と、実際に実験動物を用いるマウス皮膚発がん二段階試験を用いた方法により行い、*Croton tiglium* 由来の PE であり、強力な発がんプロモーターとして知られる phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) と *J. curcas* 由来の PEs 粗抽出物の発がんプロモーション活性の比較を行った。

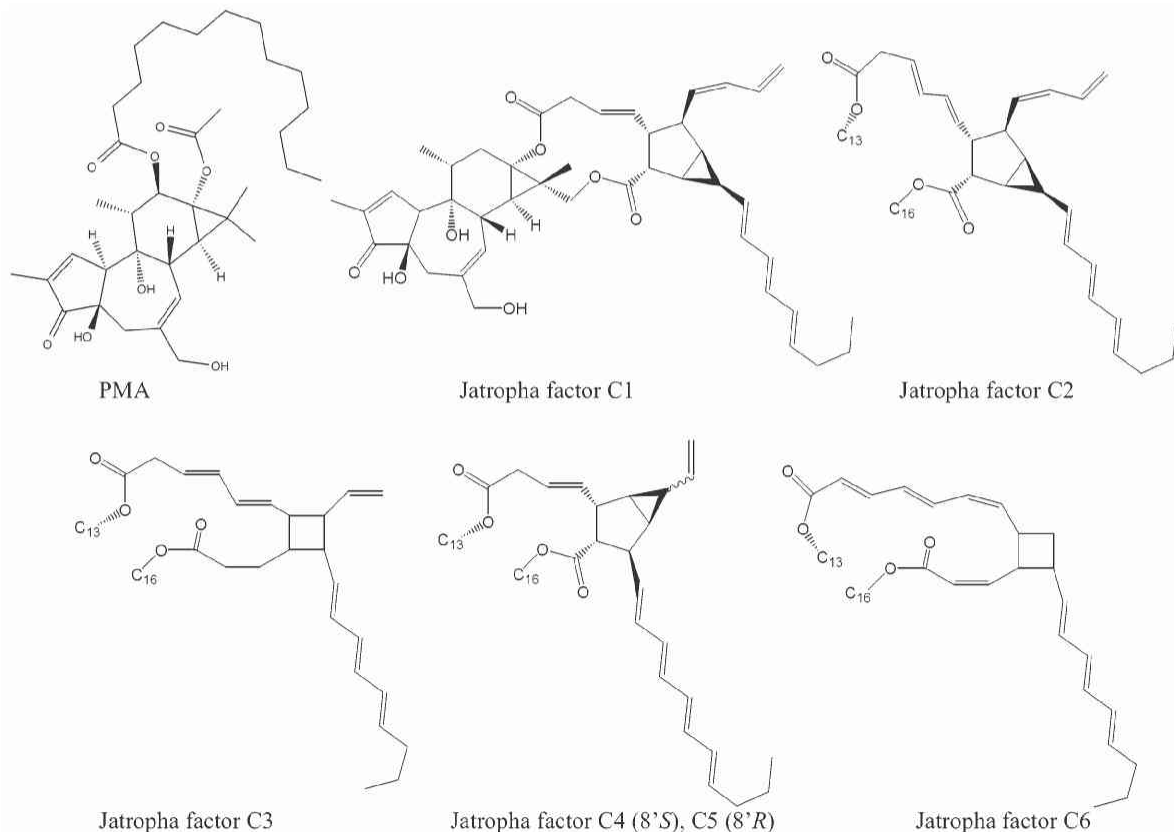


図 1. PMA および *J. curcas* に含まれる PEs の化学構造

材料および方法

種子粗抽出物の調製

植物材料は、2008年4月にフィリピンミンダナオ島南コタバト州ジェネラルサントスで栽培、収穫された *J. curcas* Hybrid No. 2 を使用した。種子の外殻を除去後、Highflex Homogenizer に供し、18,000 rpm で30秒間粉碎後、種子重量の5倍量の *n*-hexane を加えて懸濁した。懸濁液を一晩静置後、吸引ろ過に供してろ液を得た。残渣に再び *n*-hexane を加えて同様の操作を3回繰り返すことにより PE を含む *n*-hexane 抽出液を得た。得られた *n*-hexane 抽出液にシリカゲル(Wakogel C-100)を加え、減圧乾固することにより PE をシリカゲルに吸着した。吸着後のシリカゲルを *n*-hexane により懸濁後、あらかじめ *n*-hexane で平衡化したシリカゲルオープンカラム(50×500 mm)に供した。溶出溶媒には *n*-hexane と EtOAc の混合溶媒を用い、EtOAc 濃度を 0, 30, 70% に段階的に増加させることにより溶出を行った。各組成の溶媒は 1500 ml ずつ溶出して分画した。PE を含む 70% EtOAc 画分を減圧乾固したものを種子粗抽出物とした。

粗油抽出物の調製

J. curcas 圧搾粗油は過去の報告と同じものを使用した⁽³⁾。粗油 10 ml に、hexane 100 ml, MeOH 30 ml を加え、分液漏斗を用いて分液した。MeOH 層を減圧乾固後、上記の方法でシリカゲルオープンカラムに供して粗精製を行った。

EBV 早期抗原誘導活性試験

細胞にはヒトパーキットリンパ腫由来細胞である Raji 細胞(JCBB No. JCR9012)を使用し、10%牛胎児血清および抗生物質を含む RPMI1640 培地で 37°C, 5% CO₂ で培養したものを用いた。Raji 細胞を 5×10⁵ cells/ml となるように新鮮培地に播種後、最終濃度が 3 mmol/l となるように 0.6 mol/l *n*-酪酸水溶液を加えた。これに一定濃度に調製した *J. curcas* 種子粗抽出物および PMA の DMSO 溶液を加え、37°C, 5% CO₂ で 48 時間静置培養した。培養後の細胞は、細胞密度および細胞生存率を測定後、スライドガラス上でアセトンにより固定した。誘導された EBV 早期抗原は一次抗体に Anti-EBV EA D-p52/50 (Millipore), 二次抗体に Anti-Mouse Immunoglobulins/FITC (Dako)を用いて抗体染色を行い、蛍光顕微鏡により検出した。誘導率は、全細胞数に対する蛍光細胞の比で表した。

実験動物

発がん段階試験に用いたマウスは、5週齢の雌 ICR マウス(日本チャールズリバー)を用い、20°C, 湿度 50%, 日長 12 時間で飼育した。飼料には MF 固形飼料(オリエンタル酵母)を用い、飲料水にはイオン交換水を用いた。飼料および水は実験期間中自由に摂取させた。

二段階発がん試験

飼育環境に1週間馴化させたマウスの背部被毛を剃毛した。剃毛翌日にマウス各個体の体重を測定後、1 mg/ml の dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)アセトン溶液を 100 μl 塗布し、発がんイニシエーションを行った。1週間飼育した後、マウス各個体の体重を測定し、一定濃度に調製した *J. curcas* 種子粗抽出物, PMA および、これらの混合物のアセトン溶液を 100 μl 塗布した。この操作を1週間に2回繰り返し、20週間塗布を繰り返すことにより発がんプロモーションを行った。発がんプロモーション活性は形成した腫瘍の数を測定することにより評価した。

結果および考察

EBV 早期抗原誘導試験

はじめに, *J. curcas* 種子粗抽出物および粗油抽出物の発がんプロモーション活性を簡易に検出するため, EBV 早期抗原誘導活性について検討を行った。ポジティブコントロールとしては代表的な PE である PMA を用い, ネガティブコントロールとしてはオリーブオイルを用いた (図 2)。その結果, 種子粗抽出物および粗油抽出物はいずれも試料濃度の増加に伴い, 早期抗原誘導率が増加したことから, これらの試料中に EBV 早期抗原を誘導する物質が含まれることが示され, これらの試料が発がんプロモーション活性を示すことが示唆された。一方, オリーブオイルでは早期抗原誘導活性を全く示さなかったことから, 早期抗原誘導活性物質は *J. curcas* に特徴的なものであることが示された。PEs の発がんプロモーション活性は細胞内で diacylglycerol のミミックとして働くことによると考えられている。本研究の結果から, オリーブオイルなどの油脂に含まれる diacylglycerol は発がんプロモーション活性を示さないことが示唆された。一方, 代表的なホルボールエステルである PMA は極めて低い濃度で早期抗原誘導活性を示した。種子粗抽出物および粗油抽出物はいずれも夾雑物を多く含んでおり, そのために見かけ上の活性が低く見積もられている可能性が考えられる。また, 過去の報告から, *J. curcas* 由来の PEs のうち, 最も含量が多い jatropha factor C1 の発がんプロモーション活性は, PMA よりも低いことが示唆されており⁽⁶⁾, これらの要因により PMA と *J. curcas* 試料との差が見られたと推測された。

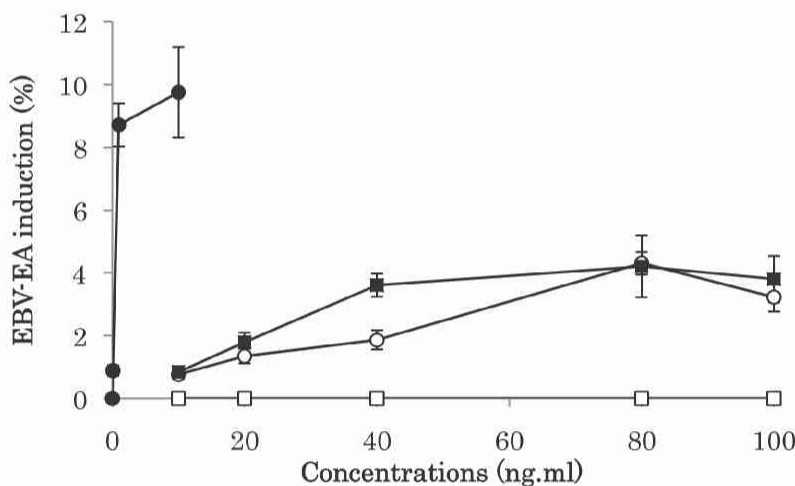


図 2 *J. curcas* 種子抽出物および粗油抽出物の EBV 早期抗原(EBV-EA)誘導率

Raji 細胞に *J. curcas* 種子抽出物 (○), 粗油抽出物 (■) を投与後, EBV 早期抗原の誘導率を測定した。ポジティブコントロールとして代表的な PE である PMA (●), ネガティブコントロールとしてオリーブオイル抽出物 (□) を投与した。誘導された早期抗原は FITC 化抗体で染色し, 蛍光顕微鏡を用いて観察した。値は 4 連の平均値±標準偏差で表した。

マウス二段階発がん試験

EBV 早期抗原誘導試験は, 簡便かつ数値化が容易に可能な点で発がんプロモーション活性の試験法として広く普及した方法である。しかし, EBV 早期抗原誘導試験では発がんプロモーターが実際に動物個体に対して与える影響を評価することが困難である。そこで, 先ほど EBV 早期抗原誘導活性を示した種子抽出物および PMA をマウス二段階発がん試験に供し, 動物個体に与える影響について検討を行った。濃度の異なる種子抽出物および 0.01 mg/ml PMA を, DMBA によりイニシエーションを行った ICR マウスに塗布し, 体重の変動を測定した (図 3)。その結果, PMA および低濃度(0.01 mg/ml)種子抽出物を投与したマ

ウスに比べて高濃度(1 mg/ml)の種子抽出物を投与したマウスでは体重の増加量が低いことが明らかになった。この結果から、種子抽出物にはマウスの成育を抑制する物質が含まれていると推測された。また、高濃度種子抽出物を投与したマウスは体重が減少し、死に至る個体も見られた。一方、強力な発がんプロモーターである PMA を投与したマウスは、低濃度の種子抽出物を投与したマウスと同様の体重増加率を示した。この結果から、種子抽出物に含まれる毒性物質は PEs とは異なる化合物であると推測された。次に、これらのマウスの腫瘍発現率について検討を行った(図4)。その結果、PMA を投与したマウスでは、投与後7週目に腫瘍が発現する個体が現れ、投与後14週目には全てのマウスに腫瘍が認められた(図4A)。

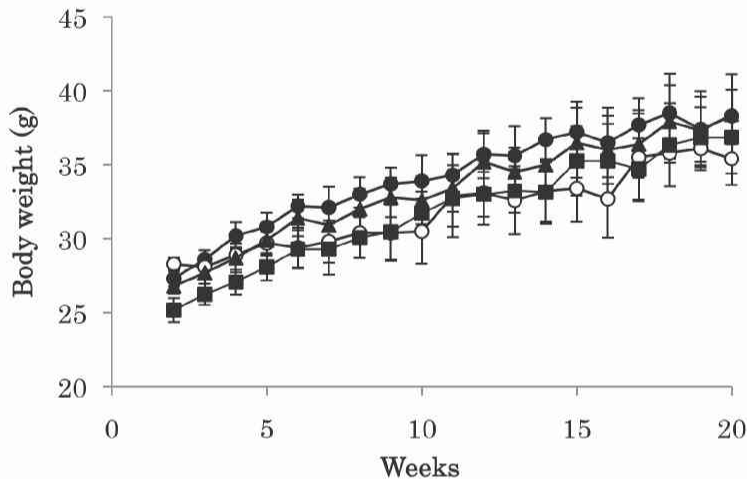


図3 マウス二段階発がん試験被検マウスの体重変動

マウス背部を剃毛し、DMBA を用いたイニシエーション後、プロモーターとして 0.01 mg/ml PMA (●), 1 mg/ml (○) および 0.01 mg/ml (▲) *J. curcas* 種子粗抽出物および PMA+種子抽出物 (■) を週 2 回塗布したときのマウスの体重を測定した。値は 12 頭の平均±標準偏差で表した。

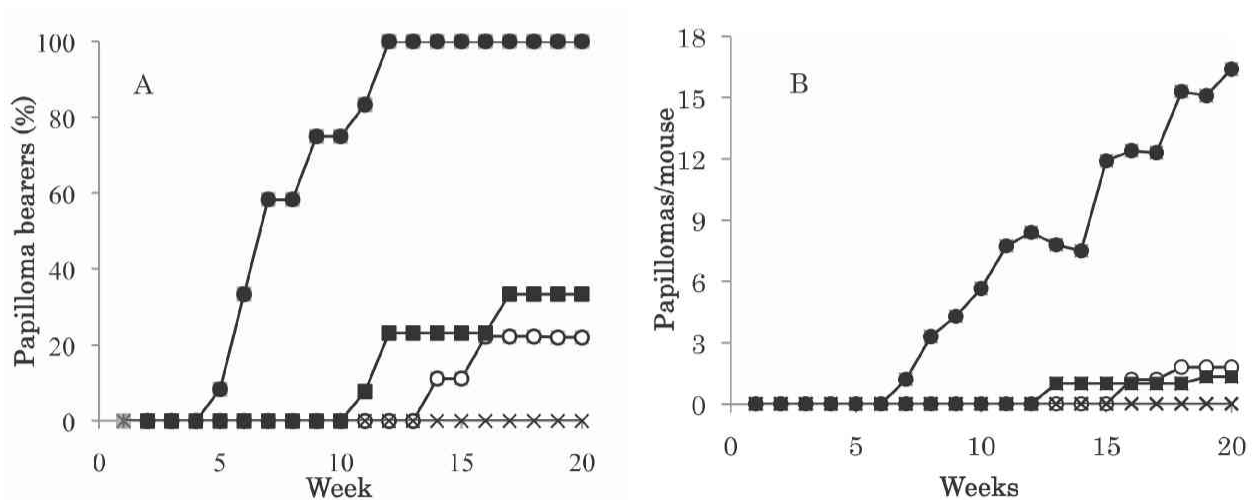


図4 *J. curcas* 種子抽出物および PMA 投与マウスの腫瘍発現率および腫瘍数

マウス背部を剃毛し、DMBA を用いてイニシエーション後、プロモーターとして 0.01 mg/ml PMA (●), 1 mg/ml *J. curcas* 種子粗抽出物 (○), PMA+種子抽出物 (■) およびアセトン(×)を週 2 回塗布したときの腫瘍発現率(A)および 1 個体あたりの腫瘍数(B)を計測した。

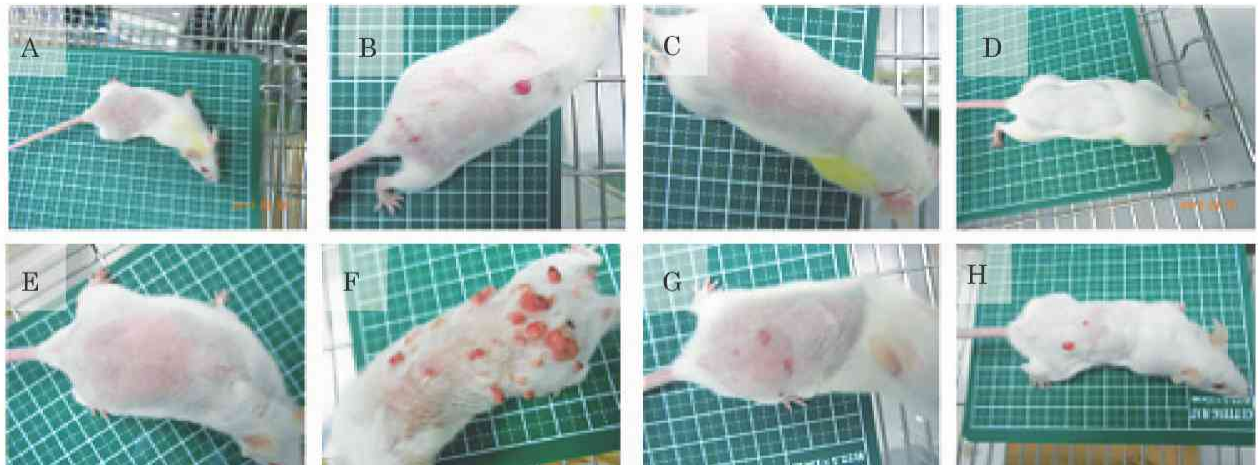


図5 *J. curcas* 種子抽出物および PMA 投与マウスの発がんプロモーション活性

マウス背部を剃毛し、DMBA を用いてイニシエーション後、プロモーターとして PMA (B, F), *J. curcas* 種子粗抽出物(C, G)および PMA+種子抽出物(D, H)を週 2 回塗布したときの処理後 8 週(A-D)および 20 週(E-H)の発がんの様子。コントロールとして acetone (A, E)を用いた。

一方、1 mg/ml の種子抽出物を投与したマウスは 16 週目で腫瘍が発現する個体が現れたが、実験期間中に腫瘍が発生した個体は 22%にとどまっていた (図 4A)。また、0.01 mg/ml の種子抽出物を投与したマウスおよびアセトンでは、実験期間中に腫瘍が発現した個体は認められなかった(data not shown)。形成された腫瘍の形状に関しても、PMA を投与した個体では 1 個体に多くの腫瘍が見られ、その大きさも経過時間に伴い大きくなることが明らかになった (図 4B, 図 5B, F)。これに対し種子抽出物を投与したマウスに発生した腫瘍は、1 個体に 1 つしか発生せず、大きさも成長がほとんど見られなかった (図 4B, 図 5C, G)。これらの結果から、*J. curcas* 種子に含まれる PEs の発がんプロモーション活性は PMA と比較して低いことが示唆された。過去の報告で示された jatropha factor C1 の発がんプロモーション活性は PMA の約 10%程度であったが、本研究の結果から見積もられた種子抽出物の発がんプロモーション活性はそれよりも低かった。このことから、種子抽出物に PEs の発がんプロモーション活性を抑制する物質が含まれている可能性が考えられた。そこで、次に PMA と種子抽出物を同時に投与し、種子抽出物の発がんプロモーション活性抑制効果について検討を行った。その結果、種子抽出物と PMA を同時に投与したマウスでは、PMA 単体で投与したマウスに比べて腫瘍が形成した個体数が顕著に減少することが明らかになった (図 4A)。また、形成された腫瘍数および腫瘍の大きさも抑制されており、種子抽出物のみを投与したマウスとほぼ同程度まで腫瘍形成が抑制されていた (図 4B, 図 5D, H)。これらの結果から、*J. curcas* 種子中には、PMA による化学発がんを抑制する作用を持つ代謝産物が存在することが示唆された。過去の報告により、phorbol の長鎖脂肪酸ジエステルが phorbol 12,13-dibutyrate の活性を抑制することが報告されており、脂肪酸側鎖の極性が活性に大きく影響することが示唆されている⁽⁹⁾。*J. curcas* 由来の PEs と PMA においても脂肪酸側鎖の違いによる拮抗作用が働き、結果として PMA の活性を抑制したことが考えられる。また、本研究で用いた種子抽出物は粗精製の段階のものであり、化学発がんの抑制に PEs 以外の夾雑物が影響している可能性も考えられる。今後、種子抽出物に含まれる発がん抑制物質の同定が期待される。

結論

本研究では、*J. curcas* 種子抽出物を用いてその発がんプロモーション活性の評価を EBV 早期抗原誘導

活性を指標とした *in vitro* アッセイ系およびマウス皮膚二段階発がん試験による *in vivo* アッセイ系の2種のアッセイ系を用いて行った。その結果、種子抽出物が発がんプロモーション活性を示すことが明らかになった。しかし、その活性は強力な発がんプロモーターである PMA と比較すると極めて低いものであった。また、マウス二段階発がん試験の結果から、*J. curcas* 種子抽出物には PEs とは逆に化学発がんを抑制する物質が含まれることが示唆された。

J. curcas 由来のバイオ燃料の普及にはその安全性の評価が不可欠であり、そのためには *J. curcas* 由来 PEs の発がんプロモーションの詳細なメカニズムを解明する必要がある。しかし、化学発がんのメカニズムは極めて複雑なため、未だに詳細は明らかになっていないのが現状である。本研究の結果から、*J. curcas* には発がんプロモーターと一方でそれと相反する発がん抑制作用を有する代謝産物が含まれることが示唆された。今後、本研究で示唆された新規発がん抑制物質を同定し、その作用の詳細が明らかになることにより複雑な化学発がんメカニズムを解明するための新たな研究用分子プローブとなることが期待される。

参考文献

- (1) Makkar, H. P. S., Becker, Z.K., Sporer, F., Wink, M. (1997) Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. J. Agric. Food Chem. 45, 3152-3157.
- (2) Becker, K., Makkar, H.P.S. (2008) *Jatropha curcas*: A potential source for tomorrow's oil and biodiesel. Lipid Technol. 20, 104-107
- (3) 松川 哲也, 鈴木 遥, 梶山慎一郎 (2010) *Jatropha curcas* を原料としたバイオディーゼル生産工程で排出される phorbol ester 類の定量分析。近畿大学生物理工学部紀要 No.26, 13-22
- (4) Haas, W., Mittelbach, M. (2000) Detoxification experiments with the seed oil from *Jatropha curcas* L. Industrial Crops Products 12, 111-118.
- (5) Hirota, M., Suttajit, M., Sygyri, H., Endo, Y., Shudo, K., Wongchai, V., Hecker, E., Fujiki, H. (1988) A new tumor promoter from the seed oil of *Jatropha curcas* L., an intramolecular diester of 12-deoxy-16-hydroxy phorbol. Cancer Res. 48, 5800-5804.
- (6) Haas, W., Sterk, H., Mittelbach, M. (2002) Novel 12-deoxy-16-hydroxyphorbol diesters isolated from the seed oil of *Jatropha curcas*. J. Nat. Prod. 65, 1434-1440.
- (7) Van Durren, B. L., Orris, L. (1965) The tumor-enhancing principles of *Croton tiglium* L. Cancer Res. 25, 1871-1875.
- (8) Baird, W. M., Boutwell, R. K. (1971) Tumor-promoting activity of phorbol and four diesters of phorbol in mouse skin. Cancer Res. 31, 1074-1079.
- (9) Sharkey, N.A., Blumberg, P.M. (1985) Highly lipophilic phorbol esters as inhibitors of specific [3H]phorbol 12,13-dibutyrate binding. Cancer Res. 45, 19-24.

英文抄録

Evaluation of tumor promoting activity of *Jatropha curcas* seed extracts by the two-stage mouse skin tumorigenesis assay and Epstein-Barr virus early antigen induction assay.

Tetsuya Matsukawa¹, Masahiro Shoda¹, Keiko Tamaki¹, Hikaru Murakami¹, Shin'ichiro Kajiyama¹

Jatropha curcas, a tropical plant belonging to the family of Euphorbiaceae, has recently been attracted the considerable attention as a potential source for bio-diesel due to the high adaptability to semi-arid areas and the high oil content in seed kernel. The seed, however, contains phorbol esters which exhibit tumor-promoting activity, and thus negative impact of these compounds on health of producers or consumers should be concerned. In this study, tumor-promoting activity of *J. curcas* seed extracts was evaluated by the two-stage mouse skin tumorigenesis assay and Epstein-Barr virus early antigen induction assay. Our results showed that tumor-promoting activity of *J. curcas* seed extracts was significantly lower than phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), which is well known as a potent tumor promotor. In addition, *J. curcas* seed extracts were revealed to suppress the tumor-promoting activity of PMA. These results suggest that *J. curcas* seed extracts contain some suppressor of tumorigenesis.

Key words: *Jatropha curcas*, phorbol esters, tumor-promoting activity, two-stage mouse skin tumorigenesis assay, EBV-EA induction assay

1. Department of Biotechnological Science, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan