

蓼藍 (*Polygonum tinctorium* Lour.) に含まれる 悪性腫瘍細胞傷害物質について

木本哲夫*, 山本祐規子, 日野恵子, 古谷聡美, 阿賀 創^a, 橋本貴治^a,
花谷利春, 新井成之, 池田雅夫, 福田恵温^a, 栗本雅司
(株)林原生物化学研究所 藤崎研究所, ^a 同 天瀬研究所

Cytotoxic effects of Substances in Indigo Plant (*Polygonum tinctorium* Lour.) on malignant tumor cells.

TETSUO KIMOTO*, YUKIKO YAMAMOTO, KEIKO HINO, SATOMI KOYA, HAJIME AGA^a,
TAKAHARU HASHIMOTO^a, TOSHIHARU HANAYA, SHIGEYUKI ARAI, MASAO IKEDA,
SHIGEHARU FUKUDA^a and MASASHI KURIMOTO

Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Fujisaki Institute
675-1, Fujisaki, Okayama 702-8006, Japan.

^a Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Amase Institute
7-7, Amaseminamimachi, Okayama 700-0834, Japan.

(Received September 2, 1998)

From the plant commonly known as Indigo Plant (*Polygonum tinctorium* Lour., Shimane, Japan), Tryptanthrin was isolated which had cytotoxic effects on malignant tumor cells. The cytotoxic effects on human solid cancer cells, leukemia cells, murine glioblastoma cell, colon cancer and malignant melanoma cells *in vitro* were assayed. Tryptanthrin induced remarkable necrotic and apoptotic changes in the malignant tumor cells.

Keywords : *Polygonum tinctorium* Lour; Tryptanthrin; malignant cells; cytotoxic effect; apoptosis

南ベトナムを原産地とする蓼藍は、古来より世界各地で染色植物として栽培され、その藍色の美しさは現在まで人々の生活の中に溶け込み、発色の技法は歴史の中に伝承され、我が国でも徳島（阿波）、島根（出雲）をはじめ、伝統染色の技術が今なお受け継がれている。

他方、染料としての藍は、漢方薬としても古くより人々に親しまれ、鎮歯痛、解熱、解毒、消炎などさまざまな効能が知られている。これまでの研究で、藍の成分として、Indigo¹⁾、Indican²⁾、Indoxyl derivatives³⁾などの多くの種類

が単離されており、特に、その成分の薬効についてはTryptanthrin^{4) 5) 6)}の抗カビ、抗バクテリア¹⁾及び3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxy-3-O-β-D-glycopyranosideとkaempferol-3-O-glycopyranosideのadenosine diphosphateで誘導される人血小板の凝集阻害作用⁷⁾などが報告されている。

現在、天然の植物由来品の薬理作用が改めて科学的に見直されつつあるなか、我々は蓼藍 (*Polygonum tinctorium* Lour.) に注目し、藍に含まれる有用な生物学的活性物質の中、特に抗癌物質の存在について各種腫瘍細胞増殖抑制効果を指標

に検索を行った。その分離抽出した画分の中に、強い活性を持つ物質を発見し、その物質の単離を行った。その物質はすでに単離が報告されている Tryptanthrin であったが、この抗癌作用については未だ詳しい研究報告はない。我々はさらに詳しく我々の抽出分画物質と市販の Tryptanthrin について比較検討を行った結果、比較的強い腫瘍細胞増殖抑制効果と傷害効果を確認したので報告する。

実験材料と方法

1. 藍の各種腫瘍細胞に対する細胞傷害成分の単離と構造

1) 腫瘍細胞に対する細胞傷害成分の単離

島根県安来市で1996年7月に採集した蓼藍の地上部15kgをミンサーで破碎し、酢酸エチルで室温で抽出後、溶媒を減圧除去し酢酸エチルエキス(86.3g)を得た。この画分に腫瘍細胞増殖抑制効果を認めたので、更にこの酢酸エチルエキスをODSカラムクロマトグラフィーに供し、メタノール/水混合液にて分画を行い18画分を得た。その分画物の中から有効成分を含むODS Fr.6(2.58g)をメタノールに懸濁し、濾紙で濾過して沈殿と上清に分け、その上清をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供しクロロホルム/メタノール混合液にて分画を行った。その分画物の中で活性の強いSi Fr.4をメタノール中で結晶化し、物質 1(19.4mg, pur.96.3%)を得た。(Fig. 1)

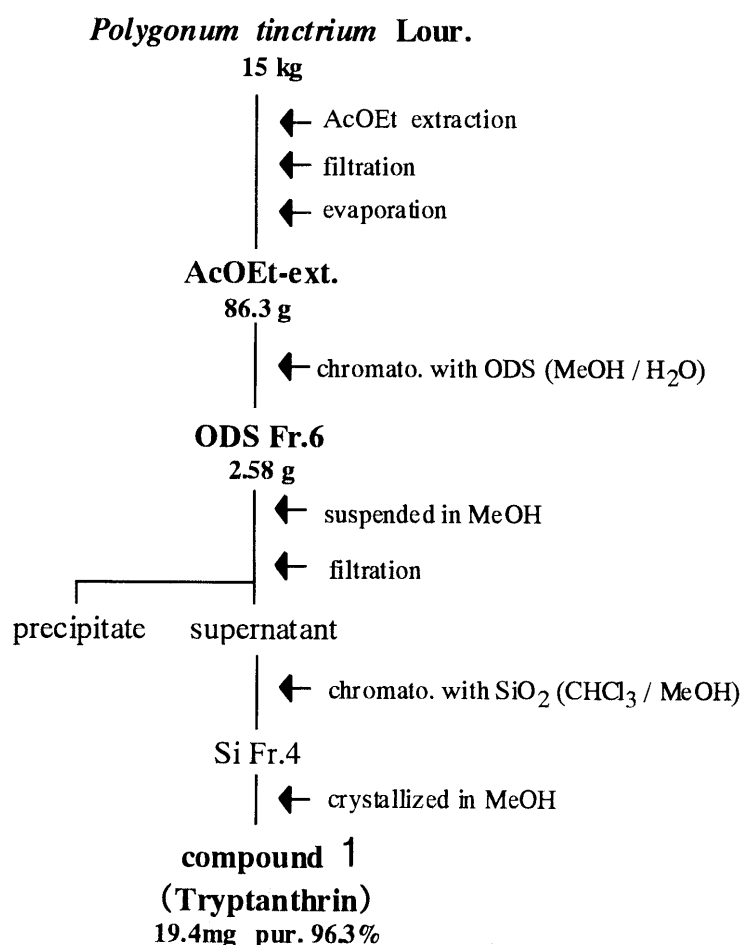


Fig. 1 Fractionation scheme for compound 1 (Tryptanthrin) from *Polygonum tinctorium* Lour..

2) 物質 1 の構造

FAB-MSは、VG ZAB-HF型を用い、 ^1H 及び ^{13}C -NMRスペクトルは、Varian UNITY INOVA600型を用いそれぞれ測定した。

物質 1 (Tryptanthrin) 茶色粉末。 ^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) = 8.48 (1H,d,J=7.9Hz,H-10), 8.32 (1H,d,J=7.7Hz,H-1), 7.95 (2H,J=3.7Hz,9.2Hz,H-3,4), 7.88 (1H,d,J=7.3Hz,H-7), 7.87 (1H,t,J=7.9Hz,H-9), 7.74 (1H,m,J=4.2Hz,H-2), 7.48 (1H,t,J=7.5Hz,H-8). ^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) = 182.4 (C-6), 157.6 (C-12), 146.4 (C-5a), 145.9 (C-4a), 144.9 (C-10a), 137.7 (C-9), 135.1 (C-3), 129.8 (C-4), 129.8 (C-2), 126.9 (C-1), 126.8 (C-8), 124.7 (C-7), 123.2 (C-12a), 122.2 (C-6a), 117.0 (C-10). HR FAB-MS m/z : 249.0694 ($(\text{M}+\text{H})^+$), calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2 + \text{H}$ 249.0664.

2. 各種腫瘍細胞に対する増殖抑制効果の測定

1) 藍分画サンプル調製法

各サンプルをDMSOにて10mg/mlに溶解したものをサンプル原液とし、それをさらに10% (v/v) FCS含有RPMI-1640培地にて50倍希釈し、テストサンプルとした。(サンプル濃度200 $\mu\text{g/ml}$ 、2% (v/v) DMSO/medium)

2) 培養ヒト腫瘍細胞と細胞懸濁液の調製

今回、スクリーニングには以下の3種の細胞を用いて検討を行った。

HL-60 (ヒト前骨髄性白血病細胞、浮遊系)

HGC (ヒト胃癌細胞、付着系)

HLC (ヒト肺癌細胞、付着系)

これらの細胞を10% (v/v) FCS含有RPMI-1640培地にて以下に示すそれぞれ適切な濃度に調製し、細胞懸濁液とした。

cell line	cell density (cells/ml)
HL-60(promyelocytic leukemia)	4×10^5
HGC(human gastric cancer)	4×10^5
HLC(human lung cancer)	2×10^6

3) 培養

96穴マイクロプレートに各サンプルを100 $\mu\text{l/well}$ 添加し、10% (v/v) FCS含有RPMI-1640培地で2倍段階希釈した。そこに細胞懸濁液を50 $\mu\text{l/well}$ 播種し、37℃、5% CO_2 にて48時間培養した。溶媒コントロールには2% (v/v) DMSO溶液を使用し、サンプルと同様2倍段階希釈した。

4) 増殖の測定

I. 付着系細胞 (Dye uptake法)

48時間培養後、25%グルタルアルデヒド溶液を20 $\mu\text{l/well}$ 添加し、15分間細胞を固定した。水洗後、0.05% (w/v) メチレンブルー溶液を100 $\mu\text{l/well}$ 添加し、15分間染色した。水洗で過剰な染色液を除き、よく乾燥した後、0.33N HClを200 $\mu\text{l/well}$ 添加し、プレートミキサーにてよく攪拌し、プレートリーダーにて吸光度 (620nm) を測定した。

II. 浮遊系細胞 (MTT法⁸⁾)

48時間培養後、MTT溶液 (5mg/ml in PBS) を25 $\mu\text{l/well}$ 添加し、37℃で4時間静置し、細胞溶解バッファーを100 $\mu\text{l/well}$ 添加し一晚静置後、プレートミキサーにて攪拌し、吸光度 (570nm/650nm) を測定した。なお、細胞の増殖は、control (無添加対照) を100%としたときの比率で示し、増殖抑制効果は50%増殖抑制濃度 (IC_{50}) で示した。

また、我々が得た物質 1 と市販のTryptanthrin (Sigma U.S.A.) について培養ヒト癌細胞と白血病細胞を用い各々の腫瘍細胞傷害活性を検討した。

5) 形態学的観察

物質 1 とTryptanthrinの腫瘍細胞傷害効果について両者の比較観察を行った。各種培養腫瘍細胞へそれぞれ200 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 、25 $\mu\text{g/ml}$ 、12.5 $\mu\text{g/ml}$ 、6.3 $\mu\text{g/ml}$ 、3.2 $\mu\text{g/ml}$ 添加し、24～48時間処理後、ギムザ染色を行い細胞の形態学的観察を行った。

また、アポトーシスの確認を目的として、細胞にTryptanthrin処理を行い、TUNEL法⁹⁾ による染色を行った。

3. 培養細胞でのDNA合成に及ぼす影響

市販のTryptanthrin (Sigma U.S.A.) を用いて、腫瘍細胞に対する細胞毒活性の機序について培養細胞でのDNA合成に及ぼす影響を測定し、検討し

た。

1) Tryptanthrinサンプル調製法

Tryptanthrin (Sigma U.S.A.) をDMSOにて5mg/mlに溶解したものをサンプル原液とし、それをさらに10% (v/v) FCS含有RPMI-1640培地にて100倍希釈し、テストサンプルとした。(サンプル濃度50 μ g/ml、1% (v/v) DMSO/medium)

2) 使用細胞及び細胞懸濁液の調製

スクリーニングに用いたHGC、HLC細胞に以下の5種類の細胞を加え、検討した。

U937 (ヒト単球性白血病細胞、浮遊系)

CCD-14Br(ヒト細気管支2倍体正常細胞、付着系)

C6 (ラット神経膠芽腫細胞、付着系)

Colon26 (マウス結腸癌細胞、付着系)

B-16 (マウス黒色腫、付着系)

これらの細胞を増殖抑制効果の測定と同様に培地にて適切な濃度(浮遊系は 2×10^5 cells/ml、付着系は 1×10^5 cells/ml) に調製し、細胞懸濁液とした。

3) 培養及び測定

培養は、増殖抑制効果の測定と同様に行ない、溶媒コントロールには1% (v/v) DMSO溶液を使用した。48時間培養後、 ^3H -Thymidineを10 μ g/well添加し、37℃、4時間培養後、 ^3H -Thymidineの取り込みを液体シンチレーションカウンター (ALOKA LSC-900) で測定した。

また、同時にMTT法にて細胞の増殖を測定し、増殖抑制効果についても検討した。

研究結果

1. 藍の各種腫瘍細胞に対する細胞傷害成分の単離及び構造

各種ヒト癌細胞2株(HGC、HLC) および白血病細胞1株(HL-60) を標的細胞として細胞増殖抑制効果の有無を指標に、Fig. 1の各分画に含まれる悪性腫瘍細胞に対する細胞傷害成分の存否についてスクリーニングを行った。その結果、単離された物質 1 に比較的強い腫瘍細胞増殖抑制効果がみられた (Table.1)。

Table. 1 Inhibitory concentration, 50% (IC_{50}) of AcOEt-ext., ODS Fr.6 and compound 1 on human solid cancer and leukemia. (MTT Assay)

cell line	IC_{50} (inhibitory concentration, 50%) (μ g/ml)		
	AcOEt-ext.	ODS Fr.6	compound 1
HL-60(promyelocytic leukemia)	24.9	21.2	4.2
HGC(human gastric cancer)	61.5	29.4	1.5
HLC(human lung cancer)	276.8	65.5	2.2

物質 1 は、FAB-MSで分子量は248であった。 ^1H 及び ^{13}C -NMRから8個の水素と15個の炭素がそれぞれ観察された。これらの結果と高分解能FAB-MSの結果より、その分子式を $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$ と決定した。分析結果の文献値⁵⁾との比較及び市販Tryptanthrin標品の ^1H -NMRスペクトルと一致がみられたことから、物質 1 をTryptanthrin [6,12-dyhydro 6,12-dioxindolo (2,1-b) quinazoline] と同定した (Fig. 2)。

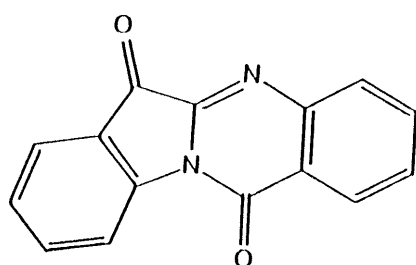


Fig. 2 Structure of compound 1 (Tryptanthrin).

次に、我々の抽出した藍に含まれる物質 1 と市販のTryptanthrinの腫瘍細胞傷害効果について比較した。両者共に細胞増殖抑制効果では比較的強い効果が認められ、我々の単離した物質 1 とTryptanthrinの作用効果はほぼ同程度であった。

2. 組織学的所見

形態学的観察では、物質 1 とTryptanthrinはそれぞれの癌細胞、白血病細胞に対して同濃度で著明な細胞傷害を示した (Fig. 3、Fig. 4、Fig. 5、Fig. 6)。すなわち物質 1 とTryptanthrinは共に著しいミトコンドリアの膨化と細胞質の空胞化を起し、アポトーシスが認められた (Fig. 4.B、Fig. 5.B、Fig. 6.B、Fig. 6.C)。

特に、ヒト癌細胞 (HGC、HLC) には物質 1、Tryptanthrin共に $25 \sim 12.5 \mu\text{g/ml}$ 、24時間処理で細胞膜の膨化、細胞質の空胞化 (ミトコンドリアの膨化) が著明にみられ、アポトーシスを誘発し (Fig. 4.B、Fig. 4.B)、癌細胞は死滅した。また、ヒト前骨髄性白血病細胞 (HL-60) でも物質

1 及びTryptanthrinに対して感受性が強く低濃度で傷害され、 $12.5 \mu\text{g/ml}$ 、24時間処理で細胞死を誘発し (Fig. 6)、 $6.3 \mu\text{g/ml}$ 処理でも多数のアポトーシスが観察された。TUNEL法による染色でもアポトーシスを確認できた。

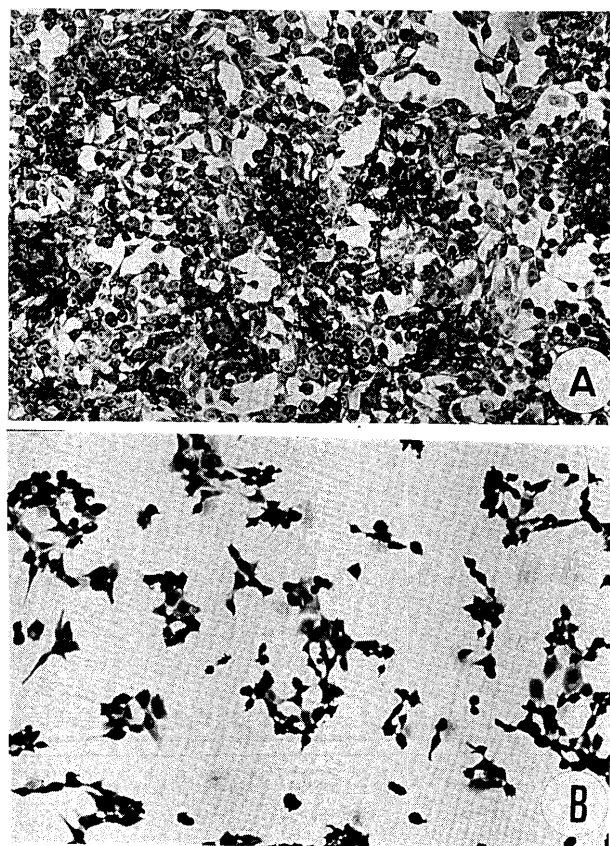


Fig. 3 Cytocidal effects of compound 1 treatment on HGC cells. (Giemsa stain)
(A) Control: untreated. ($\times 92.2$)
(B) Compound 1 ($12.5 \mu\text{g/ml}$) treatment for 24hr. ($\times 92.2$)

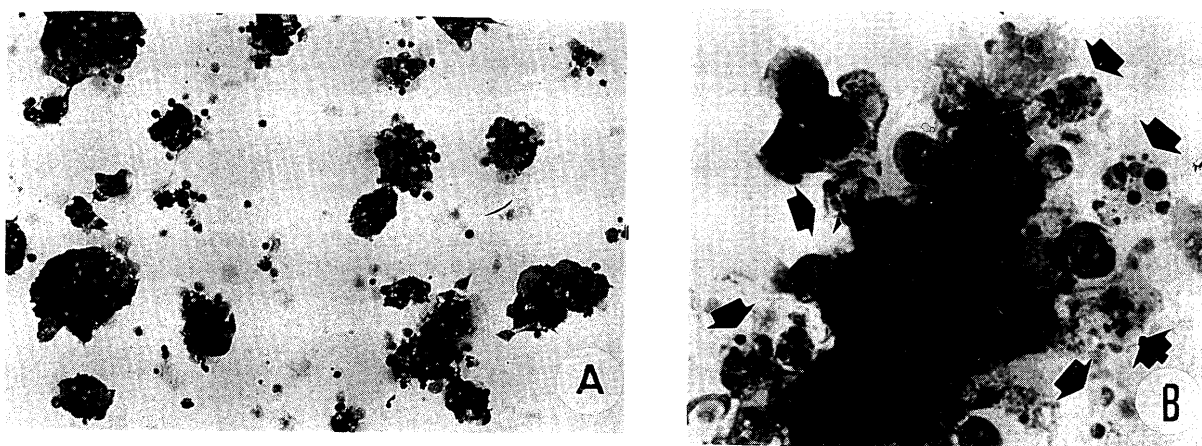


Fig. 4 Cytocidal effects of Tryptanthrin treatment on HGC cells. (Giemsa stain)
 (A) Tryptanthrin ($50 \mu\text{g/ml}$) treatment for 24hr. ($\times 92.2$)
 (B) Tryptanthrin ($100 \mu\text{g/ml}$) treatment for 24hr. Apoptotic cells can be observed (arrows). ($\times 369$)

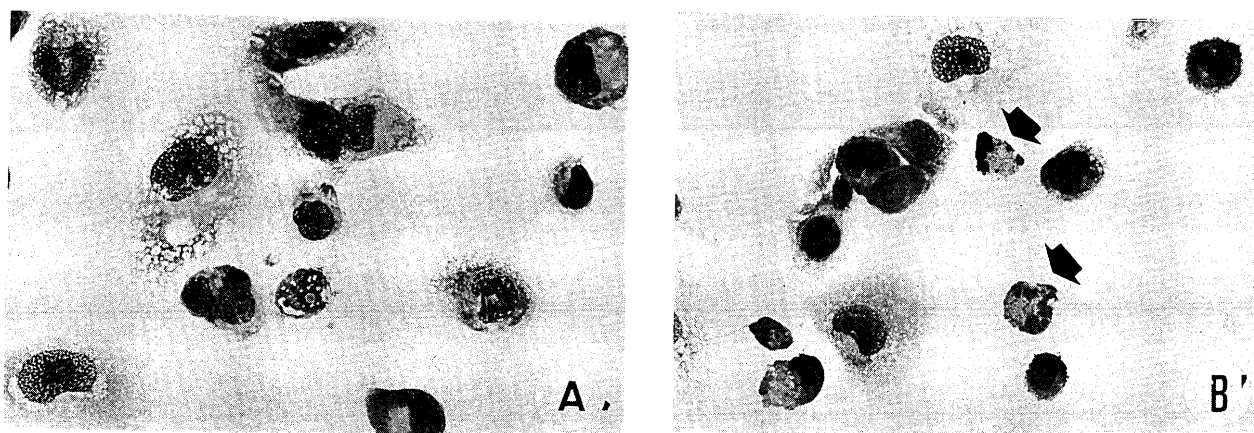


Fig. 5 Cytocidal effects of compound 1 treatment on HLC cells. (Giemsa stain)
 compound 1 ($25 \mu\text{g/ml}$) treatment for 48hr.
 (A) Swelling and vacuolation of HLC cells. ($\times 369$)
 (B) Swelling and apoptotic cells of HLC cells (arrows). ($\times 369$)

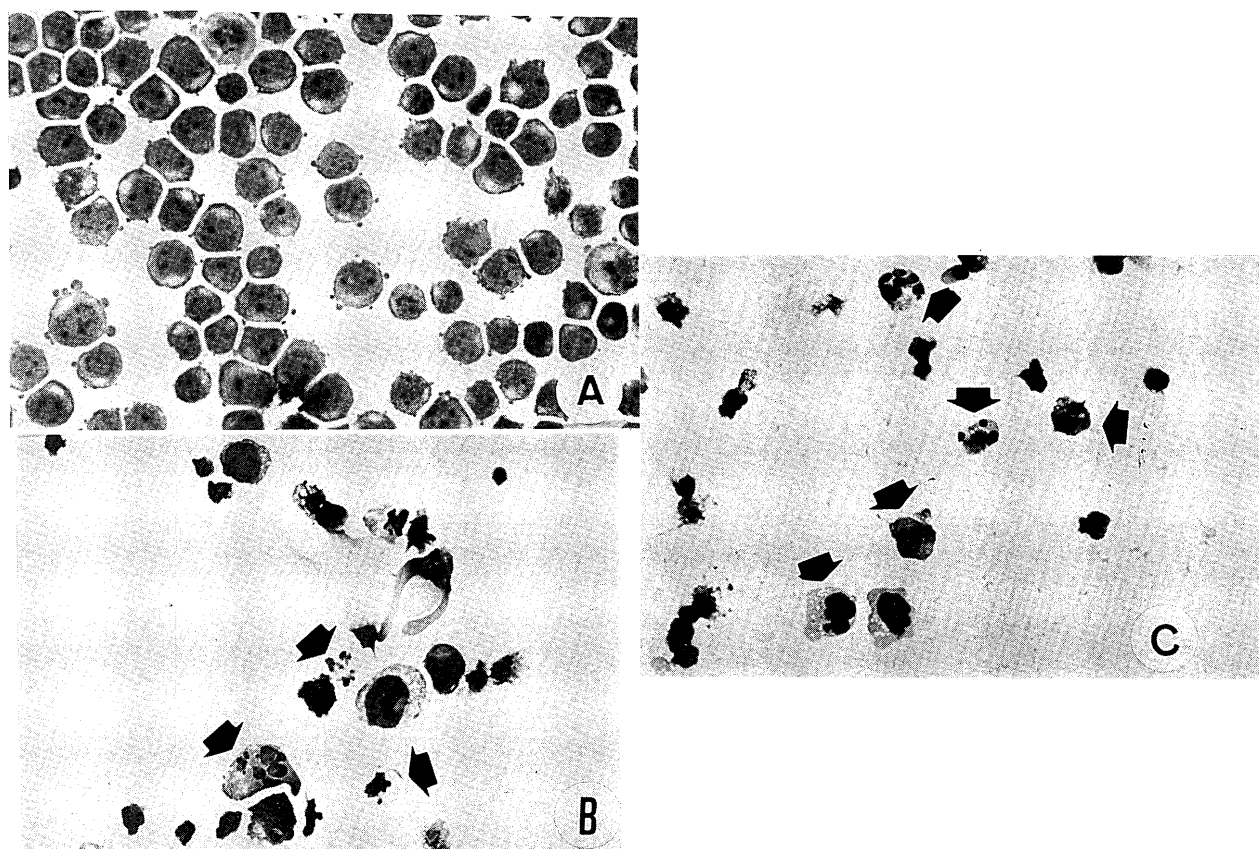


Fig. 6 Cytocidal effects of compound 1 or Tryptanthrin treatment on promyelocytic leukemia cells (HL-60). (Giemsa stain)
(A) Control: untreated. ($\times 123$)
(B) Compound 1 ($12.5 \mu\text{g/ml}$) treatment for 24hr. Cell vacuolation and apoptosis (arrows). ($\times 123$)
(C) Tryptanthrin ($25 \mu\text{g/ml}$) treatment for 24hr. Apoptosis of leukemia cells (arrows). ($\times 123$)

3. 培養細胞でのDNA合成に及ぼす影響

DNA合成に及ぼす影響の検討では、全ての培養腫瘍細胞でTryptanthrinの濃度依存的にDNA合成阻害作用が認められ、IC₅₀値はU937で $1.52 \mu\text{g/ml}$ 、Colon26で $1.54 \mu\text{g/ml}$ 、B-16で $1.08 \mu\text{g/ml}$ 、他の測定した腫瘍細胞で $0.78 \mu\text{g/ml}$ 以下であり、腫瘍細胞の種類によりそれぞれ異なるものの、約 $1 \mu\text{g/ml}$ 付近で著しいDNA合成阻害が認められた。これに対し、培養ヒト正常細胞 (CCD-14Br) ではIC₅₀= $5.05 \mu\text{g/ml}$ と腫瘍細胞と比較してDNA合成阻害は軽度であった (Fig.7)。

また、同時に測定したMTT法による細胞増殖抑制作用とではDNA合成阻害のほうが低濃度のTryptanthrinにより強い傷害を受け、Tryptanthrinによる腫瘍細胞の増殖抑制は、DNA合成阻害によるものであることが確認できた。

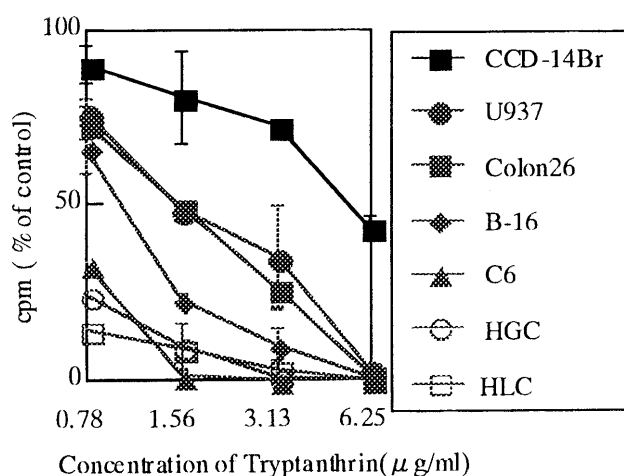


Fig.7 Inhibition of DNA synthesis by Tryptanthrin on normal diploid cell and various tumor cells. (^3H -Thymidine uptake)

考察

我々は、生藍に含まれる腫瘍細胞に対する傷害活性物質の検索を行い、Fig. 1に示すように各分画の腫瘍細胞増殖抑制効果をヒト由来の培養癌細胞（HGC、HLC）および白血病細胞（HL-60）を用いてスクリーニングしながら抽出した結果、物質 1 を得、この物質に比較的強い腫瘍細胞増殖抑制効果と傷害効果の存在を明らかにすることができた。構造解析よりこれをTryptanthrinと同定した。

今回検討を行ったヒト腫瘍細胞のうち、物質 1 及びTryptanthrinの各種腫瘍細胞増殖抑制効果において、白血病細胞（HL-60）で比較的強い効果が認められたと同時に、固形癌細胞（HGC、HLC）でもほぼ同程度の効果が認められた。

また、形態観察でも細胞質の空胞化とアポトーシスが認められ、両者による細胞傷害の所見は全く同じで、物質 1 の細胞学的変化はTryptanthrinによるものであった。腫瘍細胞傷害作用の機序については、細胞の膨化や空胞化の所見がまずみられることから、ミトコンドリアの傷害、DNA合成阻害が関与してアポトーシスを誘導するものと考えられる。また、Tryptanthrinによりヒト正常細胞でも傷害がみられたが、癌細胞や悪性腫瘍細胞などに比較して軽度であった。このことは、使用した正常細胞も試験管内培養細胞ではDNA合成を行い増殖しているためと考えられる。今後、癌移植したin vivoでの生体に及ぼす傷害を観察する予定である。

今回我々が腫瘍細胞傷害活性を確認したTryptanthrinは従来、抗癌剤として使用されている薬剤に比べ殺癌性は低いものの、長期使用が可能といった面で期待が持たれる。今後、動物実験による抗癌、抗白血病作用とともに副作用について検討を進めていく予定である。

結論

蓼藍より各種悪性腫瘍細胞をアポトーシスに誘導し、増殖抑制効果を持つ物質を抽出単離するこ

とができた。この活性物質はTryptanthrinであると同定し、DNA合成阻害物質であることを明らかにした。今後、更に藍の抗腫瘍効果をはじめ多方面における生物活性について研究を行う。

引用文献

- 1) N. Torimoto, *J. Chem. Educ.*, **64**, 332 (1989)
- 2) H. Wang, J. Li, W. Van, C. Yang, *Zhongyao. Tangbao.*, **13**, 651 (1988)
- 3) W. Maier, B. Schumann, D. Geoger, *Phytochem.*, **29**, 817 (1990)
- 4) D. Schrenk, D. Riebniger, M. Till, S. Vetter, H-P. Fiedler, *Biochem. Pharmacol.*, **54**, 165 (1997)
- 5) K. Seifert, W. Unger, *Z. Naturforsch.*, **49c**, 44 (1994)
- 6) E. Fiedler, H-P. Fiedler, A. Gerhard, W. Kellerschierlein, *Arch. Microbiol.*, **107**, 249 (1976)
- 7) H. Kohda, A. Niwa, Y. Nakamoto, O. Takada, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 523 (1990)
- 8) T. Mossman, *J. Immunol. Methods.*, **65**, 55 (1983)
- 9) Y. Takano, M. Saegusa, *Pathol. Int.*, **47**, 90 (1997)