

植物木質化合物・リグニン代謝物質 の Maus 癌組織に対する効果*

草薙昭雄・朝江陽子・影山 肇・笹隈哲夫

(文理学部生物学教室)

1 はじめに

維管束を持つ植物における組織の木質化は、細胞のリグニン前駆物質の生産、道管、仮道管、繊維の一次細胞壁の隅からのリグニンの堆積、中葉細胞間隙への拡大の過程として知られている。リグニンはフェニルプロパノイドを構成単位として複雑に重合した樹枝状構造をしており、天然ではセルロースその他の炭水化物と結合して存在し、細胞壁のセルロースミセルの中に充填し、組織を強固にするのに役立っている。筆者等は、木質化過程の細胞学的観察や、リグニン代謝物質を分裂細胞にとりこませる事による研究から、リグニン関連物質が細胞核の変性を引き起こし、選択的に細胞に死をもたらす事をつきとめ (Kusanagi & Yanagi 1971b)、これ等の物質の種々の遺伝子発現に対する調節機構について研究をすすめてきた。

最近、リグニン生合成過程の前駆物質の一つであるプロトカテキユアルデヒド (protocatechualdehyde, 正式には 3,4-dihydroxybenzaldehyde, 本文では略称として PA と呼ぶことにする) が単離、精製された。この PA を植物根端細胞に与えると、他のリグニン代謝物質で類似体であるキサランチドロール (xanthidrol) と同じように、この薬品の存在下で核分裂を通過し

A. Kusanagi, Y. Asae, H. Kageyama & T. Sasakuma. The effects of lignin precursors on the tumor growth in mice.

* 本研究の印刷出版がなされる前に急逝された草薙博士に心からの哀悼の意をささげます。

た姉妹細胞の一方の核が変形・退化に向い、核分裂終期の隔膜形成体、その後の細胞板の形成が完全に阻害されるため、二核性細胞が生じる事が観察された (Kusanagi & Yanagi 1971a)。このPAは植物細胞だけでなく動物培養細胞、バクテリア細胞にも分裂阻害効果がある事が判明し (Nishimura *et al.* 1981)、その作用は DNA 合成阻害剤であるヒドロキシウレア (hydroxyurea) と同様に、DNA 合成期 (S 期) の細胞のみ阻害効果がある事から、新たな DNA 合成阻害剤として考えられた (Nishimura *et al.* 1981)。

また PA は、チャイニーズハムスター肺由来の V79 細胞系や、ヒトの子宮上皮性ガン由来の EJ-1 細胞系では阻害効果があったが、ヒトの Hela 細胞系では顕著な効果がみられなかった事から、特殊組織細胞に対する選択的な分裂阻害効果がある事が示された。この事は、この薬品が制癌剤としての可能性を示すものである。すなわち、この化合物の DNA 合成が盛んに行われている癌細胞に対する特異的阻害効果が期待される。しかし、PA を含むリグニン関連物質をネズミに腹腔内投与すると急性神経性障害を引き起こす。また PA は生体内で急速に代謝分解され、細胞分裂阻害効果のない物質に変えられてしまう。この化合物を制癌剤として期待する場合には、副作用を回避できる投与法の開発、阻害効果のある分子構造の安定化等が求められる。

本研究は、リグニン関連物質の制癌剤への可能性を検討するための基礎研究として、PA およびその類似体プロトカテキュアルドキシム (protocatechualdoxime, 略称 PAX) を用いて、マウス癌組織に対する生体効果、投与法の開発を目的としたものである。

2 材料および方法

1) 投与薬品として用いたプロトカテキュアルデヒド (PA) およびプロトカテキュアルドキシム (PAX) は、東洋紡績株式会社総合研究所で精製され

たものを用いた。*In vitro* 系の実験によると、カテコール環のアルデヒド基 (-CHO) が強力な DNA 合成阻害効果を持つ事が示唆されているが、生体内では、デヒドロゲナーゼの存在によるアルデヒド基がカルボキシル基 (-COOH) に急速に転換され (Dacre 1968), その効果を失なう。そこで、アルデヒド基の保護のため、図 1 に示す PAX を合成した。PA および PAX は水溶性でないので、1% dimethyl-sulfoxide (DMSO) で溶解した後、タイロード・リンガー液で、最終濃度が 1~100mg/ml になるよう調整したものを処理液とした。連続静注法による血液凝固を阻止するため、処理液内に、最終濃度 1% のヘパリンソーダ注射液を (10U/ml) 付加した。

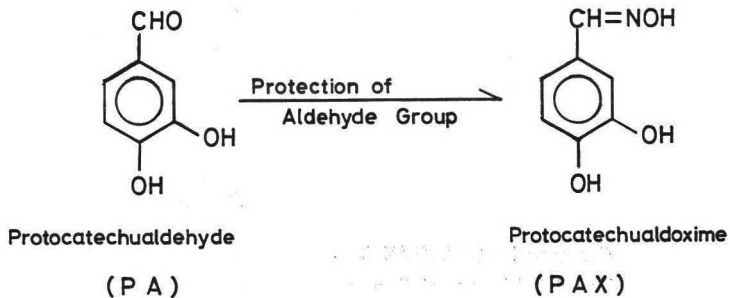


Fig. 1 Chemical structure of PA and PAX used in the experiment.

2)二種類のマウス癌組織を実験材料に用いた。一つはマウス C3H/Tw 系で横浜市立大学高杉教授によって確立 (高杉 1979) された副腎皮質癌で、精巣除去されたマウス C3H/Tw 系オスに継代移植して保持されていたものである。他の一系統はマウス ICR 系の未分化サルコーマで、この系統も、1982年に高杉研究室で確立された固形癌である。系統維持された癌組織 0.1cc 程の大きさのものを、精巣除去されたそれぞれのマウス系統に皮下移植し、六日後にガン組織の定着を確認した個体を処理実験に供した。

3)薬品の一般効果を調べるために腹腔内注射を試みた外は、PA, PAX の制癌効果を調べるために、高杉教授の開発された連続静注システムにより処理を行った (Takasugi *et al.* 1983 参照)。このシステムは、尾だけ外部に出るように工夫したケージ内のマウスの尾に注射器を固定しモーターを連動させる事により、常に薬品を静脈に注入できるようにしたもので、生体内で代謝速度が速く特続性の乏しい物質を投与しつづけられ、連続投与により副作用を減らしながら有効量を取りこませる事ができる。装置は注射液が24時間で1.8ml 注入されるように調節された。

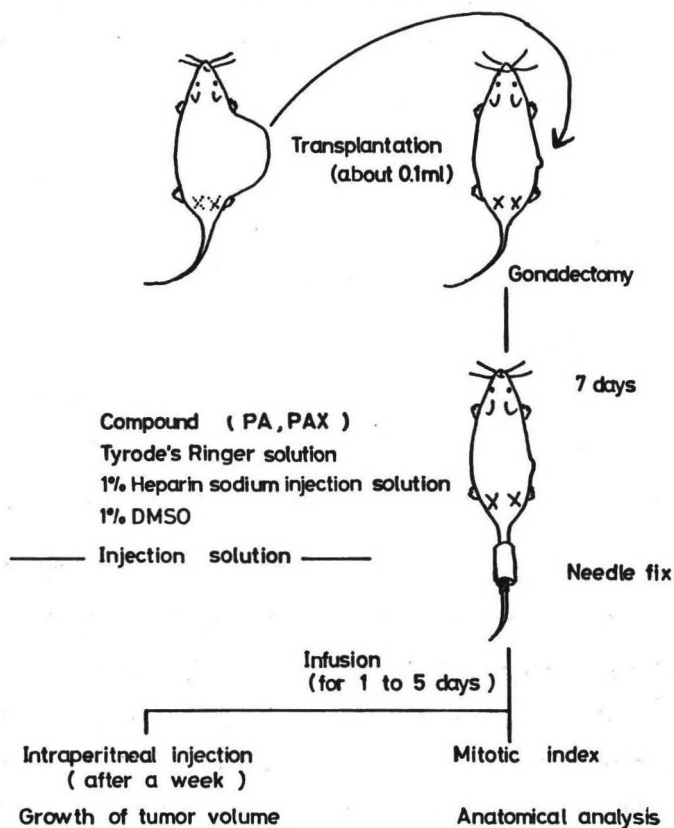


Fig. 2 Experimental scheme conducted in the present experiment.

以上の薬品，材料，装置を用いて癌を移植されたマウスへの延命効果，癌組織の増殖阻害効果を臨床的および組織学的に調べた。なお，癌組織の量的測定には，増殖した腫瘍の長軸 (a)，短軸 (b) の長さを *cm* で測定し， $\pi ab^2/6$ の式でその体積とした。また組織の増殖の度合は，H. F. Blum の細胞増殖指数 $K = \frac{\log V_2 - \log V_1}{t_2 - t_1}$ で求め，組織学的には，パラフィン包埋切片の癌組織の染色性と，細胞分裂指数 (mitotic index) を測定した。以上の実験計画は図 2 に示されている。

3 実験結果

1) PA および PAX のマウスに対する効果

生後10日の C3H/Tw 系マウスに 100mg の PA を腹腔内投与すると，マウスは激しい痙攣を起こし，やがて死に至る。この症状は，典型的な神経毒性の副作用と認められた。PA および PAX の半致死量 (LD₅₀) は各々 450mg/kg，400mg/kg であった。

連続静注の適性濃度を決定するため，PA の濃度を 5，10，20，30，70，100mg/ml にし，毎時 0.2ml の溶液を 6 時間かけて静注した。各区 4 匹のマウスを用いた結果，半致死値 (LD₅₀) は 40mg/ml であった。この場合，20 mg/ml 以下の濃度では顕著な神経毒性を示さなかったもので，以下の静注実験では，PA，PAX の溶液濃度は原則として 10mg/ml のものを用いた。

2) 連続静注による PA，PAX の副腎皮質癌に対する効果

生後10日の精巣除去マウスに副腎皮質癌組織を移植すると，癌組織の大きさは，移植後 15 日頃に約 1000 倍になり，平均して 33 日後に死に至る。10mg/ml の PA および PAX を連続静注する事により，それ等の投薬効果を調べた結果を表 1 に示す。この実験の場合，コントロールにはリンガー液を用いた。連続静注は，各々 6 日間行い，移植後 10 日，20 日，30 日の癌組

Table. 1 Effects of PA and PAX on tumor growth rate and surviving days in mice after transplantation of adrenocortical tumor.

Treatment	No. of mice treated	Growth rate ¹⁾ of tumor volume at			Surviving days after tumor transplantation
		10 days	20 days	30 days	
Control	5	200±48	2780±862	10770±1500	33.40±0.96
PA (10mg/ml)	15	97±8**	1392±410**	4714±772**	49.07±4.96**
PAX(10mg/ml)	8 ²⁾	110±6.6**	778±245**	4822±1620**	33.38±5.31

1) Relative volume of tumor when the initial volume is valued as 100.

2) Two of 10 PAX-treated mice never showed the growth of transplanted tumors, being excluded from the data of this table.

** : Significant at 1% level.

織の増加を測定し、また処理動物の生存日数を調べた。この実験条件下では、PA、PAXの神経毒性副作用は認められなかった。

癌組織の増殖に関しては、PA、PAXの両処理とも、有意な抑制効果がみられた。効果はどれも一様なものであり、薬品処理区の場合も、対照区を越えるものはみられなかった。また、PAX処理区に二例において、癌の増殖がまったくみられないケースがあった（表1の数値は、このケースを含めないで統計処理をしたものである）。生存日数に関しては、PA処理により約15日の延命効果がみられた。PAX処理による延命効果は、上記二列を除いては対照区との差はみられなかった。

移植後6日における薬品処理直後の癌組織を固定して、パラフィン切片法、ヘマトキシリン染色による組織学的観察を行った。癌組織は、周辺の葉状組織において盛んな増殖活性を示し、その細胞の分裂指数を表2に示す。PA、PAX処理により、分裂指数の40%近くの低下が示されており、また、低濃度(2mg/ml)のPA処理およびDNA合成阻害剤として知られている5-フルオロ・ウラシルでも、この癌細胞の分裂を抑制する事が示された。

Table. 2 Mitotic index in lobular area of adrenal tumor after treatments with some chemicals.

Treatment	No. of tissue observed	Mitotic index (mean \pm SE)	Dancan's test
Control	5	15.22 \pm 0.71	a
PA (2mg/ml)	3	11.12 \pm 0.47	b c
PA (10mg/ml)	5	10.33 \pm 0.19	c
PAX (10mg/ml)	5	10.56 \pm 0.62	c
5-FU(2mg/ml) ¹⁾	3	11.68 \pm 1.36	b

1) 5-fluorouracil which is known as an anti-cancer chemical.

3) 未分化サルコーマに対する PA, PAX の効果

副腎皮質癌の場合と同様な実験を, ICR 系マウスで確立された未分化サルコーマでも行った。未分化サルコーマでの組織学的観察から, この癌組織の増殖には, 図 3 に示すような, 三つのパターンがある。第一の型は, 組織移植後, ただちに細胞増殖がみられるもので, 移植後20日で大きさが5000倍以上になり, 個体を一ヶ月前後で死に至らしめる。第二の型は, 移

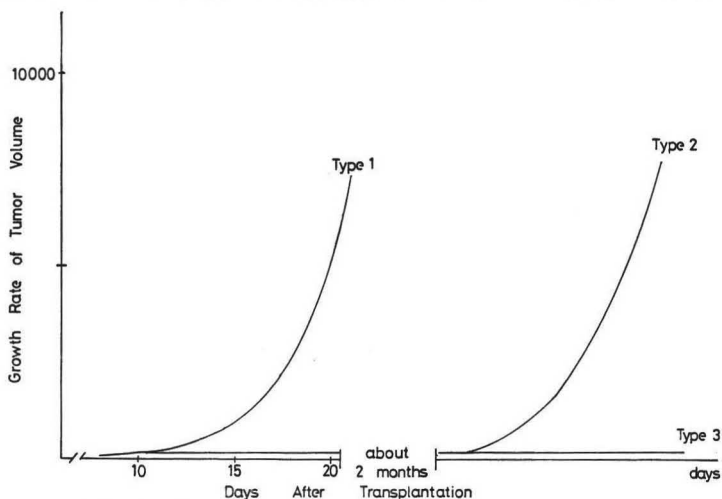


Fig. 3 Three types of tumor growth pattern of the undifferentiated sarcoma.

植後二ヶ月ほどの潜伏期間を持ち、やがて急速な増殖を開始するものである。第三の型は、三ヶ月以上たっても、増殖期に入らない型である。

PA および PAX を連続静注する事により、未分化サルコーマの増殖パターンを調べたものが表3 にまとめてある。コントロールでは25例中、半数以上が第三の型であったが、第一、第二の型も現われてくる。しかしPA, PAX 処理区では、一例を除いて全て第三の型であった。この事は、PA および PAX が未分化サルコーマの増殖開始を遅らせる効果がある事を示唆している。

Table. 3 Classification of growth types of the undifferentiated sarcoma transplanted into PA-or PAX-treated mice.

Treatment	No. of individual observed	Type-1	Type-2	Type-3
Control	25	4	4	17
PA (20mg/ml)	7	0	0	7
PAX (20mg/ml)	10	1	0	7

4 論 議

本実験において、植物から抽出してきたリグニン代謝物質が、動物の成体における特殊組織の増殖に阻害効果を持つ事が示された。リグニン代謝物質は、植物組織内においてはそれ自身、木質化物質であると共に、分裂細胞に働いて、細胞の選択的不活化をもたらす事が著者等によって示されていた。このリグニン代謝物質は、*in vitro*の実験により、S期に特異的な細胞分裂阻害剤である事が判明しつつある。著者等の未発表データではあるが、ウニの受精卵の卵割阻害に対するPA, PAXの効果を調べた実験では、PA, PAXの処理を行っても、卵割は8細胞期までは正常にすすむ。この事は、PA, PAXのS期分裂阻害は、細胞内の核酸前駆物質の合成阻

害によるものであろう事が示唆されている。

PAは生体内では、きわめて速く代謝される不安定な物質である事が調べられている（西村等 未発表）。それによると、マウス投与後のPAは、30分以内に90%以上がアルデヒド基のカルボキシル基化、および水酸基のメトキシ化の形で、イソワニン酸の形で排泄されている。上記のウニ受精卵の実験や *in vitro* の実験系によると、PAあるいはプロトカテキール環を持つグループのDNA合成阻害効果は、フェノール環上のアルデヒド基と、二つの水酸基の存在と位置が決定要因となっている事を示している。本実験で用いたPAXは、不安定なカルボキシル基の保護を行い、また、PAに比して神経毒性の副作用が少ない事からも、生体における阻害効果を調べるには適した合成物であると言える。

本実験で採用した連続静注システムは、急性の毒性副作用がある代謝上不安定な物質の生体実験には、きわめて有効な方法である事が示された。低濃度の処理が行え、しかも常に新しい溶液を投与できる事により、はじめてPA、PAXの癌組織に対する成体内での効果が明確になった。

今回の実験により、リグニン代謝物質が、マウスの制癌効果を持つ事が示された。もちろんこの事は、これ等の物質が制癌剤として応用開発される事を直接意味していない。実験条件上、扱った個体数にも限度があった。また、結果は、二例を除いてこれ等の薬品は、癌の増殖を完全に抑制するのではなく、その増殖期を遅らせるにすぎない結果であった。今後連続投与を間隔をおいてくりかえし行う等の改良を加えて試みる必要がある。

5 謝 辞

本実験の装置、材料等を提供していただき、指導をいただいた横浜市立大学高杉教授と、内分泌研究室の諸氏に、心から御礼申し上げます。

6 引用文献

- Kusanagi, A. and T. Yanagi. 1971a. Preferential nuclear inactivation and deformation following xanthidrol treatment. *Protoplasm* 72:119-128.
- Kusanagi, A. and T. Yanagi. 1971b. Differentiation between sister cells in plants, with special reference to degeneration of one of the sister nuclei. *Symp. Cell Biol.* 22:67-79.
- Nishimura, M., M. Umeda, A. Kusanagi, R. Urakabe, K. Yukimatsu and S. Otawara. 1981. Anti-proliferative activity of protocatechualdehyde on chinese hamster cell growth in culture. *Gann* 72:272-279.
- Nishimura, M. 1981. Effect of benzaldehyde, catechol and their analogues on cultured mammalian cells. Dr. Thesis, Kyoto Univ.
- Takasugi, N., M. Tanaka and C. Kato. 1983. Effects of continuous intravenous infusion of diethylstilbestrol into pregnant mice on fetus: Testicular morphology at fetal and postnatal period. *Endocrinol. Japon.* 30:35-42.