

食用菊中ガン細胞増殖抑制物質の単離と同定

若 生 豊*・谷 川 晶 彦**

Purification and structural analysis of substances in edible chrysanthemum flowers that suppress the growth of HL-60 human leukemia cells

Yutaka WAKO* Masahiko TANIKAWA**

Abstract

A large number of data from epidemiologic and rodent studies has demonstrated that ingestion of vegetables and fruits is occasionally beneficial for reduction of cancer risks in humans. Thus, chemoprevention with food phytochemicals including minor dietary ingredients (food factors) is currently regarded as one of the new important scientific fields. Recently we found that the extract of chrysanthemum have anticancer effect as strong as that of tea flavonoid. In this paper we demonstrated the isolation and structural analysis of anticancer active substance from methanol extract of chrysanthemum. Potent cell growth suppressive compound designated D1 was isolated as major active component of chrysanthemum by successively chromatography on open column packed with ODS resin, and on 2 step reverse-phase HPLC in a Mightysil RP-18 column and a TSKgel ODS-80Ts column. The compound of D1 inhibits the proliferation of HL-60 cell distinctly (GI_{50} ; 19.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Examination by TOF-MS yielded a molecular weight of 539.1144 with a chemical composition $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}\text{Na}$. By using ^1H , ^{13}C , NMR we have identified 3,5-di-*o*-caffeoylquinic acid as one of suppressive components on the growth of HL-60 cell.

Key words: Chemoprevention, Anticancer effect, Chrysanthemum, Flavonoid, Phytochemical

1. はじめに

現在我が国は世界一の長寿国となった。しかし、人口の高齢化が進むのに従い 1981 年以降ガンが死因の一位を占めるようになってきている。かつてない高齢化社会を迎える日本にとってガン対策は国民的課題と言えよう。ガン対策は予防・診断・治療の三本柱からなり、現在後の二者の分野はかなり進歩し、ガン患者の半分以上は五年以上の生存が可能になった。ところが、ガンの予防に関しては学問的にも実際的にもまだまだ未熟の段階にあるといわざるをえない。30 年ほど前まではガンは予防の対象とはならない疾病であろうとの考え方が支配的であった。しかし様々な疫学研究が進められ、ガン発症と生活習慣の間に相関が見出されるようになり、これらを改善することでリスクを低下できるのではないかと考えられるようになり、国立ガンセンターからは生活改善の指針となる「ガン予防 12ヶ条」も提唱されている。一方、予防物質を積極的に投与・摂取することによるガンの発生および進行の阻止を目的とした取り組みも始められている。すでに数種の医薬品がガン予防薬として認可されているものの、予防の対象としてはガン切除後の再発予防に限られ、副作用も大きく健常者へ適応可能なものは未

だない。また、食物因子には発ガンリスクを増大するものが発見されると同時に予防の可能性が示されるものも多数報告されている。とくに植物成分の研究に注目が集まり、1990 年から 1993 年にかけては米国国立癌研究所 (NCI) による大規模な研究が実施された (デザイナーズフード計画)。この研究は非常に多数の物質を抽出し、それらの薬理・生理機能を調べるきっかけとなり、引き続き数多くの食品成分がそのガン予防効果の可能性について精力的な検討が展開されている。残念ながら現在、食品由来の成分がある明確な証拠をもってガンを予防したという研究例はまだない。しかし、多くの研究者はガン予防効果を有する物質は存在するものと予測している。そのような物質は健常者が、副作用なく継続して長期に摂取可能なものであり、ガン予防において重要な発見となる。食品によるガン予防の可能性を立証するためにはヒトを対象とした介入試験が重要で、これまでの研究で見出されてきた物質の中からとくに可能性のあるものが選ばれ、介入試験による多くの検討プログラムが進行している。それとともに、新たな構造や作用機序を持つガン予防物質の発見も重要と考えられる。本研究では食用菊花弁中に未知のガン細胞増殖抑制活性を見出したので、食品のガン予防の可能性に関する考察の手がかりを求める目的から、その構造・作用機序の解明を試みた。

平成 15 年 12 月 26 日受理

* 生物環境化学工学科・教授

** 大学院工学研究科機械システム工学専攻博士前期課程・2 年

2. 実験材料・方法

2.1 試験試料

キク (Chrysanthemum: Compositae chrysanthemum morifolium), シュンギク (Garland chrysanthemum: Compositae chrysanthemum coronatum), ニンニク (Garlic: Liliaceae allium sativum), リンゴ (Apple: Rosaceae malus domestica), ホウレンソウ (Spinach: Chenopodiaceae spinacia oleracea) シソ (Perilla: Lamiacea perilla frutescens) を試験試料として用い、市販のものを準備した。これらはホモジナイズした後 80% メタノールで抽出し、ろ液を減圧濃縮した。凍結乾燥後、水またはエタノールにそれぞれ再溶解し試験試料とした。

2.2 ガン細胞増殖抑制活性試験

ガン細胞増殖抑制活性評価には東北大学細胞資源センターより供与された、ヒト前骨髄性白血病 (Periph, bloodpremyelocytic leukemia) 由来細胞の HL-60 を用いた。培地は RPMI-1640 培地 (GIBCO) に 10% 牛胎児血清 (FBS), 5% 抗生物質を添加したものをを用いた。培養は炭酸ガスインキュベーター (CPD-170, ヒラサワ) にて 37°C, 5% CO₂ の存在下で行った。増殖抑制活性評価は新本等¹⁾の方法に従った。始めに細胞を 3~4 日間前培養し対数増殖期の細胞を準備する。この細胞を濃度 20 × 10⁴ cell/ml に調製し、増殖抑制活性評価に使用した。96 穴マイクロカルチャープレートに細胞を 100 μl ずつ分注し、これに試験試料を 10 μl ずつ終濃度が 5~1,000 μg/ml になるように加え培養を行い、翌日から 5 日間細胞の増殖経過を観測した。生細胞数の計測は MTT 法により行い、培養液の吸光値より求めた。測定には新規テトラゾリウム塩 WST-8 [2-(2-Methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetra-zolium, monosodium salt] を採用した Cell counting kit-8 (DOJINDO) を用いた。培養液の 450 nm の吸光値はマイクロプレートリーダー (MPR-A4i, 東ソー) で測定した。抑制能力はガン細胞の増殖を 50% 抑制するときの濃度 (GI₅₀), および 100% 抑制するときの濃度 (TGI) により評価した。

2.3 活性物質の分離・精製

凍結乾燥した菊抽出物から逆相系のオープンカラムおよび HPLC を用い活性成分の分離・精製を行った。逆相シリカ樹脂 (LP-60C18, 和光純薬製) を 50 × 110 mm のカラムに充填し、水-メタノール-ギ酸 (41:38:1) の溶離液にて平衡化した。菊の凍結乾燥試料を溶離液に溶解してカラムに乗せ流速 1 ml/min で逆相分離した。溶出液を 9 ml ずつフラクションコレクターにて分取した。

高速液体クロマトグラフィーは LC-10 システム (島津

製作所製) を使用した。カラムは ODS 系の Mightysil RP-18 (10 × 250 mm, 関東化学) および, TSKgel ODS-80Ts (4.6 × 250 mm, 東ソー) を用いた。精製は 2 液による濃度勾配溶出にて行い, A 液は 0.2% ギ酸溶液, B 液はメタノール-アセトニトリル-水混合液 (9:9:2) とした。A 液: B 液 (72:28) で 30 分間保持した後, B 液濃度を 10 分間で 28% から 70% まで直線的に上昇させ溶出を行った。流速はそれぞれ 3 ml/min および 0.7 ml/min とした。

2.4 構造解析

質量分析は TOF-MS (QSTAR Mass spectrometer, Applied Biosystems) を用い実施した。標準物質は dioctyl phthalate (m/z 391.2842), recerpine (m/z 609.2806) を用いた。イオン化法は electron spray ionization (ESI) 法による positive ion mode で測定した。

¹H および ¹³C 核磁気共鳴分光分析 (以降 NMR と略記) は AVANCE DRX-400 spectrometer (Bruker) を用い CD₃OD (重アセトン) 溶媒中で測定を実施した。標準物質は Tetramethylsilane (TMS) を用いた。

2.5 電気泳動による DNA 断片化観察

DNA 断片化の観察は電気泳動によりアポトーシスアッセイキットテストワコー (和光純薬) を用い行った。被験試料で処理した細胞 1~100 × 10⁴ 個を遠心 (800 × g) により集め, それを Protein Digestion Enzyme Solution で細胞溶解した後, 核 DNA を抽出した。イソプロパノールを加えて DNA を沈殿させ回収し, エタノールで洗浄の後電気泳動用のサンプルとした。1.5% アガロースゲルの各ウェルに DNA サンプル 10 μl と Loading Buffer 2 μl を入れ, TAE 緩衝液中で 100V, 40 分間泳動をおこなった。泳動後, エチジウムブロマイドにより DNA の染色を行ない, UV トランスイルミネーター (Kodak 製) 上で検出波長を 312 nm とし, 観察を行なった。

2.6 細胞の顕微鏡観察

被験試料で処理した細胞はトリパンブルーで死細胞を染色し形態学的変化を倒立型培養顕微鏡 (IX70, OLYMPUS) にて観察した。

3. 結果と考察

3.1 食品のガン細胞増殖抑制活性

これまでガン予防の可能性が示唆されている野菜類, および本県の代表的果実であるリンゴの抽出物のガン細胞増殖抑制活性を食用菊花弁のそれと比較した (表 1)。ニンニクのガン細胞増殖を 50% 抑制する濃度である GI₅₀ は 45 μg/ml と測定され強い抑制活性を示した。ニ

表1 ガン予防の可能性が示唆される食品および食用キク抽出物のガン細胞 HL-60 に対する増殖抑制活性

Sample	GI ₅₀ (μg/ml)	TGI (μg/ml)
Chrysanthemum	108	345
Garland chrysanthemum	120	315
Apple	5,142	N.D.
Garlic	45	74
Spinach	2,125	N.D.
Perilla	1,734	5,714

GI₅₀: ガン細胞の増殖を50%抑制するときの試料濃度
TGI: ガン細胞の増殖を100%抑制するときの濃度

ニンニクはデザイナーフード計画において最も高いガン予防効果の可能性を有する食品と位置付けられている。ニンニクには多数の有効成分が存在し、多くは含硫化合物でアリルスルフィド類であり、ガン細胞増殖抑制活性成分もこれらの一連の化合物に由来するものと考えられる。キク花卉抽出物 (GI₅₀; 108 μg/ml) とシュンギク抽出物 (GI₅₀; 120 μg/ml) は同程度の GI₅₀ を示し、ニンニクに次ぐ強い有意な活性を持つことが確認された。これらの植物は十字架植物でクロロゲン酸類が抗酸化活性などの活性成分として知られている。今回見出しているキク抽出物中の抑制活性もクロロゲン酸類による可能性が考えられた。一方リンゴ抽出物の増殖抑制活性はこれらの抽出物と比べ1~2オーダー低い値であった。

しかし、これら食品の活性は治療に用いられる抗ガン剤の抑制活性に比べると、数オーダー低い値である。抗ガン剤の顕著な効果の多くは、それらが直接細胞の遺伝子を攻撃して障害を引き起こすことによる。マイトマイシンCはDNA塩基の間に入り塩基と結合することによりDNA鎖を架橋する。プレオマイシンはDNA鎖を切る。これらの影響は甚大で細胞は死滅し、ガン細胞以外の正常細胞へも多大な影響を及ぼすことから強い副作用を示す結果となっている。それでは、抗ガン剤より遥かに微弱な活性しか持たない食品成分がガン発症の予防効果を示し得る可能性があるかが課題である。ガン発症に至るまでには幾つかのステップが想定されている。遺伝子へ変異が蓄積し、変異した細胞がガン化する。変異を生じた細胞は頻繁に発生するが、その際生体は発ガンを回避する二つの防御機能を発揮しガン化を防止している。変異細胞を正常細胞へ修復し直す働きかけと、逆に変異の進んだ細胞へは積極的な死を誘導する働きかけである。このような意図を持って計画に従った死はアポトーシス死と呼ばれ死に至る戦略には複数の類型が存在する。ここで取り上げたガン予防効果が考えられている食品成分にはこのアポトーシス死誘導活性が認められている。従って活性は微弱ではあるが、ガン化の抑制に介在するアポトーシス死を誘導することより食品のガン予防の可能性を説明する活性メカニズムの一候補として検討が進行している。食用キク抽出物のガン細胞

増殖活性の詳細については未だ不明の点が多いことから、本研究では活性成分の特定とガン細胞への作用について検討を行った。

3.2 HPLCによる増殖抑制成分の検討

デザイナーフード計画においては、疫学的に抗ガン作用の可能性が考えられる食品についてそれらの成分が精力的に調査され多数の化合物の構造が明らかにされた。野菜・果実類の活性成分としては環状構造と多数の水酸基をその特徴とするポリフェノール類がその多くを占めている。図1に今回ガン細胞増殖抑制活性を測定し

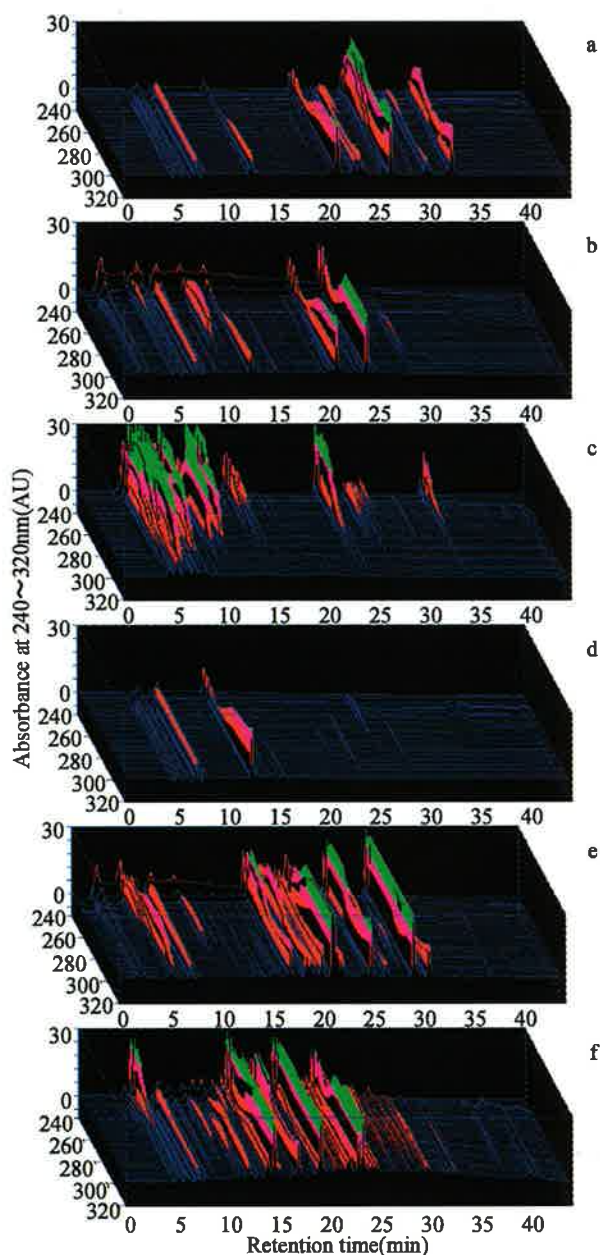


図1 ガン予防の可能性が示唆される食品および食用キク抽出物のフォトダイオードアレイによる高速液体クロマトグラフィーパターン (a: キク, b: シュンギク, c: ニンニク, d: リンゴ, e: ホウレンソウ, f: シソ)

た食品抽出物の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析結果を示した。この HPLC 分析では複数波長を同時に測定できるフォトダイオードアレイにより 240, 260, 280, 300, 320 nm の 5 波長の同時観察を行った。クロロゲン酸類化合物は野菜類に広く分布しており、キク花卉、シュンギク抽出物 (図 1a, b) の流出時間が 25 分までに出現するピークは標準物質のクロロゲン酸のピーク波長パターンと良く一致しこれらの成分がクロロゲン酸類であることが示唆された。しかしキク花卉抽出物でみられる 25 分以降のピークはクロロゲン酸のそれとは波長パターンが異なった。ハウレンソウ、シソ抽出物の主要なピークにはクロロゲン酸類似のものは認められなかった。ニンニク抽出物では何れのピークにおいてもその紫外吸収域は、280 nm より短く 240 nm 付近に極大吸収があり、アリルスルフィド類の特徴を示している。またリンゴ抽出物のピークはタンニン類のポリフェノールによるものと思われる。

キク抽出物には流出時間が 25 分までに出現する成分とそれ以降の成分に大別される。データは示さないが各主要ピークについてガン細胞増殖抑制活性の予備的検討により流出時間が 25 分までに出現するピークに顕著な活性のあることが判明し以後これらの中から活性成分の分離精製を試みた。

3.3 分離・精製と構造解析

逆相樹脂 LP-60C18 のオープンカラムによる菊抽出物の分離結果を図 2 へ示す。ここでは先の HPLC で観察した流出時間が 25 分までに出現する成分が 4 つのピー

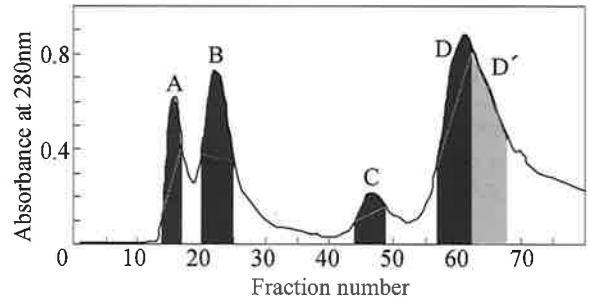


図 2 キク抽出物の逆相樹脂 LP-60C18 クロマトグラフィーによる分離プロフィールと分取画分

表 2 キク抽出の逆相樹脂 LP-60C18 による分離画分のガン細胞増殖抑制活性

Sample	GI ₅₀ (μg/ml)	TGI (μg/ml)
A	100	403
B	48	186
C	38	N.D.
D	16	56
D'	18	55

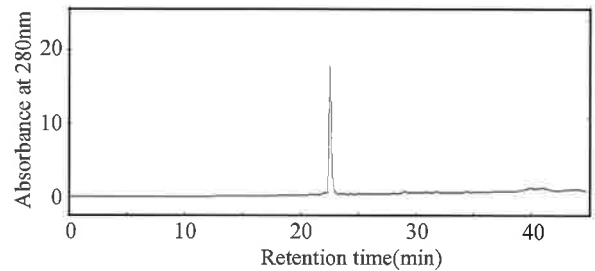


図 3 単離精製試料 D1 の HPLC パターン

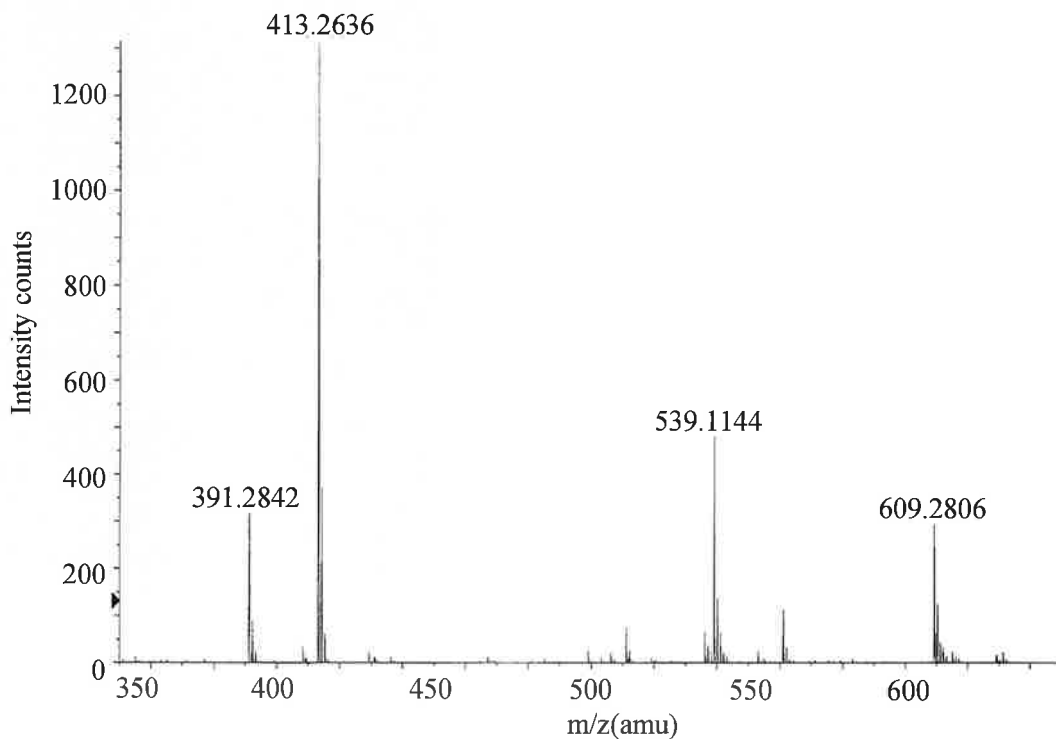


図 4 単離精製試料 D1 の TOF-MS スペクトル

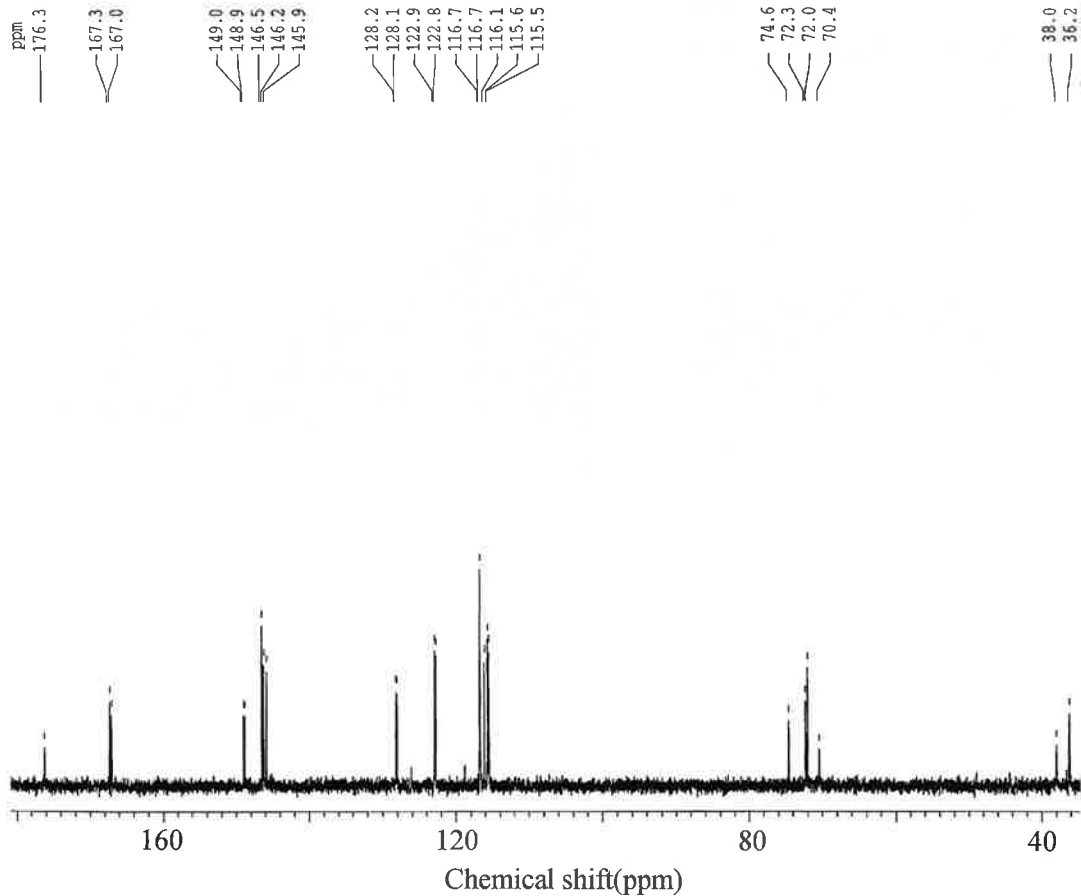


図5 単離精製試料D1の¹³C NMR スペクトル

クに分離されA～D画分とした。各画分のガン細胞増殖抑制活性を表2へ示す。主要な成分であるD画分のGI₅₀は16 μg/mlと最も強い活性を示した。B, C画分の活性はD画分より弱く (GI₅₀; 48 μg/ml・38 μg/ml), 最初に溶出されるA画分に活性は認められなかった。以後D画分から活性成分の精製を目指すこととした。D画分を回収しHPLCにより逆相系カラムMightysil RP-18を用い精製した後,引き続きTSKgel ODS-80Tsで2回目の精製を行い活性成分を単離した(図3)。

単離した活性成分は構造検討のため東京理科大学の菅原教授へ送付し,質量分析と核磁気共鳴による解析を依頼した。質量分析はTOF-MSにより行ない,そのスペクトルチャートを図4に示す。分子イオンピークの質量数は539.1144の値を示し,それより可能な組成式としてC₂₅H₂₄O₁₂が推定された。これがクロロゲン酸類縁化合物とする場合その化合物はクロロゲン酸へさらにもう1つのcaffeoyl基の加わった3,5-di-o-caffeoylquinic acid(イソクロロゲン酸)の可能性が強く示唆された。核磁気共鳴スペクトルの解析結果はM. Kodama等²⁾の報告しているイソクロロゲン酸スペクトルデータ(phytochemistry 47, 371-373, 1998)と比較し検討を行った。重水素化アセトン中の¹Hおよび¹³Cのデータを比較した(図5)。以下に示す¹³C NMR ケミカルシフト値(δ)は

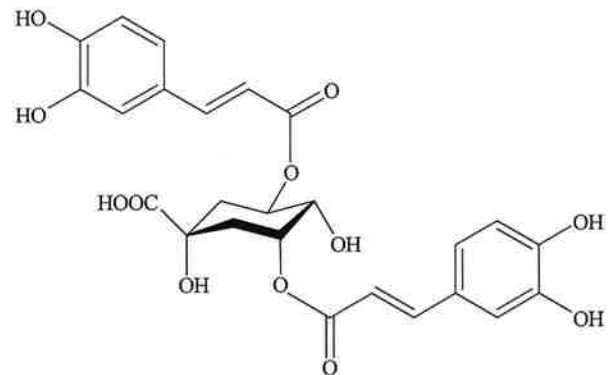


図6 単離精製試料D1の化学構造

ほぼ完全に一致し単離化合物はイソクロロゲン酸と推定し,その構造を図6に示した。¹³C NMR (δ): 74.6 (C-1), 38.0 (C-2), 72.0 (C-3), 70.4 (C-4), 72.3 (C-5), 36.2 (C-6), 176.3 (C-7) (quinic acid); 167.0, 167.3 (C-1'), 116.7, 116.7 (C-2'), 146.2, 146.5 (C-3'), 128.1, 128.2 (C-4'), 115.5, 115.6 (C-5'), 148.9, 149.0 (C-7'), 116.1 (C-8'), 122.8, 122.9 (C-9') (caffeoyl groups)。

3.4 キク花弁由来イソクロロゲン酸のガン細胞増殖抑制活性とアポトーシス誘導能

キク花弁中の主要な活性成分の1つはイソクロロゲン

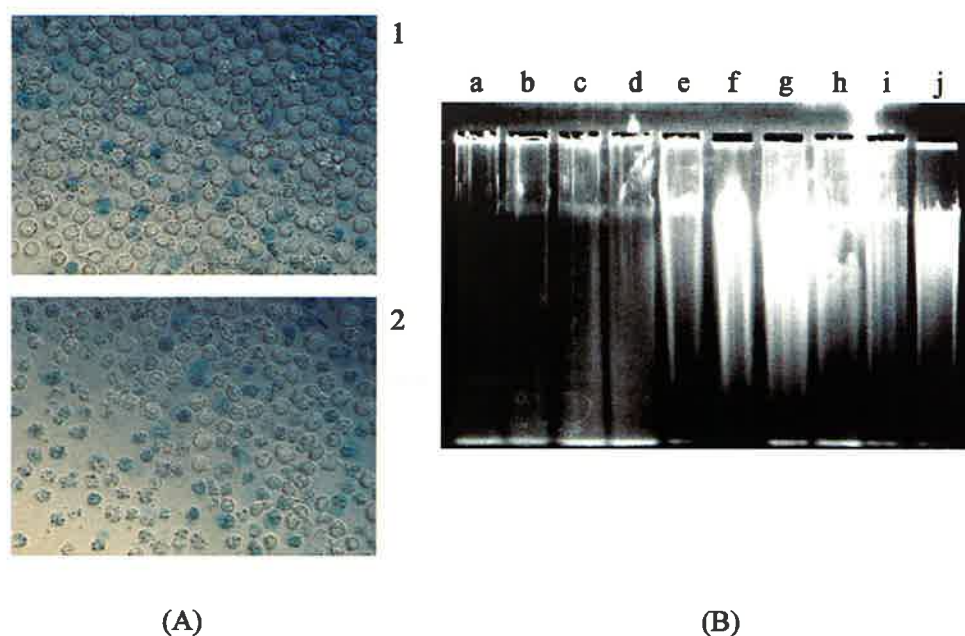


図7 単離精製試料D1のHL-60細胞に対するアポトーシス誘導作用
 (A) D1 (1) およびクロロゲン酸 (2) 処理細胞の位相差顕微鏡像
 (B) DNAの断片化作用
 a: 対照, b, c, d: マイトマイシンC (0.02, 0.05, 0.1 $\mu\text{g/ml}$), e, f, g: クロロゲン酸 (25, 40, 50 $\mu\text{g/ml}$), h, i, j: 試料D1 (10, 25, 45 $\mu\text{g/ml}$)

酸であることが推定された。イソクロロゲン酸とクロロゲン酸の活性を比較した結果、それぞれ GI_{50} は 19.3 $\mu\text{g/ml}$ および 19.9 $\mu\text{g/ml}$ とほとんど変わらない値であり、イソクロロゲン酸で1つ増えている caffeoyl 基は活性へ影響を及ぼしていない。培地にイソクロロゲン酸を加え培養した HL-60 細胞の形態変化を位相差顕微鏡で観察した。イソクロロゲン酸 73.4 μM (39.6 $\mu\text{g/ml}$), 72 h 処理した HL-60 細胞の顕微鏡像を図 7.(A)1 へ示す。トリパンブルーで染色された死細胞が多数観察され、死細胞の中に複数の細胞塊へ分裂した像が観察されアポトーシス死の特徴が認められた。図 7.(A)2 へクロロゲン酸と同様の条件で処理した細胞像を示す。これらの像とイソクロロゲン酸処理細胞の像の比較では相違は認められず、同様の形態変化が示されている。また、アポトーシス死はクロマチン DNA の断裂が特徴であり、電気泳動による DNA 断片化の検討を行い結果を図 6 に示す。イソクロロゲン酸処理細胞の DNA の電気泳動像では低分子化した DNA が原点からフロント方向へ連続的な帯(ラダー)を形成しクロマチン DNA の断片化が確認された。クロロゲン酸類を含むシュンギク抽出物およびタンニン類のポリフェノール類を含むリング抽出物で処理した細胞の DNA も同様のラダーが観察されたが、抗ガン剤のマイトマイシンCで処理した細胞の DNA は帯の形成が薄く、断片化の程度がより進行した像を示し、食品成分処理の電気泳動像とは異なっていた。

4. おわりに

本研究ではキク花卉中にガン細胞増殖抑制活性を見出し、その主要な活性成分の1つについて分離・精製・構造解析を行い、3,5-*di*-*o*-caffeoylquinic acid (イソクロロゲン酸)であることを明らかにした。イソクロロゲン酸はシュンギクをはじめ、植物に広く存在する化合物で新規なものでは無く、ガン細胞増殖抑制活性や細胞死誘導の特徴もクロロゲン酸とほぼ同一と考えられた。イソクロロゲン酸には顕著な抗酸化活性³⁾や抗ウイルス活性²⁾などが報告されている。クロロゲン酸やイソクロロゲン酸のガン予防の可能性に関する臨床的な報告は無い。しかし、キク花卉に含まれる triterpene diol 類がガン化のリスクを低減する抗プロモーション活性を示すことが明らかにされている⁴⁾。ガン予防の可能性を推測する場合、その効果がアポトーシス死誘導能によるのか、抗酸化活性が体内の酸化ストレスを緩和しこれを介した効果によるのか、全くほかの原因によるのかについては不明である。また抗酸化作用は両刃の刃であり、原理的に酸化抑制のみならず条件によっては酸化を促進させる方向へも働き得る存在であることや、フラボノイドをはじめとするポリフェノール類は体内への吸収効率が著しく低いことなどから、試験管内のガン細胞増殖抑制活性のみからガン予防を推測することはできない。

食物とガン予防に関する疫学調査はその食物に予防物質が含まれることを示唆してはいるかもしれないが、その食物を代表する物質がその原因物質かどうかに対して

は、何らの根拠を与えるものではない。因果関係の立証は介入試験（新薬開発では臨床試験）に委ねるのが現在最も信頼できる方法といえよう。これは、一方のグループにだけ試験物質やサプリメントを投与してその効果をみる。一般の薬の効果を確かめるときに行われる臨床試験で採用されるもので、現在、ガン予防が期待される幾つかの食物や成分が試されている。一方、食物のガン予防の可能性については、提案されている種々の作用メカニズムの評価や新たな作用メカニズムの発見も重要な研究分野である。新薬開発の分野ではゲノム創薬の取り組みが脚光をあびている。これは、従来活性物質の側から治療効果の追求を行うのに対し、遺伝子レベルで原因を解明し原因の側から目的にあった物質を追求する手法である。これまで多数のガン予防に期待が寄せられる物質が検討されてきたがそれを全て前述の介入試験で試すことは費用と時間の面から不可能である。膨大なガン予防物質の候補の評価には予防の根拠となる作用メカニズム側からの評価が有効ではないかと考える。本実験では新規な物質やメカニズムに繋がる発見はなかったが、多く

の広範な努力がこのようなデータ作りを支えているものと考えている。

謝 辞

活性成分の構造解析にあたり、TOF-MS および ^1H および ^{13}C NMR の分析を実施して頂きました東京理科大学理工学部菅原二三男教授、紙透伸治博士に深謝いたします。

参考文献

- 1) 新本洋士：食品機能研究法，pp 275-278，光琳（2000）。
- 2) M. Kodoma, H. Wada, H. Otani, et al.: *Phytochemistry*, 47, 371 (1998).
- 3) 津志田藤二郎，鈴木雅博，黒木征吉：日本食品工業学会誌，41, 611 (1994).
- 4) M. Ukiya, T. Akihisa, H. Tokuda: *Cancer Letters*, 177, 7 (2002).