

海藻成分の抗腫瘍作用に関する研究

第2報 *Sargassum horneri* について

中沢昭三・安部史紀・黒田浩之・河野啓三・東 忠英

京都薬科大学微生物学教室

梅 崎 勇

京都大学農学部水産学科教室

(昭和 50 年 8 月 7 日受付)

近年、海洋の資源開発の気運がたかまり、医薬資源的立場からも海洋起源の微生物、プランクトン、海藻、海綿動物、刺皮動物などの研究が進められている。このような傾向は抗腫瘍物質検索の分野でも同様であり、1974年 NCI の GOLDIN, HARTWELL らの総説¹⁾にもみられる。

われわれの教室ではこれらにさきがけて、天然物由来の生理活性物質の検索の一環として、1962 年から日本近海産の海藻について抗腫瘍性物質のスクリーニングを行ってきた。これらのスクリーニングにおいて数種の海藻がマウス移植腫瘍 EHRlich ascites carcinoma に対し抗腫瘍作用を示した。その中で *Sargassum* sp. “ほんだわら属” は一般に強い活性を示した。*Sargassum* sp. は和漢薬の分野で古くから「海藻」と称され瘰癧、癭瘤、卵腫などに効果があるとされている^{2,3)}。

前報でわれわれは *Sargassum tortile* C. AGARDH “よれもく”, これと同じ *Sargassum* sp. に属する *S. horneri* (TURNER) C. AGARDH “あかもく” および *S. hemiphyllum* C. AGARDH “いそもく” の海藻について検討を加え、粗エキスおよび透析による部分精製分画について報告した⁴⁾。今回、*S. horneri* (TURNER) C. AGARDH “あかもく” についてさらに検討を加えた結果、硫酸基を含む多糖分画、糖蛋白分画、およびこれらから低分子化したと思われる分画に抗腫瘍効果を認めることができた。これら抗腫瘍性発現について多糖分画を中心に若干の検討を加えたので報告する。

実験材料および方法

1. 海藻の採集

Sargassum horneri (TURNER) C. AGARDH “あかもく” は、1973 年 1 月若狭湾で採集したものである (Photo 1)。

2. 抽出および分離・精製

原料海藻 100 g に対して精製水 5 L で 3 日間 4°C で冷浸した。抽出液は Cellulose tubing (Visking Company) を用いて精製水を外液として透析を行ない、内液 (DI) と外液 (DO) に分画した。透析内液 (DI) は飽和硫酸により塩析をくりかえし糖蛋白分画 (DIP) を得た。非塩析

分画は Sevag 法により除蛋白を行ない、ついで 4 倍容のエタノールを加えて多糖分画 (DIS) を得た。透析外液は熱メタノール可溶成分を除き (DO-MP) とした (Fig. 1)。

3. 担癌動物治療実験

a. EHRlich ascites carcinoma に対する抗腫瘍効果

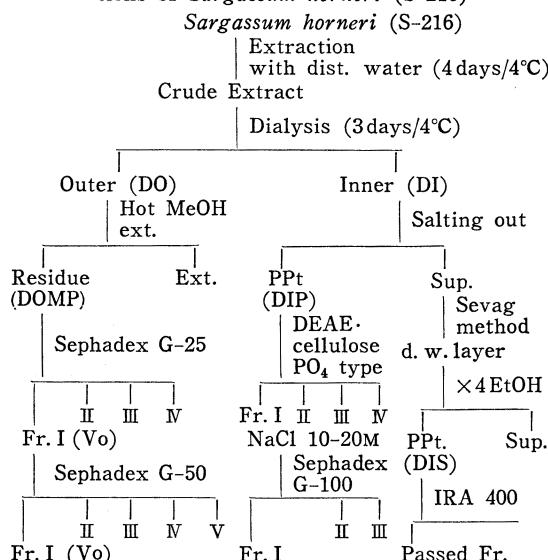
実験動物には ddYS 系 ♂ マウス (体重 20 g) 1 群 7 匹を使用し、移植後 7 日目の EHRlich ascites carcinoma を腹水とともに採取し、 3×10^5 cells/0.25 ml/mouse となるように調整し腹腔内移植した。治療は腫瘍移植後 24 時間後から 1 日 1 回、6 日間連続腹腔内注射し、60 日間観察を続け対照の無処置群と体重変化、腹水腫瘍増殖の様子、生存率などを比較検討した。

b. Sarcoma-180 に対する抗腫瘍効果

実験動物には ICR-JCL ♂ マウス (体重 20 g) 1 群 10

Photo 1 *Sargassum horneri* (TURNER) C. AGARDH

Fig. 1 Isolation of fractions of *S. horneri* of fractions of *Sargassum horneri* (S-216)



匹を使用し、移植後7日目の Sarcoma-180 を腹水とともに採取し、 2×10^6 cells/0.2 ml/mouse となるように調整しマウスの鼠蹊部皮下に移植した。治療は移植後24時間後から1日1回、6日間連続腹腔内注射し、阻止率は15日目に摘出した腫瘍の平均重量を無処置群と比較した。

c. EHRlich ascites carcinoma に対する Contact test⁵⁾

移植7日目の EHRlich ascites carcinoma を常法に従って 2.4×10^6 cells/ml になるように HANK's Balanced Saline (pH 7.4) で調整した。別に検体の2倍濃度を HANK's Balanced Saline に溶解、両者を等量混和して37°Cで1時間 incubate した。その後、1,000 r.p.m. 5分間遠心分離し、生理的食塩水で洗浄した。3回洗浄後、常法に従って ddYS 系マウス (体重 20g) に腹腔内移植した。Contacted cells を移植後60日間にわたりその増殖の状態、腹水腫瘍死の観察を行なった。

d. 腫瘍摘出後の治療効果

再発抑制の実験モデルとして水野らの方法⁶⁾に準じた。すなわち EHRlich ascites carcinoma 2×10^6 cells/0.2 ml/mouse を右鼠蹊部皮下に移植後、7日目に切除し翌日に再び左鼠蹊部皮下に腫瘍を移植する。再移植後24時間から6日間連続腹腔内注射により治療し、14日目に腫瘍を摘出し、その重量を比較した。

4. 血清蛋白の変動

a. 血清の調整

血清は断頭により採血し blood-cutter で分離、遠心して得た。24時間凍結後、使用した。

b. 血清蛋白の電気泳動

セルロースアセテート膜 (Separax 常光) を用いた電気泳動による。ペロナル緩衝液 (pH 8.6, 0.06~0.07 M) を用い、染色はボンソー 3R で行なった。試料の塗布は膜幅 1.5 cm 当り 0.8 μ l, 通電は 1.5 cm あたり 0.9 mA とした。パターンはデンストメーター (7タゴ光学) を用いて画いた。

実験結果

1. 各分画の化学組成

糖蛋白分画 (DIP), 多糖分画 (DIS), 低分子分画 (DO-MP) について元素分析, phenol-硫酸法⁷⁾による糖量, LOWRY らの Folin 法⁸⁾による蛋白量を定量した (Table 1)。

糖蛋白分画 (DIP) は Aspartic acid (16%), Glutamic acid (13%), Valine (9%), Serine (8%), Leucine, Alanine, Threonine (各 7%) などを主構成アミノ酸としている。多糖分画 (DIS) の加水分解物はペーパークロマトグラフィーにより Fucose, Galactose を主とし、少量の Xylose, ウロン酸を含んでいる。また、DODGSON⁹⁾らの方法で 20~30% の硫酸基をもっていることを確認した。

2. 各分画の抗腫瘍作用

a. EHRlich ascites carcinoma に対する抗腫瘍効果

各分画の EHRlich ascites carcinoma に対する in

Table 1. Analysis of each fractions obtained by *Sargassum horneri* (S-216)

Samples	Protein rich fr. (DIP)	Saccharides fr. (DIS)	Low m. w. fr. (DO-MP)
Ultimate analysis	H (%)	5.58	4.36
	C (%)	33.09	24.71
	N (%)	2.99	0.73
Carbohydrate ¹⁾ (%)	43	65	56
Protein ²⁾ (%)	41	5>	9

1) Phenol H₂SO₄ Method, as glucose

2) LOWRY's Folin Method, as bovine albumin

Fig. 2 Antitumor effect of S-216 on EHRlich ascites in mice

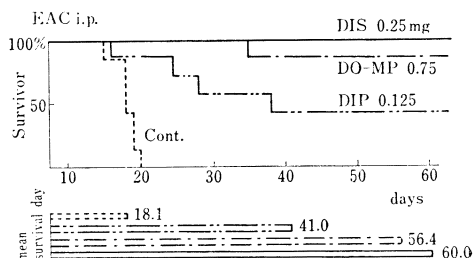


Table 2. Antitumor effect of each fraction obtained by *Sargassum horneri* on Sarcoma-180 solid tumor in mice

Samples (mg/mouse/day)	Av. body wt. difference	Survivor	Av. tumor wt. (g)	Inhibition (%)
DO-MP 1.0	1.1	10/10	1.02	48.2
2.0	-0.1	10/10	0.71	64.0
DIS 0.125	2.1	10/10	0.81	58.9
0.25	1.3	10/10	0.68	65.5
DIP 0.0625	1.8	10/10	0.91	53.8
0.125	0.7	10/10	1.09	44.8
Control	3.8	10/10	1.97	0

in vivo 効果を Fig. 2 に示した。縦軸に生存率、横軸に腫瘍移植後の観察日数をとった。糖蛋白分画 (DIP) は 0.0313~0.125 mg/mouse/day \times 6 の投与で 40~60% の完全延命を示した。多糖分画 (DIS) は 0.125~0.5 mg/mouse/day \times 6 の投与で 80~100% の完全延命を示した。いっぽう対照の無処置群は全例腹水腫瘍死し、その平均生存日数は 18.1 日であった。

b. Sarcoma-180 固型腫瘍に対する効果

各分画の Sarcoma-180 に対する *in vivo* 効果を Table 2 に示した。Inhibition ratio は 15 日目に摘出した腫瘍重量を無処置群と比較し $(1-T/C)\times 100\%$ で示した。体重変化は治療開始時 (day 1) に対する治療終了時 (day 6) の変化で示した。これらの dose では 1st shot で 1~2g の一過性の体重減少をきたすが、翌日には回復する。糖蛋白分画 (DIP)、多糖分画 (DIS)、低分子分画 (DO-MP) ともに約 50% 前後の Inhibition を示した。また多糖分画、低分子分画ともに、day (-6) から day (-1) の前投与をしても、後投与と同様の効果を見た。糖蛋白分画 (DIP) は前投与で無効であった。そこで多糖分画 (DIS) 0.125 mg/mouse/day \times 5 で前治療し、腫瘍移植後、糖蛋白分画 (DIP) 0.0625 mg/mouse/day \times 5 で後治療すると当然ながら約 70% の腫瘍増殖阻止効果を示した。

c. EHRlich ascites carcinoma に対する Contact

Fig. 3 Antitumor effect of S-216 on EHRlich ascites, as revealed by the survival curve after direct contact with the cells

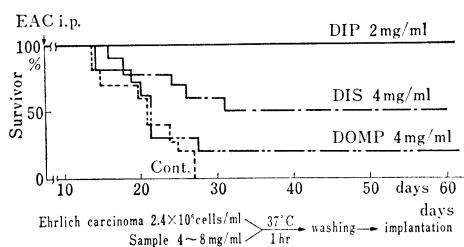
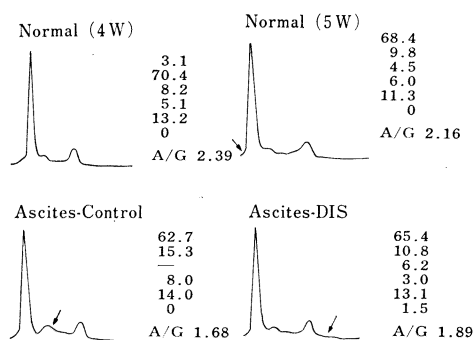


Fig. 4 Serum protein pattern of DIS treated mice



test

In vitro で腫瘍細胞と各分画とを接触させた後、腫瘍細胞を洗浄し新しいマウスの腹腔内に移植し、腫瘍増殖の有無により抗移植性を検討した。Fig. 3 に示したように糖蛋白分画 (DIP) は 2 mg/ml で 100% の腫瘍増殖阻止効果を認めた。いっぽう、多糖分画 (DIS)、低分子分画 (DO-MP) は 4 mg/ml でそれぞれ 50%, 20% と弱いものであった。Control は 27 日以内にすべて腹水腫瘍死した。

3. 多糖分画の宿主を介しての作用

a. 血清蛋白の変動と血清の抗腫瘍作用

ddYS 系マウス (5 W~6 W) 1 群 10 匹について

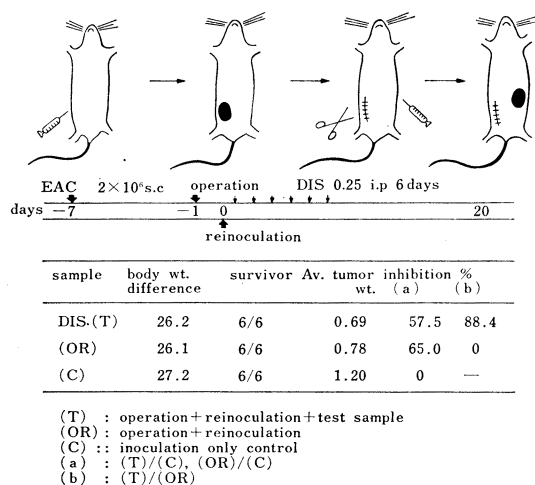
1) Normal 群
2) EHRlich ascites carcinoma (3×10^6 cells) を腹腔内移植した Control 群

3) 2) 群の多糖分画 (DIS) 0.25 mg/mouse 6 日間治療群
とし、これらの群の血清 (2), 3) 群は腫瘍移植後 12 日目に採血) について血清蛋白の変動をセルロースアセテート膜による電気泳動で検討した (Fig. 4)。担癌 Control 群では、A/G 比の減少、 γ -グロブリンの増加する傾向がみとめられた。また α_1 -グロブリン分画の欠落あるいは α_1 , α_2 -グロブリンが分離しない 4 週令以前の幼若マウスの血清パターンに類似してきた。これを多糖分画 (DIS) で治療すると Normal 値に比し α , γ -グロブリン

Table 3. Antitumor effect of serum obtained from DIS-treated tumor-bearing mice against EHRlich solid tumor

Samples	Survivor	Av. tumor (g)	Inhibition ratio (%)
Tumor-bearing serum	10/10	0.75	13.8
DIS-treated tumor bearing serum	10/10	0.52	51.2
Control	10/10	0.81	0

Fig. 5 Antitumor effect of S-216-DIS on EHRlich solid tumor after surgical removal



ン値の増加、 β -グロブリン減少につづいて、 γ -グロブリン分画の後に1つの小さな分画が認められた。

次に上記2)および3)群の血清を用いての抗腫瘍効果を検討した。EHRlich ascites carcinoma 2.0×10^6 cells/mouse/0.2 ml を鼠蹊部皮下に移植し、2時間後、24時間後の2回血清検体 0.1 ml 尾静脈から投与したところ Table 3 のような結果を得た。このように海藻多糖(DIS)で治療し延命したマウス血清を用いても固型腫瘍に対して同様の効果を認めた。

4. 腫瘍摘出後、再移植した EHRlich 固型腫瘍に対する治療効果

Fig. 5 に示したように day 0 に腫瘍を移植した後 20 日目に摘出した(無処置)群では腫瘍重量は 1.2 g であった。これに対して day(-7) に1度腫瘍移植を行ない day(-1) に摘出し day 0 に再度移植した(手術+再移植)群では腫瘍重量は 0.78 g であり、この腫瘍摘出、再移植の操作だけで 35% 腫瘍の縮小をみた。さらに腫瘍摘出、再移植腫瘍を多糖分画(DIS)で治療したところ、腫瘍重量は 0.69 g となり、(無処置)群に対しては 42.5% の腫瘍縮小をみたが、(手術+再移植)群に対しては、12.6% の腫瘍縮小とまったく無効であった。

考 察

Sargassum horneri(TURNER) C. AGARDH“あかもく”から分離・精製を行ない、20~30% の硫酸基を含む多糖分画(DIS)、糖 43%、蛋白 41% から成る糖蛋白分画(DIP)およびこれから低分子化したものと思われる分画(DO-MP)に抗腫瘍効果を認めることができた。これらの各分画は既知制癌物質ほど強力ではないが、マウ

スの EHRlich 腹水腫瘍、Sarcoma-180 固型腫瘍の両方に有効であった。前報で述べたように、低分子化したものと思われる分画は Sephadex-G 50 Fine で Void volume に相当する分画に抗腫瘍効果が認められた。この分画は 23% の硫酸基を含む糖および蛋白から成る。

これら抗腫瘍作用発現について直接的作用と宿主を介しての作用とが考えられる。まず直接的作用は EHRlich ascites carcinoma との Contact test で糖蛋白分画(DIP)に認められた。*Sargassum* sp. は海藻中でも蛋白含量が比較的高いものが多い。また、季節により蛋白含量が変化し、抗腫瘍効果も変動する点から両者と *Sargassum* sp. の生活史との関連性について検討中である。

次に宿主を介しての作用について、今回は多糖分画(DIS)について検討を加えた。海藻多糖(DIS)は従来の各種高等植物から分離されたヘミセルロース画分、ササ、バガス、酵母などの多糖体¹⁰⁾と異なり、腹水腫瘍に有効である点あるいは比較的安全性が高い点などの特徴を有する。また、Carbon clearance による網内系の stimulate はみられなかったが、末梢血中の白血球数の増加、あるいは脾臓の肥大や有核細胞数の増加傾向がみられた。いっぽう、血清のセルロースアセテート膜の電気泳動で α -, γ -グロブリン分画値が増大する傾向が認められ、さらにこの血清は固型腫瘍に抗腫瘍性を示した。これらの事実から抗腫瘍多糖体の性質と硫酸基によるポリアニオン体の性質の両方を有すると考えられる。最後に腫瘍摘出一再移植の系で抗腫瘍効果がほとんど失活することから、ddYS と EHRlich ascites carcinoma, ICR と Sarcoma-180 という Allogeneic な場での移植免疫系を増強している可能性も考えられる。

現在、Syngeneic なシステムで、さらには化学発癌剤を用いての自然発生腫瘍についても治療効果を検討中である。

謝 辞

本研究は文部省がん特別研究費により援助された。なおアミノ酸分析については京都薬大生化学教室 小原晃助教授、石光進助手にお世話になり深謝致します。また血清蛋白の電気泳動を行なっていただいた京都第二赤十字病院化学検査室 西川美年子、佐々木めぐみの両氏に感謝します。

文 献

- 1) LI, C. P.; A. GOLDIN & J. L. HARTWELL: Antineoplastic substances from the sea: A review. Cancer Chemother. Rep. (Part 2) 4: 97~129, 1974
- 2) 赤松金芳, 編: 和漢薬, 医歯薬出版 pp.720~721, 1970

- 3) 本草綱目, 15, 卷 19, 草部, pp. 109~110
- 4) 中沢昭三, 黒田浩之, 安部史紀, 西野武志, 大槻雅子, 梅崎 勇: 海藻成分の抗腫瘍作用に関する研究, 第 1 報. *Chemotherapy* 22 : 1435~1442, 1974
- 5) MIZUNO, D. & O. YOSHIOKA : Antitumor effect of intracutaneous injection of bacterial lipopolysaccharide. *Cancer Research* 28 : 1531~1537, 1968
- 6) 安部 茂, 中西美保子, 山崎正利, 大熊勝治, 水野伝一: 癌摘出手術後の化学療法, Screening system の開発. 第 33 回日本癌学会総会記事 33 : 369, 1974
- 7) DUBOIS, M. ; K. A. GILLES, J. K. HAMILTON, P. A. ROBERT & F. SMITH: Colorimetric method for determination of sugars and related substance. *Anal. Chem.* 28 (3) : 350~356, 1956
- 8) LOWRY, O. H. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265~275, 1951
- 9) DODGSON, K. S. & B. SPENCER : Studies on Sulphatases. 5. The determination of inorganic sulphate in the study of sulphatases. *Biochem. J.* 55 : 436~440, 1953
- 10) 癌の基礎的研究班シンポジウム記録: 各糖類の抗癌効果の批判. *日本臨床* 27 (6) : 1737~1771, 1969

ANTITUMOR EFFECT OF WATER-EXTRACTS FROM MARINE ALGAE

(II) *Sargassum horneri* (TURNER) C. AGARDH

SHOZO NAKAZAWA, FUMINORI ABE, HIROYUKI KURODA,
KEISO KOHNO and TADAHIDE HIGASHI

Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy, Kyoto

ISAMU UMEZAKI

Department of Agriculture, Kyoto University, Kyoto

Our previous report in this journal referred to an antitumor effect observed in *Sargassum* sp., as represented by *Sargassum tortile* C. AGARDH and *S. horneri* (TURNER) C. AGARDH, in our screening of marine algae collected in the sea around Japan for the said effect.

Described in the present report are the results of our further study of *S. horneri* (TURNER) C. AGARDH, especially the effect of its polysaccharide fraction on tumor-bearing hosts.

S. horneri, as mentioned in the previous report, is mainly a polymer of fucose and is composed of a polysaccharide fraction containing 20 to 30% of sulphate, a sugar-protein fraction containing 43% of sugar and 41% of protein, and a low-molecular fraction that apparently developed from the other two fractions. In a mouse study, all of these fractions proved effective in a dose range of 125 to 750 μ g/mouse/day (or less than 1/8 of DL_{50}) against ascites tumor [3×10^5 cells/mouse, i. p.-i. p.] and solid tumor [2×10^6 cells/mouse, s. c.-i. p.] of EHRLICH ascites carcinoma and also against solid tumor [2×10^6 cells/mouse, s. c.-i. p.] of Sarcoma-180. However, *in vitro-in vivo* tests with EHRLICH carcinoma cells, only the sugar-protein fraction manifested slight activity.

These findings suggest that each fraction of *S. horneri* may have not only direct cytotoxicity but host-mediated effect. In attempt to verify this assumption, the polysaccharide fraction has been examined for its possible effect on hosts.

The results were that, while no stimulation of reticuloendothelial system was observed, tumor-bearing hosts treated with the polysaccharide fraction showed an increase in white blood cells and a change in the pattern of electrophoresis of the serum. Also, the administration of that serum inhibited the growth of subcutaneously transplanted solid tumor in mice. The polysaccharide fraction had no effect on reinoculated solid tumors following surgery. These findings indicate that the polysaccharide fraction may have the activating effect on transplanted immunity.