

## 海藻成分の抗腫瘍作用に関する研究

第3報 *Codium pugniformis* 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教室

(昭和 50 年 8 月 7 日受付)

前報で褐藻類 *Sargassum* sp. “ほんだわら属” とくに *Sargassum horneri* (TURNER) C. AGARDH “あかもく” の抗腫瘍作用について報告<sup>1,2)</sup>した。さらに一連の日本近海に産する海藻の抗腫瘍スクリーニングを続けるなかで、緑藻類中にも EHRlich ascites carcinoma に抗腫瘍性を示す 1 群が認められた。Caulerpaceae “いわづた科”, Codiaceae “みる科” がこれである。今回、この中で最も効果の強い *Codium pugniformis* Okamura “こぶしみる” について検討を加えた。抗腫瘍物質の分離およびその効果はまだ不十分であるが、これまでの結果を報告する。

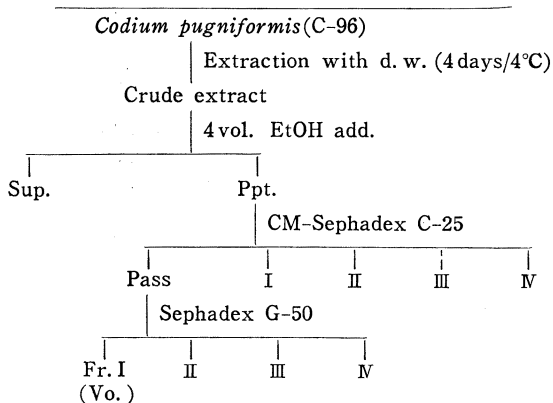
## 実験方法および結果

## 1. 海藻の採集および分離

原料海藻は 1973 年 10 月和歌山県串本で採集したものをを用いた。粗エキスは 4°C, 4 日間水抽出し凍結乾燥した。エキスは淡黄緑色で弱塩基性であり異臭を發する。これに 4 倍容のエタノールを加え、アルコール沈殿分画を CM-Sephadex C-25 (Pharmacia) PO<sub>4</sub> type のクロマトで 0.05 M PBS (pH 7.2) で溶出させた (Fig. 1)。

## 2. 化学組成

これらの化学組成を Table 1 に示した。エタノール沈殿分画を加水分解後、その構成糖をペーパークロマト

Fig. 1 Isolation of fractions of *C. pugniformis* (C-96)Table 1 Analysis of crude extract and partially purified fraction from *Codium pugniformis* [C-96]

| Samples                       | Amino acid <sup>a)</sup><br>(%) | Sugar <sup>b)</sup><br>(%) | Protein <sup>c)</sup><br>(%) |
|-------------------------------|---------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| Crude extract                 | 0.8                             | 20.1                       | 6.8                          |
| EtOH ppt. Frac.               | 0.1                             | 28.6                       | 8.3                          |
| CM-Sephadex C-25 passed Frac. | 0.1                             | 35.5                       | 1.0                          |

a) Ninhydrin reaction as alanine

b) Phenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> method as glucose

c) LOWRY's Folin method as bovine serum albumin

グラフィーで検討したところ、ガラクトース、アラビノースの強いスポットおよび少量のマンノースを同定した。さらに CM-Sephadex C-25 で溶出する分画はほとんどセチルピリジニウムクロリド (CPC) で沈殿し、糖 35.5%, 蛋白 1.0% 以下であるところから酸性多糖成分である。

## 3. 抗腫瘍効果

実験腫瘍は EHRlich 腹水および固型腫瘍, Sarcoma-180 固型腫瘍を用いた。実験方法は前報と同様、腹水腫瘍は  $3 \times 10^5$  cells/mouse, ddYS 系マウス (20 ± 0.5 g) に移植し、60 日間観察した。固型腫瘍は  $2 \times 10^6$  cells/mouse 移植し、14 日目に腫瘍を摘出しその重量を測定した。治療は移植後 24 時間後から 1 日 1 回 6 日間連続腹腔内投与を行なった。EHRlich 腹水腫瘍に対する効

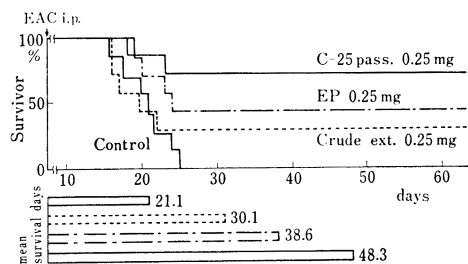
Fig. 2 Antitumor effect of *Codium pugniformis* (C-96) on EHRlich ascites in mice

Table 2 Antitumor effect of *Codium pugniformis* on EHRlich carcinoma and Sarcoma-180 transplanted subcutaneously in mice

| Tumor       | Samples (mg/mouse/day) | Av. body wt. difference | Survivor | Av. tumor wt. (g) | Inhibition (%) |
|-------------|------------------------|-------------------------|----------|-------------------|----------------|
| EHRlich     | EtOH ppt.              |                         |          |                   |                |
|             | 0.5                    | 2.3                     | 7/7      | 0.90              | 41.6           |
|             | 1.0                    | 0.3                     | 7/7      | 0.71              | 53.9           |
|             | Control                | 3.5                     | 7/7      | 1.54              | 0              |
| Sarcoma-180 | EtOH ppt.              |                         |          |                   |                |
|             | 0.5                    | 0.6                     | 10/10    | 1.15              | 37.2           |
|             | Control                | 4.2                     | 10/10    | 1.83              | 0              |

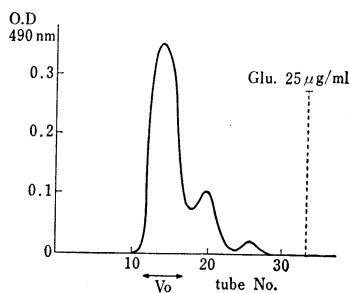
果は Fig. 2 に示したように無処置群が全例腹水腫瘍死したのに対しエタノール沈殿分画が 0.25 mg/mouse/day × 6 で 50%, CM-Sephadex C-25 で溶出する分画は 0.25 mg/mouse/day × 6 で 80% の完全延命を示した。Table 2 にはアルコール沈殿分画の EHRlich および Sarcoma-180 固型腫瘍に対する効果を示した。このように EHRlich および Sarcoma-180 固型腫瘍に対してもアルコール沈殿分画は 0.5 mg/mouse/day × 6 回の治療で約 40% の腫瘍増殖阻止を認めた。また、前投与でも同様の結果が得られた。

CM-Sephadex C-25, 0.05 M PBS で溶出する分画は、さらに Sephadex G-50 fine (Pharmacia) を用いてゲルろ過を行なったところ、Fig. 3 のようなクロマトパターンが得られた。これらの分画について現在、抗腫瘍効果、物性など検討中である。

#### 考 察

一連の海藻成分の抗腫瘍スクリーニングを続ける中で、新しく緑藻類 *Caulerpaceae*, *Codiaceae* に比較的活性の強いものが集約された。両者は分類学的にも近縁であり共通の成分が予想され、その中から *Codium pugniformis* OKAMURA “こぶしみる” について検討した。

Fig. 3 Fractionation of C-96 EP on Sephadex G-50 Gel filtration



海藻中でも珍らしく粗エキスは塩基性を示し興味もたれた。しかし、抗腫瘍性を有するものとしては高分子多糖体が分画されてきた。これは、*Sargassum horneri* (TURNER) C. AGARDH “あかもく” の酸性多糖分画の EHRlich 腹水腫瘍や Sarcoma-180 に対する態度と同様であり活性はあまり強くない。PERCIVAL<sup>3)</sup> は同属の *Codium fragile* (SURINGAR) HARIOT “みる” からアラビノース、ガラクトースを成分残基とする硫酸基をもった多糖を報告している。さらに硫酸化多糖としてデキストラン硫酸<sup>5,6)</sup> やヘパリン<sup>4)</sup> などの抗腫瘍効果が報告され、この作用はリゾゾームをラビリズし脂血症を改善し、線溶活性を示し癌の転移を抑制すると言われており、現在さらに精製を進め同定を急いでいる。

#### 文 献

- 1) 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
- 2) 中沢昭三, 安部史紀, 黒田浩之, 河野啓三, 東忠英, 梅崎 勇: 海藻成分の抗腫瘍作用に関する研究 (第 2 報)。Chemotherapy 24 (2) : 443~447, 1976
- 3) LOVE, J. & E. PERCIVAL: The polysaccharides of green seaweed, *Codium fragile*. Part II. The water-soluble sulphated polysaccharides. J. Chem. Soc. 3338~3345, 1964
- 4) LIPPMAN, S. M.: The growth-inhibitory action of heparin on the EHRlich ascites tumor in mice. Cancer Res. 17 : 11~14, 1957
- 5) 塚越 茂, 井上俊雄, 大橋富士子, 桜井欽夫: DEAE-Dextran の抗腫瘍性について。日本癌学会総会記事 32, 223, 1973
- 6) 羽室淳爾: 高分子制癌剤。高分子 23 : 705~709, 1974

## ANTITUMOR EFFECT OF WATER-EXTRACTS FROM MARINE ALGAE

(III) *Codium pugniformis* OKAMURA

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

Further to the antitumor effect of *Sargassum* sp. [Phaeophyta], especially *Sargassum horneri* (TURNER) C. AGARDH, reported in the previous papers, our continued screening of marine algae available in Japanese water for an antitumor effect has revealed that *Caulerpaceae* and *Codiaceae*, families belonging to Chlorophyta, are also effective against EHRLICH ascites carcinoma. The present report concerns our evaluation of *Codium pugniformis* OKAMURA, the most effective species of this family.

*Codium pugniformis*, collected in Kushimoto, Wakayama Prefecture, was extracted with water to obtain a weakly basic, light yellowish green extract. To this extract, 4 times as much of ethanol was added. The precipitate recovered was named C-96-EP. It was ascertained by paper partition chromatography that the acid hydrolysate of this fraction contains galactose, arabinose, and mannose. The fraction C-96-EP and its purified fraction [purified with CM-Sephadex C-25 and CPC] are both active against ascites tumor of EHRLICH carcinoma and solid tumors produced by EHRLICH carcinoma and Sarcoma-180.