

褐藻 *Sargassum fulvellum* 由来のアルギン酸ナトリウム塩の 抗腫瘍性とその作用機作

藤原三知雄・小宮山寛機*・梅沢 巖*・名雲照一

北里大学衛生学部生物物理学教室

* 北里研究所

(昭和 59 年 7 月 16 日受付)

褐藻ほんだわら (*Sargassum fulvellum*) の 熱水抽出物から分離精製したアルギン酸ナトリウム塩 (分子量: 29,000, M/G 比: 2.84) のマウス腫瘍に対する抗腫瘍性を調べた。その結果, Sarcoma-180 および Ehrlich 腹水腫瘍に対して, 50 mg/kg の投与量で ILS(Increase in life span) がそれぞれ, 141, 222% といずれに対しても抗腫瘍効果が認められた。さらに, IMC 腫瘍に対しても, 12.5 および 50 mg/kg の投与量で, ILS がそれぞれ, 205%, 215% 以上と顕著な抗腫瘍性が認められた。しかし, Meth-A と P 388 に対しては延命効果が認められなかった。次にアルギン酸ナトリウム塩の直接的な殺細胞作用を調べるために, *in vitro* で増殖している HeLa 細胞に 1,000 μ g/ml の濃度で作用させたが, 増殖抑制作用は認められなかった。そこで *in vivo* でアルギン酸ナトリウム塩の biological response modifier としての性質について検討した。まずアルギン酸ナトリウム塩を投与したマウスの腹腔浸出付着細胞 (PEC) の腫瘍細胞に対する作用を調べた。即ち, 100 mg/kg 投与し 4 日後にマウスの PEC を集め EL-4 細胞の ^3H -thymidine の取り込みを調べたところ, ほぼ完全な取り込み阻害がみられた。また, Cytolytic 活性を調べるために, あらかじめ ^3H -uridine でラベルした EL-4 細胞に PEC を作用させたと, コントロールの約 2 倍の ^3H -uridine の release がみられた。次に, アルギン酸ナトリウム塩の Interferon (IFN) 誘起能を調べるために, マウス尾静脈に投与して血中の IFN 量を測定したところ, 200 mg/kg の投与で, 1 時間後に最も高い活性が認められた。

以上の結果から, アルギン酸ナトリウム塩の抗腫瘍性は, マクロファージの活性化, およびインターフェロンの誘起能等による宿主介在性によるものであることが示唆された。

我々は先に, 褐藻類のほんだわら (*Sargassum fulvellum*) からの熱水抽出物が, Sarcoma-180 固型腫瘍の増殖を阻害すること¹⁾, また, その抽出物よりエタノール分画して得た抗腫瘍性のある画分は, 主としてウロン酸を含む多糖であること²⁾を報告した。さらに抗腫瘍性を有する多糖体をゲル濾過により精製して, 抗腫瘍性の本体がアルギン酸ナトリウム塩であることを明らかにした³⁾。

本論文では, アルギン酸ナトリウム塩の Sarcoma-180 固型腫瘍以外の数種類の腫瘍に対する抗腫瘍性と, 抗腫瘍効果の作用機作に関する実験の結果について報告する。

I. 材料と方法

1. アルギン酸ナトリウム塩の抽出と精製

1979 年 12 月, 日本海沿岸で採集した, 褐藻類のほんだわら *Sargassum fulvellum* より熱水抽出し¹⁾, 得られた熱水抽出物を, エタノールを用いて分画し²⁾, さらに

ゲル濾過により精製を行ない³⁾, アルギン酸ナトリウム塩を得た。

Table 1 Chemical and physical properties of sodium alginate

Uronic acid ^{*1}	56.8 $\pm$ 0.6%
Neutral sugar ^{*2}	2.7 $\pm$ 0.1%
Nitrogen ^{*3}	Not detected
Ash	12.7 $\pm$ 1.6%
M/G ratio ^{*4}	2.84 $\pm$ 0.05
Molecular weight ^{*5}	29,000 $\pm$ 2,000
$[\alpha]_D^{25}$ (c=0.2, H ₂ O)	-132 $\pm$ 1°

^{*1} The content was estimated by the method of BITTER and MUIR⁴⁾ (standard: GalUA).

^{*2} The content was estimated by anthrone-sulfuric acid reaction⁵⁾ (standard: Glc).

^{*3} Nitrogen was estimated by elemental analysis.

^{*4} This ratio was estimated by the method of HAUG and LARSEN⁶⁾.

^{*5} Molecular weight was calculated from the intrinsic viscosity of the sample by using the formula of DONNAN and ROSE⁷⁾.

このようにして得た標品は、電気泳動および超速心分析によって純度検定を行ない、単一であることを確認した。その化学的、物理的性質を Table 1 に示した。分子量の値が、先に報告した³⁾値 (33,400) と比べてわずかに小さいが、これは海藻の採集年度が異なるためと考えられる。

2. 抗腫瘍性実験

アルギン酸ナトリウム塩の抗腫瘍性実験は、1群7匹の4週齢雄のマウスを用いて、以下のスケジュールで行なった。腫瘍は、Sarcoma-180 (ICR マウスに 10^5 個を腹腔内移植)、Ehrlich carcinoma (ddY マウスに 2.5×10^5 個を腹腔内移植) を用い腫瘍移植 24 時間後から、生理食塩水に溶かしたアルギン酸ナトリウム塩を 100, 50, 25, 12.5 mg/kg/day の投与量で 9 回 i. p. 投与した。ただし、100 mg/kg 投与では毒性が現われたために投与回数を減した。なお、対照群には生理食塩水を投与した。

治療効果の評価は、マウスの延命率 (Increase in life span: ILS) を治療群 (T) と対照群 (C) の平均生存日数から次式で求めた。

$$\frac{T-C}{C} \times 100(\%)$$

なお、マウスはすべて静岡県実験動物農業協同組合より 4 週齢で購入し、4 日間予備飼育した後に使用した。

3. 直接殺細胞作用の測定

培養 HeLa 細胞にアルギン酸ナトリウム塩を 1,000 μ g/ml と 500 μ g/ml の濃度で、3 日間作用させ、細胞の数および形態の変化を観察した。

4. マウス脾細胞の Concanavalin A (Con A) に対する反応の変化

ddY 6 週齢雄のマウスにアルギン酸ナトリウム塩を腹腔投与し、3 日後に脾を摘出し単細胞とし、10% FCS を含む RPMI-1640 培地に入れ Con A を 2 μ g/ml 加え、37°C で 3 日間 5% CO_2 中で培養した。これに ^3H -thymidine を加えさらに 8 時間培養し、cell harvester にてガラス濾紙上に集め、冷 5% TCA で洗浄し、細胞中に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定し、コントロールに対する百分率で表わした。

5. 1) マクロファージの細胞障害試験

ddY 6 週齢雌マウスに、アルギン酸ナトリウム塩を 3.1, 12.5, 50, 100 mg/kg の投与量で腹腔に投与し、4 日後に腹腔浸出細胞 (PEC) を冷 Hank's 液を用いて採取し、細胞を同液で 2 回洗浄後、10% FCS を含む RPMI-1640 1.5 ml に懸濁した。この 0.1 または 0.2 ml を 96 穴マイクロプレートに各量共 3 well 宛播き、

37°C で 1 hr, 5% CO_2 で静置させた。次いで上清を捨て注射器にて RPMI-1640 培地をジェット噴射させ非附着細胞を 3 回洗い流し、これに EL-4 細胞浮遊液 0.2 ml (2×10^4 個) を加え 37°C で 3 日間培養し、培養終了 6 時間前に ^3H -TdR (1 $\mu\text{Ci/ml}$) を加えた。cell harvester にて、先に述べた Con A の実験と同じ方法で ^3H -TdR の細胞内取り込み量を調べた。

2) Cytolytic activity の測定

Cytostatic activity 測定の場合と同様にして得た PEC の Cytolytic activity を山田⁹⁾の方法を用いて調べた。即ち、あらかじめ ^3H -uridine を取り込ませた EL-4 細胞と PEC を 37°C で 16 時間作用させた後、残存細胞の放射活性を測定し Cytolytic ratio を次の式で求めた。

$$\text{Cytolytic ratio } (\%) = (1 - T/C) \times 100$$

ここで、T と C は、それぞれサンプルを投与したマウスおよび非投与マウスから得た PEC を作用させた時の cpm の値である。なお、比較のために、活性のあることの知られている *Corynebacterium parvum* を用いた。

6. IFN 誘起能の測定

雄 5 週齢 ddY マウスの尾静脈に、50, 100, 200 mg/kg の試料を投与した後、1, 2, 3, 6 時間後に採血し、その血清中の IFN 活性を前原らの方法¹⁰⁾に準じて測定した。IFN 活性の測定は、L 細胞を用い、ウシ水疱性口内炎ウイルス (VSV) を攻撃用ウイルスとして、ブランク 50% 減少法で行なった。IFN 価は、国際単位をもって表わした。

II. 結 果

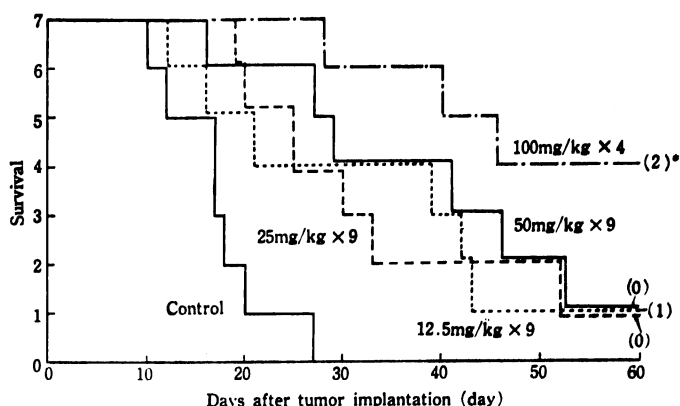
1. アルギン酸ナトリウム塩の抗腫瘍性

延命効果の認められた 3 種の腫瘍に対する結果を、Fig. 1~3 に示した。Sarcoma-180 腹水腫瘍に対し、12.5, 25, 50, 100 mg/kg 投与では ILS がそれぞれ 129, 76, 141, >253% と顕著な効果がみられた。Ehrlich 腹水腫瘍に対しては、同様な投与量に対して ILS がそれぞれ、50, 28, 222, 44% であり、やはり効果が認められた。IMC 腫瘍に対しては、同様な投与量に対して ILS がそれぞれ、205, 53, >215, >215% と、強い制癌活性がみられた。しかし、Meth-A および P388 に対しては延命効果が全く認められなかった。

2. 直接殺細胞作用

以上述べたような抗腫瘍効果の作用機作として、まず直接殺細胞作用が考えられたので、アルギン酸ナトリウム塩を HeLa 細胞に作用させてみた。その結果、コントロールが、 7.89×10^5 個/plate であったのに対し、アルギン酸ナトリウム塩を 1,000, 500 μ g/ml の各濃度で作用させると、それぞれ 7.83, 7.41×10^5 個/plate と、細胞数にほとんど変化がみられず、また何ら形態の変化もみ

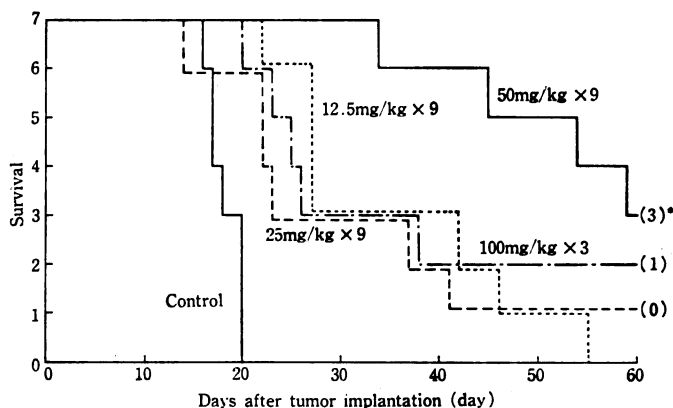
Fig. 1 Antitumor effect of sodium alginate on Sarcoma-180 ascites tumor cells



Alginate was injected i.p. into ICR mice daily from days 1 to 9 after Sarcoma-180 tumor cells (1×10^5) were inoculated i.p. into the mice. Injection of alginate at a dose of 100 mg/kg was carried out every other day from days 1 to 7 because the polysaccharide showed toxicity against the mice used.

* Numbers in parenthesis indicate No. of cured mice in 60-day survivors.

Fig. 2 Antitumor effect of sodium alginate on Ehrlich ascites tumor cells



Alginate was injected i.p. into ddY mice daily from days 1 to 9 after Ehrlich tumor cells (2.5×10^5) were inoculated i.p. into the mice. Injection of alginate at a dose of 100 mg/kg was carried out every other day from days 1 to 5 because the polysaccharide showed toxicity against the mice used.

* Numbers in parenthesis indicate No. of cured mice in 60-day survivors.

られず、直接殺細胞作用は認められなかった。

3. マウス脾細胞の Con A に対する反応の変化

Fig. 4 に示したように、アルギン酸ナトリウム塩の 50, 100 mg/kg 投与でマウスの脾臓中にレクチンに対して反応する細胞の増加が認められた。

4. Cytostatic 活性

アルギン酸ナトリウム塩の各濃度を投与した場合の Cytostatic ratio を Fig. 5 に示した。100 mg/kg 投与で

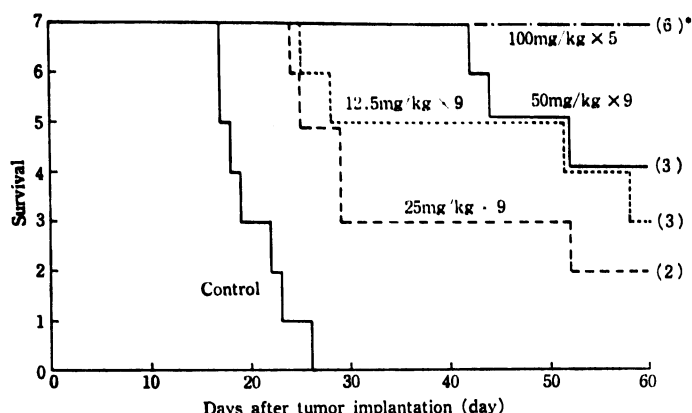
は、EL-4 細胞の Thymidine の取り込みはほぼ 100% 阻害された。

5. Cytolytic 活性

アルギン酸ナトリウム塩を 100, 200 mg/kg 投与したときの Cytolytic ratio を Fig. 6 に示した。200 mg/kg 投与では、*C. parvum* 8 mg/kg 投与とほぼ同じく、PEC がコントロールの約 2 倍の活性を示した。

6. IFN 誘起能

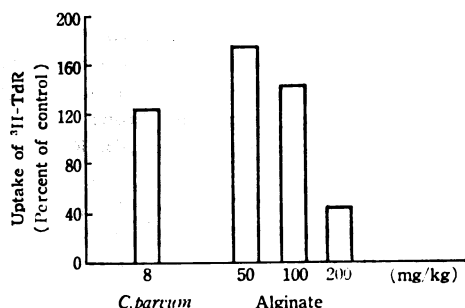
Fig. 3 Antitumor effect of sodium alginate on IMC ascites tumor cells



Alginate was injected i.p. into CDF₁ mice daily from days 1 to 9 after IMC tumor cells (1×10^4) were inoculated i.p. into the mice. Injection of alginate at a dose of 100 mg/kg was carried out every other day from days 1 to 9 because the polysaccharide showed toxicity against the mice used.

* Numbers in parenthesis indicate No. of cured mice in 60-day survivors.

Fig. 4 Lymphocyte blast formation of spleen cells from the mice treated with sodium alginate



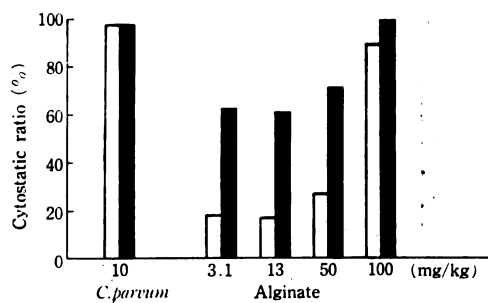
Spleen cells were incubated with 2 μ g/ml of Con A for 3 days, and uptake of ³H-TdR was measured.

マウスにサンプルを投与した後の血清中の IFN titer を経時的に測定した結果を Fig. 7 に示した。投与量が多くなるに従って、IFN titer が高くなり、興味あることには投与量によって IFN 産生の peak に時間的な差がみられた。

III. 考 察

アルギン酸ナトリウム塩の投与により、allogeneic な系の Sarcoma-180 および Ehrlich 腹水腫瘍に対して顕著な抗腫瘍効果が認められ、さらに、syngeneic な系の IMC carcinoma に対しても、100 mg/kg 投与で 7 匹全例が 60 日以上生存し、その中 6 匹が治癒し、極めて著明な抗腫瘍効果が認められた。

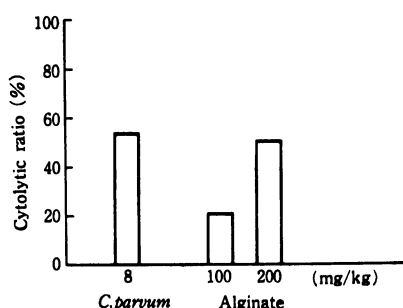
Fig. 5 Cytostatic activity of sodium alginate



Peritoneal exudate cells (PEC) were collected from mice on the fourth day after the injection of each sample into the animals. The PEC were incubated with EL-4 thymoma cells for 3 days. Then ³H-TdR (1 μ Ci/ml) was added into the PEC-EL-4 cells mixture, and incubation was further continued for 6 hr. The whole PEC were suspended into 1.5 ml of medium and 0.1 ml (□) or 0.2 ml (■) of the suspension were used for cytostatic studies (3 wells for each volume, 3 mice in each group).

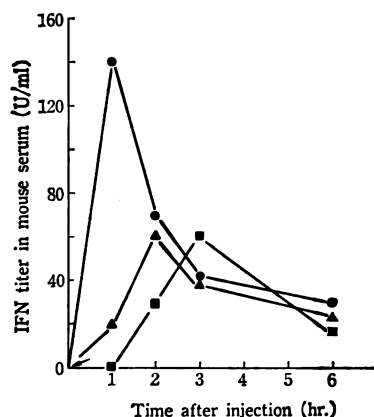
アルギン酸は、ウロン酸の重合体で、ポリアニオン (polycarboxylate) としての性質を有している。ある種のポリアニオンは制癌作用を示すことが知られており^{10,11)}、その中でビラン共重合体¹²⁾ (polycarboxylate) が最も広く研究されていて、動物癌に対して広い制癌スペクトルを有している。したがって、一種の polycarboxylate であるアルギン酸のポリアニオンとしての性質

Fig. 6 Cytolytic activity of sodium alginate



In four days after the injection of each sample into mice, PEC from the animals were mixed with ^3H -uridine-labeled EL-4 cells and incubated for 16 hr. The radioactivity of the labeled cells were counted (3 wells for each mouse, 4 mice in a group).

Fig. 7 IFN-inducing activity of sodium alginate



Alginate was injected into female ddY mice i.v. Interferon titer was measured periodically.

↓ Control, ■ 50, ▲ 100, ● 200 mg/kg/day.

が制癌性を発揮しているのではないかと考えられる。

制癌効果の作用機序としては、培養細胞に対し直接的な殺細胞作用を示さないことから宿主介在性の制癌作用と考えられる。事実、レンチナン、PS-Kなどの多糖体あるいは、ポリアニオンは IFN inducer として働き、さらにはマクロファージの細胞障害作用を高めることが報告されている。そこでアルギン酸ナトリウム塩投与による宿主の免疫能の変化を調べたところ、脾細胞の Con A に対する反応および PEC 中の付着細胞の腫瘍細胞障害作用が高まり、さらには IFN の生産が認められた。PEC 中の付着細胞は大部分がマクロファージであり¹³⁾アルギン酸ナトリウム塩はマクロファージの細胞障害活性を賦活化すると思われる。また、IFN の多彩

な生物活性¹⁴⁾の中でマクロファージの腫瘍細胞増殖抑制作用、NK細胞の賦活化などがよく知られており¹⁵⁾さらに IFN が直接的な制癌作用を示すことが報告されている¹⁶⁾。

したがって、アルギン酸ナトリウム塩は担癌宿主の生体防御機能を非特異的に亢進させて、腫瘍の退縮を導くと考えられる。

(謝辞): 本研究の遂行にあたり、IFN titer の測定に御協力いただきました、北里研究所の小松治子博士と前原信敏博士に深謝致します。また、種々の実験に御協力いただきました廣野敏美氏に感謝の意を表します。

文 献

- 1) YAMAMOTO, I.; T. NAGUMO, K. YAGI, H. TOMINAGA & M. AOKI: Antitumor effect of seaweeds. I. Antitumor effect of extracts from *Sargassum* and *Laminaria*. Japan. J. Exp. Med. 44: 543~546, 1974
- 2) YAMAMOTO, I.; T. NAGUMO, M. FUJIHARA, M. TAKAHASHI, Y. ANDO, M. OKADA & K. KAWAI: Antitumor effect of seaweeds. II. Fractionation and partial characterization of the polysaccharide with antitumor activity from *Sargassum fulvellum*. Japan. J. Exp. Med. 47: 133~140, 1977
- 3) FUJIHARA, M.; N. IZIMA, I. YAMAMOTO & T. NAGUMO: Purification and chemical and physical characterisation of an antitumour polysaccharide from the brown seaweed *Sargassum fulvellum*. Carbohydr. Res. 125: 97~106, 1984
- 4) BITTER, T. & H. M. MUIR: A modified uronic acid carbazole reaction. Anal. Biochem. 4: 330~334, 1962
- 5) 阿武喜美子, 瀬野信子: 糖質一般定量法 (I) 蛋白質・核酸・酵素 12: 1102~1107, 1967
- 6) HAUG, A. & B. LARSEN: Quantitative determination of the uronic acid composition of alginates. Acta Chem. Scand. 16: 1908~1918, 1962
- 7) DONNAN, F. G. & R. C. ROSE: Osmotic pressure, molecular weight, and viscosity of sodium alginate. Can. J. Res., Sect. B, 28: 105~113, 1950
- 8) 山田吉隆: 担がん宿主における単球機能に関する実験および臨床的研究 第1編 担がんマウスにおける各種マクロファージ機能の推移。広島大学医学雑誌 29: 491~502, 1981
- 9) MAEHARA, N.; H. KOMATSU, K. SHIMODA, S. MAKINO, Y. NAGANO & M. MATUMOTO: Enhanced production of virus-inhibiting factor (interferon) in human diploid cells by ultraviolet irradiation and temperature shift-down after stimulation with newcastle disease virus. Microbiol. Immunol. 24: 907~

- 914, 1980
- 10) LACOUR, F.; G. DELAGE & C. CHIANALE: Reduced incidence of spontaneous mammary tumors in C3H/He mice after treatment with polyadenylate-polyuridylylate. *Science*, 187: 256~257, 1975
 - 11) OTTENBRITE, R. M.: The antitumor and antiviral effects of polycarboxylic acid polymers. *Biological activities of polymers*. (CARRAHER, C. E., Jr & C. G. GEBELEIN) pp. 205~220, 1982
 - 12) MOHR, S. J.; M. A. CHIRIGOS, F. S. FUHRMAN & J. W. PRYOR: Pyran copolymer as an effective adjuvant to chemotherapy against a murine leukemia and solid tumor. *Cancer Res.* 35: 3750~3754, 1975
 - 13) 斎藤和久, 多田限卓史: マクロファージの分離, 付着法, 免疫実験操作法 A, 日本免疫学会 465~466 頁, 1971
 - 14) 桑田次男: インターフェロンの多面的作用. 蛋白質・核酸・酵素(別冊) 25: 204~208, 1981
 - 15) MINATO, N.; L. REID, H. CANTOR, P. LENGUEL & B. R. BLOOM: Mode of regulation of natural killer cell activity by interferon. *J. Exp. Med.* 152: 124~137, 1980
 - 16) 布施 晃: インターフェロンの細胞増殖抑制作用. 蛋白質・核酸・酵素(別冊) 25: 236~259, 1981

ANTITUMOR ACTIVITY AND ITS MECHANISMS OF SODIUM ALGinate FROM THE BROWN SEAWEED *SARGASSUM FULVELLUM*

MICHIO FUJIHARA, KANKI KOMIYAMA*, IWAO UMEZAWA*
and TETSUO NAGUMO

Department of Biophysics, School of Hygienic Sciences, Kitasato University.
The Kitasato Institute*.

Sodium alginate was purified from the hot-water extract of the brown seaweed *Sargassum fulvellum* by fractional precipitation with ethanol and gel-filtration, and the polysaccharide had a mol. wt. of 29,000 and molar ratio of mannuronic acid to guluronic acid of 2.84.

An antitumor activity of the alginate was investigated against various murine tumores, such as Sarcoma-180 (ascitic type) and Ehrlich ascites carcinoma tumors as allogeneic ones, and IMC carcinoma, Meth-A and leukemia P388 tumors as syngeneic ones. The activities were evaluated by the increase in life span (ILS). The alginate showed a considerable antitumor activity against Sarcoma-180 and Ehrlich ascites carcinoma (ILS, 141 and 222%, respectively at a dose of 50 mg/kg). The polysaccharide further showed more remarkable antitumor effect on IMC carcinoma (ILS, 205 and over 215% at a dose of 12.5 or 50 mg/kg, respectively). And administration of the polysaccharide at a dose of 100 mg/kg gave ILS value of over 215% and all of mice tested survived for over 60 days. On the other hand, the alginate was found to be ineffective on Meth-A and P388 tumors.

In order to clarify a mechanism of antitumor activity of the alginate, the effect of the alginate in cytostatic activity of macrophages was first examined. The peritoneal exudate cells (PEC) from mice, into which the alginate was injected, was found to inhibit uptake of ³H-thymidine into EL-4 cells. Almost complete inhibition of the uptake was shown at a dose of 100 mg/kg of the sample. Next, the effect of the polysaccharide on cytolytic activity was investigated. The cytolytic activity of the PEC from mice, which were treated with the alginate at a dose of 200 mg/kg, was found to be two times as high as that of the untreated ones.

The polyuronide was also found to have IFN-inducing activity. The highest activity was shown at 1 hr. after treatment of mice with 200 mg/kg of the sample.

These results indicated that a mechanism of antitumor activity of the alginate may be host-mediated.