

生物活性スクリーニングによる天然物資源からの抗腫瘍活性物質 の分離・同定

東京薬科大学 竹谷孝一、糸川秀治

Isolation and Structural Determination of Antitumor Substances from Natural Products using Bio-active Screening Tests

Koichi Takeya and Hideji Itokawa

Department of Pharmacognosy, Tokyo College of Pharmacy, Horinouchi 1432-1,
Hachioji, 192-03 Tokyo, JAPAN

Abstract

Many plants collected at Japan, China, Korea, Indonesia and South America were applied to antitumor and / or cytotoxic screening tests against Sarcoma 180 ascites in mice and / or V-79, KB, P388 cultured cells. On the course of these screening tests, alcoholic extracts of *Forsythia viridissima* (Oleaceae), *Eurycoma longifolia* (Simaroubaceae), *Rubia cordifolia* and *R. akane* (Rubiaceae), *Cissampelos pareira* and *Abuta concolor* (Menispermaceae), *Nardostachys chinensis* (Valerianaceae), *Mansoa alliacea* (Bignoniaceae), *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae), *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae), *Hedychium coronarium* (Zingiberaceae), *Croton palanostigma* (Euphorbiaceae), *Cocculus trilobus* (Menispermaceae), *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae), *Alpinia galanga* and *Curcuma xanthorrhiza* (Zingiberaceae), *Evodia rutaecarpa* (Rutaceae), and *Periploca sepium* (Asclepiadaceae) showed significant activity and their active principles were clarified. In this paper, a few antitumor substances in above plants are introduced.

今日、多くの人々が疾病、健康維持のために十分な医薬品・健康食品を必要としているにもかかわらず、特殊疾患・経済的理由により入手できないことがあり、手軽に入手・採取できる草根木皮類の民間療法に頼っている現実がある。これら民間生薬は新規医薬品開発の重要な情報源となっている一方、迷信的に用いられていることも多いため、化学的・薬理的・生化学的サイドからの科学的解明が必要であり、正しい民間的療法の啓蒙することが重要である。また、未利用薬用資源植物を見いだして地域住民の医療向上をめざすとともに、薬用資源植物の開発により、経済を活性化することは意義あることと考える。

新規医薬品創製研究のほとんどは、合成化学的手法による既知構造の変換・誘導化によるものであり、化合物的に新規であるとはいえ、母核構造が同一であるため、新規な薬理作用機序が期待できず、薬効が強いにもかかわらず、薬物耐性の疾病に対処できずにいるのが現実である。また、社会的に大きな問題となっている癌治療薬においても同様な研究開発体制がほとんどであり、決定的な抗癌治療薬が見いだされていないのが現状である。

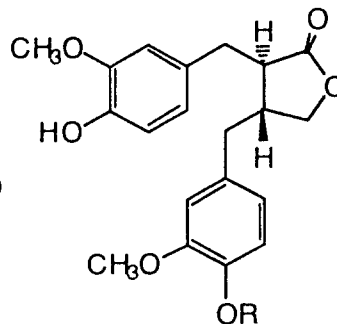
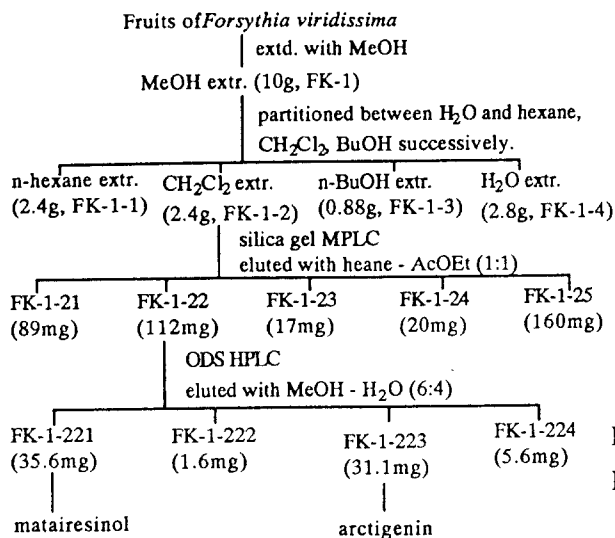
自然界よりの生理活性物質の探索研究は各地で行なわれているが、そのほとんどが微生物生産物に由来するものである。種を異にする植物からは微生物生産物とは異なる新規な構造を有する生理活性物質が発見される可能性が大であるとともに、民間で伝統的に用いられている薬物のほとんどは、植物性生薬であり、単なるランダムスクリーニングに基づく天然物医薬品開発に対して、医薬品開発の重要な情報を与えてくれる一方、薬理活性を指標に天然物から単離・構造決定され、医薬品として開発されてきた化合物類の多くは、新規化学構造を有するとともに特異な生理活性・作用機序を示すことが多く、天然物医薬品がリード化合物のターゲットとされているのが実際である。そこで、我々の研究室では、日本、中国、韓国、インドネシア、ブラジル、ペルー、パラグアイなどの各地で収集した植物のアルコール抽出物をマウスSarcoma180腹水型腫瘍とV-79, KB, P388培養細胞系生物試験に供して新規抗腫瘍活性物質の探索を中心に研究を進めているが、その一部を紹介する。

抗腫瘍活性物質検索のためのスクリーニングとしては、一般に培養細胞を用いて行なうスクリーニング法、EhrlichやSarcoma180腹水型腫瘍、白血病モデルのP388, L1210などの実験動物腫瘍で行なうスクリーニング法、生体内免疫応答物質に注目したスクリーニング法などが知られている。最近では、これらスクリーニング腫瘍系において、人癌細胞が実験に用いられる傾向が大になってきた。一方、我々の研究室では実験方法が簡単で、臨床上有効な抗癌剤の結果を良く反映しているスクリーニングとして、*in vivo*試験ではマウスSarcoma180腹水型腫瘍を用いる総細胞容積法で検定を行なっている。また、*in vitro*試験では、V-79, P388, KBなどの培養細胞を用いて行なっている。なお、これらの実験方法の詳細については、東洋資源学会誌,5(2),95-103 (1992)を参考にしたい。

1) 韓国産レンギョウ *Forsythia viridissima*からの細胞毒成分

東洋資源植物学会会長・李相來先生との共同研究により、韓国産抗腫瘍活性植物の探索研究を行なっている。このスクリーニングの過程において、日本市場品レンギョウ *F. suspensa*には活性が認められなかったが、韓国産レンギョウ (*F. viridissima*) のメタノール抽出液に、強い活性を見いだした (V-79細胞に対する IC_{50} 値: 7.9 $\mu\text{g/ml}$)。そこで活性試験を指標にその活性物質を探索したところ、リグナン系化合物 matairesinol と arctigeninが活性物質として単離・構造決定された。V-79培養細胞に対する IC_{50} 値をそれぞれについて求めたところ、7.8 $\mu\text{g/ml}$ と 1.65 $\mu\text{g/ml}$ と良好な活性を示した。リグナン系化合物の細胞毒性については、臨床効果の認められているポドフィロトキシンをはじめとしていくつか報告されているが、シナレンギョウよりの細胞毒性を指標とした系

統的分離操作により、活性物質が明かにされたのは、これが最初である。

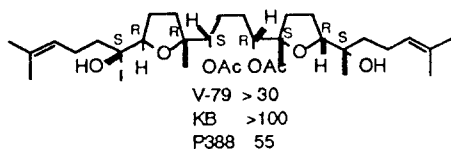


R=H: matairesinol: IC₅₀ 7.8 μg/ml
R=CH₃: arctigenin: IC₅₀ 1.65 μg/ml

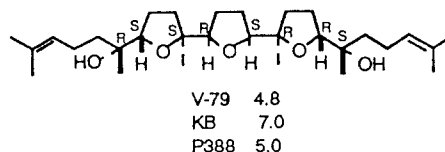
2) インドネシア産植物 *Eurycoma longifolia* の細胞毒性成分

Cytotoxic Activity of Squalene-type Triterpene Ethers against V-79, KB and P388 cells

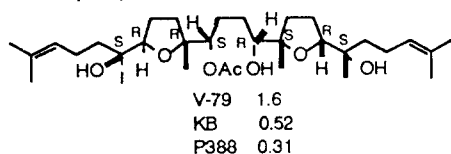
Eurylene (1)



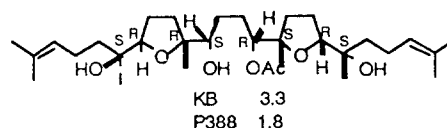
Teurilene (4)



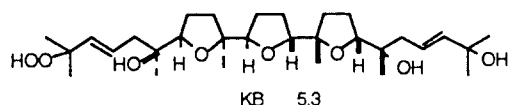
14-Deacetyleurylene (2)



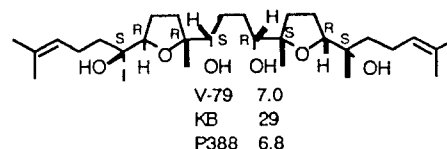
11-Deacetyleurylene (5)



Longilene peroxide (3)

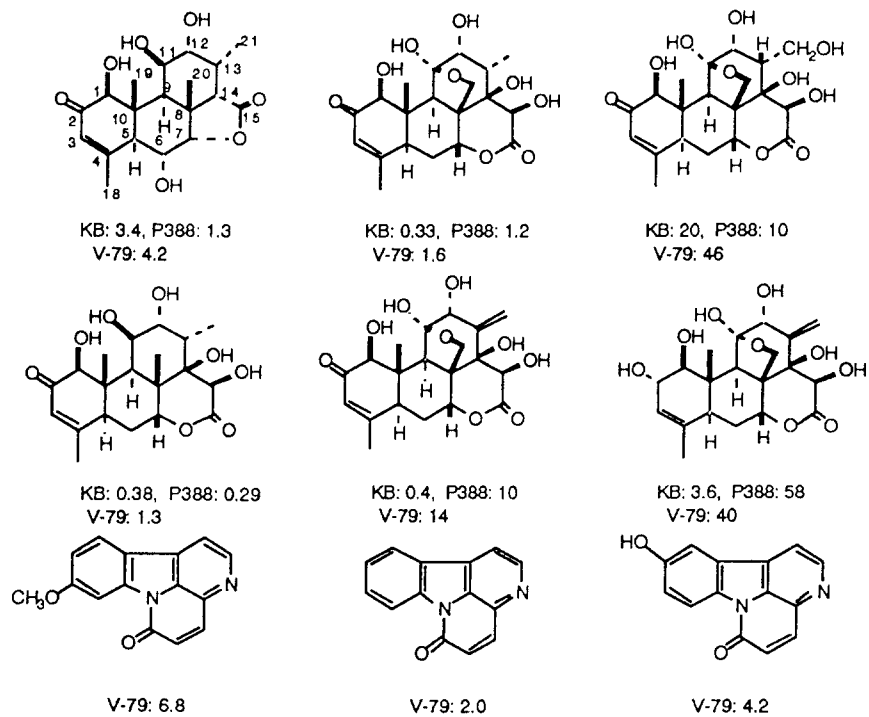


11,14-Deacetyleurylene (10)



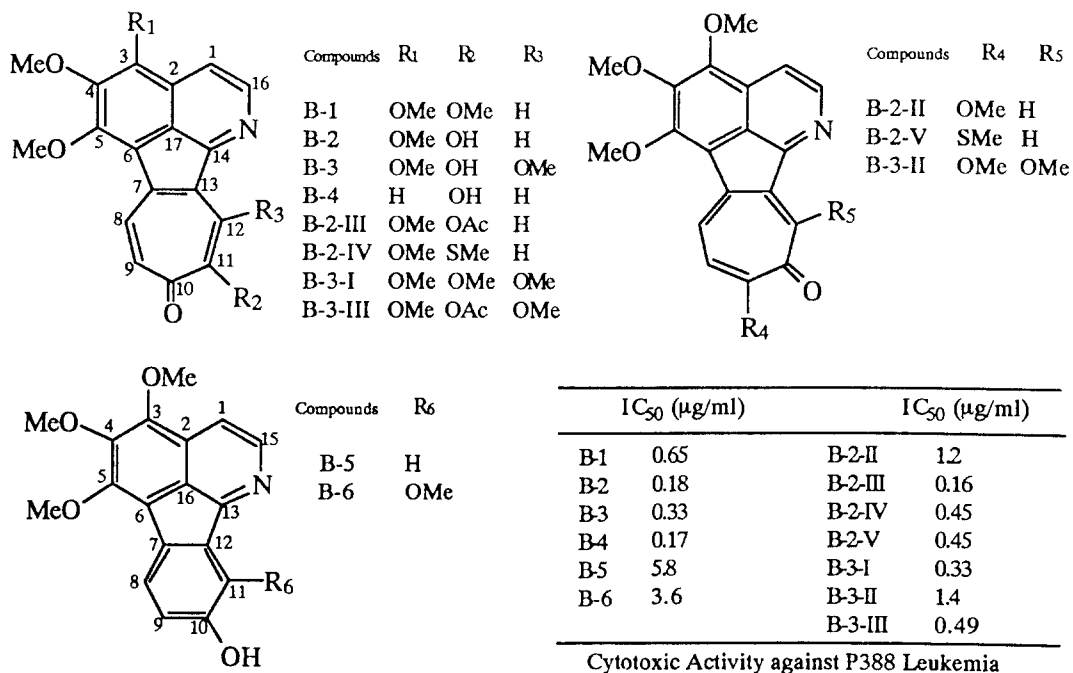
The effectiveness was evaluated in terms of the IC₅₀ values (μg/ml).

Eurycoma longifolia (Simaroubaceae)はインドシナから西マレーシア熱帯に分布し、解熱、抗マラリア剤、強壯剤などに民間薬として用いられている。本植物は、マウス Sarcoma 180腹水型腫瘍および培養細胞に対して強い活性を示したので、その活性成分の探索を行なった。その結果、活性化化合物として、スクワレン型トリテルペンエーテル類、カンチンアルカロイド類、カッシノイド類、ティルカラン型トリテルペン類を単離、構造決定した。



Cytotoxic Activities (IC₅₀ values: µg/ml) of Canthins and Quassinoids against KB, P388 and V-79 Cells

3) 南米産植物 *Cissampelos pareira* 及び *Abuta concolor* からの細胞毒性成分

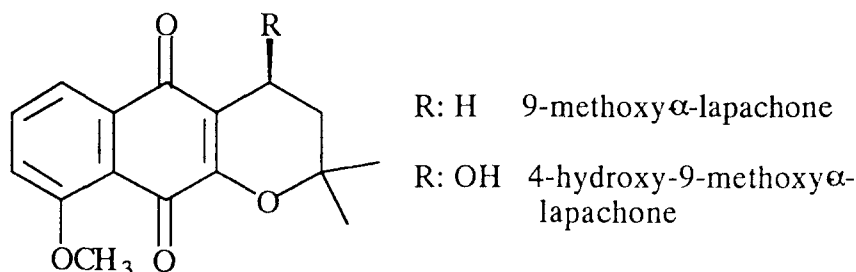


Cissampelos pareira (Menispermaceae)は西マレーシアを除く熱帯地域に広く分布し、民間的には茎は利尿剤として、葉はヘビの咬傷に使用されている。また、中国では筋肉を弛緩させ、平滑筋を収縮させる作用があると言われ、止痛や止血に用いられている。本植物は、V-79細胞に対して細胞毒性を示したので、活性を指標に成分検索を行なったところ、B-1からB-6のイソキノリンアルカロイド類を得た。なお、B-1からB-4は天然には珍しいトロポイソキノリンアルカロイド類であった。また、その活性はB-5、-6のアザフルオランセン型アルカロイド類よりもトロポイソキノリンアルカロイド類のほうが、より強い効果を示した。

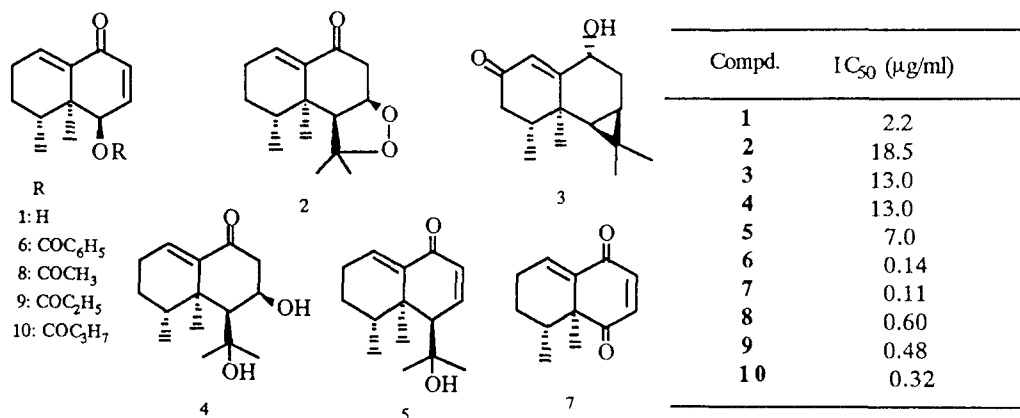
*C. pareira*と近縁植物である*Abuta concolor*をアマゾン河口のベレン市場で入手することができたので、その活性を調べるとともに、抗腫瘍活性成分を検索したところ、*C. pareira*で単離・構造決定されたB-2、-3の化合物が得られた。

4) 南米産植物 *Mansoa alliacea*の細胞毒性成分

南米ペルーのイキトスで採集した*Mansoa alliacea* (Bignoniaceae)は、培養細胞V-79に対して活性を示したので、その活性本体の探索を行なったところ、9-methoxy- α -lapachone (IC_{50} : 5.6 μ g/ml)と4-hydroxy-9-methoxy- α -lapachone (IC_{50} : 6.0 μ g/ml)が単離・同定された。



5) 甘松香 *Nardostachys chinensis*の細胞毒性成分



甘松香はインドから中国南西部にかけて分布するオミナエシ科の植物でその根茎はワ

レリアナ根の代用品として用いられるとともに、利尿・胃腸薬・腹痛・頭痛などに使用されている。本植物のアルコール抽出物はP388培養細胞に対して、IC50値が21mg/mlという活性を示したので、その活性本体の検索を行なったところ、図のようなセスキテルペン類が単離・構造決定された。

このほかにも多くの植物より、抗腫瘍活性物質を単離・構造決定してきている。これらについては、参考文献1)の総説を参照していただきたい。

以下に最近の研究発表論文を記しておいた。

- 1) H.Itoka and K.Takeya; Antitumor Substances from Higher Plants, *Heterocycles*, **3** 5(2), 1467-1501 (1993).
- 2) H.Itokawa, K.Masuyama, H.Morita and K.Takeya; Cytotoxic Sesquiterpenes from *Nardostachys chinensis*, *Chem.Pharm.Bull.*, **4** 1(6), 1183-1184 (1993).
- 3) K.Oka, T.Hirano, M.Homma, H.Ishii, K.Murakami, S.Mogami, A.Motizuki, H.Morita, K.Takeya and H.Itokawa; Satisfactory Separation and MS-MS Spectrometry of Six Surfactins Isolated from *Bacillus subtilis natto*, *Chem.Pharm.Bull.*, **4** 1(5), 1000-1002 (1993).
- 4) H.Morita, T.Yamamiya, K.Takeya, H.Itokawa, C.Sakuma, J.Yamada and T.Suga; Conformational Recognition of RA-VII by 80S Ribosomes: A Differential Line Broadening Study in ¹H NMR Spectroscopy, *Chem.Pharm.Bull.*, **4** 1(4), 781-783 (1993).
- 5) H.Itokawa, J.Suzuki, Y.Hitotsuyanagi, K.Kondo and K.Takeya; An Efficient Backbone Amide Nitrogen Alkylation of RA-VII, an Antitumor Cyclic Hexapeptide, *Chem.Lett.*, 695-696 (1993).
- 6) H.Itokawa, X.-R.Qin, H.Morita, K.Takeya and Y.Itaka; Novel Quassinoids from *Eurycoma longifolia*, *Chem.Pharm.Bull.*, **4** 1(2), 403-405 (1993).
- 7) H.Morita, K.Matsumoto, K.Takeya, H.Itokawa and Y.Itaka; A Novel Antileukemic Tropoloisoquinoline Alkaloid, Pareirubine, from *Cissampelos pareira*, *Chem.Lett.*, 339-342 (1993).
- 8) Y.Ichihara, K.Takeya, Y.Hitotsuyanagi, H.Morita, S.Okuyama, M.Suganuma, H.Fujiki, M.Motidome and H.Itokawa; Cajucarinolide and Isocajucarinolide: Anti-Inflammatory Diterpenes from *Croton cajucara*, *Planta Med.*, **5** 8, 549-551 (1992).
- 9) K.Nishiya, T.Kimura, K.Takeya and H.Itokawa; Sesquiterpenoids and Iridoid Glycosides from *Valeriana fauriei*, *Phytochemistry*, **3** 1(10), 3511-3514 (1992).
- 10) K.Osawa, H.Yasuda, T.Maruyama, H.Morita, K.Takeya and H.Itokawa; Isoflavanones from the Heartwood of *Swartzia polyphylla* and Their Antibacterial Activity against Cariogenic Bacteria, *Chem.Pharm.Bull.*, **4** 0(11) 2970-2974 (1992).
- 11) M.Haraguchi, D.Nobre, R.d.B.Guimaraes, H.S.Maria; Occurrence of Procyanidin in the Toxic Fraction from *Riedeliella graciliflora*, *Rev.Latinoamer.Quim.*, **23** / 1 & **22** / 4, 34-36 (1992).
- 12) H.Itokawa, K.Saitou, H.Morita, K.Takeya and K.Yamada; Structures and Conformations of Metabolites of Antitumor Cyclic Hexapeptides, RA-VII and RA-X, *Chem.Pharm.Bull.*, **4** 0(11), 2984-2989 (1992).
- 13) Isomerization of Antitumor Bicyclic Hexapeptide, RA-VII from *Rubia cordifolia*. Part.4. Conformation-Antitumour Activity Relationship, *J.Chem.Soc.Perkin Trans.2*, 1635-1642 (1992).

- 14) H.Morita, E.Kishi, K.Takeya and H.Itokawa; Biphenylneolignans from Wood of *Eurycoma longifolia*, *Phytochemistry*, **31**(11), 3993-3995(1992).
- 15) H.Morita, T.Yamamiya, K.Takeya and H.Itokawa; New Antitumor Bicyclic Hexapeptides, RA-XI, RA-XII, RA-XIII and RA-IV from *Rubia cordifolia*, *Chem.Pharm.Bull.*, **40**(5), 1352-1354(1992).
- 16) H.Itokawa, O.Shirota, H.Morita and K.Takeya; Sesquiterpene Pyridine Alkaloids from *Maytenus ebenifolia*, *Heterocycles*, **34**(5), 885-889(1992).
- 17) H.Itokawa, E.Kishi, H.Morita and K.Takeya; Cytotoxic Quassinoids and Tirucallane-Type Triterpenes from the Woods of *Eurycoma longifolia*, *Chem.Pharm.Bull.*, **40**(4), 1053-1055(1992).
- 18) H.Itokawa, K.Matsumoto, H.Morita and K.Takeya; Cytotoxic Naphthoquinones from *Mansoa alliacea*, *Phytochemistry*, **31**(3), 1061-1062(1992).
- 19) 上原真一、安田一郎、竹谷孝一、糸川秀治；クスリウコン *Curcuma xanthorrhiza* 根茎中のテルペノイド及びクルクミノイドについて、*薬学雑誌*, **112**(11), 817-823(1992).
- 20) 上原真一、安田一郎、竹谷孝一、糸川秀治；市場品鬱金および栽培植物の成分組成による比較、*生薬学雑誌*, **46**(1), 55-61(1992).
- 21) H.Itokawa, Y.Hitotsuyanagi and K.Takeya; Synthesis of 2-Aza-4-ketopodophyllotoxin, *Heterocycles*, **33**(2), 537-540(1992).
- 22) H.Itokawa, T.Yamamiya, H.Morita and K.Takeya; New Antitumour Bicyclic Hexapeptides, RA-IX and -X from *Rubia cordifolia*. Part 3. Conformation-Antitumour Activity Relationship, *J.Chem.Soc.Perkin Trans.1*, 455-459(1992).