

## 天然物由来抗癌物質検索のためのスクリーニング研究

竹谷 孝一

東京薬科大学

### Current Progress in the Screening for Antitumor Drugs of National Origin

Koichi Takeya

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

#### Abstract

Now, many anticancer drugs are applying in the clinical side, but there is no conclusive effect of such a chemotherapy. Development of novel clinical useful anticancer drugs would be dependent on the screening system and its test sample sources. So, it is necessary to outline some background on the tumor systems which have been used for screening. This paper describes mainly on National Cancer Institute (NCI) program for anticancer screening systems, because the large number of compounds have been screened at NCI program and their relationship of assessment between experimental animals and clinical patients has been discussing and the uniform screening protocols for various tumor systems. At the end of this paper, some literatures of antitumor substances from various higher plants at our laboratory are showed.

日本における癌の死亡率は、外科・放射線療法の進歩にもかかわらず、1985年には18万人にも達し、現在、疾病による死亡原因の第一となっている。このような状況下、いまだ決定的な化学療法剤等の開発がなされておらず、社会的に大きな問題であり、天然物由来の新規な抗癌剤の開発研究が望まれている。

新規な制がん作用機序を有するユニークな化合物を見出す方法には、新しい天然資源にそのスクリーニング検体を求める方法と、新しいスクリーニング生物検定法により抗腫瘍活性物質を検索する方法の2つが考えられる。しかし、後者は生化学者等による発癌メカニズムなどの基礎的研究が進み、新しい検定方法が確立されるまで待たねばならないため、現在において最良であると考えられる抗腫瘍活性スクリーニング方法に従わざるを得ない。前者のスクリーニング検体として無作為に用いる場合は、確かに当る確立は少ないと思われる。しかし、古来より世界各国で伝承されている民間薬草および中国の漢方医学、インドのアユルベーダ医学などの伝統的薬草知識をも加味してスクリーニング検体を類推してゆけば、新規な抗癌剤の発見により高い確立の選択手段になりえるものと思われる。即ち、民族伝統医学の薬草知識などは、人類が病との戦いから選択してきたものであり、ある意味で臨床の場を通過してきたものである。

## 1. 抗腫瘍活性スクリーニングの概要

抗腫瘍活性を指標として広く天然物資源の中から新たに有効な生理活性物質を見出そうとする努力は、大規模かつ組織的な生理活性スクリーニングのシステムが確立されて以来、各所で精力的に行われ始めた。このような大規模で組織的な天然物資源からの抗腫瘍活性物質検索スクリーニング方法の開発は、米国で最も盛んに行われてきた。したがって、米国における抗腫瘍薬開発研究の歴史が、今日のスクリーニング方法の基盤となっている点が多く、制がん剤スクリーニングに関しては、現在、米国国立癌研究所（NCI）にて採用されている方式が、日本をはじめとして多くの国々で広く利用されている。

一般に実施されている抗腫瘍活性試験では、培養細胞を用いる活性スクリーニング法、Ehrlich や Sarcoma 180の腹水腫瘍、白血病モデルの P388, L1210 などの実験動物腫瘍を用いて行うスクリーニング法が採用されている。これらの方法は抗腫瘍薬開発における選択毒性、すなわち腫瘍細胞が正常細胞に比較

して核の分裂速度が速く、核酸の代謝回転、タンパク質合成が盛んであるということをも前提とした細胞毒性に基づくものである。このような抗腫瘍薬は、腫瘍細胞を直接攻撃して腫瘍細胞の皆殺しを目的としているが、腫瘍細胞と正常細胞との区別が難しく、生体内の骨髄細胞、リンパ細胞など一般に分裂が盛んで生体防御に重要な機能をもった正常細胞まで攻撃してしまうリスクをも背負うことになる。これに対して、腫瘍細胞に対する宿主の免疫抵抗性に着目して、その抵抗性を高めることにより、悪性腫瘍を治療してゆこうとする考え方が日本の研究者を中心に開発研究され、菌体類などより抗腫瘍性多糖類が単離された。また、1970年代にはインターフェロンによる治療法も考えられるようになり、癌の免疫療法が注目を浴びるようになり、NCIでは癌の増殖および転移に対して、重要な生物学的反応を演じさせるような物質を整理統合してBRM (biological response modifiers, 生物応答調節物質) と呼び、その研究プログラムが1980年に具体化した。現在までに多くのBRMが知られてきており、今後、外科・放射線・化学療法に加えてBRMがどのような地位を確立してゆくか注目される。

## 2. 抗腫瘍効果のスクリーニング検定法

腫瘍細胞は近年開発されたヌードマウス移植性人癌を除いて、動物の種を越えての腫瘍移植が不可能であるため、そのほとんどが動物の腫瘍を対象に人癌に近いモデルにより生物検定を行い、人癌への効果を推定せざるえないのが現実であるとともに、検定に用いられる腫瘍のほとんどが移植性の動物腫瘍であるのに対し、人癌はその個体のなかに自然発生した腫瘍である。このような移植性の動物腫瘍を用いる抗腫瘍活性スクリーニングの結果が臨床効果を予言しえるのかという疑問が起り、Gellhornらは、NCIで行われた多数の動物腫瘍を用いた検定法を検討し、以下のように結論づけた。

- 1) 検討した非腫瘍系は制がん剤スクリーニング系の腫瘍系の代りにならない。
- 2) すべての腫瘍系に対して有効な制がん剤を選別しえる腫瘍系は存在せず、いくつかの腫瘍系を組合せて使用することが望ましい。
- 3) 十分に確立された臨床データのないことが、実験動物腫瘍と臨床上の人癌における制がん効果の比較を困難にしている。

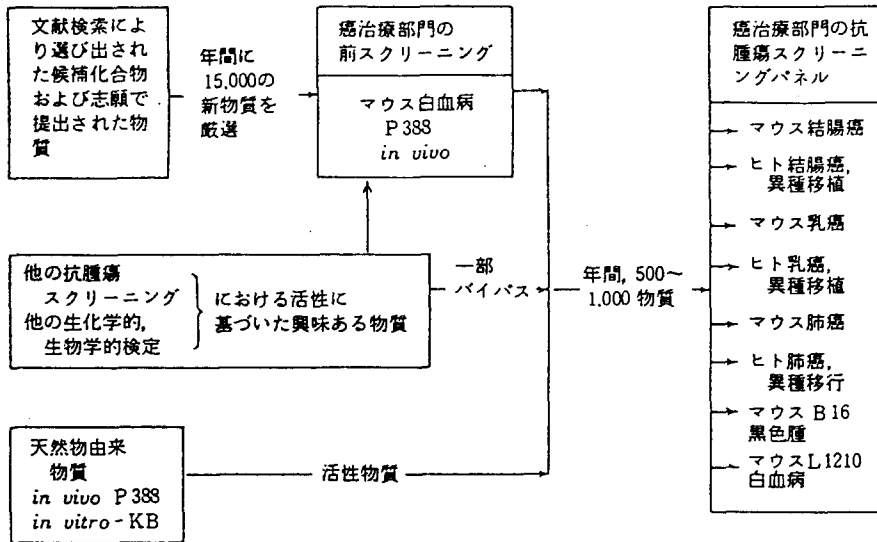


図1 1976～1982年の米国立癌研究所癌治療部門の抗癌剤第一次スクリーニングのフローチャート (ファインケミカル, vol 17 (1)より)

表2 1983年度に決まったNCIの *in vivo* スクリーニングの流れ

スクリーニング段階	1年当りの予想評価数	腫瘍系	移植部位	治療部位	治療開始日
① 一次スクリーニング	10,000	P 388	Ip	Ip	day 1
② 改良されたパネル	250	L-1210	Ip	Ip	day 1
		B 16	Ip	Ip	day 1
		MX-1	Src*	Ip	day 1
		M 5076	Ip	Ip	day 1
③ 二次スクリーニング	50	L-1210	Sc	Ip	day 1
		B 16	Sc	Ip	day 1
		B 16	Ip	Sc	day 1
		M 5076	Sc	Ip	day 1
		MX-1	Sc	Ip	When sc tumor is established
		CD	Sc	Ip	When sc tumor is established
	C 8	Sc	Ip	day 1	

Treatment of established (advanced) tumors shown sensitive to early treatment

Determination of profile of cross-resistance to major clinical drugs

Antimetastatic screens

Other assays indicated by prior found activities, structure, etc

\* subrenal capsule 法によるもの

(医学のあゆみ, vol. 141 (9)より)

以上のことより臨床上、有効な制がん剤を予言するには、より広い抗腫瘍スペクトルを検討した法が良いであろうということが提唱され、NCIで蓄積されたスクリーニングのデータを基に臨床効果との回顧的な解析が行われた結果、マウス白血病 L1210が、圧倒的によく臨床効果を予言していたという結論が報告され、マウスによる L1210の検定法が、NCIでの一次スクリーニングとして採用されると、これが国際的に広がった。しかし、当時、臨床的に有効な制がん剤として用いられていた vincristineおよび prednisonは、選別試験では有効レベルに達しなかった。また、新たに有効な制がん剤として登場してきた mithramycin, bleomycinなども L1210の検定法で無効であった。その後、これらの効果を予言しえるのは、マウス白血病 P388であることが見出され、L1210に対してあまり有効でない天然物由来化合物も P388は良好な結果を与えた。このような歴史的背景を基に1976年 NCIでは、図1のようなプレスクリーニングにマウス P388検定法を用いる一次スクリーニング方式を確立した。しかし、近年に至り、米国においては研究費の削減という事情もあり、スクリーニング経費の節約という意味からも、1983年にスクリーニング方式に手が加えられ、スクリーニングの腫瘍パネルに用いられていた8種の腫瘍系が、図2のようにマウス白血病 L1210、B16 メラノーマ、MX-1 (ヒト乳癌異種移植系) M5076 (マウス線維肉腫) の4種類に減らされた。

今日までのスクリーニング方法は、化合物の抗腫瘍活性を指標に活性物質を検索する compound-oriented in vivo screeningであるため、特定の人癌に対して有効な制がん剤が得られてこないという現実があり、スクリーニングにも人癌を対象とした系を採用すべきであるという考え方が最近強くなり、1986年にNCIでは、disease-oriented screening方式を採用した。このスクリーニングは、各種の人癌培養細胞に対する被検物質の細胞増殖抑制効果をみるものであり、今後のデータの蓄積が待たれる。

我々が実際に in vivo および in vitroの抗腫瘍活性試験を実施する場合、やはりアメリカNCIのスクリーニングのためのプロトコールが非常に参考となる。腫瘍細胞による検定法は、一般に培養細胞を試験管またはシャーレ中に移植したのち被検物質を加え、2~3日間培養を続けて細胞数を測定するか、あるいは細胞変性を観察して対照群と比較して50%増殖阻止濃度 (IC<sub>50</sub>) を求

Table I Antitumor Activity of Crude Drugs and Plants Collected in Indonesia

Indonesian name	original plant	part used	extract solvent	BWC (g)	PCV /TV	GR (%)	assess.
Pinang	Areca catechu (Palmae)	seed	E	+0.5	0.09	30	++
			W	-0.7	0.12	48	+
Akar Usar (from Jawa 1)	Andropogon zizaniodes (Gramineae)	rhizome	E	+3.0	0.40	105	-
			W	+2.6	0.33	83	-
Akar Usar (from Jawa 2)	Andropogon zizaniodes (Gramineae)	rhizome	E	-2.2	0.24	42	+
			W	-3.1	0.28	27	++
Lengkuas	Alpinia galanga (Zingiberaceae)	rhizome	E	+0.4	0.35	2	+++
			W	+1.6	0.20	69	-
Kapol	Amomum compactum (Zingiberaceae)	fruit	E	+2.8	0.29	102	-
			W	-2.2	0.14	35	++
Temu Lawak	Curcuma xanthorrhiza (Zingiberaceae)	rhizome	E	+2.8	0.02	1	+++
			W	+1.3	0.22	50	+
Temu Mangga	Curcuma mangga (Zingiberaceae)	rhizome	E	-0.4	0.29	4	+++
			W				
Temu Itam	Curcuma phaeocaulis (Zingiberaceae)	rhizome	E	+1.7	0.26	45	+
			W	-0.7	0.20	31	++
Kunyit	Curcuma longa (Zingiberaceae)	rhizome	E	+2.1	0.29	87	-
			W	-2.0	0.10	10	++
Lempuyang	Zingiber aromaticum (Zingiberaceae)	rhizome	E	-0.6	0.39	97	-
			W	-2.6	0.19	24	++
Lempuyang Pait	Zingiber amaricans (Zingiberaceae)	rhizome	E	+2.9	0.17	9	+++
Kumis Kucing	Orthosiphon aristatus (Labiatae)	leaf	E	+2.0	0.17	41	+
			W	+0.7	0.39	89	-
Pabia	Parkia roxburgii (Mimosaceae)	seed	E	+2.0	0.30	52	+
			W(50)	-2.3	0.32	38	++
Cincau Hitam	Mesona palustris (Labiatae)	leaf & stem	E	+3.9	0.05	11	++
			W				
Cabe Jawa	Piper retrofractum (Piperaceae)	fruit	E(50)	+1.2	0.36	53	+
			W	+2.1	0.23	71	-
Sinkong Racum	Manihot utilissima (Euphorbiaceae)	root	E	+4.9	0.42	104	-
			W	+2.2	0.56	25	++
Kayu Secang	Caesalpinia sappan (Leguminosae)	wood	E	+1.6	0.42	87	-
			W	+3.0	0.31	33	++
Kayu Manis	Glycyrrhiza glabra (Leguminosae)	root	E	+3.7	0.37	92	-
			W	-1.2	0.20	43	+
Sri Kaya Laut	Sterculia lychophora (Sterculiaceae)	fruit	E	+0.9	0.29	75	-
			W	-2.2	0.19	65	+
Kenanga	Canarium odoratum (Anonaceae)	*wood	E	+4.3	0.36	81	-
			W	+2.6	0.32	64	+
Pasak Bumi	Eurycoma longifolia (Simarubaceae)	root	E(30)	+1.2	0.21	34	++
			W(30)	-1.9	0.10	13	++
Kulit Lawang	Cinnamomum sp. (Lauraceae)	bark	E	+3.2	0.38	75	-
			W	+1.3	0.22	19	++
Sambilata	Andrographis paniculata (Acanthaceae)	aerial part	E	+2.3	0.19	41	+
			W	+1.7	0.33	77	-

E: ethanol extract, W: water extract, dose: 100 mg/kg/day

\*These identifications are still uncertain.

めることにより薬効をを判定する。本法は被検物質の腫瘍細胞に対する活性を細胞毒性として直接観察でき、検定期間も短く、検定の試料量が少なくすみ、検定に高い再現性があり、費用が安くすむなどの利点も多いが、宿主条件の関与がないために治療係数、活性物質の生体内における活性化、不活性化などが観察できない欠点も多い。一方、実験動物による検定法では、主として移植性腫瘍が用いられ、その腫瘍形式によって腹水腫瘍と固形腫瘍に分けられる。

腹水腫瘍を用いる検定法は、1群6~10匹の動物腹腔中に $10^5\sim 10^6$ 個の腫瘍細胞を移植したのち被検物質を1回ないし数回に分けて投与し、延命効果を測定する。延命効果の判定は、対照群(C)に対する薬物投与群(T)の生存日の平均値を $T/C\%$ 、あるいは $ILS$  (increase of life span) =  $(T - C) / C \%$ と表して評価している。また、検定一定期間後に開腹して、その腹水腫瘍量を対照群と薬物投与群とで比較して、薬効を評価する総細胞容積法(total packed cell volume method: TPCV法)で行われることもある。

固形腫瘍を用いる検定法は、腫瘍細胞を宿主動物の皮下に移植して固形腫瘍化させる。効果の判定は、一定期間後に固形腫瘍を取り出して対照群の平均腫瘍体積または重量(C)をその薬物投与群(T)のものと比較し、 $T/C\%$ をもって薬物による腫瘍の縮小率を表現して評価している。

### 3. Sarcoma 180腹水型腫瘍による薬用資源植物の抗腫瘍性スクリーニング

我々の研究室では、マウス Sarcoma 180腹水型腫瘍を用いる *in vivo* およびチャイニーズハムスター由来の V-79細胞を用いる *in vitro* スクリーニング法を一次スクリーニングとして採用し、世界各国の薬用資源植物について、検討してきた。その一部を Tableとして示したが、これらの活性試験をもとに多くの天然由来抗腫瘍活性物質を単離・構造決定してきた。これらの成果については、参考文献として最後にまとめて記載しておいた。

自然界における抗腫瘍活性物質の探索

- 1) 糸川秀治、渡辺謹三、三原和彦、竹谷孝一；生薬の抗腫瘍性スクリーニングテスト（第2報）、生薬学雑誌、36(2),145-149(1982).
- 2) H.Itokawa, K.Takeya, K.Mihara, N.Mori, T.Hamanaka, T.Sonobe, and Y.Iitaka; Studies on the Antitumor Cyclic Hexapeptides Obtained from Rubiae Radix, Chem.Pharm.Bull.,31(4),1424-1427(1983).
- 3) H.Itokawa, K.Takeya, N.Mori, T.Hamanaka, T.Sonobe, and K.Mihara; Isolation and Antitumor Activity of Cyclic Hexapeptides Isolated from Rubiae Radix, Chem.Pharm.Bull.,32(1),284-290(1984).
- 4) H.Itokawa, K.Takeya, N.Mori, T.Sonobe, N.Serisawa, T.Hamanaka and S.Mihashi ; Studies on Antitumor Cyclic Hexapeptides RA Obtained from Rubiae Radix, Rubiaceae. III. On Derivatives of RA-V and Their in Vivo Activies, Chem. Pharm.Bull.,32(8),3216-3226(1984).
- 5) H.Itokawa, K.Takeya, N.Mori, S.Kidokoro, and H.Yamamoto; Studies on Antitumour Cyclic Hexapeptides RA Obtained from Rubiae Radix, Rubiaceae (IV): Quantitative Determination of RA-VII and RA-V in Commercial Rubiae Radix and Collected Plants, Planta Medica,51(20),313-316(1984).
- 6) H.Itokawa, K.Takeya, N.Mori, M.Takanashi, H.Yamamoto, T.Sonobe, and S.Kidokoro; Cell Growth-Inhibitory Effects of Derivatives of Antitumor Cyclic Hexapeptide RA-V Obtained from Rubiae Radix (V), Gann,75(10),929-936(1984).
- 7) H.Itokawa, F.Hirayama, K.Funakoshi, and K.Takeya; Studies on the Antitumor Bisabolane Sesquiterpenoids Isolated from Curcuma xanthorrhiza, Chem.Pharm. Bull.,33(8),3488-3492(1985).
- 8) H.Itokawa, K.Takeya, N.Mori, T.Sonobe, S.Mihashi, and T.Hamanaka; Studies on Antitumor Cyclic Hexapeptides RA Obtained from Rubiae Radix, Rubiaceae. VI. Minor Antitumor Constituents, Chem.Pharm.Bull.,34(9),3762-3768(1986).
- 9) H.Itokawa, H.Morita, T.Sumitomo, N.Totsuka, and K.Takeya; Antitumour Principles from Alpinia galanga,Planta Medica,53(25),32-33(1987).



- 10) H.Itokawa, S.Tsuruoka, K.Takeya, N.Mori, T.Sonobe, S.Kosemura, and T.Hamanaka; An Antitumor Morphinane Alkaloid, Sinococuline, from *Cocculus trilobus*, Chem.Pharm.Bull.,35(4),1660-1662(1987).
- 11) H.Itokawa, N.Totsuka, K.Nakahara, K.Takeya, J.-P.Lepoittevin and Y.Asakawa ; Antitumor Principles from *Ginkgo biloba* L., Chem.Pharm.Bull.,35(7),3016-3020(1987).
- 12) H.Itokawa, J.Xu, and K.Takeya; Studies on Chemical Constituents of Antitumor Fraction from *Periploca sepium* Bge. I, Chem.Pharm.Bull.,35(11),4524-4529(1987).
- 13) H.Itokawa, J.Xu, and K.Takeya; Pregnane Glycosides from An Antitumour Fraction of *Periploca sepium*, Phytochemistry,27(4),1173-1179(1988).
- 14) H.Itokawa, J.Xu, K.Takeya, K.Watanabe, and J.Shoji; Studies on Chemical Constituents of Antitumor Fraction from *Periploca sepium*. II. Structures of New Pregnane Glycosides, Periplocosides A, B and C, Chem.Pharm.Bull.,36(3), 982-987(1988).
- 15) H.Itokawa, N.Totsuka, K.Takeya, K.Watanabe, and E.Obata; Antitumor Principles from *Casearia sylvestris* Sw.(Flacourtiaceae), Structure Elucidation of New Clerodane Diterpenes by 2-D NMR Spectroscopy, Chem.Pharm.Bull.,36(4),1585-1588(1988).
- 16) H.Itokawa, J.Xu, and K.Takeya; Studies on Chemical Constituents of Antitumor Fraction from *Periploca sepium*. IV. Structures of New Pregnane Glycosides, Periplocosides D, E, L, and M, Chem.Pharm.Bull.,36(6),2084-2089 (1988).
- 17) H.Itokawa, H.Morita, I.Katou, K.Takeya, A.J.Cavalheiro, R.C.D.de Oliveira, M.Ishige, and M.Motidome; Cytotoxic Diterpenes from the Rhizomes of *Hedychium coronarium*, Planta Medica,54(4),311-315(1988).
- 18) H.Itokawa, J.Xu, and K.Takeya; Studies on Chemical Constituents of Antitumor Fraction from *Periploca sepium*. V. Structures of New Pregnane Glycosides, Periplocosides J, K, F and O, Chem.Pharm.Bull.,36(11),4441-4446 (1988).

- 19) H.Itokawa, Y.Ichihara, K.Watanabe, and K.Takeya; An Antitumour Principle from *Euphorbia lathyris* L., *Planta Medica*,55(3),271-272(1989).
- 20) H.Itokawa, N.Totsuka, K.Nakahara, M.Maezuru, K.Takeya, M.Kondo, M.Inamatsu and H.Morita; A Quantitative Structure-Activity Relationship for Antitumor Activity of Long-Chain Phenols from *Ginkgo biloba* L., *Chem.Pharm.Bull.*,37(6),1619-1621(1989).
- 21) 糸川秀治, 平山総良, 鶴岡俊志, 水野謙治, 竹谷孝一, 新田あや; 生薬の抗腫瘍性スクリーニングテスト (第3報) インドネシア産薬用植物の抗腫瘍活性について *生薬学雑誌*, 44(1),58-62(1990).
- 22) H.Morita, E.Kishi, K.Takeya and O.Tanaka; New Quassinoids from the Roots of *Eurycoma longifolia*, *Chem.Lett.*749-752(1990).
- 23) H.Itokawa, M.Inamatsu and K.Takeya; A Cytotoxic Principle from *Evodia rutaecarpa*, *生薬学雑誌*, 44(2),135-137(1990).