

韓國産レンギョウ *Forsythia viridissima* の 細胞毒性成分に関する研究

糸川秀治,^a 松本浩二,^a 森田博史,^a 竹谷 孝一,^a 李 相來^b

東京薬科大学,^a 東洋資源植物研究所^b

Studies on Cytotoxic Constituents of Korean Forsythia Fruits

HIDECHI ITOKAWA, KOUJI MATSUMOTO, HIROSI MORITA, KOICHI TAKEYA, SANG RAE LEE

Department of Pharmacognosy, Tokyo College of Pharmacy^a, Horinouchi 1432-1, Hachioji, Tokyo 192-03, Japan and Institute of Oriental Botanical Resources^b, 312-28, Bukgajwa-Dong Seodaemun-ku, Seoul 120-132, Korea

Abstract

In the preliminary antitumor screening tests of Crude Drugs and collected plants, the methanolic extract of Forsythia Fruits in Korean market showed significant cytotoxic activity against Chinese hamster V-79 cells, but that in Japanese market did not. The former was identified as *Forsythia viridissima* Lindley and latter as *F. suspensa* Vahl on the basis of the morphological observation. When an aqueous solution of the extract prepared from the fruits of *F. viridissima* (Oleaceae) was partitioned successively with n-hexane, methylene chloride, n-butanol, the cytotoxic activity was concentrated in the methylene chloride extract. Fractionation of the extract was made with the guidance of bioassay against V-79 cells to give cytotoxic lignans, matairesiol (1) and arctigenin (2). Their IC₅₀ values of compounds 1 and 2 were respectively 7.8 µg/ml 1 and 1.65 µg/ml. Also, their structures were confirmed by comparison of physical and spectral data in the literature.

Key word : *Forsythia viridissima*, cytotoxic activity, matairesiol, arctigenin

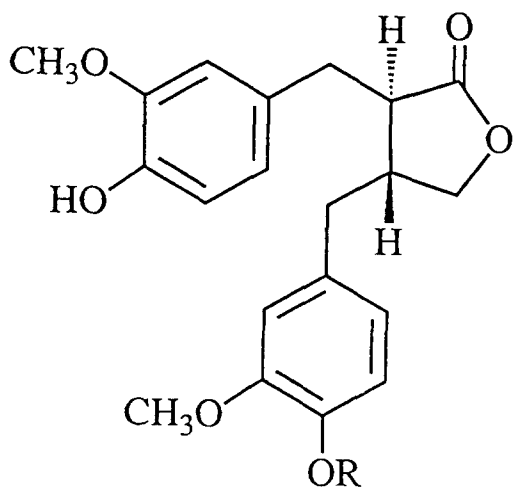
今日、多くの制がん剤の適用が臨床において試みられているが、決定的な効果を有する化学療法剤が見出されていないのが現実であり、日本での病死原因の第一は、癌となっている。また、その死亡年齢が働き盛りの40代、50代に多く、社会的にも大きな問題となってきた。このような状況下、臨床医においては、新規な化学構造で、新しい制がん作用機序を有する活性物質の出現を切に望んでいる。この点を考慮した場合、天然物資源のランダムスクリーニングより発見される可能性が最も大であると思われる。

韓国産薬用資源植物をマウス Sarcoma 180 腹水型腫瘍および チャイニーズハムスター肺由来の V-79 培養細胞を用いる抗腫瘍活性スクリーニングに供したところ、連翹 FORSYTHIAE FRUCTUS のメタノール抽出物は、V-79 培養細胞に対し IC₅₀ 値(50% コロニー形成阻害濃度)が 7.9 μ g/mlと強い細胞毒活性を示した。しかし、日本市場の連翹は、細胞毒活性を示さなかった。そこで、その活性を指標に韓国市場連翹の活性成分の検索を行ったところ、細胞毒性成分の一部として2種のリグナン系化合物を単離・同定することができたので報告する。

連翹は消炎・排膿薬、皮膚疾患用薬とみなされる漢方処方：響声破笛丸、驅風解毒散(湯)、荊芥連翹湯、荊防敗毒散、柴胡清肝湯、十味敗毒湯、防風通聖散などに配合され、第十二改正日本薬局方ではその基原生薬を *F. suspensa* Vahl, *F. viridissima* Lindley, *F. koreana* Nakai (Oleaceae) の果実と規定している。成分的には、トリテルペン、リグナン、フェニルプロパノイドなどが知られている。¹⁻¹²⁾ その生物活性作用として胆汁分泌促進、¹³⁾ cyclic AMP ホスホジエステラーゼ阻害作用、¹⁴⁾ 黄色ぶどう球菌に対する抗菌作用、^{3, 9, 15)} 5-リポキシゲナーゼ阻害作用などが報告¹⁶⁾されている。

本実験に用いた連翹は韓国で入手したものであり、本連翹は果実の外観形状

FK-1-21 から FK-1-25 の5フラクションに分画して活性試験を試みたところ、FK-1-22 は、溶出量が多いにもかかわらず、 IC_{50} 値が $0.37 \mu\text{g/ml}$ と良好な結果を得たので、本画分については、さらにオクタデシルシリル-シリカゲル (ODS) カラムを用いる高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分離操作を行い、FK-1-221 (1) および FK-1-223 (2) と仮称する活性物質を得た。



R=H IC_{50} $7.8 \mu\text{g/ml}$
(matairesinol)

R=CH₃ IC_{50} $1.65 \mu\text{g/ml}$
(arctigenin)

FK-1-221 (1) は無色シロップ状物質として得られ、そのマスペクトル (MS) および炭素13核磁気共鳴 (C-13 NMR) スペクトルより、分子式 $C_{20}H_{22}O_6$ と決定した。また、プロトン (H-1) および C-13 NMR スペクトルより 2 個の1,3,4-置換ベンゼン、1 個の5員環ラクトン、2 個のメチレン、2 個のメトキシル基が存在することが明らかとなり、リグナン系化合物 matairesinol と推測し、各種物理恒数および機器データを文献値²⁾と比較することにより、その化学構造を決定した。

FK-1-223 (2) は化合物 1 と同様に、無色シロップ状物質として得られ、そのマスペクトル (MS) および炭素13核磁気共鳴 (C-13 NMR) スペクトルより、分子式 $C_{21}H_{24}O_6$ と決定した。その NMR データは、化合物 1 に類似していたが、メトキシル基に由来するメチルシグナルが 1 個多く観察された。このことは、分

子式よりも指示され、arctigenin と推定されたので各種物理恒数および機器データを文献値⁵⁾と比較することにより、その化学構造を決定した。

ここで得られた matairesinol (1) と arctigenin (2) は、活性画分より単離・同定されたものであることより、V-79培養細胞に対するその IC₅₀ 値を求めたところ、それぞれ 7.8 μ g/ml と 1.65 μ g/ml と良好な活性を示した。リグナン化合物の細胞毒性については、臨床的効果の認められている podophyllotoxin をはじめとしていくつかの報告^{20, 21)}があるが、シナレンギョウよりの細胞毒性を指標とした系統的な分離操作により、活性成分が明らかにされたのは、今回が最初である。

実 験 の 部

融点測定には Yanako MP-3 を用いたが、すべて未補正である。MS は Hitachi M-80, IR は JASCO A-302, UV は Hitachi 557 で測定した。NMR は Bruker AM-400 で tetramethylsilane (TMS) を内部標準として δ 値を ppm 単位で表した。結合定数 (J) は Hz 単位で表し、シグナルの多重度は s: singlet, d: doublet, t: triplet, q: quartet, m: multiplet のように略記した。

シリカゲルカラムクロマトグラフィーの充填剤には、Wakogel C-200 (100 - 200 mesh), Merck Kieselgel 60 (70 - 230 mesh) を用いた。また、分取用中圧液体クロマトグラフィー (MPLC) では草野科学社 CIG column system を用い、カラムには CPS-HS-221-1 (22 i.d. x 100 mm, シリカゲル), CP0-HS-221-20 (22 i.d. x 100 mm, ODS) を使用した。高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) は CCPE ポンプ (東ソー) を用い UV-8000 検出器 (東ソー) で検出し、カラムには YMC D-ODS-5 (20 i.d. x 250 mm), Inertsil PREP ODS (20 i.d. x 250) を用いた。薄層クロマトグラフィーは Kieselgel 60F₂₅₄ 0.25 mm (Merck) のプレートを用い、展開後のスポットは UV (254 nm) 検出器および 10% 硫酸を噴霧した後加熱して検出した。

抽出および分離： 韓国市場品の連翹 *Forsythia viridissima* (Oleaceae, 村上が報告した形態学的所見に基づき、その基原植物を同定した。) の果実 (100 g) を破碎して、メタノール 1 リットルで 2 回温浸抽出した。抽出液は減圧下、溶媒を留去することによりメタノール抽出物 (18 g) を得た。このメタノール抽出物は、V-79 培養細胞に対して良好な細胞毒性を示したので、この生物活性を指標に Chart 1 に図示したような分離操作を行い、細胞毒性成分として matairesinol (1) と arctigenin (2) を得た。

Matairesinol (1)： 無色シロップ状物質として得たが、エタノールより再結晶することにより、無色板状結晶を得た。この結晶は文献(5)に記載された matairesinol の理化学的性質と一致した。MS m/z (%)： 358 (27), 194 (3), 164 (5), 137 (100). H-1 NMR ($CDCl_3$, δ)： 2.42 - 2.64 (4H, m), 2.87 (1H, dd, $J=6.9, 14.1$ Hz), 2.95 (1H, dd, $J=5.2, 14.1$ Hz), 3.80 (3H, s), 3.81 (3H, s), 3.89 (1H, dd, $J=7.3, 9.1$ Hz), 4.15 (1H, dd, $J=7.3, 9.1$ Hz), 6.41 (1H, d, $J=1.8$ Hz), 6.50 (1H, dd, $J=1.8, 8.2$ Hz), 6.60 (1H, d, $J=1.8$ Hz), 6.61 (1H, dd, $J=1.8, 7.9$ Hz), 6.79 (1H, d, $J=8.2$ Hz), 6.81 (1H, d, $J=7.9$ Hz). C-13 NMR ($CDCl_3$, δ)： 34.58 (t), 38.28 (t), 41.00 (d), 46.55 (d), 55.79 (q), 55.84 (q), 71.30 (t), 111.05 (d), 111.59 (d), 114.14 (d), 114.45 (d), 121.31 (d), 122.06 (d), 129.55 (s), 129.77 (s), 144.43 (s), 144.55 (s), 146.64 (s), 146.74 (s), 178.79 (s).

Arctigenin (2)： 無色シロップ状物質として得たが、酢酸エチルエステルより再結晶することにより、無色板状結晶を得た。この結晶は文献(5)に記載された Arctigenin の理化学的性質と一致した。MS m/z (%)： 372 (46), 194 (3), 177 (12), 137 (100). H-1 NMR ($CDCl_3$, δ)： 2.44 - 2.66 (4H, m), 2.89 (1H, dd, $J=6.5, 14.1$ Hz), 2.95 (1H, dd, $J=5.4, 14.1$ Hz), 3.80 (3H, s), 3.81 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.87 (1H, dd, $J=7.4, 9.1$ Hz), 4.13 (1H, dd, $J=7.2, 9.1$ Hz), 6.46 (1H, d, $J=1.9$ Hz), 6.54 (1H, dd, $J=1.9, 8.1$ Hz),

6.60 (1H, dd, J=1.9, 8.0 Hz), 6.64 (1H, d, J=1.9 Hz), 6.74 (1H, d, J=8.1 Hz), 6.82 (1H, d, J=8.0 Hz). C-13 NMR (CDCl₃, δ): 34.55 (t), 38.19 (t), 40.95 (d), 46.60 (d), 55.85 (q), 55.87 (q), 55.92 (q), 71.28 (t), 111.45 (d), 111.63 (d), 111.95 (d), 114.17 (d), 120.63 (d), 122.10 (d), 129.52 (s), 130.51 (s), 144.60 (s), 146.75 (s), 147.90 (s), 149.10 (s), 178.71 (s).

細胞毒性試験：細胞毒性試験はチャイニーズハムスター肺由来細胞 V-79 細胞を用いるコロニー形成法で検定した。

V-79細胞をPBS(-)で洗浄後、0.25%トリプシン液で処理して、RPMI1640培地 5 mlに浮遊させた。血球計算盤にてその細胞数をかぞえ、培地 2 mlに細胞を 300個になるよう調整し、35 mmシャーレ (6穴プレート) に蒔き、CO₂インキュベーター (37°C, 5% CO₂)にて 24時間培養した後、10 μlのエタノールに溶解した目的濃度の試料を添加した。対照群としては、無添加のものと10 μlのエタノールを加えたものを用いた。96時間培養した後、上清培養液を除去し、PBS(-) 2 mlにて洗浄したのち、10%中性ホルマリンにより形成されたコロニーを固定し、0.05%クリスタルバイオレット溶液 0.75 mlを加えて染色し、そのコロニー数をかぞえた。

引用文献

- 1.村上誠愨, 薬誌, 77,437(1957).
- 2.西部三省, 千葉真理子, 久田末雄, 薬誌, 97,1134(1977).
- 3.西部三省, 千葉真理子, 久田末雄, 生薬学雑誌, 31,131 (1977).
- 4.M.Chiba, S.Hisada and S.Nishibe, Chem.Pharm.Bull.,25,3435(1977).
- 5.千葉真理子, 久田末雄, 西部三省, 生薬学雑誌, 32,194(1978).
- 6.千葉真理子, 塚本博樹, 久田末雄, 西部三省, 生薬学雑誌, 33,150(1979).
- 7.S.Nishibe, K.Okabe, H.Tsukamoto, A.Sakushima and S.Hisada, Chem.

- Pharm.Bull.,30,1048(1982).
- 8.S.Nishibe, K.Okabe, H.Tsukamoto, A.Sakushima, S.Hisada, H.Baba and T.Akisada, Chem.Pharm.Bull.,30,4548(1982).
- 9.S.Kitagawa, H.Tsukamoto, S.Hisada and S.Nishibe, Chem.Pharm.Bull., 32,1209(1984).
- 10.北川 静香, 西部三省, 馬場久衛, 107,274(1987).
- 11.K.Endo, K.Seya and H.Hikino, Tetrahedron,43,2681(1987).
- 12.Kuang Haixue, Zhongyao Tongbao,13,416(1988).
- 13.三浦雅美, 太田節子, 鴨川旭, 篠田雅人, 薬誌, 107,992(1987).
- 14.T.Nikaido, T.Ohmoto, T.Kinoshita, U.Sankawa, S.Nishibe and S.Hisada, Chem.Pharm.Bull.,29,3586(1981).
- 15.K.Endo, K.Takahashi, T.Abe and H.Hkino, Heterocycles,19,261(1982).
- 16.Y.Kimura, H.Okuda, S.Nishibe and S.Arichi, Planta Med.,53,148(1987).
- 17.村上誠愨, 薬誌, 77,403(1957).
- 18.S.Kitagawa, S.Hisada and S.Nishibe, Phytochemistry,23,1635(1984).
- 19.西部三省, 笹原道子, 土産田未嘉, 野呂征男, 川村智子, 田中俊弘, 薬誌, 110,453(1990).
- 20.Ed by J.M.Cassady and J.D.Douros, "Anticancer Agents Based on Natural Products Models", Academic Press (1980).
- 21.G.A.Dombradi, Chemotherapy,15,250(1970).