

天然抗腫瘍性資源とスクリーニングの實際

竹谷孝一

東京薬科大学

Practices of Antitumor Screening Tests for Natural Products

Koichi Takeya

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

Present anticancer drugs in the clinical side have not showed a conclusive effect of the chemotherapy for cancer patients. In order to find much more efficient antitumor agents from natural resources, various screening methods *in vivo* and *in vitro* have been developed by many researchers. The intention of this paper is to provide an outline of some background on the tumor system in drug development of natural products, to review some screening programs for the evaluation of antitumor activity and to introduce the practical procedures of some antitumor screening methods *in vivo* and *in vitro*. At the end of this paper, the current literatures related to antitumor natural products from higher plants at our laboratory are described.

Key words : anticancer drugs, screening methods.

近年、我が国の疾病による死亡率の上位に、常に入っている癌は、その予防あるいは治療法の開発のために国際的規模で研究が進められ、多くの抗腫瘍薬が開発され、臨床において使用が試みられているが、決定的な効果を示す薬剤が見い出されていないのが現実である。

今日臨床で使用されている抗腫瘍薬の開発の経過をかいてみると

- 1) 無作為のスクリーニングなどにより発見されたもの : daunomycin, mithramycin, mitomycin C, hydroxyurea など。
- 2) 他の生物活性の目的で使用されているうちに発見されて来たもの : actinomycin D, vinblastine, nitrogen mustard, L-asparaginase, cortisone など。
- 3) 生化学的メカニズムの見地から発見されたもの : 5-FU (5-fluorourasil), 6-MP (6-mercaptopurine), 8-AZ (8-azaguanine) など。

に分類できるが、2) による発見は偶然性に待つほかわなく、3) による発見は、生化学者などによる発癌メカニズムなどが明らかにならないと研究に着手できないなどの制約があるため、新規な抗腫瘍薬を開発していく方法としては、現在のところ1) の無作為スクリーニングに頼らざる得ないのが実際である。

無作為スクリーニング対象検体としては、天然物資源と化学的合成品が考えられる

が、合成品由来の抗腫瘍薬開発研究では、すでに抗腫瘍活性が明確になっている既知構造物質を母核化合物として化学修飾や類似化合物の合成を行い、新たな抗腫瘍薬を開発しようとしているのが現実であり、全く新規なタイプの抗腫瘍薬が発見される確率は、非常に低い。しかし、植物成分、海産生物成分および微生物産生成分などに探索の対象を求めている天然物質は、多種多様な化合物群より構成されている上に、古来より各国で伝承されている民間薬草および漢方医学（中国）、アユルベータ医学（インド）などの民族伝統医学の薬草知識があり、新規な抗腫瘍薬開発のために、より効率的な手段となり得るものと思われる。

A) 抗腫瘍活性スクリーニングの概要 生理活性を指標として広く天然物資源のなかから新たに有効な生理活性物質を見い出そうとする努力は、大規模かつ組織的なスクリーニングのシステムが確立されて以来、各国で精力的に行われ始めた。このような大規模で組織的なスクリーニング方法により天然物資源から抗腫瘍活性物質を見い

Screening System for Antitumor Activity

tumor	host animal	inocubation size	inocubation site	administration*1 route	administration*1 period	criteria of activity*2
Leukemia or ascites tumors						
Sarcoma 180A	ICR	10 ⁶	<i>i.p.</i>	<i>i.p.</i>	1-5	TPCV
			<i>i.p.</i>	<i>i.v.</i>	1-9	
			<i>i.p.</i>	<i>p.o.</i>	1-9	
P388 leukemia	CDF1	10 ⁶	<i>i.p.</i>	<i>i.p.</i>	1,5,9	MST
			<i>i.p.</i>	<i>i.p.</i>	1-9	
L1210 leukemia	CDF1	10 ⁵	<i>i.p.</i>	<i>i.p.</i>	1-5	MST
C1498 leukemia	BDF1	10 ⁶	<i>i.p.</i>	<i>i.p.</i>	1-5	MST
Ehrlich carcinoma	ICR	5x10 ⁶	<i>i.p.</i>	<i>i.p.</i>	1-5	MST
MM2 mammary carcinoma	C3H/He	10 ⁶	<i>i.p.</i>	<i>i.p.</i>	1-9	MST
MH-134 hepatoma	C3H/He	10 ⁶	<i>i.p.</i>	<i>i.p.</i>	1-5	MST
B16 melanoma	BDF1	homogenate	<i>i.p.</i>	<i>i.p.</i>	1-9	MST
Colon 26 adenocarcinoma	CDF1	homogenate	<i>i.p.</i>	<i>i.p.</i>	1-9	MST
Solid tumors						
Lewis lung carcinoma	C57B1/6	5x10 ⁵	<i>s.c.</i>	<i>i.p.</i>	1-11	TWD 17 MST
Colon 38 adenocarcinoma	BDF1	homogenate	<i>s.c.</i>	<i>i.p.</i>	1-11	TWD 17 MST
Ehrlich carcinoma	ICR	5x10 ⁶	<i>s.c.</i>	<i>i.p.</i>	1-11	TWD 14

*1 Drugs were administered on the indicated days.

*2 TPCV; Total packed cell volume.

MST; Mean survival time.

TWD; Tumor weight on the day (Tumor weight was determined with callipers LXW2/2).

出そうとする研究は、アメリカにおいて最も精力的に行われた。従って、アメリカにおける抗腫瘍薬開発の歴史が、今日の抗腫瘍薬開発のスクリーニング方法の基盤となっており、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、次ページに示すような Ehrlich や Sarcoma 180 腹水型腫瘍、白血病モデルの P388, L1210 などの実験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いて選択毒性を指標に抗腫瘍活性を評価したものである。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前提とした細胞毒性に基づくものである。このような考えのもとで開発され、臨床で使われている制がん剤は、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細胞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リスクを背負うことになる。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、その免疫能を増大させて悪性腫瘍を治癒させようとする研究が日本を中心に行われ、きのこなどの真菌類より抗腫瘍性多糖類が単離され、医薬品として臨床で用いられている。このような背景をもとに生体内免疫応答物質が研究され、インターフェロンによる癌の免疫療法が注目を浴びようになり、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の役割を演じているような生体内物質を整理統合して BRM (biological response modifier, 生物応答調節物質) と呼び、その研究プログラムが 1980 年に具体化され、今後、癌治療薬として化学療法剤とともに BRM がどのような地位を確立してゆくか注目される。

しかしながら、細胞選択毒性に基づいて開発された切れ味のよい化学療法剤が臨床サイドでは主流であり、制がん剤開発においては培養細胞および実験腫瘍動物を用いて新規抗腫瘍活性物質が行われているのが大部分である。このような歴史的背景を基に米国国立癌研究所では、1976年に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から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、8種のスクリーニング腫瘍パネルが、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 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いず、いままでのスクリーニングで固形癌に有効な薬剤が開発されてきていないという現実があり、スクリーニング法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、従来のマウス P388 白血病を用いた *in vivo* スクリーニングが変わって、現在、ヒト培養がん細胞パネルをもちいた *in vitro* スクリーニングを大規模に行っている。このスクリーニング方式では、60種類のヒト培養がん細胞系を用いているが、そ

の内訳は、肺がん13系、大腸がん9系、腎がん9系、メラノーマ9系、卵巣がん6系、脳腫瘍8系、白血病／リンホーマ6系である。96穴マイクロプレートにがん細胞をまきこみ、各種検体のがん細胞50%増殖阻害濃度（ IC_{50} ）が求められ、60系のがん細胞に対するその IC_{50} 値を比較することにより、その検体がどのがん細胞系に対して、より有効であるか有効濃度の偏差パターンを判定し、有望な検体については、ヒトがん細胞を移植したヌードマウスで、2次スクリーニングが行われている。

ヒトがん細胞の移植可能なヌードマウスが、今日、制がん剤開発において盛んに利用されるようになってきた。同様に、ヒトがん細胞の移植可能なマウスとして最近注目をあつめている重度免疫不全（SCID: Sever Combined Immunodeficiency）マウスが1983年、Bosma博士により報告された。SCIDは第16染色体md遺伝子にリンクした劣性遺伝子（scid）によるもので、免疫学的にはT細胞とB細胞の両機能欠損を生じている。従って、SCIDマウスでは、ヒトがん細胞が生着増殖しやすいのみならず、通常のマウスの数倍近いスピードで増殖し、しかも、肺、腎、脾臓の各種臓器に自然遠隔転移をおこす。このようにヒトがん細胞で自然転移をおこすSCIDマウスは、がん患者の寿命決定要因である転移研究に新しい流れをもたらすものであり、ヒト良性腫瘍およびがん病変の人工的な悪性化へのモデル研究、ヒト骨髄や皮膚のSCIDマウスへの移植を行うことによる *in vivo* でのヒト幹細胞の正常および異常分化・成熟の研究など、がん研究における種々の応用研究が期待される。

B) 抗腫瘍活性スクリーニング検定法の実際

実験者が実際に *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の抗腫瘍活性スクリーニングのためのプロトコールが基準となり、実施されているのが現実である。

腫瘍細胞による検定法は、一般に培養細胞を試験管、シャーレまたはマイクロプレート中に移植した後、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_{50} ）を求めることにより薬効を評価する。この方法は、被検物質のがん細胞に対する活性を細胞毒性として直接観察できると共に、検定期間も短く、生物検定の試料量が少なく高い再現性があり、実験費用が安くすむなどの利点も多い反面、生体の宿主条件の関与がないために治療係数、免疫系への関与、薬剤の生体内における活性化、不活性化などの情報が得られないなどの欠点も多い。

一方、実験動物による検定法では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類される。腹水腫瘍を用いる検定法は、1群6～10匹の実験動物腹腔内中に $10^5 \sim 10^6$ 個の腫瘍細胞を移植した後、1回ないし数回に分けて被検物質を投与して延命効果または増加した腫瘍細胞量を測定する。延命効果の測定は、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) = $(T - C) / C\%$ として評価している。また、腫瘍細胞量は、検定一定期間後に開腹して、その腹水腫瘍細胞量を対照群と被検物質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て、一定期間後に増殖した固形腫瘍を取り出し、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) のものと比較して、 $T/C\%$ 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。

1) Sarcoma 180 腹水型腫瘍マウスを用いた総細胞容積法

動物： マウス ICR ♂ 5週令

体重 20g 以上、平均体重のばらつき 0.3g 以内

腫瘍： Sarcoma 180 ascites

移植後 8 日目の腹水腫瘍 0.05 ml (1×10^6 cells) を腹腔内注射 (*i.p.*) し、移植する。

実験方法

Day -5 WED マウス入荷

Day 0 MON 体重 20g 以上、体重のばらつき 3g 以内のものを集め、1群6匹賭する。個々のマウスはピクリン酸ナトリウムのエタノール溶液により標識し、区別する。(平均体重のばらつきが 0.3g 以内とする。)

Day 1 THU ~ Day 5 SAT

検体薬物 (0.1 ml) を決められた投与量に従い、腹腔内投与する。

Day 7 MON マウス体重を測定後、マウスを頸椎脱臼させ、腹部の皮膚をはぎ、スピッツ管上で腹部を切開する。

スピッツ管内の腹水を 1500 - 2000 rpm で 10 分間、遠心分離する。遠心分離後、PCV (packed cell volume), TV (total volume) を測定する。

抗腫瘍効果の判定

Growth Ratio (G.R.): 腫瘍成長率

G.R. = $PCV(T) / PCV(C)$

T: 薬物投与群 (Treated)

C: 薬物非投与群 (Control)

G.R.: 0 - 10% (+++), 11 - 40% (++) , 41 - 65% (+), 66% 以上 (-)

B.W.C.: Body Weight Change

B.W.C.: $Body\ Weight\ (Day\ 7) - (Body\ Weight\ (Day\ 0) + TV\ (total\ volume))$

※ 腫瘍変化率 PCV/TV は通常 0.3 - 0.5 である。

検体注射液の調製

通常、火曜日から土曜日までの注射液をまとめて、月曜日に調製している。

- 1) 生理食塩水が 0.5% Sodium Carboxymethyl Cellulose (CMC) を含むような液 (例 100 mg CMC / 20 ml saline solution) をオートクレーブで 20 分間滅菌、可溶化する。
- 2) この液を用いて、検体 1 日分の薬物が 0.1 ml 中に含まれるように調製する。
なお、検体を注射液に可溶化または懸濁させる場合、ソニケーターを用いる。
- 3) 調製した検体は、冷蔵庫に保管する。

※ 検体が懸濁しにくい時は、Tween 80 数滴、滴下する。

E) 細胞毒性の評価

- 1) コロニー数をかぞえる。
- 2) $T/C(\%) = \frac{\text{試料を添加したもののコロニー数}}{\text{コントロールのコロニー数}} \times 100$
 ※T/C(%)が30 µg/mlで50%以下であるものを活性ありの目安としている。
- 3) 横軸(対数目盛)に濃度、縦軸にT/C(%)をプロットしてIC₅₀値を求める。

F) 培地

RPMI 1640 + カナマイシン + 10% ウシ胎仔血清 (FCS)
 89 ml 1 ml (10mg/ml) 10 ml

3) MTT法によるKBおよびP388の細胞毒性試験

A) KBおよびP388細胞の継代

- 1) 細胞の状態を顕微鏡で確かめる。
- 2) 古い培地を吸い取り、PBS(-)5 mlで洗う。
- 3) トリプシン液1 mlを加え、細胞を壁から剥がす。
- 4) 新しい培地を9 ml加え、曲がりピペットを用いてよくピペッティングして細胞液を20-30 mlのマイヤーに移す。
- 5) 新しい培地を9 ml入れた25 cm²の培養フラスコ2個に、細胞液をそれぞれ25-50 µl, 50-100 µl加える。
- 6) フラスコに細胞が入っていることを確認して、キャップをゆるめて、CO₂インキュベーターに入れる。

KB細胞の培地

MEM培地 + カナマイシン + 5% ウシ胎仔血清 (FCS)
 94 ml 1 ml (10mg/ml) 5 ml

P388細胞の培地

RPMI 1640 - 2ME + カナマイシン + 10% ウシ胎仔血清 (FCS)
 94 ml 1 ml (10mg/ml) 5 ml

B) MTT法による細胞毒性試験

B1: 細胞の移植 DAY 0

- 1) 各種細胞とも、 3.0×10^4 cells/ml 細胞液を調製する。
- 2) 96穴プレートに、100 µl/wellの細胞を移植する。なお、IC₅₀値を求めるのに使用するday 1(又はday 0)のプレートも調製する。
- 3) プレートミキサーにより攪拌し、CO₂インキュベーターに入れる。

B2: 試料溶液の調製および添加 DAY 1

- 1) 試料の20 mg/ml DMSO溶液を調製し、培地(又はPBS)にて順次希釈して各濃度の5% DMSO-medium (or PBS)溶液とする。
 ※試料は2-5 mgをセラムチューブに量り取る。
- 2) 細胞移植から約2-4時間後、オクタペットを用いてサンプル希釈液を10

$\mu\text{l/well}$ 添加する。blank および control には 5% DMSO-medium (or PBS) 溶液を添加する。

- 3) プレートミキサーにより攪拌し、 CO_2 インキュベーターに入れる。
- 4) 試料添加から約 2 - 3 時間培養後、細胞の試料による影響を観察する。

B 3 : 細胞の観察 DAY 2

試料添加から約 2 4 時間培養後、細胞の試料による影響を観察する。

B 4 : 生細胞の染色 DAY 3

- 1) MTT 試薬を添加する前に、細胞の試料による影響を観察する。
- 2) 試料添加から約 4 8 時間培養後、MTT 試薬 (5 mg/ml) を 20 $\mu\text{l/well}$ 添加する。
- 3) プレートミキサーにより攪拌し、 CO_2 インキュベーターに入れる。
- 4) MTT 試薬添加から 4 時間後、10% SDS - 0.01N HCl を 100 $\mu\text{l/well}$ 添加しピペティングにより細胞および MTT formazan を溶解する。
※蓋に泡を付けないように注意する。
- 5) CO_2 インキュベーター中にて安定化させる。

B 5 : 細胞毒性の評価 DAY 4

- 1) マイクロプレートリーダー (2 波長 : 550 nm, 700 nm) により、比色値 (OD) を測定する。
- 2) test well の比色値 (OD) より blank well の比色値 (OD) を差し引く。
- 3) 各試料について、試料濃度および比色値 (ΔOD) を片対数グラフにプロットする。
- 4) control の比色値 (ΔOD) を 100%, day 0 (or day 1) の比色値 (ΔOD) を 0% として、 IC_{50} 値 (50% 成長阻止濃度値) を求める。

上記の抗腫瘍活性スクリーニング法を用いて、天然資源より多数の活性物質を当研究室では、見い出してきた。これらの研究の最近の文献を以下に記す。

- 1) H.Morita, T.Yamamiya, K.Takeya and H.Itokawa, New Antitumor Bicyclic Hexapeptides RA-XI, -XII, -XIII and -XIV from *Rubia cordifolia*, Chem.Pharm.Bull.,**40**(5),1352-1354 (1992).
- 2) H.Itokawa, O.Shirota, H.Morita and K.Takeya, Sesquiterpene Pyridine Alkaloids from *Maytenus ebenifolia*, **34**(5),885-889(1992).
- 3) H.Itokawa, E.Kishi, H.Morita and K.Takeya, Cytotoxic Quassinoids and Tyrucallane-Type Triterpenes from *Eurycoma longifolia*, Chem.Pharm.Bull.,**40**(4),1053-1055(1992).
- 4) H.Itokawa, H.Morita and K.Takeya, Solution Forms of an Antitumor Cyclic Hexapeptides RA-VII in Dimethyl Sulfoxide- d_6 from Nuclear Magnetic Resonance Studies, Chem. Pharm.Bull.,**40**(4),1050-1052(1992).
- 5) H.Itokawa, K.Matsumoto, H.Morita and K.Takeya, Cytotoxic Naphthoquinones from *Mansoa alliacea*, Phytochemistry,**31**(3),1061-1062(1992).
- 6) H.Itokawa, T.Yamamiya, H.Morita and K.Takeya, New Antitumour Bicyclic Hexapeptide

- RA-IX and -X from *Rubia cordifolia*. Part 3. Conformation - Antitumour Activity Relationship, J.Chem.Soc. Perkin Trans. I, 455-459(1992).
- 7) H.Itokawa, E.Kishi, H.Morita, K.Takeya and Y.Iitaka, A New Squalene-type Triterpene from the woods of *Eurycoma longifolia*, Chem.Lett.,2221-2222(1991).
 - 8) H.Itokawa, H.Morita, K.Takeya, N.Tomioka and A.Itai, RAI-III and -VI, Conformational Isomers of Antitumor Cyclic Hexapeptides, RA-III and -VI from *Rubia cordifolia*, Chem. Lett.,2217-2220(1991).
 - 9) H.Itokawa, H.Morita, K.Takeya, N.Tomioka, A.Itai and Y.Iitaka, New Antitumor Bicyclic Hexapeptides, RA-VI and -VIII from *Rubia cordifolia*; Conformation-Activity Relationship II, Tetrahedron,47(34),7007-7020(1991).
 - 10) H.Itokawa, O.Shirota, H.Ikuta, H.Morita, K.Takeya and Y.Iitaka, Triterpenes from *Maytenus ilicifolia*, Phytochemistry,30(11),3713-3716(1991).
 - 11) H.Itokawa, K.Saitou, H.Morita and K.Takeya, Conformational Analysis of [N-Demethyl-Tyr(OCH₃)-3]RA-VII, Conformationally Restricted Model Approach, Chem.Pharm.Bull., 39(8),2161-2163(1991).
 - 12) H.Morita, K.Kondo, Y.Itotsuyanagi, K.Takeya, H.Itokawa, N.Tomioka, A.Itai and Y. Iitaka, Conformational Analysis of Antitumor Cyclic Hexapeptides RA Series, Tetrahedron 47(16/17),2757-2772(1991).
 - 13) H.Itokawa, E.Kishi, H.Morita, K.Takeya and Y.Iitaka, Eurylene, A New Squalene-Type Triterpene from *Eurycoma longifolia*, Tetrahedron Lett., 32(15),1803-1804(1991).
 - 14) H.Itokawa, Y.Ichihara, M.Mochizuki, T.Enomori, H.Morita, O.Shirota, M.Inamatsu and K.Takeya, A Cytotoxic Substance from Sangre de Grado, Chem.Pharm.Bull.,39(4),1041-1042(1991).
 - 15) H.Morita, M.Nakayama, H.Kojima, K.Takeya, H.Itokawa, E.P.Schenkel and M.Motidome, Structures and Cytotoxic Activity Relationship of Casearins, New Clerodane Diterpenes from *Casearia sylvestris* Sw., Chem.Pharm.Bull.,39(3),693-697(1991).
 - 16) H.Itokawa, N.Totsuka, H.Morita, K.Takeya, Y.Iitaka, E.P.Schenkel and M.Motidome, New Antitumor Principles, Casearins A - F, from *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae) Chem.Pharm.Bull.,38(12),3384-3388(1990).
 - 17) H.Itokawa, O.Shirota, H.Morita, K.Takeya, N.Tomioka and A.Itai, New Triterpene Dimers from *Maytenus ilicifolia*, Tetrahedron Lett.,31(47),6881-6882(1990).
 - 18) H.Itokawa, M.Inamatsu and K.Takeya, A Cytotoxic Principle from *Evodia rutaecarpa*, Shoyakugaku Zasshi,44(2),135-137(1990).