

食糧成分中のリグニンの抗腫瘍機構：(2) 木材パルプ製造時に副生する各種リグニン製剤の抗腫瘍作用

村上, 浩紀
九州大学農学部食糧化学教室

落合, 千津子
九州大学農学部食糧化学教室

大村, 浩久
九州大学農学部食糧化学教室

<https://doi.org/10.15017/23169>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 28 (4), pp.215-221, 1974-06. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

食糧成分中のリグニンの抗腫瘍機構

(2) 木材パルプ製造時に副生する各種リグニン製剤の抗腫瘍作用

村上浩紀・落合千津子・大村浩久

九州大学農学部食糧化学教室

(1974年3月30日受理)

Antitumor Mechanisms of Lignins in Foods

II. Antitumor Potency of Lignin Preparations Produced by Pulping Procedures of Woods

HIROKI MURAKAMI, CHIZUKO OCHIAI
and HIROHISA OMURA

Food Chemistry Institute, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka

食糧成分中には各種栄養素をはじめ、多種の生理活性物質が含有されており、多くの研究によつてそれらの存在が確認され、その意義についても検討が加えられてきた。しかし食糧成分中には、なお、その存在が知られていないもの、あるいは存在することが確実であつても、人間の生理作用におよぼす意義の不明なものもまた含まれている。

著者らは後者についてリグニンをとりあげ、それが高等動物におよぼす影響の検討の一環として、その移植性腫瘍に対する抑制作用について追究してきた(村上・山藤, 1968)。

リグニンは植物組織の木質化に伴つて生成される高分子成分であり、その理化学的性質については膨大な研究がある。しかしその生理作用におよぼす影響については、ほとんど知られていない。

リグニンは食糧成分中にも多く含まれている。たとえば梨の石細胞、タケノコ(樋口, 1969)、種子(荻山, 1971)、各種根菜類、ユウガオ(カンピョウ)(Tachi *et al.*, 1957)、野菜の葉脈などにその存在が知られている。これらに含まれるリグニンは食品の調理によつても安定で、可食部分として処理され、したがつて食餌中に混入してくる。

リグニンはその由来する植物によつて各々特徴を有するが、赤外吸収スペクトルによる研究から、広葉樹材のそれに近縁なもの、針葉樹材のそれに大別される(祖父江・福原, 1958)。そこで食糧成分中のリグ

ニンの抗腫瘍機構考察の手段の一つとして、品質の一定したものが比較的容易にしかも多量に得られる、木材パルプ製造時に副生する各種リグニン製剤を用いて試験を行なつた。さらに被験製剤中では亜硫酸パルプ法によつて副生したものが効果が著しいことから、精製リグニンスルホン酸の抗腫瘍能を詳細にしらべ、さらにこの製剤の抗腫瘍機構についても考察を加えた。

材料と方法

1. 抗腫瘍能の検定

腹水型 sarcoma 180 細胞 10^5 個/0.2ml を体重 20 g 前後の生後 4 週の ddN 系雄マウスの腹腔内に移植した。タネ動物の腹腔内で純培養状態にある腫瘍細胞数は約 10^9 個/ml に達する。これを Ringer 液で約 2,000 倍に希釈して用いるのであるが、多数の動物に腫瘍を移植するときには懸濁液中の腫瘍細胞の経時的衰弱の可能性も考慮する必要がある。このために腫瘍移植後の動物に乱数表を活用して、各群の動物の状態を平均化した。上記の細胞数を移植したマウスは 20~30 日のうちに 100% 腫瘍死した。腫瘍移植の翌日からリグニン製剤 0.2 ml を腹腔内に投与した。腫瘍を移植しただけの動物を対照区とした。これは Ringer 液などを投与しても対照区と有意な差がないことが知られているからである(村上・山藤, 1968)。抗腫瘍効果の判定は対照区がすべて腫瘍死したときに残存する製剤投与区の動物の割合で行なつた。

2. 供試リグニン製剤およびリグニンスルホン酸

N-1: 針葉樹材の亜硫酸パルプ廃液をアルコール発酵に用いたのち、その蒸留残渣をカルシウム塩として濃縮粉末化したもの。

N-2: 上記カルシウム塩を置換してナトリウム塩としたもの。

L-1: 広葉樹材の亜硫酸パルプ廃液をカルシウム塩として粉末化したもの。

L-2: 上記カルシウム塩を置換してナトリウム塩としたもの。

NL: N-1 と L-1 を 1 : 1 の割合で混合したもの。

NT: 針葉樹材をアルカリ蒸解して得られたチオリグニン。

LT: 広葉樹材をアルカリ蒸解して得られたチオリグニン

NTM: NT をメタ過よう素酸で処理し、リグニンのメトキシル基の含量を低下させたもの。

LTM: LT に NTM と同様の処理を行なったもの。

N-LS: 針葉樹材由来のリグニンスルホン酸。

L-LS: 広葉樹材由来のリグニンスルホン酸

これらを必要濃度の約 2 倍の水溶液としたのち、蒸留水に透析して混在する低分子物質を除去した。あらかじめ各々の製剤について 475 nm における吸光係数を測定しておき、使用時、所定濃度に蒸留水で希釈した。なおこれらの溶液の pH は 6.0~7.5 であった。

3. リグニン製剤の成分分析

a) リグニン含量: グリコールキトザン沈殿法(千手ら, 1953)によつた。ただし, N-LS および L-LS についてはメトキシル含量から算出した。

b) 還元糖量: micro Bertrand 法(田村・泉, 1957)によつた。

c) メトキシル基含量: Vieböck らの方法(津田・落合, 1948)によつた。

d) ジクロロフェノールインドフェノール(DPI)還元値: アスコルビン酸およびレダクトン類の定量には DPI-ブタノール溶液(満田・鹿内, 1957)が用いられるが、本法をそのままリグニン製剤溶液に適用したときにはブタノール層にリグニンが転入着色し、比色定量が不能であった。ブタノールにかえてオクタノールを使用するとリグニンの転入もなく、満足すべき結果が得られた。

4. NT および LT のメタ過よう素酸処理による NTM および LTM の調製

Marton ら(1963)の方法にしたがつて、試料 1 g

を 63ml の加温した 90% 酢酸に溶解したのち、0.14M になるように 60% 酢酸に溶解したメタ過よう素酸ナトリウム溶液 75 ml を添加した。37°C, 30 分保温したのち、亜硫酸ガスを通じて反応を停止させた。反応液を 1 l の冷蒸留水中に投入し、生じた沈殿を 1 l の冷蒸留水で洗じよう後、エタノール、エチルエーテルで順次脱水、乾燥した。この処理によつて NTM および LTM 中のメトキシル含量は NT, LT の約 50% に低下した。

結 果

1. リグニン製剤の抗腫瘍能

抗腫瘍試験用に調製したリグニン製剤を 600mg/kg 体重の割合で正常マウスの腹腔内に注入したときに、N-2 および NL では動物の体重増加の割合は無投与マウスのそれにくらべて低かつた。300 mg/kg 体重の投与量ではいずれの製剤についても正常の体重増加が認められたので、抗腫瘍能の試験はすべての製剤について 300mg/kg 体重で実施した。

10⁵ 個/0.2 ml の腫瘍細胞を移植したマウスは 20~30 日間で確実に腫瘍死に至るが、リグニン製剤投与群には明らかに延命効果が認められるものがあつた。第 1 図に、対照群がすべて死に至つたときの、各種製剤投与群における生存マウスの頭数を示す。

L-1, N-2, および NL 投与群では対照群がすべて斃死したときでもなお 5 頭以上が生存しており、延命

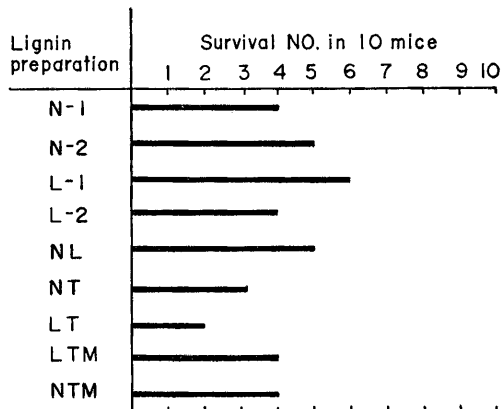


Fig. 1. Antitumor potency of lignin preparation. Three hundred milligrams per Kg. body weight of lignin preparations were given intraperitoneally every other day for 10 days after the transplantation of ascitic sarcoma-180 (10⁵ tumor cells to each ddN male mouse). Broad lines show the survival numbers of lignin injected mice after all the control mice were dead.

効果が認められた。なおこれらの生存マウスのうちには、腹水の貯留が非常にわずかなものや、腹腔内洗じよう液を顕微鏡観察してもリンパ球のみで腫瘍細胞を認めることができず、治癒したと考えられる個体もあった。一方 LT, NT, LTM および NTM は延命効果が弱く、少数残存した動物には腹水の貯留が著しく、腫瘍死に至ることは确实と推定される。

延命効果のすぐれていた L-1 について、腫瘍移植後の生存動物数の減少の経過と生存マウスの平均体重の変化を第 2 図に示す。

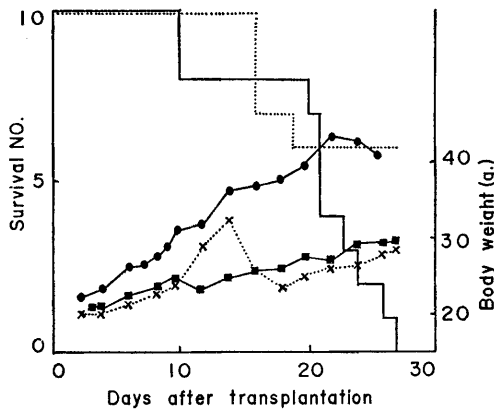


Fig. 2. Effect of lignin preparation (L-1) on survival curve and the increase of average body weight in mice. Survival numbers of L-1 injected mice and control —. Body weight of L-1 injected mice x.....x, control ●—● and normal mice ■—■.

対照群がすべて斃死したときに L-1 投与群では 10 頭中 6 頭がなお生存していた。これらの中には腹水の貯留が少量で、なお長時間生存することが予想される個体もあった。一方、対照群の平均体重は腫瘍移植 10 日目頃から腹水量が増加するにしたがつて急激にふえつづけた。L-1 投与群でも 10 日目以降、腹水の貯留の顕著な個体の影響をうけてその平均体重が著しく増加したが、それらの個体が 16 日目に腫瘍死するとともに平均体重は低レベルにもどり、以後正常マウスの体重増加度に近い傾向で増加していった。

製剤投与群では日数の経過とともに個体間での体重の変動が大きくなる傾向にあった。これは製剤投与によつて腹水の貯留が顕著に抑制される個体や、投与にもかかわらず、対照群と同程度に急速に腹水が増加するものなどがあつたからである。

2. リグニンスルホン酸塩の抗腫瘍能

針葉樹由来のリグニンスルホン酸 (N-LS)、および

広葉樹由来のリグニンスルホン酸 (L-LS) のカルシウム塩を 100 mg/kg 体重の割合で腫瘍移植翌日から隔日 5 回計 10 日間にわたつて担がんマウスの腹腔内に投与して 60 日間観察した。その経過を第 3 図に示す。

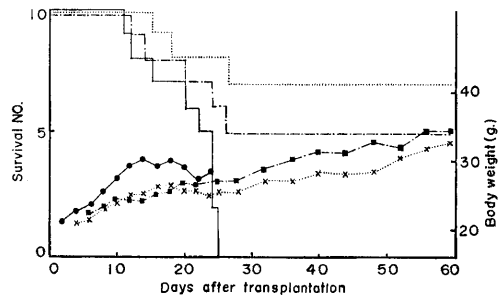


Fig. 3. Effect of calcium lignosulfonates on survival curves and increase of average body weight in mice. Survival curves of L-LS injected , N-LS injected --- and control —. Body weight of L-LS injected x.....x, N-LS injected ■---■ and control ●—●.

L-LS を投与した群では腫瘍移植後 26 日までに 3 頭、N-LS を投与した群では 27 日までに 5 頭が腫瘍死した。このとき残存していた動物は以後観察を打ち切るまで斃死することはなかつた。ごく少数のがん細胞を腹腔内に移植した場合でも 30 日内外で腹水の貯留が顕著に認められるようになるが、生存していたマウスには 60 日目でも腹水の貯留が認められず、治癒したと判定された。リグニンスルホン酸塩を投与しても対照区と同様な経過で腫瘍死した個体がみられた。このような個体では製剤投与にもかかわらず、腹水の貯留が対照区のそれと同程度に進行し、リグニンスルホン酸の効果があつたかのようにみえた。このことはリグニンスルホン酸による効果の発現には宿主の生理状態が関与していることを示唆している。種々の起源の多糖類が移植性腫瘍に対して抑制作用を有することが知られているが、このものの作用はがん細胞に対する直接的影響よりもむしろ細網内皮系の賦活にあるとされている (Komatsu *et al.*, 1969)。リグニンスルホン酸についてもこのようなことが抗腫瘍能の発現に関与していることが考えられる。そこで 100mg/kg 体重の L-LS を腫瘍移植 10 日前から隔日 5 回投与し、移植後同量の L-LS を隔日 5 回投与して、従来の投与方法による効果と比較した。その結果第 4 図に示すように、対照群がすべて腫瘍死したときにも前処理をほどこした群はすべて生存しており、効果が強められたことが明らかであつた。なおこれらの動物には腹水の貯留がほとんど認められず、長期間観察してもその生

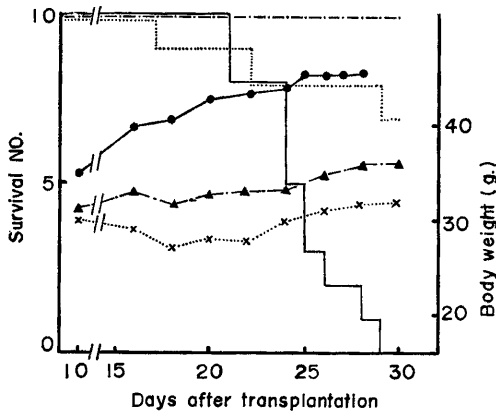


Fig. 4. Effect of calcium lignosulfonate (L-LS) on survival curves and increase of average body weight in mice. Survival curves of preinjected mice ---, ordinarily injected and control —. Body weight of preinjected \triangle — \triangle , ordinarily injected \times — \times and control \bullet — \bullet .

存率は低下しないことが推定される。

リグニンスルホン酸ががん細胞と直接あるいは間接に相互作用をもつ場合にはスルホン基も抗腫瘍能の発現に関与しているものと考えられる。そこでL-LSに脱スルホン処理を行ない(品川・工藤, 1970), スルホン基の約63% (16.6% \rightarrow 6.2%)を除去したのについて, その抗腫瘍能を検定した。その結果, 第5図に示すように, 途中経過においてはこのものにやや延命効果がみられたが, 最終的にはその能力はまったく失なわれていた。

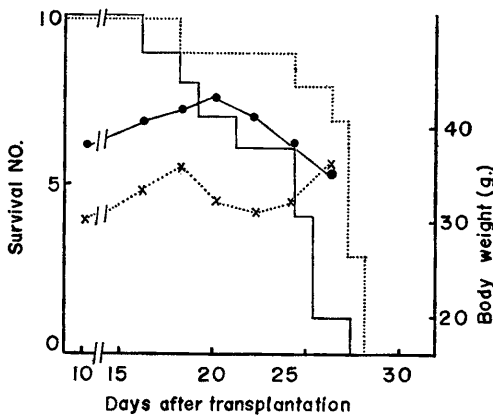


Fig. 5. Effect of partially desulfonated L-LS on survival curve and increases of average body weight in mice. Survival curves of tested mice and control —. Body weight of tested mice \times — \times and control \bullet — \bullet .

リグニンスルホン酸カルシウム塩とそのナトリウム塩との効果を比較すると途中経過ではカルシウム塩がやや有効のようであったが, 延命効果に関しては明らかな差はみられなかった。

L-LSを担がんマウスに経口投与した場合にはその効果を認めることができなかつた。すなわち, 試験に用いたマウスは1日に1頭あたり約6mlの飲用水を摂取したので, L-LSを飲用水に溶解して用いた。この方法でマウスは1頭あたり約300mg/体重のL-LSを試験期間中(30日)毎日摂取したことになる。なおこの濃度のL-LSを添加した飲用水に対してマウスは忌避を示すことはなく, 通常の飲用水と同程度の摂取率であった。

3. リグニン製剤およびリグニンスルホン酸塩の成分分析

抗腫瘍能の検定に用いたリグニン製剤およびリグニンスルホン酸塩について, リグニン含量, 還元糖量, DPI還元値およびメトキシ基含量を定量した。ただし還元糖量値とは製剤中アルカリ性で Cu^{2+} を還元するものを, 通例にしたがってグルコースに換算して示したものであり, 製剤中の Cu^{2+} 還元性のすべてが必ずしも還元糖に由来するものではない。同様にDPI還元値もDPI還元性物質の量をアスコルビン酸に換算したものであり, 製剤中にアスコルビン酸が含有されることを示したものである。第1表中に乾燥製剤1g中の各成分のmg数を示す。

考 察

各種パルプ製造法によつて副生するリグニン製剤の抗腫瘍能を検討した結果, 亜硫酸パルプ法によつて副生したリグニン製剤のうち, L-1, N-2およびNLが腹水型sarcoma 180を抑制する能力にすぐれていた。特にL-1は効果が強く, 開腹しても腹水の貯留がみとめられず, 長期間飼育観察しても, 腫瘍死することはないと考えられる個体もあつた。

リグニン製剤中には糖類が混在するが, 加水分解して糖部分を除去したリグニンにも抗腫瘍能が依然として保持されているので, 製剤中のリグニン部分が抗腫瘍能発現に必要であると考えられる(村上・山藤, 1968)。

各種リグニン製剤について, リグニン含量, 還元糖含量, DPI還元値などと抗腫瘍能との関連性について検討したが, 第1図ならびに第1表との比較からリグニン含量の多いものが必ずしも制がん能がすぐれているわけではなく, その他の成分についてもその含量と

Table 1. Analyses of components in lignin preparations.

Lignin Preparation	Lignin content (%)	Reducing Sugar (as glucose) (%)	OCH ₃ (%)	SO ₃ H (%)	DPI reductivity (as ascorbic acid) μ g/g.
N-1	62.6	11.0	7.7	0.8	7.0
N-2	54.4	5.8	7.3	4.3	4.5
L-1	46.6	18.9	8.9	0.6	5.5
L-2	44.2	9.0	7.8	0.3	4.5
NL	57.7	14.4	8.7	0.3	9.0
NT	—	16.0	1.7	—	10.5
LT	—	13.0	1.5	—	6.0
NTM	—	14.6	0.6	—	—
LTM	93.9	12.6	0.6	5.3	—
N-LS	(77.3)	1.0	10.9	—	2.0
L-LS	(85.7)	1.0	12.3	16.6	2.0
Desulfonated L-LS	—	—	13.9	6.2	—

As lignin contents in the brackets were calculated from OCH₃ contents, N-LS and L-LS are almost composed of lignin.

抗腫瘍能との間には明確な相関は見いだせない。

すでに著者らはリグニンの抗腫瘍性に関与する部分構造としてカテコール骨格を提案し、そのモデルとしてピロカテコールを用い、その抗腫瘍能や核酸との反応について考察を加えてきた(村上・山藤, 1969)。事実リグニンスルホン酸1分子あたり26個のカテコール残基が含有されていることが知られている(林, 1966)。

リグニン分子中のメトキシル基の減少はカテコール骨格の増加と相関がある。しかし第1表に示すように、メタ過よう素酸処理によつてメトキシル含量を減少させた NTM, LTM などには抗腫瘍効果は殆んど認められなかつた。第1図の結果からはメトキシル含量の多い製剤ほど抗腫瘍効果がすぐれているようであつた。しかし、部分的に脱スルホン処理を施した L-LS (desulfonated L-LS) 中のメトキシル含量は L-LS にくらべて相対的に増加するが、このものの抗腫瘍能はまったく失なわれていた。このことはリグニン中のメトキシル含量の多寡が必ずしも抗腫瘍能の指標とはなりえないことを示している。

L-LS の部分的脱スルホン化物に抗腫瘍能がなかつたことはリグニン分子中のスルホン基が腹水型 sarcoma 180 の抑制に寄与していることを推定させる。固形型 sarcoma 180 に対して笹葉リグニンは抑制作用を有していた(Yamafuji and Murakami, 1968)、このリグニンはアルカリ抽出によつて調製したもので、その構造中にスルホン基を含有しない。一方笹葉リグニンは腹水型 sarcoma 180 には無効であつた。腹水型 sarcoma 180 細胞は固形型にくらべて増殖度が著るしく大きいので、L-LS 中のスルホン基は腫瘍抑制能の増強に寄与していると考えられる。

リグニン製剤製造過程における加熱処理などによつて、混在する糖類からレダクトン類が生成される可能性もある。レダクトン類は核酸と反応し、腫瘍抑制作用を示す(Yamafuji *et al.*, 1971)。しかしリグニン製剤中のレダクトン量はわずかであり、この程度の量のレダクトンに抗腫瘍効果を期待することは、レダクトンの作用力から考えて困難である。

すでに述べたように、種々の方法で調製したリグニン製剤中のリグニン含量と抗腫瘍能とは必ずしも平行的ではなかつた。これはリグニン製剤の制がん力の程度がそのリグニン含量のみによつて一義的に決定されるのではなく、含有リグニンの性質についても考慮しなければならないことを示唆している。すでに著者らはリグニンの抗腫瘍効果の発現にはリグニン分子の高次構造も関与していることを指摘している(Yamafuji and Murakami, 1968)。各種の方法で得られた製剤のうちで、亜硫酸パルプ法によつて副生したリグニンスルホン酸が抗腫瘍力発現に有効な構造を最もよく保持しているのであろう。

また、リグニンが抗腫瘍能を発揮するためには、腫瘍細胞レセプターへの吸着、細胞内への移行、細胞内標的物質との反応による細胞機能の停止あるいは変化などの諸過程が必要であらう。リグニン分子中の特定の作用基と核酸との反応が腫瘍抑制作用の起源であると考えられるが、その作用基をとりまく高次構造のちがひによつてこれらの諸過程におよぼすリグニンの影響力に差があり、このことも製剤によつて腫瘍抑制効果が異なる原因の一つと考えられる。

要 約

食糧成分中のリグニンの抗腫瘍機構を検討する目的

で木材パルプ製造時に副生する種々のリグニン製剤について抗腫瘍効果を検定した。その結果、亜硫酸パルプ法によつて副生した製剤にあきらかな抗腫瘍能が認められ、特に広葉樹材を起源とする製剤に効果が著るしかつた。この製剤から分離精製したリグニンスルホン酸(L-LS)は腹水型 sarcoma 180の抑制に著しい効果を示した。すなわち対照群の担がんマウスは腫瘍移植後25日ですべて腫瘍死したにもかかわらず、100 mg/kg 体重の L-LS を投与した群では60日後でも5頭が生きていた。これらの動物には腹水の貯留も認められず、治癒したと判断された。またL-LSを腫瘍移植前から投与するとその効果はさらに増強され、対照群がすべて斃死したときでも、投与区はすべて生存しており、腹水の貯留も認められなかつた。

リグニン製剤の抗がん力は、単にそのリグニン含量のみによつて評価することはできず、高次構造も関与したリグニン分子の存在様式も抗腫瘍能発現のための重要な因子の一つであると考えられる。

文 献

- 林暁・名村好文 1966 リグニンスルホン酸に関する研究(第23報)リグニンスルホン酸中のカテコール基。木材学会誌, 12(1): 44-47
- 樋口隆昌 1969 タケリグニンおよびその生合成。木材研究, 48号: 1-4
- Komatsu, N., S. Okubo, S. Kikumoto, K. Kimura, G. Saito and S. Sakai 1969 Host-mediated antitumor action of *Schizophyllan*, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. *Gann*, 60(2): 137-144
- Marton, J., S. C. Chaleston and E. Adler 1963 Oxidative demethylation of lignin. US patent 3, 071, 570
- 満田久輝・鹿内健彦 1957 インドフェノール・ブタノール溶液を用いるビタミンCの微量比色定量法。 *Vitamins (Japan)*, 13: 394-401
- 村上浩紀・山藤一雄 1968 リグニンの制癌作用。九大農学芸誌, 23(3): 103-111
- 村上浩紀・山藤一雄 1969 カテコールの制癌作用とデオキシリボ核酸に対する反応。九大農学芸誌, 24(1): 13-17
- 荻山浩一・島山隆一・谷口栄一 1971 種子リグニンの特性・第16回リグニン化学討論会(高松)要旨集: 21-24
- 千手諒一・坂田功・西田屹二 1953 亜硫酸パルプ廃液中のリグニンスルホン酸の新定量法(コロイド滴定)。紙パ技協会誌, 7(3): 166-169
- 品川和夫・工藤正邦 1970 バニリン製造時における副生リグニンの性状について。第15回リグニン化学討論会(札幌)要旨集: 91-94
- 祖父江寛・福原節雄 1958 天然リグニンの赤外線吸収スペクトル。工化誌, 61(9): 1070-1073
- Tachi, I., A. Hayashi and A. Sato 1957 Studies on the biosynthesis of lignin. Part 1. Changes of the content of lignin and other chemical constituents with growth of "yugao" fruit (*Lagenalia leucantha* Rosby var. *clavata* Makino) *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 21(5): 279-283
- 田村太郎・泉山江 1957 ミクロ・ベルトラン法用換算表について。食糧研究所報告第13号: 93-98
- 津田恭介・落合英二 1948 有機微量小量分析法。南山堂, 東京, 188-170頁
- Yamafuji, K. and H. Murakami 1968 Antitumor potency of lignin and pyrocatechol and their action on deoxyribonucleic acid. *Enzymologia*, 35(3): 139-153
- Yamafuji, K., Y. Nakamura, H. Omura, T. Soeda and K. Gyotoku 1971 Antitumor potency of ascorbic, dehydroascorbic or 2, 3-diketogulonic acid and their action on deoxyribonucleic acid. *Z. Krebsforsch.*, 76: 1-7

Summary

We have been studying about antitumor potency of lignins in foods. Lignins are contained not only in woods but also in edible parts of some fruits and vegetables; such as in stone cells of pears, bamboo shoots, radishes, gourd fruits and nerves of leaves. These lignins are also so stable against cooking that they come into diets.

Lignins are IR-spectrophotometrically classified into two species; one belongs to that of latifoliate trees and the other to that of needle-leaf trees. As the models for investigating the antitumor mechanisms of lignins in foodstuffs, we used lignin preparations which were by-produced by some pulping procedures of latifoliate and needle-leaf trees.

Lignin preparations produced by sulfite-pulping process were effective to ascitic sarcoma 180. Fifty to 60% of mice to which these lignin preparations had been injected intraperitoneally survived even after the perishment of all the tumor-bearing mice of

control. Then, antitumor potency of calcium lignosulfonates from latifoliate trees (L-LS) and needle-leaf trees (N-LS) against the sarcoma was investigated. Many mice treated with these lignosulfonates survived more than 60 days after tumor transplantation (in case of L-LS, 7/10; N-LS, 5/10), though all of the tumor-bearing mice of control run were dead within 25 days. Among these survived animals, no accumulation of ascitic fluid was detected, they appeared to recover from the sarcoma.

Alkaline oxidation or demethoxylation of the lignins caused the decrease in the potency. Circumstantial evidences have shown that the configurations of lignin molecules largely take parts in their antitumor ability.