九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

笹多糖類の制癌作用

飯尾, 雅嘉
九州大学農学部食糧化学教室

山藤, 一雄
九州大学農学部食糧化学教室

https://doi.org/10.15017/23010

出版情報：九州大學農學部學藝雜誌. 23 (3), pp.113-118, 1968-03. 九州大學農學部
バージョン：
権利関係：

笹多糖類の制癌作用

飯尾雅嘉・山藤一雄

Antitumor activity of bamboo-leaf polysaccharide

M. Iio and K. Yamafuji

天然物で食糧品，嗜好品およびこれに類するものとして利用されているものは非常に数多く，その利用方法，目的も多岐にわたると同時に人体ないし生体に対する作用も千差万別である．従つてその性質・作用について澱粉やタンパク質などのように詳細な研究が行なわれてきたものもあれば，その性質を知らずに，あるいは解明され得ないままに利用されてきたものもある．これら不明の作用を究明しそれを有効に利用することは有益且必要なことであり生物学的な観点からも興味深い課題であると考えられる．更にまだ食糧品として利用されていない物質についても，色々の前処理などによつて利用方法を工夫すれば摂取できるようになるものもあると思われる．また生体への摂取を単に経口的な方法に限ることなく最も効果的な方法を検討することも必要である．このような食糧品の未知な特性とその利用に関する当教室の研究の一環として先に村上[9]が古来強壮剤などとしてその有用性が認められてきた笹葉から制癌物質としてのリグニンを証明，報告した．著者らは，笹葉中のもう一つの制癌作用をもつ物質として酒井ら[12)13)]により報告された多糖類画分に注目して検索を進めた．笹葉の多糖類については酒井らによりその調製法および制癌性が確認され，中原ら[10]により作用機作の一端が推察されているが，われわれは異なつた方法で笹葉のアルカリ抽出液から多糖類を分離した．またマウス腫瘍に試料を投与するに際しては酒井らおよび中原らがその試料溶液を腹腔内に投与しているのに対して，われわれは試料を腫瘍移植部位に投与した．また酒井らおよび中原らは多糖類の性質については余り研究を行なつていないが，われわれはこの点について検討を加えた．

実験方法

制癌性多糖類の分離

多糖類を検索するために笹葉のアルカリ抽出液の少量について諸々の手段によつて分画を行ない，得られた画分を透析して塩その他の低分子物質を除去したのち凍結乾燥を行なつて標品を得，これを酸加水分解したのちミクロベルトラン法によつて還元糖を測定し標品中の糖含量を決定するという方法を取つた．最初硫酸アンモニウムで分画することを試みたが良い結果を得ることが出来なかつた．そこでアルカリ抽出液を塩酸で分画することを試み，塩酸を添加したところ pH 4付近で多量の沈澱を生じたのでこの沈澱について糖含量を測定したが60%程度であつた．しかし上澄から得られた標品は90%の糖を含んでいた．そこで多量のアルカリ抽出液から出発して糖を多く含むこの画分を調製し動物試験に供した結果制癌性が見られたので，以後この画分について分離精製を行なつて表-1のような方法を確立した．得られた物質は水溶性であり，収量はアルカリ抽出液 300 ml から約1 g であつた．

Table 1. Preparation of the polysaccharide.

Bamboo leaves alkaline extraction
- N-HCl　pH 4.2

Supernatant (6,000 r.p.m×20 min.)
- N-NaOH　pH 7.0
- dialysed against running water

Non-dialysable
- concentrated
- 1 vol. Ethanol
- washed once

Sediment (6,000 r.p.m.×20 min.)
- dissolved in water
- dialysed against deionized water

Non-dialysable

Supernatant (24,000 r.p.m.×60 min.)
- lyophilized

Yellow amorphous substance

制癌効果の判定

得られた多糖類の制癌性を判定するに当つてはマウスの可移植性結節腫瘍に対して投与を行ない，一定日数後に腫瘍結節を摘出し重量を対照群のそれと比較するという方法を取つた．供試用腫瘍としては Crocker

Tumor 180，一般に Sarcoma 180 と呼ばれているものを選んだ．顕微鏡観察によると腫瘍細胞はほぼ円形に近く大きさは大体均一であつた．この腫瘍を腹水型として 10日毎にマウスに移植維持し効果判定のつど腹水を採取して腋窩部に注射することによつて腫瘍結節を得た．腹水型腫瘍は殆んど移植率 100 %であり被移植マウスは移植後2週間前後で死に至つた．腹水はしばしば血液を含んで赤色を呈することもあるが移植率に対する影響はなかつた．結節型腫瘍はその移植部位によつて増殖の程度が異なり，腋窩部から下肢の方に離れて移植を行なつた場合，腫瘍は吸収されて自然消失することがあつた．また余り深く針を挿入すると腫瘍の顎部浸潤の原因となりマウスの異常に早い死をもたらし結果の判定を困難にすることになるがいずれも注意深く実験することによつてこれらを避けることが出来るようになつた．

腫瘍の移植，生育，摘出

移植に用いる器具（ハサミ，ピンセット，注射筒，注射針，小試験管）は予め消毒殺菌する．腹水移植後10日を経たマウスの頸椎を伸長切断し解剖台上に腹部を上にして四肢を固定する．腹部表皮のみをピンセットではさんで持上げハサミを水平に用いて表皮のみを腹胸部正中線上に切開する．ついで四肢に向けて表皮を切開し腹膜を露出させて表皮を台上に引張るように固定する．腹腔内には腹水が充満しており腹水が溢出する恐れがあるのでこの操作の間，腹膜を傷つけないように注意する．予めリンゲル液で筒内を湿した 5cc 容注射筒に輸血用針（太）を付して腹水を吸引採取する．針で腹膜を貫き腹腔内左下部において小腸などの器管を避けながら採取を行なつた．要すれば腹膜を切開して残つた腹水の採取を行なう．このようにして得た腹水細胞を一旦小試験管に集め，予めリンゲル液で筒内を湿して静脈針（1/2）を付した 2 cc 容の注射筒によつて供試マウスの腋窩部に 0.2 ml ずつ注射する．注射筒内全部の注入が終つたら一度リンゲル液で筒内を洗滌したのち再び腹水を取る．腹水 1 ml 中には約 10^9 個の細胞が含まれており従つて腋窩部には約 2×10^8 個の細胞が移植されたことになる．

供試用マウスとしては ddN 雄，生後4週のものを九州大学医学部純系動物飼育所より得てこれを用いた．結節型 Sarcoma 180 は移植後一旦消失したような状態を経ることはないが，始めから固く結節することもない．最初柔軟な感触を与え次第に固化して行く，従つて移植の成否を1週間で判定しうる．即ち1週間を経て結節の存在が判らないもの，余りにも感触が固いものは移植が成功しなかつたと見なさなければならない．また腫瘍の発育部位が余りにも下肢あるいは頭部に近いものは自然消失あるいは異常に早い死亡を来たすので場合によつてはこれらを試験の対象から外すことも考えなければならない．移植後2週間を経た腫瘍は相当に発育する．これを摘出するには，移植時と同様にマウスを台上に固定する．皮膚面を消毒後，表皮を腹胸部において結節に沿つて切開する．腫瘍結節と他の組織とは判然と区別できない場合もあるが結節を持上げるようにすると結節を包み他の組織と結節を結ぶように見える半透明膜状組織が判るので要すればハサミを用いるなどして血管を傷つけないように結節を分離し重量を測定する．腫瘍移植後2週間を経たマウスの体重と摘出した腫瘍重量とを表-2に示す．腫瘍重量 3g 以上になると腫瘍の発育は相当なものであり，血管の発達，正常臓器の圧迫が見られる．

Table 2. Tumor weight excised on the 14th day after transplantation.

Tumor weight	Body weight
5.0	29.6
4.1	26.4
3.8	25.0
3.4	29.2
3.1	30.9
2.9	33.0
2.6	26.3
2.0	23.7
0.7	23.4
0.4	27.3
2.8	27.5

多糖類の分析

得られた多糖類について元素分析および還元糖，ペントース，アルドヘキソース，ケトヘキソース，ウロン酸の含量などを調べた．またリグニンについても定性定量試験を行なつた．ペーパークロマトグラフィにより溶媒と発色試薬とを色々組合せて構成単糖類を調べた．これを行なう場合は試料を酸加水分解し不溶物を濾去し濾液を Amberlite 1 RA-93 で中和したものを用いた．濾紙は東洋濾紙 No. 51 を用いた．

結果および考察

製剤による腫瘍の発育抑止

調製した多糖類の制癌作用を判定するに当つては腫瘍移植後3日目から試料を投与した．試料は2%水溶液としマウス当り 0.2 ml ずつ（=4 mg/mouse）を隔日1回，4週間計 14 回投与し，移植後 30 日目に効果の判定を行なつた．対照群にはリンゲル液を投与した．

Table 3. Effect of polysaccharide-treatment.

Control mice		Treated mice	
Tumor wt.	Body wt.	Tumor wt.	Body wt.
10.2	35.2	2.4	20.0
7.8	26.0	2.3	25.6
6.6	23.2	0.8	26.4
5.7	23.7	0.3	28.7
5.4	22.8	0.3	31.4
5.0	20.8	0.2	23.9
4.4	22.9	0.2	25.2
4.1	15.7	—	24.2
3.7	30.9	—	22.1
1.0	25.7	—	26.6
Ave. 5.4	24.7	0.7	25.3

その結果を表-3 に示す．これから判るように試料の投与を受けたマウスは対照マウスに比して腫瘍重量が遙かに小さいが，体重は等しく外観も健康でうずくまりや立毛あるいは下痢などなどの病的な状態は見られなかつた．その外の所見としては投与群の腫瘍結節が固くなつているのが多く壊死が見られた．これらの事実からこの多糖類は Sarcoma 180 の発育を抑制するがマウスに対しては目立つて有害な作用を与えないことが知られた．多くの制癌剤が担癌動物に対しても同時に有毒であることからするとこの多糖類の作用は大変興味深いものと思われる．

製剤中の糖類の含量

多糖類調製品の元素分析を九州大学理学部化学分析センターに依頼して表－4のような結果を得た．このうち最も注意すべきことは窒素が含まれていないことであり，従つてこの調製品中にはタンパク質，アミノ酸，アミノ糖などの含窒素化合物が含まれていないことが判明した．多糖類の糖含量を知るために加水分解液にミクロベルトラン法を適用した．秤取した試料を水に溶かし塩酸を加えて酸濃度を3％とし還流冷却管を付して沸とう浴中で3時間加水分解し生じた不溶物を濾別水洗し濾液，洗液を合せて一定容としその一定量を取つてミクロベルトラン法を行ない，標定した $KMnO_4$ 液の消費量から相当する銅量を求め表によつてグルコース量を知り還元糖含量を95％と算出した．ペントースについては，Bial のオルシン・Fe^{+++}・塩酸法[14] によつて定量を行なつた．上記と同様に水解して定容とした液について比色定量法を行ない，リボースによつて標準曲線を描き，これからペントース濃度を得て試料中の含量を83％と算出した．アルドヘキソースについては Koehler[6] のアンスロン法によつて定量を行なつた．この方法によると重合体を加水分解することなく直接定量することができる．グルコースによつて標準曲線を描き，これからアルドヘキソース濃度を知つて試料中の含量を15％と算出した．ケトヘキソースについては Kulka[8] のレゾルシン・Fe^{+++}・塩酸法を用いて加水分解液について比色定量法を実施しフラクトースによつて標準曲線を描いたが試料溶液の色調が標準溶液のそれと著しく異なり，この呈色は他の糖の存在によるものと考えられた．ペーパークロマトグラフイなどの結果からケトヘキソースは存在しないものと推定した．アミノ糖については元素分析の結果からこの多糖類調製品には窒素が含まれておらず，従つてアミノ糖は含まれていないことになるが，これは Elson-Morgan 反応[3]，ニンヒドリン反応いずれも陰性であることによつて確認された．ウロン酸については加水分解液に対しナフトレゾルシン反応[7]，カルバゾール硫酸反応[2] などの定性試験を行なつたがいずれも反応は陰性であつた．またペーパークロマトグラフイを利用する定性試験もウロン酸に対するアニリントリクロル酢酸法[4]，塩基性酢酸鉛法[4]，ラクトンに対するヒドロキサム酸法[1] いずれも陰性であつたのでこの多糖類中にはウロン酸は含まれていないものと断定した．以上の結果を表－5にまとめる．即ち多糖類調製品は高度に糖を含有しその大部分をペントースが占め残りの糖はアルドヘキソースであり，アミノ糖，ウロン酸，ケトヘキソースを含んでいないことが判つた．

Table 4. Elementary analysis of the polysaccharide.

	C	H	N	Ash
%	39.45	6.89	0	trace

Table 5. Sugar content of the polysaccharide.

Component	Content (%)	Method
Reducing sugar	95	micro Bertrand
Pentose	83	Bial
Aldohexose	15	Koehler
Ketohexose	—	Kulka
Amino sugar	—	Elson-Morgan
Uronic acid	—	Carbazole-H_2SO_4

リグニンについての検討

多糖類標品は元素分析の結果からタンパク質を含んでいないことが判つたが，銅・Folin 反応に陽性であり，紫外吸収スペクトル測定の結果，280 mμ 付近に緩やかな吸収極大を示した．また水溶液を濾紙にスポッ

トし赤血塩・塩化第二鉄試薬を噴霧したところ鮮青色を呈しフェノール性の物質の存在が推定された．これらの結果からフェノール性の物質の存在を考え，これに相当するものとして植物の構造多糖類に随伴して存在することが極めて多くまた笹葉中にもその存在が確認されたリグニンを予想した．糖含量などから考えるとリグニンは多くとも 10％程度しか含まれないことになるがリグニンは先に村上によつて制癌性が確認されているので多糖類調製品についてリグニンに対する試験を行なつた．まず定性試験としてニトロベンゼン酸化物を確認する方法[15]を取つた．多糖類調製品をニトロベンゼンによつて 180～190° で2時間酸化を行ない，エーテル層に移してこれを薄層クロマトグラフィに用いた．溶媒としてベンゼン・メタノール (95：5) を，標準物質としてリグニンのニトロベンゼン酸化物であることが知られているバニリンおよび p-オキシベンズアルデヒドを用いたところ多糖類調製品の酸化物のスポットが標準物質のそれにきれいに一致したのでリグニンの存在が認められた．ついでリグニンを硫酸加水分解をうけないいわゆる Klason リグニンとして定量し含量 3.5％という値を得た．以上の結果からリグニンの存在が認められたがその含量は少なく，リグニンのみが制癌作用を示す投与量 (12 mg/mouse) から考えて少なくともこの多糖類調製品中のリグニンは制癌作用の本体をなすものではなくその作用は補助的なものであると考えられた．

構成糖の検索

多糖類調製品の性質に関する知見を更に得て腫瘍に対する作用機作の解明の手がかりとするために，この多糖類の糖成分の同定を行なつた．方法としては試料を酸加水分解し不溶物を濾去し，濾液を弱塩基性アニオン交換樹脂 Amberlite 1 RA-93 によつて中和し，これをペーパークロマトグラフィに適用した．まず多糖類を構成する糖の数を知るために，2次元の展開を行なつた．いずれも下降法を用い溶媒が濾紙先端より落下しても展開を続け糖相互の完全な分離を媒つた．溶媒は1次元が n-ブタノール・エタノール・水 (5：1：4)，2次元が酢酸エチル・酢酸・水 (3：1：3)，検出にはアンモニア性硝酸銀[16]を用い，図—1に示すようにこの多糖類が3つの糖を含むことが判つた．溶媒として酢酸エチル・酢酸・水 (3：1：3) を用いての1次元だけの展開によつても3つのスポットが得られることが判つたので，この溶媒を用いて次のような試験を行ない構成糖を推定した．ロケーションガイドとしてキシロースを用い 20時間下降法を行

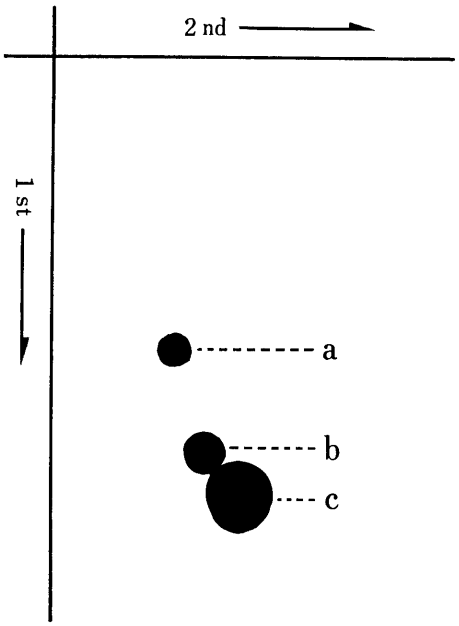

Fig. 1. Peper chromatogram of the polysaccharide hydrolysate after 2-dimensional descending development.

Solvent 1st n-BuOH·EtOH·H_2O 5：1：4
2nd Ethylacetate·AcOH·H_2O 3：1：3
Spots were detected with Ammonium-$AgNO_3$.

なつたところ先端のスポットはキシロースに一致するように思われた．そこで仮に先端のスポットをキシロースとして Isherwood ら[5]の Rf 値 0.265 をあてはめ，他のスポットの Rf 値を原点からの距離より算出すると第2のスポットが 0.23，第3の原点に近いものが 0.16 という値が得られた．同じ文献によればアラビノースの Rf 値が 0.22，グルコース 0.17，ガラクトースが 0.14で，その他の糖の値は上記の値から離れていた．この結果によつて構成糖としてキシロース，アラビノースおよびグルコースまたはガラクトースが考えられた．上記の試験の際に同時に展開した濾紙についてアニリン水素フタル酸塩法[11]によつて定性試験を行なつたところ先端およびその次に位置するスポットは赤色を呈したのでペントースであり，第3のスポットは褐色を呈したものでペントース，ケトヘキソース以外の還元糖であることが判つた．従つてこの結果は構成糖がキシロース，アラビノースおよびグルコースまたはガラクトースであるという推定に一致するものである．上記の推定を確認するためにアラビノキシランなどの構成糖検索によく利用され，また予備試験の結果からキシロースとアラビノースの相互の分離が非

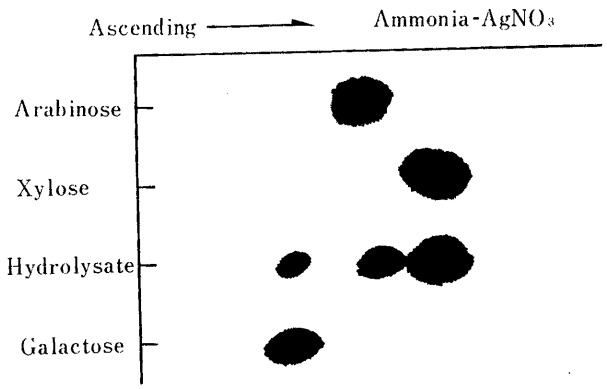

Fig. 2. Paperchromatogram of the polysaccharide hydrolysate.
Solvent n-BuOH・Benzene・Pyridine・H_2O 5：1：3：3.

常に優れている溶媒であることが知られた n-ブタノール・ベンゼン・ピリジン・水（5：1：3：3）を用いて試験を行なつたところ図—2に示すように第1，第2のスポットがそれぞれキシロース，アラビノースにきれいに一致した．また第3のスポットはガラクトースに一致した．キシロースおよびアラビノースの存在は展開溶媒として 80％フェノールを用いての試験により，その Rf 値の逆転の結果からも支持された．また加水分解時間を30分，1，2，3時間としたものを順次ペーパークロマトグラフイ適用して比較検討したがいずれもスポットは3つであり変化はなかつた．またその各原点にアラビノース，キシロースを重ねてスポットし展開したがいずれも一致し，この2つの糖の存在が確認された．

総　　括

食糧品の未知な特性とその利用に関する研究の一環として笹葉から制癌性を有する多糖類を分離した．

この物質は笹葉のアルカリ抽出液中の酸性で沈澱しない画分に存在し減圧濃縮およびエタノール添加を主な手段として調製された．

この物質は窒素を全く含有していなかつた．糖含量は95％に達しペントースが83％，アルドヘキソースが15％含まれており，ケトヘキソース，ウロン酸は含まれていなかつた．

リグニンが含有されていたが，その含量は3.5％で，制癌作用の本体をなすものではないと考えられた．

ペーパークロマトグラフイの結果からペントースとしてキシロース，アラビノースおよびアルドヘキソースとしてガラクトースが確認された．

終りに動物試験に関して御教示頂いた九州大学医学部癌研究施設の今井環教授，福井仁士先生に深謝の意を表します．

文　　献

1) Abdel-Akher, N. and Smith, F. (1951) J. Am. Chem. Soc., **73**, 5859.
2) Dische, Z. (1947): J. Biol. Chem., **167**, 189.
3) Elson, L. A. and Morgan, W. T. J. (1933): Biochem. J. **27**, 1824.
4) Gee, M. and McCready, R. M. (1957): Anal. Chem. **29**, 257.
5) Isherwood, F. A. et al (1949): Biochem. J. **44**, 402.
6) Koehler, L. H. (1952): Anal. Chem. **24**, 1576.
7) Koch, F. C. and Hanke, M. E. (1948): Practical Methods in Biochemistry p. 17.
8) Kulka, R. G. (1956): Biochem. J. **63**, 542.
9) 村上浩紀・山藤一雄（1967）：日本農芸化学会昭和42年度大会講演要旨集 p. 24.
10) Nakahara, W. et al (1964): Gann **55**, 283.
11) Partridge, S. M. (1949): Nature **164**, 443.
12) Sakai, S. et al (1964): Gann **55**, 197.
13) 酒井純雄（1966）：化学と生物 **4**, 466.
14) Sato, R. et al (1954): J. Biochem. **41**, 307.
15) 田中治郎・近藤民雄（1956）：木材学会誌 **2**, 145.
16) Trevelyan, W. E. et al (1950): Nature **166**, 444.

Summary

As a part of the studies on unknown nature of food materials and their use Murakami and Yamafuji (1967) demonstrated an anticancer effect of lignin prepared from bamboo leaves. We have now prepared a polysaccharide and examined its antitumor action.

We first established a new procedure for preparation of polysaccharide; alkaline extraction of bamboo leaves was acidified and the supernatant was appropriately treated with ethanol. The sediment was dissolved in water and dialyzed. Light yellow amorphous substance was finally obtained from the dialysate after some treatments.

The material was tested for its antitumor effect to solid form of Sarcoma 180. On the 3rd day after tumor transplantation, 0.2 ml of 2% aqueous solution of the material was injected to each of ten test mice (=4 mg/mouse), subcutenously at axilla where the tumor had been transplanted. The control mice were treated with Ringer's solution. Both groups of the animals were treated once every other day and the treatment was continued for 4 weeks. On the 30 th day, the tumor were excised, weighed and compared with those of the control mice. In this way the polysaccharide was found to have a notable antitumor effect to Sarcoma 180.

Analyses showed that the polysaccharide contains no nitrogen. It consisted of 83% pentose and 15% aldohexose. Neither ketohexose nor uronic acid were tested. The preparation contained 3.5% lignin which may not participate in its antitumor activity.

By paper chromatographic methods, xylose, arabinose and galactose were detected as sugar components.