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

アスコルビン酸酸化物の制癌作用

中村, 泰彦
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/10.15017/23011

出版情報：九州大學農學部學藝雜誌. 23 (3), pp.119-125, 1968-03. 九州大學農學部
バージョン：
権利関係：

アスコルビン酸酸化物の制癌作用

中村泰彦・山藤一雄

Antitumor activities of oxidized products of ascorbic acid

Y. Nakamura and K. Yamafuji

食糧品中の制癌性物質に関する当教室の一連の研究により，すでにリグニンや笹多糖類が可移植性マウス腫瘍に対して抗腫瘍性を示すことが明らかにされた．一方，食糧成分として動植物界に広く存在するアスコルビン酸について，荒谷[1]はエールリッヒ腹水癌の死亡率を低下させ腹水貯留を抑制する作用があると報告している．アスコルビン酸は生体内では酸化型，還元型の両型として存在し，生体内の酸化還元反応に関与していると考えられる．酸化型アスコルビン酸，つまりデヒドロアスコルビン酸は分子中に $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-$ の構造を持ち，種々の還元剤により容易に還元されてアスコルビン酸となり，また α-アミノ酸と反応して赤色物質を作り褐変現象の一因をなすなど反応性に富んでいる．

そこで著者らは可移植性マウス腫瘍 Sarcoma 180 を使つて，アスコルビン酸およびアスコルビン酸酸化物の抗腫瘍性について検討し，デヒドロアスコルビン酸およびそのラクトン環の開裂により生じる 2, 3-ジケトグロン酸が抗腫瘍性を持つことを明らかにした．

実験方法

1) デヒドロアスコルビン酸の合成

市販の特級 L-アスコルビン酸を用い，Kenyon らの方法[4]を一部変えて行なつた．

2) デヒドロアスコルビン酸粗結晶の性質

上の方法により得られた粗結晶の性質を調べるために，ペーパークロマトグラフイー，紫外部吸収スペクトルの測定，2, 4-ジニトロフェニルヒドラジンとの縮合により生じるヒドラゾンの吸収スペクトル測定を行なつた．

3) 市販アスコルビン酸の純度検定

市販特級 L-アスコルビン酸の一定量を正確に計り，2％メタ燐酸に溶解して概略 40 γ/ml となるようにする．この 5 ml に 6％ヨウ化カリ 0.5 ml と指示薬として澱粉液数滴を加えて 1/1000 N ヨウ素酸カリ液で滴定した．

4) ヒドラジン法によるアスコルビン酸，デヒドロアスコルビン酸，2, 3-ジケトグロン酸の分別定量

AVC 法[2]に準じて行なつた．

a）標準曲線作成

アスコルビン酸 100 mg を 5％メタ燐酸に溶かして 100 mg とし，その 50 ml をとり臭素 2，3 滴を加えて振り，氷水中で冷却しながら窒素ガスを通じて過剰の臭素を除く．この液 10 ml にチオ尿素 0.5 g を加え 5％メタ燐酸で 500 ml とする．これをもとに 1％チオ尿素－5％メタ燐酸で稀釈して各濃度を作り発色させた．

b）アスコルビン酸＋デヒドロスアスコルビン酸＋2, 3-ジケトグロン酸

粗結晶を 5％メタ燐酸に溶かして上と同様に臭素酸化を行ない，1％になるようにチオ尿素を加えて常法に従つて発色させた．

c）デヒドロアスコルビン酸＋2, 3-ジケトグロン酸

粗結晶を 1％チオ尿素－5％メタ燐酸に溶かし比色被検液とした．

d）2, 3-ジケトグロン酸

最初は粗結晶を 5％メタ燐酸に溶かして硫化水素還元を行ないすぐに濾過して発色させる方法をとつたが，これでは還元が十分でなく，2, 3-ジケトグロン酸の含量が常に高く出るので，次のようにした．すなわち粗結晶を純水に溶かして氷水中で冷却しながら硫化水素を 15 分間通じ，密栓して冷蔵庫に一夜放置し，これに終濃度がそれぞれ 5％と 1％になるようにメタ燐酸，チオ尿素を加え濾過，この濾液について発色以下の操作を行なつた．

e）発　色

被検液 4 ml に 2％ 2, 4-ジニトロフェニルヒドラ

ジン液1 ml を加え，37℃，6時間反応させ反応後氷水中で冷却しながら注意深く85%硫酸5 ml を滴下した．別に被検液4 ml に氷水中で85%硫酸5 ml を滴下し，2，4-ジニトロフェニルヒドラジン1 ml を加えて盲検とした．吸光度の測定は520 mμで行なつた．

5）動物実験

a）マウス

ddN系雄，生後4週のものを用いた．

b）腫　瘍

九大医学部癌研より分与いただき，現在当教室で維持しているマウス腫瘍 Sarcoma 180 を用いた．Sarcoma 180 は常時腹水型として維持しておき，試験のつど移植後10～12日目の腹水0.2 ml を生後4週の ddN 雄マウスの腋下部皮下に注射移植した．

c）薬の投与

試験群にはリンゲル液に溶かした薬を，対照群にはリンゲル液を，腫瘍移植48時間後から始めて隔日1回，計6回移植部位に0.2 ml ずつ注射した．

d）抗腫瘍性の判定

薬の最終投与後1日おいて屠殺し腫瘍を摘出し，その重量を測定して対照群のそれとの比較から判定した．

実験結果ならびに考察

1）デヒドロアスコルビン酸の合成

アスコルビン酸8.8 g とヨウ素12.6 g をそれぞれ約35 ml の95%メタノールに出来るだけ溶解した上で加え合わせ，さらにメタノールを加えて75 ml とする．これを10℃程度に冷却して攪拌下に炭酸鉛を徐々に加える．添加は静置上清が無色となるまで続けるが，約20 g を要する．遠沈して上清を集め沈澱は少量のメタノールで洗う．これに硫化水素を5秒間通じる．無色の液は赤褐色となるがただちに空気を通じて溶存硫化水素を除く．かなり時間がかかるので冷却しながら行なう．黒褐色沈澱が凝集し液は透明になる．濾過後30～40℃で減圧濃縮すると無色のシラップ状となるから温度を徐々に上げて100℃にする．100℃で1.5時間減圧乾燥した後室温まで冷し，99.5%エタノール30 ml に溶かし冷蔵庫に放置する．出来た結晶は少量の冷エタノールで洗い真空デシケーターで乾燥する．収量1 g．

2）デヒドロアスコルビン酸粗結晶の純度

a）ペーパークロマトグラフィー

上記の粗結晶とアスコルビン酸の1%水溶液を0.01 ml 宛スポットし，n-ブタノール-酢酸-水（4：1：5）で室温，下降法で展開した．発色には0.1 N $AgNO_3$—10% NH_4OH（1：1）を用いた（Fig. 1）．

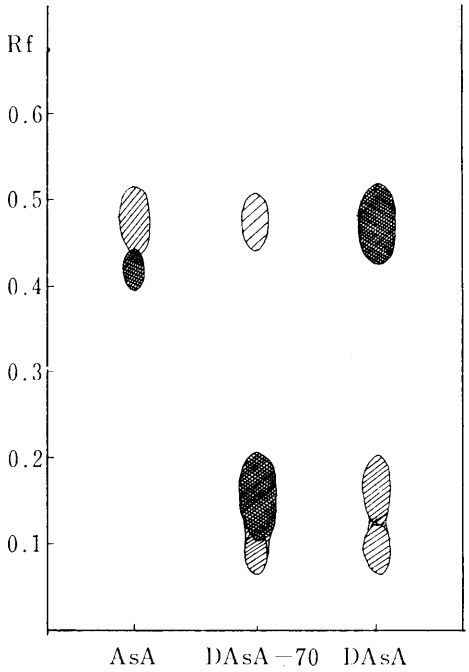

Fig. 1. Paperchromatograms of dehydroascorbic acid crude crystal and its aqueous solution kept at 30℃ for 70 hours. AsA: ascorbic acid; DAsA-70: aqueous solution of dehydroascorbic acid crude crystal kept at 30℃ for 70 hours; DAsA: dehydroascorbic acid crude crystal.

アスコルビン酸溶液では Rf=0.42 のスポットの他に Rf=0.48 のスポットが現われる．特にアスコルビン酸を溶液にした状態で長く放置した場合著しく，デヒドロアスコルビン酸のメインスポットに一致する．これは溶液状態で，或いは展開中にアスコルビン酸が一部酸化したためと思われる．酸化防止剤としてチオ尿素を添加すると0.1N $AgNO_3$—10% NH_4OH ではバックが褐色となりスポットが見分けにくくなる．粗結晶では Rf=0.47 のメインスポットの他に Rf=0.16, 0.11 の2つが現われる．デヒドロアスコルビン酸の水溶液を長く放置すると次第に2，3-ジケトグロン酸に変るといわれており，この粗結晶の水溶液も30℃に70時間おいた後クロマトグラフィーを行なうとメインスポットは Rf=0.16 に移るから Rf=0.16 は2，3-ジケトグロン酸であろう．

b）紫外吸収スペクトル

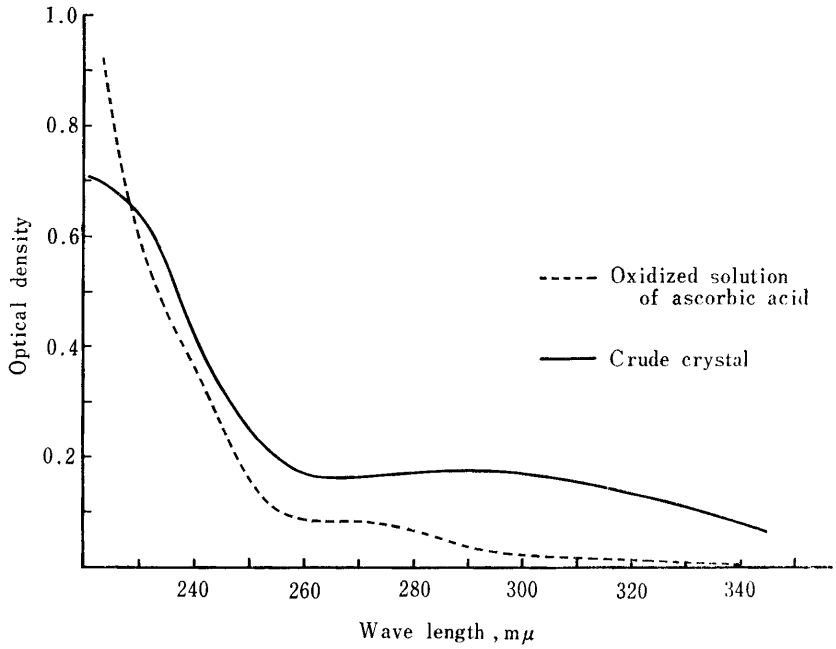

Fig. 2. UV spectra of dehydroascorbic acid crude crystal and oxidized solution of ascorbic acid by bromine. Both were dissolved in 2% HPO_3 at the ratio of mg/ml.

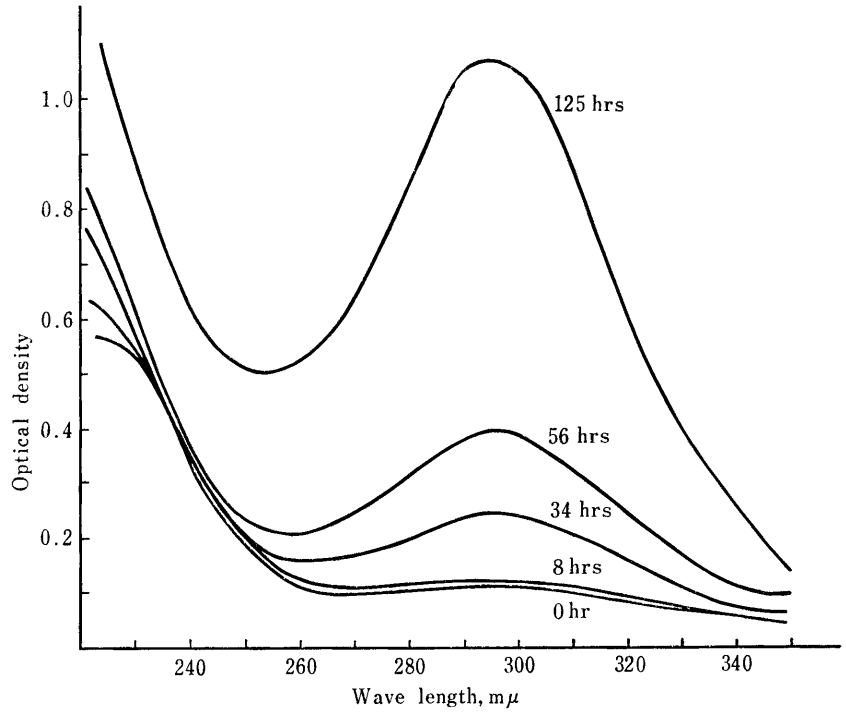

Fig. 3. Changes of UV spectrum of dehydroascorbic acid crude crystal in aqueous solution. 10 mg of crude crystal was dissolved in pure water and kept at 20°C. PH of the solution was 3.0.

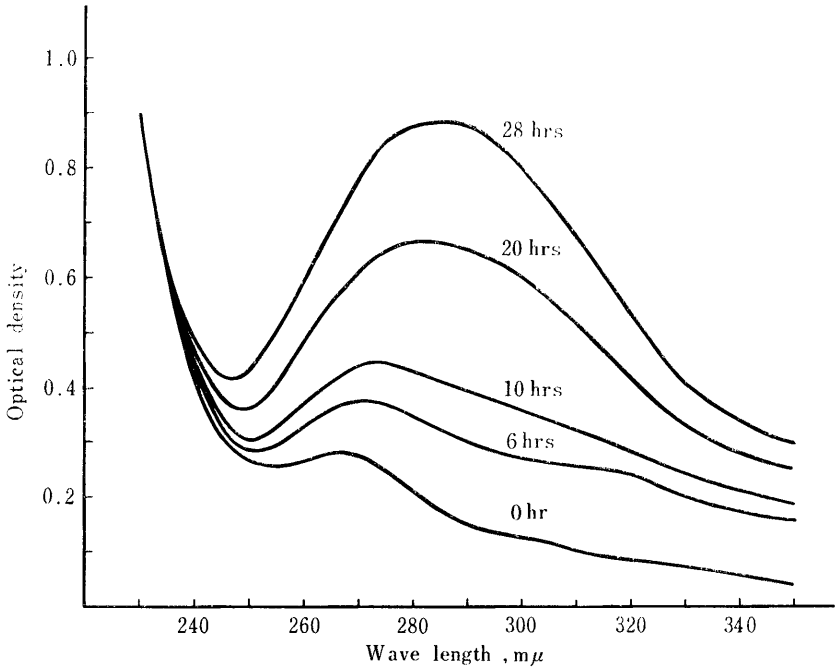

Fig. 4. Changes of UV spectrum of dehydroascorbic acid crude crystal in neutral buffer solution.

Ten mg of crude crystal was dissolved in 10 ml of sodium citrate buffer solution, PH 7.0, and kept at 20°C.

粗結晶の溶解直後の紫外吸収スペクトルを Fig. 2 に示す．これは Herbert ら[3] のものと大体一致する．しかしデヒドロアスコルビン酸水溶液は 210 mμ より長波長側には何らの選択的吸収を持たないとされているから，295 mμ 附近のなだらかな吸収ピークは混在する他の物質によるものであろう．この吸収スペクトルは時間と共に変化して 295 mμ にはつきりしたピークを持つようになり，その吸光度も次第に増加していく．短波長側の吸収も増大する（Fig. 3）．

溶液が中性であるとその変化はもつと速く，吸収ピークは初期において短波長側にずれる（Fig. 4）．

デヒドロアスコルビン酸は水溶液中で 2, 3-ジケトグロン酸へ不可逆的変化をすること，2, 3-ジケトグロン酸の吸収極大が 295 mμ であることからこの 295 mμ の吸収は生成した 2, 3-ジケトグロン酸によるものであろう．

c）2, 4-ジニトロフェニルヒドラジンとのヒドラゾン形成

2, 4-ジニトロフェニルヒドラジンはデヒドロアスコルビン酸または 2, 3-ジケトグロン酸のケト基と反応して難溶性のヒドラゾンを作る．レダクトンも反応するがそのヒドラゾンの硫酸溶液は 450～490 mμ に特異的な吸収をもち，520 mμ に極大を示した 2, 3-ジケトグロン酸のヒドラゾンとは区別できる．

d）分別定量

ヨウ素酸カリ滴定法による市販特級アスコルビン酸の純度は 99 %以上であり，ヒドラジン法によれば 0.8 %のデヒドロアスコビン酸を含んでいた．

ヒドラジン法による分別定量はアスコルビン酸⇄デヒドロアスコルビン酸の酸化還元における可逆性とデヒドロアコルビン酸→2, 3-ジケトグロン酸の不可逆性を利用したものである．つまり臭素による酸化によりアスコルビン酸をデヒドロ体に変えて（アスコルビン酸＋デヒドロアスコルビン酸＋2, 3-ジケトグロン酸）量を，そのままで（デヒドロアスコルビン酸＋2, 3-ジケトグロン酸）量を，硫化水素による還元によりデヒドロ体をアスコルビン酸に変えて 2, 3-ジケトグロン酸量を測定し，それぞれ差し引いて算出するものである．従つて酸化還元その他の操作中における各物質の分解をさけるため，必要以外は出来るだけ低温で短時間にすませるようにした．

粗結晶はペーパークロマトグラフィーの結果からみ

ると 2, 3-ジケトグロン酸を含む可能性があるので，ヒドラジンとの縮合反応は反応時間を6時間とした．これによつてヒドラゾン形成におけるデヒドロアスコルビン酸と 2, 3-ジケトグロン酸の反応速度の違いから生じる誤差は除かれる．

標準曲線から求めた粗結晶の成分組成を Table 1 に示した．

Table 1. Composition of crude crystal.

Component	Ascorbic acid	Dehydro-ascorbic acid	2, 3-diketo-gulonic acid	Others
γ in 10 γ of crude crystal	0.2	6.6	1.0	2.2

その他の22%は溶解した粗結晶の重量10γから(アスコルビン酸＋デヒドロアスコルビン酸＋2, 3-ジケトグロン酸）量 7.8γを引いたもので，このものが何であるかは分らない．後述するように粗結晶の水溶液を長時間放置しておくと 2, 3-ジケトグロン酸の量が増すが，その溶液は（アスコルビン酸＋デヒドロアスコルビン酸＋2, 3-ジケトグロン酸）量も 8.3γと大きく出る（Table 2）．

Table 2. Composition of 70-hrs-solution.*

Component	Ascorbic acid	Dehydro-ascorbic acid	2, 3-diketo-gulonic acid	Others
γ in 10 γ of crude crystal	0	2.5	5.8	1.7

* Crude crystal was dissolved in pure water and kept at 30°C for 70 hours.

その原因は分らないが溶解直後の溶液が何かの理由でヒドラジンと縮合しにくいような状態にあるとすれば，Table 1 のその他の%は実際はもつと低いと思われる．粗結晶は10%の 2, 3-ジケトグロン酸および22%のその他の酸化生成物を含むので，この段階で粗結晶の抗腫瘍性がデヒドロアスコルビン酸によるとは断定できない．

一方デヒドロアスコルビン酸は水溶液中でラクトン環が開いて次第に 2, 3-ジケトグロン酸に変わると云われている．例えば Fig. 3 に示すように 20°C, pH 3.0 では125時間後に 2, 3-ジケトグロン酸の λmax. である 295 mμ の吸収は10倍以上に増大した．そこで 70 時間後のデヒドロアスコルビン酸と 2, 3-ジケトグロン酸の割合をヒドラジン法により求めると，Table 2 のように 2, 3-ジケトグロン酸が増加しデヒドロアスコルビン酸が減少している．

3) 動物試験の成績

薬の抗腫瘍性判定の方法はいろいろあるが，著者らはマウス腹水腫瘍 Sarcoma 180 を腹水型として維持しておき，試験には結節型として使用する方法をとつた．その利点は，Sarcoma 180 は腹水中では腫瘍細胞が1個1個完全に遊離しており移植する腫瘍細胞の量を自由に調節できること，移植が簡単であること，固型で移植する場合に比べて腫瘍重量のばらつきが小さいこと，腫瘍重量を比較するという簡単な方法で一応抗腫瘍性の判断が出来ることなどである．

すなわち，たね動物より採取した腹水を生後5週の ddN 雄マウスの腹腔内に移植する．移植後9～10日すると細胞数は約10^9個/ml となるので，この腹水を太い輸血針で採取し生後4週の ddN 雄マウスの腋下部皮下に静脈針（1/2）で 0.2 ml 宛移植する．4～5日後には腫瘍は大豆大の結節となり，2週間後には平均4～6 g となる．中には10 g におよぶものもあり大きいものは中心部から融解しやすい．腫瘍重量により抗腫瘍性の判定をするときには移植後2週間，平均腫瘍重4～6 g 程度で比較するのがばらつきが小さくよいことが分つた．

アスコルビン酸およびデヒドロアスコルビン酸粗結晶は注射直前に 15 mg/ml となるようにリンゲル液に溶かし，70 時間放置水溶液は粗結晶を 15 mg/ml リンゲル液の濃度に溶かし 30°C に 70 時間おいた後，それぞれ 0.2 ml（3 mg/mouse, 150 mg/kg）ずつ6回注射した．これらの水溶液は酸性であるが中性にすると分解しやすくなるので中和はしなかつた．

粗結晶投与群では1～2回の注射で腫瘍が固くなり

Table 3. Effect of crude crystal administration.

Mice No.	Crude crystal		Ringer's solution	
	Body weight (gm)	Tumor weight (gm)	Body weight (gm)	Tumor weight (gm)
1	22.4	4.8	25.2	7.9
2	20.7	4.3	27.0	6.2
3	20.0	3.6	27.0	5.4
4	16.5	3.5	21.9	4.2
5	22.4	1.6	21.1	3.6
6	23.0	0.6	21.6	3.3
7	22.0	0.6	18.5	2.7
8	18.9	0.5	20.7	2.0
Average	20.7	2.4	22.9	4.4

Administration was initiated 2 days after implantation with subcutaneous injection and continued every other day for 6 days. Dose was 150 mg/kg/day.

Table 4. Effect of administration of 70-hrs-solution.*

Mice No.	70-hrs-solution		Ascorbic acid		Ringer's solution	
	Body weight (gm)	Tumor weight (gm)	Body weight (gm)	Tumor weight (gm)	Body weight (gm)	Tumor weight (gm)
1	28.7	4.8	26.4	6.0	32.0	8.6
2	28.0	3.6	26.0	5.0	29.2	8.1
3	23.8	3.6	24.5	5.0	26.4	6.5
4	23.5	3.3	22.8	4.0	24.0	5.5
5	23.9	2.1	23.5	3.8	32.5	4.9
6	27.0	2.0	23.6	3.3	30.2	4.9
7	27.5	1.5	24.2	2.1	27.0	3.5
8	28.5	0.7	23.6	1.5	30.5	2.0
Average	26.4	2.7	24.3	3.8	29.0	5.5

* Crude crystal was dissolved in Ringer's solution and kept at 30°C for 70 hours. Dose was 150 mg/kg/day.

Table 5. Effect of administration of ascorbic acid in low dosage level.

Mice No.	Ascorbic acid		Ringer's solution	
	Body weight (gm)	Tumor weight (gm)	Body weight (gm)	Tumor weight (gm)
1	27.0	4.6	23.5	4.6
2	26.0	4.2	28.0	3.8
3	23.0	3.4	22.0	3.3
4	30.0	3.2	25.5	3.2
5	24.5	3.3	24.0	2.9
6	20.0	3.0	22.0	2.8
7	26.0	2.8	24.0	2.3
8	23.0	2.8	24.0	2.2
9	26.5	2.4	20.5	2.0
10	19.0	1.3	23.5	1.0
Average	24.5	3.1	23.7	2.8

Dose was 36 mg/kg/day.

壊死を起こすものもある．そのような個体は以後腫瘍の発育は著しく抑えられる．体重の増加は対照群に比べてやや劣るが，腫瘍重ははるかに小さく対照群の55%である（Table 3）．

70時間放置水溶液でも同じような傾向がみられ，腫瘍重は対照群の49%である（Table 4）．

粗結晶の成分はデヒドロアスコルビン酸66%，2,3-ジケトグロン酸10%であり，70時間放置水溶液はデヒドロアスコルビン酸25%，2,3-ジケトグロン酸58%であるにもかかわらず腫瘍抑制率はほぼ同じであるから，デヒドロアスコルビン酸およびそのラクトン環が開いた2,3-ジケトグロン酸はどちらも抗腫瘍性を持つと考えられる．アスコルビン酸もこの投与レベルでは腫瘍の発育を抑える傾向にある（Table 4）．しかし投与量が少ないとき(0.74 mg/mouse, 37 mg/kg)は抗腫瘍性は認められなかつた（Table 5）．

アスコルビン酸がアスコルビン酸そのものとして弱い抗腫瘍性を示すのか，或いは注射されたアスコルビン酸の一部が生体内で酸化されて抗腫瘍性を発揮したのか今のところ分らない．

摘　　要

1．Kenyonらの方法を一部変えてアスコルビン酸よりデヒドロアスコルビン酸を調成し粗結晶として分離した．

粗結晶の溶解直後の水溶液は紫外部にほとんど選択的吸収を示さないが，時間がたつにつれて295 mμに吸収極大を持つようになり別の物質に変化することを示した．この変化はペーパークロマトグラフィーによつて確かめられた．

ヒドラジン法によると粗結晶の組成はデヒドロアスコルビン酸66%，2,3-ジケトグロン酸10%，アスコルビン酸2%，その他22%であり，70時間放置水溶液はデヒドロアスコルビン酸25%，2,3-ジケトグロン酸58%，その他17%であつた．

2．粗結晶およびその70時間放置水溶液は，可移植性マウス腫瘍 Sarcoma 180 に対して抗腫瘍性を示し，腫瘍の増殖は粗結晶投与群では対照群の55%，70時間放置水溶液投与群では対照群の49%に抑えられた．この抗腫瘍性はデヒドロアスコルビン酸，2,3-ジケトグロン酸によるものと推定した．

文　　献

1) Aratani, H., 1958. J. Antibiotics, Ser. B., **11**, 244.
2) The Association of Vitamin Chemists, 1951. Methods of Vitamin Assay, 2nd ed., 93.
3) Herbert, R. W., Hirst. E. L., Percival, E. G. V., Reynolds, R. J. W. and Smith, F., 1933. J. Chem. Soc., 1270.
4) Kenyon, J. and Munro, N., 1948. J. Chem. Soc., 158.

Summary

In vivo ascorbic acid exists in two forms of oxidized dehydroascorbic acid and reduced ascorbic acid.

It is reported that ascorbic acid decreases the mortality of mice bearing Ehrlich ascites tumor, but we have no information as to dehydroascorbic acid.

We synthesized dehydroascorbic acid by improved method of Kenyon et al. and isolated it as crude crystal.

Aqueous solution immediately after dissolution showed no selective absorption in ultraviolet wave length, and it came to have a peak at 295 mμ with the lapse of time. By means of hydrazine method, crude crystal was calculated to be composed of 2 % ascorbic acid, 66 % dehydroascorbic acid, 10 % 2,3-diketogulonic acid and 22 % others.

Crude crystal solution kept at 30°C for 70 hours (70-hrs-solution) consisted of 25 % dehydroascorbic acid, 58 % 2,3-diketogulonic acid and 17 % others. There was similar tendency in paper-chromatography.

Crude crystal and 70-hrs-solution inhibited the growth of transplantable mouse tumor Sarcoma 180, solid type and the inhibition rates were 45 % and 51 % respectively with the dose of 150 mg/kg/day for 6 days. With the same dosage, ascorbic acid showed weak antitumor activity.

Although crude crystal and 70-hrs-solution went by contraries on the content of dehydroascorbic acid and 2,3-diketogulonic acid, both inhibited the growth of tumor to similar extent.

So we presumed that dehydroascorbic acid and 2,3-diketogulonic acid had antitumor activities respectively.

Laboratory of Food Chemistry,
Department of Food Science and Technology,
Kyushu University