

5-Methyl-3,4-dihydroxytetroneの抗腫瘍性

富田, 純史
九州大学農学部食糧化学教室

江藤, 正義
九州大学農学部食糧化学教室

飯尾, 雅嘉
九州大学農学部食糧化学教室

村上, 浩紀
九州大学農学部食糧化学教室

他

<https://doi.org/10.15017/23158>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 28 (3), pp.113-137, 1974-03. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：



5-Methyl-3, 4-dihydroxytetrone の抗腫瘍性

富田 純史・江藤 正義・飯尾 雅嘉

村上 浩紀・大村 浩久

九州大学農学部食糧化学教室

(1974年2月9日受理)

Antitumor Potency of 5-Methyl-3, 4-dihydroxytetrone

YOSHIFUMI TOMITA, MASAYOSHI ETO, MASAYOSHI IIO,
HIROKI MURAKAMI and HIROHISA OMURA

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

抗腫瘍性食糧成分の検索においてレダクトン類が注目された(村上・山藤, 1968; 1969a; 1969b; 山藤・村上, 1968; 山藤ら, 1970). とくにアスコルビン酸(AA), デヒドロアスコルビン酸(DAA)および2,3-ジケトグルコン酸(DKG)の効果が確認されたことは, そのビタミンC効果と関連して興味深くまた重要である(中村, 1968; 中村・山藤, 1968; 山藤ら, 1971). さらにAA関連物質としてエリソルビン酸(EA), デヒドロエリソルビン酸(DEA)あるいはAAパルミチン酸エステル(AA-Palm)なども有効であることが明らかにされている(富田ら, 1973). これらはいずれも分子内のエンジオール構造ないしその酸化型が中心的役割を演じていると推定されるものであつて, たとえばDAAをオルソフェニレンジアミン(OPD)と縮合させてその基本構造をブロックすると抗腫瘍効果は消失する. 従つて少なくともエンジオール基を含むレダクトン類に抗腫瘍性物質の検索を指向することは, 理論的にも妥当なものであると推定される.

AAはビタミンCとして栄養上不可欠のものであつて食品から摂取しなければならない. さらにAAは食品の加工貯蔵において, ビタミンCの強化だけでなく, 抗酸化剤などとして品質の保持にも広く利用される. しかしAAは変化しやすく, 種々の経路で分解されるが, その1つとしてFig. 1に示すようにDAA, DKG, キシロソンからL-pentose reductone(レダクトンC), 2,3,4-trihydroxypent-2-enoic acid(レダクトンB), 5-methyl-3,4-dihydroxytetrone(レダクトンA; MDT)を経由するものがある. Has-

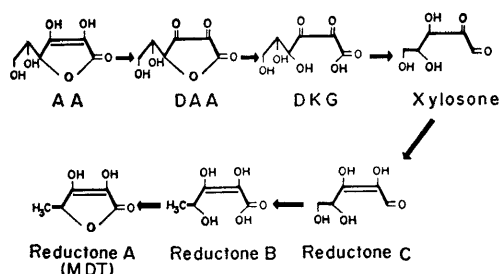


Fig. 1. Degradation of ascorbic acid.

selquist (1955) は DAA を分解して生ずる aci-レダクトンⅢは MDT であることを認めた. 一方, 神谷 (1959 a, b) は DAA を 5%有機酸溶液中で加熱し, 2種のレダクトン, すなわち, 2,3,4-trihydroxypent-2-enoic acid およびそのラクトンMDTを検出した. 他方, 中村 (1972) は AA 関連物質のデオキシリボ核酸分解作用の試験において, DAA ないし DKG 溶液が還元性を増加し, とくに Cu^{2+} により促進されることを Tillman 試薬により確かめた. またこの場合, 2,3のレダクトンが生成することを薄層クロマトグラフィーにより認め, DAA ないし DKG の DNA に対する粘度低下作用は反応初期に生成するレダクトン類によつて行なわれることを推定した.

そこで AA 関連物質の抗腫瘍性をさらにレダクトンの立場から確実にするため, MDT に着目し, その抗腫瘍性を試験した. これは AA の分解によつて生成する1つのレダクトンであつて, しかもラクトン環を有し, AA に近い構造を持つている.

本研究に際し種々御教示頂いた本学野村男次教授に深く感謝申し上げます。

実験方法

ペーパークロマトグラフィー 東洋濾紙 No. 51 を用い室温上昇法によりブタノール・酢酸・水 (4:1:1) で展開, 乾燥後 2,6-ジクロロフェノールインドフェノールにより検出した。

紫外線吸収スペクトル MDT 水溶液 (20 μ g/ml) を常法により 島津 マルチ パーパス 自記分光光度計 MPS-50 型によって測定した。

赤外線吸収スペクトル 赤外線分光光度計ベックマン IR-20 型で KBr 錠剤法によって測定した。

抗腫瘍性 腹水型として常時保存してきた腫瘍 Sarcoma 180 の腹水をリンゲル液で適宜稀釈し, その 0.2 ml (細胞数 5×10^5) を生後 4 週, 体重約 20 g の ddN 雄マウスの右腋窩部に注入移植して固型化した。移植翌日から一定期間 MDT を投与し, 屠殺して腫瘍重量を測定して抗腫瘍効果を求めた。なお必要に応じ試験期間中のマウスの体重および腫瘍の直径も測定した。MDT は 0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 5.7) で緩衝化したリンゲル液に適宜溶解し, その 0.2 ml を投与した。

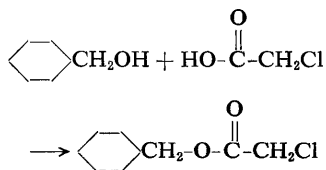
実験結果および考察

1. MDT の調製

MDT はレダクトンの 1 種であつて反応性に富み貯蔵にも問題があるので, 比較的容易に調製できることが必要であり, また抗腫瘍性の試験には比較的多量の試料を要する。そのためこの立場から, benzyl benzoyl glycolate と ethyl benzoyl lactate の Claisen 縮合による合成法 (Micheel-Haarhoff, 1940) と, DAA を硫酸中で分解させて調製する方法 (Euler-Hasselquist, 1955) について検討した。

a) 合成法

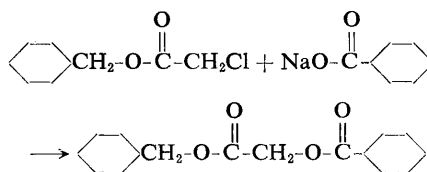
(i) Benzyl monochloroacetate の合成



54 g monochloroacetic acid と 54 g benzyl alcohol とを混合後温浴中で溶解, 乾燥塩化水素ガスを常温で約 30 分間通じて飽和させる。これを温浴中で約 2 時間加熱したのち冷水中に投入, 十分攪拌したの

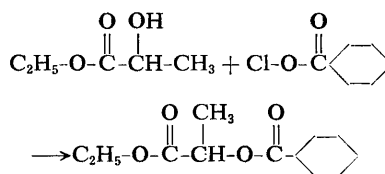
ち放置した。エーテルで抽出し, エーテル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後エーテルを溜去, 残った粗エーテルを 3~4 mmHg で分画蒸溜し, 106°C/3 mmHg の画分を集めた。収量 47.5 g。

(ii) Benzyl benzoyl glycolate の合成



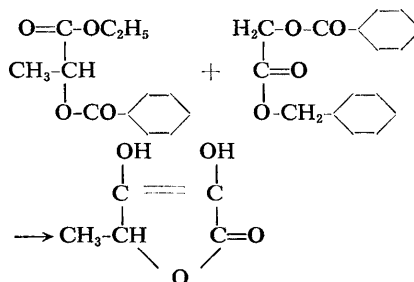
無水アセトン中に 36.9 g benzyl monochloroacetate, 29 g 安息香酸ナトリウム, 3 g ヨウ化ナトリウムを懸濁させ, 48 時間煮沸還流, 生成した塩化ナトリウムを濾別し, 濾液を減圧濃縮, これに白濁するまで水を加えると油状物が析出した。放置して生ずる固化物をアセトンおよび水から再結, 収量 26 g, 融点 57°C (文献 59~60°C)。

(iii) Ethyl benzoyl lactate の合成



27 g benzoyl chloride と 27 g ethyl lactate とをナス型フラスコ中で混合し, 油浴中 170°C で 2 時間加熱, 放冷後 100 ml クロロホルムを加えて抽出した。クロロホルム層を 100 ml 10% 塩酸で 2 回, 100 ml 5% 水酸化ナトリウムで 2 回, 100 ml 2% 塩酸で 1 回洗滌した後, さらに蒸留水で中性になるまで洗滌した。ついで塩化カルシウムで乾燥した後, クロロホルムを溜去した。残存部分を 3 mmHg 減圧下に蒸溜し, 119°C の画分を集めた。収量 23 g。

(iv) MDT の合成



10 mg benzyl benzoyl glycolate と 8.3 g ethyl benzoyl lactate とを乾燥ベンゼン 100 g に溶解し, 窒素ガスを導入しながら攪拌, 90~95°C に徐々に加

熱しながら金属カリウム 3.62 g を少量ずつ投入した。約 1 時間半攪拌するとカリウムは溶解しカリウムエチレートが析出した。これに無水エタノール 100 ml を少量づつ加え 2～3 時間煮沸、氷水で冷却後強く攪拌しながらカリウムと等量の 2N 硫酸を滴加、分液ロートで水-エタノール層をとった。ベンゼンで数回洗滌後、水層を酢酸エチルで抽出、無水硫酸ナトリウムで脱水乾燥、濾液を減圧濃縮し、少量のエチルエーテルで抽出、抽出液を減圧濃縮したのち、 -16°C に放置して MDT を晶出させた。得られたものは D 型、L 型の混合物である。収量 130 mg。

b) 分解法

5.28 g AA を 30 ml 水に溶解、3.3 g *p*-ベンゾキノンを 100 ml エチルエーテルに溶かしたものと混合し、10 分間振盪して反応させた後、過剰のキノンや生成したハイドロキノンをエーテルで抽出除去した。得られた DAA 水溶液に（必要に応じて濃縮後）等容の 2N 硫酸を加えて、 90°C で 1～2 時間加熱した。食塩で飽和した後ベンゼンで生成不純物フラン-2-カルボン酸を抽出除去した。ついで水層から酢酸エチルで MDT を抽出し、無水硫酸ナトリウムで脱水乾燥、濃縮して -16°C に約 1 週間放置すると MDT が晶出した。収量 60 mg～100 mg。

c) MDT 標品の比較

上記合成法および分解法によつて得た標品の赤外線吸収スペクトルを Fig. 2 に示すが、両標品は完全に一致し、AA のものに類似した。3380, 1290 cm^{-1} :

Table 1. Some properties of MDT.

MDT		a	b	literature
λ_{max}	(m μ)	257	257	257.5
m. p.	($^{\circ}\text{C}$)	170	175	175
analysis	C (%)	46.19	46.41	46.16*
	H (%)	4.77	4.85	4.61*

* Calculated value

MDT: The same as in Fig. 2.

水酸基; 1730, 1620: ラクトン環; さらに紫外線吸収極大波長、融点および元素分析値もほぼ等しく、文献値ないし計算値と一致し (Table 1), またペーパークロマトグラフィーによる Rf 値も一致した (Fig. 3). 従つて研究にはいずれの標品を用いても差支えないと思われるが、容易にしかも多量に調製するため、主として分解法を採用した。

なお、この MDT 水溶液は不安定であつて、室温に放置するとかなり速やかに変化することが、経時的に測定した紫外線吸収スペクトルの吸収極大の低下から観察された (Fig. 4). この場合 DAA 分解法により調製した MDT 標品が多少速やかに変化するようであつた。

2. MDT の抗腫瘍性

富田ら (1973) の AA 関連物質についての試験と比較のため、それと同様な条件で抗腫瘍性を求めた。すなわち、85 mM MDT 溶液を調製し、その 0.2 ml (MDT 2.3 mg (0.017 m moles)) を腫瘍細胞の移

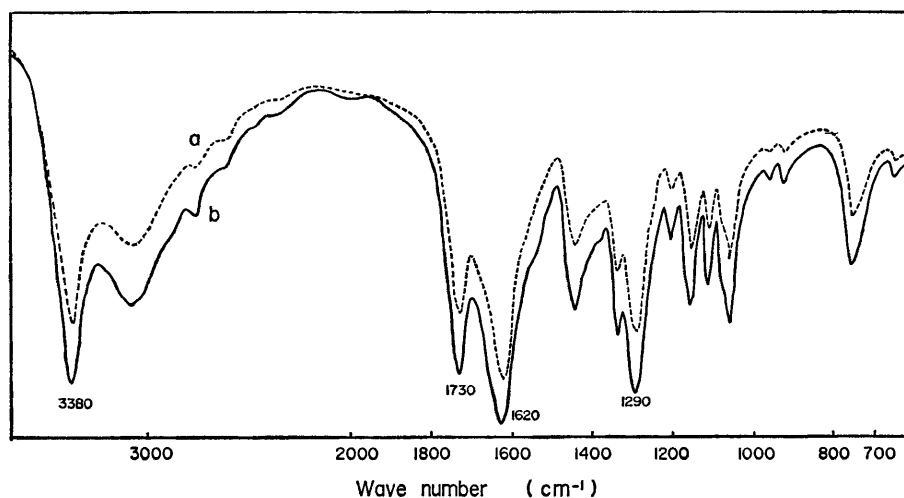


Fig. 2. IR spectrum of MDT. a: MDT was prepared by the condensation method from benzylbenzoylglycolate and ethylbenzoyllactate. b: MDT was prepared by the acid degradation method from dehydroascorbic acid.

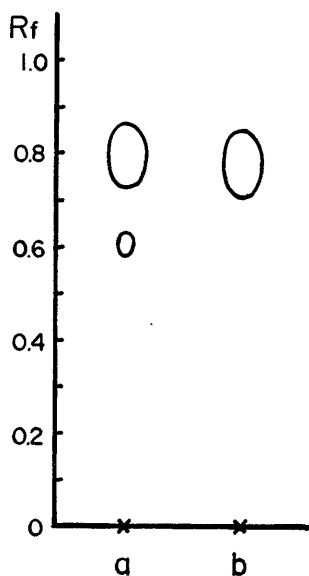


Fig. 3. Paper chromatogram of MDT. Paper: Toyo No. 51. Ascending method. Solvent: Butanol-acetic acid-water (4:1:1). Detection: 2,6-Dichlorophenolindophenol.

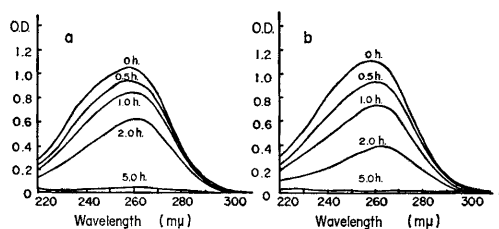


Fig. 4. Variation of UV spectrum of MDT solution. Aqueous solution of MDT (20 μ g/ml) was kept at room temperature for different hours indicated. MDT: The same as in Fig. 2.

植翌日から毎日1回、9日間投与し、17日目に屠殺し腫瘍重量を測定した。なお、試験期間中に適宜マウスの体重および腫瘍の大きさをも測定した。

抗腫瘍性を Table 2 に示すが、供試条件において MDT による 50% 程度の抑制率が認められた。これに応じて Fig. 5 に示すように、MDT 投与区における腫瘍の増殖は対照区のものに比べて低かった。また体重の増加も若干抑えられる傾向が認められた。

DAA やカテコールアミン類の抗腫瘍性は微量の Cu^{2+} を加えることにより増強されることがしばしば観察された。そこで MDT 溶液にその濃度の 1/50、すなわち 1.7mM になるよう硫酸銅を同時に溶かし試験に用いた。従って硫酸銅は 55 μ g (0.34 μ moles)

Table 2. Antitumor potency of MDT.

Mouse No.	control		MDT	
	body weight (g)	tumor weight (g)	body weight (g)	tumor weight (g)
1	41.5	6.8	35.2	5.2
2	26.8	6.5	27.6	4.1
3	26.4	6.2	35.1	4.0
4	37.7	5.6	35.6	2.8
5	33.2	3.9	35.0	2.8
6	40.4	3.9	27.7	2.1
7	27.0	3.5	30.9	1.2
8	37.9	3.3	18.7	1.0
9	29.1	3.0	32.1	0.8
10	36.1	2.9	29.3	0
Average $\pm$ S.E.	33.6 $\pm$ 1.9	4.6 $\pm$ 0.5	30.7 $\pm$ 1.7	2.4 $\pm$ 0.5
Inhibition (%)			47.5	

Antitumor potency was principally assayed as follows using mouse sarcoma-180 and 10 male ddN-mice of 4 weeks old in each group. MDT (b in Fig. 2) was dissolved in Ringer's solution at room temperature (final conc. 85 mM) and 0.2 ml (containing 2.3 mg or 0.017 m moles MDT) were subcutaneously injected once a day for 9 times from the next day after implanting sarcoma-180. In the control, Ringer's solution was injected instead of MDT solution. On the 17th day, tumor was weighed in all groups.

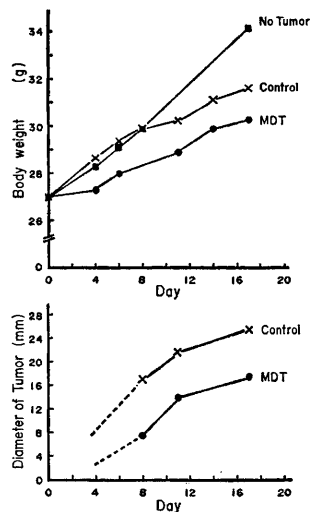


Fig. 5. Increment of body weight of mouse and tumor by MDT administration. The same as in Table 2.

宛投与された。

腫瘍細胞移植翌日から毎日1回、10日間投与し、15日目に判定した結果を Table 3 に示す。MDT の

抗腫瘍性に対する Cu^{2+} の促進効果はほとんど認められず、むしろ若干低下させるようにも思われる。

この場合 MDT 溶液は室温で調製したものであった。従つて、MDT が水溶液中でかなり分解しやすいために、このような結果を生じたと推定される。そこで供試溶液を十分に氷冷しながら注意して調製し、直ちに試験した。この場合も毎日 1 回、10 日間、計 10 回投与したが、効果の判定は 19 日目に行つた。Table 4 に示すように、MDT を単独に投与した場合には 30 % 程度の低い抑制効果が認められるに過ぎなかつたが、 Cu^{2+} を同時に投与するとその効果がかなり高め

られることがわかつた。

なお、この間の体重変化を Fig. 6 に示すが、MDT の投与により約 1 週間後から体重の増加が抑えられ、動物体にかかなり悪い影響を及ぼすことが観察された。

このような動物試験においては、投与された薬物は生体内で作用部位に到達し、そこで機能を発揮することが必要である。MDT 自体非常に不安定であるので、その作用本体については明らかでない。しかし MDT の変化をできるだけ避けながら投与した場合、その効率が Cu^{2+} により促進されること、MDT の変化を特別に配慮せず室温で供試溶液を調製した場合、

Table 3. Effect of Cu^{2+} on antitumor potency of MDT solution dissolved at room temperature.

Mouse No.	control		MDT		MDT + Cu^{2+}	
	body weight, (g)	tumor weight, (g)	body weight, (g)	tumor weight, (g)	body weight, (g)	tumor weight, (g)
1	37.0	9.5	26.2	6.3	35.4	6.3
2	33.2	9.2	30.0	4.6	34.7	5.3
3	37.0	8.7	31.0	4.2	25.3	4.5
4	28.1	8.5	32.6	4.1	30.1	4.0
5	32.7	8.0	24.8	2.8	26.5	2.9
6	32.4	7.3	28.2	2.7	28.3	2.8
7	32.3	7.2	28.6	2.6	30.0	2.4
8	33.5	5.6	32.2	1.9	35.3	2.1
9	31.9	5.5	29.1	1.3	24.7	2.0
10	32.2	4.0	29.6	1.0	—	—
Average $\pm$ S.E.	33.0 $\pm$ 0.8	7.4 $\pm$ 0.6	29.2 $\pm$ 0.8	3.2 $\pm$ 0.5	30.0 $\pm$ 1.4	3.6 $\pm$ 0.5
Inhibition (%)			57.3		51.2	

Test solutions (85 mM MDT and 85 mM MDT + 17 mM CuSO_4) were prepared by dissolving them in Ringer's solution at room temperature. Antitumor potency was assayed as in Table 2 with some modifications. Administration of MDT: 2.3 mg (0.017 m moles) MDT or 2.3 mg (0.017 m moles) MDT + 55 μg (0.34 μ moles) CuSO_4 . Injection of the reagent was conducted for 10 times and antitumor potency was assayed on the 15th day.

Table 4. Effect of Cu^{2+} on antitumor potency of MDT solution dissolved in the cold.

Mouse No.	control		MDT		MDT + Cu^{2+}	
	body weight, (g)	tumor weight, (g)	body weight, (g)	tumor weight, (g)	body weight, (g)	tumor weight, (g)
1	43.2	9.1	36.9	8.2	32.3	4.6
2	37.9	7.4	35.7	7.3	26.4	2.9
3	31.8	4.4	27.7	3.5	27.5	1.8
4	28.7	4.2	23.0	3.0	26.5	1.2
5	26.1	4.0	31.4	2.6	25.4	0.3
6	37.2	3.0	28.3	1.0	28.0	0.3
7	30.2	2.9	19.3	1.0	23.6	0.1
8	25.4	0.5	29.6	0.6	25.5	0.1
9	—	—	27.9	0.5	—	—
10	—	—	—	—	—	—
Average $\pm$ S.E.	32.6 $\pm$ 2.2	4.4 $\pm$ 1.0	28.9 $\pm$ 1.9	3.1 $\pm$ 1.0	26.9 $\pm$ 0.9	1.4 $\pm$ 0.6
Inhibition (%)			30.3		68.2	

Test solutions (the same as in Table 3) were prepared by dissolving them in Ringer's solution in the cold. Antitumor potency was assayed as in Table 3, but on the 19th day.

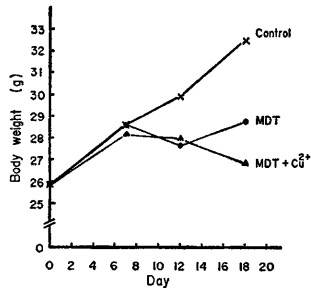


Fig. 6. Increment of body weight of mouse by MDT+Cu²⁺ administration. The same as in Table 4.

MDT 単独でもある程度の効果を示すが、Cu²⁺ 共存によりかえって効果が低下する傾向があることなどから、MDT が酸化などによつて変化する過程で比較的に早く生ずる物質あるいはラジカルが腫瘍の増殖を抑制すると推定される。いずれにしても、薬品の安定性や動物体そのものに及ぼす影響などに問題があり、さらに効率においても DAA などには及ばないが、少なくとも MDT も多少の抗腫瘍性を示すことは明らかである。従つてレダクトン類を中心に抗腫瘍性物質を検索しようとするわれわれの研究方向は、一応妥当なものであると考えられる。

総 括

5-Methyl-3,4-dihydroxytetrone すなわちレダクトン A の調製について、benzyl benzoyl glycolate と ethyl benzoyl lactate の縮合による合成法と DAA からの硫酸分解法とを比較検討した。その結果、いずれの方法でも差支えないが、容易にしかも多量の調製を必要とする研究の目的上、主として後者を採用した。

ついで 5-methyl-3,4-dihydroxytetrone のマウス固形腫瘍 Sarcoma 180 に対する抗腫瘍性を試験した。5-Methyl-3,4-dihydroxytetrone は不安定であるので氷冷下に供試溶液を調製し、2.3 mg 宛、1 日 1 回、計 10 回投与することにより、約 30 % 程度の抗腫瘍性が認められるに過ぎなかったが、微量の Cu²⁺ の共存により効率は高められた。一方室温で調製投与すると 50 % 程度の抗腫瘍性を示したが、Cu²⁺ の効果

は認められなかった。

文 献

- Euler, H. und Hasselquist, H. 1955 Entstehung von aci-Reduktonen. *Arkiv Kemi*, **8**(8): 67-72
- Hasselquist, H. 1955 Isolierung von aci-Reduktonen und Derivaten derselben. *Arkiv Kemi*, **8**(38): 381-386
- 神谷真太郎 1959 a L-アスコルビン酸の褐変分解 (その 1). *農化*, **33**(5): 398-402
- 神谷真太郎 1959 b L-アスコルビン酸の褐変分解 (その 2). *農化*, **33**(5): 402-406
- Micheel, F. und Haarhoff, H. 1940 Eine neue Synthese von Reduktonen. *Lieb. Ann. Chem.*, **545**(1): 28-32
- 村上浩紀・山藤一雄 1968 リグニンの制癌作用. *九大農芸誌*, **23**(3): 103-111
- 村上浩紀・山藤一雄 1969 a 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. *九大農芸誌*, **24**(1): 13-17
- 村上浩紀・山藤一雄 1969 b ポリフェノール類の制癌作用. *九大農芸誌*, **24**(1): 19-24
- 中村泰彦 1968 L-アスコルビン酸酸化物の制癌作用および DNA との反応. *佐賀女短大紀要*, **3**(1): 11-28
- 中村泰彦 1972 デヒドロアスコルビン酸のデオキシリボ核酸分解作用. *佐賀女短大紀要*, **6**(1): 1-15
- 中村泰彦・山藤一雄 1968 アスコルビン酸酸化物の制癌作用. *九大農芸誌*, **23**(3): 119-125
- 富田純史・大村浩久・中村泰彦 1973 アスコルビン酸関連物質の腫瘍抑制効果. *日本栄養食糧学会第 27 回大会講演要旨集* (42), 1973 年 5 月 17 日 (東京)
- Yamafuji, K. and Murakami, H. 1968 Antitumor Potency of Lignin and Pyrocatechol and Their Action on Deoxyribonucleic Acid. *Enzymol.*, **35**(3), 139-153
- Yamafuji, K., Murakami, H. and Shinozuka, M. 1970 Antitumor Activity of Dopa, Dopamine, Noradrenalin or Adrenalin and Their Reaction with Nucleic Acids. *Z. Krebsforsch.*, **73**(4), 195-203
- Yamafuji, K., Nakamura, Y., Omura, H., Soeda, T. and Gyotoku, K. 1971 Antitumor Potency of Ascorbic, Dehydroascorbic or 2, 3-Diketogulonic Acid and Their Action on Deoxyribonucleic Acid. *Z. Krebsforsch.*, **76**(1), 1-7

Summary

5-Methyl-3,4-dihydroxytetrone (MDT) was prepared by condensation of benzyl benzoyl glycolate with ethyl benzoyl lactate. The former had been synthesized from monochloroacetic acid and benzyl alcohol through benzyl monochloroacetate. The latter had been prepared from benzoyl chloride and ethyl lactate. On the other hand, MDT was prepared by degradation of dehydroascorbic acid with sulfuric acid started from *p*-benzoquinone treatment of ascorbic acid. By elemental analysis and comparison of some properties such as UV and IR spectra, melting point and R_f value, difference was not observed in the both preparations. For the purpose of easy and efficient preparation of MDT in the present study, therefore, the method preferred to the degradation of dehydroascorbic acid.

Then, antitumor potency of about 50 % against sarcoma 180 of mouse was shown by subcutaneous injection of MDT. Some retardation of growth of mouse was also incidentally observed. When injecting solution of MDT had been prepared at room temperature, effect of Cu²⁺ on the antitumor efficiency was not indicated. On the contrary, the quite low efficiency was estimated by administering MDT solution prepared in the cold. In this case, however, the efficiency was enhanced by injecting MDT with a small amount of Cu²⁺.