

ニトロ化リグニンスルホン酸の腫瘍抑制作用

村上, 浩紀
九州大学農学部食糧化学教室

村上, 進
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/10.15017/23190>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 29 (4), pp.179-186, 1975-03. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：



ニトロ化リグニンスルホン酸の腫瘍抑制作用

村上浩紀・村上 進・大村浩久

九州大学農学部食糧化学教室

(1975年1月17日受理)

Antitumor Potency of Nitrated Lignin Sulfonate

HIROKI MURAKAMI, SUSUMU MURAKAMI
 and HIROHISA OMURA

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

リグニンスルホン酸は亜硫酸パルプ (sulfite pulp: SP) 法によってパルプを製造する際に副産物として得られるパルプ廃液の主成分である。

SP 法はそのパルプ廃液の COD, BOD, SS の負荷が大であるので、漂白、薬液の回収技術の進歩した KP (kraft pulp) 法に置きかえられつつある。しかし、SP 法について薬液の回収、河川汚濁防止への努力も続けられており、日本林業年鑑 (1973) によれば、昭和46年度のわが国パルプ生産量の約4%に相当する37.5万トンが SP 法によって製造されている。この SP 廃液は固形分換算でパルプ生産量の約1.3倍であり、したがって約49万トンに達する。このうち、46~54%がリグニンスルホン酸塩であり、その他、44~52%の糖類などの有機物、2%の無機化合物である。

このように尨大な量のパルプ廃液の有効利用は未利用資源の高度活用や公害防止の面からきわめて重要である。パルプ廃液利用については多くの開発努力がなされてきた。しかし未利用のまま廃棄する場合も多く、その有効利用法の開発が期待されている。著者らはすでにリグニンスルホン酸が抗腫瘍能を有することを明らかにしており、その利用法の新しい一面について追究してきた。本報ではリグニンスルホン酸のニトロ化がその抗腫瘍能に与える影響について検討を加えた。

実験方法および結果

1. リグニンスルホン酸のニトロ化

広葉樹リグニンスルホン酸 (LSA: 山陽国策パル

プ製) 20 g に 20 ml の濃硝酸を氷冷下で滴下し、LSA を溶解させ (a 法)、あるいはこれにさらに 25 ml の水冷濃硫酸を徐々に添加して (b 法)、ニトロ化をおこなった。このうち、Fig. 1 に示すように、室温に一夜放置し、冷エタノール 300 ml を加えた。生成した黄色沈殿を 3,000 rpm, 5 分の遠心分離により

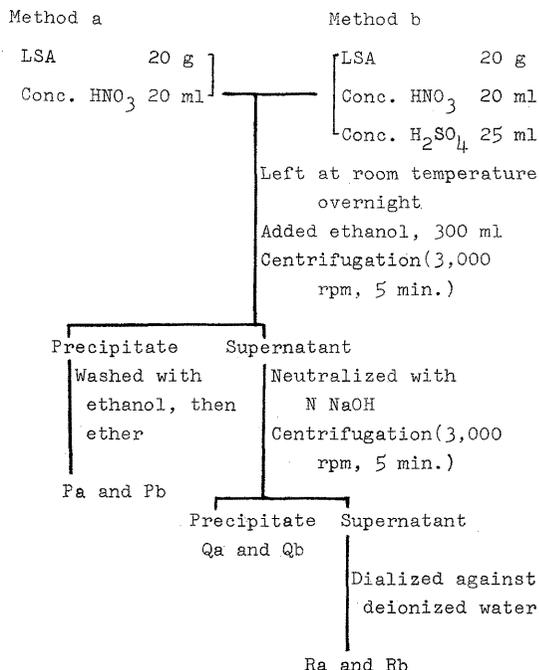


Fig. 1. Preparation of nitrated products by methods a and b.

集めたのち、冷エタノール、エーテルで順次洗浄し、乾燥した (Pa, Pb). なお, Pb は Pa にくらべて水に対する溶解度がやや低かった. 冷却した上澄を攪拌しながら, これに 1N の冷 NaOH 溶液を滴下して中和した. このとき生じた沈殿を遠心して集めた (Qa, Qb). さらにこの遠心上澄を脱イオン水に対して透析して脱塩したのち, 濃縮乾燥した (Ra, Rb).

2. ニトロ化物のゲルろ過

Sephadex G-50 (1.8 cm×110 cm) でニトロ化物のゲルろ過をおこなった. 分画は 5 ml/tube, 50 ml/hr で実施し, 添加量はいずれの試料も 5 mg/ml 水溶液 3 ml とした. ニトロ化物の検出は 400 nm の吸光度でおこなった.

a) Pa, Pb Fig. 2 に示すように, ニトロ化処理をしない LSA をゲルろ過すると, 分画番号 10 から高い吸光値を示す部分が流出しはじめる. 分画時間が経過するにつれて, 流出液の吸光値は漸減するが, 18 番目から再び吸光値が上昇しはじめ, 20 番目に強いピークがあらわれる. ついで 23 番目までには LSA の全吸光値のほぼすべてが流出する. Pa は LSA の流出開始と同時に流出しはじめ, 同じく 23 番目までにその吸光値のほとんどがゲルから脱離する. このことから Pa は LSA と同様の分子量分布を示すことがわかる. おのおのの構成分子種の存在割合は LSA と Pa では明らかにことになっており, Pa の吸光値は流出開始直後からもつとも大で, 以後, 減少するのみである. しかし, そのゲルろ過パターンから 15 および 20 番目に肩が認められ, 最初に流出する部分を含めて, 分子量の大きい順に Pa-1, Pa-2 および Pa-3 の三分面に細分することができる. これらの部分を集め, 再クロマトにより他の成分の混入を除いたのち, それぞれを窒素分析, 吸収スペクトルの観測に用いた. 腫瘍抑制試験は必要量の確保が可能であった Pa-1 についてのみ実施した. Pa は LSA および Pa にくらべ遅く流出しはじめ, 最初の流出は 13 番目であった. そのクロマトグラムから, このものは 15 番に主ピークと 39 番目に低いピークをもつ二成分に大別できる. いずれにしても, Pa は Pa にくらべより低分子部分までその分子量が分布しており, これは方法 b が方法 a よりもニトロ化の条件が強くと, LSA の酸化分解が高度に進行したことによると考えられる. なお, Pb は上記のように二成分に大別できたが, 後流出部は分量が得られなかつたので, 以下の諸試験にはこれらを分別することなく用いた.

また, Fig. 1, 2, 3 の全吸光値はおのおのの試料

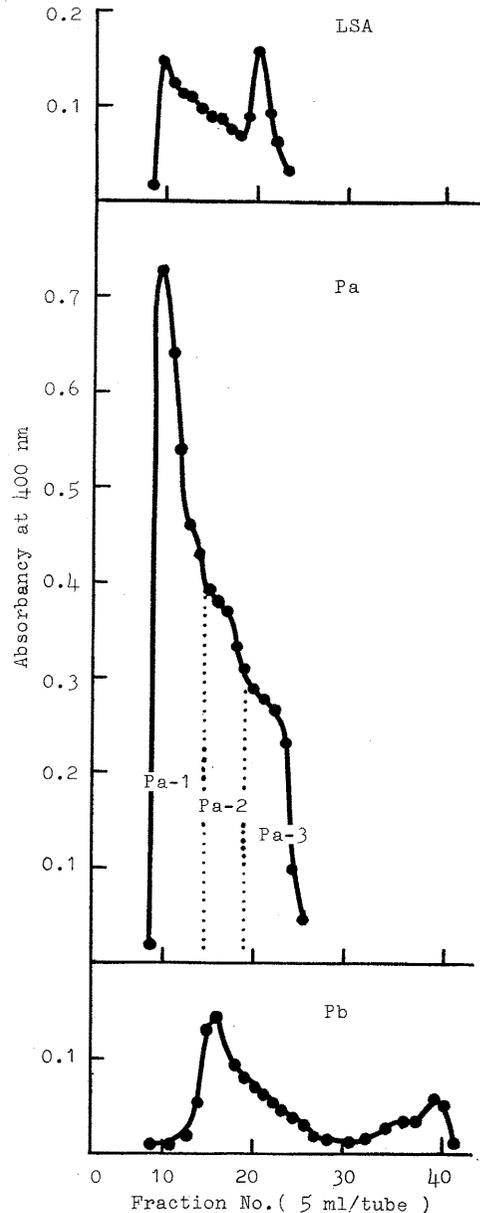


Fig. 2. Sephadex G-50 column chromatogram of LSA, Pa and Pb. Five mg each sample dissolved in 3 ml deionized water, was charged on a column (1.8 × 110 cm). Flow rate was 50 ml/hr. The material eluted was detected by the absorbance at 400 nm. Pa was further fractionated to Pa-1, Pa-2 and Pa-3 from the chromatogram. Thereafter, they were purified by the rechromatography under the same condition.

によつてことになっており, これは後述するように, ニトロ化反応に伴う各試料の吸光係数の変化を示すもの

である。

b) **Qa, Qb** 方法 a および b による **Qa** および **Qb** のクロマトグラムは Fig. 3 に示すとおりである。 **Qa** は分画番号 10 に小さな鋭いピークを示す物質を含んでいるが、その全吸光値の 93% は 21~32 画分に含まれる。そこで 3, 4 および 5 項にのべる試験をこの部分についておこなった。 **Qb** についてはそのクロマトグラムから、吸光値のモードは 18 番目にあり、全吸光値の約 55% が 17 および 18 番目を合わせたものの中に含まれる。 **Qb** をさらに分画して動物実験に用い

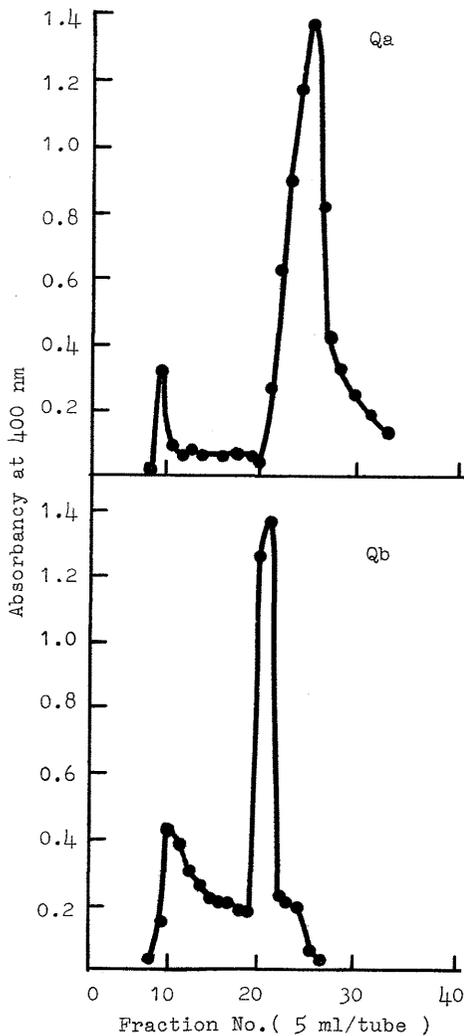


Fig. 3. Sephadex G-50 column chromatogram of **Qa** and **Qb**. Three ml of aqueous solution containing 5 mg each sample was charged on the column, and treated with the same condition depicted in Fig. 2.

ることは量的に困難であつたので、そのまま諸試験に供した。 **Qa** よりも **Qb** がより高分子側に分布しており、 **Pa, Pb** の場合と対照的であつた。

c) **Ra, Rb** Fig. 4 に示すように **Ra** よりも **Rb** の流出がより早く、したがつて **Rb** が **Ra** よりも、より高分子部分を多く含んでいることが推定される。

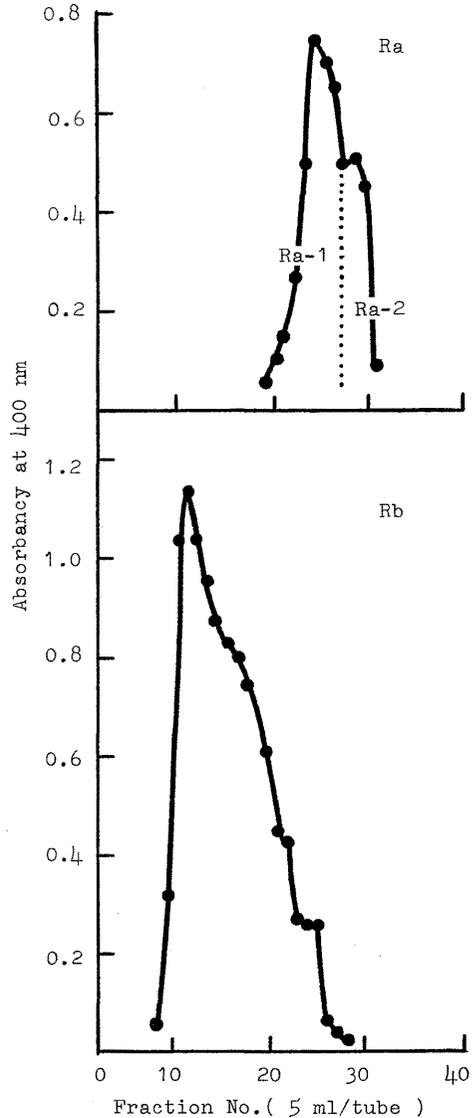


Fig. 4. Sephadex G-50 column chromatogram of **Ra** and **Rb**. Five mg each sample was dissolved in 3 ml of deionized water. The performed was the same as shown in Fig. 2. **Ra** was separated to **Ra-1** and **Ra-2**, then they were purified by the rechromatography.

Ra は 28 番目にクロマトグラムの変曲点があるので、23~27 番および 28~30 番目を別々に集め、再クロマトにより精製した。両者について窒素含量、吸収スペクトルを測定した。Rb はそのクロマトグラムから、分子量的に二ないし三分画の混合物と考えられるが、それらを相互に分離することなく試験に用いた。

3. ニトロ化物の窒素分析値

木材を希硝酸で処理すると、リグニンは一部は酸化されて水溶性の低分子物質になるとともに、他の部分は希アルカリに易溶の窒素化合物、いわゆるニトロリグニンになることが知られている。また単離したリグニンの硝酸処理によつても窒素を含むリグニンを得ることは可能である。一般にニトロリグニン中には数%の窒素含有量が認められており、岡部・八浜 (1955) は赤松脱脂木粉を 3%硝酸、8 倍量とともに 95°C に 3 時間処理し、窒素量、2.52%および 1.49%のものを得ている。これらの窒素のすべてが実際にリグニン分子中のフェニル基にニトロ基として存在しているかどうかについては多くの議論があり、イソニトロソ基、硝酸エステルなどとして存在する場合も多いとされている。実際に上記赤松木粉から得たニトロリグニン中の窒素の約 30%のみがニトロ基であるとされている。

このように硝酸あるいは混酸で処理した LSA 中の窒素量のすべてが、必ずしもニトロ基からなっているわけではないことは容易に推定できるが、窒素含量の測定によつてニトロ基含量のおおよその相対的増減を論ずることはできよう。

Table 1 にニトロ化処理をした LSA の各画分の窒素分析値を示す。LSA は 0.13%の窒素を含むのみであり、このものはニトロ態窒素ではないと考えられる。これに硝酸で処理する方法 a をほどこすと、4.5~2.8%の窒素が導入される。

Table 1. Nitrogen content in LSA and nitrated products.

Sample	Nitrogen (%)
LSA	0.13
Pa-1	4.50
Pa-2	3.69
Pa-3	3.13
Qa	3.39
Pa-1	2.78
Pa-2	3.00
Pb	0.92
Qb	3.07
Rb	3.43

Pa, Qa, Ra について窒素含量を比較すると、それらのうちでもつとも平均分子量が小さい Pa 画分がもつとも多いようであり、Pa 画分中ではもつとも分子量が大きい Pa-1 が最多で、ついで Pa-2, Pa-3 の順であり、Pa 画分中の窒素含量はその分子量の大きさに対応していることがわかる。

一方、方法 b によつては $Rb > Qb > Pb$ の順に含窒素量が大き、方法 a の場合と逆になつている。とくに Pb 画分のそれは 0.92%であり、他のどの画分と比較しても著しく含量が低いことが注目される。

4. ニトロ化物の吸収スペクトル

LSA はその構造中にアルキル (-R) 基、アルコキシル (-OR) 基あるいはフェノール (-OH) 基などで置換されたベンゼン核を含んでいる。このことは、非置換ベンゼンの 260 nm の吸収帯 (primary band) が、Fig. 5 に示すように、LSA では 280 nm 付近に移動し、上記電子供与性置換基の影響をうけていることからわかる。これらの置換基をもち、あるいはアリールケトン基と共役した芳香核は一般に 250~280 nm に極大吸収をもち、その分子吸光係数 (ϵ) は 5,000 から 10,000 程度であることが知られている。このことと LSA の溶液 (mg/ml) の 280 nm の吸光値が約 9 であることから、LSA 中の置換ベンゼン核量は 10~20%であると考えられる。このような LSA にニトロ化反応を適用すると、前述のように種々の形でニトロ基が導入されるが、LSA の吸収ス

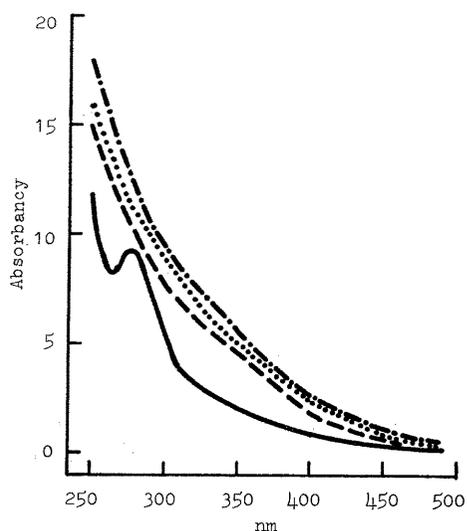


Fig. 5. UV-visible absorption spectra of LSA —, Pa-1 ···, Pa-2 - - - and Pa-3 - - - in mg/ml aqueous solution.

ベクトルに大きな影響をおよぼすのは主として、芳香核に置換結合したニトロ基によるものであると考えられる。きわめて電子吸引性の強いニトロ基が芳香核に結合すると大きな ϵ をもつようになるが、その 200 nm 吸収帯 (secondary band) は可視部近傍まで移行する。Pa-1, Pa-2, Pa-3 などがいずれももとの LSA よりも吸光度が増加し、さらに可視部付近の吸光度が著しく強くなっていることは、これらの試料中に芳香核に結合したニトロ基が存在することを示唆している。ただし、この三種の試料の吸光係数は、これらの窒素分析から得られた窒素量と必ずしも平行関係にあるわけではない。すなわち、窒素含量のもつとも多かつた Pa-1 の吸光度が Pa-2 よりも低い。このことは Pa-1 中にはこのものの芳香核と結合していないニトロ基、あるいはニトロ態以外の窒素が存在していることを示唆している。

Qa, Ra-1, Ra-2 についても、ニトロ化反応によって生じたニトロ基置換ベンゼンの primary band に由来すると思われる 300~350 nm 領域の吸光度の増加が認められる (Fig. 6)。この領域で、Qa は Pa-3 とほぼ同等の吸光値を与えるにもかかわらず、その窒素含量はやや多いことも前述の理由によるものであろう。Qa, Ra-1, Ra-2 はこのようにいずれも LSA にくらべて長波長側で濃色化するが、その程度は Pa-2, Pa-1 にくらべて弱く、さらには 280 nm 付近の吸光度はむしろ LSA よりも低い。このことは硝酸酸化によって芳香核の開裂が一部、生起している可能性を示唆しており、長波長側の吸光度の増加は分解をま

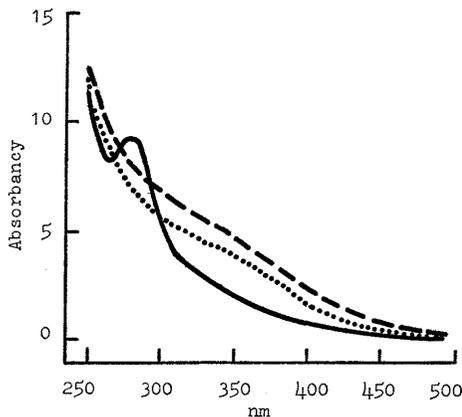


Fig. 6. UV-visible absorption spectra of Qa --- and Ra-1 and Ra-2 ... in mg/ml aqueous solution. The spectrum of LSA — was also referred.

ぬがれたニトロ置換芳香核の大きな ϵ に負うものであろう。ニトロ化に伴う芳香核の分解はより強い条件を用いた方法 b で LSA を処理したときに顕著になってくる。

LSA から方法 b で得られる Pb, Qb, Rb のスペクトルは Fig. 7 のようになり、窒素含量、吸光値とももつとも高い部類に属する Pa に相当する Pb が、これらのいずれについても著しく低く、とくに紫外領域に強い吸収を示さなくなる。これは、この画分中には芳香核の存在がわずかしかないと示している。

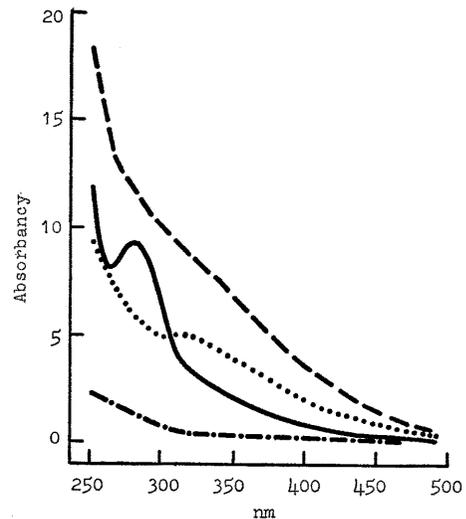


Fig. 7. UV-visible absorption spectra of Pb —, Qb ... and Rb --- in mg/ml aqueous solution. The spectrum of LSA — in the same concentration was shown as a reference.

Qb の吸光スペクトルはほぼ Qa のそれに相当しているが、その窒素含量は Qa のそれの約 88% であった。また、Rb はそのスペクトルが Pa-2 に近似しており、窒素量は Pa-2 のそれの約 92% であった。

5. ニトロ化物の抗腫瘍試験

既報の方法 (村上ら, 1974) で Pa-1, Qa, Pb, Qb, Rb について、それらの抗腫瘍能を試験した。すなわち、Sarcoma 180 腹水型腫瘍を ddN 系雄マウス 10 頭に移植したものを一試験区とし、これらの動物の腹腔内に各反応産物を投与した。腫瘍抑制効果の判定は、対照担がん動物がすべて斃死したときの試験区のマウスの生存数の割合でおこなったが、体重変化、毛並みなどの外観の様相の差異さらには剖検による腹水の有無などの観察結果も参考とした。

a) Pa-1, Qa おおのおを 1 頭につき 2 mg 宛、

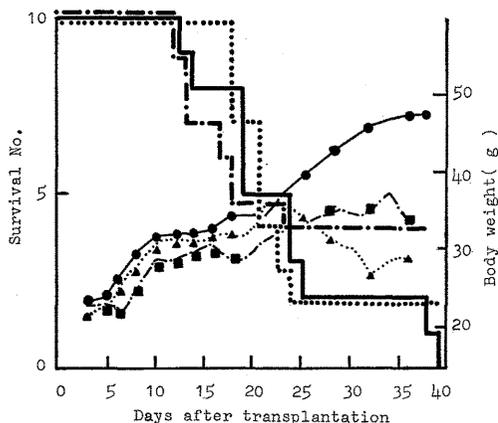


Fig. 8. Effect of nitrated products, Pa-1 and Qa on survival curves and the increase of average body weight in the mice. Survival numbers of Pa-1 injected mice —●—, Qa injected ... and control —. Body weight of Pa-1 injected mice ■---■ Qa injected ▲---▲ and control ●—●.

腫瘍移植翌日から隔日、計3回投与したときの生存日数と平均体重の変化を Fig. 8 に示す。

リグニン製剤の抗腫瘍能の試験の場合は、われわれは通常、隔日7回投与を標準法として用いているが、これらの試料については十分量を得ることが困難であったので、一回投与量を減じて定法の回数投与することはしないで、投与量は従前通りとし、投与回数を減じることとした。

Pa-1 投与区は初期のうちには対照区に比べて若干、早めに腫瘍死する個体があつたが、観察後期になつても生存している個体(4/10)には腹水の貯留が認められず、完治したと判定された。このように試験区の動物の一部は製剤投与にもかかわらず、対照区と同様の経過で斃死し、他の一部は、腹水の貯留速度が部分的におさえられ、延命日数が多くなるのみで、いずれは腫瘍死するといった形式をとらず完治した。このことは、すでに LSA を投与した場合にも認められており、村上ら(1974)はこの現象を LSA の抗腫瘍機構に関連して論じた。完治したと判断される4頭はすべてのが、実験期間を通じて常に腹水の貯留がなかつたわけではなく、そのうちの2頭は腫瘍移植後、腹水の増加がほぼ対照区と同程度に進行していた。しかしながら、この2頭では12日目頃から腹水の減少が観察され、ついには腹腔内に腫瘍細胞の存在を確認することができなくなった。このことは、これらの動物の平均体重の推移にも反映されており、13~20日にか

て腫瘍細胞の増殖がおう盛で、腹水の貯留が著しくなるにつれて、体重が急激に増加した。その後、悪疫質状態の進行により斃死した個体の平均体重への影響がなくなり、あるいは生存している動物にも腹水の貯留が減少するにつれて、生存個体の平均体重は20日目頃に低下した。以後の残存個体の体重増加度は正常マウスのそれと同様であつた。

一方、Qa を投与したときには、2週間経過時までは、腹水の貯留による体重の増加は対照区と同程度に急速であつたが、毛並み、動作などの外観の評価では対照区よりややすぐれているようであつた。しかし、生存日数は対照区と変るところがなく、Qa には延命効果を認めることができなかった。

b) Pb, Qb および Rb これらを1頭宛 2 mg, 7回投与した。ただし、Pb のみは第1回目の投与後に毒性が認められたので、第2回以後、1 mg で試験した。対照区がすべて斃死したときの各処理区の生存数は Fig. 9 に示すように、10頭中 Pb, Qb, Rb でそれぞれ3, 5および6であつた。Pb 区の残存する動物は腹水の増量が著しく、数日後にはいずれも腫瘍死することが推定された。体重の増加度も急激な増加の一途をたどるのみで、減少するなどの傾向はなかつた。

Qb を投与した場合には、8日目までは急速にその体重が増加したが、以後、対照区のそれに比べて、その割合が低下した。ついで、14日目以降はその平

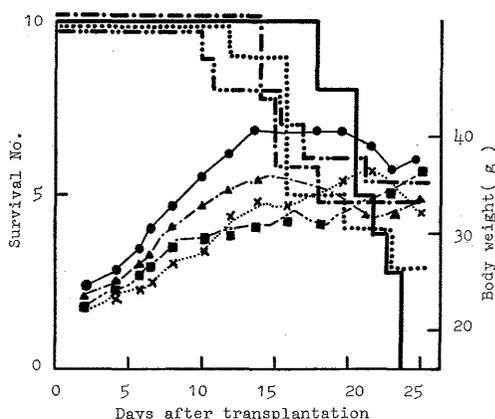


Fig. 9. Effect of Pb, Qb and Rb on survival curves and the increase of average body weight in the mice. Survival numbers of Pb injected mice ... Qb injected --- Rb injected -.- and control — Body weight of Pb injected mice ×—×, Qb injected ▲---▲ Rb injected ■---■ and control ●—●.

均体重が低下しはじめ、貯留していた腹水が減少する傾向にあることがわかる。観察終了時に残存していた動物は、剖検によっても腫瘍細胞を確認することができず、完治したと判定された。

Rb 投与区もまた6頭が生存していたが、これらの個体のほとんどにはかなり大量の腹水があり、Rb は延命効果を示すのみで、これらの動物は結局は腫瘍細胞の増殖によつて斃死するものと判断された。

考 察

LSA の利用の一環として、その抗腫瘍能について検討を加え、広葉樹由来の LSA が担がん動物の延命に著しく効果を示すのみならず、それによつて完治する個体も認められることを明らかにした。

この LSA に種々の処理をほどこして、さらに有効な物質を得る目的で、まず、ニトロ化反応をおこない、得られた数種の画分の抗腫瘍能を試験した。a, b 両法のニトロ化反応ののち、エタノール沈殿、pH 調整ならびにゲルろ過により分別して得られた各反応産物中、Pa-1 および Qb 画分に抗腫瘍能が認められた。とくに Pa-1 についてはその総投与量、回数ともに Pb, Qb あるいは Rb などの場合の半分にもみないことを考慮すると、その延命および治癒効果は顕著であると思われる。ニトロ化の条件がことなると、相当する画分の各性質が著しく変化することが観察された。すなわち、Pa および Pb はいずれもエタノールで沈殿するが分子量、窒素含量、さらには吸光度のいずれも Pb の方が小さく、抗腫瘍能もまったく認められなかった。Qa, Qb については、その平均分子量は Qb が大であるが窒素含量は小である。また、腫瘍抑制能については Qb がより著しいと思われる。

このように抗腫瘍能と分子量、あるいは窒素含量との間には明確な相関は認められなかったが、LSA に適当な条件でニトロ化をほどこすことによつて、さらに有効な物質を得ることができると考えられる。

要 約

パルプ廃液中の LSA の有効利用の一方法として、その抗腫瘍能の増強をはかる目的で、これにニトロ化反応をほどこし、それらを種々の手段で分画して、それらの抗腫瘍能と分子量、窒素含量、吸収スペクトルとの関係について検討を加えた。その結果、

1. 硝酸のみと LSA を混合して得られる Pa-1 および混酸で処理した Qb が有効であり、とくに前者が強い効果を示すようであった。

2. エタノール沈殿で同一挙動を示す Pa-1, Pb, pH 調整で沈殿する Qa, Qb もその分子量、窒素含量、吸光度がいずれも相互にことなっており、またその抗腫瘍能も、Pa-1, Qb のみに認められた。

3. 抗腫瘍能の著しかつた Pa-1, Qb はいずれもかなりの窒素含量を示したが、窒素含量の高いものが、必ずしもその能力にすぐれているわけではなかつた。

文 献

- 村上浩紀・落合千津子・大村浩久 1974 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。九大農芸誌, 28(4): 215-221
 日本林業年鑑 1974 林野弘済会 (東京)
 岡部次郎・八浜義和 1955 ニトロリグニンの還元。工化誌, 58(10): 779-781

Summary

As one of the utilization of lignin sulfonate (LSA) in pulp waste liquor, we attempted to enrich its antitumor potency, which had been confirmed by us. Nitration of LSA was supposed to be one of the means. The nitrated products were fractionated by ethanol precipitation, pH adjustment and gel filtration. Antitumor potency of these fractions were discussed in relation to their molecular weights, nitrogen contents or absorption spectra.

1. Pa-1 which was obtained by the treatment of LSA with nitric acid, and Qb which was a product of nitrating acid-treatment were both effective antitumor substances. Pa-1 was more remarkable on the potency than Qb. Some of survival animals had no ascitic fluid even after death of all tumor-bearing mice of control.

2. Pa-1 and Pb which came into the same fraction by ethanol precipitation and

gel filtration or Qa and Qb precipitated by the same pH adjustment, were different from each other in their molecular weights, nitrogen contents, absorption coefficients and spectra.

3. Fractions which showed higher nitrogen content were not necessarily potent in the activity, however, effective Pa-1 and Qa had fairly high nitrogen content.

4. It was also suggested that more effective antitumor substances might be derived from LSA by suitable chemical modifications.