



Title	ヤエヤマヒルギ樹皮のメタノール抽出画分の生理活性 —細胞毒性，抗腫瘍活性を中心として—
Author(s)	上地, 俊徳; 黛, 宏和; 高橋, 梢; 野原, 敏次; 金城, 一彦
Citation	琉球大学農学部学術報告 = The Science Bulletin of the Faculty of Agriculture. University of the Ryukyus(55): 11-15
Issue Date	2008-12
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/9909
Rights	

ヤエヤマヒルギ樹皮のメタノール抽出画分の生理活性

- 細胞毒性, 抗腫瘍活性を中心として -

上地俊徳*, 黛 宏和, 高橋 梢, 野原敏次, 金城一彦

琉球大学農学部 生物資源科学科

Physiological activities of methanol extracts from the bark of *Rhizophora stylosa* Griff.
- On cytotoxicity and anti-tumor activity -

Shuntoku UECHI*, Hirokazu MAYUZUMI, Kozue TAKAHASHI, Toshitsugu NOHARA
and Kazuhiko KINJO

Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus

Abstract

The anti-tumor and other physiological activities of an extract of the bark of *Rhizophora stylosa* Griff obtained from Iriomotejima Island were investigated in vitro and in vivo. The water-soluble fraction of a methanol extract obtained from air-dried bark was separated by liquid-liquid partition using ethyl acetate. The ethyl acetate fraction was then separated by Sephadex LH-20 column chromatography to obtain methanol:water and acetone:water fractions. We then investigated the cytotoxicity of the four fractions in RAW264.7 cells. Survival rates at the lowest doses of all samples were very high. The effects of three different doses of these fractions on the NO production in LPS-treated RAW264.7 cells were investigated. The cells produced 140 $\mu\text{mol/L}$ of NO in the presence of 40 $\mu\text{g/ml}$ of the ethyl acetate fraction, which was about 1.6-fold more than that produced by control cells incubated with PBS. The ethyl acetate fraction was eluted once again through Sephadex LH-20 using ethanol/methanol, which generated 10 fractions (Fr. 1 through 10). Murine peritoneal macrophages produced more NO when incubated with these fractions than with standard catechin. The ethyl acetate fraction (3 mg/day/mouse) was also administered intraperitoneally to ICR mice bearing sarcoma-180 tumors every other day for about 10 weeks. Although the survival of the mice did not significantly increase, tumor metastasis and volume tended to be suppressed.

The ethyl acetate fraction of *Rhizophora stylosa* Griff increased NO production in RAW264.7 cells and in murine peritoneal macrophages, and suppressed the metastasis and proliferation of sarcoma-180 tumor cells. These findings suggest that this fraction contains useful immunoregulators.

キーワード: ヤエヤマヒルギ, ICR 担癌マウス, 抗腫瘍活性

Key words: *Rhizophora stylosa* Griff, tumor-bearing ICR mice, Anti-tumor activity

緒言

本邦には約 20 種類のマングローブ (Mangroves) が分布し, 沖縄地方にはそのうちの 11 種が分布しているとされ, そのなかでもヒルギ科のオヒルギ (*Bruguiera gymnorhiza* (L.) Wurmb.), メヒルギ (*Kandelia candel* (L.) Druce) およびヤエヤマヒルギ (*Rhizophora stylosa* Griff) が代表的な構成種としてあげられる. マングローブの用途は多様で, それぞれの樹種の特性を活かして燃料, 飼料, 染料および用材などに部分利用されている. マングローブに

は殺虫 1), 抗 HIV 2), 抗酸化および抗菌などの生理活性が知られ, 抗腫瘍活性についての報告 3) も散見されるが不明の点が多い.

本研究では, 沖縄地方のマングローブ構成樹種の中から, 環境からの様々な外的ストレスに対し植物生体防御能を有するタンニンの含有量が比較的高いとされるヤエヤマヒルギに着目した. 今回, ヤエヤマヒルギのメタノール抽出物やその分画画分について培養細胞系および動物実験により抗腫瘍活性等を調べ, 若干の知見を得たのでその成績を報告する.

*Corresponding author (E-mail: uechis@agr.u-ryukyu.ac.jp)

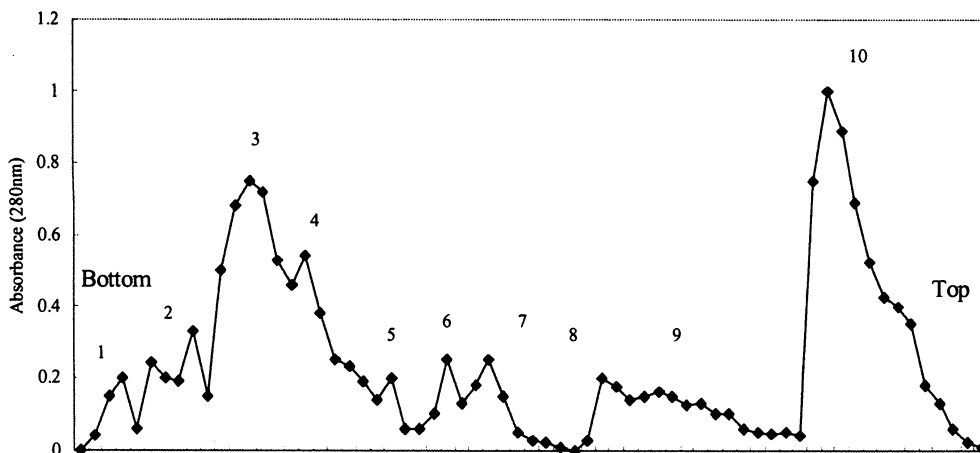


Fig.1 Elution profile of ethyl acetate fraction on Sephadex LH-20 column chromatography.

材料および実験方法

1. 供試材料および試料の抽出と分画

実験には 2006-2007 年に沖縄県西表島で採取したヤヤマヒルギを用いた。

採取した樹皮を風乾後ウイレー氏粉碎器により粉末とし、粉末 1 キログラムにメタノール 4 リットルを加え、室温で約 1 週間浸漬・抽出した。この抽出液を濾紙でろ過後、減圧濃縮により黒褐色のメタノール抽出物を得た。これを蒸留水に溶解し、酢酸エチルで液・液分配して酢酸エチル画分を分取した。また、酢酸エチル画分を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーに付し、メタノール：水 (1:1, v/v) 画分およびアセトン：水 (1:1, v/v) 画分を得た。これら 4 試料の減圧濃縮画分を、用に臨み所定の溶媒に溶解して、*in vivo* および *in vitro* 毒性試験や抗腫瘍試験などに用いた。また、酢酸エチル画分を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーに付し、エタノール・メタノールで溶出させて 10 画分 (Fig.1) に細分画し、各フラクションがマウス腹腔マクロファージの NO 産生に及ぼす影響などを調べた。

2. マウス毒性および細胞毒性試験

正常マウスを用いて前記 4 試料について若干の毒性評価を行った。ICR 雄性マウス (7 週齢, 日本チャールズ・リバー株式会社) を購入し、予備飼育後供試した。投与液を調製するにあたって、メタノール抽出物およびメタノール：水溶出画分は生理的食塩液で、酢酸エチル画分とアセトン：水溶出画分はエタノール+生理的食塩液 (1:15, v/v) の混合溶媒 (Vehicle) に溶解した。1 つの試料について 10 および 30mg/ml の 2 濃度を調製した。これを 0.1ml/マウス/日で約 2 週間にわたって腹腔内に隔日投与した。投与液は直前に濾過滅菌 (0.20 μ m, アドバ

ンテック社) した。2 週間の投与期間中一般状態を毎日観察し、試験終了後解剖し、剖検、血液検査 (白血球総数および赤血球数) および臓器 (脾臓、胸腺) 重量を測定した。飼育は室温 23 \pm 2 $^{\circ}$ C, 室温 50 \pm 10% の飼育室で行い、飼料 (CE-2, 日本クレア株式会社) と飲水 (蒸留水) は自由摂取とした。照明は 8:00-20:00 を明期とした。

また、MTS 法による RAW264.7 株細胞に対する細胞毒性試験も実施した。すなわち、4 試料のそれぞれについて 12.5-0.39mg/ml の間で 2 倍段階希釈液を調製し、本法添付手順書に従って操作して細胞培養後の生存率を算出した。生存率はコントロール (PBS) の吸光度を 100% としたときの相対値で示した。

3. NO 産生量の測定

分画した 4 試料について、RAW264.7 株細胞が産生する NO 量に及ぼす影響を調べた。メタノール抽出物、酢酸エチル画分およびメタノール：水溶出画分の 3 試料については 40, 200 および 400 μ g/ml を、アセトン：水溶出画分については 20, 100 および 200 μ g/ml を供試した。また Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにより酢酸エチル画分から細分画した 10 画分 (Frs.1-10) について、腹腔マクロファージの NO 産生量に及ぼす影響についても調べた。NO 産生量の測定には市販の測定キット (NO₂/NO₃ Assay Kit-C II, 同仁化学) を用い、LPS (E. coli O26 由来; 和光純薬) 刺激下での産生量をマイクロプレートを使って測定した。すなわち、96 well マイクロプレートに分注した培養上清に Griess 試薬を加え、550nm における吸光度を測定した。RAW264.7 株細胞は ETCC から入手した。腹腔マクロファージは 5% プロテオースペプトンで ICR 正常マウスより誘導して用いた。一部の試験では市販の標準カテキンを比較物質として用いた。

4. 酢酸エチル画分の抗腫瘍試験

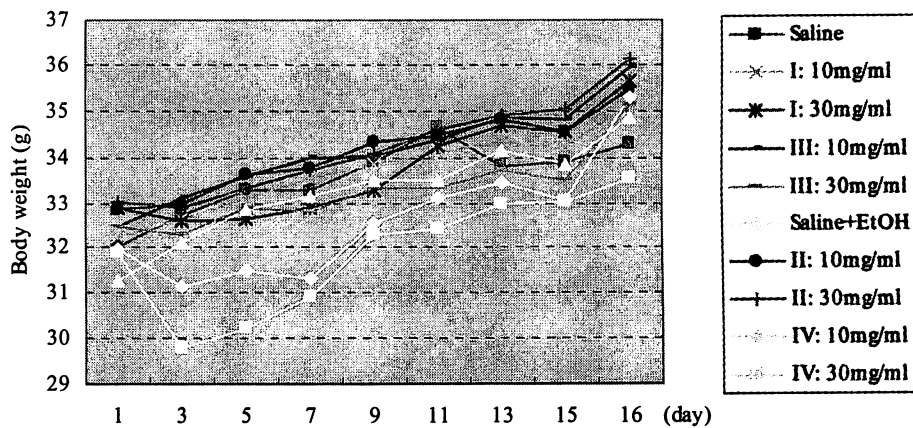


Fig. 2 Body weight changes of mice during mangrove extract administration.

I: methanol extract, II: ethyl acetate fraction, III: methanol:H₂O fraction and IV: acetone:H₂O fraction.

ICR 雄性マウス (8 週齢, 日本エスエルシー株式会社) を購入し, 約 1 週間の馴化後に使用した. Sarcoma-180 腫瘍細胞 (東北大学加齢医学研究所より入手) はマウスに接種する前に 10%FBS 加 DMEM 培地 (Gibco) を用い, 5%CO₂, 37°C 下で数回継代した. トリプシン (0.2%)・EDTA (0.02%) 液で細胞を回収し, 遠心洗浄後, PBS (-) で接種用の細胞浮遊液 1.0×10⁶ cells/ml を調製した. この Sarcoma-180 細胞浮遊液 0.1ml (1.0×10⁵) をマウスの右背側部皮下に接種し, 担癌マウスを作成した. 接種後 7 日目に腫瘍細胞の生着が肉眼的に確認されたマウスのみを選抜して 1 群 20 匹の 2 群に群分けした. 群分けした日から約 10 週間の間, 酢酸エチル画分 (3mg/0.1ml/mouse) を隔日に腹腔内投与し, 体重と腫瘍径を 5 日毎に測定し, 推定腫瘍容積 [腫瘍の長径 (mm) × (腫瘍の短径 (mm))² × 0.5236] を算出した. 対照群には同用量の試料溶解液を投与した. 癌細胞接種から 10 週間後, 剖検および腫瘍を摘出して重量を測定した.

結果および考察

1. マウス毒性および細胞毒性

ICR 正常マウスおよび RAW264.7 株細胞を用いて, メタノール抽出物, 酢酸エチル画分, メタノール:水溶出画分およびアセトン:水溶出画分の 4 試料について一般的な毒性評価を行った. 約 2 週間に亘って各試料を腹腔内に隔日投与した時のマウス体重を Fig.2 に示した. 4 試

料の中で, 特に, アセトン:水溶出画分を投与した 2 群において強い増加抑制傾向が見られ, 高用量群 (30mg/ml) においてその影響はより顕著であった. 剖検時の脾臓重量および血液検査においては試験群間に差は認められず, 対照群との比較でも差がなかったことから, これらの 4 試料には被験濃度において骨髄抑制作用はないものと推測された. 胸腺の湿重量にも試験群間で差はなかった. しかし剖検所見において腹腔内の消化器系臓器に癒着や腹水貯留等が散見された. 特に, アセトン:水溶出画分の高用量群 (30mg/ml) においては 8 例中 5 例に腹水が, 7 例に大腸, 小腸などの癒着が, 3 例に肝臓の壊死像が認められ, 本群の低体重との関連性が強く示唆された. なお本群以外にも小腸, 胃, 肝臓などに軽微な癒着が散見された. 癒着は溶解液 (Vehicle) を投与した群には認められなかったため, 試料中の成分による影響であろうと考えられた. なお投与開始 2 日目にアセトン:水溶出画分の高用量群 (30mg/ml) で 1 例が死亡した. 死因は特定できなかったが, 誤投与の可能性も否定できなかった. 一方の MTS 法による RAW264.7 株細胞に対する毒性試験では, いずれの試料でも生存率曲線は用量相関的に推移し, 培地中の試料濃度が低くなるほどに細胞生存率は上昇し, 0.39mg/ml 暴露下では水可溶画分と酢酸エチル画分が 90% 以上の高い生存率を示した.

2. RAW264.7 細胞および腹腔内マクロファージの NO 産生に及ぼす各分画物の影響

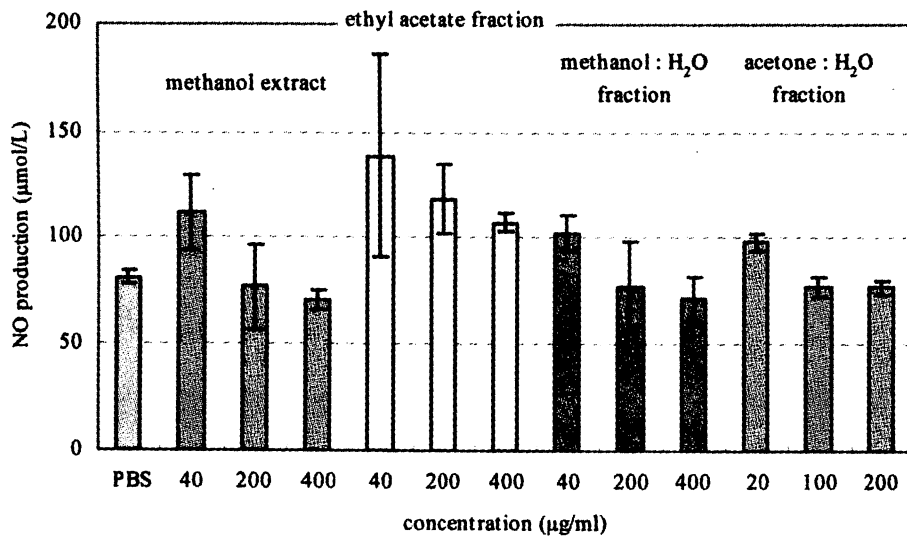


Fig. 3 NO production of RAW264.7 cell with each fraction treatment.

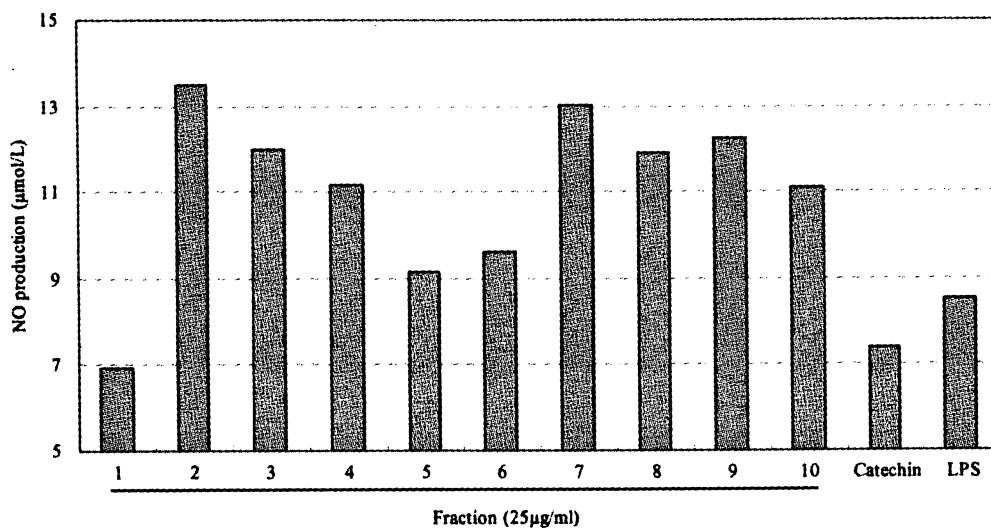


Fig. 4 NO production of each fraction obtained from Sephadex LH-20 column chromatography of ethyl acetate fraction.

メタノール抽出物, 酢酸エチル画分, メタノール:水溶出画分およびアセトン:水溶出画分が RAW264.7 細胞の NO 産生量に及ぼす影響を検討した. 結果を Fig.3 に示した. 図に見るように, 4 試料とも, 暴露濃度が高いところでは低濃度暴露時に比べて RAW264.7 細胞の NO 産生量は低かった. すなわち高濃度側では NO の産生は少なく, 暴露濃度が低くなるにつれて産生量が増加した. カテキン類のうちで, epigallocatechin-3-gallate は核転写因子 NF- κ B を阻害し, NO 産生酵素である iNOS (inducible nitric oxide synthase) の合成を阻害するとの報告 4) がある. 本試験で用いた試料中にはカテキン類を始めとして多くの機能性成分が混在すると推測されるが, 今回観察された濃度相関的な NO 産生量の推移にも類似成分の多寡が関与している可能性が考えられた. 次に, Sephadex

LH-20 カラムクロマトグラフィーにより酢酸エチル画分から細分画した 10 画分 (Frs.1-10) が腹腔内マクロファージの NO 産生量に及ぼす影響を検討した. 結果を Fig.4 に示した. 10 画分中 9 画分 (Fr.2-10) では NO 産生量はカテキンの値 (7.4 μ mol/L) を上回った. 中でも Fr.2, 7 および 9 では 13.5, 13.1 および 12.8 μ mol/L を示し, カテキンの約 2 倍の値であった. すなわち Fr.1 以外の 9 画分にマクロファージ活性作用が認められ, 特に 3 画分が高い活性を示した.

3. 担癌マウスにおける酢酸エチル画分の抗腫瘍活性
Sarcoma-180 担癌マウスを作成後, 酢酸エチル画分 (3mg/0.1ml/mouse/day) を隔日に約 10 週間にわたって腹腔内に投与した. 腫瘍径を 5 日毎に測定し, 計算式か

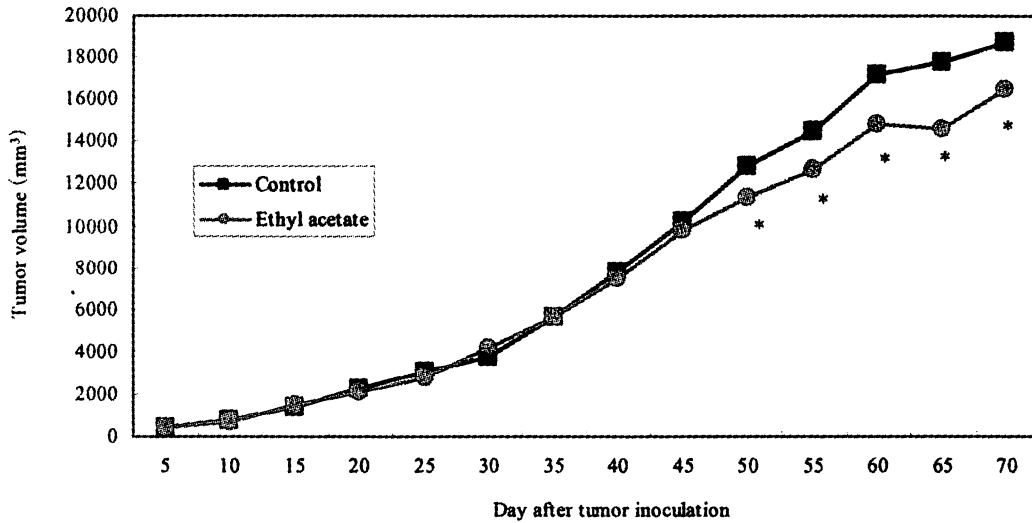


Fig.5 Anti-tumor effects of ethyl acetate fraction.
*: $p < 0.05$

ら求めた推定腫瘍容積の推移を Fig.5 に示した。酢酸エチル画分投与群において、投与開始 50 日目頃から推定腫瘍容積が対照群と比べて低値傾向にあった。また、腫瘍の転移に関し、対照群において四肢間接部や肺への転移が多く見られたが、酢酸エチル画分ではまったく見られず、この点では興味ある所見が得られた。以上、担癌マウスへの酢酸エチル画分投与試験において、マウスの生存率では有意な延命効果は認められなかったが、腫瘍の肺転移および推定腫瘍容積において抑制傾向がみられた。

要約

西表島産ヤエヤマヒルギ (*Rhizophora stylosa* Griff.) の樹皮抽出画分について、抗腫瘍活性等を *in vitro* および *in vivo* で検討し、以下の成績を得た。風乾樹皮からメタノール抽出物を得、これの水可溶画分を酢酸エチルで液・液分配して酢酸エチル画分を得た。さらに酢酸エチル画分から Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーによってメタノール：水溶出画分とアセトン：水溶出画分を得た。これら 4 試料について RAW264.7 株細胞を用いて細胞毒性試験を実施した結果、いずれの試料も 0.39mg/ml の最低用量において高い生存率を示した。この結果を踏まえて 4 試料についてそれぞれ 3 濃度 (400~20 μ g/ml) を設定し、LPS 刺激下での RAW264.7 株細胞の NO 産生量に及ぼす影響を調べた結果、酢酸エチル画分の 40 μ g/ml の濃度において対照 (PBS) の約 1.6 倍相当、140 μ mol/L の NO 産生が見られた。酢酸エチル画分を再度 Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーに付し、エタノール・メタノール溶出により 10 画分 (Fr.1~10) に細分画し、それぞれの 25 μ g/ml 暴露下におけるマウス腹

腔内マクロファージの NO 産生に及ぼす影響を調べた結果、Fr.2~Fr.9 において標準カテキンよりも高い NO 産生がみられた。また、Sarcoma-180 担癌 ICR マウスの腹腔内に酢酸エチル画分 (3mg/mouse/day) を約 10 週間にわたって隔日投与したところ、マウスの生存率では有意な延命効果を得るには至らなかったが、腫瘍の転移および腫瘍容積において抑制傾向がみられた。

これらの結果から、酢酸エチル画分には RAW264.7 株細胞あるいはマウス腹腔内マクロファージの NO 産生促進作用や Sarcoma-180 腫瘍細胞の転移ならびに増殖の抑制作用があると考えられ、有用な免疫調整物質が含まれている可能性が示唆された。

参考文献

- L.A.D. Williams, 1999. *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae) triterpenoids with insecticidal activity. *Naturwissenschaften*, 86: 450-452.
- Mariappan P. et al., 1999. Antiviral properties of mangrove plant, *Rhizophora apiculata* Blume, against human immunodeficiency virus. *Antiviral Research*, 44: 113-122.
- 永田純一, 金城一彦: マングローブ樹皮メタノール抽出物の担癌マウス抗腫瘍効果に及ぼす影響, マングローブに関する調査報告書。平成 14 年度内閣府委託調査研究。財) 亜熱帯総合研究所
- YU-li Lin and Jen-kun Lin, 1997. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor- κ B. *Molecular Pharmacology*, 52: 465-472.