

[Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol.67, No.10, pp.1411~1416, 1993]

コーン水抽出物中より得られたケトール型 不飽和脂肪酸の抗腫瘍活性

石原伸浩, 中川香穂, 斎藤文郎, 上中居和男
久我 洋*, 江島明男*, 三井郁雄*, 佐藤敬喜*
(タマノ井酢第2研究所, *第一製薬探索第1研究所)

平成5年4月5日受付

Antitumor Activities of Ketol Forms of Unsaturated Fatty Acids from a Water Extract of Corn Grain

Nobuhiro ISHIHARA, Kaho NAKAGAWA, Fumio SAITO, Kazuo UENAKAI,
Hiroshi KUGA*, Akio EJIMA*, Ikuo MITSUI*, and Keiki SATO*
Research Laboratories II, Tamanoi Vinegar Co., Ltd., 1-32, 1-cho,
Kurumano-cho Nishi, Sakai, Osaka 590

* Exploratory Research Laboratories I, Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.,
16-13 Kitakasai 1-chome, Edogawa, Tokyo 134

Ketol forms of unsaturated fatty acids, which were derived from linoleic acid, were obtained from a water extract of corn grain and their antitumor activities was evaluated. These ketols, especially 13-hydroxy-10-oxo-trans-11-octadecenoic acid (gamma-ketol), had more effect on various cancer cells in culture than linoleic acid. In an *in vivo* study, mice were implanted with mammary carcinoma MM46 cells intraperitoneally. Gamma-ketol given intraperitoneally cured the cancer. Other mice were implanted with solid Sarcoma 180 cells and gamma-ketol or linoleic acid was given by mouth. Gamma-ketol inhibited the cancer, but linoleic acid did not. Gamma-ketol was evaluated for mutagenicity with *Salmonella typhimurium* by the reverse mutation (Ames) test and the chromosomal aberration test with human lymphocytes. Mutagenicity was not detected. These results suggested that oral administration of ketol forms of unsaturated fatty acids may be an useful treatment for cancer.

(Received April 5, 1993)

緒 言

われわれは医食同源の観点から、食品に含まれる、とくに食酢中に含まれる生理活性物質の探索研究を進め、その成果として、アルコール発酵工程を無蒸煮法とした、純コーン酢中に含まれる抗腫瘍活性成分について本学会に発表してきた^(1,2)。その研究過程で、原料コーンの水抽出物中にさらに強い別の抗腫瘍活性を認め、その物質を単離し、構造を調べた結果、遊離のケトール型不飽和脂肪酸であることが判明した⁽³⁾。

リノール酸などの不飽和脂肪酸が、コーン中の酵素によりケトール型不飽和脂肪酸に代謝変換されることは、

1970年 H. W. Gardner により報告⁽⁴⁾され、その後、植物リポキシゲナーゼ経路の詳細な研究により、リポキシゲナーゼおよびハイドロペーオキサイドヒドローゼが関与することが報告されている⁽⁵⁾。これら植物リポキシゲナーゼ経路を経た生成物の生理活性については、植物ホルモン様活性や、抗菌活性についての報告があるが⁽⁶⁾、抗腫瘍活性についてはこれまでに報告がない。

一方、オレイン酸やリノール酸などの脂肪酸の抗腫瘍活性については、沼田ら⁽⁷⁾や M. E. Bégin ら⁽⁸⁾により報告されている。脂肪酸はもともと生体成分であるため、正常細胞に対する毒性はきわめて低く、癌細胞のみを攻撃するような選択毒性を有するものもあると考えられて

いる。しかし、その有効性は特定の癌に対してのみ得られるものであり、また動物実験では、癌の部位への直接投与以外は無効であると報告されている⁽⁷⁾。

今回、著者らはリノール酸由来のケトール型不飽和脂肪酸が *in vitro* において、リノール酸に比べ抗腫瘍活性が著しく高いという知見を得、さらに *in vivo* における効果を調べたところ、経口投与で有効であるとの結果を得た。また、細胞への選択性を探る目的で変異原性試験を行い、興味ある結果を得たので合わせて報告する。

実験方法

1. 供試材料 アメリカ産デントコーン (*Zea mays L. var. indentata* STURT.) をカッターミルにて 0.3 mm のスクリーンを通過するように粉碎したものを試料とした。

2. 抗腫瘍活性物質の抽出と精製 Fig. 1 に手順を示した。すなわち、コーン粉碎物 50 kg を 250 l の水で抽出した液を塩酸で pH 3 に調整し、遠心分離により沈殿物 860 g を得た。この沈殿物を酢酸エチルで抽出し、酢酸エチルに移行したもので減圧濃縮することにより粗精製物 44 g を得た。

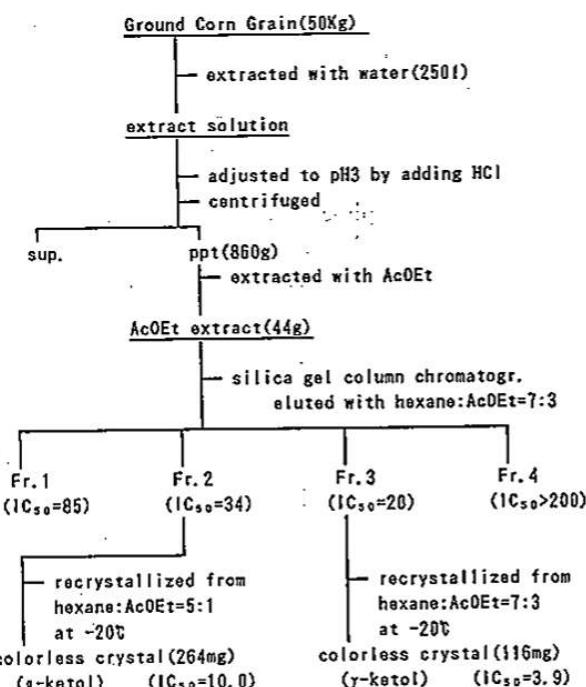


Fig. 1. Procedure for Isolation of Ketol-Formed Unsaturated Fatty Acids. IC_{50} , The concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$) which caused 50% growth inhibition against P 388 murine leukemia.

この粗精製物全量をヘキサン：酢酸エチル = 7 : 3 の混合溶媒で平衡化した Wakogel C-300 900 ml (30 × 127 mm) にのせ、同溶媒にてカラムクロマトを行い、カラムボリュームの 2.5~4.5 倍量の溶出物を活性画分として回収し、減圧濃縮した (0.7 g)。この濃縮物をヘキサン：酢酸エチル = 7 : 3 の混合溶媒に溶かし -20°C で放置することにより結晶が析出するのでそれらを濾取し、同様の操作での再結晶化により得られた結晶 (116 mg) を化合物 1 とした。また、Wakogel C-300 によるカラムクロマト時のカラムボリューム 1.0~2.5 倍量の画分の濃縮物 3.5 g からは、結晶化時にヘキサン：酢酸エチル = 5 : 1 の混合溶媒を用いて同様の操作で結晶 (264 mg) を得、化合物 2 とした。

化合物 1, 2 をそれぞれ機器分析した結果 H. W. Gardner の報告⁽⁶⁾にある 13-hydroxy-10-oxo-trans-11-octadecenoic acid (γ -ケトール) と 9-hydroxy-10-oxo-cis-12-octadecenoic acid (α -ケトール) にスペクトルが一致したので、それぞれを γ -ケトール、 α -ケトールとして以下の実験に供した。

3. *in vitro* 抗腫瘍活性測定法 マウス白血病細胞 P 388 と 5 種のヒト癌細胞 KB (ヒト鼻咽頭上皮癌)、MKN-28 (ヒト胃癌)、NUGC-3 (ヒト胃癌)、MDA-MB-231 (ヒト乳癌)、BT-474 (ヒト乳癌) の計 6 種の細胞を用いて抗腫瘍活性を測定した。なお、KB と MKN-28 は財団法人癌研究振興財団より供与を受けた細胞を使用した。

検体としては上記方法により得られた α -ケトール、 γ -ケトール、対照としてリノール酸 (ナカライトスク、純度 99%)、5-FU (和光純薬) を用いた。

P 388 は 5×10^2 、ヒト腫瘍細胞は 2.5×10^3 cells/well になるように、96 well-microplate に播種し、P 388 は 2 時間後、ヒト腫瘍細胞は 24 時間後に検体を添加した。その後、5% CO_2 下 37°C で 3 日間培養し、培養終了 4 時間に前 MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-di-phenyl-2-H-tetrazolium bromide] を添加した。次いで培養液を除去後 150 $\mu\text{l}/\text{well}$ の DMSO を各 well に加え、生成したフォルマザンの吸光度を 540 nm にて測定し、細胞生育阻止率 50% 浓度 IC_{50} を求めた。

4. 復帰変異試験 *Salmonella typhimurium* TA 98 株、TA 100 株を用いた復帰変異試験 (Ames Test) を Bruce N. Ames らの方法⁽⁸⁾に従って行った。対照として抗癌剤 5-FU (和光純薬)、ドキソルビシン塩酸塩

(Sigma) を用いた。

5. 染色体異常試験 ヘパリン加末梢血をリンパ球分離溶液 ($d=1.077$, ナカライテスク) に重層し、遠心分離で集めたリンパ球を培養液 (5% 仔ウシ胎児血清加 RPMI-1640) 中に 2×10^6 cells/ml になるように調製した。このリンパ球浮遊液に、リンパ球の幼若化を図るために Phytohemagglutinin-P® (DIFCO) を $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ の割合で添加した。37°C で 48 時間培養後検体溶液を加え、さらに培養を続け 24 時間に培養を終了し染色体標本を作製した。それぞれの培養終了 3 時間前に $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ のコルセミドを添加した。空気乾燥法で染色体標本をつくり観察した。

対照として抗癌剤ドキソルビシン塩酸塩 (Sigma), マイトイマイシン C (協和醸酵工業) を用いた。

6. 動物実験法 (1) 実験動物: ICR マウス (4 週齢メス), および C3H/He マウス (4 週齢メス) (日本エスエルシー株式会社) を 1 週間予備飼育後実験に供した。

(2) 実験腫瘍: マウス肉腫 S 180, およびマウス乳癌 MM 46 をそれぞれマウス腹腔内で継代移植して用いた。

(3) 経口投与用検体の調製法: 4% コール酸ナトリウム (Sigma) 水溶液に被検物質を加え、60°C 加温条件下で攪拌し乳化液を得て投与した。被検物質としては γ -ケトールと対照としてリノール酸 (ナカライテスク, 純度 99%) を用いた。

(4) 腹腔内投与用検体調製法: 20% エタノールを含むリン酸緩衝生理食塩水にてケトール型不飽和脂肪酸の結晶を懸濁した。

(5) 腹水型腫瘍に対する活性測定法: C3H/He マウスの腹腔内に MM 46 を 1×10^6 cells/mouse 移植し、その翌日から検体を 1 日 1 回、5 日間連続腹腔内に投与した。癌細胞を移植した日以降の生存日数から抗腫瘍効果を判定することとし、投与群 (T) と非投与群 (C) の平均生存日数から延命率: $ILS = (T/C - 1) \times 100$ を算出した。

(6) 固形腫瘍に対する活性測定法: ICR マウス (5 週齢メス) の大腿部皮下に S 180 を 5×10^6 cells/mouse 移植し、腫瘍移植後 7, 9, 11 日目に、検体をゾンデにて経口投与した。投与日以降腫瘍径を知覚計で測定し、推定体積 (長径 × 短径 × 高さ ÷ 2) を求め、Control 群 (Vehicle 投与群) に対する有意差検定 (Student's *t*-test) で効果を判定した。

実験結果

1. ケトール型不飽和脂肪酸の *in vitro* における抗腫瘍活性

リノール酸の代謝産物であるケトール型不飽和脂肪酸と、リノール酸および 5-FU との細胞増殖抑制効果の比較を各種細胞を用いて *in vitro* にて測定した。Table I に示すとおりケトール型脂肪酸同士の比較では α -ケトールに比べ γ -ケトールのほうが活性が高い。また、 γ -ケトールは 6 種の細胞に対し IC_{50} 値が $3.9 \sim 18.6 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、リノール酸に比べて 5~10 倍の活性を示した。

既存の癌化学療法剤の 5-FU との比較では、5-FU は P 388 や MKN-28 に対し非常に強い活性を示すが、BT-474 には全く活性を示さず、細胞特異性があるのに対し、 γ -ケトールは 6 種の細胞すべてにはば一様な効果を示した。

2. 復帰変異試験

Salmonella typhimurium TA 98 株、TA 100 株を用いた復帰変異試験では、S 9 Mix 存在下、非存在下ともに $0.25 \sim 5 \text{ mg}/\text{plate}$ の濃度範囲で試験した結果、 γ -ケトールによる復帰変異コロニーの増加は認められなかった (Table II)。一方、5-FU ($5 \mu\text{g}/\text{plate}$ 以上) やドキソルビシン塩酸塩 ($1.4 \mu\text{g}/\text{plate}$ 以上) は S 9 Mix 非存在下でも復帰変異コロニー数が有意に増加した。

3. 染色体異常試験

ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験では、 γ -ケトール $1.25 \sim 20 \mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で処理した結果、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下では染色体異常を誘発せず、用量作用関係も示さなかった。また、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では細胞毒性がみられた。それに対し、既存の癌化学療法剤 (ドキソルビシン)

Table I. Antitumor Activities of γ -Ketol, α -Ketol, Linoleic Acid and 5-FU against Various Cell Lines

Cell lines	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
	γ -ketol	α -ketol	LA	5-FU
P 388	3.9	10.0	42.5	0.072
KB	15.2	44.6	75.4	0.8
MKN-28	4.4	19.1	34.6	0.27
NUGC-3	11.0	NT	74.4	1.2
MDA-MB-231	6.9	NT	70.7	4.7
BT-474	18.6	NT	129	>50

LA, linoleic acid; NT, not tested.

Table II. Induction of Mutations by γ -Ketol in *Salmonella typhimurium*

Concentrations (mg/plate)	S 9 Mix	Revertants per plate		Judge- ment
		TA 98	TA 100	
Vehicle	—	27	122	
γ -ketol	0.25	21	124	Negative
	0.5	23	119	Negative
	1.0	21	102	Negative
	2.5	2		* ^{c)}
	5.0	0		*
Positive control ^{a)}	—	143	612	Positive
Vehicle	+	36	140	
γ -ketol	0.25	30	141	Negative
	0.5	25	128	Negative
	1.0	25	116	Negative
Positive control ^{b)}	+	24	980	Positive

^{a)} 4NQO 0.025 μ g/plate; ^{b)} B[a]P 2.5 μ g/plate;^{c)} *, Growth inhibition of *Salmonella typhimurium*.

塩酸塩、マイトマイシンC) は染色体異常の有意な増加が認められた (Table III).

4. γ -ケトールの *in vivo* における抗腫瘍活性

In vitro 試験で活性の高かった γ -ケトールを用いて *in vivo* 試験を行った.

腹水型腫瘍 (MM 46) 接種マウスに及ぼす効果を調べた結果、25 mg/kg/day 投与群で 247% 以上の延命率を示し、50 mg/kg/day 投与群では延命率 336% 以上で、治療した 5 匹中 4 匹で腫瘍の完全消失をみた (Table IV).

Table III. Effect of γ -Ketol and Other Anticancer Compounds on the Chromosomes of Human Peripheral Blood Lymphocytes

Compounds	Concentrations (μ g/ml)	Gap	Break	Exchange	Others	Affected cells
γ -ketol	1.25	2	2	1	0	3
	2.5	2	1	0	0	1
	5.0	0	1	1	0	2
	10.0 ^{a)}	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic
Doxorubicin-hydrochloride	0.01	19	37	4	0	31
	0.02	17	69	12	0	51
	0.04 ^{b)}					88
Mitomycin C	0.025	0	8	2	0	8
	0.05	2	24	4	0	24
	0.1	8	54	6	0	44
Vehicle		7	1	0	0	1

^{a)} Toxic effect was observed; ^{b)} Impossible to count because many aberrant cells are recognized.Table IV. Intraperitoneal Therapeutic Effect of γ -Ketol on the Survival Time in C3H/He Mice Implanted Ascites Formed Mammary Carcinoma (MM 46)

Dose (mg/kg/ day)	Life span ^t (days)	MSD \pm SD	ILS (%)
0	13, 13, 14, 15, 21	15.2 \pm 3.3	—
12.5	13, 16, 16, 17, 18	16.0 \pm 1.9	5.3
25.0	14, 55, >70, >70, >70	>52.8	>247
50.0	51, >70, >70, >70, >70	>66.2	>336

^t Life span after implantation; >70, 70 days survivors.

また、S 180 の固形腫瘍に対する γ -ケトールの経口投与での効果をリノール酸と比較した。腫瘍移植後 7, 9, 11 日目に γ -ケトールとリノール酸を 800 mg/kg/day ずつ投与した結果、リノール酸投与群はコントロール群と同様に腫瘍が増殖したが、 γ -ケトール投与群は有意差をもって腫瘍の増殖を抑制した。また、乳化剤として用いたコール酸 Na も腫瘍の増殖に影響を及ぼさなかった (Fig. 2).

なお、 γ -ケトールの急性毒性については腹腔内投与の場合 $LD_{50}=125$ mg/kg、経口投与の場合 $LD_{50}>2400$ mg/kg であった。

考 察

M. E. Bégin らは培養乳癌細胞に対する C18 脂肪酸の影響を調べているが、その結果脂肪酸の細胞毒性は、二重結合の数、位置、幾何学的形状に依存すると推察し

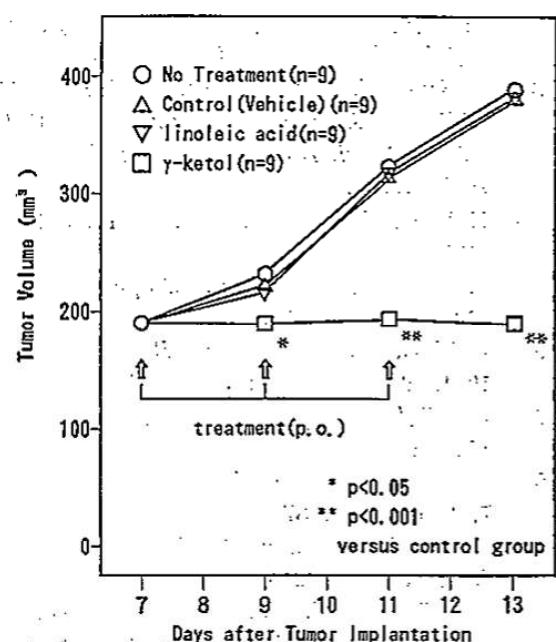


Fig. 2. Comparison of Inhibitory Effect between γ -Ketol and Linoleic Acid on *in vivo* Growth of Sarcoma 180

ており、数は1個では効果がなく2, 6個のものより3, 4, 5個のものほうが効果が大きいと、また *trans* より *cis* 異性体のほうが効果があるとしている¹⁸。沼田らも飽和脂肪酸の場合炭素数が13と15のものが、不飽和脂肪酸の場合 ω 3系列のものが強い抗腫瘍活性を有すると報告¹⁷しており、わずかな構造の違いで活性が左右されることが示されている。

今回の *in vitro* 試験の結果、リノール酸が酵素で代謝された γ -ケトールは、リノール酸に比べ抗腫瘍活性が5~10倍になっており、抗腫瘍スペクトルも広いことが確認された。 γ -ケトールと抗癌剤 5-FUとの比較では、乳癌に対しては γ -ケトールが同等もしくはそれ以上の活性を示している(Table I)。また、動物実験においてもリノール酸が無効であった経口投与で、 γ -ケトールは効果を示した。しかし、リノール酸が *cis* 型の二重結合が2つで ω 6系列であるのに対し、この γ -ケトールは *trans* 型の二重結合が1つで ω 7系列であることから、リノール酸より γ -ケトールのほうが活性が高いことについては炭素数、二重結合の数、位置、幾何学的形状以外の要因によるものと考えられる。

ハイドロキシ脂肪酸についてはローヤルゼリーの抗腫瘍活性の本体として G.F.Townsend ら¹⁹により、ケトール型不飽和脂肪酸についてはヤマブシタケから単離された HeLa 細胞の増殖阻害物質として H.Kawagishi

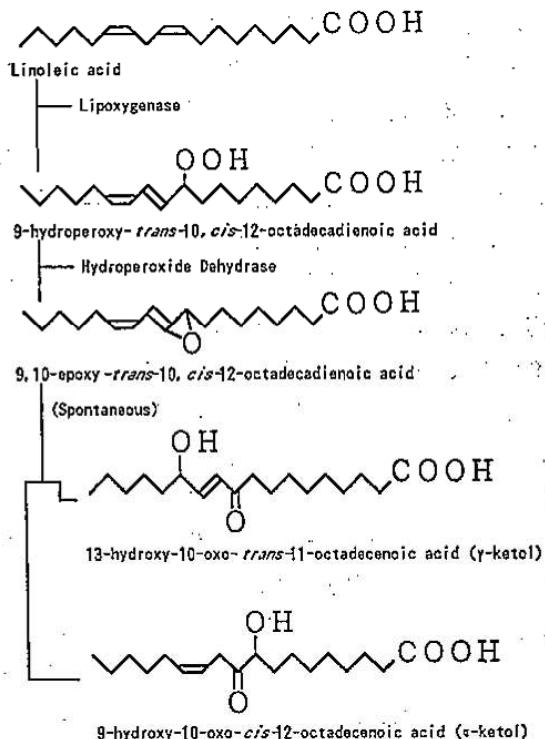


Fig. 3. Reactions Catalyzed by Corn Lipoxygenase and Hydroperoxide Dehydrase

ら¹¹により報告されている。また、病原菌に侵された植物体中に、その病原菌に抗菌活性を示すハイドロキシ不飽和脂肪酸が蓄積するという報告^{12~14}もあり、水酸基やケトン基の付与が、 γ -ケトールの生理活性に寄与している可能性も考えられる。

普通の遊離脂肪酸の場合はもともと生体成分であるため、毒性も少ないと予想され、事実選択性も認められている¹⁵が、 γ -ケトールにおいても変異原性がないということが認められた(Table II, III)。代謝拮抗剤や抗腫瘍性抗生物質などの抗癌剤は、DNAに作用するため今回の比較試験でも変異原性が認められたが、 γ -ケトールには認められなかったので、その作用点はDNAではないことが示唆された。 γ -リノレン酸の抗腫瘍活性発現の作用機作について F.Fujiwara らは、 γ -リノレン酸が腫瘍細胞に取り込まれた後、細胞膜の脂質変化により細胞機能異常が生ずるためと推測¹⁶している。 γ -ケトールも細胞膜になんらかの影響を与え抗腫瘍活性を発現している可能性は考えられ、作用機作については今後さらに検討する必要がある。

これらのケトール型不飽和脂肪酸は、コーン粉碎物を直接メタノール抽出した場合は検出されなかった。このことから、コーンに含まれる遊離のリノール酸が、M.

Hamberg の報告⁽⁵⁾にあるように、コーン中のリポキシゲナーゼおよびハイドロペーオキサイドヒドローゼにより Fig. 3 に示す反応を経て、水抽出中に生成したと考えられる。植物体からの抗腫瘍活性物質の第一次抽出は、通常メタノールなどの有機溶媒や熱水によるものが多いが、そのことがこれまでコーン由来のケトール型不飽和脂肪酸の抗腫瘍活性についての報告がなかった一因と考えられる。コーンのリポキシゲナーゼはリノール酸の9位の炭素を過酸化するが、大豆やアルファルファのリポキシゲナーゼは13位の炭素も過酸化する^(17,18)ので、それらの酵素を用いれば別のケトール型不飽和脂肪酸が得されることになる。また、これらの酵素はリノール酸以外にも *cis*-1, *cis*-4-ペントデカジエン構造を持つ脂肪酸に対して特異的に働くことが知られている⁽¹⁹⁾ので、 γ -リノレン酸のような遊離脂肪酸のなかでも比較的活性が強いとされている⁽⁸⁾ものを基質とすればさらに活性の強い化合物を得られる可能性もあり、このことについてもさらに検討する必要がある。

要 約

コーンの水抽出物中から得られたケトール型不飽和脂肪酸の抗腫瘍活性の評価を行い以下の結果を得た。

(1) *In vitro* 試験の結果 γ -ケトールはリノール酸に比べ5~10倍の活性を示し、抗腫瘍スペクトルも広いことが認められた。

(2) γ -ケトールは細菌を用いた復帰変異試験において突然変異を誘発せず、また、ヒト末梢血リンパ球に対しても染色体異常を誘発しないことが確認された。

(3) *In vivo* において MM 46 の腹水型腫瘍接種マウスに対する γ -ケトールの腹腔内投与で腫瘍の完全消失がみられた。また S 180 固形腫瘍担癌マウスへの経口投与でも γ -ケトールは腫瘍増殖抑制効果を示した。

(1) 藤原範子、腹巻ゆかり、沖 裕治、斎藤文郎、久保田昭正、山本武彦：農化、63, 545 (1989).

(2) 石原伸浩、藤原範子、斎藤文郎、福田香穂、久

- 保田昭正：日本農芸化学会関西支部第362回講演会講演要旨集、神戸、1989, p.1.
- (3) H. Kuga, A. Ejima, I. Mitsui, K. Sato, N. Ishihara, K. Fukuda, F. Saito, and K. Uenakai : *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 1020—1021 (1993).
- (4) H. W. Gardner : *J. Lipid Res.*, 11, 311—321 (1970).
- (5) M. Hamberg : *Biochim. Biophys. Acta*, 920, 76—84 (1987).
- (6) H. W. Gardner : *Biochim. Biophys. Acta*, 1084, 221—239 (1991).
- (7) 沢田光弘、磯田好弘：化学と工業、39, 151—153 (1986).
- (8) M. E. Bégin and G. Ells : *Anticancer Res.*, 7, 215—218 (1987).
- (9) D. M. Maron and B. N. Ames : *Mutat. Res.*, 113, 173—215 (1983).
- (10) G. F. Townsend, J. F. Morgan, S. Tolnai, B. Hazlett, H. J. Morton, and R. W. Shuel : *Cancer Res.*, 20, 503—510 (1960).
- (11) H. Kawagishi, M. Ando, T. Mizuno, H. Yokota, and S. Konishi : *Agric. Biol. Chem.*, 54, 1329—1331 (1990).
- (12) T. Kato, Y. Yamaguchi, T. Hirano, T. Yokoyama, T. Uyehara, T. Namai, S. Yamana, and N. Harada : *Chem. Lett.*, 1984, 409—412.
- (13) H. Koshino, S. Togita, T. Yoshihara, and S. Sakamura : *Tetrahedron Lett.*, 28, 73—76 (1987).
- (14) T. Kato, Y. Yamaguchi, N. Abe, T. Uyehara, T. Namai, M. Kodama, and Y. Shiobara : *Tetrahedron Lett.*, 26, 2357—2360 (1985).
- (15) M. E. Bégin, G. Ells, U. N. Das, and D. F. Horrobin : *J. Natl. Cancer Inst.*, 77, 1053—1062 (1986).
- (16) F. Fujiwara, S. Todo, and S. Imashuku : *Prostaglandins Leukotrienes Med.*, 30, 37—49 (1987).
- (17) H. W. Gardner : *Lipids*, 10, 248—252 (1975).
- (18) W. J. Esselman and C. O. Clagett : *J. Lipid Res.*, 15, 173—178 (1974).
- (19) B. A. Vick and D. C. Zimmerman : *Plant Physiol.*, 63, 490—494 (1979).