

茵陳蒿の抗腫瘍活性物質とその関連化合物

徐 強^{a)} 森 裕志^{a)} 坂本 修身^{a)} 江田 昭英^{*a)}
西岡 五夫^{b)} 小川 義光^{c)} 穂坂 邦男^{c)}

^{a)}岐阜薬科大学薬理学教室, ^{b)}九州大学薬学部生薬学教室, ^{c)}株式会社ツムラ・生物・化学研究所

Antitumor principle of *Artemisiae capillaris* HERBA and its related compound

Qiang XU^{a)} Hiroshi MORI^{a)} Osami SAKAMOTO^{a)} Akihiko KODA^{*a)} Itsuo NISHIOKA^{b)}
Yoshimitsu OGAWA^{c)} and Kunio HOSAKA^{c)}

^{a)}Department of Pharmacology, Gifu Pharmaceutical University

^{b)}Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

^{c)}Research Institute for Biology & Chemistry, Tsumura & Co.

(Received December 7, 1988. Accepted December 21, 1988.)

Abstract

Previously, we reported the antitumor activity of several kinds of crude drugs including *Artemisiae capillaris* HERBA in a syngeneic system of BALB/c mice-Meth A sarcoma. It has been also evidenced that *Artemisiae capillaris* HERBA shows the antitumor activity mainly through a direct cytotoxic action. In the present paper, capillarisin was isolated from *Artemisiae capillaris* HERBA as an antitumor principle having cytotoxic activity against L-929 and KB cells *in vitro*. Oral administration of the final fraction containing capillarisin inhibited the growth of Meth A tumor in BALB/c mice. A synthesized compound related with capillarisin, 5,7-dihydroxy-2-(4'-hydroxyanilino)-6-methoxychromone (Capi-N), showed the cytotoxic activity *in vitro* stronger than capillarisin did. However, Capi-N did not show any antitumor activity *in vivo* probably because of its low absorbability. A water soluble derivative of Capi-N, 7-L-lysinyloxy-5-hydroxy-2-(4'-L-lysinyloxyanilino)-6-methoxychromone tetrahydrochloride (Capi-N-lys), inhibited the growth of Meth A tumor significantly. Capi-N-lys also augmented the Meth A-induced delayed type hypersensitivity in BALB/c mice as well as OK-432 did. Both mechanisms of enhancing antitumor immune response and direct tumoricidal action can be considered for the antitumor activity of Capi-N-lys *in vivo*.

Key words *Artemisiae capillaris* HERBA, Inchinko (Intin-kô), antitumor activity, capillarisin, tumoricidal action.

Abbreviations Meth A-DTH, Meth A tumor-induced delayed type hypersensitivity.

緒 言

これまでに、著者らは BALB/c マウス-Meth A 腫瘍の syngeneic system を用いて数種生薬の水製エキスの抗腫瘍作用を検討し、茵陳蒿、石上柏、白朮および山豆根の4種の生薬が抗腫瘍作用を有することを見出した¹⁾。さらに、これらの生薬の抗腫瘍作

用機序について検討した結果、茵陳蒿以外の3種生薬は主としてT細胞依存性の腫瘍免疫を促進することによって抗腫瘍作用を示すが、茵陳蒿は直接的な腫瘍細胞障害性によって抗腫瘍作用を示すことを報告した¹⁻⁴⁾。すなわち、茵陳蒿は *in vitro* で Meth A および L-929 細胞に対して細胞障害活性を示し、BALB/c-nu/nu マウスに移植した Meth A 腫瘍の増殖を BALB/c-nu/+ マウスの場合と同様に抑制

*〒502 岐阜市三田洞東 5-6-1
5-6-1, Mitahora-higashi, Gifu 502, Japan

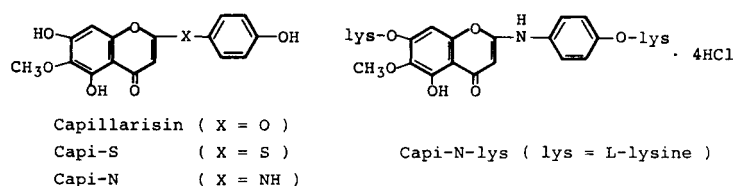


Fig. 1 Chemical structures of capillarisin, Capi-S, Capi-N and Capi-N-lys.

した¹⁾。しかし、担がんマウス脾細胞の Meth A 細胞に対する中和活性および液性免疫応答には影響を及ぼさなかった³⁾。これらの成績は、茵陳蒿が主として直接的な細胞障害性によって抗腫瘍作用を示すことを示唆する。一方、茵陳蒿は Meth A に対する遅延型免疫反応 (Meth A-DTH) を促進し²⁾、また、TNF 産生における priming 活性を示す⁴⁾。ことから、茵陳蒿は免疫応答を促進する成分も含有することが考えられる。本研究では、茵陳蒿の直接的な腫瘍細胞障害活性を示す成分を精製単離するために、*in vitro*での L-929 細胞の増殖に対する抑制活性を指標にして分画を行なった。その結果、有効成分の 1 つは Fig. 1 に示す capillarisin であることが考えられる。そこで、capillarisin 関連化合物である Capi-S, Capi-N および Capi-N-lys を合成し、それらの抗腫瘍作用を検討した。また、capillarisin および Capi-N-lys については Meth A-DTH に及ぼす影響を検討した。

材料と方法

(1) 薬物：用いた茵陳蒿 (*Artemisiae capillaris* HERBA) は中国産であり、株式会社ツムラから贈与された。茵陳蒿の有効成分の分画は九州大学薬学部生薬学教室で行なわれた。2-(*p*-hydroxyphenyl)-6-methoxy-5, 7-dihydroxychromone (capillarisin) の関連化合物、5, 7-dihydroxy-2-(4'-hydroxyphenylthio)-6-methoxychromone (Capi-S), 5, 7-dihydroxy-2-(4'-hydroxyanilino)-6-methoxychromone (Capi-N), 7-L-lysinyloxy-5-hydroxy-2-(4'-L-lysinyloxyanilino)-6-methoxychromone tetrahydrochloride (Capi-N-lys) は株式会社ツムラ・生物・化学研究所第一薬品合成研究所で合成された (Fig. 1)。薬物の生物学的活性は岐阜薬科大学薬理学教室で行なわれ、一部の試験では 5-fluorouracil (5-FU, 半井化学) およ

び N₁-(2'-tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil (FT-207, 大鵬薬品) を対照薬として用いた。

(2) 実験動物：8-11週齢雌性の BALB/c マウス (静岡実験動物センター) を用いた。温度 21 ± 1 °C, 湿度 60% の恒温恒湿飼育室に設置したアイソラック (三基化学) 中で飼育し、固型飼料および水は自由摂取とした。

(3) 腫瘍細胞：Meth A 腫瘍細胞は BALB/c マウスの腹水型として毎週継代維持し、移植後 5 または 6 日目の腹水から採取した細胞を実験に供した。L-929 細胞および KB 細胞は 10 U/ml の penicillin G (明治製薬), 100 μg/ml の streptomycin (明治製薬) および 10% のウシ胎児血清 (Flow Lab.) を加えた Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 日水製薬) を培養液とし、継代培養した。

(4) 培養細胞に及ぼす影響：茵陳蒿の水抽出物および Capi-N-lys は培養液にて、茵陳蒿のその後の分画物および capillarisin 関連化合物は dimethylsulfoxide (DMSO) にて溶解し、それぞれ cellulose acetate filter (0.22 μm, Corning) または有機溶媒用 filter (0.5 μm, FHLP, millipore) を用いて滅菌濾過したのち、培養液にて希釈した。DMSO の最終濃度は細胞増殖抑制作用を示さない 0.5 % 以下となるよう配慮した。L-929 細胞では、2 × 10⁴ 個/0.2 ml/well の細胞を 96 wells culture plate (flat bottom, Corning) に加え、薬物の共存下で 48 時間培養した。KB 細胞では、5 × 10³ 個/1 ml/well の細胞を 24 wells culture plate (flat bottom, Corning) にて 1 日 incubation した後、上清を除去し、被検薬物を溶解した培養液を加え、さらに 4 日間培養した。培養終了後、37 °C に加温した Hanks' balanced salt solution (BSS) で 2 回洗浄した。L-929 細胞の場合、前報¹⁾に従って ethidium bromide を用いた蛍光法¹⁾にて細胞数を算出した。KB 細胞の場合、0.2 ml の 0.2% trypsin で細胞を剥離、単離細胞とし、0.2 ml の牛血清を加えて反応を停止し

た後、9.6 ml の Isoton 液 (日本科学機械) に混和して cell counter (Coulter counter, Model Z, Coulter Electronics) で細胞数を計測した。実験はいずれも duplicate または triplicate で行い、その平均値をもって成績とした。

(5) *in vivo*での抗腫瘍作用: BALB/c マウスの側腹部皮下に 10^6 個の Meth A 細胞を移植し、10, 15, 20および25日後にノギスを用いて腫瘍の長径および短径を測定し、次式に従って腫瘍の大きさを算出した。腫瘍サイズ (cm^3) = $4/3 \cdot \pi \cdot (\text{長径}/2) \cdot (\text{短径}/2)^2$ 。また、その後の生存期間についても観察した。被検薬物は経口投与の場合には水に、腹腔内投与の場合には滅菌生理食塩水に溶解または懸濁し

た。

(6) Meth A細胞に対する遅延型免疫反応 (Meth A-DTH): Meth A-DTH の惹起は前報²⁾に従った。すなわち、BALB/c マウスに 10^6 個の Meth A を皮下移植し、10日後に 10^6 個の mitomycin C (MMC) 処理した Meth A を足蹠皮下に注射し、24時間後に足の腫脹を plethysmometer (model TK-101, Unicom) を用いて測定した。

DTH の強度は担がんマウスと正常マウスの腫脹の差をもって評価した。被検薬物は上述と同様に溶解または懸濁した。

(7) 統計: 腫瘍増殖についての成績は Wilcoxon の U-test によって、DTH についての成績は F 検

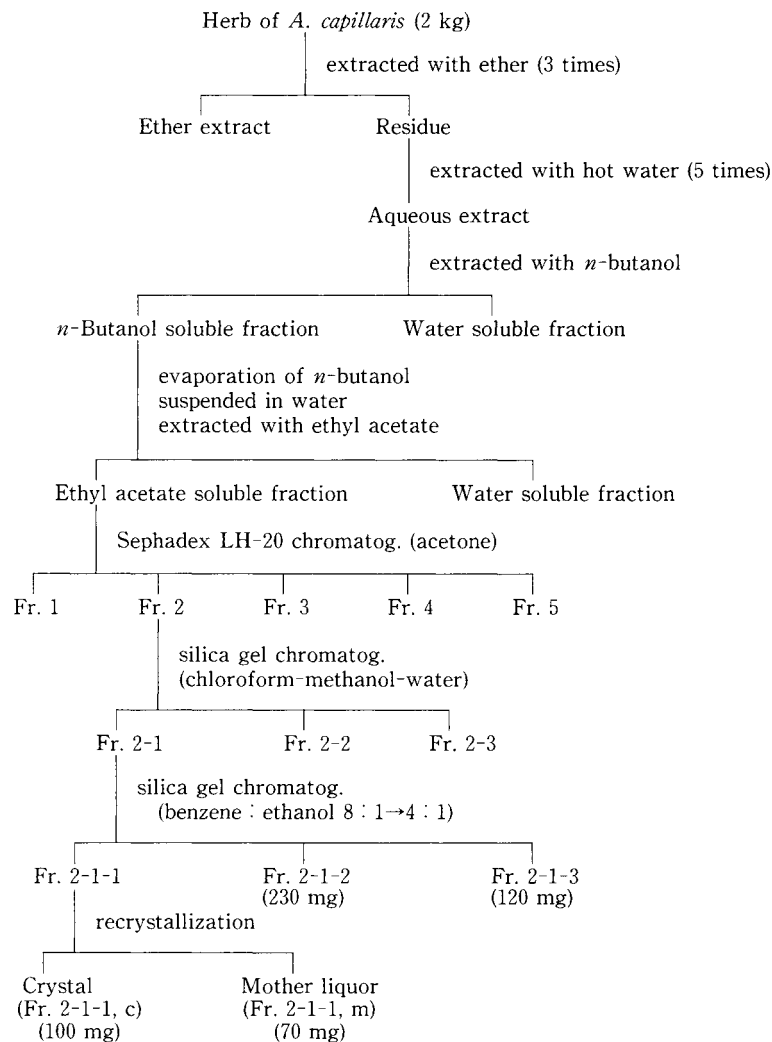


Fig. 2 Protocol for fractionating cytotoxic substance from *Artemisia capillaris* HERBA.

定後, Student's *t*-test または Welch の *t*-test によって 2 群間の有意差を検定した。

結 果

1. 茵陳蒿の水製エキスからの有効成分の分画

分画方法の概略を Fig. 2 に示す。各画分は培養 L-929 細胞に及ぼす影響を指標として分画, 精製した。Fig. 3 に示すように, 水抽出エキス (aqueous extract) の 50% 細胞増殖抑制濃度 (IC_{50}) は, 2.7×10^{-4} g/ml であったのに対して, これを *n*-butanol で分配した *n*-butanol 画分の IC_{50} は 5.0×10^{-5} g/ml であり, 約 5 倍の活性上昇がみられた。減圧乾固した *n*-butanol 画分を, 水に懸濁し, ethyl acetate で分配すると, *n*-butanol 画分の IC_{50} が 1.3×10^{-4} g/ml であるのに対して, ethyl acetate 溶性画分の IC_{50} は 9.1×10^{-5} g/ml であり, 水画分の IC_{50} は 8.5×10^{-4} g/ml であった。この ethyl acetate 画分を Sephadex LH-20 のカラムクロマトに付し, アセトンで溶出し, Fr. 1 から Fr. 5 を得た。これらの画分のうち Fr. 2 が最も強い抑制作用を示し, ethyl acetate 層の IC_{50} が 5.4×10^{-5} g/ml であったのに対して, Fr. 2 の IC_{50} は 4.0×10^{-5} g/ml であった。Fr. 1, Fr. 3, Fr. 4 および Fr. 5 の IC_{50} はそれぞれ 1.4×10^{-4} , 1.3×10^{-4} , 1.0×10^{-4} , 6.6×10^{-4} g/ml であった。この Fr. 2 を減圧乾固し, シリカゲルカラムクロマトにより, Fr. 2-1~3 に分画した。Fr. 2 の IC_{50} が 4.0×10^{-5} g/ml であったのに対して, Fr. 2-1 の IC_{50} は 4.8×10^{-5} g/ml, Fr. 2-2 および Fr. 2-3 の IC_{50} はそれぞれ 1.4×10^{-4} , 4.0×10^{-4} g/ml であった。次いで, Fr. 2-1 をシリカゲルカラムクロマトグラフに付し,

ベンゼン-エタノール (8 : 1 → 4 : 1) で溶出し, Fr. 2-1-1, Fr. 2-1-2, Fr. 2-1-3 の 3 つの画分を得た。Fr. 2-1-1 は再結晶により, 結晶物質 (Fr. 2-1-1, c) と母液 (Fr. 2-1-1, m) とに分けた。Fr. 2-1-1, c~3 の L-929 細胞および KB 細胞に及ぼす影響を Fig. 4 に示す。L-929 細胞に対してはいずれの画分も同程度で, Fr. 2-1 に比して強い増殖抑制作用を示した。KB 細胞に対しては Fr. 2-1-2 を除

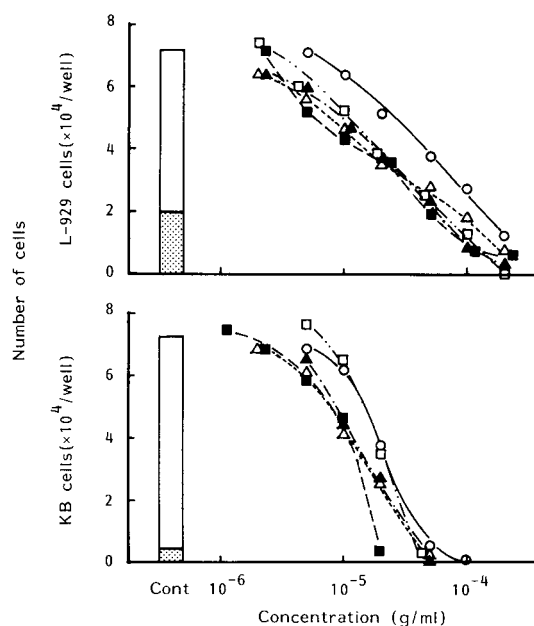


Fig. 4 Effect of Fr. 2-1, Fr. 2-1-1, Fr. 2-1-2 and Fr. 2-1-3 on L-929 cells and KB cells *in vitro*.
 (■) : Number of seeded cells, ○—: Fr. 2-1,
 △---: Fr. 2-1-1, c, ▲---: Fr. 2-1-1, m, □---:
 Fr. 2-1-2, ■---: Fr. 2-1-3.

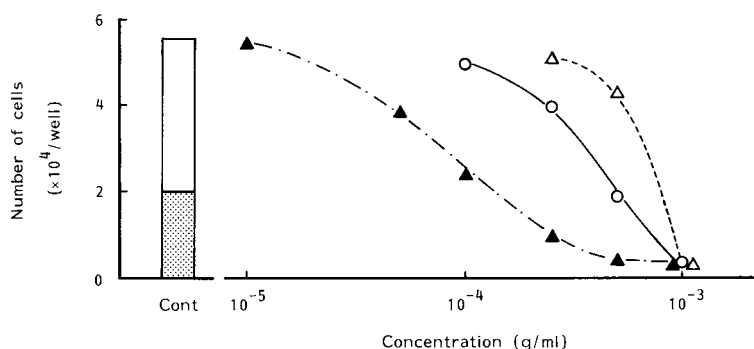


Fig. 3 Effect of fractions (*n*-butanol/water) from aqueous extract of *Artemisia capillaris* HERBA on L-929 cells *in vitro*.
 (■) : Number of seeded cells, ○—: aqueous extract, △---: water soluble fraction, ▲---:
n-butanol soluble fraction.

いて Fr. 2-1 に比して強い抑制作用を示した。Fr. 2-1-1, c は capillarisin と 6-desmethoxycapillarisin の混合物 (88:12) であり、その他の画分は未同定物質の混合物であった。成績には示さないが、精製単離した capillarisin は L-929 細胞および KB 細胞のいずれに対しても Fr. 2-1-1, c とほぼ同程度の抑制作用を示した。

2. Fr. 2-1-1, c での *in vivo* の抗腫瘍作用

BALB/c マウスの側腹部皮下に 10^6 個の Meth A を移植し、移植日から30日間 Fr. 2-1-1, c の10, 25, 100 および 250 mg/kg を経口投与した。Fig. 5 に示すように、250 mg/kg 投与群では、40 mg/kg の FT-207 と同程度の有意な抑制がみられ、その他の用量群ではいずれも抑制傾向がみられた。成績には示さないが、この場合の生存期間にはいずれの用量によっても延長はみられなかった。

3. Capi-S および Capi-N の培養細胞に及ぼす影響

Fig. 6 は L-929 および KB 細胞に及ぼす Capi-S,

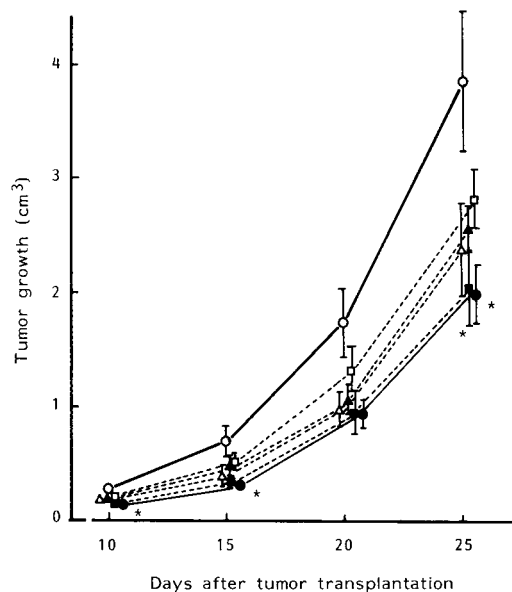


Fig. 5 Effect of Fr. 2-1-1, c and FT-207 on tumor growth in BALB/c female mice.

Animals, 8 weeks old, were transplanted with 10^6 Meth A cells s.c. into their flanks. Drugs were given p.o. for 30 days from the tumor transplantation. Each point indicates the mean $\pm$ S.E. of 7 or 8 animals. $\circ$: Control, $\bullet$: FT-207 40 mg/kg, $\times$: Fr. 2-1-1, c (Δ : 10 mg/kg, $\blacktriangle$: 25 mg/kg, $\square$: 100 mg/kg, $\blacksquare$: 250 mg/kg). * : Statistical significance from the control at $p < 0.05$.

Capi-N の影響を示す。Capi-S の L-929 細胞に対する IC_{50} は 6.5×10^{-6} g/ml であり、Capi-N では 2.0×10^{-6} g/ml であった。一方、capillarisin のそれは 1.4×10^{-5} g/ml であった。KB 細胞の場合もほぼ同様に、Capi-S, Capi-N および capillarisin の IC_{50} はそれぞれ 2.3×10^{-5} , 6×10^{-6} および 2.3×10^{-5} g/ml であった。したがって、L-929 および KB 細胞のいずれに対しても Capi-N の抑制作用が最も強力であった。しかし、Capi-N は capillarisin および Capi-S と異なり、高濃度においてもその細胞数は接種した細胞数以下には減少しなかった。

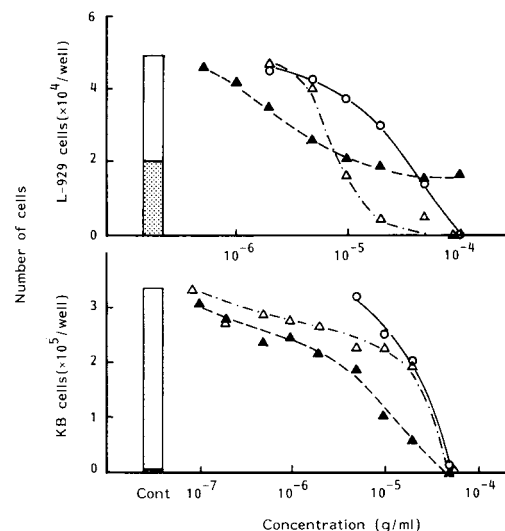


Fig. 6 Effect of capillarisin ($\circ$), Capi-S (Δ), and Capi-N ($\blacktriangle$) on L-929 cells and KB cells *in vitro*. $\square$: Number of seeded cells.

4. Capi-N および Capi-N-lys の *in vivo* での抗腫瘍作用

Capi-N についてのデータは示さないが、100 および 250 mg/kg を Meth A 移植日から20日間経口投与した場合、腫瘍増殖にはほとんど影響を及ぼさなかった。Capi-N の 50 および 100 mg/kg を20日間腹腔内投与した場合にも腫瘍増殖の抑制傾向がみられるにすぎなかった。この理由として Capi-N の吸収が良好ではないことが考えられた。そこで、Capi-N を母核とし、それに lysine を結合させた Capi-N-lys を合成し、この抗腫瘍作用について検討した。成績には示さないが、Capi-N-lys は *in vitro* で L-929 細胞の増殖に対して同モル数の Capi-N とほぼ同程度の抑制作用を示した。また、

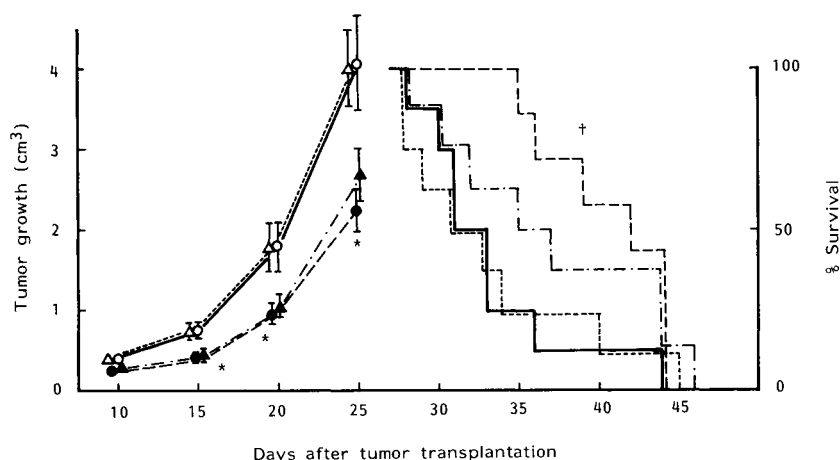


Fig. 7 Effect of Capi-N-lys and 5-FU on tumor growth and survival time of BALB/c mice. Animals, 9 weeks old, were transplanted with 10^6 Meth A cells s.c. into their flanks. Capi-N-lys and 5-FU were given i.p. for 20 days from the transplantation, respectively. Each point indicates the mean $\pm$ S.E. of 7 or 8 animals. $\circ$ —: Control, $\triangle$ —: Capi-N-lys 50 mg/kg, $\blacktriangle$ —: Capi-N-lys 100 mg/kg, $\bullet$ —: 5-FU 13 mg/kg. * $\dagger$: Statistical significance from the control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

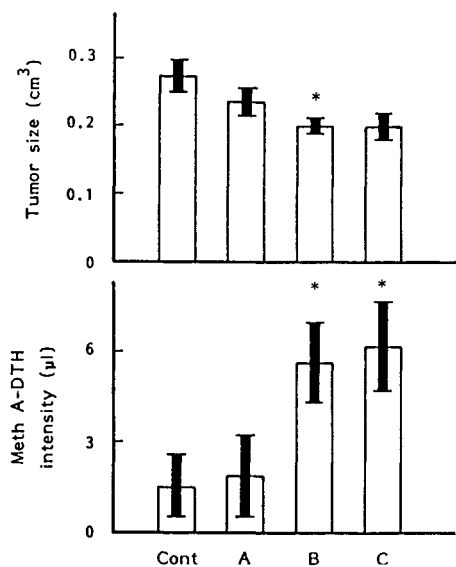


Fig. 8 Effect of capillarisin, Capi-N-lys, and OK-432 on tumor growth and Meth A-induced delayed type hypersensitivity (Meth A-DTH) in BALB/c mice.

Drugs were given i.p. for 10 days from the tumor transplantation. On the day after the final drug-treatment, tumor size was measured and Meth A-DTH was elicited by the s.c. injection of mitomycin C-treated Meth A cells into footpad. A: Capillarisin 50 mg/kg, B: Capi-N-lys 100 mg/kg, C: OK-432 0.5 KE/animal. *: Statistical significance from the control at $p < 0.05$.

Capi-N-lys は Capi-N と同様に高濃度においてもその細胞数を接種細胞数以下には減少しなかった。BALB/c マウスに Meth A を移植し、移植日から20日間 Capi-N-lys の 50 および 100 mg/kg を腹腔内投与した場合、Fig. 7 に示すように、control 群の腫瘍増殖に比して Capi-N-lys の 50 mg/kg 投与群では影響がみられなかったが、100 mg/kg 投与群は 5-FU の 13 mg/kg とほぼ同程度の有意な抑制を示した。この場合の生存期間は 5-FU によって有意に延長し、Capi-N-lys の 100 mg/kg によって延長傾向がみられた。

5. Capi-N-lys の Meth A-DTH に及ぼす影響

被検薬物は Meth A 移植日から10日間腹腔内投与した。最終投与の翌日に Meth A-DTH を惹起した。Fig. 8 に示すように、Capi-N-lys の 100 mg/kg は Control 群に比して有意に Meth A-DTH を増強し、OK-432 の 0.5 KE/animal 群とほぼ同程度の増強を示した。一方、capillarisin の 50 mg/kg は Meth A-DTH に影響を及ぼさなかった。

考 察

茵陳蒿は漢方では清熱利胆薬として使われており、基礎的研究では解熱作用、利胆作用、降圧作用、利尿作用、抗微生物作用などの多岐にわたる生物活性とともに、*in vivo* および *in vitro* の抗腫瘍

作用が報告されている⁵⁾。著者らの検討¹⁾によっても茵陳蒿はBALB/cマウスに移植したMeth A腫瘍の増殖を抑制した。茵陳蒿の作用機序についての検討の結果、茵陳蒿は主として直接的な腫瘍細胞障害作用によって抗腫瘍作用を示し、一部腫瘍免疫を介する可能性があることを明らかにした。

本研究ではこの茵陳蒿の抗腫瘍作用の有効成分を精製するため、*in vitro*でL-929細胞に対する増殖抑制作用を指標として細胞障害物質の分画を行なった。その結果、capillarisinとdesmethoxycapillarisinの88対12の混合物としてのFr. 2-1-1, cを得た。Desmethoxycapillarisinは活性を検討をするための充分量が得られなかったが、単離したcapillarisinはFr. 2-1-1, cと同程度の*in vitro*における細胞障害作用を示した。Capillarisinについては動物実験において胆汁分泌促進作用⁶⁾および肝障害抑制作用⁷⁾を有することが報告されているが、抗腫瘍作用についての報告はみられない。本研究では、Meth A腫瘍を移植したBALB/cマウスにFr. 2-1-1, cを経口投与することによって抗腫瘍効果が認められた。そこで、抗腫瘍活性の増強を企図してcapillarisinの関連化合物であるCapi-SおよびCapi-Nを合成し、抗腫瘍活性を検討した。Capi-Nは*in vitro*でL-929およびKB細胞のいずれに対してもCapi-Sおよびcapillarisinより強い細胞増殖抑制活性を示した。しかし、BALB/cマウスに移植したMeth Aの増殖に対してはCapi-Nは経口または腹腔内投与のいずれによってもほとんど抑制を示さなかった。この理由として、Capi-Nは水に難溶性であり、生体内での吸収が良好ではないことが考えられた。そこで、Capi-NにL-lysineを結合したCapi-N-lysを合成した。このCapi-N-lysは塩酸塩であり、水溶液は酸性を呈する。また、水溶液中では不安定であるため使用直前に溶解し1N-NaOHで中和したものをマウスに腹腔内投与した。その結果、Meth A腫瘍の増殖は有意に抑制され、生存期間の延長傾向もみられた。

前報で²⁾、担がんマウスのMeth A細胞に対する遅延型免疫反応(Meth A-DTH)は茵陳蒿により増強することを報告した。このことは茵陳蒿にMeth

A-DTHを促進する成分が含まれることを示唆する。しかし、capillarisinはMeth A-DTHに影響を及ぼさなかった。一方、100 mg/kgのCapi-N-lysはこの免疫応答を有意に増強した。Capi-N-lysのDTH増強作用は0.5 KE/animalのOK-432投与群とほぼ同程度であった。OK-432はがんの免疫療法剤として臨床使用されており、著者らも前報²⁾においてOK-432がMeth A-DTHを増強することを報告した。したがって、Capi-N-lysは直接細胞障害活性を有するほか、腫瘍免疫を促進して抗腫瘍作用を示す可能性が考えられる。CapillarisinおよびCapi-N-lysの*in vitro*での細胞増殖抑制作用機序は現在不明であるが、Capi-NおよびCapi-N-lysはcapillarisinおよびCapi-Sと異なり、培養後の細胞数を接種細胞数以下に減少させないことから、その作用機序は異なることが考えられる。これらの薬物の*in vivo*における抗腫瘍作用機序の詳細についてはさらに検討が必要である。

文 献

- 1) 徐 強, 手島浩慈, 崔 沫亨, 森 裕志, 江田昭英, 西岡五夫: 数種生薬の抗腫瘍作用についての検討, 和漢医薬学会誌 **3**, 31-36, 1986.
- 2) Mori, H., Xu, Q., Sakamoto, O., Uesugi, Y., Ono, Y., Koda, A. and Nishioka, I.: Immunological mechanisms of antitumor activity of some kinds of Chinese herbs. Meth A-induced delayed type hypersensitivity. *Japan. J. Pharmacol.* **48**, 37-46, 1988.
- 3) 徐 強, 坂本修身, 森 裕志, 江田昭英, 西岡五夫: 数種生薬の抗腫瘍作用についての検討, 和漢医薬学会誌 **4**, 278-279, 1987.
- 4) 徐 強, 稲垣直樹, 森 裕志, 江田昭英: 数種生薬の抗腫瘍作用についての検討, 和漢医薬学会誌 **2**, 550-551, 1985.
- 5) 茵陳蒿, “中薬大辞典 下冊”(江蘇新医学院編), 上海科学技术出版社, 上海, pp. 1588-1591, 1977.
- 6) Komiya, T., Tsukui, M. and Oshio, H.: Capillarisin, a constituent from *Artemisia capillaris* HERBA. *Chem. Pharm. Bull.* **23**, 1387-1388, 1975.
- 7) 木曾良信, 小笠原祥子, 広田桂子, 渡部教子, 大島吉輝, 今野長八, ヒキノヒロシ: 茵陳蒿の肝障害抑制成分, 日本薬学会103年会講演要旨集, p. 269, 1983.