イカ甲骨の抗腫瘍性物質について—I^{*1}

試料の調製と抗腫瘍活性

奥 谷 康 一

(1975 年 12 月 2 日受理)

An Antitumor Substance Obtained from the Internal Shell of Squid—I
Isolation Procedures and Antitumor ActivityKoichi OKUTANI^{*2}

The internal shell of squid was extracted with hot M/100 EDTA after washings with acetone and hot water. The crude extract was obtained by dialysing the EDTA extract against water followed by freeze-drying.

The crude extract exhibited antitumor activity for mouse sarcoma-180 (ascites type). Upon intraperitoneal injection of 10 mg/kg/day $\times$ 5 and 50 mg/kg/day $\times$ 5 of this material, the growth of mouse ascites carcinoma was inhibited by 43.7 per cent and 55.1 per cent respectively.

The homogeneity of the crude extract was determined by column chromatography on CPG10-170 and Sephadex G-200. The data suggested that the polysaccharide was separated from the protein and that both the polysaccharide and the protein were heterogenous.

Chemical analysis showed that the crude extract contained 6.2 per cent N, 17.2 per cent sugar, 45.3 per cent protein, and 20.5 per cent ash.

イカ甲骨は主成分として石灰質を含み,¹⁾ また甲周辺にはキチン質から成る外縁を保有している。^{2,3)} そして他の多くの生物の骨と同様少量成分として多糖および蛋白質, またはそれらの複合体を含有しているものと思われる。

著者は、イカ甲骨から EDTA により抽出される物質が多糖を含み、マウス Sarcoma-180 に対して抗腫瘍活性のあることを見出した。近年、植物多糖体に抗腫瘍活性のあることが注目されており特に茸類から抽出される多糖体に関する研究は進んでいる。^{4,5)} 著者は、イカ甲骨から抽出される物質が示す抗腫瘍活性の本体がこれに含まれる多糖体ではないかと考え、研究を進めた。

実験材料および方法

試料の調製 イカ甲骨を良く風乾した後粉砕機にかけて碎き、まずアセトンで洗滌した。次いで風乾によりアセトンを除いた後熱水で洗滌した。このようにしてイカ甲骨を処理した後 M/100 EDTA (2Na) を加え加熱して抽出される区分を集め飽和水酸化バリウム水溶液を加えた。生じた沈澱物を濾過により集め、脱イオン水で洗滌した後 M/100 EDTA (2Na) で再溶解する区分を集めて水で透析した。透析内液は濾過 (Whatman GFC) を行なった後その濾液を凍結乾燥して得られた淡褐色粉末を今回の実験の試料として用いた。これらの操作を Fig. 1 にまとめた。

化学分析 試料の N および灰分含有量の測定は、CHN-corder (柳本 MT-1) で行なった。多糖はフェ

^{*1} 香川大学農学部庵治臨海実習施設業績第 2 号

^{*2} 香川大学農学部 (Faculty of Agriculture, Kagawa University, Kagawa 761-07, Japan)

Fig. 1. Isolation procedures of an antitumor substance from the internal shell of squid.

Table 1. Criteria for evaluation of activity

	Activity			
	—	+	卄	卅
S-180A, (T/C%)	100-66	65-41	40-11	10-0
EAC				
NFS (T/C%)	100-71	70-51	50-21	20-0

The tumor growth (T/C%):

$$\frac{\text{The mean value of treated group}}{\text{That of control}} \times 100$$

ノール硫酸法,⁸⁾ 蛋白質は銅-Folin 法⁷⁾ および 280 nm における吸光度からそれぞれ定量を行なった。

ゲル濾過 CPG10-170⁹⁾ および Sephadex G-200 を用いカラムクロマトを行なった。カラムの void volume (V_0) は Blue dextran 2000 を用いて測定を行なった。

Cetyltrimethylammonium chloride (CTAC) による分別 試料水溶液 5 ml に 5% CTAC 1 ml を加え 1 夜放置後、不溶物を濾過により除

き (Whatman GFC), 多糖をフェノール硫酸法で定量した。CTAC 処理前後の多糖量の差から酸性多糖量を求めた。

抗腫瘍活性 腫瘍は、マウス Sarcoma-180 腹水型 (S-180A), Ehrlich carcinoma 腹水型 (EAC) および Nakahara-Fukuoka-sarcoma 固型 (NFS) を用いた。実験動物には ddy 系マウス (体重約 20 g) を用い、試料は腫瘍移植後 24 時間目より 1 日 1 回 5 日間腹腔内に投与した。S-180A および EAC の実験では、腫瘍移植後 7 日目に腹水を採り容量および細胞比を測定し総細胞容積 (Total packed cell volume, TPCV) を算出した。そして腫瘍増殖率 (処置群と対照群の比) により効果を判定した。NFS の実験では、腫瘍

Table 2. Chemical composition of the crude extract

Components	Contents in per cent of the crude extract
N	6.2
Sugar (as glucose)* ¹	17.2
Protein (as bovine serum albumin)* ²	45.3
Ash	20.5

*¹ By the phenol sulfuric acid method.

*² By the LOWRY et al. method

Fig. 2. CPG 10-170 column chromatography of the crude extract.

Twenty milligrams of the crude extract were dissolved in 2 ml of water (A) or in 4 ml of 5% trichloroacetic acid (B). After filtration (Whatman GFC), the solutions were applied to the column (2.0×40 cm) and fractionated with water at a flow rate of 2 ml/min. Each 5 ml fractions was collected and analyzed.

Sugar was determined by the phenol sulfuric acid method (—). Protein was determined by the absorbance at 280 nm (---), and by the method of LOWRY et al. (---).

Void volume of the column (V_0) was indicated by an arrow.

Fig. 3. Sephadex G-200 column chromatography of the crude extract.

Two hundred milligrams of the crude extract were dissolved in 10 ml of 1 M-NaCl solution. After filtration (Whatman GFC), the solution was applied to the column (4.8×89 cm) and fractionated with 1 M-NaCl at a flow rate of 26 ml/hr. Each 10 ml fractions was collected and analyzed.

Sugar was determined by the phenol sulfuric acid method (—). Protein was determined by the absorbance at 280 nm (---), and by the method of LOWRY et al. (---).

Void volume of the column (V_0) was indicated by an arrow.

移植後 10 日目に腫瘍を摘出しその重量を測定して腫瘍増殖率により効果を判定した。抗腫瘍活性の表示は Table 1 によつた。

実験結果および考察

試料の調製方法は Fig. 1 に示すとおりであるが、10 kg の原料からおよそ 1 g の粗抽出物が得られた。粗抽出物は淡褐色粉末で水に溶かすと不溶物が残り、また濃厚溶液は乳濁色を呈した。粗抽出物はフェノール硫酸法および銅-Folin 法に陽性を示すと共に 280 nm での吸収が認められた。この物質を化学分析した結果を Table 2 に示した。この結果から粗抽出物には蛋白質と灰分の占める割合が多いことがわかる。また S 含有量について予備的に行なつた測定結果、1% 以下であつた。

次に粗抽出物の構成成分をゲル濾過法により調べた。多孔質ガラス粒子 CPG10-170³⁾ によるカラムクロマトグラフィーの結果を Fig. 2 に示した。多糖および蛋白質から成るピークが V₀ 付近に溶出されたが (A)、試料をあらかじめ 5% トリクロル酢酸に溶解しその不溶物を除去してから CPG10-170 カラムにのせた場合には、V₀ 付近に多糖のみが溶出されここでは蛋白質は検出されなかつた (B)。トリクロル酢酸で処理した場合には、多糖の溶出が終りに近づいた溶出容積付近から 280 nm の強い吸収および銅-Folin 法による発色の妨害が認められた。これはトリクロル酢酸によるものである。一方、多糖の溶出パターンは不均一性を示した。多糖の溶出された分画を集め、脱イオン水に透析した後凍結乾燥を行なつて白色粉末を得た。以上の結果から粗抽出物に含まれる多糖は蛋白質とは複合体を形成していないものと思われる。

Sephadex G-200 カラムクロマトグラフィーによる結果を Fig. 3 に示した。V₀ 付近に多糖と蛋白質、それらよりずつとおくれて蛋白質画分がさらに溶出された。多糖画分は V₀ 付近に溶出された他にはほぼ全溶出域に亘つて溶出され、分別は不十分であつた。これは多糖画分の不均一性を示しているものと思われる。これに比べ、蛋白質画分は分子量の大きい群と小さい群とに分別された。

次に CTAC による分別法を用いて酸性糖の存

Table 3. Fractionation of the crude extract by cetyltrimethylammonium chloride

Experiments	Sugar contents (OD at 490 nm)	
	Total	Acidic
I.	0.229	0.035
II.	0.162	0.042

To the crude extract solution was added 5% aqueous solution of cetyltrimethylammonium chloride to precipitate the acidic polysaccharide as an insoluble complex, which was removed by filtration (Whatman GFC). The clear filtrate was then subjected to the sugar analysis by the phenol sulfuric acid method.

Table 4. Antitumor activity of the crude extract from internal shell of squid

Tumor	Drugs	Dose (mg/Kgxdays)	Rout	Number of mice	Mean±SE. ¹⁾	Tumor growth ²⁾ T/C%	Activity
S-180A	Sample	10×5	ip	7	0.83±0.22	56.3	+
		50×5	ip	7	0.66±0.13	44.9	+
	Control	×5	ip	10	1.48±0.11	*	*
EAC	Sample	10×5	ip	7	1.14±0.41	68.7	—
		50×5	ip	7	1.61±0.40	97.0	—
	Control	×5	ip	10	1.66±0.12	*	*
NFS	Sample	10×5	ip	10	2.16±0.36	144	—
		50×5	ip	10	1.79±0.31	119	—
	Control	×5	ip	10	1.50±0.46	*	*

¹⁾ S-180A and EAC: Total packed cell volume. NFS: Tumor weight.

²⁾ The tumor growth T/C%: $\frac{\text{The mean value of treated group}}{\text{That of control}} \times 100$

在の有無を調べたところ Table 3 に示すように量的には少ないと思われるがその存在が推定された。粗抽出物に酸性糖が含まれていることは DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーにおける結果からも推定されたが、このことに関しては統報でのべる。

粗抽出物の抗腫瘍活性を Table 4 に示した。S-180A に対しては 10 mg の投与で 43.7%, 50 mg の投与で 55.1% の抑制を示し、投与量を増すことにより活性の増大が期待されるのでさらに今後、投与量を増大した実験を行ない検討する必要がある。また EAC に対しては抑制効果は期待できないように思われる。NFS に対してはむしろ腫瘍の増殖を促進さす効果が得られた。ここで得られた結果からは抗腫瘍活性のスペクトラムは狭く活性も弱いように思われるが、今後 S-180A で得られた抗腫瘍活性の本体について試料の精製を行なつて調べてゆくつもりである。

要 約

イカ甲骨を粉碎後アセトン、次いで熱水で洗滌した後、EDTAにより抽出される物質はマウス Sarcoma-180 (腹水型) に対して 10 mg×5 回投与で 43.7%, 50 mg×5 回投与で 55.1% の抑制率を示した。この物質の均一性について CPG10-170 および Sephadex G-200 カラムクロマトグラフィーを用いて調べたところ多糖および蛋白質が分離されると共にそれぞれが不均一であつた。化学分析の結果 N=6.2%, 糖=17.2%, 蛋白質=45.3%, 灰分=20.5% をそれぞれ含んでいた。

文 献

- 1) 谷田専治: 水産動物学 (水産学全集第8巻), 第3版, 恒星社厚生閣, 東京, 1973, pp. 171-176.
- 2) P. W. KENT: in "Comparative Biochemistry" (ed. by M. FLORKIN and H. S. MASON), Vol. VII, Academic Press, New York, 1964, pp. 97-100.
- 3) 松島祥夫: 多糖生化学 (江上不二夫監修), 1, 共立出版, 東京, 1971, pp. 398.
- 4) 塚越 茂: 化学と生物, 13, 578-582 (1975).
- 5) 西川嘉広: ファルマシア, 8, 543-548 (1974).
- 6) 富士川竜郎・塩見道夫・向井 直・和田正太: 農化誌, 48, 483-491 (1974).
- 7) 日本化学会編: 実験化学講座 23, 第2版, 丸善, 東京, 1963, pp. 37-39.
- 8) Electro-Nucleonics, INC.: Operation instructions, CPG10 controlled pore glass, Electro-Nucleonics, INC., U.S.A. 1973.