薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
105 (2) 188-193 (1985)

米糠由来抗腫瘍性多糖 RBS に関する研究 (第 1 報)

製法, 物理化学的性質及び生物活性について

伊藤悦男,^a 竹尾 駿,^b 加戸久生,^b 山本久夫,^b 渡辺信宏,^{*,b}

上村 稔,^b 相馬英一,^b 打田輝一,^b 森 義忠,^b 森永 豪^c

琉球大学医学部第一病理学教室,^a サッポロビール(株),^b

ダイセル化学工業(株)^c

Studies on an Antitumor Polysaccharide RBS Derived from Rice

Bran. I. Preparation, Physico-chemical Properties, and Biological Activities of RBS

ETSUO ITO,^a SUGURU TAKEO,^b HISAO KADO,^b HISAO YAMAMOTO,^b

NOBUHIRO WATANABE,^{*,b} MINORU KAMIMURA,^b EIICHI SOMA,^b

KIICHI UCHIDA,^b YOSHITADA MORI,^b

and TSUYOSHI MORINAGA^c

Department of Pathology, School of Medicine, University of the Ryukyus,^a 207, Uehara,

Nishihara, Okinawa, 903-01, Japan, Sapporo Breweries Ltd.,^b 10, Okatome, Yaizu,

Shizuoka, 425, Japan, and Daicel Chemical Industries Ltd.,^c 1239, Shinzaikai,

Aboshi-ku, Himeji, Hyogo, 671-12, Japan

(Received September 3, 1984)

An antitumor polysaccharide, RBS (rice bran saccharide), has been prepared from rice bran with hot water extraction. Potent antitumor activities against sarcoma-180 solid tumors were observed not only by intraperitoneal administration but also by oral administration of purified RBS (RBS₈₀F₁).

Physico-chemical properties of RBS₈₀F₁ are as follows; (1) it is a white powder and soluble in water, (2) pH of the aqueous solution is neutral, (3) it is a glucan constructed by glucose as a sole sugar component, (4) it has α -1 $\rightarrow$ 6-glucosidic bond as a main frame including a small amount of α -1 $\rightarrow$ 4-glucosidic bond, (5) it contains a small amount of protein and minerals connecting to the polysaccharide, and (6) its molecular weight is over one million.

Since it has been known little that α -glucan has potent antitumor activities, the fact mentioned above would be interesting to think about the relationship between structure and biological activities of polysaccharides. Antitumor activities of RBS₈₀F₁ are thought to be a kind of host mediated action that stimulates the immunological activities of the host, because the substance had no cytotoxic activity against an animal cell line *in vitro*. No acute toxicity against rats was observed in the case of oral administration of crude RBS (RBS₈₀).

Keywords—rice bran; polysaccharide; rice bran saccharide (RBS); antitumor substance; immunopotentiator; hot water extract; α -1 $\rightarrow$ 6-glucan; sarcoma-180

免疫賦活作用による抗腫瘍性物質として天然物由来のものは数多く研究され、その一部はすでに医薬品として実用化されている。微生物菌体又はその細胞壁、キノコ類がよく研究され、また最近では海草、海中動物等の成分にまで研究が及んでいる。

一方高等植物の植物体成分からの抗腫瘍性物質の検索を目的とした研究例は数少ない。¹⁾ 著者ら^{2,3)}は米糠、ふすま、ハトムギ、ヒエ等の抽出物の抗腫瘍性についてマウスの同種腫瘍 sarcoma-180 を検定系としてスクリーニング研究をしてきたが、米糠の熱水抽出物の多糖画分に腹腔投与のみならず経口投与でも強い活性を有する成分が存在することを見出し、rice bran saccharide に因んで RBS と命名した。本研究はそれを受けてその製法、物

理化学的性質, 抗腫瘍性, 各種免疫系に及ぼす影響, 感染防御作用等について研究を展開し, 興味ある結果を得ている.⁴⁾

本報では RBS の製法, 物理化学的性質及び抗腫瘍活性を中心とする若干の生物活性について報告する.

なお, 米糠のアルカリ抽出法により得られる抗腫瘍性物質については別途報告する予定である.

実験の部

粗 RBS の抽出及びエタノールによる分画 Fig. 1 に示す方法で調製した. 即ち, 24 メッシュの篩で碎米等の夾雑物を除いた市販の米糠 2 kg に水 10 l を加えて攪拌しながら加熱し, $100^{\circ}\text{C}\cdot 5\text{ h}$, 次いで加圧下に $120^{\circ}\text{C}\cdot 1\text{ h}$ 抽出を行う. 抽出液の液温を 70°C に下げてから α -アミラーゼ 15 mg (長瀬・結晶 α -アミラーゼ) を加えて 1 h 保つ. 冷却後遠心濾過により固液分離し, 得られた抽出液を 1/3 に濃縮後 pH を 6.8 に調節し, 上記 α -アミラーゼをさらに 35 mg 加えて $70^{\circ}\text{C}\cdot 15\text{ h}$ 保った後酵素を失活させるために $100^{\circ}\text{C}\cdot 2\text{ h}$ 加熱する. 冷却後遠心分離にて清澄液を得る. これに最終濃度が 30% (v/v) になるようにエタノールを加え生じた沈澱を遠心分離にて集め, 水に再溶解後再度遠心分離を行い沈澱部 (RBS_p) 及び水溶部 (RBS₃₀) に分けた. 一方 30% エタノール沈澱上澄部にさらに最終濃度が 60% になるようにエタノールを加え遠心分離にて沈澱部 (RBS₆₀) 及び上澄部 (RBS_s) に分け, それぞれの画分を濃縮, 凍結乾燥して粗 RBS として 4 標品を得た.

粗 RBS (RBS₃₀) のゲル濾過による分画 粗 RBS 中のエタノール濃度 30% で沈澱する水溶性画分 RBS₃₀ の 5% 水溶液を 10000 rpm $\cdot$ 10 min 遠心分離して得られた上澄液を水を溶出液として Sepharose CL-6B のカラムにかけてゲル濾過し void volume に溶出する画分及びおくらて溶出する画分をそれぞれ集めて濃縮, 凍結乾燥して RBS₃₀F₁, RBS₃₀F₂ とした.

抗腫瘍活性の検定 1) Sarcoma-180 腹水型腫瘍を用いた Total Packed Cell Volume (TPCV) 法 (腹腔投与)——星ら⁵⁾ の方法に従った. 即ち 1 群 6 匹, 4 週齢メスの ICR マウス (日本チャールスリバー) の腹腔内に同上マウスで継代された sarcoma-180 細胞 (国立がんセンター薬効試験部由来) を 1×10^7 cells/mouse 移植し, 翌日から 5 日間生理食塩水に溶解したサンプル (対照群は生理食塩水のみ) を腹腔内に投与し, 細胞移植 7 日後に

Fig. 1. Preparation of Crude RBS from Rice Bran

マウスを殺して全腹水を集め、ヘマトクリット遠心器にて遠心分離をし癌細胞含有率を求め、TPCVを算出する。試験群と対照群のTPCVの比から阻止率を算出する。

2) 皮下移植 Sarcoma-180 固型腫瘍に対する抗腫瘍活性 (腹腔投与)——1群 10 匹, 6 週齢メスの ICR マウスの右腋下皮下に同上マウスの腹腔内で継代された sarcoma-180 細胞 (同上由来) を 6×10^6 cells/mouse 移植し, 翌日から 10 日間生理食塩水に溶解したサンプル (対照群は生理食塩水のみ) を腹腔内に投与し, 30 日後マウスを殺し, 腫瘍部を摘出, 重量を測定して試験群と対照群の平均腫瘍重量比から阻止率を算出する。

3) 筋肉内移植 Sarcoma-180 固型腫瘍に対する抗腫瘍活性 (経口投与)——Sarcoma-180 細胞 (国立がんセンター化学療法部由来) をマウスの後足筋肉内に 1×10^6 cells/mouse 移植し, サンプルを経口で投与するほかは上記 2) と同様に処理する。

急性毒性 薬剤投与前 16 時間絶食せしめた 5 週齢オスの SD 系ラット (日本チャールスリバー) 体重 120—135 g のもの 1 群 10 匹を用い, 濃度 30% で蒸留水に懸濁した RBS₈₀ を 5 ml/100 g 体重の割合で胃ゾンデを用いて強制的に経口投与した。投与直後より 7 日間にわたり, 一般状態及び生死を観察し, 7 日目に致死せしめ剖検を行った。

結 果

粗 RBS の抗腫瘍活性及び分画

実験の部で述べた方法で調製した粗 RBS の抗腫瘍活性を TPCV 法により調べた結果を Table I に示す。Table I から明らかなように 30% エタノールで沈澱させた水溶性の画分に強い活性が認められたのでこの画分 RBS₈₀ の精製を試みた。RBS₈₀ 水溶液を Sepharose CL-6B にてゲル濾過したときの溶出パターンを Fig. 2 に示す。Void volume に溶出する画分 F₁ と, おくれて溶出する画分 F₂ に 2 分された。それぞれの画分を集めて凍結乾燥し, 前者を RBS₈₀F₁, 後者を RBS₈₀F₂ とした。その存在比はおよそ 7:3 であった。

RBS₈₀ の抗腫瘍活性

Fig. 2 に示す方法で分画した RBS₈₀F₁ 及び RBS₈₀F₂ の抗腫瘍活性を皮下移植 sarcoma-180 固型腫瘍に対する抗腫瘍性 (腹腔投与) で調べた結果を Table II に示す。Table II から明らかなように RBS₈₀ を Sepharose CL-6B でゲル濾過したとき, void volume に溶出する水溶性画分に強い活性が認められたのでこの画分 RBS₈₀F₁ を精製 RBS として以後の実験に供した。

RBS₈₀F₁ の物理化学的性質

外観は白色の粉末で特定の融点を示さず, 水溶性で水溶液の pH は中性を示す。ジメチルスルホキシド, ホルムアミド等には溶けるが一般の有機溶媒に

TABLE I. Antitumor Activity of Crude RBS against Ascites Form of Sarcoma-180

Sample	Dose (mg/kg)	Average TPCV (ml±S.E.)	Inhibition ratio (%)
Control (Saline)	—	1.90±0.18	—
RBSp	10	1.14±0.22	40
	100	0.72±0.20	62
RBS ₈₀	10	0.29±0.15	85
	100	0.15±0.12	92
RBS ₈₀	10	1.20±0.20	37
	100	1.08±0.18	43
RBSs	10	1.71±0.30	10
	100	1.52±0.25	20

Tumor cells (1×10^7 cells/mouse) were inoculated intraperitoneally on day 0.

Six mice were used in each group.

Each sample was injected intraperitoneally on day 1, 2, 3, 4, and 6.

Fig. 2. Gel Filtration of RBS₈₀ on Sepharose CL-6B

Column: Sepharose CL-6B (40×1000 mm).

Eluant: Distilled water, 30 ml/h.

One fraction: 15 ml.

Sugar: Sugar detected by a phenol sulfuric acid method.

は不溶である。フェノール硫酸反応、ローリー・フォーリン反応等が陽性でエルソン・モルガン反応、ヨード反応が陰性であることから、でんぷんとは異なり、アミノ糖を含まず、タンパク質を含んだ多糖と推定され、以下の実験によりそれを確認した。

1) 元素分析値 島津 CHN アナライザー、モデル CHN-1A で分析した結果, C, 39.75; H, 6.13; N, 0.25; 灰分, 2.35 を示し、無機元素としては K, Na, Cl, Mg, Ca, P, Si 等を含んでいた。

2) IR 吸収スペクトル 日立-285 型赤外線分光光度計を用い KBr 錠剤法で測定した結果, 750, 850, 920 cm^{-1} 付近に比較的強い吸収があり, 890 cm^{-1} 付近に吸収がないなど α -結合をもった糖に特徴的な吸収パターンを示した。

3) UV 吸収スペクトル 日立 200-20 型紫外線分光光度計で測定したところ特異な吸収パターンは示さなかった。

4) 比旋光度 日本分光 DIP-4 型で測定したところ $[\alpha]_D^{20} = +142 \rightarrow +145^\circ$ (H_2O) を示し、この糖の α -結合の可能性を示唆している。

5) 糖組成 ギ酸-硫酸による完全加水分解物を薄層クロマトグラフィー (Merck, Kieselgel 60F₂₅₄) にて下記に示す 4 種の展開溶媒を用いて分析した結果いずれの場合でもグルコースのスポットのみを検出した。a) 酢酸エチル：メタノール：酢酸：水 (65：15：10：10), b) 酢酸エチル：イソプロパノール：水 (65：23：12), c) イソプロパノール：ピリジン：水：酢酸 (8：8：4：1), d) *n*-ブタノール：ピリジン：水 (6：4：3)。

6) 糖及び蛋白含量 フェノール硫酸法により測定した糖含量はグルコース換算で 92.5%, ローリー・フォーリン法による蛋白含量は 1.5% であった。

7) ^{13}C -NMR JNM FX90Q 核磁気共鳴スペクトルスペクトロメーター (日本電子) にて 22.50 MHz, D_2O 中で測定した。内部標準としてジオキサン (外部標準 TMS より 66.90 ppm) を用いた。Fig. 3 に示したスペクトルにおいて、アノメリック炭素に帰属される δ 100.77 ppm, δ 98.88 ppm のシグナルの $^1J_{\text{CH}}$ がそれぞれ 172.0 Hz, 172.1 Hz を示すことによりすべての結合が α -配位であることが明らかである。また C-6 位に帰属される δ 66.99 ppm, δ 61.73 ppm のシグナルのうち、前者は α -D-グルコースの文献値⁹⁾ δ 61.7 ppm と比較してグリコ

Fig. 3. ^{13}C -NMR Spectrum of RBS₃₀F₁

TABLE II. Antitumor Activity of RBS₃₀ against Solid Form of Sarcoma-180

Sample ^{a)}	Dose (mg/kg)	Average tumor weight (g $\pm$ S.E.)	Inhibition ratio (%)
Control (Saline)	—	5.35 $\pm$ 2.30	—
RBS ₃₀ F ₁	10	2.58 $\pm$ 2.26	51.8 ^{b)}
	30	2.14 $\pm$ 1.86	60.0 ^{c)}
	100	2.80 $\pm$ 2.30	47.7 ^{b)}
RBS ₃₀ F ₂	10	5.08 $\pm$ 2.43	5.0
	30	4.80 $\pm$ 2.36	10.3
	100	4.96 $\pm$ 2.38	7.3

Tumor cells (6×10^6 cells/mouse) were inoculated subcutaneously on day 0.

Ten mice were used in each group.

a) Each sample was injected intraperitoneally on day 1 to 10.

Statistically significant, b) $p < 0.05$, c) $p < 0.01$.

TABLE III. Antitumor Activity of RBS₃₀F₁ against Solid Form of Sacoma-180 by Oral Administration

Sample ^{a)}	Dose (mg/kg)	Average tumor weight (g $\pm$ S.E.)	Inhibition ratio (%)
Control (Saline)	—	12.1 $\pm$ 3.8	—
RBS ₃₀ F ₁	10	6.1 $\pm$ 6.0	49.6 ^{c)}
	30	5.4 $\pm$ 3.7	55.4 ^{d)}
	100	6.7 $\pm$ 5.8	44.6 ^{c)}
5-FU ^{b)}	30	5.0 $\pm$ 3.0	58.7 ^{d)}

Tumor cells (1×10^6 cells/mouse) were inoculated intramuscularly on day 0.

Ten mice were used in each group.

a) Each sample was administered orally on day 1 to 10.

b) 5-FU: 5-Fluorouracil, as a positive control.

Statistically significant, c) $p < 0.05$, d) $p < 0.01$.

シル基に置換された C-6 位と考えられ α -1 $\rightarrow$ 6 グルカンの文献値⁹⁾ δ 66.7 ppm とよく一致する。また C-2—5 位に帰属されるシグナルのうち、 δ 78.52 ppm のものはアミロースの文献値⁹⁾ δ 78.4 ppm と一致し α -1 $\rightarrow$ 4 グルカンの 4 位と考えられる。この結果から RBS₃₀F₁ のグルコースの結合様式は α -1 $\rightarrow$ 6 結合を主とし少量の α -1 $\rightarrow$ 4 結合を含有することが明らかとなった。

RBS₃₀F₁ の経口投与による抗腫瘍活性

RBS₃₀F₁ の経口投与による筋肉内移植 sarcoma-180 固型腫瘍に対する抗腫瘍活性を Table III に示す。Table III から明らかなように経口投与においても 30 mg/kg 付近に至適投与量をもち、positive control として用いた 5-FU に匹敵する抗腫瘍活性を有していることが分かった。

急性毒性

物理的最大投与可能量の 15 g/kg の RBS₃₀ を経口投与した場合でも死亡例は 1 例もみられず、LD₅₀>15 g/kg であった。また 7 日間の観察期間で一般状態に変化はみられず、体重増加も順調であった。また屠殺例の剖検でも肉眼的異常は全く認められなかった。以上の結果により RBS₃₀ のラットでの経口急性毒性はないものと推察される。

その他の生物活性

1) 直接細胞傷害活性 マウスの C3H-2K 細胞の SV40 腫瘍転換細胞の *in vitro* 培養細胞に対する傷害活性を直接検鏡法⁷⁾ で調べた結果、RBS₃₀F₁ は 1000 μ g/ml 以下の濃度ではほとんど傷害活性を示さないことが分かった。

2) 変異原性 Ames の方法に準拠した試験法⁸⁾ にて、被験菌として *Salmonella typhimurium* TA-98, TA-100 及び *Escherichia coli* WP2 hcr 株を用いて、S9 添加による代謝活性化の有無の条件で試験したが、RBS₃₀F₁ は全く変異原性を示さなかった。

3) 抗菌活性 被験菌として *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, 及び *E. coli* を用い寒天ディスク法にて検定したところ RBS₃₀F₁ は全く抗菌活性を示さなかった。

考 察

米糠から生理活性を有する多糖 RBS を抽出し、その物理化学的性質のいくつかを明らかにし、抗腫瘍活性を中心とした若干の生理活性について報告した。RBS の米糠からの抽出条件を抗腫瘍活性を指標として種々検討したが、本報で述べた方法が最も安定して収率よく抗腫瘍性多糖を抽出できることが分かった。本報によれば原料の米糠の種類（品種、産地、収穫年度）によらず一定規格のサンプルが抽出できる。

精製された RBS である RBS₃₀F₁ の糖組成はグルコースのみから成る、 α -1 $\rightarrow$ 4 結合を少量含む α -1 $\rightarrow$ 6 グルカンと判明した。このような α -1 $\rightarrow$ 6 グルカンが経口投与でも有効な抗腫瘍活性を有することは従来知られていない。RBS₃₀F₁ と似た糖の結合様式をもつ α -グルカンとしてデキストランがよく知られているが、この物質は抗腫瘍活性のような生理活性は知られておらず、むしろ生理活性をもたない特徴を生かして代用血漿として多用されている。⁹⁾ 抗腫瘍活性を有するグルカンとしてすでに多くの物質が報告されているが、それらの物質の糖の結合様式はほとんどが β -結合を主体に構成されている。¹⁰⁾

RBS₃₀F₁ は少量のタンパク質と無機質を含有しているが、これはゲル濾過によっても分離しないところから多糖体に何らかの形で結合しているものと考えられる。プロナーゼ処理にセバーク法¹¹⁾を併用することにより RBS₃₀F₁ を完全に除タンパクすることは可能であるが、完全除タンパクされた RBS₃₀F₁ は除タンパク前の RBS₃₀F₁ と変らない抗腫瘍活性を示す（未発表）ことから、タンパク質は活性には関与していないものと推察される。無機質の存在意義については不明であるが制癌活性の発現に必要な多糖のコンホメーションの維持に関与しているのではないかと考えられ、その存在形態とあわせて現在検討中である。

粗 RBS、精製 RBS とともにデシケーター中に保存しておけば常温で少なくとも 2 年以上は生物活性を維持して安定であった。

RBS₃₀F₁ は *in vitro* 培養細胞に対して直接傷害活性をもたないことから、本物質の示す抗腫瘍活性は宿主の免疫能を賦活することによる間接的作用であることが推察される。ただし精製の初期段階では *in vitro* 培養細胞に対する傷害活性が観察され、この直接作用と間接作用との相乗効果により、Table I にみられるように TPCV 法

では強い抗腫瘍活性が出現したのではないかと推察される。

RBS₃₀F₁ の詳細な構造, 各種同系腫瘍に対する腹腔投与, 経口投与による抗腫瘍効果, 化学療法剤との併用効果, 各種免疫系に及ぼす影響及び感染防御作用等については追って報告する予定である。

謝辞 本研究を進めるにあたりご指導, ご鞭撻を賜わった癌研 塚越 茂先生, 国立がんセンター 新田和男先生, 星 昭夫先生, 及び帝京大学 古江 尚先生に深甚の謝意を表します。

引用文献及び注

- 1) 馬場賢典, 安部 茂, 水野伝一, 薬誌, **101**, 538 (1981).
- 2) E. Ito, 第 35 回日本癌学会総会記事, 東京, 1976, p. 137; 伊藤悦男, 第 66 回日本病理学会総会, 岡山, 1977, p. 153; 伊藤悦男, 第 36 回日本癌学会総会記事, 東京, 1977, p. 158.
- 3) 伊藤悦男, 琉球大学保健学医学雑誌, **1**, 198 (1978).
- 4) 相馬英一, 唐川卓郎, 伊藤悦男, 山岸和夫, 第 38 回日本癌学会総会記事, 東京, 1979, p. 211; 竹尾 駿, 森 義忠, 伊藤悦男, 山岸和夫, 第 39 回日本癌学会総会記事, 東京, 1980, p. 230; 竹尾 駿, 渡辺信宏, 森 義忠, 伊藤悦男, 山岸和夫, 第 40 回日本癌学会総会記事, 札幌, 1981, p. 237; 伊藤悦男, 竹尾 駿, 渡辺信宏, 森 義忠, 河合公利, 菅原邦雄, 森永 豪, 第 41 回日本癌学会総会記事, 大阪, 1982, p. 252.
- 5) 星 昭夫, 樽谷和夫, ファルマシア, **9**, 464 (1973).
- 6) P. Colson, H. J. Jennings, I. C. P. Smith, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 8081 (1974).
- 7) M. Munekata, A. Takatsuki, K. Onodera, G. Tamura, *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1843 (1981).
- 8) 白須泰彦, 吐山豊秋編, “毒性試験ハンドブック”, フジ・テクノシステム, 東京, 1980, p. 221.
- 9) 原田篤也, 三崎 旭編, “総合多糖類科学 下”, 講談社, 東京, 1974, p. 536.
- 10) 水野 卓, 化学と生物, **21**, 473 (1983).
- 11) M. G. Sevag, D. B. Lackman, J. Smolens, *J. Biol. Chem.*, **124**, 425 (1938).