薬 学 雑 誌
YAKUGAKU ZASSHI
106 (2) 183-185 (1986)

治癌中薬に関する研究 (第3報¹⁾) 菱実中の HeLa 細胞に対する
細胞毒性成分について

小菅卓夫,^a 横田正実,^a 杉山 清,^{*,a} 岡本 厚,^a
斎藤正志,^a 山本藤輔^b
静岡薬科大学,^a 株式会社津村順天堂^b

Studies on Chinese Medicines Used for Cancer. III.¹⁾ Cytotoxic Constituent
against HeLa Cells in the Fruit of *Trapa bispinosa* ROXB.

TAKUO KOSUGE,^a MASAMI YOKOTA,^a KIYOSHI SUGIYAMA,^{*,a}
ATSUSHI OKAMOTO,^a MASASHI SAITO,^a
and TOSUKE YAMAMOTO^b

Shizuoka College of Pharmacy,^a 2-2-1, Oshika, Shizuoka, 422, Japan and
Tsumura Juntendo Co., Ltd.,^b 2-1-1, Nihonbashi-honcho,
Chuo-ku, Tokyo, 103, Japan

(Received September 18, 1985)

Gallic acid was isolated as a cytotoxic constituent from the fruit of *Trapa bispinosa* ROXB., by tracing the inhibitory activity against HeLa cells.

Keywords gallic acid; cytotoxic constituent; *Trapa bispinosa*; HeLa cell; Chinese medicine

中国において、癌に効果があると表明されている中薬の効果を、それらに含まれる成分の面より解明する目的で 91 種の中薬の制癌スクリーニングを行い、選択した中薬中 83% という高い確率で活性を認めた。²⁾

今回、スクリーニングの結果 HeLa 細胞に対し増殖抑制作用を認めた菱実より、細胞毒性成分を単離することができたので報告する。

菱はヒシ科 (Trapaceae) に属する一年草で、その果実を中医学では古来解毒、清暑解熱、益気、健脾の目的で用いているが、近年は癌の治療にも用いている。³⁾

菱実の制癌作用に関する研究は、すでに羽野,⁴⁾ 田中,⁵⁾ 糸川⁶⁾ らにより報告されている。しかしこれらいずれの研究においても、その作用本体は明らかにされておらず、興味が持たれていた。

我々は、HeLa 細胞に対する増殖抑制作用を指標に、分離と生物試験を同時に行い、菱実の水抽出エキス中より、作用本体として gallic acid を単離した。

菱実からの gallic acid の分離過程を Chart 1 に示した。Chart 1 中、() 内には各分画の収量を、また [] 内には HeLa 細胞増殖抑制作用を 50% 増殖抑制濃度 (IC₅₀) で示した。

Chart 1 に示したように、溶媒による分配を 2 回、ついで Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーを行い、分配係数 (*K_d*) 8—12 及び 12—16 の分画に活性成分を効果的に濃縮することができた。両分画はシリカゲル薄層クロマトグラフィーの結果同一の成分であることが示されたので、最終的に、両分画より得られる結晶性物質を合わせ水より再結晶し、gallic acid を菱実より 0.27% の収率で得た。

Chart 1 に示した水抽出エキス及び gallic acid の収量と活性より考えると、水抽出エキスの活性は gallic acid 単独で約 57% 説明されることになる。Gallic acid が非常に極性の高い成分であり、しかも数段階の分離過程を経て得られたものであることを考えると、菱実の水抽出エキスの活性は gallic acid 単独で充分説明できるものと思われたが、このことを確認する目的で高速液体クロマトグラフィーを行い、gallic acid を定量した。

その結果、水抽出エキス中に gallic acid が 4.6% 含まれることが明らかとなり、水抽出エキスの活性は gallic

Chart 1. Isolation of Gallic Acid from the Fruit of *Trapa bispinosa* ROXB.

() indicates yield, [] indicates IC₅₀ (μg/ml).

acid で説明できるものと思われた。

実 験 の 部

融点は柳本製 MP-S3 型で測定 (未補正)。赤外吸収 (IR) スペクトルは JASCO A-220, また ¹³C-核磁気共鳴 (¹³C-NMR) スペクトルは JEOL FX90 (tetramethylsilane を内部標準) で測定した。略語: s=singlet, d=dou-
blet。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は Waters 製の ALC/GPC 201 型を使用した。薄層クロマトグラフ
ィーは Merck 製 glass plate (silica gel, 60 plate, 0.25 mm) を用い, テトラヒドロフラン-ヘキサン (8 : 2) で展
開した。Sephadex LH-20 はファルマシア・ジャパン製を用いた。菱実是中国, 中医研究院, 中薬研究所より提
供された *Trapa bispinosa* ROXB. を用い, 果皮及び果肉を合わせ実験材料とした。HeLa 細胞増殖抑制作用は,
前報²⁾と同様の方法を用い検討した。

水抽出エキスの調製法 菱実を粉碎し, 10 倍量の精製水で沸騰水浴上 1 時間, 2 回抽出した。抽出液は合わ
せ汙過した後凍結乾燥した (H₂O ext.)。

酢酸エチル-水-プロパノールによる分配 水抽出エキス (15 g) を酢酸エチル-水-プロパノール (7 : 4 : 2,
v/v) の下層 2 l に懸濁し, 上層 2 l で 4 回抽出した。抽出液を合わせ減圧下で溶媒を留去し, 淡黄色粉末 (1.5 g)
を得た。同様の操作を 2 回行い, 30.6 g の水抽出エキスより Fr. 1 を 3.1 g 得た。

クロロホルム-メタノール-水による分配 Fr. 1 (3.1 g) をクロロホルム-メタノール-水 (19 : 19 : 12, v/v)
の下層 500 ml に懸濁し, 上層 500 ml で 2 回抽出した。抽出液は合わせ減圧下で溶媒を留去し, 淡黄色粉末 (2.3 g)
を得た (Fr. 1-1)。

Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー Fr. 1-1 (2.3 g) を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフ
(3.3 i.d.×28 cm) にかき, 2% 酢酸で溶出し, K_d 0-5, K_d 5-8, K_d 8-12, K_d 12-16 の 4 分画に分離した。さ
らに, 2% 酢酸で溶出するものがほとんどなくなった後, メタノールで溶出した。

Gallic Acid の同定 標品の gallic acid (和工純薬工業製の gallic acid を水から 2 回再結晶したもの) と, 融
点, IR スペクトル, ¹³C-NMR スペクトルを直接比較し同定した。mp 220-225°C (無色針状晶)。IR ν_{max}^{KBr} cm⁻¹:
3350, 1680, 1610, 1320, 1260, 1210, 1030. ¹³C-NMR (acetone-d₆) δ: 109.6 (d), 121.1 (s), 138.3 (s), 145.3 (s),
168.1 (s). Anal. Calcd C₇H₆O₅: C, 49.42; H, 3.56. Found: C, 49.35; H, 3.49.

HPLC の条件 Column: Nucleosil 5C₁₈ (4 i.d. × 250 mm), mobile phase: CH₃CN-H₂O (15 : 85) + oxalic acid (2.0 g/l), flow rate: 1.0 ml/min, detector: 紫外吸収 (280 nm). 本条件での gallic acid の保持時間は 3.7 分であった.

引 用 文 献

- 1) 第 2 報: T. Kosuge, M. Yokota, K. Sugiyama, M. Saito, Y. Iwata, M. Nakura, T. Yamamoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 5565 (1985).
- 2) 第 1 報: 小菅卓夫, 横田正実, 杉山 清, 山本藤輔, 俣 慕 雲, 嚴 述 常, 薬誌, **105**, 791 (1985).
- 3) 江蘇新医学院編, “中薬大辞典 (下),” 第 1 版, 上海科学技術出版社, 1978, pp. 1992—1993.
- 4) K. Hano, *Bull. Pharm. Res. Inst. Osaka*, **51**, 1 (1964).
- 5) 田中信寿, 増沢国泰, 入倉 勉, 日本薬学会第 89 年々会講演要旨集, 名古屋 1969, p. 324.
- 6) 糸川秀治, 渡辺謹三, 三原和彦, 竹谷孝一, 生薬, **36**, 145 (1982).