薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
108 (5) 458-460 (1988)

セスキテルペンラクトン類の研究 (第 14 報¹⁾) 2, 3 の天然多酸素含有
セスキテルペンラクトン類の *in Vitro* 細胞毒性について

是枝正人,^a 長岐正彦,^b 勝倉由樹,^b 速水健一,^b 松枝 澄*,^c

ミシガン大学,^a 弘前大学教養部,^b 松平天然物研究所^c

Studies on Sesquiterpene Lactones. XIV.¹⁾ *In Vitro* Cytotoxicities
of Some Highly Oxygenated Sesquiterpene Lactones

MASATO KOREEDA,^a MASAHICO NAGAKI,^b YUKI KATSUKURA,^b
KEN-ICHI HAYAMI,^b and SUMU MATSUEDA*,^c

Chemistry Department, The University of Michigan,^a Ann Arbor, Michigan 48109,
U.S.A., Department of General Education, Hirosaki University,^b Bunkyo-cho,
Hirosaki, Aomori, 036, Japan and Matsudaira Natural Products Research
Institute,^c Kamitakahata 1-chome, Nakagawa-ku, Nagoya, 454, Japan

(Received November 17, 1987)

Highly oxygenated natural sesquiterpene lactones, ezomontanin (I) and 11,13-dihydro derivative (II) of I having both 1,4- β -endoperoxide showed potent cytotoxicities against mouse leukemia L-1210/v/c and human carcinoma KB cells *in vitro*. Yomogiartemin (III) having α -methylene- γ -lactone also showed similar activity to I and II. 11,13-Dihydro derivative (IV) of III showed no cytotoxicities.

Keywords—sesquiterpene lactone; ezomontanin; 11,13-dihydroezomontanin; yomogiartemin; yamayomoginin; cytotoxicity; leukemia L-1210/v/c; carcinoma KB cell

前報¹⁾において、エゾヨモギ, *Artemisia montana* (NAKAI) PAMP から ezomontanin (I) 及び 11,13-dihydroezomontanin (II) を単離したことを報告した。I 及び II はその部分構造に 1,4- β -epidioxy 構造, すなわち, 通称 1,4- β -endoperoxide 構造を有し, かつ, I は α -methylene- γ -lactone であり, II はその飽和したものである。著者らは既に, 高知県産ヒメヨモギ, *A. feddei* LEV. et VAN. から yomogiartemin (III)²⁾ を, また福島県産ヤマヨモギ, *A. montana* から yamayomoginin (IV)³⁾ を単離した。III 及び IV はその部分構造に 1,2,3,4-diepoxy 構造を有し, III は α -methylene- γ -lactone であり IV はその飽和したものである。すなわち, I 及び II, III 及び IV は密接に関連した構造を有している。 α -Methylene- γ -lactone は *in vitro*, 培養系で細胞毒性を示すことが既に知られている。⁴⁾

マウスリンパ性白血病培養株 L-1210/v/c⁵⁾ に対する I, II, III 及び IV の細胞毒性を *in vitro*, 浮遊培養法で測定した。すなわち, おおのの量の検体を含む所定の培地中に一定数の L-1210/v/c の細胞を播種し, 37°C, 72 時間培養した後, 生細胞数を常法によってトリパンブルー染色法で計数し IC₅₀ 値を求めた。II の使用量 (μ g/ml) とそれに対する T/C (%) を Table I に示したが両者は直線的な負の相関関係を示し, IC₅₀=0.59 μ g/ml が求められた。同様に I 及び III の IC₅₀ 値はそれぞれ, 0.71 及び 0.66 μ g/ml であったが IV は活性を示さなかった (Table II 及び III)。なお, II, III 及び IV について, *in vitro*, KB 細胞に対しての効果は次の通りである。⁶⁾ II (JCI No. C-501), IC₅₀=13.0 μ g/ml; III (JCI No. C-499), IC₅₀=8.8 μ g/ml; IV (JCI No. C-500), IC₅₀>100 μ g/ml。すなわち, I—III は L-1210/v/c に対し, また, II 及び III は KB 細胞に対して, *in vitro*, 培養系で同じ傾向の細胞毒性を示した。⁷⁾ 特に注目される点は, II は α -methylene- γ -lactone の構造が飽和され失われているのにもかかわらず高い活性を呈する事である。これは 1,4- β -endoperoxide 構造の存在が活性に寄与している事を示唆する。一方, ergosterol-5,8- α -endoperoxide (V)⁸⁾ は既に *Cercospora kikuchii* MATSUMOTO et TOMOYASU の菌体から,⁹⁾ また, *A. feddei* LEV. et VAN. から^{2b)} 単離されているが, *in vitro*, 培養系で L-1210/v/c 細胞に対して IC₅₀=3.5 μ g/ml を示し, 同じく, 7-dehydrocholesterol-5,8- α -endoperoxide (VI) は L-1210/v/c 細胞に対して IC₅₀=11.7 μ g/ml

V: R = -CH(CH₃)-CH=CH-CH(CH₃)-CH(CH₃)₂
 VI: R = -CH(CH₃)-(CH₂)₃-CH(CH₃)₂

VII: R = -CH(CH₃)-CH=CH-CH(CH₃)-CH(CH₃)₂
 VIII: R = -CH(CH₃)-(CH₂)₃-CH(CH₃)₂

Chart 1

TABLE I. Effect of II on Mouse Leukemia L-1210/v/c Suspension Culture

Conc. of II ($\mu\text{g/ml}$)	Number of viable cells ($\times 10^4$ cells/ml)	T/C (%)
Control	197.83 $\pm$ 18.00	—
0.01	176.06 $\pm$ 10.86	88.99
0.05	172.69 $\pm$ 3.36	87.29
0.10	162.94 $\pm$ 1.59	82.36
0.20	152.06 $\pm$ 15.73	76.86
0.40	112.13 $\pm$ 4.59	56.68
0.80	71.63 $\pm$ 6.36	36.21
1.00	44.44 $\pm$ 5.11	22.46

TABLE II. Effect of I on Mouse Leukemia L-1210/v/c Suspension Culture

Conc. of I ($\mu\text{g/ml}$)	Number of viable cells ($\times 10^4$ cells/ml)	T/C (%)
Control	260.82 $\pm$ 20.81	—
0.01	230.50 $\pm$ 10.73	88.65
0.10	207.76 $\pm$ 9.38	79.66
1.00	94.32 $\pm$ 6.26	36.16
10.00	1.51 $\pm$ 0.25	0.54

TABLE III. Effect of III on Mouse Leukemia L-1210/v/c Suspension Culture

Conc. of III ($\mu\text{g/ml}$)	Number of viable cells ($\times 10^4$ cells/ml)	T/C (%)
Control	260.82 $\pm$ 20.81	—
0.01	237.94 $\pm$ 11.84	91.51
0.10	231.75 $\pm$ 13.88	89.13
1.00	76.13 $\pm$ 9.37	29.19
10.00	6.83 $\pm$ 0.75	2.45

ml 及び KB 細胞に対して $\text{IC}_{50}=12.3 \mu\text{g/ml}$ を示した。¹⁰⁾ かつ、V 及び VI の原化合物と考えられる ergosterol (VII) 及び 7-dehydrocholesterol (VIII) (provitamin D₂ 及び D₃) は単純な steroid 類であり、*in vitro*, L-1210/v/c 細胞に対して $\text{IC}_{50}>350 \mu\text{g/ml}$ で活性を示さなかった。これらの事から endoperoxide 構造が I, II, V 及び VI の活性に寄与している可能性がある。

セスキテルペンラクトン類の W1-38,¹¹⁾ EP-2 及び W-18 Va 2 細胞¹²⁾ に対する細胞毒性,¹³⁾ また、KB 細胞に対する活性¹⁴⁾ についての報告はあるが、構造活性相関よりはむしろそれぞれ単独の化合物の数値として論じられている。

一方、マウス腹腔に移植した P-388¹⁵⁾ に対して同じく腹腔に検体を投与して抗腫瘍性を延命効果でみる *in vivo* の系¹⁶⁾ において、III 及び IV は共に抗腫瘍性を示さなかった。すなわち、III (NSC No. 600098) を 375, 500, 687 又は 750 $\mu\text{g/kg}$ 単回投与した場合、T/C (%) はおのおの 108, 106, 104 及び 100 でありこれ等はコントロール群と有意の差が無かった。また、IV (NSC No. 600097) を 500, 750, 875 又は 937.5 $\mu\text{g/kg}$ 単回投与した場合、T/C (%) はおのおの 97, 100, 100 及び 98 を示した。同様に、V は *in vivo* では sarcoma 180 及び P-388 に対して無効であった。なお、III と IV の抗菌性については既に報告した。⁸⁾

実 験 の 部

生物活性テストに供した試料は融点, 赤外吸収スペクトル (IR), ^1H 核磁気共鳴スペクトル ($^1\text{H-NMR}$) 及び $^{13}\text{C-NMR}$ などの機器分析及び 薄層クロマトグラフィー (TLC) によって構造と純度を確認したものを使用した.

7-Dehydrocholesterol-5,8-peroxide (5,8- α -epidioxy-5 α -cholest-6-en-3 β -ol) (VI) 2 g の 7-dehydrocholesterol (cholesta-5,7-dien-3 β -ol) を 200 ml のクロロホルムに溶解し紫外ランプ (2537Å) 照射の下で空気泡を送り込んで 3 日間攪拌, 蒸発溶媒は補った. 生成混合物はクロロホルムを展開溶媒としシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Kiesel gel 60, 230—400 mesh 2×50 cm) を行い, 展開物をエーテルより再結晶, $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_3$, 無色柱状結晶, mp 126—127°C を得た. 収量, 50 mg (2.4%). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , ppm) δ : 4.10 (1H, br, $W_{1/2}=18$ Hz, C-3-axH); 6.23 (2H, dd, $J=8.5$ Hz, C-6, C-7 vinyl H). MS m/z : 416 ($\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_3$, M^+), 384 (base peak) (M^+-O_2), 305 ($\text{M}^+-\text{CH}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

L-1210/v/c 細胞に対する *in Vitro* 細胞毒性テスト 培地は 10% ウシ胎児血清 (製造会社, Flow Lab.) を含む RPMI 1640 (Flow Lab.) に 100 $\mu\text{g/ml}$ のストレプトマイシンと 100 U/ml のペニシリンを添加し pH 7.0 に調製した. この中にマウスリンパ性白血病細胞培養株, L-1210/v/c を初濃度 5×10^4 cells/ml になるように播種した. 培養は 37°C, 72 時間, 浮遊培養法によった. 予備試験としてこの中に II をおのおの 1, 10, 100 及び 1000 $\mu\text{g/ml}$ になるように添加した各群と無添加のコントロール群 (増殖率, 100%) の培養後の細胞数を計数して比較した. 生細胞はトリパンブルーに染まらない. また, II はあらかじめ L-1210/v/c 細胞に無影響であることを確認した 0.01% Tween-20 に溶解して使用した. この結果, II は低濃度で増殖抑制効果のあることを知り II の 0.01, 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80 及び 1.00 $\mu\text{g/ml}$ を含む培地で同様の培養を行って IC_{50} 値を求めた.

謝辞 本研究全般にわたって御指導を賜った明治薬科大, 柴田承二教授及び注に述べた諸測定をお願いした各位に深謝します.

引用文献及び注

- 1) 第 13 報: 是枝正人, 長岐正彦, 速水健一, 松枝 澄, 薬誌, **108**, 434 (1988).
- 2) a) M. Koreeda, S. Matsueda, T. Satomi, K. Horitsu, J. Clardy, *Chem. Lett.*, **1979**, 81; b) 松枝 澄, 長岐正彦, 是枝正人, 薬誌, **100**, 615 (1980).
- 3) 松枝 澄, 長岐正彦, 薬誌, **104**, 753 (1984).
- 4) E. Rodriguez, G. H. N. Towers, J. C. Mitchell, *Phytochem.*, **15**, 1573 (1976).
- 5) L-1210/v/c は国立癌センター, 下山正徳が培養確立した株を東北大, 抗酸菌研究所肺癌部門を経て分与を受けた.
- 6) 田代田鶴子博士, 癌研究所, 癌化学療法センター, 東京に測定を依頼した.
- 7) 桜井欽夫, 塚越 茂, 田代田鶴子, 癌と化学療法, **7** (Sup. II), 6 (1980).
- 8) A. Windaus, J. Brunken, *Liebigs. Ann.*, **1928**, 225.
- 9) 松枝 澄, 下山 満, 今泉 隆, 対馬康孝, 薬誌, **102**, 347 (1982).
- 10) S. Matsueda, Y. Katsukura, *Chem. Ind. (London)*, **1985**, 411.
- 11) Human diploid fibroblast 株.
- 12) Simian virus 40-transformed cell 株.
- 13) K. H. Lee, E. S. Huang, C. Piantadosi, J. S. Pagano, T. A. Geissman, *Cancer Res.*, **31**, 1649 (1971).
- 14) M. Ogura, G. A. Cordell, N. R. Farnsworth, *Phytochem.*, **17**, 957 (1978).
- 15) Mouse leukemia 株
- 16) Dr. M. Suffness, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, U.S.A. に測定を依頼した.