

マウス白血病細胞株P388を用いた果物抽出物の抗癌作用の検索

新 本 洋 士・鈴 木 雅 博・木 村 俊 之・山 岸 賢 治

(東北農業試験場)

Antitumor Effects to Mouse Myeloma P388 Cells of Fruit Extracts

Hiroshi SHINMOTO, Masahiro SUZUKI, Toshiyuki KIMURA and Kenji YAMAGISHI

(Tohoku National Agricultural Experiment Station)

1 は じ め に

アイソトープを用いない細胞増殖測定法としてMosmann²⁾によって紹介されたMTT法は、抗癌剤のスクリーニング、サイトカインのアクセシ、毒性試験などに広く用いられてきた。しかしながら、MTT法では細胞によって還元されたMTTが不溶性のホルマザンを生じ、これをプロパノールなどの有機溶媒で溶解する必要があった。これを改良したWST-1法では、生じるホルマザンが可溶性であり、操作がより簡便になった。筆者ら³⁾もWST-1法が癌細胞株を用いた野菜抽出物の抗癌作用の検索に有用であることを報告してきた。

近年、WST-1とメトキシPMSをブレミックスしたReady-to-useのテトラカラーワン試薬が考案され、細胞増殖をより簡便に測定することができるようになった。本報告では、種々の果実の抽出物の抗癌作用を、抗癌作用検定の標準細胞株であるマウス白血病細胞株P388とテトラカラーワン試薬によって検索し、渋柿を脱渋することによって抗癌作用が変化することを見出したので報告する。

2 試 験 方 法

(1) 細胞

マウス白血病細胞株P388はヒューマンサイエンス研究資源バンクより入手し、牛胎仔血清(FCS)を5%添加したERDF培地(極東製薬)で継代培養した。

(2) 果実抽出物の調製

1999年産のモモ、ブドウ、ナシ、リンゴを使用し、果実可食部をホモゲナイズし、凍結乾燥した。この0.1gにジメチルスルホキシド(DMSO)5mlを加えて抽出したものを果実抽出物とした¹⁾。

(3) 癌細胞増殖抑制試験

5%FCSを含むERDF培地にP388を 5×10^4 /mlの密度に浮遊させ、この100 μ lを96穴マイクロカルチャープレートに分注した。ここにリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で5倍希釈した抽出物2 μ lを添加してよく混和後、48時間培養した。培養穴にテトラカラーワン試薬(調製済みのWST-1試薬、生化学工業)10 μ lを添加してさらに2時間培養後、600nmを参照波長にして450nmの吸光度を96穴プレートリーダー(東ソーMPR-A4)で測定した。測定値は試料の代わりにPBSを添加して培養した穴の吸

光度に対する百分率で表した。測定は各試料とも3連で行った。

3 試験結果及び考察

(1) モモ、ブドウ、ナシ、リンゴ抽出物の抗癌作用

表1 果実の抗癌作用測定結果

果実名(品種)	P388増殖率
モモ	102-108%
(ゆうぞら、あきぞら、あぶくま、秀峰)	
ブドウ	90-116%
(キャンベル3、マスカット、巨峰2、安芸クイーン、スチューベン、ハニービーナス、ハニーブラック)	
ナシ	90-116%
(新高2、秀玉2、ラフランス、ゼネラルレクラーク、バスクラサン、シルバーベル、ペラダグア、豊月、幸水2、太白、新興、上花2、鴨梨2、新星2、豊水2、紅梨、晩三吉、慈梨、二十世紀)	
リンゴ	96-111%
(ぐんま名月、こうたろう、清明、レッドヤング、ほおずり、さんさ、みずずつがる、つがる、晩秋、北斗、新世界、王林、紅玉、スターキング、ゴールデンデリシャス、きたろう、ジャナゴールド、陽光、アキタゴールド)	

表1にモモ、ブドウ、ナシ及びリンゴ抽出物を添加して培養したP388の増殖をテトラカラーワン法で測定した結果を示す。モモ4品種4試料、ブドウ7品種10試料、洋ナシを含むナシ21品種26試料、リンゴ19品種19試料のアクセシを行った結果を示す。いずれの抽出液もP388の増殖にはほとんど影響を与えず、増殖率は90~116%の範囲であった。したがって、これらの果実抽出物には、抗癌作用がないか、あっても極めて低いと考えられる。

(2) カキ抽出物の抗癌作用

表2にカキの抽出物のP388の増殖に与える影響を示す。いずれも渋柿である「蜂屋」、「平核無」、「身不知」については、脱渋前と脱渋後の果皮及び果肉抽出液の作用を検討した。果肉では、脱渋前の試料からの抽出物はP388の増殖を強く抑制したが、脱渋処理によっていずれも抗癌作用が低下した。また、柿生葉からの抽出物は、「平核無」、「身不知」とともに強い増殖抑制作用を示した。

図1に「平核無」及び「実不知」の抽出物を希釈してP388培養に添加した結果を示す。表2の結果と同様に、果皮、果肉とも、脱渋によってP388増殖抑制作用が低下した。

表2 カキ抽出物の抗癌作用

品種名等	P388 増殖率(%)	標準偏差
蜂屋皮	39.6	1.0
蜂屋皮脱	90.2	4.4
蜂屋実	45.8	6.4
蜂屋実脱	66.2	5.4
平核無葉	39.3	1.3
平核無皮	75.9	4.1
平核無皮脱	94.3	1.8
平核無実	44.2	3.5
平核無実脱	71.6	2.4
身不知葉	33.8	1.3
身不知皮	82.3	4.0
身不知皮脱	87.3	6.3
身不知実	37.4	2.2
身不知実脱	66.8	5.1

(脱: アルコール脱渋処理をしたもの)

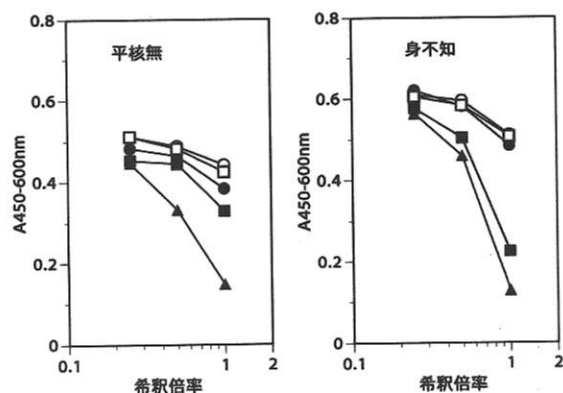


図1 段階希釈したカキ抽出物の抗癌作用

▲葉, ●皮, ○脱皮後の皮, ■実, □脱皮後の実

また、カキ生葉は非常に強い増殖抑制作用を示した。

本研究に用いた脱渋カキは、アルコール処理により脱渋したものである。カキ渋はタンニンと呼ばれるポリフェノール化合物であり、脱渋処理によって不溶化されて渋味を感じなくなる。抗癌作用が脱渋処理によって低下することか

ら、タンニンが抗癌作用の本体でないかと推論される。しかしながら、カキに含まれる抗癌物質は、タンニンと挙動を同一にする他の成分である可能性も否定できない。

カキの葉には強いP388増殖抑制作用があった。本研究で用いたカキの葉は、秋口に採取されたものである。新芽を用いて調製されたカキ葉茶抽出物には抗癌作用がみられなかった(データ示さず)ことから、カキの葉の抗癌作用成分は、葉の成長とともに増加する物質で、新芽には少ないと考えられる。今後、カキの実とともに、カキの葉の抗癌作用成分について、成分の単離、構造解析を行う必要がある。

4 ま と め

マウス白血病細胞株P388を用いて、果実抽出物の抗癌作用をスクリーニングした。果実を破砕後凍結乾燥し、DMSOで抽出した抽出物をP388の培養液に加えて増殖を比較した。様々な品種のモモ、ナシ、リンゴ、ブドウについて検討した結果、これらの果実からの抽出物はP388の増殖にほとんど影響を与えなかった。カキは、脱渋前の果肉、果皮からの抽出物は強くP388の増殖を抑制するものがみられたが、脱渋後は増殖抑制作用が低下した。これらは脱渋過程でP388の増殖を抑制する成分が不溶化されるためと考えられた。また、カキ葉からの抽出物はP388の増殖を強く抑制した。

引用文献

- 1) 木村俊之, 船附雅子, 我妻正迪, 山岸賢治, 新本洋士. 1999. ソバ葉の有するラジカル消去活性について. 東北農業研究 52: 255-256.
- 2) Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65: 5-63.
- 3) 新本洋士, 實山安英, 小堀真珠子, 津志田藤二郎. 1996. 野菜抽出物のヒト培養細胞株の増殖に対する作用の WS T-1 アッセイによる検討. 食工誌 43(1): 64-68.