

## ガン抑制遺伝子産物の不活性化ガン細胞系による 食品素材中の抗ガン物質の検討

河村幸雄, 石川 勝\*, 村元 学\*\*, 橋田和美, 真部 真理子  
農林水産省・食品総合研究所, (\*現 東京水産大学 \*\*現 JT 食生活研究所)

### Studies on Anti-cancer Substances in Food Stuffs by Using Transformed Cells Bearing the Oncogene-Oncosuppressor System.

Yukio Kawamura, Masaru Ishikawa\*, Manabu Muramoto\*\*, Kazumi Kitta, and Mariko Manabe  
*Protein Science Laboratory, National Food Research Institute*  
2-1-2 Kannon-dai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8642, Japan

By using cultured mouse fibroblast cells transformed with Simian virus 40 which bears the putative oncoprotein-oncosuppressor system, the rice bran was shown to contain anti-cancer substances which are selectively cytotoxic to the SV40-transformed cells but not to the non-transformed counterpart cells. Active substances were found in a small molecular fraction between the molecular weights of 500 and 1,000 dalton, as revealed by molecular sieve chromatography on a Bio-gel P-2 column. LD50 and LD90 value of the active fraction was 1.0mg/ml and 3.0mg/ml to SV40-transformed cell, respectively, whereas at these concentrations nearly no cytotoxicity was observed to nontransformed cells.

分類学上動物と遠縁の生物には新規な生理活性物質の存在が推定される。いくつかの植物、特に担子菌類（キノコ類）には、抗生物質、抗ウイルス物質、抗腫瘍物質の様な生理活性物質の存在が報告されてきている。また、動物、植物、微生物などすべての生物組織や細胞系は、本来、損傷 DNA 修復系や細胞周期調節系および抗形質転換系を発達させてきていると考えられ、生体防御系に重要な役割をはたし、悪性腫瘍、すなわちガンの発生の抑制と密接に関係している。この様な観点から、我々はこれまで生物材料中に抗形質転換や抗腫瘍因子の検索を行ってきた<sup>1,2)</sup>。その目的には、現在最も有力視されている発ガン機構のひとつである、p53 や pRB のようなガン抑制遺伝子産物 (oncosuppressor) の変異や不活性化にもとづく系が最適と考えられる<sup>3)</sup>。

そこで、食品として利用する可能性をさぐる観点から低分子量の選択的抗腫瘍性物質の解明を目的と

---

\*present address : Tokyo University of Fisheries

\*\*present address : JT Food and Life Institute

して食品素材中の抗ガン物質の検討を行った。いくつかの食品のうちで、選択的な抗腫瘍活性を示す素材は多くなく、いくつかのキノコと米糠にその様な活性が認められた。本報告では、米糠に存在する低分子量の抗腫瘍活性について述べる。

## 材料と方法

### 実験材料

細胞培地は、DMEMとMEM(日水製薬)を使った。Centriprep-30とCentricon-10、および限外濾過膜のYM2とYCO5はアミコン社製を購入した。透析膜のSpectrapor MWCO25,000, 1,000, および500はSpectrum Medical Industryから購入した。Biogel-P2, Sephadex G-25はLKB/Pharmacia製を使用した。HPLC用カラム, ODS-80TMとTSKgel G3000SWxlはトーソー製を購入した。酵素類, プロテアーゼのペプシン, トリプシン,  $\alpha$ -キモトリプシン, 及びグリコシダーゼ類のエンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼとグリコアミラーゼはシグマ社製を, 他のすべての試薬は, ナカライテスク社製を使用した。

### 培養細胞と培養条件

3T3/Swiss albino (ATCC CCL92)とSV40 transformed 3T3細胞は10%の子牛血清を含むDMEM培地で培養した。HeLa, HeLaS3, およびヒトの2倍体細胞のSV40による形質転換体であるWI38 VI 13サブクローン(ATCC CCL 75.1)は, 非必須アミノ酸混合物と10%のウシ胎児血清を含むMEM培地で培養された。培養は, 加湿5%炭酸ガス下, 37°Cでおこなった。

### 抗腫瘍活性の測定

抗腫瘍活性は, 正常マウス繊維芽細胞Balb/3T3 (A31)とoncoprotein -oncosuppressor機構に従ってガン化したそのSV40形質転換体(SV-T2)に対する選択的致死活性を指標とした。米糠その他の抽出物の細胞障害活性は, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)による生細胞数の測定<sup>4)</sup>によった。96穴プラスチックプレート1穴当たり $2.0 \times 10^3$ 個 ( $/100 \mu\text{l}$ )の形質転換および未転換細胞を媒種し, 24時間前培養後,  $10 \mu\text{l}$ のPBSに溶かした試料を各プレートの穴に添加して, 44時間培養した。各穴あたり $10 \mu\text{l}$  (5mg/ml)のMTT試薬を添加後さらに4時間培養した。プレートを遠心後培養液を吸引除去し,  $100 \mu\text{l}$ の0.04N HCl イソプロパノール溶液と $20 \mu\text{l}$ の3% SDS溶液をくわえて, MTTフォルマザンとアルコール不溶物質を溶解した。しばらくプレート振とう機にて攪拌後, マイクロプレート用分光光度計にて655nmを対照に595nmの吸光度を測定した。ガン細胞に選択的な細胞致死活性は次の式に従って求めた。比選択的細胞障害活性(%) =  $(A - B) / A \times 100$ , ここで, A = 対照区の吸収, B = 試料の吸収, タンパク質量の定量は, ウシ血清アルブミンを標準タンパク質としたLowry法<sup>5)</sup>にて測定した。

## 結果と考察

### 米糠抽出物の調製

新鮮な米糠は、脱穀玄米を精白した直後の標品を使用した。100gの新鮮米糠に500ccのn-ヘキサンの加えて、30℃で1時間攪拌後、遠心分離して沈殿部分を回収した。25℃で12時間風乾したのち、5倍量(v/w)の0.001Nの水酸化ナトリウムにて4時間、4℃で抽出操作を行った。1Nの塩酸で中和後、8000gで40分間遠心分離を行った。上清をエバポレーターで40℃で50mlに濃縮後、10倍量の蒸留水にて2回、4倍量の蒸留水にて2回透析した。透析外液と内液派すべて集めて、凍結乾燥した。透析内液には不溶性物質が認められたので、遠心後の沈殿を回収し、1M塩化ナトリウムに溶解させてその遠心上清を凍結乾燥して1M塩化ナトリウム可溶画分とした。以上の分画手順を図1に示した。

### 色素排除能による細胞死とMTT法の相関

MTT法は、生細胞の測定に広範囲に用いられているが、それは多くの試料を同時に測定しやすいことがその一因である。しかし細胞によってはあるいは目的によっては必ずしも細胞死を正確に測定できているとは限らない。そこで、色素排除能による細胞死の定量値とMTT法との相関を検討した。図2に示されるように、正常細胞とガン化細胞で、両法とも同じ結果を与え、用いた細胞系でMTT法により細胞死が測定できていることが示された。

### 米糠抽出物のガン細胞選択的致死活性

図1に従って調製した米糠画分のガン細胞選択的致死活性を検討した。すなわち、未形質転換細胞swiss/3T3とSV40形質転換3T3細胞の生存率に与える米糠抽出画分、水抽出透析外液、水抽出透析内

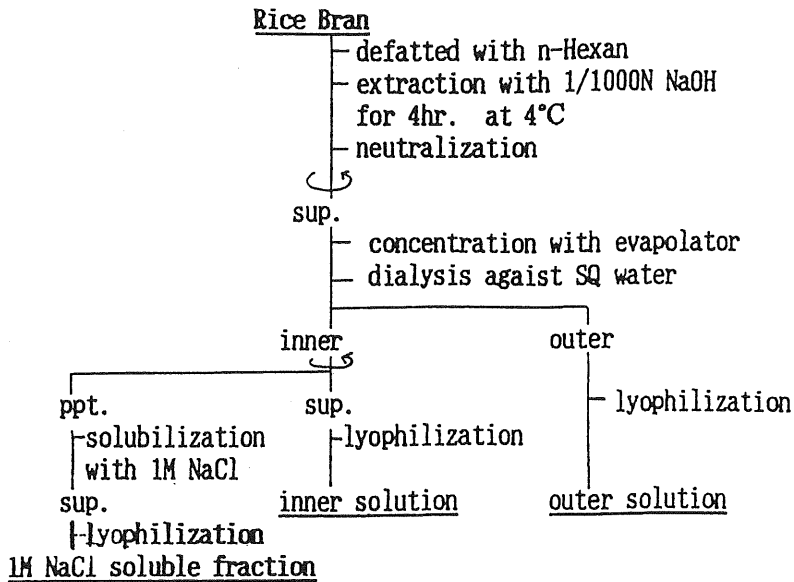


Fig. 1. A fractionation procedure of antitumor substances from rice bran.

液上清, 水抽出透析内液不溶物からの1M 塩化ナトリウム可溶画分の影響を調べた (図3)。1M 塩化ナトリウム可溶画分は, 細胞致死活性を示したが, 3T3 および SV40-3T3 の両者に対して比特異的な致死活性であった。一方, 水抽出透析外液と水抽出透析内液上清はいずれも SV40-3T3 細胞にたいして特異的な細胞死を示した。水抽出透析外液の方が若干強い細胞毒性を示すようであった。この両者の細胞毒性物質を区別できるかどうかを明らかにするために, 分画分子量1,000のYM2と分画分子量500の

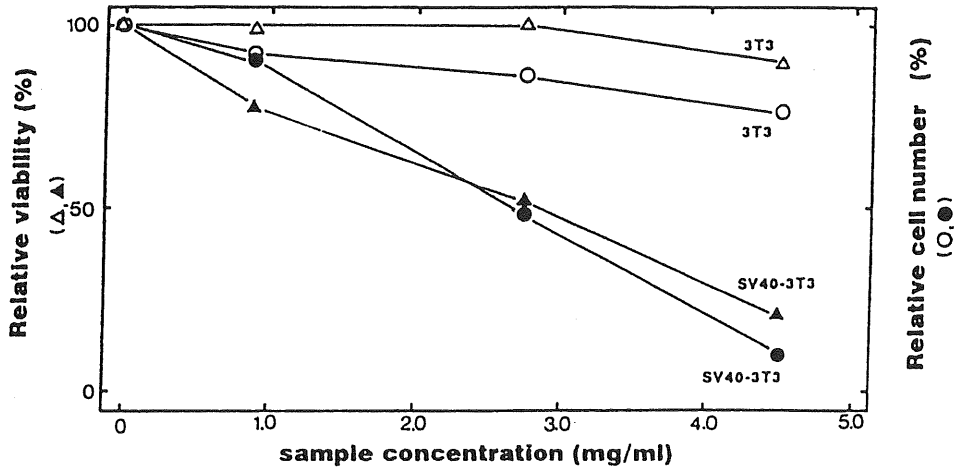


Fig. 2. Correlation between MTT assay and dye-exclusion test. Relative viable cell number with dye-exclusion test (○, 3T3 cells ; ●, SV40-3T3 cells), relative viability with MTT assay (Δ, 3T3 cells ; ▲, SV40-3T3 cells)

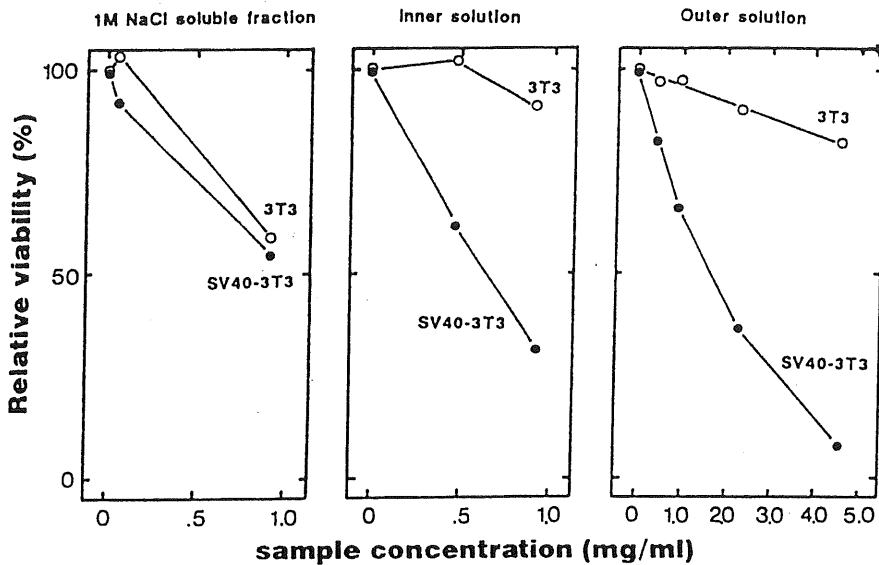


Fig. 3. Cytotoxic action of extracts of rice bran. ○, 3T3 cells ; ●, SV40-3T3 cells

YCO5 を用いて水抽出透析内液上清の限外濾過を行った。図 4 に示めされるように分子量1,000から500の画分でガン細胞選択的細胞致死活性の強いことが示された。このことは、水抽出透析内液上清の透析に最初に使われた透析膜が分画分子量3,500であったこととそれによる透析が不完全であったために内液上清に細胞致死活性が認められたことを示している。

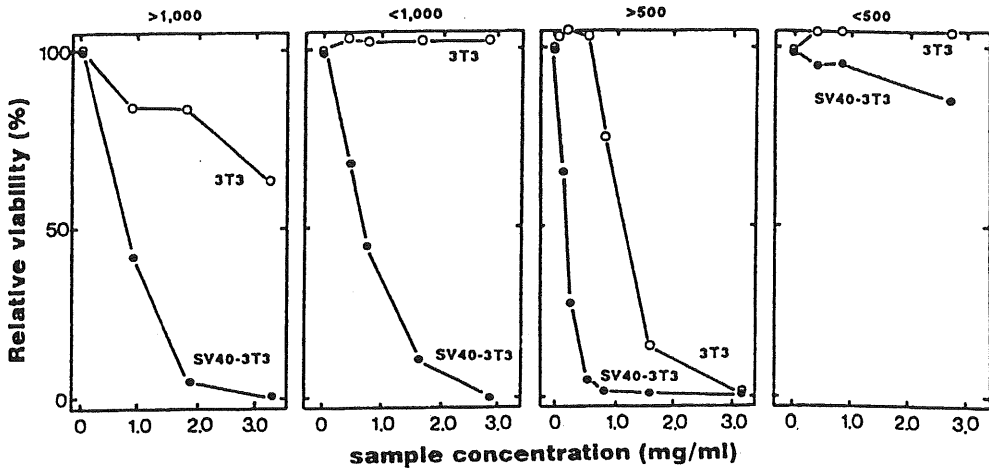
そこで、米糠は、溶出力の強い0.002N 水酸化ナトリウムでまず抽出し、抽出液を分画分子量3500の透析膜にて徹底的に透析を行い、その外液を回収した。外液を減圧濃縮した後、分画分子量500の限外濾過膜にて透析し内液を凍結乾燥することで粗抽出低分子活性標品を得た。

**粗抽出低分子活性画分の Bio-Gel P-2 による分画**

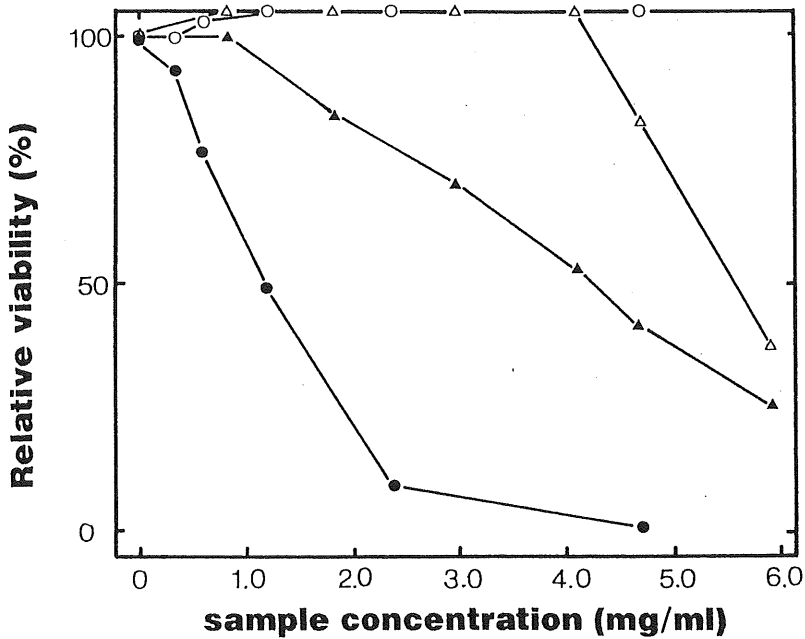
粗抽出低分子活性標品（分画分子量500の限外濾過膜の内液の凍結乾燥物—以下低分子画分）中の活性物質を同定分離するために、低分子画分を、0.01M 酢酸緩衝液に溶解し、同緩衝液に平衡化された Bio-gel P-2 カラムによってさらに分画した。その結果、280nm に吸収を示す数多くのピークが認められたがその中で、排除分画に近いところに二つ (f-1 と f-2) のガン細胞選択的致死活性活性が認められた。米糠由来であることから、各分画の無機リン含量を測定したところ、オーバーラップする部分は認められたが、必ずしも、活性ピークとは一致しなかった。2つの活性画分を集めて凍結乾燥したのち、それらの選択的ガン細胞致死作用を示したのが、図 5 である。分子量の大きい方 (f-1) の分画が小さい方 (f-2) と比べて比致死活性及び選択性とも大きく、そらの 3T3 及び SV40-3T3 細胞に対する LD50 値は、それぞれ 1.0mg/ml 及び 4.2mg/ml であった。

特に、f-1 のガン細胞選択性は大きく、ガン細胞の90%以上が死滅する濃度域、2 から 5mg/ml において未形質転換細胞 3T3 細胞はほとんど影響を受けなかった。

現在、f-1 をさらに HPLC クロマトグラフィーにより分画と精製を進行させている。



**Fig. 4.** Cytotoxic action of inner solution after dialyzed by YM2 and YCO5  
 ○, 3T3 cells ; ●, SV40-3T3 cells. Upper figures indicate the approximate molecular exclusion limit in Dalton



**Fig. 5.** Cytotoxic action of two fractions, F-1 and F-2, from Bio-gel P-2 gel exclusion chromatography.

F-1 : ○, 3T3 cells ; ●, SV40-3T3 cells.

F-2 : △, 3T3 cells ; ▲, SV40-3T3 cells

## 文 献

1. Kawamura Y. and Ishikawa M. (1993) : Anti-tumorigenic and immunoactive protein and peptide factors in food stuff (I). in *Food and Cancer Prevention, Chemical and Biological Aspects*, ed. by Waldron, K. W. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK : pp327-330
2. Kawamura Y., Manabe M. Ookura T. and Kitta K. (1994) : A novel anti-tumorigenic protein specific to SV40- and human papilloma virus-transformed cells. in *Animal Cell Technol: Basic and Applied Aspects*, eds. by Kobayashi et. al., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp555-559
3. Weinberg R. A. (1995) *Cell*, 81, 323-330
4. Mosmann T. (1983) *J. Immunol. Methods*, 65, 55
5. Lowry D. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265