



Title	ササ(Sasa kurilensis)多糖類の抗腫瘍性効果に関する研究
Author(s)	数森, 康二; KAZUMORI, Koji; 榊原, 彰 他
Citation	北海道大學農學部 演習林研究報告, 34(2), 305-325
Issue Date	1977-09
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/20983">https://hdl.handle.net/2115/20983</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	34(2)_P305-325.pdf



# ササ (*Sasa kurilensis*) 多糖類の抗腫瘍性 効果に関する研究

数森康二\* 榊原 彰\*

Studies on the Anti-tumor Effect of Polysaccharides  
from Bamboo Grass (*Sasa kurilensis*)

By

Koji KAZUMORI\* and Akira SAKAKIBARA\*

## 目 次

1. 緒 言 .....	306
2. 実験と結果 .....	307
2.1 試料の調製 .....	307
2.1.1 ヘミセルロース A の調製 .....	307
2.1.2 水溶性ヘミセルロースの調製 .....	307
2.1.3 化学的性質 .....	308
2.1.4 物理的性質 .....	309
2.2 ヘミセルロース A の水溶化 .....	311
2.2.1 部分アセチル化 .....	311
2.2.2 部分メチル化 .....	312
2.3 抗腫瘍試験 .....	315
2.3.1 SX-1 の効果 .....	315
2.3.2 ヘミセルロース A の効果 .....	318
2.3.3 WSH の効果 .....	319
2.4 メチル化分析 .....	319
3. 考 察 .....	322
3.1 ヘミセルロースの性質 .....	322
3.2 ヘミセルロース A の水溶化 .....	322
3.3 抗腫瘍性 .....	323
4. 要 約 .....	323
謝 辞 .....	324
参考文献 .....	324
Summary .....	325

1977年1月31日受理

\* 北海道大学農学部林産学科 木材化学教室

\* Laboratory of Wood Chemistry, Department of Forest Products, Faculty of Agriculture, Hokkaido University.

## 1. 緒 言

多糖類の制癌性に関する研究はこれまで多数の報告が見られる。古くは酵母細胞壁多糖 Zymosan<sup>1)</sup> に始まり、菌類、地衣類、高等植物等<sup>2)-10)</sup> から多くの活性多糖類が単離されている。またその種類も、グルカン、マンナン、キシランというように多岐にわたっている。この分野で最もよく調べられているのは、シイタケ等からの $\beta$ 1-3 グルカンで、抗腫瘍性と微細構造<sup>11)</sup> との関連およびその作用機序も次第に明らかになりつつある。他の多糖類でもその作用は cytotoxic というよりも、むしろ host mediated として作用することが知られており、これらが非特異的免疫に関連していることはほぼまちがいのない事実となっている。これらの多糖類の特長としては他に、固型腫瘍に顕著な効果を示し、腹水型に無効である点などがあげられるが、最近1日2回という投与方法で笹葉より抽出した Banfolin が Sarcoma 180 腹水型を注射したマウスの生存日数を明らかに延ばしたという報告もある<sup>6)</sup>。投与量を含めた投与方法の問題は、tumor spectrum の問題と同時に今後いっそうの研究が望まれる。一方、ヘミセルロースに限ると、最近ブナキシランが効果をもつことが土師<sup>9)</sup> により明らかになり、同時に効果の見られないキシランもあることから、その微細構造と活性の関係、さらに本研究との関連において多くの興味をそそる分野である。ネマガリダケ (*Sasa kurilensis*) は分類上イネ科植物に属するが、この中にはヤクシマザサ、クマザサ、バガス、小麦わら等、かなり多くの種類にわたって抗腫瘍性を有する多糖類が含まれている<sup>10)</sup>。しかし、それらの多くは熱水抽出物であり、収量が非常に低く、実験に適切な材料とは言い難い。ネマガリダケより抽出したヘミセルロースに関し、その抗腫瘍性を最初に調べたのは小山<sup>32)</sup>、榊原<sup>33)</sup> である。すなわち、ヘミセルロース A, B を単独、あるいはマイトマイシン併用下にラットを用いて移植腫瘍に対する抗腫瘍効果を調べ、マイトマイシン併用の場合は単独に用いた場合の4~5倍の強い抗腫瘍性のあることがわかった。しかし以前に用いたヘミセルロース A, B は共に水に不溶であり、臨床的には種々の生理的障害を起こす可能性がある。そこで本研究の一つの目的として、ヘミセルロース A の水溶化および水溶性試料の単離を試みた。多糖類を水溶化する手法としては、部分メチル化、部分アセチル化、カルボキシメチル化等が知られている。主として、その生成物の工業的価値により、セルロース<sup>12)</sup>、デンプン<sup>13)</sup> について詳しく調べられているが、ヘミセルロースに関しての報告はカルボキシメチル化キシラン<sup>14)</sup> 以外はほとんどない。本実験では条件を変えながら、部分メチル化、部分アセチル化を行なった。一方ネマガリダケのヘミセルロースに関しては、古く氏家<sup>15)</sup> が調べたのみであり、その後詳細な報告はない。本研究では、抗腫瘍性を調べるための動物実験と併せて、同時に化学構造に関しての若干の実験を行なった。

## 2. 実験と結果

### 2.1 試料の調製

#### 2.1.1 ヘミセルロース A の調製

##### i) ネマガリダケの採取および脱脂

北海道大学天塩地方演習林において、昭和50年5月31日、ネマガリダケ(チシマザサ)の葉部を除き、約30 kgを採取した。このネマガリダケの平均桿長は3.3 m、平均個体重308 g(絶乾80°C)、桿含水率45.3%であった。上記のネマガリダケを2週間風乾後、チップパーによりチップにし、引き続きWiley millにて粉碎し40~60メッシュのものを分取した。ササ粉はソックスレー抽出器を用い、エタノール:ベンゼン(1:2)で24時間抽出し、脱脂ササ粉とした。

クラートソリグニン:23.1%

##### ii) ホロセルロースの調製

脱脂ササ粉40~60メッシュのものを使用し、亜塩素酸塩法<sup>16)</sup>にて行ない処理回数はネマガリダケが広葉樹に類似しているため3回とした。収率:76.5%クラートソリグニン:3.0%

##### iii) ヘミセルロース A の単離

WISEの方法<sup>17)</sup>に準じて行なった。上記のホロセルロースを20 gとり、5%カセイカリ水溶液2ℓで窒素気流下2時間抽出した。アルカリ抽出液は酢酸で中和後、4倍量のエタノールを加え、生じた沈殿は遠心分離し、エタノールで3回、エーテルで3回洗浄後風乾した。その後、粉碎し、五酸化リンとカセイカリ上で減圧乾燥し、ヘミセルロースA 6 gを得た。収率:30%(対ホロセルロース)

#### 2.1.2 水溶性ヘミセルロースの調製

i) 5%カセイカリ水溶液抽出物水溶性画分の単離(WSH) WSHはアルカリ抽出液を中和後、沈殿せずに上澄み中に残る部分であり、BLAKE<sup>18)</sup>等の分別方法におけるヘミセルロースbに類似した画分である。一方、WIHはヘミセルロースaに相当することになる。調製は以下のように行なった。ホロセルロース、絶乾約20 gを5%カセイカリ水溶液2ℓで抽出した。抽出液は酢酸で中和後、40°C以下、約500 mlまで濃縮した。濃縮液は10日間流水中で透析し、その後、7,000 rpm 1時間遠心分離し、可溶部と不溶部に分けた。この条件でほぼ清澄な上澄み液が得られた。不溶部は常法によって乾燥、淡い褐色を帯びた白色粉末4.3 gを得た(WIH)。可溶部は100 ml以下まで濃縮し、4倍量のエタノールを加え、沈殿してくる部分を3,000 rpm、15分間遠心分離を行ない回収し、常法によって乾燥後、褐色粉末1.7 gを得た(WSH)。

ii) アセチル基を有する水溶性キシランの単離(SX-I, SX-II) 広葉樹キシランがアセチル基を有することは広く知られているが、イネ科植物のキシランが同様に有することはあまり知られていない。最近、マダケよりアセチル基を有するキシランが単離<sup>19)</sup>されているが、ネマガリダ

ケでもホロセルロースにおいてアセチル基が検出され(2.9%), その存在が示唆された。このことから、ジメチルスルホキシド<sup>20),21)</sup> および熱水による抽出を試みた。

前記のホロセルロース 11.4 g (絶乾 10 g) を5% モノエタノールアミン-エタノール溶液 200 ml に浸し、冷却しながら一晩放置した。ホロセルロースは濾別し、エタノールで洗浄後風乾した。ジメチルスルホキシド 80 ml を加え、室温で24時間、振とう抽出した。この操作を繰り返し、ジメチルスルホキシド溶液は酢酸を加えた後、4倍量のエタノール中に滴下し、生じた沈殿は常法によって回収、乾燥後、やや褐色を帯びた白色粉末 121 mg を得た (SX-I)。ジメチルスルホキシド抽出残渣は水 300 ml を加え、ホットスターラー上で2時間還流することによって熱水抽出を行なった。この操作を繰り返し、濾液および洗浄液は40°以下で濃縮した。濃縮液は多量の酢酸酸性エタノール中に滴下し、生じた沈殿は常法によって回収し、乾燥し、やや褐色の白色粉末 755 mg を得た (SX-II)。その後5% カセイカリ水溶液 500 ml を抽出残渣に加え、2.1.1. iii の方法で抽出、回収し、白色粉末 1,404 mg を得た (PX)。

### 2.1.3 化学的性質

i) リグニン含量 クラーソンリグニンとして定量した。ii) アセチル基の定量 木材標準分析法<sup>22)</sup>にしたがい、アセチル基を2.5% 硫酸で加水分解し、生成した酢酸を蒸留して1/50 N-NaOH でフェノールフタレインを指示薬として滴定した。iii) メトキシル基の定量 島津アルコキシル定量装置により、同一サンプルを2~4回分析し、ばらつきのないことを確かめて平均値をとった。iv) 元素分析、灰分 当大学薬学部にて依頼して炭水素分析を行ない残留物を灰分とした。v) ウロン酸の定量 T. BITTER のカルバゾール-硫酸法<sup>23)</sup>により、グルクロン酸として比色定量した。グルクロン酸特級を使い検量線を作成し、一試料について3回分析し、平均値をとって定量した。vi) 構成糖 構成糖の分析はアルディトールアセテート<sup>24)</sup>としてガスクロマトグラフィーで行なった。各試料約50 mg に1 N-硫酸 10 ml を加え、還流冷却器を付け10時間煮沸し、完全加水分解を行なった。4時間の後にも不透明のままであるものもあったが、おおむね2~3時間以内に溶液は透明になった。上記の加水分解液はAmberlite IR 45(CO<sub>3</sub><sup>+</sup>)でpH 4に調整し、中和溶液は濃縮乾固し、五酸化リン上で減圧乾燥後秤量した。収量: 36~43 mg 糖混合物は水 5 ml にとかし、水素化ホウ素ナトリウム 40 mg を加え、室温に4時間放置し、還元した。反応溶液は水酢酸 5 ml を加え、過剰の水素化ホウ素ナトリウムを分解し、濃縮乾固した。その後メタノール-塩酸 (1000:1) 5 ml を加えて、生じたホウ酸をホウ酸メチルエステルとして留去し、一晩デシケーター中で乾燥した。アルディトール混合物はピリジン 2 ml と無水酢酸 2 ml を加え、4時間還流し、アルディトールアセテートとした。ガスクロマトグラフィーは柳本ガスクロマトグラフ G 8 型を使い条件は以下の通りである。固定相担体: Gas Chrom Q (100~120 ムッシュ) 固定相液体: ECNSS-M, 3% カラム長: 1.8 m カラム温度: 180°C 注入温度: 220°C キャリアーガス: 窒素 (17.5 ml/min.)

**Table 1.** Yields, specific rotations and compositions of extracts from the holocellulose of *Sasa kurilensis*

		HA	WSH	WIH	SX-I	SX-II	PX
Yield	%	30.0	8.6	21.6	12.1	7.6	14.0
Ash	%	6.5	5.5	5.7	0	14.0	2.6
Elementary analysis	{ C%	38.8	42.8	29.5	44.4	36.4	39.7
	{ H	6.1	5.8	4.1	6.1	5.5	5.2
Lignin	%	0.6	8.5	2.0	3.2	2.1	1.9
OMe	%	1.1	4.3	0.8	4.0	3.4	1.1
Uronic acid	%	6.3	11.7	5.4	5.1	5.3	5.8
OAc	%	—	—	—	7.0	6.7	—
[ $\alpha$ ] <sub>D</sub> *		-85°	-80°	—	-50°	-63°	-85°
Sugar analysis %	Xylose	87.8	64.2	91.2	73.6	74.7	94.5
	Arabinose	5.6	14.3	5.6	5.0	7.9	5.5
	Glucose	6.6	15.6	3.2	21.4	17.4	trace
	Galactose	trace	5.9	—	—	trace	trace
Xylose/Arabinose		15.7	4.5	16.3	14.6	9.5	17.1

Yields based on the holocellulose.

\* HA, WSH, PX: C=1, 5% NaOH.

SX-I: C=1, dimethyl sulfoxide.

SX-II: C=0.64, H<sub>2</sub>O.

#### 2.1.4 物理的性質

i) 溶解度 次の方法によって溶解度あるいは不溶物の割合を求めた。なお、これは低分子物質における溶解度とは内容を異にするものである。一定量の試料を一定量の溶媒に溶かし、4時間振とう一晚放置後、遠心分離で液を清澄にし、上澄み液に溶解している物質重量を蒸発法、あるいは沈殿法によって求め、採取した試料重量に対する百分率として求めた。ヘミセルロース A, WSH, SX-I, SX-II, PX はいずれもアルカリに可溶であるが、WIH は一部角質化が起り完全には溶解しなかった。水への溶解性は SX-I, WSH が良いが一部不溶部がある。SX-II はかなりの不溶部があり、不溶部の割合は SX-I で 8%, SX-II で 36%, WSH で 5% 前後である。

ii) 粘度 ネマガリダケのヘミセルロースに関しては、6% NaOH<sup>15)</sup>、クロロホルム-エタノール 9:1 (アセテート)<sup>25)</sup> ですでに粘度が調べられている。今回は、アセチル基を有する SX-I, SX-II についてジメチルスルホキシド中での粘度を測定した。粘度計は Cannon Fenske を用い、恒温槽中 25°±0.01°C で落下時間を測定した。SX-I は測定直前に軽く濾過を行ない、SX-II は遠心分離で不溶物を除いたのちに行なった。(SX-II のジメチルスルホキシドへの溶解度は 55.7%) ジメチルスルホキシドはモレキュラーシーブ Type 4 A で乾燥したものを使用した。

それらの粘度を部分アセチル化ヘミセルロース水溶液部(後述)の粘度と共に Fig. 1 に示した。  
 iii) ゲル濾過水溶性の試料について, G 50 によるゲル濾過を試みた。G 100 によるゲル過濾も試みたが, 下降法では分離が良好ではなかった。カラムは内径 1.5 cm, ベッド高 48 cm で, 流速は 3~4 ml/hr. で下降法で行なった。試料は 5~10 mg を水 1 ml にとかし, 不溶物がある場合は遠心分離で除去後, カラムに充填した。溶出液は 1~2 ml ずつ毎に分取し, フェノール-硫酸法<sup>26)</sup>で発色させ 480 m $\mu$  の吸光度を測定した。結果を Fig. 2 に示した。ブルーデキストラ

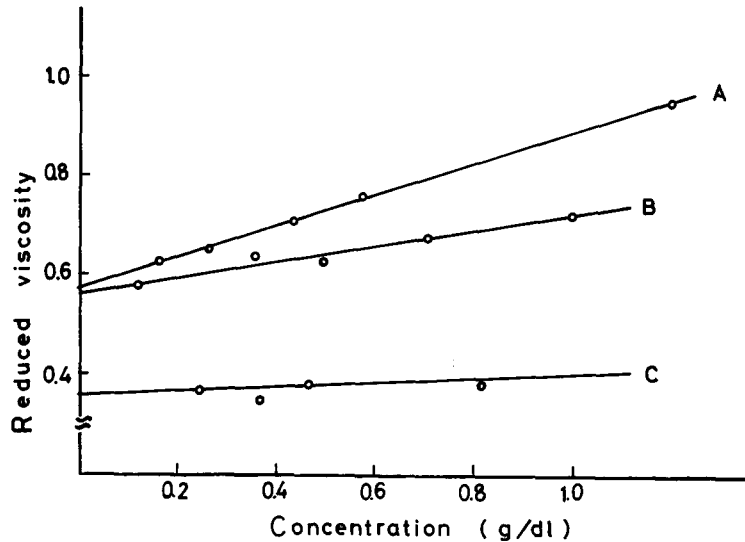


Fig. 1. Relation between  $\eta_{sp}/c$  and concentration (c) for SX-I, SX-II and AH 1 in DMSO.

A: SX-I B: AH 1 C: SX-II.

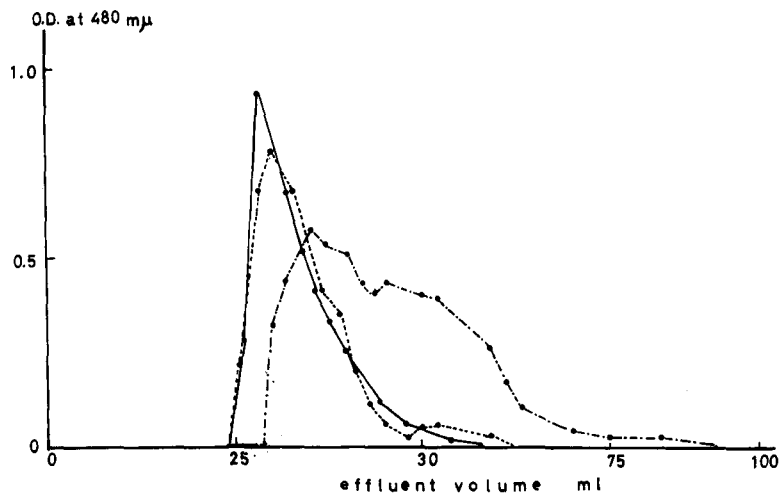


Fig. 2. Gel filtration of SX-I (—), SX-II (····) and WSH (---).  
 Gel material: Sephadex G 50. Eluting solvent: Water.

ン (MW,  $2 \times 10^6$ ) は 28~33 ml に溶出した。SX-I, SX-II もこの付近に最大ピークをもち、大部分が exclude されているが、WSH ではかなり include されていた。iv) 旋光度 アタゴ偏光計ポラックスを使い室温で測定した。結果はヘミセルロースの組成、収率と共に Table 1 に示した。

## 2.2 ヘミセルロース A の水溶化

### 2.2.1 部分アセチル化

アセチル化により水溶性多糖類を得る方法はセルロース<sup>12)</sup>、デンプン<sup>13)</sup> に関して詳しく調べられている。前者は有機溶媒に可溶となったセルロースアセテートを硫酸触媒として加水分解する方法で、硫酸の結合が起こっている。後者は希アルカリ水溶液中で pH を一定に保ちながらアセチル化するもので、分解はほとんど起こらず、元の構造を維持していると言われる。この点、後者の方法に興味があるが、本実験ではヘミセルロースの完全アセチル化に用いられる方法で、その条件を変えることによって部分アセチル化を行なった。i) 方法 乾燥したヘミセルロース A 1 g を三角フラスコにとり、モレキュラーシーブ Type 4 A で乾燥したジメチルスルホキシド 25 ml を加え、空気中の水分を断ち、3 時間攪拌して完全に分散させた。その後、乾燥ピリジン 50 ml を加え、すぐに無水酢酸 (0.5, 1.0, 1.5 ml) を滴下し、2 時間反応させた。反応終了後、少量の水を加え、無水酢酸を分解したのち、4 倍量のエタノールを加え、ヘミセルロースを沈殿させ、常法によって回収、乾燥した。ii) 結果 乾燥したアセチル化物、0.7 g を水 10 ml 中にけん濁させ、6 時間振とう一晚放置後、3,500 rpm 1 時間遠心分離を行ない、透明な上澄みを除き、さらに水を 5 ml 加え同じ操作を繰り返し、水溶部と水不溶部に分けた。水不溶部をエタノールで置換する際、上澄みは 2 層に分かれたがこの部分はまた別に回収した (Residual fraction とする)。AH 1, AH 2 のこの部分は水に可溶であるが、AH 3 のそれは水に不溶で、水-エタノール混液に可溶であった。アセチル基の定量は 2.1.3. ii) に記した方法

Table 2. Stepwise acetylation of hemicellulose A

	Acetic anhydride (ml)	Yield (%)	Acetyl (%)	DS
AH 1	0.5	90.5	6.9	0.23
AH 2	1.0	93.8	10.6	0.36
AH 3	1.5	92.3	13.7	0.49

Table 3. Yields and acetyl contents of each fraction

	Sol. (%)	Acetyl (%)	DS	Insol. (%)	Acetyl (%)	DS	R. (%)
AH 1	30.2	8.9	0.30	55.7	6.0	0.19	8.3
AH 2	33.5	13.4	0.47	50.1	8.3	0.27	9.7
AH 3	8.3	9.9	0.34	77.1	14.1	0.50	8.2

Sol.: water soluble fraction. Insol.: water insoluble fraction. R.: Residual fraction.

で行ない、AH1水溶部に関してはジメチルスルホキシド中での粘度を測定した (Fig. 1)。置換度はキシロース無水物として計算した。これらの結果を Table 2, Table 3, Fig. 3 に示した。

### 2.2.2 部分メチル化

TIMELL<sup>27)</sup> はキシランのメチル化の際、反応する水酸基の速度定数を求めるため、エスパルトキシランの部分メチル化を行なったが、キシランの水溶化という目的でこの方法を用いた例はあまりない。アルカリ-ジメチル硫酸系ではジメチル硫酸は試料の水酸基をメチル化する

と同時に、水とも反応し分解する。したがって、アルカリ濃度を下げ、ジメチル硫酸の添加量を減らすことによってメチル基の導入を抑えることができる。本実験ではメチル基の導入を最低限に抑え、なおかつ水溶性である試料を得るため、五つの条件で反応を試みた。i) 方法へミセルロース A 1.5 g を三つ口フラスコにとり、カセイソーダ水溶液 (6%, 10%) 50 ml を加え、窒素気流下、マグネチックスターラーで搅拌しながら溶解させた。ジメチル硫酸 (1~10 ml) を反応容器を冷水で冷却しながら滴下し、その後室温で4時間搅拌した。反応溶液は5N-塩酸で中和後、流水中10日間透析した。不溶物は遠心分離または濾過で除去後、40°C以下濃縮した。少量の濃縮溶液は多量の酢酸酸性エタノール中に滴下し、生成した沈殿は常法によって回収、乾燥した。Table 4 に部分メチル化へミセルロースの収率とメトキシル含量を記した。ii) 部分メチル化へミセルロース A の物理的性質 a. 溶解度 メチル化物 100 mg を水 5 ml 中に加え、20時間振とうした。その後水 10 ml を用い遠沈管に移し、12,000 rpm 45分間、遠心分離を行ない、上澄み 2 ml をとり、水分を蒸発させ溶解量を求めた。15 ml 中に溶解している量を採取した試料重量で割り 100 を乗じて溶解度とした。その結果を Table 5, Fig. 4 に示

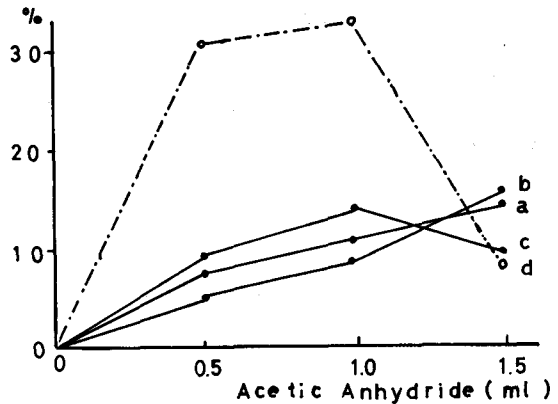


Fig. 3. Stepwise acetylation of hemicellulose A. a: unfractionated AH. b: water insoluble fraction. c: water soluble fraction. d: yields of water soluble fractions.

(—) acetyl content. (- - -) yield.

Table 4. Stepwise methylation of hemicellulose A

	NaOH (%)	DMS (ml)	Yield (%)	OMe (%)	DS
MH 1	10	10	51.5	24.4	1.2
MH 2	6	10	66.7	21.3	1.0
MH 3	6	5	84.5	16.7	0.8
MH 4	6	3	60.5	11.7	0.5
MH 5	6	1	77.3	4.5	0.2

DMS: Dimethyl sulfate.

Table 5. Solubility and limiting viscosity numbers of the methylated hemicellulose A in water

	MH 1	MH 2	MH 3	MH 5	MH 5
solubility (%)	99.7	100.7	91.8	73.7	<72.7
[ $\eta$ ]	0.53	0.63	0.58	0.63	

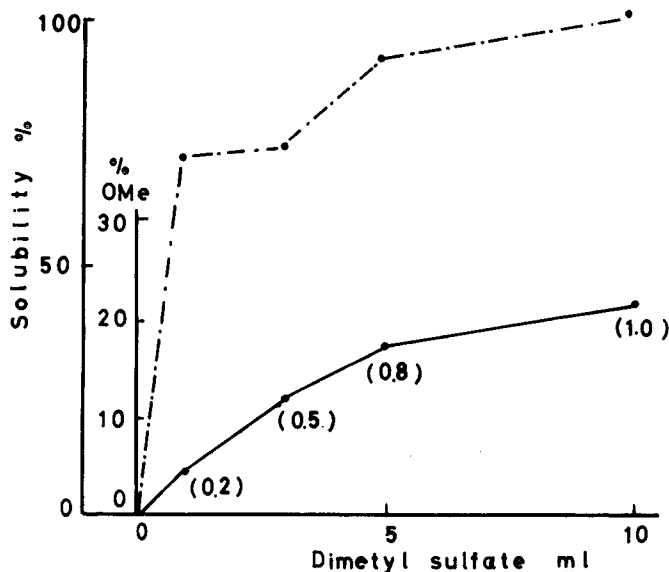


Fig. 4. Stepwise methylation of hemicellulose A in 6% NaOH.  
 (—): OMe (%). (--- · --- · ---): solubility in water. ( ): DS.

した。b. 粘度 清澄な水溶液にしたのち、25.3°CでCannon Fenske粘度計を用い流下時間を測定した。各メチル化物の極限粘度をTable 5に示した。c. 水溶液の性状 水への溶解性において差異が認められたので、水溶液にした後、その外観を観察した。MH 1~MH 3まではほぼ透明溶解したが、MH 4ではにごりが観察され、MH 5は白濁した。また液を清澄にした約0.5%水溶液に、酢酸-エタノール(1:5)10混液倍量を加え、沈殿が生成するかどうかを調べた。その結果、MH 1~MH 3では沈殿が生成されなかったのに対し、MH 4, MH 5ではほぼ定量的に沈殿を生成した。iii) メトキシル置換状態の検索 部分メチル化ヘミセルロース中の置換基の分布を知るために試料を加水分解し、ガスクロマトグラフィーにより部分メチル化糖を調べた。

各メチル化物は72%~8%<sup>28)</sup>硫酸法で加水分解し、2.1.3.vi)に記した方法により処理し、部分メチル化アルディトールアセテートとした。ガスクロマトグラフィーの装置および条件は2.1.3.vi)と同様にして行なった。部分メチル化糖の同定には2mのカラムを用い、既知データとの相対保持時間を比較することによって行なった。定量はピーク面積を測定して行ない、未知ピークに対しては主要なもの以外は考慮しなかった。典型的なガスクロマトグラムをFig. 5

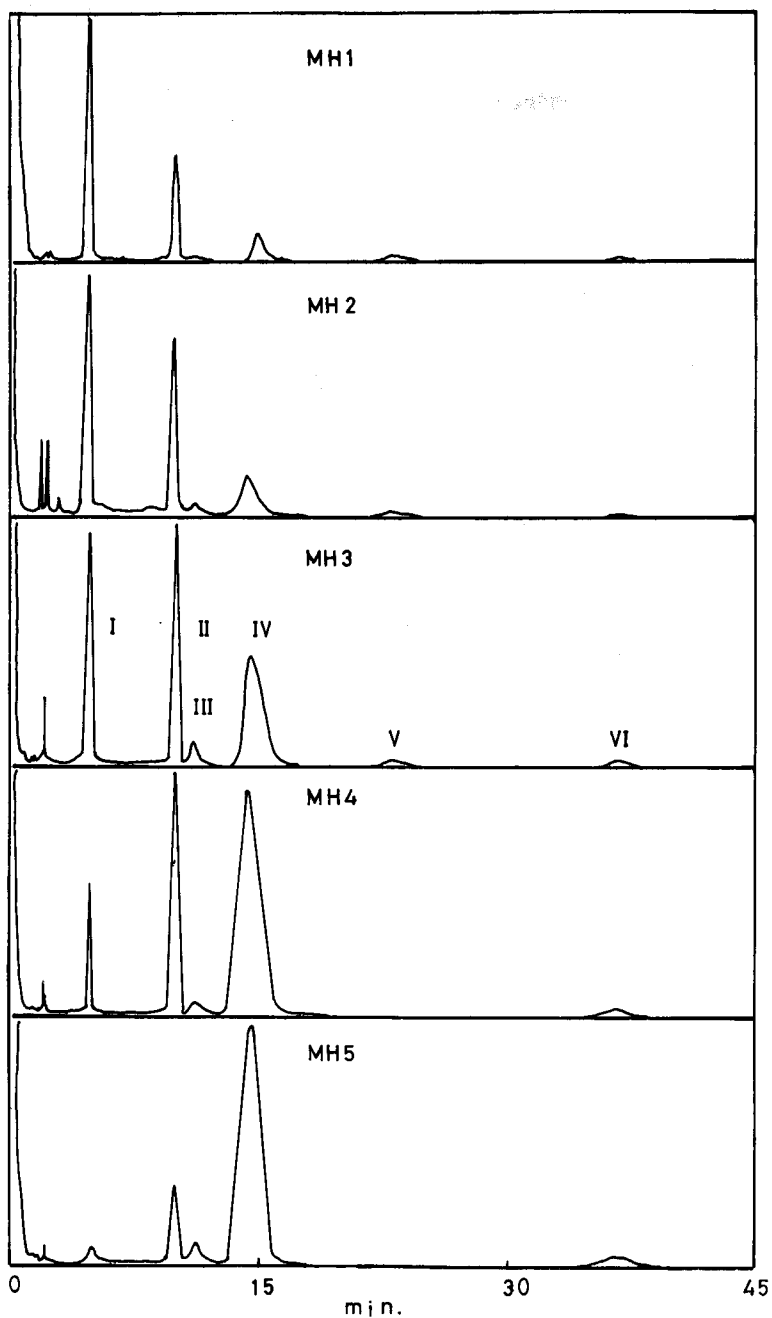


Fig. 5. Separation of partially methylated alditol acetates on ECNSS-M column.

I. 2,3-di-O-methyl-D-xylitol acetate. II. mono-O-methyl-D-xylitol acetate. III. D-arabitol acetate. IV. D-xylitol acetate. V. not identified. VI. D-glucitol acetate.

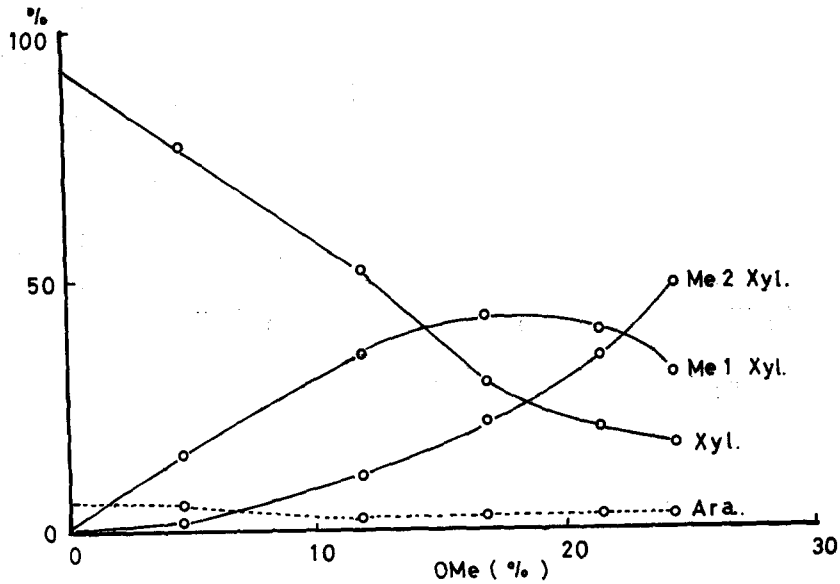


Fig. 6. Distribution of substituents in a partially methylated hemicellulose.

Table 6. The ratio of sugars in the hydrolysates of the methylated hemicellulose A

	Me 2 Xylose	Me 1 Xylose	Xylose	Arabinose	Glucose
MH 1	18.4	11.6	5.7	1.0	trace
MH 2	11.4	13.0	6.5	1.0	trace
MH 3	8.0	14.5	10.3	1.0	trace
MH 4	5.3	17.5	25.7	1.0	trace
MH 5	0.4	3.3	16.7	1.0	0.4
HA	0	0	15.7	1.0	1.2

に、置換キシロースの分配を Fig. 6 に、加水分解物中の糖残基の比率を Table 6 にそれぞれ示した。

### 2.3 抗腫瘍試験

MH 3, SX-I, WSH, HA について動物実験を行ない抗腫瘍効果を調べた。MH 3 はなおも、現在検討中であり、ここでは SX-I, WSH, HA についての実験結果を示す。(SX-I の試験の一部は北海道大学医学部、細川真澄男氏によって行なわれた。)

#### 2.3.1 SX-I の効果

試料 SX-I, 5.6 g を生理食塩水 100 ml に 1 日攪拌しながら溶解させたが、一部不溶部があったので、12,500 rpm, 50 分間遠心分離をし透明な溶液とした。溶液中の SX-I 含量は 42.6 mg/ml であった。この溶液をアンプルにとり、封管して 120°C, 2 時間滅菌し、以下の動物実験に供した。i) Ehrlich 腹水型に対する効果 実験動物は ICR マウス 8 10 匹を使用した。

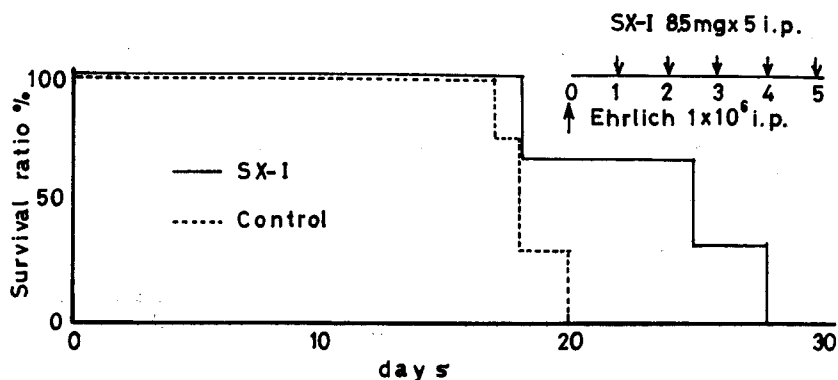


Fig. 7. Anti-tumor effect of SX-I on Ehrlich (ascites form).

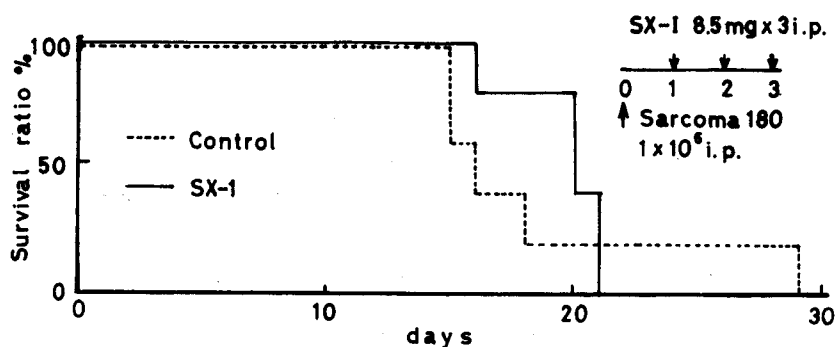


Fig. 8. Anti-tumor effect of SX-I on Sarcoma 180 (ascites form).

Ehrlich 腹水型腫瘍細胞  $1 \times 10^6$  個をマウスの腹腔内に接種後、処理群は翌日より1日1回  $0.2 \text{ ml}$  ( $0.85 \text{ mg}$  の SX-I を含む) を5日間腹腔内投与した。対照群はその間、 $0.2 \text{ ml}$  の生理食塩水を腹腔内に注射した。平均生存日数を計算し、延命効果から有効性を判定した。なお生存日数は腫瘍を接種した翌日から死亡前日までの日数とした。死亡マウスは体重を測定後、解剖し死因を判定し、腫瘍死以外で死んだ個体については平均生存日数の算出の際除外した。結果を Fig. 7 に示した。処理群における平均生存日数は  $23.69 \pm 4.19$  日、対照群では  $18.25 \pm 1.09$  で5.4日の延命が認められた。ii) Sarcoma 180 腹水型に対する効果 a. 後投与

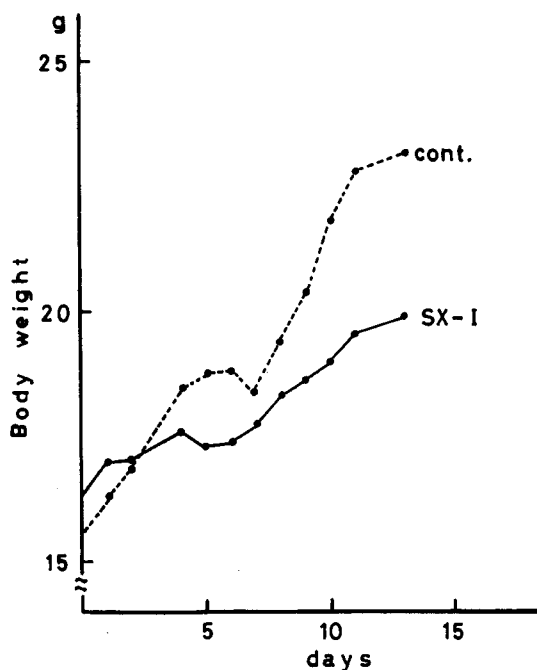


Fig. 9. Anti-tumor effect of SX-I on Sarcoma 180 (ascites form).

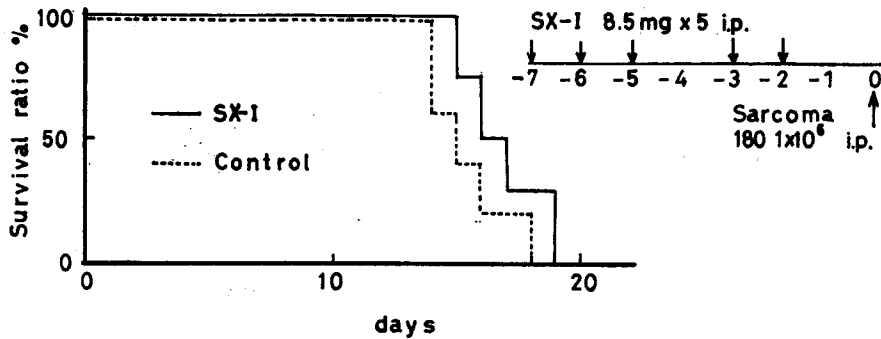


Fig. 10. Anti-tumor effect of SX-I on Sarcoma 180 (ascites form).

実験動物として ddy ♂10 匹を用いた。ddy 系マウスで継代培養した Sarcoma 180 腹水腫瘍細胞をマウスの腹腔内に  $1 \times 10^6$  個接種した。翌日より試料溶液 0.2 ml を毎日 1 回、3 日間腹腔内投与した。マウスの体重を毎日ほり、体重の増加を観察した。結果は Fig. 8, Fig. 9 に示した。処理群の平均生存日数は  $19.6 \pm 1.85$  日、対照群では  $18.6 \pm 5.31$  日で 1 日ほど延命が認められた。体重の増加は処理群でやや抑えられた。b. 前投与 ddy マウス ♂10 匹を用い、処理群は毎日 1 回 5 日間腹腔内投与後、Sarcoma 180 腹水腫瘍細胞  $1 \times 10^6$  個腹腔内に接種して、前投与による効果を調べた。結果を Fig. 10, Fig. 11 に示した。処理群の平均生存日数は  $16.75 \pm 1.48$  日、対照群で  $15.40 \pm 1.87$  日であった。iii) Endoxan と SX-I の併用による Ehrlich 腹水型に対する効果 Fig. 12 に示した方法で、

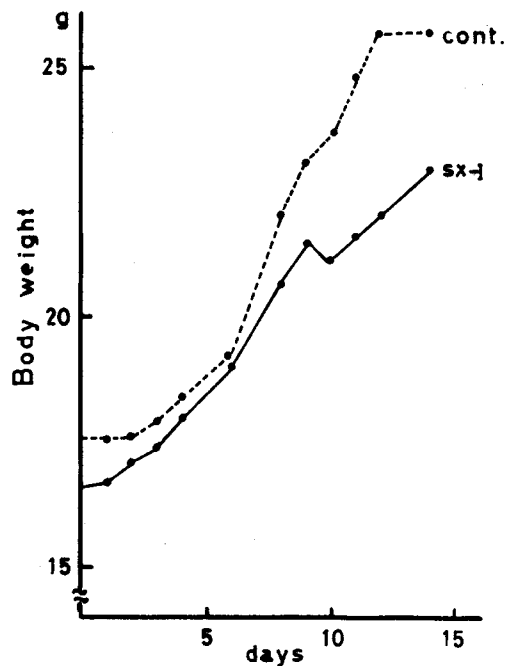


Fig. 11. Anti-tumor effect of SX-I on Sarcoma 180 (ascites form).

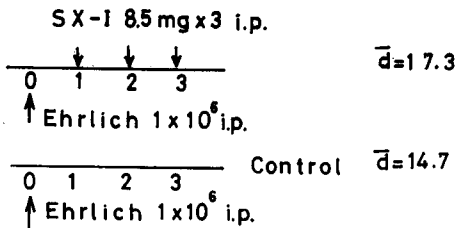


Fig. 12. Anti-tumor effect of SX-I on Ehrlich (ascites form).

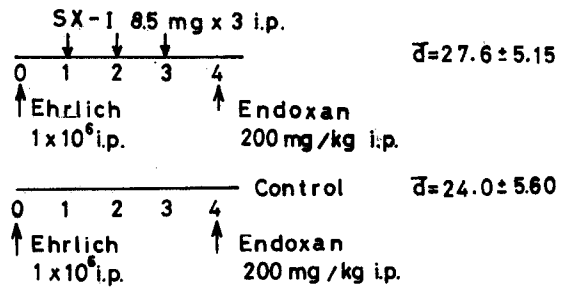


Fig. 13. Anti-tumor effect of combined treatment with SX-I and Endoxan on Ehrlich (ascites form).

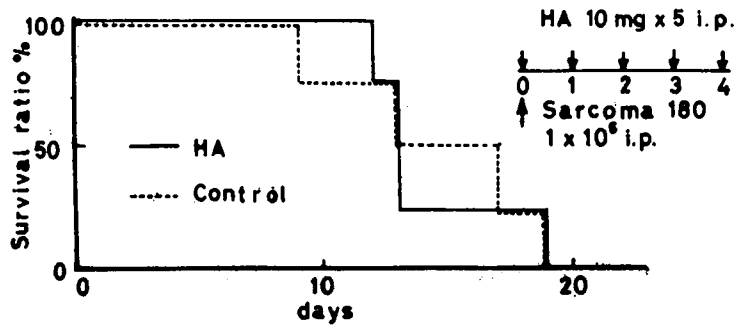


Fig. 14. Anti-tumor effect of hemicellulose A on Sarcoma 180 (ascites form).

ICR マウス 6 匹を使い単独投与による効果を調べた。同時に Fig. 13 の方法で Endoxan との併用による効果を調べた。単独投与で 2.6 日、併用により 3.6 日の延命が観察されたが、併用による効果はさほど顕著ではなかった。

### 2.3.2 ヘミセルロース A の効果

ラットに移植した吉田肉腫に対して効果のみられたものであるが、本実験では新たに調製した SX-I, WSH との比較の意味で、Sarcoma 180 腹水型に対する効果を調べた。ヘミセルロース A は生理食塩水に 10 mg/0.2 ml となるように加え、滅菌後けん濁液として動物実験に供した。第一回目の投与を腫瘍移植後 2 時間目に行なった以外は 2.3.1 i) と同じである。マウスは ddy ♂ 10 匹を用いた。結果を Fig. 14, Fig. 15 に示した。処理群の平均生存日数は 14.00 ± 2.92 日、対照群では 14.50 ± 3.84 日で効果は認められなかった。

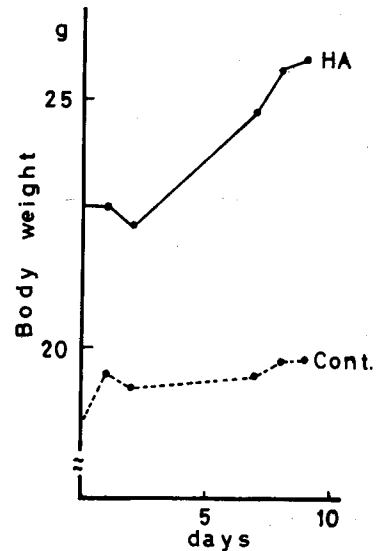


Fig. 15. Anti-tumor effect of hemicellulose A on Sarcoma 180 (ascites form).

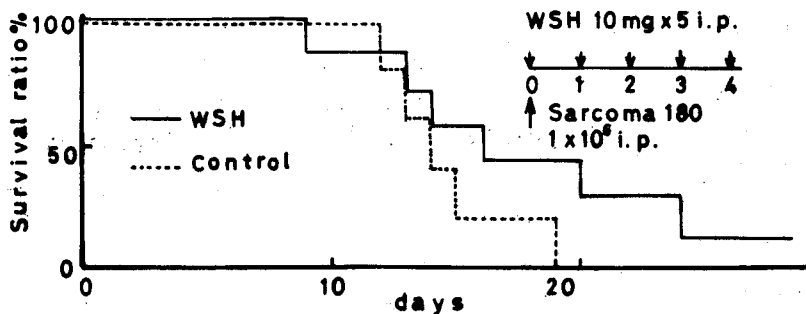


Fig. 16. Anti-tumor effect of WSH on Sarcoma 180 (ascites form).

2.3.3 WSHの効果

i) Sarcoma 180 腹水型に対する効果 WSH は 10 mg/0.2 ml となるように生理食塩水にとかした。滅菌, その他の操作は 2.3.2 と同様に行なった。動物は ddy マウス 各 13 匹を用いた。結果は Fig. 16, Fig. 17 に示した。処理群においてばらつきが認められ明瞭な結果とは言えないが, 対照群が 19 日ですべて死亡したのに対し, 処理群ではなおも 3 匹が生存していたことから, わずかながら効果があると考えられる。ii) Sarcoma 180 固型腫瘍に対する効果 ddy マウス 各 13 匹の右背部皮下に, Sarcoma 180 腹水腫瘍細胞  $5 \times 10^6$  個を接種し固型腫瘍とした。その日より WSH 10 mg を毎日 5 日間腹腔内投与した。腫瘍の大きさをノギスで経時的に測定

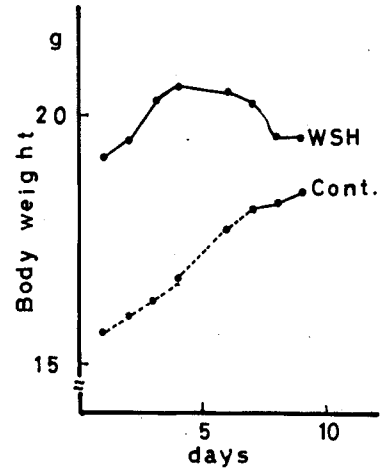


Fig. 17. Anti-tumor effect of WSH on Sarcoma 180 (ascites form).

し, 腫瘍面積の増加を観察した。結果を Table 7, Fig. 18, Fig. 19 に示した。対照群にくらべ腫瘍面積の増加は 10 日目から明らかに抑えられた。処理群 8 匹のうち 2 匹において腫瘍の完全退縮が観察された。

Table 7. Anti-tumor effect of WSH on Sarcoma 180 (Solid form) (mm)

days	10	14	16	18	21	23
K	11×8	17×15	20×17	28×18	—	—
KrA	13×8	15×10	20×12	22×15	22×17	—
KlA	8×7	10×12	20×12	24×16	22×13	23×15
KrB	6×6	12×12	26×16	27×15	30×17	32×17
KlB	14×12	24×16	27×20	30×22	26×20	—
K	12×8	14×11	15×13	17×13	17×14	17×13
KrA	11×7	15×10	16×12	15×10	18×14	19×13
KlA	10×7	19×11	20×11	23×13	23×14	22×15
KrB	8×6	11×8	7×5	6×4	5×4	0×0
KlB	15×7	14×12	17×14	17×14	20×15	21×18
R	13×9	18×10	18×10	22×14	22×15	24×15
RrA	12×7	12×11	13×11	11×10	10×9	10×8
RlA	14×9	15×8	18×13	17×13	22×15	20×15

K~KlB control. K~RlA WSH 10 mg×5 i. p.

2.4 メチル化分析

効果のあった SX-I についてメチル化分析を行なった。メチル化は箱守法<sup>29)</sup> によって行なった。絶乾 SX-I 0.988 g を三つ口フラスコにとり, 乾燥ジメチルスルホキシド 50 ml を加え

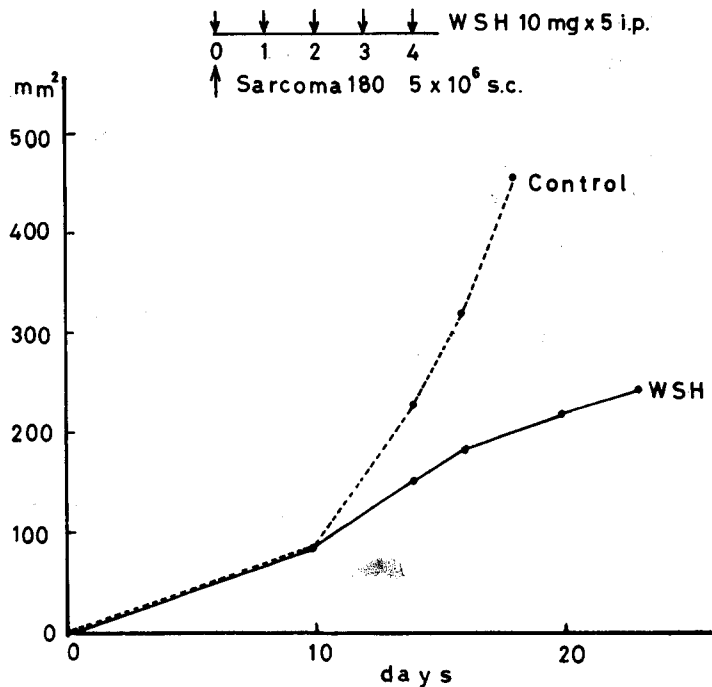


Fig. 18. Anti-tumor effect of WSH on Sarcoma 180 (solid form).

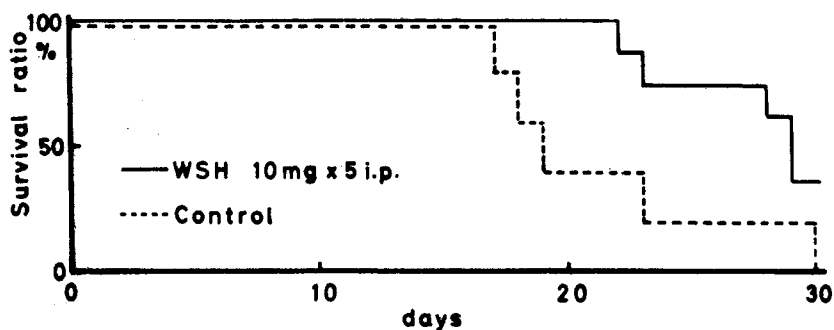


Fig. 19. Anti-tumor effect of WSH on Sorcoma 189 (solid form).

窒素気流下で溶解させた。別に調製したメチルスルフィニールカルバニオン ( $1.5 \times 10^{-3}$  M/ml) 15 ml を注射器を使い滴下した。反応溶液はすぐにゲル化を起したが、1時間後には攪拌可能となり、褐色粘稠な溶液を与えた。反応溶液は氷-水で冷却し、ジメチル硫酸 6.5 ml を越えないようなやさで滴下した。反応溶液は流水にて1日透析後、クロロホルムで抽出し、ポウ硝で乾燥後  $40^{\circ}\text{C}$  以下で濃縮した。濃縮液は多量の石油エーテル中に攪拌しながら滴下し、生成した沈殿は遠心分離によって回収、乾燥後淡く着色した白色粉末 861 mg を得た。IR スペクトルにより、 $3,400\text{ cm}^{-1}$  付近の水酸基による吸収は消え、 $1,750\text{ cm}^{-1}$  付近にエステルカルボニルによる吸収が観察された。OCH<sub>3</sub>: 35.1% 完全メチル化物 500 mg は乾燥テトラヒドロフラ



**Table 8.** Methylethers in the hydrolysates of the methylated SX-I

	OMe (%)	Sugars			
		2,3 Me 2 Xyl.	Me 1 Xyl.	2,3,4,6 Me 4 Glu.	Me 3 Glu.
II (sol. p.)	38.8	10.2	1.0	<0.7	1.1
III (insol. p.)	36.9	20.7	1.0		
T*		1.42	2.73	1.00	2.38

\* Retention times of the corresponding alditol acetates on an ECNSS-M column relative to 1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucitol.

### 3. 考 察

#### 3.1 ヘミセルロースの性質

単離したヘミセルロースの分析結果は Table 1 に要約した。これはすべてアラビノグルクロノキシランを主成分とするものであろう。ヘミセルロース A は氏家<sup>15)</sup> の示した結果とほぼ一致し、キシロース/アラビノースは 17, 本実験では 16 という数値を与えた。WSH, SX-II ではこの比が低い、その他の画分は 15 から 17 の付近にあった。多くの画分で見られるグルコースは、グルコースのほとんどない画分 (PX) が存在し、また SX-I のメチル化分析より、グルコース由来のピークが見られない画分 III が存在することから、キシランを構成するものではなく、セルロースの分解物等に由来すると思われる。WSH はリグニン含量、ゲル濾過曲線 (Fig. 2) が示すように、かなり不純な画分で、また低分子量成分を含んでいる。これは脱リグニンの際かなりの変化をうけた部分がこの画分に移動したことを思わせるが、同時にガラクトースの存在は他の多糖類の存在を示唆している。SX-I はアセチル基を 7% (アラビノグルクロノキシランとして 9.2%) 含んでおり、水溶性である。ネマガリダケキシランが広葉樹キシラン同様アセチル基を有していることが明らかになったが、先に前川<sup>19)</sup> によりマダケから同様な画分が抽出され、アセチル基 6.53%, 糖組成キシロース 90.6%, アラビノース 5.8%, グルコース 3.1%, ガラクトース 0.4% という値を報告している。SX-I は抗腫瘍効果のみられた画分であったのでメチル化分析を行なった。ガスクロマトグラフィーでは保持時間の短い部分、すなわちトリ-O-メチル-キシロース、トリ-O-メチル-アラビノース等の情報が不充分であったが次のようなことがわかった。1. 2,3-ジ-O-メチル-キシロースに由来するピーク面積が大きいことから、キシロースが 1→4 結合したかなり linear な構造をもっている。2. キシロース単位 10~20 に 1 個の割合でアラビノースあるいはウロン酸側鎖をもっている。ジメチルスルホキシド、熱水抽出後に、アルカリで抽出されてくる部分すなわち PX は、ほぼ純粋なアラビノグルクロノキシランで今後詳しい構造研究をする際には適切な材料と言えるだろう。

#### 3.2 ヘミセルロース A の水溶性

部分アセチル化では、最高 40% 前後の収量で水溶性ヘミセルロースが得られた。置換度との関係では、0.30 から 0.47 の間で水溶化が起こっており、置換度 0.27 あるいは 0.50 では水

不溶性であった。部分アセチル化による収量の減少はほとんど起こらず(収率, 90.5~93.8%), はなはだしい分解は起こっていないと考えられる。これはまた極限粘度が0.56とSX-Iと近い値を示していることから裏付けされる。水溶性試料の収量が低いが, さらに条件を選択するとある程度上がると思われるが反応が不均一なため何らかの工夫が必要であろう。部分メチル化では, ほぼ完全に水溶化の目的が達成され, 置換度0.8~1.2のものは水への溶解性が良かった。置換度0.2のMH5でもその約70%が水溶性であり, かなり広い範囲にわたって水溶化が起こった。ただ置換度0.5以下のものは, 水への溶解性で0.8以上のものとは異なっていた。メトキシル基はランダムに分布していると思われる。

### 3.3 抗腫瘍性

SX-Iについては次の事が考察された。1. Ehrlich 腹水型, Sarcoma 180 腹水型に対してわずかの延命が期待できた。2. 体重増加曲線より, 処理群の腫瘍の増殖は対照群よりもやや抑えられていると思われた。3. Endoxan との併用は顕著な効果を期待することはできなかった。4. 処理群においてSX-I投与後10日目で局部的脱毛を起こす個体があったが, その後7日程で回復し始めるという現象が観察された。従来, 多くの多糖類が無効とされてきた腹水型を使った実験であるので, わずかな延命は意義のあることと思われる。ヘミセルロースAは全く無効であったので, それよりは強い抗腫瘍性をもっていると推察される。脱毛の原因に関しては今のところ不明であるが, このような多糖体が毒性をもつ例はあまりないので, きょう雑物等に由来すると考えられる。ヘミセルロースAはSarcoma 180 腹水型には全く効果を示さなかった。WSHに関しては次のことがわかった。1. Sarcoma 180 腹水型に対しわずかながら延命が期待できた。2. Sarcoma 180 固型に対しては顕著な効果を示し, 対照群にくらべ10日目から腫瘍の増殖が抑えられた。また8匹のうち, 2匹で腫瘍の完全退縮が観察された。このように本研究により, ヘミセルロースA以外の画分, すなわちWSH, SX-Iにおいて新たに抗腫瘍性が存在することが明らかになった。またこれらの効果は, 本実験に関する限りヘミセルロースAより強いと思われた。行なった実験の多くは腹水型を用いているため効果の判定がむずかしい場合もあった。今後, 固型腫瘍で行なえばより明確な結果が期待できると思われる。SX-I, WSHは未精製であったが, 効果のあることがわかった現在, 精製し, 投与量を含めた詳細な研究が望まれる。

## 4. 要 約

以前の研究で抗腫瘍活性を有することが判明したヘミセルロースAを, 部分メチル化, あるいは部分アセチル化で水溶化した。前者では広い範囲にわたって水溶化が起こり, 置換度0.8~1.2の試料は水への溶解性が良かった。後者では, 水溶性試料の置換度は0.30~0.47の間であった。同時に5種のヘミセルロース画分, WSH, WIH, SX-I, SX-II, PXをホロセルロースから調製し, それらの化学的組成を調べ, 水溶性であるWSH, SX-Iについては動物実験

を行なった。その結果、WSH, SX-Iにも新たに抗腫瘍活性があることが明らかになった。部分メチル化物の抗腫瘍性は現在検討中である。

## 謝 辞

本研究に際し、動物実験の便宜をはからって頂いた北海道大学医学部、小林博教授、細川真澄男助手に深甚の謝意を表す。試料の採取にあたっては北海道大学天塩地方演習林の方々にお世話になり、また親切な御指導と貴重な助言を頂いた武山浩武助手をはじめとする木材化学、林産製造、演習林の諸兄に併せて謝意を表す。

## 参 考 文 献

- 1) BRANDER, W. T., CLARKE, D. A. and STOCK, C. C.: *Cancer Res.*, **18**, 347-351, 1958.
- 2) CHIHARA, G., HAMURO, J., MAEDA, Y., ARAI, Y. and FUKUOKA, F.: *ibid.*, **30**, 2776-2781, 1970.
- 3) CHIHARA, G., MAEDA, Y., HAMURO, J., SASAKI, T. and FUKUOKA, F.: *Nature*, **222**, 687-688, 1969.
- 4) 千原呉郎等: *日本臨床*, **27**, 6, 177-202, 1969.
- 5) 山本郁夫・緒方幸雄・金森政人・中沢正三・辻 明良: *杏林医学会雑誌*, **2**, 2, 73-84, 1971.
- 6) 山本郁夫・緒方幸雄・金森政人・中沢正三・辻 明良: *杏林医学会雑誌*, **4**, 3, 163-166, 1973.
- 7) 小山隆三: *札幌医学雑誌*, **42**(5), 374-392, 1973.
- 8) 榊原 彰・塚田英之: *北海道科学研究費指定課題報告書*, 1970.
- 9) 土師美恵子・竹下隆裕: *日本木材学会研究発表要旨*, 1976.
- 10) 菅山順一・鎌須賀輝男・高田彰一・高野俊雄・斎藤伍作・酒井純雄: *The Journal of Antibiotics*, SER., **B**, **19**, 143-147, 1971.
- 11) HAMURO, J., MAEDA, Y., ARAI, Y., FUKUOKA, F. and CHIHARA, G.: *Chem-Biol Interactions*, **3**, 69-71, 1971.
- 12) MALM, C. J., BARKEY, K. T., SALO, M. and MAY, D. C.: *Ind. Eng. Chem.*, **49**, 79-83, 1957.
- 13) WHISTLER, R. L.: *Method in carbohydrate chemistry IV. Starch*, Academic Press New York and London 1964.
- 14) SCHAMORAK, J. and ADAMS, G. A.: *Tappi*, **40**, 5, 378-383, 1957.
- 15) 氏家雅男: *北海道大学農学部演習林報告*, **20**, 1, 280-308, 1959.
- 16) WISE, L. E., MURPHY, M. and ADDICCO, D. A. A.: *Paper Trade, J.*, **35**, 122, 1946.
- 17) WISE, L. E.: *Tappi*, **35**, 2, 122, 1946.
- 18) BLAKE, J. D., MURPHY, P. T. and RICHARDS, G. N.: *Carbohydr. Res.*, **16**, 49, 1971.
- 19) MAEKAWA, E.: *Wood Research*, **59/60**, 153-179, 1976.
- 20) TIMELL, T. E.: *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 5211, 1960.
- 21) BOUVENG, H. N., GAREGG, P. J. and LINDBERG, B.: *Acta Chem. Scand.*, **14**, 742, 1960.
- 22) 芝本武夫: *林産化学実験書*, p. 106. 東京大学農学部, 1956.
- 23) BITTER, T. and MUIR, H. M.: *Anal. Biochem.*, **4**, 330, 1962.
- 24) SJÖSTRÖM, E., HÄGLUND, P. and JANON, J.: *Svensk Papperstidn.*, **69**, 381-385, 1966.
- 25) 富本研三: *昭和49年度卒業論文*.
- 26) DUBOIS, M., GILLES, A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A. and SMITH, F.: *Anal. Chem.*, **28**, 3, 350-356, 1956.
- 27) CROON, I. and TIMELL, T. E.: *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 3416-3417, 1960.
- 28) GAREGG, P. J. and LINDBERG, B.: *Acta Chem. Scand.*, **14**, 871, 1960.
- 29) SANTORD, A. and CONRAD, H. E.: *Biochemistry*, **5**, 1508, 1960.

- 30) BJÖRNDAL, H., HELLERQVIST, C. C., LINDBERG, B. and SVENSSON, S.: *Angew. Chem.*, **82**, 643-652, 1970.
- 31) BJÖRNDAL, H., LINDBERG, B. and SVENSSON, S.: *Carbohydr. Res.*, **5**, 433-440, 1967.
- 32) 小山隆三: 札幌医学雑誌, **42**, 374 (1973).
- 33) 榊原 彰: 昭和44年度北海道科学研究費(指定課題)報告書(1970).

### Summary

Previous investigations showed that hemicellulose A extracted from bamboo grass (*Sasa kurilensis*) inhibited the growth of Yoshida sarcoma implanted in rats. Hemicellulose A is, however, insoluble in water, and it may be probable that their intraperitoneal administrations would cause some biological difficulties.

In this paper, water soluble polysaccharides were prepared by stepwise methylation or acetylation of hemicellulose A. In addition, five different hemicellulose fractions, WIH, WSH, SX-I, SX-II, and PX were isolated from chlorite holocellulose of *S. kurilensis*. Among them, WSH, SX-I, and SX were soluble in water.

The anti-tumor activity of hemicellulose A, SX-I and WSH was tested and the following results were obtained.

- (1) SX-I had slight activity on Ehrlich and Sarcoma 180 ascites implanted in mice.
- (2) WSH also had activity slightly on Sarcoma 180 ascites and remarkably on Sarcoma 180 subcutaneously implanted in mice.
- (3) Hemicellulose A had no anti-tumor activity on Sarcoma 180 ascites.