

選択的細胞毒性を有する亜熱帯生物資源の探索について — 各種ガン細胞に対する県産資源の効果 —

豊川哲也、鎌田靖弘、山城利枝子、比嘉賢一、吉田安彦¹、花城薫¹

1. 緒言

近年、世界的に医療に対する考え方が変わりつつあり、西洋医療（現代医療）を補ったり置き換える、補完代替医療が広く行われるようになってきた。中でも生理機能を有するいわゆる機能性食品の利用が注目されており、その産業規模は日本国内で一兆円に達すると言われていている。日本で唯一熱帯・亜熱帯地域に位置している沖縄県は、他府県とは異なる生物が多数生息し、補完代替医療および健康増進に利用可能な素材が豊富に存在すると考えられている。また、沖縄県民の健康・長寿が、沖縄の伝統的かつ特徴的な食事・食材に起因していると指摘されており、県民の死亡率の割合で三大生活習慣病（ガン、心疾患、脳血管障害）の占める割合が都道府県別の比較で最下位、平均年齢が最上位であることもこれを裏付けている。すなわち、沖縄で利用されてきた多様な伝統食品や生物資源が、健康保持を目的とした食品や医薬品等の開発に関して極めて高い利用価値を有していると考えられる。そこで県産資源について健康・長寿に関わる機能性を探索し、それらを食品等に応用することは、高齢化社会を迎えつつある日本全体にとって有益であると言えよう。本研究の最終的な目的は、沖縄県の豊富な生物資源を利用した高付加価値型製品の開発を行うことであり、食品および機能性食品への応用を足がかりに、工業原料の供給、製薬、創薬を視野に入れた産業の育成にある。しかしながら、県外・国外との商品開発力を念頭に置くと、その中では技術力・資金力が脆弱と言われていた沖縄が、ただ闇雲に研究を推進するのは得策とはいえない。幸い沖縄県は、「豊富な生物資源」、「世界的な長寿地域」、「温暖な気候、美しい自然」等、他の地域との差別化を図るうえで有利な有形無形の資源に恵まれている。その中でも、ゴーヤーやウコンおよびモズクなどは「健康にいい食材」のイメージで沖縄ブランドとして定着している。その気運に乗って「第2、第3のゴーヤーやウコン」を創出し新たな沖縄ブランドを定着させることは、一次産品の多様化および消費の拡大につながり、他の地域との差別化を図ることが可能である。我々は、こうした考えを背景に「亜熱帯沖縄」をキーワードに選定した陸上植物や海藻等が持つ機能性の検索を行っ

ている。本研究では国民の関心が最も高いと言える「ガン抑制効果」を機能性の検索として選択し、生物資源の抽出液をヒト細胞培養液に添加し、ヒト正常細胞には毒性を示さず、ヒトガン細胞にのみ毒性を示す選択的細胞毒性素材^{3),4)}の探索を行った。

2. 実験方法および実験条件

2-1. 実験材料及び装置

実験材料には、当センターが所有する葉草・海藻等の抽出液約300種のうち、「亜熱帯沖縄」をキーワードに157種（表1）を選択した。選択的細胞毒性試験に使用した細胞は、A-431、CCD-27SK、A549、WI-38、Hep G2、CS-Hc Cells、Raji Cell、KATOⅢの8種類で、詳細を表2に示す。

細胞の生存率の測定にはMTTアッセイ（プロメガ、CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay）を用い、吸光度の測定にはマイクロプレートリーダーを使用した。

2-2. 試料の調製

当センターが所有する抽出液は、 -40°C で保存・管理されており、調製方法は既報¹⁾を参照されたい。今回選択的細胞毒性試験で用いた試料は、調製・保存されていた抽出液を濃縮したものである。すなわち、保存抽出液を5ml分取し減圧遠心濃縮により乾固させ、乾固物を1mlのPBS(-) (pH7.4) で再溶解後、 $0.45\mu\text{m}$ の滅菌フィルターで濾過滅菌して添加サンプルとした。

2-3. MTT法を用いた細胞毒性試験

テトラゾリウム塩（MTT）は生細胞によって青色のホルマザン産物に変換され、570nmの吸光度を測ることによって生成量を容易に測定できる。ホルマザン量と生細胞数は比例関係にあるので、比色定量法を用いて簡単に細胞数を割り出すことができる。MTT法²⁾とは、このようにホルマザン量から生細胞数を割り出す手法であり、本研究はこのMTT法を用いて添加サンプルの細胞へ及ぼす影響（細胞に対する毒性）を生細胞の数を比較することによって明らかにした。

¹ 沖縄県産業振興公社 健康・長寿研究センター

表1 選択的毒性試験に供したサンプル

1	アマチャヅル	41	アガリクス	81	キタチアロエ	121	②ホンダワラ属(残液)
2	海人草	42	ワイキョウ000929(葉)	82	烏ゴボウ	122	カキケノリ(伊計)
3	リュウキユウモギ(ジャージャーガル 自然日照)	43	グワバ(実)	83	宮農36(莖)	123	カラガラ(伊計)
4	グワバ(ジャージャーガル 自然日照)	44	つるむらさき	84	アダン(莖)	124	パピラソノ(糸満)
5	ニガナ(葉)	45	クミスクチン	85	カーナ	125	トウガン(本体)
6	グワバ(葉)	46	月下美人(花)	86	モウイ(種)	126	アカハウミウチフ(糸満)
7	ア一サ	47	宮農36(本体)	87	モンパノギ(幹)	127	フクロノリ(糸満)
8	ビセ(本体)	48	グワバ(ジャージャーガル 自然日照)	88	紫ウコン	128	ユミガタオゴノリ(糸満)
9	へちま	49	シンロカイ(皮)	89	パバイヤ(熟果)	129	コケイクツツ(伊計)
10	ニガナ(根)	50	にがうり	90	イソノハナ(伊計)	130	トウガン(皮)
11	サラカチ	51	山羊肉	91	島バナナ	131	乾燥酵母
12	モ一イ	52	ス一ナ	92	サクナ(根)	132	リボンアオサ(糸満)
13	イカスミ	53	組山芋	93	クワソソウ	133	モ一ウイ(可食部)
14	濃紫葉	54	ワタガラス	94	大東ワタン(莖)	134	クビレオゴノリ(卵無し 糸満)
15	モ一ア一サ	55	カゴメノリ(糸満)	95	マンゴン	135	ヤセガタミツレミル(伊計)
16	蒸蕪バガス	56	ムラチドリB(糸満)	96	島ニンジン	136	コナハタ属(伊計)
17	シークワーサー(実)	57	バガス	97	ヒメモサヅキ(真栄田)	137	チアブル(皮)
18	烏らつきよう	58	クビレツタ(本体)	98	イシノハナ(伊計)	138	イハラノリ(糸満)
19	シンロカイ(中身)	59	パイんかす(頭部)	99	クビレツタ(莖)	139	ビロ一ドガラガラ(伊計)
20	シシ玉(葉)	60	糖蜜	100	ウチワサボテングサ(伊計)	140	ヒメモサヅキ(伊計)
21	ハママ一チ	61	姜芽かす	101	クビレオゴノリ(卵あり 糸満)	141	オゴノリ
22	ワイキョウ000922(葉)	62	モ一ウイ(皮)	102	①ホンダワラ属(残液)	142	アナアオサ(天然)
23	ヘハナボロキク(島尻マーシ 自然日照)	63	ハンタマー	103	ムラチドリA(糸満)	143	アナアオサ(養殖)
24	ヒハチ	64	リュウキユウハギ(莖葉)	104	ラツバモク(真栄田)	144	キリンサイ
25	シマヤマヒハチ(実)	65	シオグサ属(糸満)	105	カイメンソウ(糸満)	145	ソソ属(伊計)
26	オトコヨモギ(ジャージャーガル 自然日照)	66	酵母かす(生)	106	カゴメノリ(真栄田)	146	ヒトエタサ
27	カラシナ(自然日照)	67	ウスガサネ(伊計)	107	ススカケヅタ又はタカヅキヅタ(残液)	147	ウブダクサ(糸満)
28	唇輪草(ジャージャーガル 自然日照)	68	カタオゴノリ(糸満)	108	ランソウ類(真栄田)	148	トゲイギス
29	シークワーサー(皮)	69	ハブ粉	109	シオミドロ(糸満)	149	フシクレノリ(糸満)
30	アダン(新芽)	70	チアブル(本体)	110	アオモクサ(真栄田)	150	イソスギナ(糸満)
31	カワラヨモギ(ジャージャーガル 自然日照)	71	夜光貝(内臓)	111	ハイミル(伊計)	151	ホソバナミノハナ(伊計)
32	ガジュツ70℃乾	72	モモタマナ(幹)	112	マユハキモ(伊計)	152	センナリヅタ(糸満)
33	イラブ一	73	田芋(本体)	113	ソデガラミ(糸満)	153	海人草(伊計)
34	オオタニワタリ(新芽)	74	ムシ一(莖)	114	ウミウチワ属(糸満)	154	ムクキッコウグサ(伊計)
35	シシ玉(実)	75	ギムネマ	115	トウガン(種部)	155	モスク
36	ビセ(莖)	76	クウニソマツ(根莖)	116	アオモクサ(糸満)	156	リュウキユウオゴノリ
37	春ウコン	77	ウコンイソマツ	117	ホンダワラ属(伊計)	157	ハバイヤ(未熟果)
38	ウコン	78	月桃(花)	118	アオモクサ(糸満)		
39	月桃(莖)	79	ヒオウギ(根)	119	蒸留かす		
40	エンサイ(自然日照)	80	ハラゴ	120	ソソ属(残液)		

表2 本研究で使用した培養細胞

細胞名	培地	由来
A-431	D-MEM+FBS(10%)	類表皮癌
CCD-27SK	E-MEM+FBS(10%)	正常皮膚繊維芽細胞
A549	D-MEM+FBS(10%)	肺癌
WI-38	E-MEM+FBS(10%)	胎児正常二倍体(女)
HepG2	E-MEM+FBS(10%)	肝癌
CS-Hc Cells	CS-C	ヒト正常肝細胞
Raji Cell	RPMI1640+FBS(10%)	バーキットリンパ腫
KATOⅢ	McCoy'S-5A+FBS(10%)	胃癌

まず1次スクリーニングとして、157種類のサンプルを検体数=1でアッセイし、その結果を受けて検体数を増やして再試験を行った。1次スクリーニングでは、マイクロプレートの各ウェルあたり700個の細胞を播種し、サンプルを0.075 - 4.58 × 10⁶の希釈率となるように添加した。CO₂インキュベーター中(37℃、CO₂濃度5%)2日間培養後、3日目にMTTアッセイを行い、事前に作成した検量線から細胞数を算出した。PBS(-)を添加した試験区を対照として、細胞の生存率を求めた。2次スクリーニングでは、1次スクリーニングの知見を基に添加サンプル濃度を最適範囲となるように調製して細胞毒性試験を行った。

3. 結果

CCD-27SK(正常皮膚細胞)とA-431(皮膚ガン細胞)、WI-38(正常肺細胞)とA549(肺ガン細胞)、CS-Hc Cells(正常肝細胞)とHepG2(肝ガン細胞)の3組については1次スクリーニング(検体数1)で正常細胞とガン細胞との生存率を比較した。CCD-27SK(正常皮膚細胞)とA-431(皮膚ガン細胞)については、検体数=7、希釈系列₅で2次スクリーニングを行い、選択的細胞毒性を示す10種(アマチャヅル、夜光貝(内臓)、ヒオウギ(根)、ピロードガラガラ(伊計)、ホソバナミノハナ(伊計)、パピラソソ(糸満)、アカバウミウチワ(糸満)、クビレオゴノリ(卵無し、糸満)、ヒメモサ

ヅキ(伊計)、イソスギナ)を確認した(図1~10)。y軸は細胞の生存率(%)を示し、毒性のないリン酸緩衝液を対照として加えて培養した場合を「100」としている。細胞が完全に死滅していると値は「0」になる。x軸には希釈率を示す。正常細胞の生存率がガン細胞の生存率を上回り、さらに生存率の差が大きいほど、そのサンプルはガン細胞に対して選択的に毒性を示したことになる。WI-38(正常肺細胞)とA549(肺ガン細胞)の比較試験と、CS-Hc Cells(正常肝細胞)とHepG2(肝ガン細胞)の比較試験については、今後検体数を増やして統計的な解析をする予定であり、詳細については来年度報告させていただきたい。しかしながら、アッセイの精度は比較的高く皮膚の場合でも統計的に有意差がないと判断されたのは2次スクリーニングに供したサンプルの2割程度であることから、今後の試験で大部分のサンプルは有意に差があることが予想される。1次スクリーニングの結果から、WI-38(正常肺細胞)とA549(肺ガン細胞)については、選択的細胞毒性を示す可能性があるものを陸生植物1種、水生植物3種、計4種得た。CS-Hc Cells(正常肝細胞)とHepG2(肝ガン細胞)については、陸生植物13種、水生植物1種、その他1種、計15種得た。Raji Cell(バーキットリンパ腫細胞)およびKATOⅢ(胃ガン細胞)については、それぞれに対応する正常細胞との比較を検討中である。

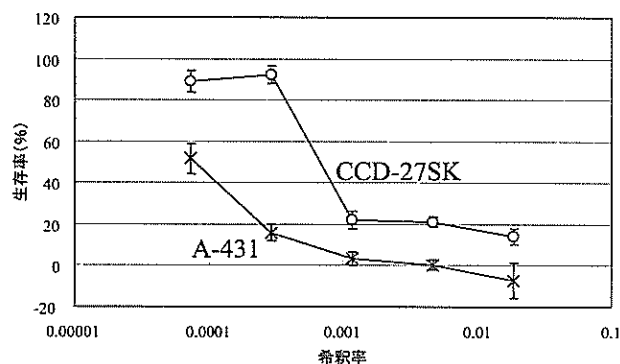


図1. アマチャヅル抽出液が正常皮膚細胞 CCD-27SK と皮膚ガン細胞の生存率に与える影響
誤差線は標準偏差を示す。

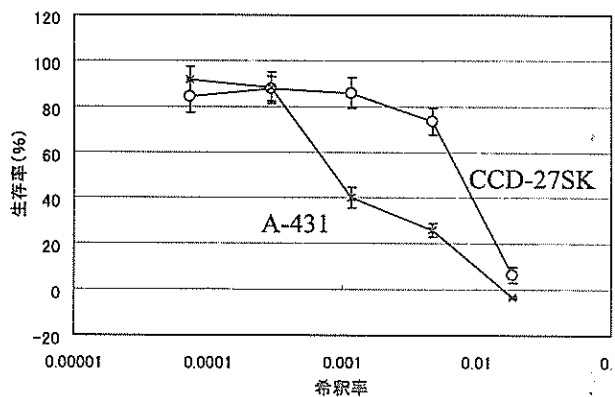


図2. 夜光貝(内臓)抽出液が正常皮膚細胞 CCD-27SK と皮膚ガン細胞の生存率に与える影響
誤差線は標準偏差を示す。

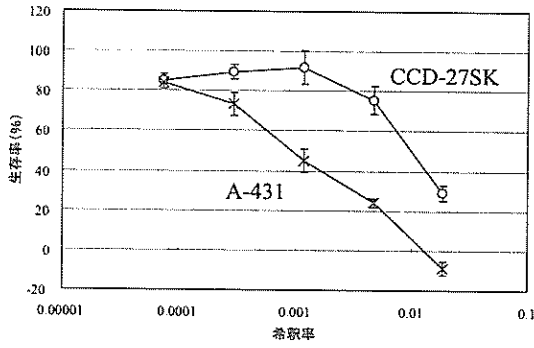


図3. ヒオウギ(根)抽出液が正常皮膚細胞 CCD-27SK と皮膚ガン細胞の生存率に与える影響
誤差線は標準偏差を示す。

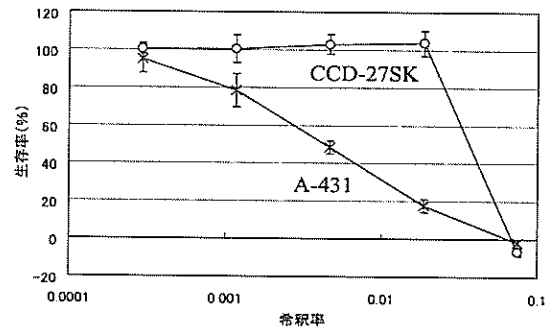


図7. アカバウミウチワ(糸満)抽出液が正常皮膚細胞 CCD-27SK と皮膚ガン細胞の生存率に与える影響
誤差線は標準偏差を示す。

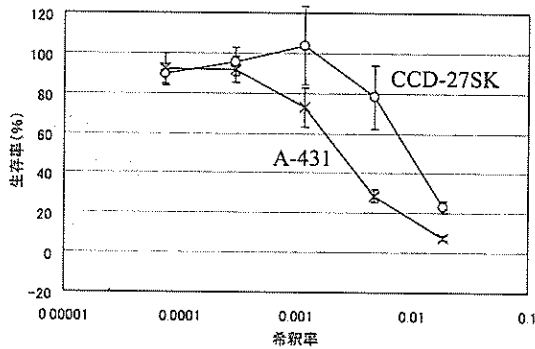


図4. ビロードガラガラ(伊計)抽出液が正常皮膚細胞 CCD-27SK と皮膚ガン細胞の生存率に与える影響
誤差線は標準偏差を示す。

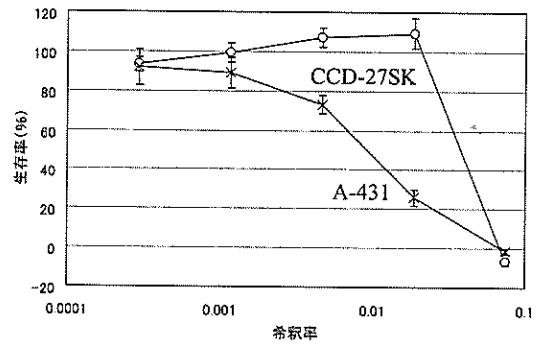


図8. クビレオゴノリ(卵無し、糸満)抽出液が正常皮膚細胞 CCD-27SK と皮膚ガン細胞の生存率に与える影響
誤差線は標準偏差を示す。

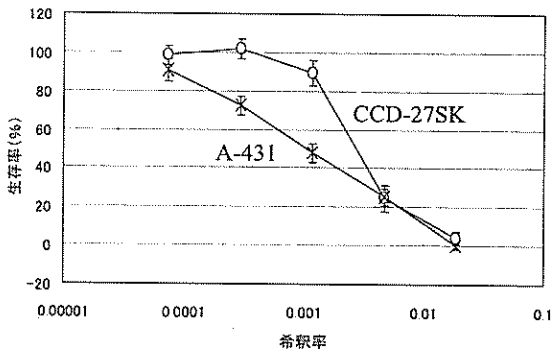


図5. ホソバナミノハナ(伊計)抽出液が正常皮膚細胞 CCD-27SK と皮膚ガン細胞の生存率に与える影響
誤差線は標準偏差を示す。

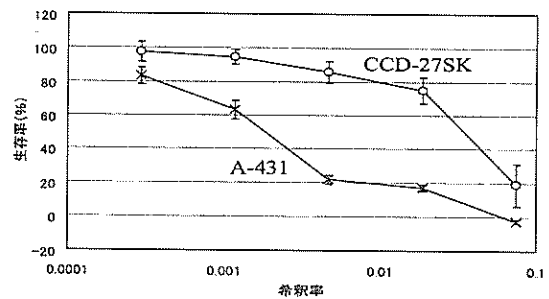


図9. ヒメモツヅキ(伊計)抽出液が正常皮膚細胞 CCD-27SK と皮膚ガン細胞の生存率に与える影響
誤差線は標準偏差を示す。

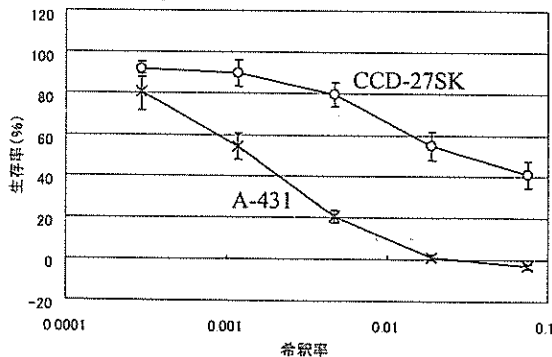


図6. パピランゾ(糸満)抽出液が正常皮膚細胞 CCD-27SK と皮膚ガン細胞の生存率に与える影響
誤差線は標準偏差を示す。

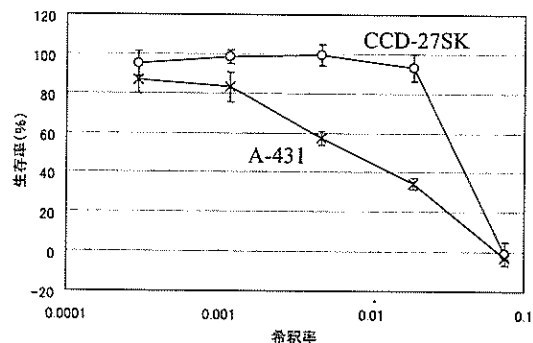


図10. イソスギナ抽出液が正常皮膚細胞 CCD-27SK と皮膚ガン細胞の生存率に与える影響
誤差線は標準偏差を示す。

4. 考察

本研究の検索結果、ガン細胞に対する選択的細胞毒性を有する生物資源を皮膚ガン細胞において10種、肺ガン細胞において4種、肝ガン細胞において15種（肺ガン細胞、肝ガン細胞については確認実験中）得た。興味深いことに、皮膚、肺、肝臓各部位で効果が見られた生物資源に重複が見られない。つまり、今回ピックアップされた生物資源が有する抗腫瘍活性は部位特異的である可能性がある。特に、肺胞上皮ガン（腺ガン）は、現在の主なガン治療である化学療法や放射線療法では、あまり期待できないと言われていることから、肺胞上皮ガンに対応する培養細胞A549において、いくつかの生物資源に本活性を有する傾向があることは、高付加価値製品の開発を目指す点で重要であると思われる。

本実験に供した陸上植物資源は、古来より食用とされてきたものを中心に選定したことから、通常の食品として摂取する場合、安全性に関して特に問題ないと考えられる。しかし、これら効果が認められた陸上資源より有効成分を単離抽出し、高濃度で摂取させる場合は特別の配慮が必要であろう。すなわち、本実験は培養細胞を使用した生体外での試験であることから、健康食品等に応用する場合、動物試験、臨床試験等を実施する必要があると考えられる。一方、海藻は食経歴が不明なものが多数あることから、食品以外の利用法を模索すべきであると考えられる。すなわち、医薬品原料や生化学試薬としての利用法の開発が求められるであろう。

今後の課題として、他部位（胃、大腸、血球等）の培養細胞を用いた検索を継続し、選抜された生物資源に含まれる生理活性物質の単離・精製・同定を進めていく。また、可能であれば、DNAチップも使用し、発現遺伝子の解析結果から生理活性を予測する研究を進め、高付加価値型製品の開発を推進する。

5. 謝辞

サンプルの一部を提供していただきました(株)トロピカルテクノセンター、(有)INARI、北中城漁業協同組合、儀保正司氏、恩納村漁業協同組合、沖縄県水産試験場に感謝申し上げます。本研究の一部は水産庁「平成12年度先端技術地域実用化研究促進事業」により行ったものです。

参考文献

- 1) 豊川哲也ら、県産資源を活用した機能性食品素材の開発、沖工技セ研究報告第2号、p35-57、(2000)
- 2) 大野忠夫編著 動物実験法代替マニュアル 共立出版 1994
- 3) 篠原和毅ら、食品工業学会誌Vol.47, No.6, 399~405

(2000)

- 4) 福家洋子ら、食品工業学会誌、Vol.41, No.10, 709~711(1994)

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターに

ご連絡ください。