

焼酎粕からの抗腫瘍性物質の生産

土谷紀美,^a 津崎健二,^a 西村賢了,^a 清長賢一,^b 松本陽子,^{b,c} 上岡龍一^{*,b,c}

Production of Antitumor Substances from Shochu Distillation Remnants

Kimi TSUCHIYA,^a Kenji TSUZAKI,^a Kenryo NISHIMURA,^aKenichi KIYONAGA,^b Yoko MATSUMOTO,^{b,c} and Ryuichi UEOKA^{*,b,c}

^aDepartment of Biochemistry and Food Science, Kumamoto Industrial Research Institute, 3-11-38 Higashimachi, Kumamoto 862-0901, Japan, ^bGraduate Course of Applied Chemistry, and ^cGraduate Course of Life Science, Sojo University, 4-22-1 Ikeda, Kumamoto 860-0082, Japan

(Received January 16, 2006; Accepted February 23, 2006; Published online March 2, 2006)

This study aimed to develop a new processing method for the effective use of rice *shochu* distillation remnants. We examined the inhibitory effects on the growth of human lung carcinoma cells in the medium of rice *shochu* distillation remnants with various fungi. Interestingly, high inhibitory effects on the growth of human lung carcinoma cells in the medium of rice *shochu* distillation remnants with *Aspergillus oryzae* were obtained, although no inhibitory effect was observed in the case of synthetic medium. We therefore fractionated the medium of rice *shochu* distillation remnants with *A. oryzae* using anion-exchange and reverse-phase chromatography. Furthermore, we attempted to determine the chemical structure of compounds that showed high inhibitory effects on the growth of tumor cells. The chemical structure of 1-hydroxy-6-(1-methylpropyl)-3-(2-methylpropyl)-2(1H)-pyrazinone was revealed on the basis of liquid and gas mass spectroscopies. This compound should be completely safe based on toxic test results using model mice.

Key words—*shochu* distillation remnants; antitumor effect; lung carcinoma cell

緒 言

近年、環境保全の見地から、バイオマスの有効利用やリサイクルが推進されており、食品工場由来バイオマスについて多くの知見が得られている。¹⁾ バイオマスの特性を利用した健康飲料も製造され、例えばモロミ酢²⁾のように一定の市場を得たものもある。焼酎は、年間数十万トンが製造され、同量の焼酎蒸留粕が廃液として排出している。処理・処分方法、又は有効利用法の開発が早急に求められており、これまで焼酎粕の有効利用に関する研究が多数報告されている。^{3–6)} また、医薬品への有効利用に関する研究も行われている。^{7,8)} 最近、焼酎粕そのものの培養がん細胞に対する抗腫瘍効果が報告された。^{9–11)} 本研究では、微生物を利用して、バイオマス中に抗腫瘍性物質を生産させ、医薬品の開発に資することを目的としている。上岡らは既に、リポ

ソームのみによる *in vitro* での顕著ながん細胞増殖抑制効果を、^{12,13)} また *in vivo* での担がんマウスの延命効果^{14–16)} 及び臨床への応用を報告している。^{17,18)} さらに、リポソームをドラッグデリバリーシステムのキャリアーとして用い、*in vitro* での治療効果を得ている。¹⁹⁾ 今回は、米焼酎粕を培地として種々の微生物を培養後、がん細胞増殖抑制効果を *in vitro* で検討し、がん細胞増殖抑制効果を有する物質を見出し、その物質の化学構造を決定した。さらに、動物を用いた急性毒性試験により安全性を確認した。

実 験

1. 培地 米焼酎蒸留粕を 2500×g, 20 分間遠心分離後、上澄液をバツフル付き三角フラスコに入れ、薄型タイプのシリコン栓を付けて、121°C, 15 分間オートクレーブ滅菌し培地とした。

2. 微生物の培養 *Aspergillus kawachii* (焼酎用実用株), *Aspergillus oryzae* (みそ用実用株), *Aspergillus oryzae* (醤油用実用株), *Aspergillus*

^a熊本工業技術センター, ^b崇城大学大学院応用化学専攻, ^c崇城大学大学院応用生命科学専攻

*e-mail: ueoka@life.sojo-u.ac.jp

awamari (NRBC 4033), *Mucor pusillus* (*Rhizomucor pusillus*, NRBC 4580), *Penicillium notatum* (*Penicillium chrysogenum*, NRBC 4640), *Rhizopus delemer* (*Rhizopus oryzae*, NRBC 4698), *Monascus pilosus* (NRBC 4520), *Monascus purpureus* (*Monascus anka*, NRBC 4478) を微生物として用いた。

胞子の状態で保存されている菌株スラントから各菌株の胞子を 0.9% 滅菌生理食塩水に懸濁し、 1×10^5 cells/ml の初濃度で培地に植菌し、30°C、160 rpm で振とう培養を行った。培養液を凍結乾燥後、リン酸緩衝液で再懸濁してろ過除菌した後、細胞試験に用いた。3種類の合成培地 (Czapek Dox 培地, Malt 培地, Sabouraud 培地) についても、同条件で培養を行った。

3. がん細胞増殖抑制効果 ヒト肺がん細胞 (RERF-LC-AI), 繊維芽細胞悪性転換株 (VA-13) 及び正常ヒト2倍体繊維芽細胞 (WI-38) は理化学研究所細胞開発銀行より購入したものをを用いた。細胞の培地として、RERF-LC-AI, WI-38 には DMEM (+10%FBS), VA-13 には MEM- α (+10%FBS) を用いた。

がん細胞増殖抑制効果は、酵素活性測定法である WST-1 assay 法²⁰⁾により評価した。対数増殖期にある細胞をトリプシン処理し、細胞懸濁液を 1×10^5 cells/ml に調製して 100 μ l/well で 96 ウェルプレートに播種した。37°C, CO₂ 濃度 5%, 湿度 95% の条件下で 24 時間、前培養を行い、試料を 10 μ l/well 添加して 48 時間本培養を行った。Cell counting Kit (同仁化学研究所) を用いて WST-1 試薬を 10 μ l/well 添加後 3 時間培養し、450 nm の吸光度を分光光度計により測定した。細胞増殖抑制効果は、対照として緩衝液を添加した場合の吸光度 A_{control} 及び試料を添加した場合の吸光度 A から、細胞増殖抑制効果 (%) = $(1 - A/A_{\text{control}}) \times 100$ として算出し、評価した。

4. 耐熱性及び pH 安定性の評価 抗腫瘍活性を有する培養液を 25—90°C の温度で 1 時間保温し、冷却後に VA-13, WI-38 で細胞試験を行い、抗腫瘍性成分の耐熱性を評価した。

また、抗腫瘍活性を有する培養液の凍結乾燥物を各 pH (4.0—8.0) の緩衝液で再懸濁し、一晚放置後、凍結乾燥してリン酸緩衝液で再溶解して試料とした。VA-13, WI-38 で細胞試験を行い、抗腫瘍性

成分の pH 安定性を評価した。

5. ゲルろ過クロマトグラフィー カラムは Sephacryl™S-200 (Amersham Biosciences, 50 mm \times 950 mm, 1800 ml 容) を用い、20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した。培養液 60 ml をロードし、移動相 20mM リン酸緩衝液 (pH 7.0, 流速 8.0 ml/min) で溶出した。溶出液は 30 ml ずつ分取し、各 5 倍濃縮した試料について細胞増殖抑制効果を測定した。

6. 陰イオン交換クロマトグラフィー 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した陰イオン交換体カラム Q Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences, 26 mm \times 400 mm, 200 ml 容) にゲルろ過クロマトの活性画分濃縮液 30 ml をロードし、20 mM リン酸緩衝液 500 ml (pH 7.0, 流速 5.0 ml/min) で溶出後、0.15 M NaCl 添加 20 mM リン酸緩衝液で 500 ml (pH 7.0, 流速 5.0 ml/min) 溶出した。溶出液は 30 ml ずつ分取し、各フラクションの細胞増殖抑制効果について肺がん細胞 (VA-13) と肺正常細胞 (WI-38) を用いて測定した。各画分の全糖濃度をフェノール硫酸法により、タンパク濃度を Protein assay Kit (Bio Rad) を用いて測定した。

7. 逆相クロマトグラフィー 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した ODS-AQ 120-S50 (YMC, 40 ml 容) を用い、陰イオン交換クロマトの活性画分濃縮液をロードし、10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) とエタノール 99.5% のステップグラジエント法 (流速: 1.0 ml/min) により溶出した。280 nm 及び 250 nm の吸光度を測定し、画分はエタノール除去後に肺がん細胞 (VA-13) と肺正常細胞 (WI-38) を用いて細胞増殖抑制効果を評価した。

8. 抗腫瘍性成分の同定 逆相クロマトグラフィーで分画された活性画分の吸収スペクトルを分光光度計 (V-560, JASCO) を用いて測定した。また、赤外吸収スペクトルを FTIR (700, JASCO) を用いて KBr 法により測定した。抗腫瘍性成分の分子量を液体クロマト質量分析計 (1100MSD, HEWLETT PACKARD) により推定した。分子量情報を基に、ガスクロマト質量分析計 (5890, HEWLETT PACKARD) による測定とライブラリ検索により化合物を同定した。

9. 抗腫瘍性成分の安全性試験 精製操作のゲルろ過クロマトグラフィーで得た活性画分について

のマウスを用いた急性経口毒性試験（限度試験）を財団法人日本食品分析センターで実施した。6週齢のマウス雄雌各5匹に、培養液活性画分を20 ml/kgの投与量で強制単回経口投与を行い、投与後14日間の対照群（水投与）との体重の比較、経過観察を行った。観察終了後解剖検査を行った。

結果と考察

1. 糸状菌培養液の抗腫瘍活性 9種類の糸状菌を米焼酎粕培地で培養し、まず、植菌後7日目の培養液のがん細胞に対する増殖抑制効果を検討した。結果をFig. 1に示す。図から明らかなように、醤油用麹菌 *Aspergillus oryzae* (*A. oryzae*) の培養液がヒト肺がん細胞（RERF-LC-AI）に対して顕著な増殖抑制効果を示した。次に、麹菌培養液のがん細胞増殖抑制効果の経時変化を検討した。結果をFig. 2に示す。図から明らかなように、7日目に増殖抑制効果が急激に増大した。麹菌体は約3日後まで増殖し、以後定常期になるが、菌体が増殖したあとに培養液のpHが上昇し、酸性から中性へと変化した。麹菌の液体培養時の培養液のpH上昇については、森村らは生産されたプロテアーゼによる菌体自己消化により引き起こされると報告している。²¹⁾ 本実験においても、pH上昇後のがん細胞増殖抑制効果が増大したことから、細胞増殖抑制物質は、菌体内に生産された酵素による菌体自己消化の結果、

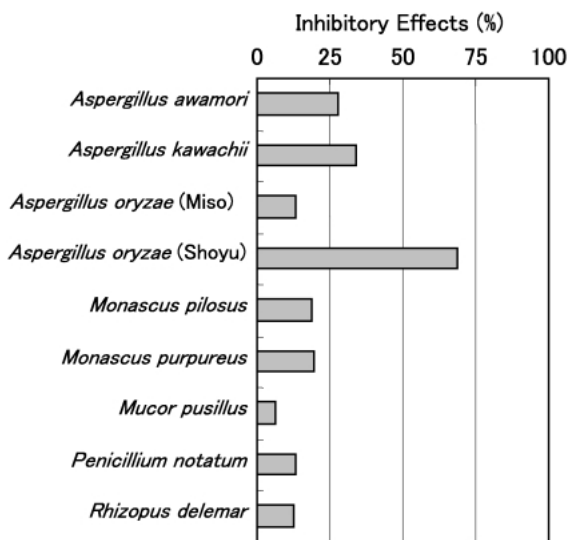


Fig. 1. Inhibitory Effects on the Growth of RERF-LC-AI Cells in the Medium of Rice Shochu Distillation Remnants with Various Fungi

生産された可能性が高いと考える。

一方、醤油用麹菌 *A. oryzae* を合成培地で7日間培養した培養液のがん細胞増殖抑制効果を比較のために検討したところ、用いた3つの合成培地（Czappek Dox, Malt, Sabouraud）においては、いずれの場合にもがん細胞増殖抑制効果は認められなかった。このことから、本研究で用いた米焼酎粕は、特異的ながん細胞増殖抑制効果を有する物質を生産する培地であることが明らかになった。

2. 熱及びpHに対する安定性 醤油用麹菌は、米焼酎粕からがん細胞増殖抑制効果を有する物質を生産することが明らかになった。そこで、次に熱及びpHに対する安定性を検討した。この試験には、肺がん細胞（VA-13）及びコントロールとして肺正常細胞（WI-38）を用いた。Figure 3に常温から90°Cまでの熱安定性を検討した結果を示す。90

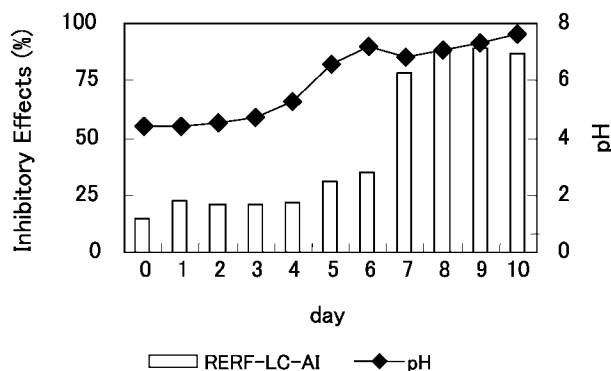


Fig. 2. Inhibitory Effects on the Growth of RERF-LC-AI Cells in the Medium of Rice Shochu Distillation Remnants with *Aspergillus oryzae*

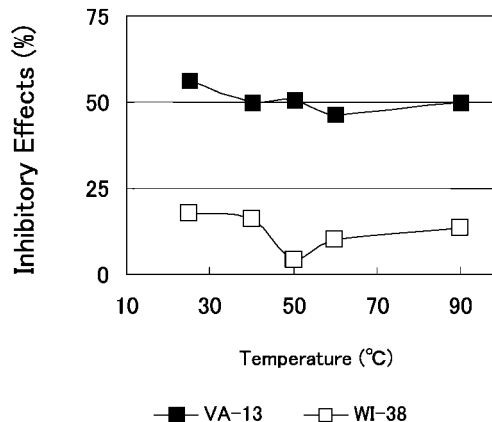


Fig. 3. Temperature Dependence of Inhibitory Effects on the Growth of VA-13 and WI-38 Cells in the Medium of Rice Shochu Distillation Remnants with *A. oryzae*

°Cでも効果は保持され、耐熱性を有することが確認できた。また、がん細胞に対する増殖抑制効果に比べ、正常細胞に対する効果は3分の1以下に抑えられており、がん細胞に優位に作用する抗腫瘍性物質を含有することが示された。一方、pHについては、Fig. 4に示したように、pH 4—8のpH域ではpHの影響を受けないことが明らかになった。

3. 抗腫瘍活性成分の精製 培養液に含まれる抗腫瘍活性を示す成分を明らかにするために、培養液からの精製を試みた。まず、培養液をゲルろ過クロマトグラフィーで分画し、細胞試験によりがん細胞増殖抑制効果を有する画分を分取した。次に、陰イオン交換クロマトグラフィーにて分画した。結果をFig. 5に示す。陰イオン交換樹脂に非吸着の画分をフラクションNo. 17まで分画し、その後150

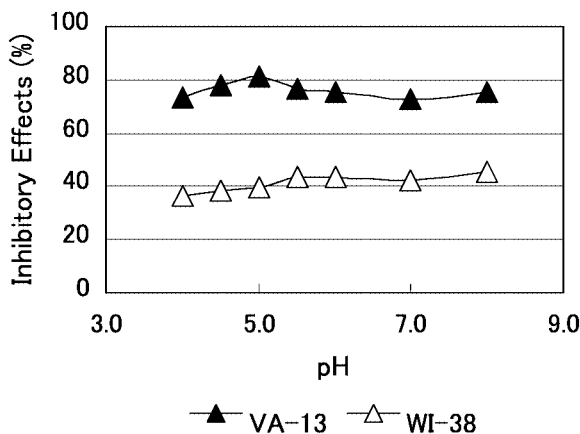


Fig. 4. pH Dependence of Inhibitory Effects on the Growth of VA-13 and WI-38 Cells in the Medium of Rice Shochu Distillation Remnants with *A. oryzae*

mmNaClを含むリン酸緩衝液で溶出した。非吸着画分のフラクションNo. 13—14において、高い増殖抑制効果が得られた。吸着画分では、逆に正常細胞の増殖を抑制する成分が溶出されていた。細胞増殖抑制効果を有する画分では、280 nmの吸光度のピークはみられたが、タンパク質や糖は極めて低い濃度でしか存在せず、抗腫瘍性成分がそれらの成分ではないことが示唆された。フラクションNo. 13—14を濃縮して、逆相クロマトグラフィーに供した結果をFig. 6に示す。250 nmの吸光度にピークがみられた画分をP1, P2, P3, P4の4つに分け、エタノールを除去して細胞実験に供したところ、エタノール50%溶液による溶出画分P4において75%の高いがん細胞増殖抑制効果が得られた。また、P4画分は正常細胞に対して25%の抑制効果を示した。そこで、動物を用いた安全性をさらに検討した。

4. 抗腫瘍活性成分の同定 がん細胞増殖抑制成分の同定を行うため、紫外可視吸光スペクトルを測定したところ、340 nm付近に最大吸収がみられた。Figure 7に赤外吸収スペクトルを示す。特性吸収として、 3400 cm^{-1} にO-H伸縮振動、 2960 cm^{-1} にC-H伸縮振動、 1640 cm^{-1} にC=O伸縮振動、 1540 cm^{-1} にC=N伸縮振動、 1380 cm^{-1} にC-H変角振動、 1080 cm^{-1} にO-H変角振動が得られた。液体クロマト質量分析の結果、ベースピークとして $m/z=225.4(M+H)$ が検出されたので、当該物質の分子量は224であると推定された。これらの情報を基に、ガスクロマト質量分析計によりマススペクトルを測定した。Figure 8に示したように、

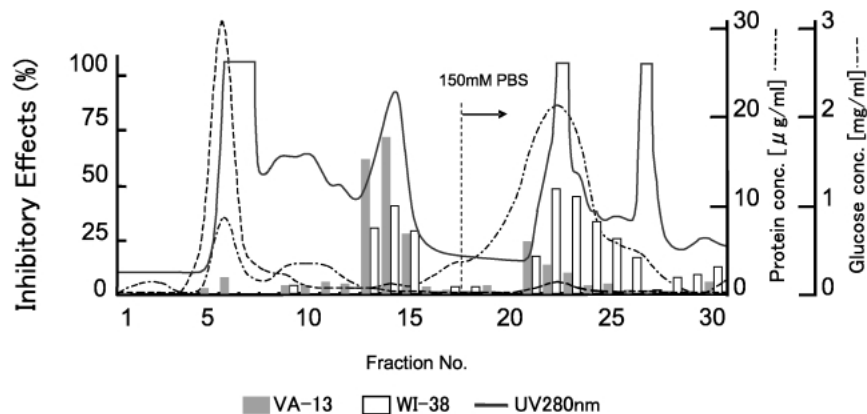


Fig. 5. Inhibitory Effects on the Growth of VA-13 and WI-38 Cells after the Incubation in the Medium of Rice Shochu Distillation Remnants with *Aspergillus oryzae* fractionated by Anion-exchange Chromatography

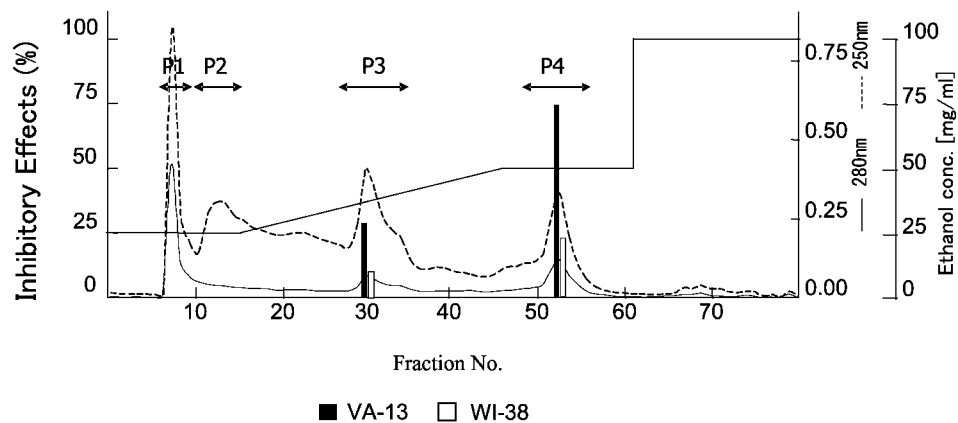


Fig. 6. Inhibitory Effects on the Growth of VA-13 and WI-38 Cells after the Incubation in the Medium of Rice Shochu Distillation Remnants with *Aspergillus oryzae* fractionated by Reverse Phase Chromatography

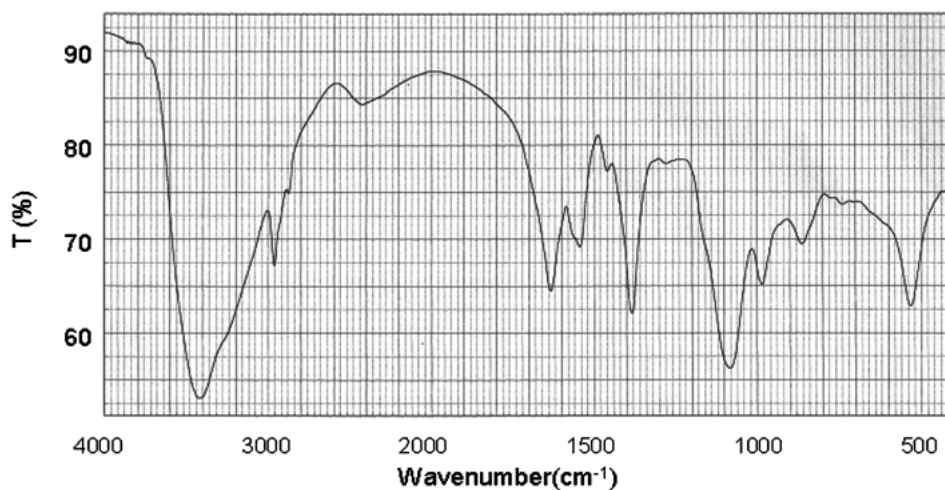


Fig. 7. IR Spectrum of Active Compound

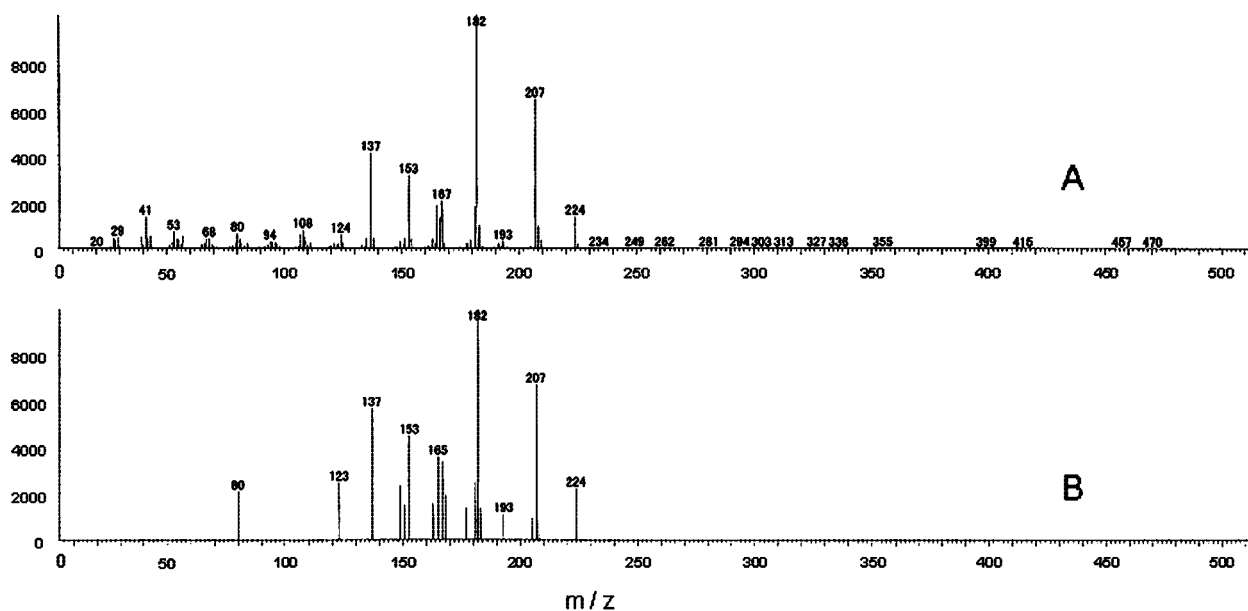


Fig. 8. GC Spectra of Active Compound (A) and 1-Hydroxy-6-(1-methylpropyl)-3-(2-methylpropyl)-2(1H)-pyrazinone (B)

MS: m/z 224(M^+ , 15), 182(100), 207(64), 137(41), 153(32), 165(19) のフラグメントが得られた。ライブラリ検索を行った結果、マススペクトルの一致により当該物質が 1-hydroxy-6-(1-methylpropyl)-3-(2-methylpropyl)-2(1H)-pyrazinone²²⁾ (Aspergillic acid) である可能性が明確になった (Fig. 9)。分子量がジペプチド程度の大きさであることから、腸管に問題なく吸収されると考えられる。

Aspergillic acid は、*Aspergillus* 属の培養により、ロイシンとイソロイシンから合成されると報告されている。²³⁾ 米焼酎粕は、合成培地と比べてこれらのアミノ酸を豊富に含有しており、Aspergillic acid の生成に有用であったと考えられる。

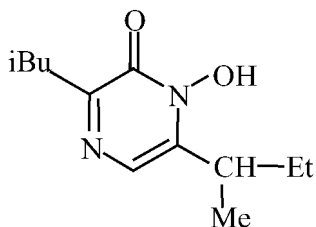


Fig. 9. Chemical Structure of 1-Hydroxy-6-(1-methylpropyl)-3-(2-methylpropyl)-2(1H)-pyrazinone

5. 抗腫瘍活性成分の定量 Aspergillic acid の生産性をチェックできるように、液体クロマトグラフィーによる分析法を検討したところ、次の条件で Aspergillic acid の分析が可能であった。

カラム：ODS カラム (40°C)，移動相：A 液 (10 mM リン酸緩衝液) と B 液 (メタノール：アセトニトリル：水=9：9：2) のグラジエント送液，1 ml/min，検出波長：UV280 nm。この方法により、米焼酎粕、それを培地に用いた麹菌培養液、今回精製された試料を分析した結果を Fig. 10 に示す。3つのクロマトグラムから、Aspergillic acid は米焼酎粕に含まれていた物質ではなく、麹菌培養による生産物である可能性を確認できた。

6. 抗腫瘍活性成分の安全性 Aspergillic acid 等ピラジン環化合物は、麹菌が生産する抗菌性物質としての報告²⁴⁾がある。本研究では、Aspergillic acid の抗腫瘍活性を見出したが、正常細胞への影響も若干あったため、飲食品への応用を考える場合は生体への安全性の確認が不可欠である。そこで、マウスを用いた急性経口毒性試験を委託して実施した。がん細胞 VA-13 に対して 80%以上の抗腫瘍活性を有し、正常細胞 WI-38 に対しては 25%の

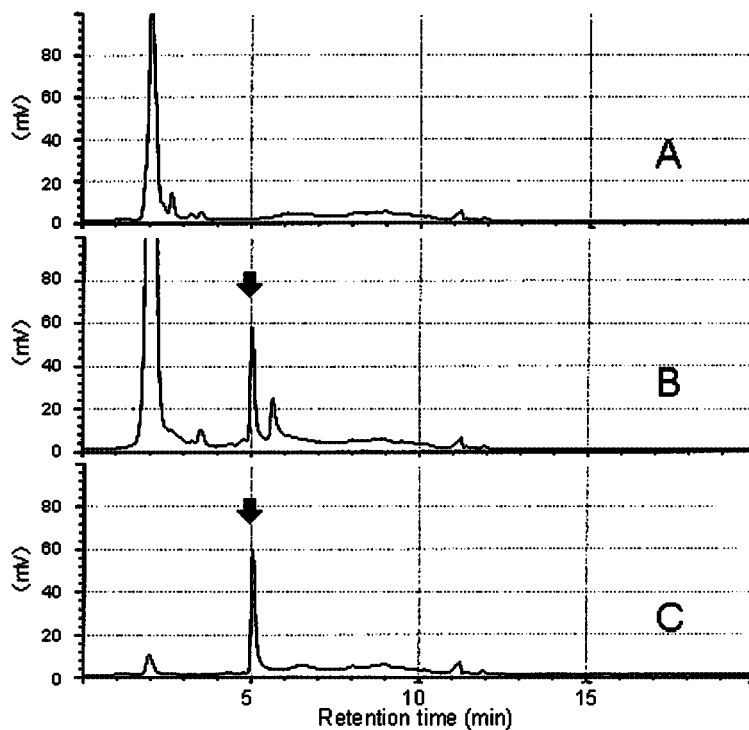


Fig. 10. HPLC of Rice Shochu Distillation Remnants (A), the Medium of Rice Shochu Distillation Remnants with *Aspergillus oryzae* (B), and Fraction of Active Compound (C)

細胞増殖抑制活性を有した試料をさらに 10 倍濃縮して、マウスに経口投与して 14 日間の経過観察を行った結果、観察期間中に死亡例、異常はみられず、水を投与した対照群と比較して体重値に差はみられなかった。また観察終了時の剖検においても異常はみられなかった。以上のことから、Aspergillilic acid の安全性が明らかになった。

結 言

焼酎粕の有効利用及びリサイクル技術の開発を目指し、米焼酎粕による抗腫瘍性物質の探索を行い、次のような興味ある知見が得られた。

- 1) 米焼酎粕で醤油用麹菌 *Aspergillus oryzae* を 7 日間以上振とう培養後、培養液を用いてヒト肺がん細胞に対する増殖抑制試験を行ったところ、高い抑制効果が得られた。このことから、培養中に抗腫瘍性物質が生産されたことが示唆された。合成培地を用いた場合は、抑制効果は得られず、米焼酎粕から生産されたことが明らかになった。
- 2) 抗腫瘍性物質を各種クロマトグラフィーを利用して培養液中から分離精製し、1-Hydroxy-6-(1-methylpropyl)-3-(2-methylpropyl)-2(1H)-pyrazinone (Aspergillilic acid) である可能性を明らかにした。
- 3) 液体クロマトグラフィーにより、この物質が麹菌の培養で生産されたことを確認することができた。
- 4) この物質は熱や pH に対して安定であることが明らかになった。
- 5) マウスを用いた経口急性毒性試験から、Aspergillilic acid と考えられる抗腫瘍物質の安全性を確認した。

以上のように、焼酎粕の培養工程において抗腫瘍性物質 Aspergillilic acid が生産され、その活性はもとの焼酎粕よりも顕著に強い可能性が明らかになった。焼酎粕について、医薬品生産培地としての新たな有用性を示すことができたと考える。

謝辞 本研究において、ガスクロマト質量分析では熊本県保健環境科学研究所飛野敏明氏に、液体クロマト質量分析では熊本工業技術センター松田茂樹氏に、FTIR 測定では同永山賛平氏にご協力いた

だいた。感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Matsuda S., *J. Jpn. Assoc. Food Preservation Scientists*, **30**, 141-145 (2004).
- 2) Ishikawa N., *J. Brewing Soc. Jpn.*, **95**, 520-525 (2000).
- 3) Yokoyama S., Tarumizu S., *Seibutsu-kogaku Kaishi*, **79**, 211-217 (2001).
- 4) Morimura S., Kanou S., Shigematsu T., Kida K., *Seibutsu-kogaku Kaishi*, **80**, 417-423 (2002).
- 5) Motizuki S., Miyamoto A., Hagiwara M., Takeshima N., Omori T., *J. Brewing Soc. Jpn.*, **96**, 559-563 (2001).
- 6) Tuchiya N., Matsuda T., Nishimura K., Iwahara M., *J. Brewing Soc. Jpn.*, **98**, 132-138 (2003).
- 7) Furuta Y., Takachita H., Omori T., Sonomoto K., Ishizaki A., Shimoda M., Wada H., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **864**, 276-279 (1998).
- 8) Motizuki S., Miyamoto A., Hagiwara M., Takeshima N., Ohmori T., *Joukyou*, **96**, 559-563 (2001).
- 9) Hirose S., Tanoue O., Iefuji H., Matsumoto Y., Ueoka R., *Kagaku Kougaku Ronbunshu*, **28**, 621-625 (2002).
- 10) Kadota Y., Hirose S., Iefuji H., Matsushita T., Matsumoto Y., Ueoka R., *J. Chem. Eng. J.*, **38**, 154-157 (2005).
- 11) Ueoka R., Tanoue O., Ichihara H., *Chem. Chem. Ind.*, **58**, 1412-1414 (2005).
- 12) Matsumoto Y., Kato T., Iseki S., Suzuki H., Nakano K., Iwahara M., Ueoka R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 1937-1940 (1999).
- 13) Matsumoto Y., Iwamoto Y., Matsushita T., Ueoka R., *Int. J. Cancer*, **115**, 377-382 (2005).
- 14) Kanno A., Tsuzaki Y., Miyagi M., Matsumoto Y., Ueoka R., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 1013-1014 (1999).
- 15) Ueoka R., Matsumoto Y., Kanno A., Tsuzaki K., Ichihara H., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 1262-1263 (2000).
- 16) Ichihara H., Nagami H., Yamamoto K., Matsumoto Y., Ueoka R., *Yakugaku Zasshi*, **122**, 25-34 (2003).
- 17) Ueoka R., Matsumoto Y., Ichihara H.,

- Kiyokawa T., *Am. Chem. Soc. Books, Biol. Eng.*, **830**, 177–189 (2002).
- 18) Matsumoto Y., Ueoka R., *Protein, Nucleic Acid and Enzyme*, **48**, 1646–1652 (2003).
- 19) Kitamura I., Kochi M., Matsumoto Y., Ueoka R., Kuratsu J., Ushio Y., *Cancer Res.*, **56**, 3986–3992 (1996).
- 20) Ishiyama M., Shiga M., Sasamoto K., Mizoguchi M., *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1118–1122 (1993).
- 21) Morimura S., Kida K., Yakita Y., Sonoda Y., Myoga H., *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 329–334 (1991).
- 22) THE MERCK INDEX, TWELFTH EDITION, Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd., p. 142.
- 23) MacDonald J. C., *J. Bio. Chem.*, **236**, 512–514 (1960).
- 24) Yokotsuka T., Oshita K., Kikuchi T., Sasaki M., Asao Y., *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **43**, 189–196 (1969).