

イヌガヤの組織培養による抗ガン性アルカロイド、 イソハリントニンの生成^{*1}

吉田 真弓^{*2}・北畠 昌詳^{*2}・伊藤 和貴^{*2}
沖 妙^{*2}・橘 燥郎^{*2}

Formation of Isoharringtonine, an Anti-tumor Alkaloid in
Cephalotaxus harringtonia Callus Cultures^{*1}

Mayumi YOSHIDA^{*2}, Masayoshi KITAHATA^{*2},
Kazutaka ITOH^{*2}, Tae OKI^{*2} and Sanro TACHIBANA^{*2}

Summary : Calli were induced from leaves and stems of young trees of Inugaya, *Cephalotaxus harringtonia*, on Murashige-Skoog (MS) medium supplemented with naphthalene-acetic acid, kinetin, six kinds of vitamins, and casamino acid. Induction of calli was stimulated with increase in added amounts of casamino acid to the MS medium. The induced calli were subcultured on the same medium. Gas chromatographic analysis of the alkaloids extracted from the calli induced from Inugaya leaves revealed that calli produced isoharringtonine (3) that is known as an anti-tumor agent. The content of isoharringtonine in the calli was 0.005% of dry weight. It was 25 times larger than that of the intact plant (0.0002% of dry weight).

要 旨 イヌガヤ (*Cephalotaxus harringtonia*) の若木の葉および茎から、ナフタレン酢酸、カイネチン、数種のビタミン類およびカザミノ酸を含む Murashige-Skoog (MS) 培地によりカルスを誘導し、引き続き同培地上で継代培養した。培地へのカザミノ酸添加量の増加に従ってカルス誘導の促進が見られた。イヌガヤ葉から誘導したカルスのアルカロイド抽出物のガスクロマトグラフ分析により、カルスは抗ガン性を有するイソハリントニンを生産できることが明らかとなった。カルス中のイソハリントニンの含量は0.005%であった。イヌガヤ葉のカルス培養により、カルス中のイソハリントニンの含量は母植物のそれ (0.0002%) の25倍増加した。

*1 本報告の一部は第44回日本木材学会大会（1994年4月、奈良）で発表した。

*2 森林資源利用化学研究室 Laboratory of Chemistry and Biotechnology for Utilization of Forest Resources

1. 緒 言

イヌガヤ (*Cephalotaxus harringtonia*) は小高木もしくは低木の常緑針葉樹で、大きいものは樹高 8~10m, 胸高直径30~40cmになり、日本、朝鮮、中国に分布している¹⁾。イヌガヤの抽出成分については1958年に沢田²⁾により、葉中に二分子フラボンの一種、カヤフラボンが存在することが報告されていたが、1960年代後半に米国国立ガン研究所 (National Cancer Institute) の研究により、イヌガヤに強力な抗ガン性アルカロイドが含まれていることが明らかにされた³⁾。その後アルカロイド成分として、ハリントニンアルカロイド類 (5種)⁴⁾とホモエリスリナアルカロイド類 (6種)⁵⁾が単離・固定され、それらの抗ガン性が調べられた。その結果、Fig. 1 に示した4種のハリントニンアルカロイド類(1)~(4)がリンパ腫 (リンパを侵すガン) に対して抗ガン性⁶⁾を示すことが明らかにされた。

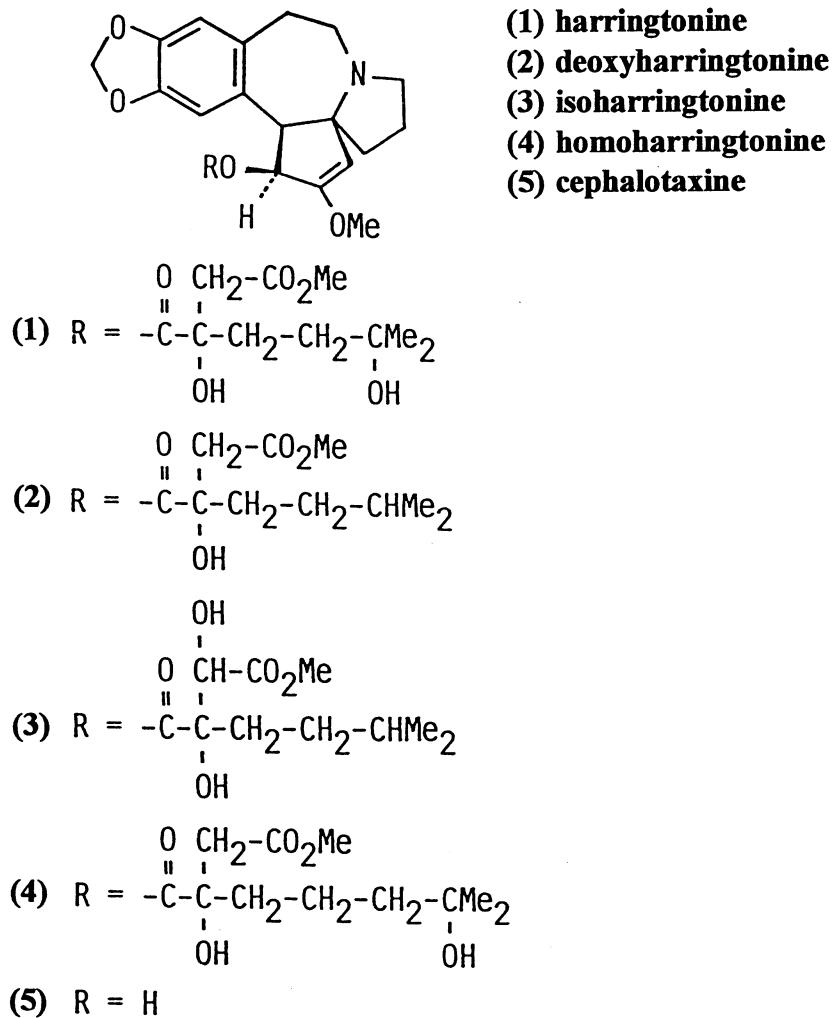


Fig. 1 Harringtonine alkaloids (1)–(5) in the leaves and stems of Inugaya (*Cephalotaxus harringtonia*).

これらの抗ガン性アルカロイド類(1)~(4)はセファロタキシン(5) (Fig. 1) に一種のヒドロキシ脂肪酸がエステル結合した化合物であったが、脂肪酸とのエステル結合を持たないセファロタキシン(5)は抗

ガン性を示さなかった⁶⁾。これらの抗ガン性アルカロイド類(1)～(4)はイヌガヤの樹木全体に含まれているが、実に最も多く含有されている⁴⁾。しかし、イヌガヤ中のハリントニンアルカロイド類(1)～(4)の含量は約0.01～0.02%（対乾燥葉、茎）と報告されており⁴⁾、その含量は少ない。しかもイヌガヤ樹木の成長も遅い。そのため、イヌガヤの組織培養によるハリントニンアルカロイド類の生産の研究が Delfel と Rothfus⁷⁾、Misawa ら⁸⁾により1977年から1983年にかけて行われた。Delfel と Rothfus⁷⁾および Misawa ら⁸⁾は Murashige-Skoog (MS) 培地を基本とし、これに植物ホルモンとしてカイネチンとナフタレン酢酸 (NAA) を補添した培地を用いて、各々葉と茎、葉と茎と種子からカルスを誘導し、その培養によりハリントニンアルカロイド類の生産を試みた。しかしながら、Delfel と Rothfus⁷⁾ や Misawa ら⁸⁾によるイヌガヤのカルス培養および細胞懸濁培養により生産されたハリントニンアルカロイド類の量は、各々母植物のそれの約1～3%，1～2%であった。また3年間継代培養を続けたカルスでは、ハリントニンアルカロイド類の蓄積が認められなかったことも報告されている⁹⁾。これらのことから、イヌガヤの組織培養によるハリントニンアルカロイド類の生産の研究は1984年以降行われていなかった。しかし、1990年頃から樹木を含めた植物中の抗ガン性物質の組織培養による生産の研究が進められる中で、Wickremesinhe と Atreca¹⁰⁾により、1993年にイヌガヤの組織培養の研究が再び行われている。彼らは MS 培地を基本に植物ホルモンとして2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) と6-フルフリルアミノプリンを用いて、根から誘導したカルスの増殖について検討している。しかし、彼らはこのカルス培養により、どの程度ハリントニンアルカロイド類が生産されたのかについては調査していない。

Delfel と Rothfus⁷⁾ 及び Misawa ら⁸⁾の結果は、組織培養によってもハリントニンアルカロイド類の生産量を母植物のそれよりも高めることが出来なかったことを示している。しかしながら、イヌガヤのカルス誘導・増殖のための培地条件の検討やイヌガヤカルスへのエリシター、合成前駆体等の添加により、ハリントニンアルカロイド類の生産量を母植物のそれよりも高めることは可能と考えられる。著者ら¹¹⁻¹³⁾は、既にイチイ科樹木、キャラボクの組織培養による強力な抗ガン性物質、タキソールの生産の研究において、キャラボクのカルス培養によりタキソールが生産できることを報告する¹¹⁾と共に、キャラボクカルスにエリシターおよび合成前駆体を添加することにより、タキソールの生産性を数倍～数十倍増加できることを報告している^{12, 13)}。それゆえ、キャラボクの組織培養によるタキソールの生産性向上に用いた方法をイヌガヤにも適応すれば、ハリントニンアルカロイド類の生産性は向上できるものと考えられた。これらのことから、まず本研究では、イヌガヤのカルス誘導における培地組成の影響について検討すると共に、誘導されたカルスの培養により生産される抗ガン性アルカロイド、イソハリントニン〔4種のハリントニンアルカロイド類の一種〕の生産量を調べた。

2. 実験

2. 1 イヌガヤの組織培養

2. 1. 1 試料

愛媛大学農学部演習林より採取した約30cm高の若いイヌガヤの葉と茎を用いた。

2. 1. 2 培地組成及び MS 培地の調製

培地組成を Table 1 に示した。Delfel と Rothfus⁷⁾ の培地を参考にしながら、MS 培地を基本と

し、これに植物ホルモン、ビタミン類（ヒポキサンチン、リボフラビン、ビタミンB₁₂、ビオチン、葉酸、パントテン酸カルシウム）、カザミノ酸（0～2.0g/l）を補添したものを培地として用いた。植物ホルモンはオーキシンとしてNAA（10mg/l）を、サイトカイニンとしてカイネチン（1mg/l）を使用した。Table 1に示した試薬のうち植物ホルモン、寒天を除いたものを蒸留水に溶解し、これに植物ホルモンを溶解した溶液を加え約980mlとした。この溶液を1N水酸化ナトリウム水溶液でpH5.6に調整した後、1000mlにメスアップした。これに寒天10gを加え、湯浴上で寒天を加熱溶解後、管ビンに30mlづつ分注した。この管ビンをアルミホイルで蓋をし、オートクレーブ（120℃、20分間）にかけ滅菌した。その後、調製したNS培地は試料を植え込むまで殺菌灯をつけたクリーンベンチ内で静置した。

2.1.3 試料の滅菌

外植体（若い葉と茎）を中性洗剤で洗浄した後、70%エタノールに1分間浸漬して予備殺菌を行った。その後、外植体を1%次亜塩素酸ナトリウム（アンチホルミン）水溶液に浸漬し、15～20分間攪拌しながら表面殺菌を行った。その後、滅菌蒸留水で3回洗浄し、滅菌漉紙上で風乾させた。

2.1.4 培地への植え込み

2.1.3で得た滅菌試料をメスで切り分け、培地に植え込んだ。葉は、切り口の面積が大きくなるように主脈に斜めにメスをいれ、2つの切片に切り分けた。茎は5mm程度の長さに切った。2.1.2で調製したMS培地にピンセットで組織片を植え込んだ。その後、管ビンをアルミホイルで二重に蓋をして培養を開始した。培養は25℃、1500lux下に16時間明期—8時間暗期を与えて行った。

2.1.5 カルスの増殖

各試料から誘導されたカルスは、2.1.2で調製したMS培地上で一ヶ月毎に継代して増殖させた（25℃、1500lux下、16時間明期—8時間暗期）。なお、後述するが、カルスの増殖用の培地は1.0g/lのカザミノ酸を添加したものを使用した。

2.2 イヌガヤ葉のアルカロイドの抽出及び分析

2.2.1 イヌガヤ葉からのアルカロイドの抽出⁴⁾

イヌガヤの生葉（6.5kg）（絶乾重3.06kg）をミキサーで細かく碎き、これに95%エタノール（8l）を加え、室温で1週間抽出した。1週間後、デカンテーションで溶媒を除いたものに再度95%エタノールを加え、室温で1週間抽出した。エタノール抽出液は合併し、減圧濃縮して、エタノール抽出物（630g）を得た。これに10倍量の2.5%酒石酸水溶液を加え、クロロホルムで4回抽出して、酸性物質と中性物質を除いた。その後水層に濃アンモニア水を加え、pH9.1として、アルカロイドを遊離させた後、クロロホルムで5回抽出した。クロロホルム抽出液は合併し、芒硝で乾燥後減圧濃縮して、アルカロイド抽出物（4.09g）を得た。

2.2.2 イヌガヤ葉のアルカロイド抽出物のガスクロマトグラフ分析

A) Methyl Lignocerate の調製

ガスクロマトグラフ(GLC)によるアルカロイド抽出物の分析の際に、内部標準として使用するMethyl LignocerateをLignoceric Acidのエステル化により調製した。Lignoceric Acid（0.2g）に1%H₂SO₄を含むMeOH：ベンゼン混液（4：1）（20ml）を加え、80℃で3時間加熱還流した¹⁵⁾。冷却後、水を加えエーテルで2回抽出した。抽出液は合併し、中性まで水洗した。芒硝で乾燥後、減圧濃縮して、白色固体（199.1mg）を得た。これをメタノールで再結し、白色固体のMethyl

Lignocerate (176.2mg, 収率84.9%), 融点57℃～58℃を得た (lit mp 58～58.9℃) ¹⁶⁾。

B) イヌガヤ葉のアルカロイド抽出物のガスクロマトグラフ分析¹⁴⁾

2. 2. 1により得たアルカロイド抽出物 (2mg) と Methyl Lignocerate (0.05mg) にピリジン (40μl), N, O-Bis(trimethylsilyl)acetamide (BSA) (40μl), Trimethylchlorosilane (20μl) を加え 60℃で1時間加熱してトリメチルシリル (TMS) 化した¹⁴⁾。その後、下記の条件でガスクロマトグラフィー (GLC) にかけた。GLC 条件：カラム：OV-101 (0.25mm×30m)；分析温度：180℃～285℃ (2℃/min で昇温, 285℃で20分間保持), 注入口温度：245℃, 検出器温度：290℃, キャリヤーガス：He: 3kg/cm², Air: 1.1kg/cm², H₂: 1.3kg/cm², スプリット比: 1:32。

2. 2. 3 イヌガヤ葉のアルカロイド抽出物のガスクロマトグラフマススペクトロメーターによる分析

2. 2. 2と同様にして調製したイヌガヤ葉のアルカロイド抽出物の TMS 化物をガスクロマトグラフマススペクトロメーター (GC-MS) で分析した。GC-MS 分析装置は、日立M-80B および島津 QP-1000を用いた。GLC の分析条件は 2. 2. 2 と同条件で行った。質量分析は、イオン化電圧は70eV で行った。なお、分析カラムとして、OV-101以外に DB-5 (0.25mm×30m) も用いた。

2. 3 カルスからのアルカロイド抽出物中のイソハリントニンの定量

2. 3. 1 カルス中のアルカロイドの抽出⁴⁾

葉から誘導したカルスを4回継代したもの (約3g) (生重量) を凍結乾燥した後、乳鉢と乳棒を用いて細かく碎いた。これにエタノール (50ml) を加え、2. 2. 1と同様に抽出し、エタノール抽出物 (143～159mg)を得た。この抽出物を 2. 2. 1 と同様に処理して、アルカロイド抽出物 (2.5～3mg)を得た。

2. 3. 2 カルス中のアルカロイド抽出物のガスクロマトグラフ分析およびアルカロイド抽出物中のイソハリントニンの定量

2. 3. 1で得たカルス中のアルカロイド抽出物 (2mg) に Methyl Lignocerate (0.05mg), ピリジン (40μl), BSA (40μl), Trimethylchlorosilane (20μl) を加え、60℃で1時間加熱して TMS 化した。その後、2. 2. 2 と同条件で GLC 分析を行った。また GLC と同条件で GC-MS 分析も行った。

標品のイソハリントニンも同様に TMS 化して GLC にかけ、イヌガヤおよびカルスから得たアルカロイド抽出物中のイソハリントニンの存在の確認並びにスペイキングによる同定を行った。また、標品のイソハリントニンを用いて予め作成しておいた検量線から、両アルカロイド抽出物中のイソハリントニンの定量を行った。

3. 結果および考察

3. 1 イヌガヤの組織培養

3. 1. 1 イヌガヤの葉および茎からのカルス誘導におけるカザミノ酸の影響

外植体として葉および茎を用いて、イヌガヤからカルスを誘導することを試みた。カルス誘導に用いた培地の組成を Table 1 に示した。カルス誘導のための培地は Delfel と Rothfus⁷⁾ が使用した MS 培地を基本とし、これに植物ホルモンとして NAA (10mg/l) とカイネチン (1mg/l) および数種

のビタミン類、カザミノ酸（0～2.0g/l）を補添したものを用いた。このMS培地上に葉及び茎の外植片を置き、25℃、1500lux下に、16時間明期と8時間暗期を与えてカルスの誘導を行った。

Table 1 Constituents in Murashige-Skoog medium used for induction of calli from Inugaya leaves and stems.

Chemicals	Concentration (mg/l)
NH ₄ NO ₃	33000
KNO ₃	38000
CaCl ₂ · 2H ₂ O	8800
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7400
KH ₂ PO ₄	3400
H ₃ BO ₃	620
MnSO ₄ · 4H ₂ O	2230
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	860
KI	83
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	2.5
CoCl ₂ · 6H ₂ O	2.5
Na ₂ EDTA	1900
FeSO ₄ · 7H ₂ O	1400
Glycine	100
Inositol	5000
Nicotinic acid	25
Pyridoxine hydrochloride	25
Vitamin B ₁ hydrochloride	5
Growth regulator	
Naphthaleneacetic acid (NAA)	10
Kinetin	1
Vitamins	
Hypoxanthine	25
Riboflavin	0.5
Vitamin B ₁₂	0.0005
Biotin	0.001
Folic acid	1
Calcium D (+) -Pantothenate	1
Casamino acid	0, 200, 500, 1000, 2000
Agar	10000

イヌガヤのカルス誘導におよぼすカザミノ酸の影響をTable 2に示した。この表に示すように、カザミノ酸添加量が増加するに従って、カルス誘導の促進が認められた。カザミノ酸添加量が1.0g/lおよび2.0g/lの場合が最も早くカルスが誘導された。しかし、カザミノ酸を添加しなかった場合は殆どカルスが誘導されなかった。カザミノ酸添加量が1.0g/lおよび2.0g/lの場合には、茎では約2週間で、葉では約3週間で白色のカルスの誘導が観察された。一般にカザミノ酸（カゼイン加水分解物）を培地に添加した場合、細胞、組織の増殖が促進される¹⁷⁾と言われているので、ここでの場合もカザミノ酸添加によりカルス誘導が促進されたものと考えられた。なお、カザミノ酸添加量が1.0g/lの場合も2.0g/lの場合もカルス誘導のスピードには大差が認められなかつたので、以後の実験ではカザミノ酸添加量は1.0g/lで行った。また前記したように、茎からカルスを誘導する方が葉からカルスを誘導するよりも短期間でカルスが生成されるが、本研究では試料採取の都合上、以後の実験では葉から誘導されたカルスを用いた。

Table 2 Effects of concentration of casamino acid in Murashige-Skoog (MS) medium on the induction of calli from Inugaya leaves and stems.

Casamino acid in MS medium	Concentration (g/l)				
	0	0.2	0.5	1.0	2.0
Induction	-* ²	+* ¹	+* ¹	++* ¹	++* ¹

Notes : *¹: Degree of rate of induction of calli, +: slow, ++: fast; "fast" means callus is induced in about two weeks from the stems and in about three weeks from the leaves; "slow" means callus is induced in about three weeks from the stems and in about four weeks from the leaves; *² : no induction.

3. 1. 2 イヌガヤ葉から誘導されたカルスの増殖

イヌガヤ葉から誘導されたカルスを3. 1. 1と同培地上で, 25°C, 1500lux 下に16時間明期と8時間暗期の条件を与えて継代し, 増殖させた。継代は1ヶ月毎に行った。カルスは3~4回継代すると緑色のカルスとなり, 継代毎に約1.5~2倍に増加した。しかしながら, 半年以上継代するとカルスは褐変し, 増殖は殆ど認められなくなった。そのため, 以後のカルス中のアルカロイドの抽出には4回継代したカルスを使用した。

3. 2 イヌガヤ葉からのアルカロイドの抽出およびガスクロマトグラフ分析

実験の項2. 2. 1に示した方法により, イヌガヤ葉から0.13%の収量でアルカロイド抽出物を得た。その抽出物の成分を知るため, GLC および GC-MS 分析を行った。Fig. 2にアルカロイド抽出物のGLCチャートを示した。リテンションタイム37分のピークAのGC-MS測定により得られたマススペクトルをFig. 3に示した。そのマススペクトルは, m/z 403に分子イオンピーク (M^+) を, m/z 262にベースピークを示した。マススペクトルの解析および文献記載のマススペクトル¹⁴⁾の比較から, ピークAをデュルパンと推定し, 標品とのリテンションタイムの一一致並びにスペイキングにより同定した。リテンションタイム33分のピークBのマススペクトルをFig. 4に示した。このマススペクトルは, m/z 387に分子イオンピーク (M^+) を, m/z 298にベースピークを持つことおよびマススペクトルの解析から, セファロタキシンと推定した。文献記載のセファロタキシンのマススペクトル¹⁴⁾とピークBのマススペクトルが一致することにより, ピークBをセファロタキシンと同定した。

イヌガヤ葉のアルカロイド抽出物中に含まれる抗ガン性アルカロイド, ハリントニンアルカロイド類(1)~(4) (Fig. 1) は GC-MS 測定の結果および標品のイソハリントニン(3)の GLC 上でのスペイキング並びに文献記載のハリントニンアルカロイド類との GLC 上でのリテンションタイムの比較から, ハリントニンアルカロイド類はリテンションタイム50分以降に出現することが分かった。標品のイソハリントニンを用いて, イヌガヤ葉のアルカロイド抽出物中のイソハリントニンを定量した結果を Table 3に示した。この表に示すように, イソハリントニンはイヌガヤ中に0.0002% (対絶乾葉) 含まれていた。この値は, 文献値^{4, 5)} (0.003%~0.01%) の1/15~1/50であった。イソハリントニン含量の文献値と本研究で得られた値の違いは, 各々の研究に使用されたイヌガヤの生育場所や生育環境等が異なるためとイヌガヤそのものの個体間の差異によるものと考えられた。標品が得られなかつたので, 本研究ではハリントニン(1), デオキシハリントニン(2), ホモハリントニン(4)の定量は行なわなかった。しかし, 化合物(1), (2), (4)のピークはイソハリントニン(3)のそれに比べ, GLC チャート上

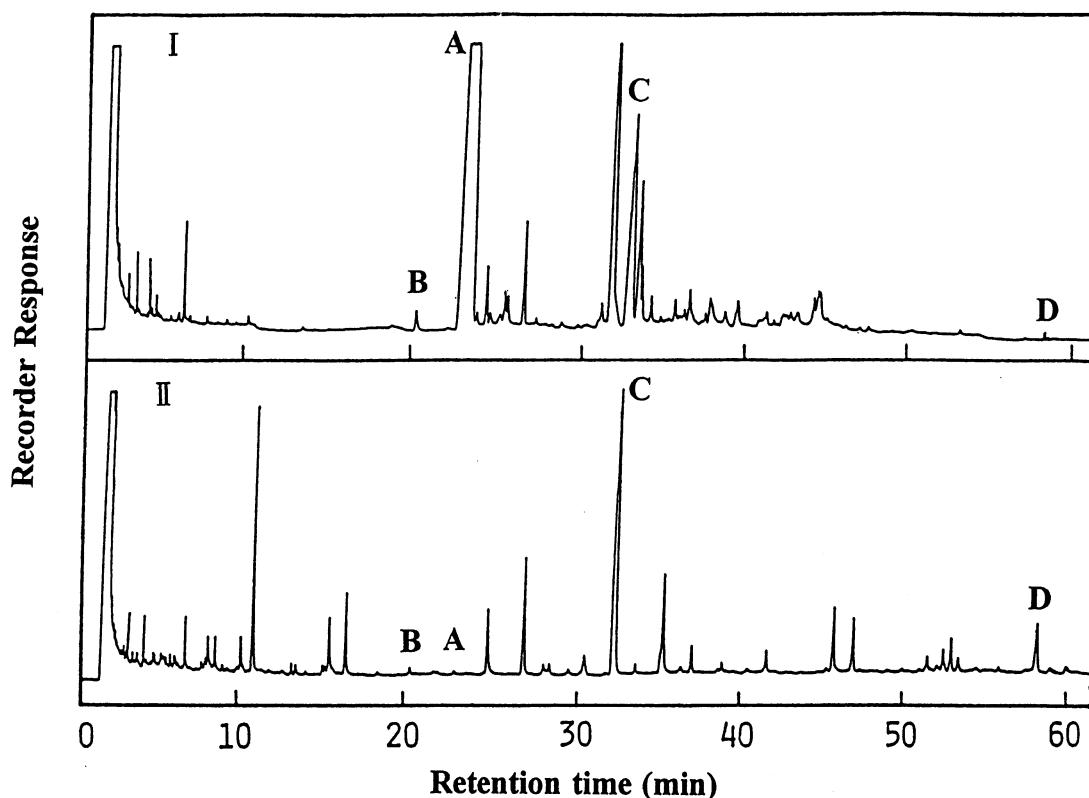


Fig. 2 GLC chromatogram of trimethylsilyl (TMS) derivatives of alkaloid extracts from intact plant (I) and calli (II) of Inugaya leaves.

Notes : Peak A: TMS derivative of drupacine; Peak B: TMS derivative of cephalotaxine; Peak C: Methyl lignocerate (internal standard); Peak D: TMS derivative of isoharringtonine. Chemical structures of cephalotaxine and isoharringtonine, and drupacine refer to Fig. 1 and Fig. 3 respectively.

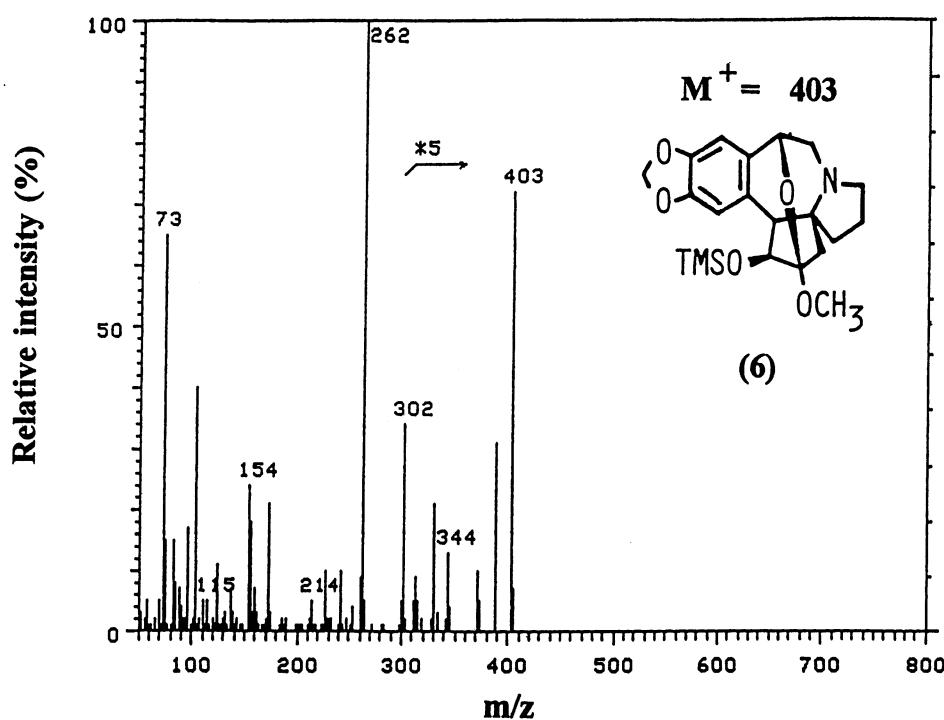


Fig. 3 Mass spectrum of trimethylsilyl (TMS) derivative of drupacine (6).

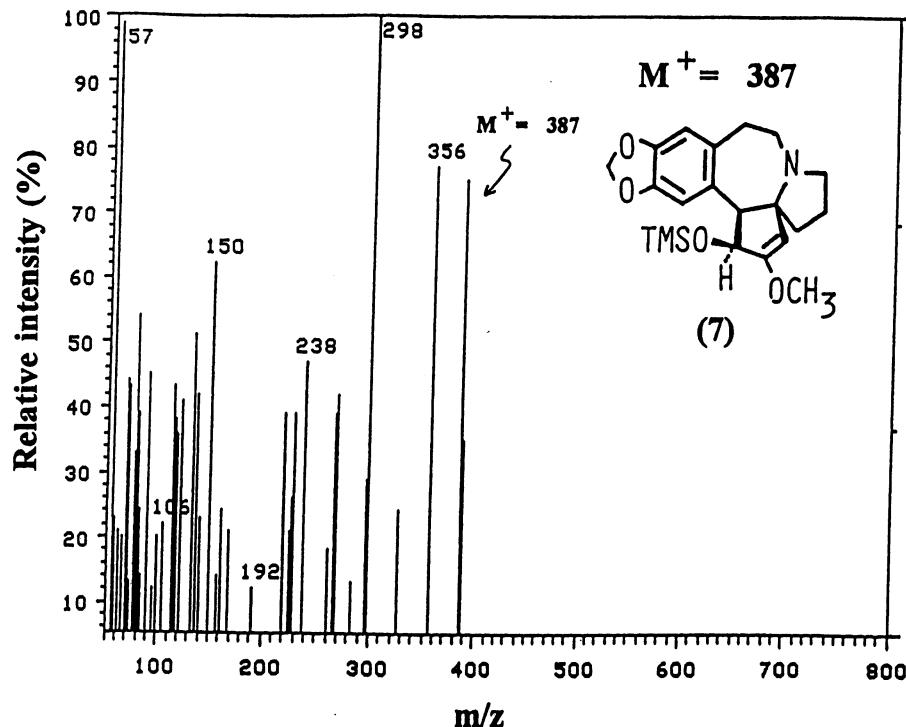


Fig. 4 Mass spectrum of trimethylsilyl (TMS) derivative of cephalotaxine (7).

Table 3 Comparison of the content of alkaloid extracts and iso-harringtonine in calli and intact plant of Inugaya leaves.

	Alkaloid extracts (%, dry weight)	Isoharringtonine (%, dry weight)
Callus	1.63	0.005
Intact plant	0.13	0.0002

でピークの判別がしがたい程小さかったので、本研究で使用したイヌガヤ中のハリントニンアルカロイドは大部分がイソハリントニンであると考えられた。

3. 3 イヌガヤ葉のカルス培養によるイソハリントニンの生成

実験2.3の項で示した方法により、4回継代したカルスから得たアルカロイド抽出物のGLCチャートもFig. 2に示した。母植物のGLCチャートでは、デュルパンのピーク（ピークA）が大きく見られたのに対し、カルスのそれでは殆ど見られなかった。反対に、母植物のGLCチャートでは、イソハリントニン以外殆ど見られなかったハリントニンアルカロイド類と考えられるピークがカルスのアルカロイド抽出物で大きく出現した。これはイヌガヤのカルス培養により、ハリントニンアルカロイド類が母植物のそれよりも多く生産されることを示している。Fig. 2のピークDのGC-MSにより得られたマススペクトルをFig. 5に示した。そのマススペクトルは、m/z 675に分子イオンピーク (M^+) を、m/z 298にベースピークを示した。このマススペクトルの解析からピークDをイソハリントニンと推定し、文献記載のマススペクトル¹⁴⁾との一致および標品とのリテンションタイムの一致並びにスペイキングにより、ピークDをイソハリントニンと同定した。

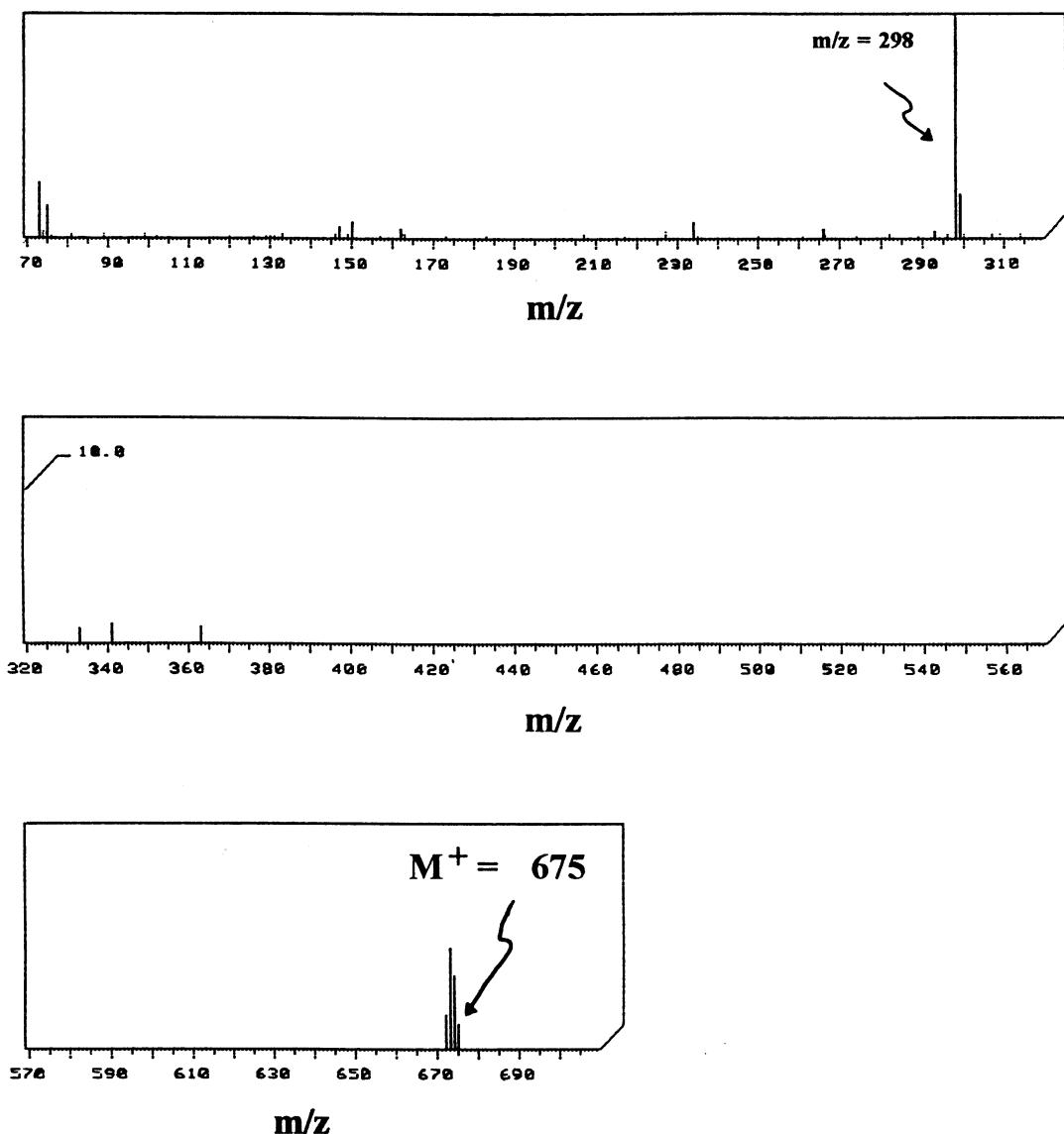


Fig. 5 Mass spectrum of trimethyl Silyl (TMS) derivative of isoharringtonine (3).
Note : Chemical structure of isoharringtonine refers to Fig. 1.

抗ガン性を有するハリントニンアルカロイド類(1)～(4) (Fig. 1) のうちイソハリントニン(3)のみ標品が得られたので、定量を行った。その結果を Table 3 に示した。この表に示すようにカルス培養により、イソハリントニン(3)はカルス中に0.005%生産されることが分かった。このカルス培養により、イソハリントニンは母植物のそれに比べ、25倍生産されることが分かった。標品が得られなかったので、他の3種のアルカロイド(1), (2), (4)は定量できなかつたが、それらのピークはイソハリントニンのそれに比べて非常に小さかつた。そのため、カルスから得られたアルカロイド抽出中の化合物(1), (2), (4)は僅かであると考えられた。Delfel と Rothfus⁷⁾ や Misawa ら⁸⁾ はイヌガヤのカルス培養および細胞懸濁培養では、ハリントニンアルカロイド類の生産性が上がらず、母植物のそれよりもかなり低い（約1～3%）ことを報告している。しかしながら、本研究で得られた結果は、イヌガヤのカルス誘導・培養条件を検討することにより、ハリントニンアルカロイド類の生産性を母植物のそれよりも高めることができることを明示している。なお、著者ら¹⁸⁾ はエリシターや合成前駆体を用いて、

イヌガヤカルス中のハリントニンアルカロイド類の生産性を大幅に増加できる方法も見いだしているが、このことについては後報で述べたい。

以上のことから、イヌガヤのカルス培養により、抗ガン性アルカロイド、イソハリントニンを母植物のそれの25倍生産できることが分かった。今後、イソハリントニンを含めた抗ガン性を有するハリントニンアルカロイド類(1)～(4)の生産を高めるための種々の方法の検討やそれにより生産されるハリントニンアルカロイド類の定量を行う必要があると考えられる。

4. 結論

植物ホルモンとして、ナフタレン酢酸とカイネチン、数種のビタミン類およびカザミノ酸を補添したMS培地により、イヌガヤの葉と茎からカルスが誘導できた。カルス誘導にはカザミノ酸が必要であり、培地中のカザミノ酸濃度が増加するに従って、カルスの誘導が促進された。また誘導されたカルスは同培地上で増殖できた。そのカルスのダブリングタイムは約15～20日であった。イヌガヤ葉のカルス培養により、抗ガン性を有するハリントニンアルカロイド類 [(1)～(4) (Fig. 1)] の一種、イソハリントニン(3)を母植物のそれの25倍生産できることが分かった。

謝辞

イソハリントニン、デュルパシンの標品をご提供頂きました Forest Research Service Center, United States Department of Agriculture の R. G. Powell 博士に感謝致します。また、イヌガヤの試料を頂きました愛媛大学農学部附属演習林の諸氏に感謝致します。日立M-80BによるGC-MS分析をして頂いた愛媛大学機器分析センターの諸氏に感謝致します。

引用文献

- 1) 上原敬二：“樹木大図説”，第1巻，有明書房，1969，p. 89-96.
- 2) 沢田徳之助：松柏類及び近縁植物葉中のフラボノイドの研究（第5報）. 二分子フラボノイドの分布と植物分類との関連性，薬学雑誌，78，1023-1027 (1958).
- 3) J. L. Hartwell : Plants used against cancer. A survey, *Lloydia*, 30, 397-436 (1967).
- 4) R. G. Powell; S. P. Rogovin; C. R. Smith, Jr. : Isolation of Antitumor Alkaloids from *Cephalotaxus harringtonia*, *Ind. Eng. Chem. Res. Develop.*, 13 (2), 129-132 (1974).
- 5) R. G. Powell; D. Weisleder; C. R. Smith, Jr. : Structures of homoerythrina alkaloids from *Cephalotaxus harringtonia*, *Phytochemistry*, 11, 1467-1472 (1972).
- 6) R. G. Powell; D. Weisleder; C. R. Smith, Jr. : Antitumor Alkaloids from *Cephalotaxus harringtonia*, Structure and Activity, *J. Pharm. Sci.*, 61 (8), 1227-1230 (1972).
- 7) N. E. Delfel; J. A. Rothfus : Antitumor alkaloids in callus cultures of *Cephalotaxus harringtonia*, *Phytochemistry*, 16, 1595-1598 (1977).
- 8) M. Misawa; M. Hayashi; S. Takayama : Production of Antineoplastic Agents by Plant Tissue Cultures. 1. Induction of Callus Tissues and Detection of the Agents in Cultured Cells,

Planta Medica, 49, 115–119 (1983).

- 9) 三澤正愛：“植物細胞組織培養 実際・応用・展望”，原田 宏，駒嶺 穆 編集，理工学社，1979, p. 358–359.
- 10) E. R. Wickremesinhe; R. N. Arteca : Establishment of fast-growing callus and root cultures of *Cephalotaxus harringtonia*, *plant Cell Reports*, 12, 80–83 (1993).
- 11) S. Tachibana; E. Watanabe; K. Itoh; T. Oki : Formation of Taxol in *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc. var. *nana* Rehder Callus Cultures, *Mokuzai Gakkaishi*, 40 (11), 1254–1258 (1994).
- 12) 吉田真弓, 伊藤和貴, 沖 妙, 橋 燐郎：イヌガヤの組織培養による生理活性物質の生産の試み, 第44回日本木材学会大会研究発表要旨集, 奈良, 1994, p. 191.
- 13) 橋 燐郎, 木戸将江, 伊藤和貴, 沖 妙, 東 昌弘, 久保田実：タキソールの培養生産法, 特許出願番号 平6-238359 (1994).
- 14) G. F. Spencer; R. D. Plattner; R. G. Powell : Quantitative gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry of *Cephalotaxus alkaloids*, *J. Chromatography*, 120, 335–341 (1976).
- 15) 橋 燐郎, 伊藤和貴, 大久保克美, 沖 妙, 住本昌之：抽出成分の化学変換によるケミカルスと燃料の生産(第9報), 愛媛県内に植栽されているハゼ品種の化学組成とその蠍の性質について, 木材学会誌, 38 (12), 1151–1158 (1992).
- 16) G. F. Spencer : “The Merck Index”, Eighth Edition, Merck and Co. Inc., 1968, p. 619.
- 17) 原田 宏, 鎌田 博：“植物細胞組織培養 実際・応用・展望”，原田 宏，駒嶺 穆 編集，理工学社，1979, p. 20.
- 18) 北畠昌詳, 吉田真弓, 伊藤和貴, 沖 妙, 橋 燐郎：イヌガヤの組織培養による生理活性物質生産の試み(2), 第45回日本木材学会大会研究発表要旨集, 東京, 1994, p. 10.

(1995年11月20日受理)