

【原 著】

ハトムギの抗腫瘍ならびに抗炎症作用に関する検討

Study of the Inhibitory Effect of *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf on Carcinogenesis and Inflammation

鈴木里芳¹, 徳田春邦², 鈴木信孝², 上馬場和夫³, 許 鳳浩²,
川端豊慈樹², 太田富久⁴, 大竹茂樹⁵

Rihou SUZUKI¹, Harukuni TOKUDA², Nobutaka SUZUKI², Kazuo UEBABA³, XU FengHao²,
Toshiki KAWABATA², Tomihisa OHTA⁴, Shigeki OHTAKE⁵

¹金沢大学大学院医薬保健学総合研究科保健学専攻

²金沢大学大学院医学系研究科臨床研究開発補完代替医療学講座

³帝京平成大学東洋医学研究所

⁴金沢大学医薬保健学総合研究科環境健康科学講座

⁵金沢大学医薬保健研究域保健学系病態検査学講座

日本補完代替医療学会誌 第10巻 第2号 別刷

平成25年9月

Reprinted from Japanese Journal of Complementary and Alternative Medicine

Vol.10, No.2, September, 2013

【原 著】

ハトムギの抗腫瘍ならびに抗炎症作用に関する検討

Study of the Inhibitory Effect of *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf on Carcinogenesis and Inflammation鈴木里芳¹, 徳田春邦², 鈴木信孝^{2,*}, 上馬場和夫³, 許 鳳浩²,
川端豊慈樹², 太田富久⁴, 大竹茂樹⁵Rihou SUZUKI¹, Harukuni TOKUDA², Nobutaka SUZUKI^{2,*}, Kazuo UEBABA³,
XU FengHao², Toshiki KAWABATA², Tomihisa OHTA⁴, Shigeki OHTAKE⁵¹ 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科保健学専攻² 金沢大学大学院医学系研究科臨床研究開発補完代替医療学講座³ 帝京平成大学東洋医学研究所⁴ 金沢大学医薬保健学総合研究科環境健康科学講座⁵ 金沢大学医薬保健研究域保健学系病態検査学講座

【要 旨】

ハトムギ [*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf] の子実は、これまで伝統薬として、中国や日本で古くから利用され、抗腫瘍、抗肥満、抗糖尿など様々な機能を持つことが報告されている。われわれは以前よりハトムギの渋皮、薄皮、外殻の生物作用に着目してきた。今回、従来より漢方などで使われてきたハトムギの子実の熱水抽出エキス（ヨクイニン）を比較対象として、子実、渋皮、薄皮、外殻のすべての部分を含む熱水抽出エキス（CRD）、ハトムギの有用成分である Monoolein と Trilinolein の抗腫瘍、抗炎症作用を検討した。ヒト由来癌細胞に対する細胞増殖抑制作用については、乳癌細胞 (MCF-7)、肺癌細胞 (A-549)、喉頭癌細胞 (Hep-2) を用いて評価した。結果は両エキス、Monoolein、Trilinolein とともに各癌細胞に対して弱い増殖抑制効果を認め、その作用はヨクイニンよりも CRD、Monoolein、Trilinolein の方がより強かった。また、発癌予防作用については、ヒトリンパ腫由来の Raji 細胞と発癌プロモーターである TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate) を用いて、特異抗原発現能により評価した。結果は両エキス、Monoolein、Trilinolein とともに特異抗原発現を減少させた。

また、ヨクイニンより CRD、Monoolein、Trilinolein がより強く発現を抑制した。一方、Monoolein は Trilinolein よりも強く抑制した。次に、ハトムギの抗炎症作用を検討するために、マウス皮膚上皮由来正常細胞に被検物質を作用させ、紫外線 (UVB) 照射前後ならびに加熱障害前後の細胞形態変化により評価した。結果は UVB 照射前後にかかわらずヨクイニンよりも CRD、Monoolein、Trilinolein が有意に細胞障害を抑制した。また、加熱障害前後については、ヨクイニンの方が CRD より細胞障害を抑制し、Monoolein は Trilinolein より有意に細胞障害を抑制した。以上のことから、子実以外にも渋皮、薄皮、外殻が有用であることが示唆された。さらに、Monoolein と Trilinolein は抗腫瘍、抗炎症を有することが示された。

【キーワード】

ハトムギ、Monoolein、Trilinolein、がん化学予防、UVB、抗炎症

受理日：2013年7月1日

* 〒920-8640 石川県金沢市宝町 13-1 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科臨床研究開発補完代替医療学講座

Tel: 076-265-2147 Fax: 076-234-4247 E-mail: pcam@med.kanazawa-u.ac.jp

はじめに

ハトムギ *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf (Adlay) は、イネ科ジュズダマ属の一年生草本でモチ性の子実(穎果)を有している。ハトムギは、外側から内側にかけて、外殻 (husk, involucre), 薄皮 (pellicle, glume), 渋皮 (astringent skin, bran, pericarp), 子実 (grain, sarcocarp, caryopsis) から構成されている (図1)。「日本薬局方」に記載され漢方薬として知られているヨクイニンとは、ハトムギの穀実を脱穀(外殻, 薄皮, 渋皮を除去)した子実の漢方薬名と定義されている。ハトムギは、伝統薬として、中国や日本で古くから利用され、非常に様々な機能性を持つことが特徴とされており、米をはじめとする他の穀類とは一線を画している。主な報告だけでも、抗糖尿病¹⁻³⁾や抗肥満作用に関する報告⁴⁻⁶⁾をはじめ、抗コレステロール・高脂質血症⁷⁻¹⁰⁾, 抗酸化・ラジカル消去¹¹⁾, 筋弛緩作用¹²⁾, 排卵促進作用¹³⁾, 骨粗鬆症¹⁴⁾, 細胞外マトリックス崩壊防止作用¹⁵⁾, 糸球体腎炎¹⁶⁾などがみられる。

これまでのハトムギに関する報告は、主としてハトムギの子実(ヨクイニン)に関するものが多かったが、われわれは以前よりハトムギの外殻, 薄皮, 渋皮の薬理作用に着目し、より高い機能を有したハトムギ食品による治未病の可能性を模索してきたが¹⁷⁾, まだまだ未解明な部分が多い。そこで、本試験においては、ハトムギ子実の熱水抽出物であるヨクイニンを比較対象に、ハトムギの子実・渋皮・薄皮・外殻のすべての部分を含む熱水抽出物 (Coix Related Derivatives; CRD) のヒト由来癌細胞に対する細胞増殖抑制作用について比較検討した。また、癌の化学予防作用については、ヒトリンパ腫由来の Raji 細胞と発癌プロモーターである TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate) を用い特異抗原発現能を評価し、抗炎症作用については、マウス皮膚由来細胞を用い、紫外線 B 波 (UVB) 照射前後ならびに加熱障害前後

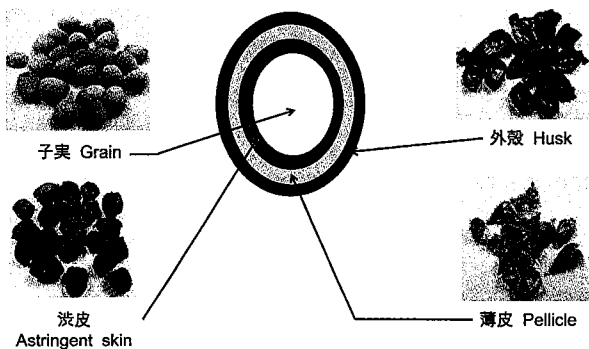


図1 ハトムギの構造

において比較検討した。さらに、ハトムギの抗腫瘍成分と考えられている Monoolein $C_{21}H_{40}O_4$ ならびに Trilinolein $C_{21}H_{40}O_4$ (図2) についても同様に検討した。

材料・方法

1. 被検物質

ハトムギエキスとしては、ハトムギ子実の熱水抽出物(ヨクイニン; 株式会社 ALT 製)とハトムギの子実, 渋皮, 薄皮, 外殻の熱水抽出物である CRD¹⁸⁾ (株式会社 ALT 製)の2種類を用いた。また, Monoolein と Trilinolein は、東京化成工業株式会社製の特級を使用した。

2. ヒト由来癌細胞に対する細胞増殖抑制試験

2.1 癌細胞株

ヒト由来乳癌細胞 (MCF-7), ヒト由来肺胞基底上皮癌細胞 (A-549), ヒト由来喉頭癌細胞 (Hep-2) は DS ファーマバイオメディカル株式会社製を用いた。

2.2 細胞培養法

10%仔牛血清 (FCS) を含む D-MEM 基礎培地に 1×10^6 cells/ml に調製した細胞を播種した。80%まで増殖した段階で培地を交換した。DMSO (Dimethyl sulfoxide) で、ヨクイニンと CRD は 50 mg/ml に、Monoolein と Trilinolein は 15 mg/ml に溶解し、培地に 2 μ l 加え、7日間培養した。ただし、培地が 1 ml の場合は、少なくとも加える DMSO 量は 10 μ l 以下にした。

2.3 細胞形態変化による評価

培養 3, 5, 7 日後に光学顕微鏡下で、4 視の細胞数を計測するとともに、円形(細胞障害を呈する形態)に形態変化した細胞数を計測し、同様の試験を合計 3 回繰り返した。溶媒のみのサンプルの生存癌細胞数を分母、エキスを加えたサンプルの計測生存癌細胞数を分子にして計算し、溶媒のみのサンプルを陽性コントロール 100%として計算した。

3. 発癌予防試験

試験の指標とする細胞として、ヒトリンパ腫である

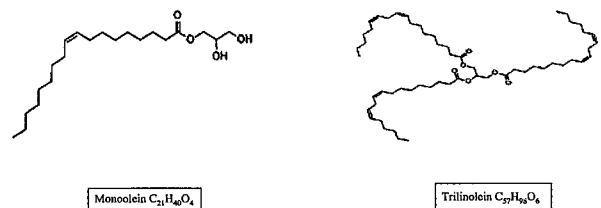


図2 Monoolein と Trilinolein の化学構造

Raji 細胞を用いた。10%仔牛血清 (FCS) を含む RPMI-1640 基礎培地に Raji 細胞を 1×10^6 cells/ml になるように加え培養した。次に、発癌プロモーターの TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate) と TPA に相乗作用があると考えられる n-酪酸 (n-buthlic acid) を加えた。TPA はヨクイニン、CRD では 20 ng, Monoolein と Trilinolein では 32 pmol 使用し、n-酪酸はそれぞれ 4 mmol 使用した。加える被検物質の量は、ヨクイニンと CRD はいずれも 1.0 μ g, 10 μ g, 100 μ g, Monoolein と Trilinolein は 0.32 nmol, 3.2 nmol, 32 nmol とした。37°C, 48 時間培養後、神戸大と大分医科大より提供された上咽頭癌患者血清 (初期抗原に対する抗体) と FITC 標識抗ヒト IgG 血清 (初期抗原に対する抗体の抗体) を用いて、間接蛍光抗体法を行い、蛍光顕微鏡にて観察し、蛍光を有する細胞を測定した。原理は、Raji 細胞に発癌プロモーターを作用させると、細胞表面に特異的な抗原ができ、癌予防剤は、その抗原の産生を抑制するというものである。なお、抑制率は棒グラフで比較した。細胞の生存はトリパンブルー染色液を用いて確認し、試験は合計 3 回実施した。

4. 抗炎症試験

4.1 抗 UVB 試験

SST 細胞 (SENCAR マウス由来皮膚組織培養細胞) を 10% FCS を含む D-MEM 基礎培地を用い 3 日間培養した。抗 UVB 試験は以下の 2 種類の試験法を用い、加える被検物質の量は、ヨクイニンと CRD はいずれも 1.0 μ g, 10 μ g, 100 μ g, Monoolein と Trilinolein は 0.32 nmol, 3.2 nmol, 32 nmol とした。UVB 照射は UVB (TOSHIBA FL20S・E-30 ランプ) を培養細胞面との距離 5 cm で 15 分の条件で行った。陽性コントロールには、エキスと同量の溶媒を加えて、同条件で UVB 照射した。

抗 UVB 試験①

照射前日 (1 日前) にエキスを加え、24 時間培養した後に UVB を照射した。その後 5 日間培養した。

抗 UVB 試験②

照射 3 分後にエキスを加え、5 日間培養した。

抗 UVB 試験①、②ともに、培養後、培養液を全てチューブに移し、軽く攪拌した後、10 μ l 採取し、白血球計算盤にて測定した。位相差顕微鏡下で、円形 (細胞障害を呈する形態) に形態変化した細胞数を計測した。溶媒のみのサンプルの計測細胞数を分母、エキスを加えた計測細胞数を分子として計算し、溶媒のみのサンプルを陽性コントロール 100% として、細胞障害率を算出し比較検討した。なお、試験はそれぞれ合計 3 回実施した。

4.2 抗加熱障害試験

実験は、抗 UVB 試験と同様の培養条件下で行った。

試験は下記の 2 種類の試験法を用いた。加える被検物質の量は、ヨクイニンと CRD はいずれも 1.0 μ g, 10 μ g, 100 μ g, Monoolein と Trilinolein は 0.32 nmol, 3.2 nmol, 32 nmol とした。加熱処理は、加熱式スターラー上で 80°C, 1 分の条件で行った。陽性コントロールには、エキスと同量の溶媒を加えて、同条件下に加熱処理した。

抗加熱障害試験①

エキスを加え 24 時間培養した後に加熱処理を行い、その後、3 日間培養した。

抗加熱障害試験②

加熱処理 3 分後にエキスを加え、3 日間培養した。

抗加熱障害試験①、②ともに、培養後、上澄みを採取し、遠心した。次に、沈殿物に PBS を 0.1 ml 加え、攪拌し、その液を 10 μ l 採取し、白血球計算盤にて測定した。位相差顕微鏡下で、円形 (細胞障害を呈する形態) に形態変化した細胞数を計測した。溶媒のみのサンプルの計測細胞数を分母、エキスを加えた計測細胞数を分子として計算し、溶媒のみのサンプルを陽性コントロール 100% として障害率を算出し、比較検討した。試験は合計 3 回繰り返した。

5. 統計解析

結果の値は、平均値 \pm SD で示した。経時的な変化については、培養開始点 (起点) に関して Dunnet's *t*-test により対照のヨクイニン群内の変化を検定した後、対照群と他のサンプル群 (CRD, Monoolein ならびに Trilinolein) 間の変化の差について 2-way ANOVA によって群間差を検定した。濃度の変化による差や同一濃度でのサンプル間の群間差については、1-way ANOVA の後、Tukey の多重比較を行った。いずれも有意水準は 0.05 とし、統計解析ソフトは、SPSS v-11 を使用した。

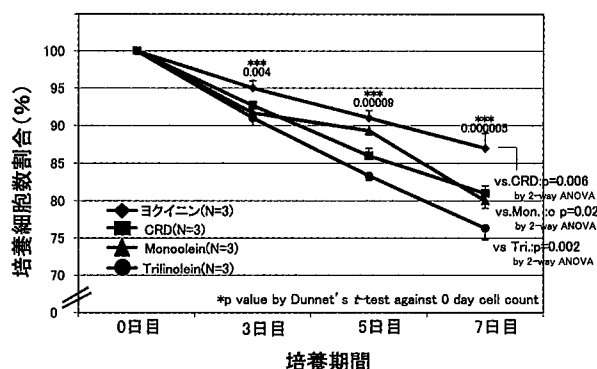


図3 ヨクイニン、CRD、Monoolein、Trilinolein の癌細胞増殖抑制作用 (MCF-7 細胞)。

ヨクイニンと CRD は 50 mg/ml に、Monoolein と Trilinolein は 15 mg/ml に溶解し、培地に 2 μ l 加え、7 日間培養した。

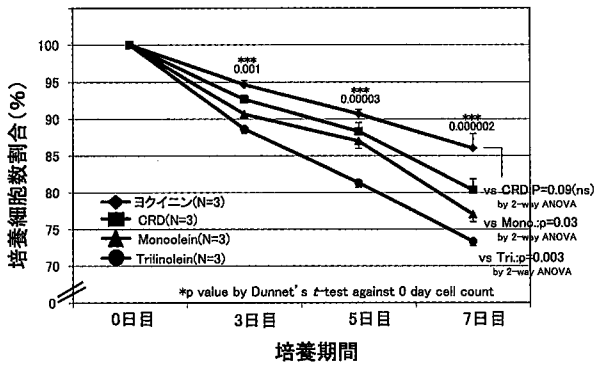


図4 ヨクイニン, CRD, Monoolein, Trilinolein の癌細胞増殖抑制作用 (A-549細胞).
 ヨクイニンと CRD は50 mg/ml に, Monoolein と Trilinolein は15 mg/ml に溶解し, 培地に 2 μl 加え, 7日間培養した.

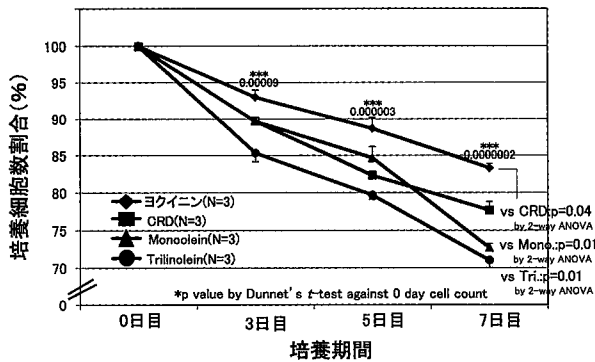


図5 ヨクイニン, CRD, Monoolein, Trilinolein の癌細胞増殖抑制作用 (Hep-2細胞).
 ヨクイニンと CRD は1 m 50 mg/ml に, Monoolein と Trilinolein は15 mg/ml に溶解し, 培地に 2 μl 加え, 7日間培養した.

結果

1. ヒト由来癌細胞に対する細胞増殖抑制試験 (図3, 4, 5)
 被検物質いずれも, MCF-7 細胞, A-549 細胞, Hep-2 細胞の増殖を軽度抑制した. 培養7日目には, ヨクイニンでは, いずれの細胞でも約85%に, CRDでは約80%と増殖を有意に抑制した. MCF-7 細胞, A-549 細胞, Hep-2 細胞において, ヨクイニンと CRD, Monoolein ならびに Trilinolein の群間の変動については, 培養7日目で有意

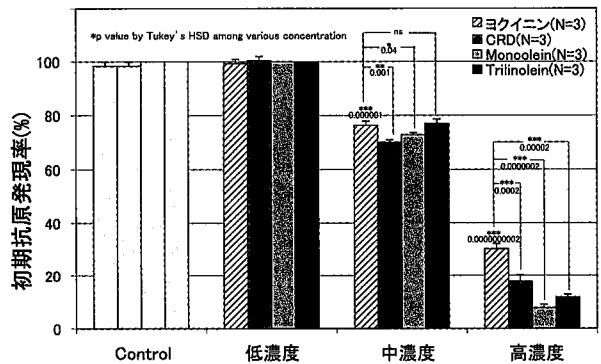
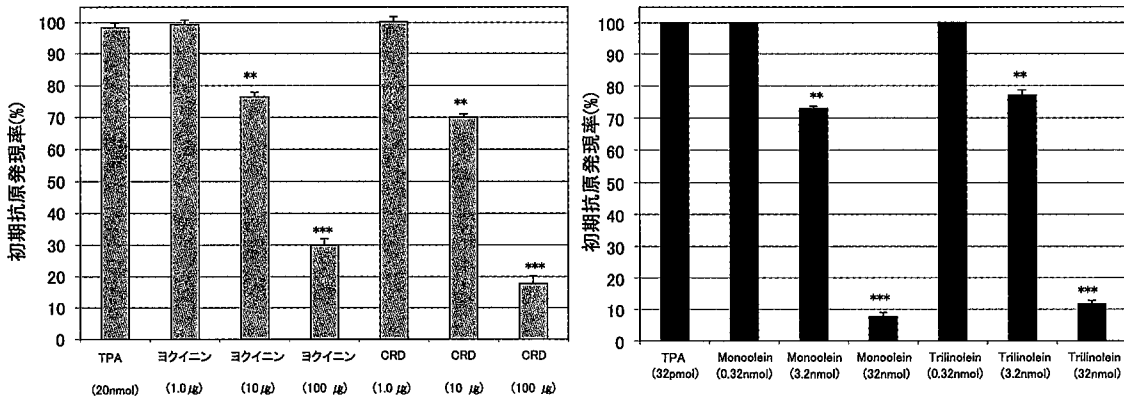


図6-1 ヨクイニン, CRD, Monoolein, Trilinolein の発癌子防作用 (Raji 細胞を使った試験管内検査法)
 TPA はヨクイニン, CRD では20 ng, Monoolein と Trilinolein では32 pmol 使用し, n-酪酸はそれぞれ4 mmol 使用した. 添加したヨクイニンと CRD はいずれも1.0 μg, 10 μg, 100 μg, Monoolein と Trilinolein はそれぞれ0.32 nmol, 3.2 nmol, 32 nmol とした. cont. の初期抗原発現率とそれぞれ被検物質を添加した初期抗原発現率を%表示した.
 (**p<0.001, ***p<0.0001, 対照群との Tukey の多重比較及び Dunnett's t-test)



**p<0.01 by 2-way ANOVA between 2 types of dose-dependent suppression by Mon. and Tri., N=3

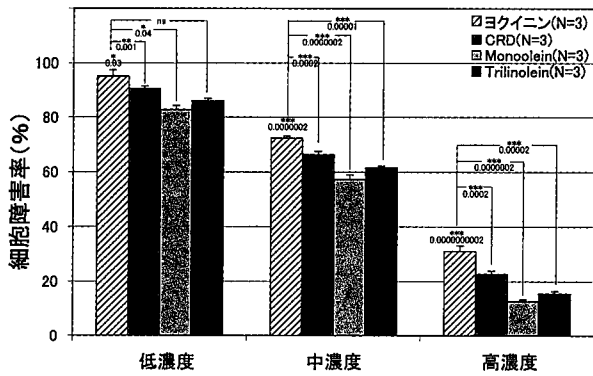
図6-2 ヨクイニン, CRD, Monoolein, Trilinolein の発癌子防作用 (Raji 細胞を使った試験管内検査法)

TPA はヨクイニン, CRD では20 ng, Monoolein と Trilinolein では32 pmol 使用し, n-酪酸はそれぞれ4 mmol 使用した. 添加したヨクイニンと CRD はいずれも1.0 μg, 10 μg, 100 μg, Monoolein と Trilinolein は0.32 nmol, 3.2 nmol, 32 nmol とした. cont. の初期抗原発現率とそれぞれ被検物質を添加した初期抗原発現率を%表示した.
 (**p<0.001, ***p<0.0001, 対照群との Tukey の多重比較及び Dunnett's t-test)
 Monoolein と Trilinolein 群の濃度依存性変化に, 有意な群間差を認めた.
 (**p<0.01, 2-way ANOVA)

な差を認めた (2-way ANOVA, $p < 0.01-0.05$). 図示はしていないが, MCF-7 では, Monoolein と Trilinolein 間にも有意な差を認めた (2-way ANOVA, $p < 0.01$).

2. 発癌予防試験

被検物質の濃度が高くなるにつれ, 初期抗原の発現がより強く抑制された. 初期抗原の発現はヨクイニン (100 μg) では 30.0%に, CRD (100 μg) では 17.7%と有意に抑制された (図 6-1). Monoolein, Trilinolein についても同様に, 0.32 nmol~32 nmol の間で, エキスの濃度が高く



*p value by Tukey's HSD among various concentration

図 7-1 抗 UVB 作用 (24 hr 培養後 UVB 照射)

被検物質を添加後 24 hr 培養後に UVB を照射し, cont. の細胞障害率を 100%として, それぞれの細胞障害率を%表示した. (** $p < 0.001$, *** $p < 0.00001$, 対照群との Tukey の多重比較及び Dunnett's t-test) 加えた被検物質の量は, ヨクイニンと CRD はいずれも 1.0 μg , 10 μg , 100 μg , Monoolein と Trilinolein は 0.32 nmol, 3.2 nmol, 32 nmol とした.

なるにつれ, 初期抗原の産生がより強く有意に抑制された. 初期抗原の産生が Monoolein (32 nmol) では 7.6%に, Trilinolein (32 nmol) では 11.7%に抑制された (図 6-1). また, Monoolein と Trilinolein 群の間の濃度依存性の変化に有意な群間差を認め, Monoolein の方が阻害率が高いものであった (2-way ANOVA, $p < 0.01$) (図 6-2).

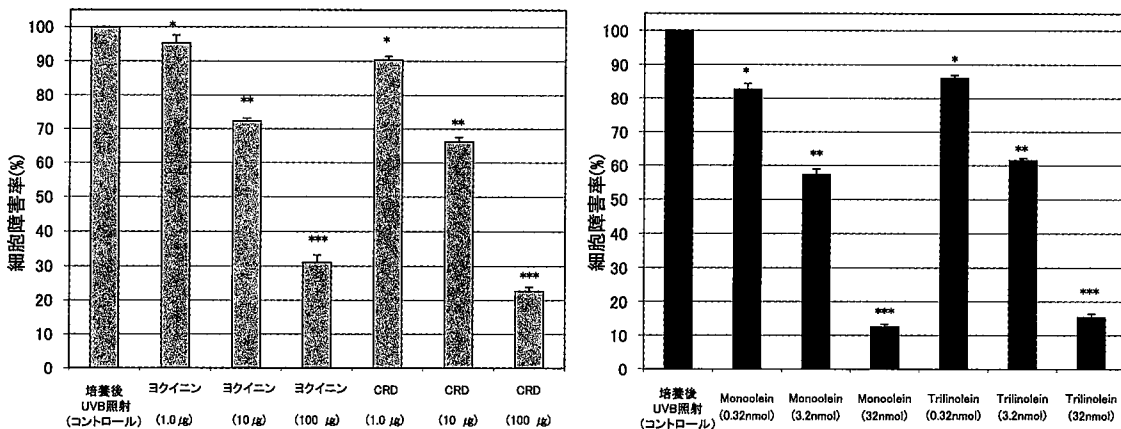
3. 抗炎症試験

3.1 抗 UVB 試験

UVB 照射前に被検物質を加えた試験① (図 7), 照射後に被検物質を加えた試験② (図 8) とともに添加濃度が高くなるにつれて, 細胞障害率は有意に低下した.

試験①では, ヨクイニン (100 μg) は 31.1%に, CRD (100 μg) は 22.7%に抑制した (図 7-1). また, Monoolein, Trilinolein についてもエキスの濃度が高くなるにつれて, 細胞障害率は低下し, Monoolein (32 nmol) は 12.6%に, Trilinolein (32 nmol) は 15.5%に抑制した (図 7-1). ヨクイニンと CRD 群の濃度による変化に有意な群間差を認め ($p < 0.05$), Monoolein と Trilinolein 群の濃度による濃度依存性変化にも有意な群間差を認めた (各々 2-way ANOVA, $p < 0.05$) (図 7-2).

試験②では, ヨクイニン (100 μg) は 33.9%に, CRD (100 μg) は 24.9%に抑制し, Monoolein, Trilinolein についてもエキスの濃度が高くなるにつれて, 細胞障害率は低下した. Monoolein (32 nmol) は 18.2%に, Trilinolein (100 μg) は 19.8%に抑制した (図 8-1). ヨクイニンと CRD 群の濃度による変化に有意な群間差を認めた ($p < 0.05$, 2-way ANOVA) (図 8-2). なお, Monoolein と Trilinolein



(左) * $p < 0.05$ by 2-way ANOVA between 2 types of dose-dependent suppression by CRD and Yokukinin, $N=3$

(右) * $p < 0.05$ by 2-way ANOVA between 2 types of dose-dependent suppression by Monoolein and Tri.linolein, $N=3$

図 7-2 抗 UVB 作用 (24 hr 培養後 UVB 照射)

被検物質を添加後 24 hr 培養後に UVB を照射し, cont. の細胞障害率を 100%として, それぞれの細胞障害率を%表示した. (** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, 対照群との Tukey の多重比較及び Dunnett's t-test) 加えた被検物質の量は, ヨクイニンと CRD はいずれも 1.0 μg , 10 μg , 100 μg , Monoolein と Trilinolein は 0.32 nmol, 3.2 nmol, 32 nmol とした. ヨクイニンと CRD 群の濃度依存性変化には有意な群間差を認めた. (* $p < 0.05$, 2-way ANOVA)

群の濃度による濃度依存性変化には有意な群間差を認めなかった (図 8-2)。

3.2 抗加熱障害試験

加熱処理前に被検物質を加えた試験① (図 9), 加熱処理後に被検物質を加えた試験② (図 10) とともに添加濃度が高くなるにつれて, 細胞障害率は有意に低下した。

試験①では, ヨクイニン (100 μg) は 37.8%に, CRD (100 μg) は 44.4%に抑制した。Monoolein (32 nmol) は 25.1%に, Trilinolein (32 nmol) は 30.9%に抑制した (図 9-1)。

また, ヨクイニンと CRD 群の濃度による変化に有意な群間差を認めた ($p < 0.01$) (図 9-2) が, Monoolein と

Trilinolein 群の間には有意な群間差はなかった (図 9-2)。

試験②では, ヨクイニン (100 μg) は 29.3%に, CRD (100 μg) は 37.5%に抑制した (図 10-1)。

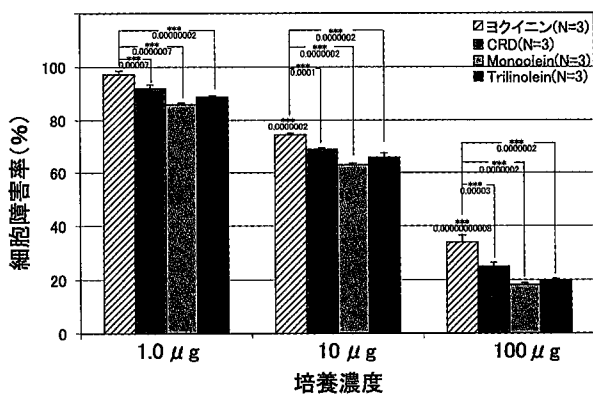
Monoolein, Trilinolein についても, エキスの濃度が高くなるにつれて, 細胞障害率は低下した。

また, ヨクイニンと CRD 群の濃度による変化に有意な群間差を認めたが (2-way ANOVA, $p < 0.05$, 図 9-2), Monoolein と Trilinolein 群の濃度による変化にも有意な群間差を認めた (図 10-2)。

考 察

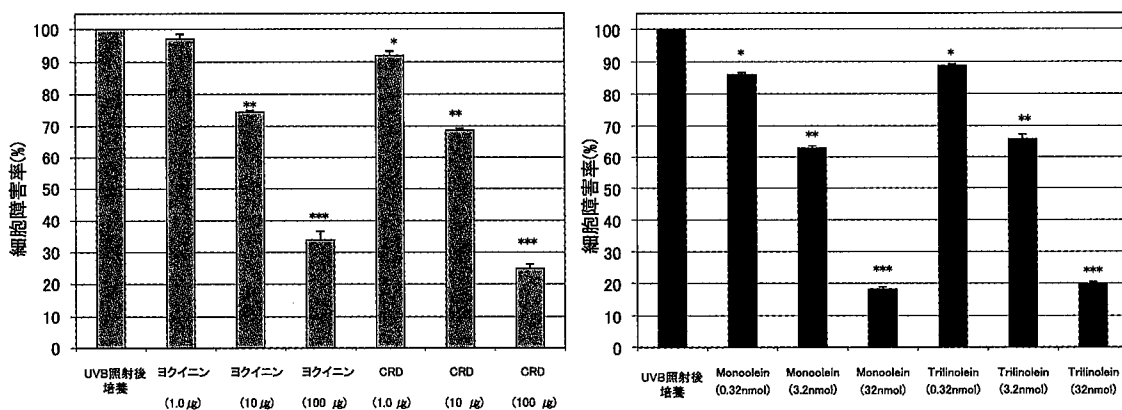
ハトムギは天然物由来の癌化学子防剤として有望であると考えられており, 中国ではハトムギ子実の抗癌注射剤である Kanglaite が使用されている。Kanglaite は胃がんの化学療法の効果を高め, 副作用を減弱化し, 患者の QOL を向上させ¹⁹⁾, 肝癌細胞株 HepG2 の増殖も抑制すると報告されており, これは Fas/FasL pathway の誘導により起きると考えられている²⁰⁾。さらに, ハトムギの polysaccharide 画分 CP-1 が, ヒト非小細胞性肺癌株 A549 のアポトーシスを容量依存性に誘導し, western blotting の結果 caspase-3 と caspase-9 タンパクが増加しているとの報告²¹⁾や, ハトムギエキスは, 肝癌細胞 HepG2 において caspase-8 の発現を増加させるが, Bcl-2 については変化がみられなかったとする報告がみられる²²⁾。

ハトムギの抗癌作用に関する報告は, そのほとんどすべてがヨクイニンの有機溶媒抽出物に関するものであり, ハトムギ熱水抽出物に関するものは極めて少ない。今回のわれわれの実験では, ハトムギの熱水抽出物にも



*p value by Tukey's HSD among various concentration

図 8-1 抗 UVB 作用 (試験②: UVB 3 分間照射後エキス添加) UVB 照射 3 分後に被検物質を添加し, cont. の細胞障害率を 100%として, それぞれの細胞障害率を%表示した (** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, 対照群との Tukey の多重比較及び Dunnett's t-test). 加えた被検物質の量は, ヨクイニンと CRD はいずれも 1.0 μg , 10 μg , 100 μg , Monoolein と Trilinolein は 0.32 nmol, 3.2 nmol, 32 nmol とした。



* $p < 0.05$ by 2-way ANOVA between 2 types of dose-dependent suppression by CRD and Yokueinin, N=3

図 8-2 抗 UVB 作用 (UVB 3 分間照射後エキス添加)

UVB 照射 3 分後に被検物質を添加し, cont. の細胞障害率を 100%として, それぞれの細胞障害率を%表示した (** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, 対照群との Tukey の多重比較及び Dunnett's t-test). 加えた被検物質の量は, ヨクイニンと CRD はいずれも 1.0 μg , 10 μg , 100 μg , Monoolein と Trilinolein は 0.32 nmol, 3.2 nmol, 32 nmol とした。ヨクイニンと CRD 群の濃度依存性変化には有意な群間差を認めた。(* $p < 0.05$, 2-way ANOVA)

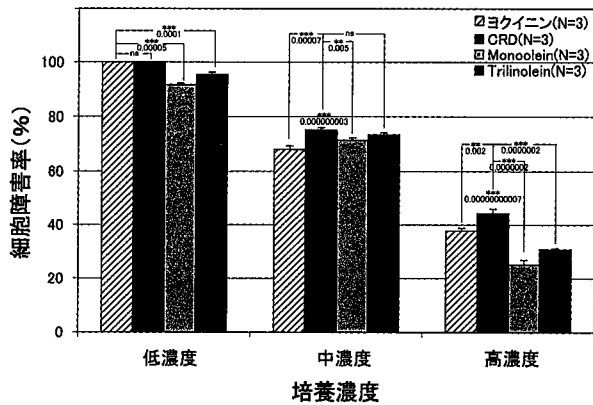
弱いながらも抗腫瘍活性を認めることがわかった。とくに、MCF-7 細胞と Hep-2 細胞では、ヨクイニンよりも CRD が有意に腫瘍を抑制することから、ハトムギ子実のみならずハトムギの外殻、薄皮、渋皮にも抗腫瘍に関する有用成分が存在すると推察された。

これまでハトムギの癌予防作用についてはいくつか報告がみられ、ハトムギ糠のエタノール抽出物が、ラットの大腸の前がん病変である preneoplastic aberrant crypt foci (ACF) の数を容量依存的に減少させるという報告²³⁾やハトムギ糠のエタノール抽出物の酢酸エチル画分は、RAS

and Ets2 がん遺伝子の発現を抑制し、Cyclooxygenase-2 (COX-2) タンパクの発現を有意に抑制することによって慢性の炎症を抑制する作用が、大腸の前がん病変抑制につながっているとする報告²⁴⁾等がある。また、今回の実験で腫瘍増殖抑制効果については Monoolein より Trilinolein が、発癌予防作用については、Trilinolein より Monoolein の方が有意に強かったが、両物質とも抗腫瘍の有用成分であることの一部が裏付けされたものと考えた。Trilinolein の抗腫瘍効果についてはこれまで少なくとも 1 件の報告がみられ、Trilinolein が A549 細胞の増殖を抑制し、そのメカニズムとしては PI3K/Akt 経路のダウンレギュレーションにあるとしている²⁵⁾。一方、Monoolein についてはわれわれの研究以外に報告は見当たらない。

脂質代謝とハトムギの抗腫瘍に関する報告もみられ、Yu らは、ハトムギ投与により、beta-ketoacyl reductases (KR) and enoyl reductase (ER) の減少により、肝臓での fatty acid synthase (FAS) の阻害が起き、lipid protein lipase (LPL), hepatic lipase (HL) が上昇、G-6-PD activity に影響しこれが抗腫瘍作用に関係すると報告し、ハトムギの有効成分として Hexadecanoic acid, Octadecanoic acid, Octadecenoic acid, Octadecadienoic acid をあげている²⁶⁾。

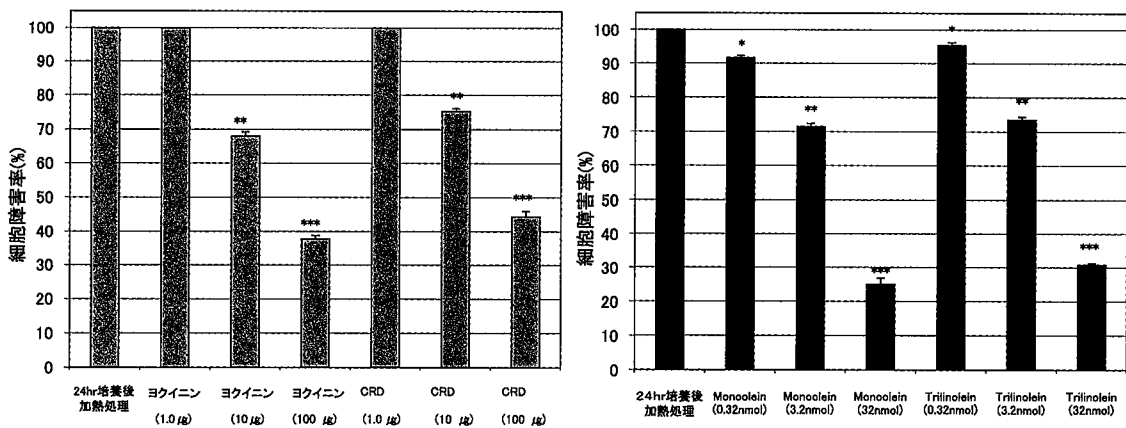
今回われわれは検討していないが、ハトムギの抗腫瘍作用には免疫機構の関与もあり、ヒト試験で MHC 非拘束性 cytotoxic T cell がハトムギ 4 週間投与で著明に上昇し、natural killer cell は 3 週間で上昇すること^{27,28)}や、ハトムギ糠のエタノール画分の酢酸エチル画分は、卵白アルブミン (OVA) 免疫マウスを用いた実験で、OVA IgE 抗体の産生減少、IFN- γ の減少、IL-6 の減少、Th2 タイプの



*p value by Tukey's HSD among various concentration

図 9-1 抗加熱障害作用 (24 hr 培養後細胞を加熱処理)

被験エキスを添加し、培養後加熱処理し、cont. の細胞障害率を 100% として、それぞれの細胞障害率を%表示した (**p<0.001, ***p<0.0001, 対照群との Tukey の多重比較及び Dunnett's t-test). 加えた被験物質の量は、ヨクイニンと CRD はいずれも 1.0 μ g, 10 μ g, 100 μ g, Monoolein と Trilinolein は 0.32 nmol, 3.2 nmol, 32 nmol とした。



**p<0.01 by 2-way ANOVA between 2 types of dose-dependent suppression by CRD and Yokuinin, N=3

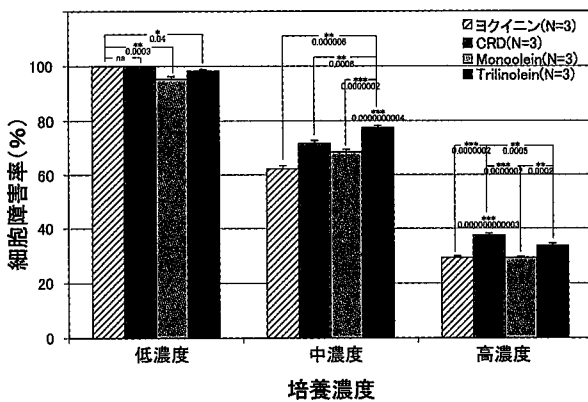
図 9-2 抗加熱障害作用 (24 hr 培養後細胞を加熱処理)

被験エキスを添加し、培養後加熱処理し、cont. の細胞障害率を 100% として、それぞれの細胞障害率を%表示した (**p<0.001, ***p<0.0001, 対照群との Tukey の多重比較及び Dunnett's t-test). 加えた被験物質の量は、ヨクイニンと CRD はいずれも 1.0 μ g, 10 μ g, 100 μ g, Monoolein と Trilinolein は 0.32 nmol, 3.2 nmol, 32 nmol とした。ヨクイニンと CRD 群の濃度依存性変化には有意な群間差を認めた (**p<0.01, 2-way ANOVA)

サイトカイン (IL-4 and IL-5) を調整することにより, Th1/Th2 のバランスを調整する作用があることも報告されている²⁹⁾. 今後, われわれもハトムギの熱水抽出物について免疫学的な検討を行うべきであると思われた.

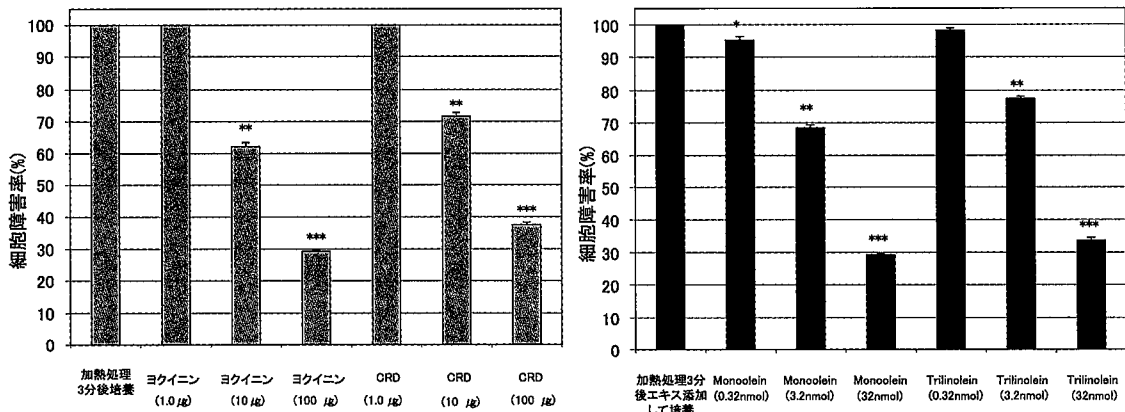
さて, 今回の試験でハトムギの熱水抽出物と2つの有用成分の抗炎症作用の一端が明らかになったが, 抗炎症・抗アレルギー作用に関してこれまでいくつかの報告はみられる. Chenらは, ラット好塩基性白血球細胞 RBL-2H3 においてハトムギ糖のエタノール画分の酢酸エチル画分

は肥満細胞の脱顆粒を減少させ, interleukin (IL)-4, IL-6 と tumor necrosis factor- α を減少させること, また, 同画分が後期アレルギー反応においてサイトカインの産生を減少させ, 細胞内活性酸素種の産生の抑制, Akt のリン酸化を抑制し, protein kinase C の発現を減少させることを報告しており, 有用成分として, 6 個のフェノール酸と 1 個のフラボンを同定し, なかでも, luteolin が最も作用が強いとしている³⁰⁾. また, ハトムギの薄皮のエタノール抽出物の酢酸エチル画分は, RBL-2H3 細胞において, cellinterleukin (IL)-4, IL-6 と tumor necrosis factor-alpha 分泌を押さえ, ラット好塩基白血球細胞 (RBL)-2H3 において肥満細胞の脱顆粒を抑制したという報告³¹⁾ もみられる. Huang らは, ハトムギ外殻のエタノール抽出物から Eriodictyol, ceramide(2S,3S,4R)-2-[(2'R)-2'-hydroxytetracosanoyl-amino]-1,3,4-octadecanetriol と p-coumaric acid が同定され, 特にこのうち Eriodictyol, ceramide が lipopolysaccharide (LPS) で誘導された RAW 264.7 マクロファージの炎症反応を抑制する作用を有することを報告し³²⁾, ハトムギの薄皮のエタノールエキスの成分が antiradical, antioxidative, and anti-inflammatory activities をもち, そのメカニズムは inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase 2 (COX-2) proteins のダウンレギュレーションであること, 有効物質としては chlorogenic acid (CGA), vanillic acid (VA), caffeic acid (CA), p-coumaric acid (PCA), ferulic acid (FA), 2-O-beta-glucopyranosyl-7-methoxy-4(2H)-benzoxazin-3-one (GMBO) のうち, 抗酸化, 抗炎症作用で重要なのは, chlorogenic acid (CGA), caffeic acid (CA), ferulic acid (FA) であるとしている³³⁾.



*p value by Tukey's HSD among various concentration
 図 10-1 抗加熱障害作用 (細胞加熱処理 3 分後に被検エキスを添加)

加熱処理 3 分後に被検エキスを添加し, cont. の細胞障害率を 100% として, それぞれの細胞障害率を % 表示した. (**p<0.001, ***p<0.0001, 対照群との Tukey の多重比較及び Dunnett's t-test). 加えた被検物質の量は, ヨクイニンと CRD はいずれも 1.0 μ g, 10 μ g, 100 μ g, Monoolein と Trilinolein は 0.32 nmol, 3.2 nmol, 32 nmol とした.



(左) **p<0.01 by 2-way ANOVA between 2 types of dose-dependent suppression by CRD and Yokuinin., N=3
 (右) *p<0.05 by 2-way ANOVA between 2 types of dose-dependent suppression by Monoolein and Trilinolein, N=3

図 10-2 抗加熱障害作用 (細胞加熱処理 3 分後に被検エキスを添加)

加熱処理 3 分後に被検エキスを添加し, cont. の細胞障害率を 100% として, それぞれの細胞障害率を % 表示した. (**p<0.001, ***p<0.0001, 対照群との Tukey の多重比較及び Dunnett's t-test). 加えた被検物質の量は, ヨクイニンと CRD はいずれも 1.0 μ g, 10 μ g, 100 μ g, Monoolein と Trilinolein は 0.32 nmol, 3.2 nmol, 32 nmol とした. ヨクイニンと CRD 群の変化には有意な群間差を認めた (**p<0.01, 2-way ANOVA). Monoolein と Trilinolein 群の濃度による濃度依存性変化にも有意な群間差を認めた. (*p<0.05, 2-way ANOVA)

ごく最近ハトムギの抗 UVB 作用についての報告もみられる。ヒト皮膚角化上皮膜貫通型水チャンネルのアクアポリンは紫外線照射時の光老化による皮膚の脱水に関与しているが、Shan らは protein kinase C と NF-κB の抑制作用のあるハトムギ抗腫瘍剤 Kanglaite は aquaporin-3(AQP3) をダウンレギュレートすることにより、抗紫外線効果を発揮することを報告している³⁴⁾。われわれは今回ハトムギの熱水抽出物にも同様の抗紫外線作用を有することを明らかにすることができたが、基本的なメカニズムはハトムギが有する抗酸化・ラジカル消去作用によるところが大きいと考えている。今回試験したハトムギの有用成分の一つ trilinolein も抗酸化作用を有するとされている³⁵⁾。

ハトムギの有効成分は報告されているだけでも 40 種類以上あるので、今後は Monoolein や Trilinolein 以外の化合物についても詳細に検討する必要があると思われる。

結 論

ハトムギ子実の熱水抽出エキスとハトムギの外殻・薄皮・渋皮をすべて含む殻実の熱水抽出エキスならびにハトムギの有用成分である Monoolein や Trilinolein の腫瘍増殖抑制作用ならびに抗炎症作用を検討し、これらの物質が腫瘍増殖抑制効果と抗炎症作用を有することが明らかとなった。また、ハトムギは子実以外の外殻・薄皮・渋皮も有用であることが示唆された。

参 考 文 献

- 1) Ha do T, Nam Trung T, Bich Thu N, et al. Adlay seed extract (*Coix lachryma-jobi* L.) decreased adipocyte differentiation and increased glucose uptake in 3T3-L1 cells. *J Med Food* 2010; 13(6): 1331-1339.
- 2) Yeh PH, Chiang W, Chiang MT. Effects of dehulled adlay on plasma glucose and lipid concentrations in streptozotocin-induced diabetic rats fed a diet enriched in cholesterol. *Int J Vitam Nutr Res* 2006; 76(5): 299-305.
- 3) Takahashi M, Konno C, Hikino H. Isolation and hypoglycemic activity of coixans A, B and C, glycans of *Coix lachryma-jobi* var. *ma-yuen* seeds. *Planta Med* 1986; (1): 64-65.
- 4) Kim SO, Yun SJ, Lee EH. The water extract of adlay seed (*Coix lachrymajobi* var. *mayuen*) exhibits anti-obesity effects through neuroendocrine modulation. *Am J Chin Med* 2007; 35(2): 297-308.
- 5) Huang BW, Chiang MT, Yao HT, et al. The effect of adlay oil on plasma lipids, insulin and leptin in rat. *Phytomedicine* 2005; 12(6-7): 433-439.

- 6) Kim SO, Yun SJ, Jung B, et al. Hypolipidemic effects of crude extract of adlay seed (*Coix lachrymajobi* var. *mayuen*) in obesity rat fed high fat diet: relations of TNF-alpha and leptin mRNA expressions and serum lipid levels. *Life Sci* 2004; 75(11): 1391-1404.
- 7) Wang L, Sun J, Yi Q, et al. Protective effect of polyphenols extract of adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) on hypercholesterolemia-induced oxidative stress in rats. *Molecules* 2012; 17(8): 8886-8897.
- 8) Kim JY, Shin JH, Lee SS. Cardioprotective effects of diet with different grains on lipid profiles and antioxidative system in obesity-induced rats. *Int J Vitam Nutr Res* 2012; 82(2): 85-93.
- 9) Yu F, Gao J, Zeng Y, Liu CX. Effects of adlay seed oil on blood lipids and antioxidant capacity in hyperlipidemic rats. *J Sci Food Agric* 2011; 91(10): 1843-1848.
- 10) Park Y, Suzuki H, Lee YS, et al. Effect of coix on plasma, liver, and fecal lipid components in the rat fed on lard- or soybean oil-cholesterol diet. *Biochem Med Metab Biol* 1988; 39(1): 11-17.
- 11) Chen HH, Chen YT, Huang YW, et al. 4-Ketopinosresinol, a novel naturally occurring ARE activator, induces the Nrf2/HO-1 axis and protects against oxidative stress-induced cell injury via activation of PI3K/AKT signaling. *Free Radic Biol Med* 2012; 52(6): 1054-1066.
- 12) Gomita Y, Ichimaru Y, Moriyama M, et al. Behavioral and EEG effects of coixol (6-methoxybenzoxazolone), one of the components in *Coix Lachryma-Jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 1981; 77(3): 245-259.
- 13) Kondo Y, Nakajima K, Nozoe S, et al. Isolation of ovulatory-active substances from crops of Job's tears (*Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* STAPF.). *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1988; 36(8): 3147-3152.
- 14) Yang RS, Chiang W, Lu YH, et al. Evaluation of osteoporosis prevention by adlay using a tissue culture model. *Asia Pac J Clin Nutr* 2008; 17 (Suppl 1): 143-146.
- 15) Woo JH, Li D, Wilsbach K, et al. Coix seed extract, a commonly used treatment for cancer in China, inhibits NFκappaB and protein kinase C signaling. *Cancer Biol Ther* 2007; 6(12): 2005-2011.
- 16) Hu Y, Liang H, Gong WK, et al. The effect of kanglaite injection(KLT) on the proliferation and telomerase activity of rat mesangial cells. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2005; 30(6): 450-453.
- 17) 太田康之, 鈴木信孝, 太田富久ら. ハトムギサプリメント素材としての研究の現状. *総合臨床*. 2005; 54(10): 3199-3201.
- 18) Hayashi H, Ohta Y, Arai T, et al. Acute oral toxicity test of hot water extract of *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf in Rats. *JJCAM* 2009; 6(2): 105-110.
- 19) Zhan YP, Huang XE, Cao J, et al. Clinical safety and efficacy of Kanglaite® (*Coix Seed Oil*) injection combined with chemotherapy in treating patients with gastric cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13(10): 5319-5321.
- 20) Lu Y, Wu LQ, Dong Q, et al. Experimental study on the effect of

- Kang-Lai-Te induced apoptosis of human hepatoma carcinoma cell HepG2. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8(3): 267–372.
- 21) Lu X, Liu W, Wu J, et al. A polysaccharide fraction of adlay seed (*Coixlachryma-jobi* L.) induces apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 430(2): 846–851.
 - 22) Lu Y, Zhang BY, Jia ZX, et al. Hepatocellular carcinoma HepG2 cell apoptosis and caspase-8 and Bcl-2 expression induced by injectable seed extract of *Coix lacryma-jobi*. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2011; 10(3): 303–307.
 - 23) Li SC, Chen CM, Lin SH, et al. Effects of adlay bran and its ethanolic extract and residue on preneoplastic lesions of the colon in rats. *J Sci Food Agric* 2011; 91(3): 547–552.
 - 24) Chung CP, Hsu HY, Huang DW, et al. Ethyl acetate fraction of adlay bran ethanolic extract inhibits oncogene expression and suppresses DMH-induced preneoplastic lesions of the colon in F344 rats through an anti-inflammatory pathway. *J Agric Food Chem* 2010; 58(13): 7616–7623.
 - 25) Chou PY, Huang GJ, Pan CH, et al. Trilinolein inhibits proliferation of human non-small cell lung carcinoma A549 through the modulation of PI3K/Akt pathway. *Am J Chin Med* 2011; 39(4): 803–815.
 - 26) Yu F, Gao J, Zeng Y, et al. Inhibition of Coix seed extract on fatty acid synthase, a novel target for anticancer activity. *J Ethnopharmacol* 2008; 119(2): 252–258.
 - 27) Kaneda T, Hidaka Y, Kashiwai T, et al. Effect of coix seed on the changes in peripheral lymphocyte subsets. *Rinsho Byori* 1992; 40(2): 179–181.
 - 28) Hidaka Y, Kaneda T, Amino N, et al. Chinese medicine, Coix seeds increase peripheral cytotoxic T and NK cells. *Biotherapy* 1992; 5(3): 201–203.
 - 29) Chen HJ, Hsu HY, Chiang W. Allergic immune-regulatory effects of adlay bran on an OVA-immunized mice allergic model. *Food Chem Toxicol* 2012; 50(10): 3808–3813.
 - 30) Chen HJ, Lo YC, Chiang W. Inhibitory effects of adlay bran (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) on chemical mediator release and cytokine production in rat basophilic leukemia cells. *J Ethnopharmacol* 2012; 141(1): 119–127.
 - 31) Chen HJ, Shih CK, Hsu HY, et al. Mast cell-dependent allergic responses are inhibited by ethanolic extract of adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) testa. *J Agric Food Chem* 2010; 58(4): 2596–2601.
 - 32) Huang DW, Chung CP, Kuo YH, et al. Identification of compounds in adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) seed hull extracts that inhibit lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem* 2009; 57(22): 10651–10657.
 - 33) Huang DW, Kuo YH, Lin FY, et al. Effect of Adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) Testa and its phenolic components on Cu²⁺-treated low-density lipoprotein (LDL) oxidation and lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem* 2009; 57(6): 2259–2266.
 - 34) Shan SJ, Xiao T, Chen J, et al. Kanglaite attenuates UVB-induced down-regulation of aquaporin-3 in cultured human skin keratinocytes. *Int J Mol Med* 2012; 29(4): 625–629.
 - 35) Chan P, NeilThomas G, Tomlinson B. Protective effects of trilinolein extracted from *Panax notoginseng* against cardiovascular disease. *Acta Pharmacol Sin* 2002; 23(12): 1157–1162.

ABSTRACT**Study of the Inhibitory Effect of *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf on Carcinogenesis and Inflammation**

Rihou SUZUKI¹, Harukuni TOKUDA², Nobutaka SUZUKI², Kazuo UEBABA³, XU FengHao²,
Toshiki KAWABATA², Tomihisa OHTA⁴, Shigeki OHTAKE⁵

¹ *The Division of Health Sciences, Kanazawa University Graduate School of Medical Science*

² *Department of Complementary and Alternative Medicine Clinical Research and Development,
Kanazawa University Graduate School of Medical Science*

³ *Institute of Eastern Medicine, Teikyo Heisei University*

⁴ *College of Medicinal Pharmaceutical and Health Sciences Laboratory of Environmental and Health Sciences, Kanazawa University*

⁵ *Department of Clinical Laboratory Science, School of Health Sciences, College of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences,
Kanazawa University*

Adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) is a grass crop that has long been used in traditional medicine as a nourishing food. This study investigated the inhibitory effects of adlay related substances on carcinogenesis and anti-inflammation. The hot water extract of all parts of adlay (CRD) were compared with the hot water extract of dehulled adlay (yokuinin). In addition, the Monoolein and Trilinolein components of adlay were compared.

As a screening date, antiproliferative effect of human cancer cells showed weak biological potency on physical dose response. Prevention effect of carcinogenesis and anti-inflammatory effect were also observed in all samples. CRD showed stronger anti-UVB inflammatory effect than that of yokuinin; while yokuinin showed stronger anti-heating injury inflammatory effect than that of CRD. Moreover, Monoolein showed stronger effect than Trilinolein on both prevention effect of carcinogenesis and anti-inflammatory effect. These result indicated that these two extracts of adlay exhibited inhibitory effect on both tumor and inflammation. In addition, it is also suggested that Monoolein is more effective than Trilinolein.

Key words: *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf, Monoolein, Trilinolein, cancer chemoprevention, UVB, anti-inflammation

