

春ウコン熱水抽出エキスの免疫賦活作用

渡辺 章夫^{1*}、中村 太郎²、小山 彩華¹、衛藤 未侑¹、要害 心¹、
倉若 美咲樹¹、小林 亘³、米澤 貴之⁴、禹 濟泰²
(令和5年2月11日受理)

Immunostimulating Activity of Boiled Extracts of *Curcuma Aromatica*

Akio WATANABE¹, Taro NAKAMURA², Ayaka KOYAMA¹, Miyu ETO¹, Kokoro YOGAI¹,
Misaki KURAWAKA¹, Wataru KOBAYASHI³, Takayuki YONEZAWA⁴, Je-Tae WOO²

Summary

Curcuma aromatica (*C. aromatica*), a plant belonging to the family Zingiberaceae has been cultivated for years in tropical Asia. *C. aromatica* is a good source of immune-modifying agents; however, the mechanism of action of the active components is still unclear. We demonstrated the anti-tumor effects (suppression of tumor size and weight) of boiled extracts of *C. aromatica* following administration to cancer-bearing mice. In addition, the extracts activated mouse macrophages and induced IFN- γ production in mouse splenic primary cells *in vitro*. However, the extract did not induce IFN- γ production in human natural killer cells and NK activity against K562 tumor cells. These results suggest that the boiled extracts of *C. aromatica* do not act directly on NK cells, but activate T cells or NK cells via macrophages, and activate the innate immune system. The boiled extracts of *C. aromatica* may be useful as a novel food-derived immunostimulant.

Key words : *Curcuma aromatica*, immunostimulation

要旨 : 春ウコン (*Curcuma aromatica*) は熱帯アジア地域で栽培されているショウガ科の植物である。春ウコンには免疫賦活作用があることがすでに報告されているが、そのメカニズムは詳細に調べられていない。我々は、春ウコン熱水抽出エキスを担癌モデルマウスに投与したところ、腫瘍サイズおよび腫瘍重量を抑制する抗腫瘍効果が認められた。また、春ウコン熱水抽出エキスは*in vitro*において、マウスマクロファージを活性化し、マウス脾臓初代細胞に対してIFN- γ 産生を誘導した。しかし、ヒトナチュラルキラー細胞におけるIFN- γ 産生やK562癌細胞に対するNK活性を直接的に誘導する効果は認められなかった。これらの結果から、春ウコン熱水抽出エキスはNK細胞に対して直接作用せず、マクロファージなどを介してT細胞またはNK細胞を活性化し、自然免疫系を賦活していることが示唆された。春ウコン熱水抽出エキスは新しい食品由来の免疫賦活剤としての利用が期待される。

キーワード : 春ウコン、免疫賦活

*連絡責任者 (Corresponding author E-mail: akio-wa@jumonji-u.ac.jp)

十文字学園女子大学 (352-8510 埼玉県新座市菅沢2-1-28)

Jumonji University, 2-1-28, Sugasawa, Niiza-shi, Saitama 352-8510, Japan

¹ 十文字学園女子大学 人間生活学部 食品開発学科 ² 中部大学大学院 応用生物学研究科

³ 十文字学園女子大学 人間生活学部 健康栄養学科 ⁴ 中部大学 生物機能開発研究所

緒言

我々には、ウイルスやがん細胞から防御するための様々な免疫機能が備わっている。ナチュラルキラー (NK) 細胞は、ウイルス感染細胞やがん細胞をいち早く発見して殺す働きがあり、特にインフルエンザウイルスやコロナウイルスなどの感染症予防、がん予防の決め手として注目されている¹⁾。NK細胞の活性 (がん細胞傷害活性) は加齢とともに低下することから、高齢になるほどがん発生率が高くなるのは、NK細胞の活性化の衰えに関連していると言われている²⁾。また、NK細胞は自律神経に影響を受けるため、ストレスを受けて交感神経が優位になるとNK細胞の活性は激減する³⁾。健康を維持するためには、NK細胞の活性化が不可欠である。NK細胞の活性化を促進する物質が探索されているが、薬剤として利用されるものがほとんどである。食品として利用可能な素材としては、多糖(フコイダン、βグルカン等)が知られている^{4, 5)}。春ウコン (別名: キョウオウ、*Curcuma aromatica*) は沖縄県下で栽培されているショウガ科クルクマ属の多年性草であり、その根茎は食用、薬用、香辛料および染料等に用いられている⁶⁾。根茎の切り口は濃い黄色で、苦味が強い特徴がある。古くから免疫レベルを高くする効果があることが知られており、沖縄などでは健康維持を目的として食用されている。Zhangらは春ウコンの熱水抽出物からエタノール沈殿にて調製した多糖粗精製物がマクロファージにおいてTNF-αやIL-6の産生を増加させるなど免疫賦活作用を有することを報告している⁷⁾。しかし、*in vivo*での作用やNK細胞への影響は明らかになっていない。そこで、春ウコン熱水抽出液の60%エタノール沈殿画分がマクロファージやNK細胞などの免疫細胞に及ぼす影響について、*in vivo*および*in vitro*で作用機構を明らかにすることを目的として検討を行った。

実験方法

1. 被験物質

沖縄県内でお茶として市販されている沖縄県産春ウコン粉末を用いた。春ウコン熱水抽出液は春ウコン粉末に20倍量の蒸留水を加え105℃、5分間の条件下でオートクレーブを使用して調製した。次に、熱水抽出液に30、60、90%エタノールになるようにエタノールを添加することで、3つのエタノール沈殿画分を得たのち凍結乾燥を行った。春ウコン熱水抽出物の30、60、90%エタノール沈殿画分について、RAW264細胞のNO産生誘導活性を検

討した結果、60%エタノール沈殿画分の作用が最も強かったため、本研究ではこの春ウコン熱水抽出物の60%エタノール沈殿画分を、春ウコン熱水抽出エキス (CBE: Curcuma Boil Extract) として実験に使用した。

2. RAW264細胞におけるNO産生試験

マウスマクロファージ様細胞株RAW264 (1.0×10⁵ cells/well) に1~50 μg/mLの濃度のCBEを添加し、24時間後の培養上清中のNO₂濃度をGriess法で測定し、NO産生誘導能を評価した。NO産生率 (%) は0.1 μg/mL リポポリサッカライド (LPS: *Escherichia coli* O55:B5由来、和光純薬工業株式会社) を添加して培養後の培養上清中のNO₂濃度を100%とした相対値により算出した。

3. 担癌マウスを用いた抗腫瘍試験

試験動物 (C57BL/6J Jms Slc, 4週齢、雌) は日本エスエルシー (株) より購入し、予備飼育で一般状態に異常がないことを確認した後、群分けして試験に使用した。試験動物をポリカーボネート製ケージに5匹ずつを収容し、室温23℃±2℃、照明時間12時間/日に設定した飼育室において飼育し、CRF-1固形飼料 (オリエンタル酵母株式会社) を自由摂取とした。CBEは0.1%、0.5%の濃度で蒸留水に溶解し、ろ過滅菌したものを飲水としてマウスに自由摂取させた。Control群は滅菌蒸留水とした。CBE投与開始から7日目にマウス肺癌細胞 (LLC: Lewis lung cancer) を5×10⁵ cells/100 μL PBS/mouseの割合で背側に皮下投与することで担癌マウスを作製し、翌日から腫瘍径を1日あるいは2日ごとにノギスで測定することで腫瘍の増大抑制効果を検証した⁸⁾。腫瘍体積 (mm³) は以下の式で算出した⁹⁾。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = \text{直径} \times (\text{短径})^2 \div 2$$

動物実験は中部大学における実験動物に関する指針と設定された人道的エンドポイントに従って実施した (承認番号: 第202110037号)。LLCを移植した日から数えて18日目に人道的エンドポイントに達したと判断し実験を終了した。また、安楽死後に剖検時の一般状態を観察した後、腫瘍を摘出し、腫瘍重量を測定した。また心臓から血液を採取し、血漿中のIFN-γ濃度をELISA法で測定した。

4. ICRマウス由来脾臓細胞試験

実験動物 (Slc: ICR, 8週齢、雌) から脾臓を取り出し、定法に従って調製した脾臓細胞 (4×10⁶

cells/mL) にCBEが50 µg/mLになるように添加して培養を行った。陽性対象としてIL-2 (100 unit/mL) および LPS (0.1 µg/mL) を使用した。3日後の培養上清中のIFN-γ量をELISA法で測定した¹⁰⁾。

動物実験は十文字学園女子大学における実験動物に関する指針に従って行った(承認番号: 第2201号)。

5. KHYG-1細胞を用いた免疫賦活試験

ヒトNK様細胞株であるKHYG-1細胞 (1.5×10⁵ cells/mL) に賦活処理としてCBE (50 µg/mL)、または、陽性対象であるIL-2 (100 unit/mL) および LPS (0.1 µg/mL) を添加して24時間の前培養後、培養上清中のIFN-γ量を測定した¹¹⁾。

また、標的細胞としてCalcein-AM標識をした白血病細胞株K562細胞に、賦活処理後のKHYG-1細胞を加えて共培養し、標的細胞の損傷により漏出するCalceinの蛍光強度をがん細胞傷害活性の指標としてNK活性を測定した。Effector cell : Target cell (E : T) 比はE : T=50 : 1とした¹²⁾。

NK活性(%)は以下の式で算出した。

$$\text{NK活性(\%)} = (\text{サンプル添加群におけるCalcein漏出量} - \text{サンプル未添加群のCalcein漏出量}) / (\text{Calcein最大漏出量} - \text{サンプル未添加群のCalcein漏出量}) \times 100$$

Calcein最大漏出量 = 1% Triton添加によるCalcein漏出量

6. 統計解析

統計処理はGraphPad Prism 9を用いて、Control群と比較群間で一元分散分析を行い、有意な場合はDunnnett多重比較法により比較を行った。結果は平均値 (Mean) ±標準誤差 (SE) で表し、*p* 値が0.05未満の場合に統計的に有意差があると判断した。

実験結果

1. RAW264細胞におけるCBEのNO産生促進効果

マクロファージ様細胞株RAW264においてCBEに濃度依存的なNO産生促進作用が認められた(図1)。CBEはマクロファージを強力に活性化する効果が確認された。

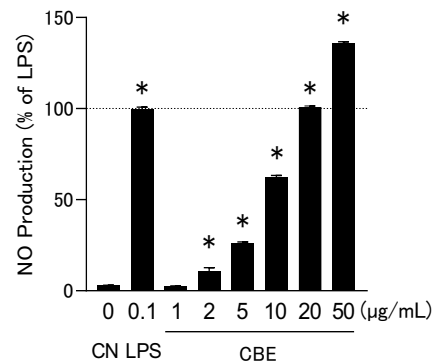


図1. RAW264細胞を用いたNO産生促進試験

それぞれデータは平均値±標準誤差、*n*=6で示した。NO産生率は0.1 µg/mL LPSのNO₂濃度を100%とした相対値として算出した。群間における有意差は*p<0.05 (Dunnnett多重比較法) で示した。

2. 担癌マウスにおける一般状態観察

一般状態を観察したところ、全ての群において、投与期間中に死亡動物は認められなかったが、担癌後、16日までは異常は見られなかったが、17日時点でControl群において下半身に麻痺を発症する個体が認められたため、18日目をエンドポイントとして、死亡個体が生じる前に実験を終了した。剖検時には、Control群の麻痺を発症した個体において腰椎付近に腫瘍の骨転移がみられたが、その他の個体では骨転移は見られなかった。

3. 担癌マウスにおけるCBEの抗腫瘍効果

CBEを投与した癌移植マウスにおける腫瘍体積の推移を図2に、また剖検時の腫瘍重量を図3に示した。その結果、CBEの飲水投与により、濃度依存的な腫瘍体積の増加の抑制が認められ、0.5% CBE群では腫瘍重量が有意に低かった。このことからCBEは動物レベルで抗腫瘍効果を有することが示唆された。

Tリンパ球やNK細胞から分泌される炎症性サイトカインで、Tリンパ球やNK細胞の活性化の指標であるIFN-γについて、CBE投与後の担癌マウスの血漿中のIFN-γ濃度をELISA法で測定したところ、有意な差は見られなかったが、0.1%および0.5% CBE投与群において、IFN-γ濃度が減少する傾向が観察された(図4)。

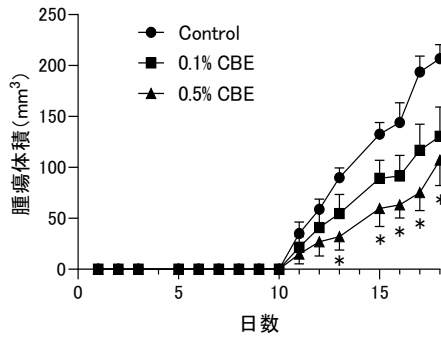


図2. CBEを投与した担癌マウスにおける腫瘍体積の推移

それぞれデータは平均値±標準誤差、 $n=5$ で示した。群間における有意差は $*p<0.05$ (Dunnett多重比較法) で示した。

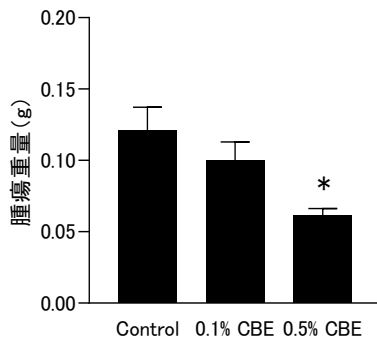


図3. CBEを投与した担癌マウスにおける腫瘍重量

それぞれデータは平均値±標準誤差、 $n=5$ で示した。群間における有意差は $*p<0.05$ (Dunnett多重比較法) で示した。

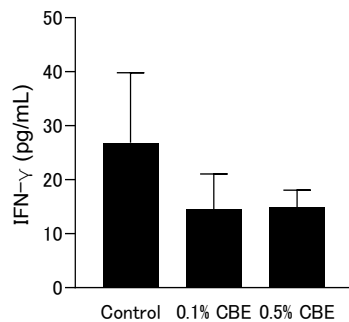


図4. CBEを投与した担癌マウスの血漿におけるIFN- γ 濃度

それぞれデータは平均値±標準誤差、 $n=5$ で示した。

4. ICRマウス由来脾臓培養におけるCBEのIFN- γ 産生作用

ICRマウスから採取した脾臓細胞にCBEを添加してから3日後の培養上清中のIFN- γ 量を測定した。その結果、ポジティブコントロールであるIL-2、LPSと同様に50 $\mu\text{g/mL}$ CBEの添加により、有意なIFN- γ 量の上昇が認められた (図5)。

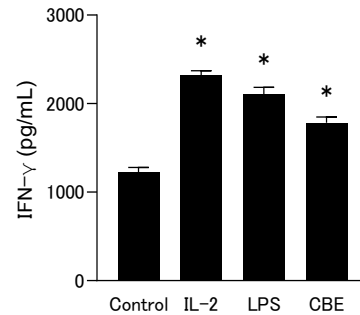


図5. ICRマウス由来脾臓初代培養におけるIFN- γ 量

それぞれデータは平均値±標準誤差、 $n=6$ で示した。群間における有意差は $*p<0.05$ (Dunnett多重比較法) で示した。

(IL-2: 100 unit/mL, LPS: 0.1 $\mu\text{g/mL}$, CBE: 50 $\mu\text{g/mL}$)

5. KHYG-1細胞におけるCBEの影響

ヒトNK様細胞株KHYG-1を用いたNK活性(%)の結果を図6に示した。ポジティブコントロールであるIL-2、LPSの添加によって有意なNK活性の上昇が認められたが、50 $\mu\text{g/mL}$ CBEの添加では有意な影響は認められなかった。

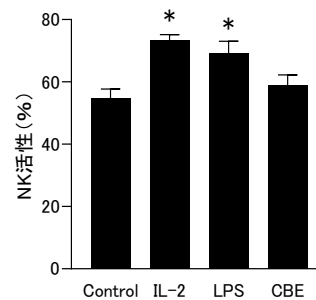


図6. ヒトNK様培養細胞KHYG-1におけるNK活性

それぞれデータは平均値±標準誤差、 $n=4$ で示した。群間における有意差は $*p<0.05$ (Dunnett多重比較法) で示した。(IL-2: 100 unit/mL, LPS: 0.1 $\mu\text{g/mL}$, CBE: 50 $\mu\text{g/mL}$)

培養上清中のIFN- γ 量を図7に示した。KHYG-1細胞にサンプルを添加して24時間後の培養上清中のIFN- γ 量を確認したところ、IL-2の添加によってIFN- γ 量の有意な上昇が認められたが、LPSの添加では有意な差は認められなかった。一方、50 $\mu\text{g/mL}$ CBEの添加により、IFN- γ 量の有意な減少が認められた。

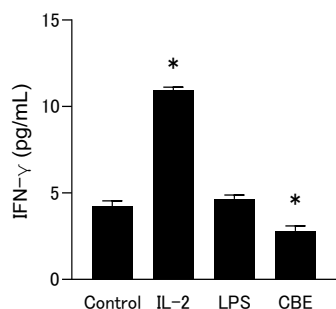


図7. ヒトNK 様培養細胞KHYG-1におけるIFN- γ 量

それぞれデータは平均値±標準誤差、 $n=3\sim4$ で示した。群間における有意差は* $p < 0.05$ (Dunnett多重比較法)で示した。(IL-2: 100 unit/mL, LPS: 0.1 $\mu\text{g/mL}$, CBE: 50 $\mu\text{g/mL}$)

考 察

本研究では、まず春ウコンより熱水抽出した後の60%エタノール沈殿画分(CBE)のマクロファージへの影響を調べるために、マウスマクロファージ様細胞株であるRAW264を用いて、NO産生能をマクロファージ活性化の指標として検証した。CBEに濃度依存的なNO産生促進作用が認められ、免疫賦活作用を有することが認められた。春ウコン熱水抽出エキスには既にZhangらによってTNF- α やIL-6の産生を増加させるなどの免疫賦活作用効果が報告されているが⁷⁾、我々もまた*in vitro*においてNO産生促進作用を確認することができた。

次に、動物レベルの免疫賦活作用としてCBEの抗腫瘍効果を検証する為にマウス肺癌細胞の皮内移植マウスモデルを用いて、0.1% CBEおよび0.5% CBE投与における効果を検討した結果、CBEに濃度依存的な抗腫瘍効果が認められた。しかし、血漿中のIFN- γ をELISA法で測定したところ、有意な差は見られなかったが、0.1%および0.5% CBE投与群において、予想に反してIFN- γ 濃度が減少する傾向が観察された。これは、Control群でLLC肺癌細胞の骨転移などが起こっており、臓器や組織

において慢性炎症が惹起されたことで、IFN- γ 濃度が増加した可能性などが考えられるため、今後、他の炎症因子を測定するなど、さらに詳細に原因の検討を行う予定である。

樹状細胞、NK細胞、T細胞など全身性の免疫細胞が集積する脾臓初代細胞に対する直接的な影響を調べてみたところIFN- γ 量の有意な増加が認められたが、ヒトナチュラルキラー様細胞株であるKHYG-1細胞ではIFN- γ 産生促進は見られず、白血病細胞株に対するNK活性(がん細胞傷害活性)も見られなかった。KHYG-1細胞におけるCBEによるIFN- γ 量の減少効果に関する原因は不明であり、検証が必要である。

これらのことから、春ウコン熱水抽出エキスはNK細胞に対して直接作用せず、マクロファージや樹状細胞などの活性化を介して、T細胞またはNK細胞などを活性化することで、自然免疫系を賦活化している可能性が示唆された。生体内でどのようなメカニズムで免疫賦活が起こっているのかについてはより詳細な検討が必要であるが、春ウコン熱水抽出エキスの成分を分析したところ、高分子の多糖成分を含有していることが分かっており、具体的な作用成分については今後の検討課題としたい。

本研究では春ウコン熱水抽出エキスによる免疫賦活効果と抗腫瘍効果を明らかにした。フコイダンや β グルカンと同様に春ウコン熱水抽出エキスもまた新規免疫賦活剤となる新しい可能性を示すことができた。春ウコンは食経験が豊かであり、長期間にわたって安全に摂取できる食品由来の免疫賦活剤としての利用が期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に深謝申し上げます。また、実験に協力をいただいた中部大学応用生物学部 実験補助員の今井律子さん、中部大学応用生物学部応用生物化学科の井田愛美里さん、岡部貴史さん、中村理乃さん、十文字学園女子大学人間生活学部食品開発学科の保永陽依さん、前原一葉さん、宮本京香さんに心から感謝いたします。

文 献

1) Santoli D. and Koprowski H., Mechanisms of activation of human natural killer cells against tumor and virus infected cells. *Immunological reviews*, **44**, 125-163

(1979)

2) Kovacs E. J., Palmer J. L., Fortin C. F., Fülöp T., Goldstein D. R., and Linton P.J., Aging and innate immunity in the mouse: impact of intrinsic and extrinsic factors. *Trends in Immunology*, **30**, 319-324 (2009)

3) Delahanty D. L., Wang T., Maravich C., Forlenza M., and Baum, A., Time-of-day effects on response of natural killer cells to acute stress in men and women, *Health psychology*, **19**, 39-45 (2000)

4) 水野雅史, 貯蔵条件によるシイタケ中に含まれる抗腫瘍性多糖レンチナン含量の変化とその生理活性., 神戸大学農学部学術報告, **26**, 39-42 (2002)

5) 大野木宏, ガゴメ昆布 (*Kjellmaniella crassifolia*) 由来フコイダンの免疫賦活・調節作用., *Food Style* **21**, **15**(6), 43-45 (2011)

6) 鎌田靖弘, 上原真希子, 天願朝隆, 沖縄県工業技術センター研究報告書., **15**, 23-28, (2012)

7) Zhang L., Khoo C., Koyyalamudi S. R., Pedro N. D., and Reddy, N., Immunostimulatory and Anticancer Activities of Polysaccharides Extracted from Traditional Anticancer Chinese Medicinal Herbs, *Pharmacologia*, **9**, 18-29 (2018)

8) 五十嵐雅陽, 山崎則之, 菊田麻朱美, 鈴木孝太郎, 松井博之, 松田芳和., 担癌マウスを用いたカキ抽出物の抗腫瘍作用の評価., 微量栄養素研究., **34**, 89-93 (2011)

9) 小笠原勝, 宮本(山口)朋美, 松永孝之, 長井良憲, 高津聖志., がん移植マウスモデルにおけるベツリンの抗腫瘍効果に関する検討., 富山県薬事研究所年報., **42**, 17-22 (2015)

10) 後藤真生., 初代免疫細胞を用いた各種免疫応答の簡便な測定法., 平成20年度農林水産省補助事業食品機能性評価マニュアル集第III集., 143-148 (2008)

11) Saito T, Abe D, and Nogata Y. Polymethoxylated flavones potentiate the cytolytic activity of NK leukemia cell line KHYG-1 via enhanced expression of granzyme B. *Biochemical and biophysical research communications*., **456**(3) 799-803 (2015)

12) 安藝健作, 佐藤瑞樹, 曾根淳美, 川添和義,

細井英司., ヒトNK様培養細胞 KHYG-1を用いたNK細胞機能の評価., 四国医学雑誌, **75**(5), 165-170 (2019)