

博士論文

ウコン熱水エキスの抗炎症作用 に関する研究

ハウスウェルネスフーズ株式会社
開発研究所 研究部 第三グループ

川崎 健吾

2018年 11月

目次

1. 序論.....	1
2. 内皮細胞の細胞接着分子の発現と単球の接着特性に対するウコン熱水エキスの影響	
2-1. 概要.....	8
2-2. 方法.....	9
2-3. 結果.....	12
2-4. 考察.....	14
2-5. 結論.....	16
2-6. 図表.....	17
3. マクロファージの PGE2 と NO の産生に対するウコン熱水エキスおよびその含有成分 の影響	
3-1. 概要.....	21
3-2. 方法.....	22
3-3. 結果.....	25
3-4. 考察.....	29
3-5. 結論.....	31
3-6. 図表.....	32
4. 健常者の気分状態に対するウコン熱水エキスの影響	
4-1. 概要.....	37
4-2. 方法.....	38
4-3. 結果.....	40
4-4. 考察.....	41
4-5. 結論.....	42
4-6. 図表.....	43
5. 結語.....	47
6. 引用文献.....	48
7. 謝辞.....	56

1. 序論

1-1. ウコン

本研究におけるウコンとは、和名をウコン、学名を *Curcuma longa*、中薬名を姜黄（キョウオウ）とする植物を指し、ショウガ科に属する根茎状の多年生植物である。植物体の地上部および根茎の写真を図 1-1 に示す。ウコンの原産は南西アジアとされ、少なくとも 6,000 年前には医薬品としてヒトに利用されていたという文書記録がある[1]。ウコンは現在もスパイス、化粧品、色素、医薬品などの原料として世界中で用いられており、主に熱帯、亜熱帯地域で栽培されている。国別の生産量は、インドが最も多く、次いでバングラデシュ、中国、タイなどの東南アジア諸国となっている。インドでの栽培面積は、2002 年時点で約 17 万 5000 ヘクタールとされ、スパイスの総栽培面積のおよそ 20%を占める。国内の市場には、類縁種のハルウコン（学名：*Curcuma aromatica*、中薬名：姜黄（キョウオウ））や、ガジュツ（学名：*Curcuma zedoaria*、中薬名：鬱金（ウコン））を起源としたものが流通するが、ハルウコンとウコンの中薬名が同じであることや、ガジュツの中薬名がウコンと同じであることに注意を要する。

ウコンは、他の植物と同様、多様な二次代謝産物を産生する。ウコンには少なくとも 235 種の二次代謝産物が含まれていることが報告されており、クルクミンなど 22 種のジアリルヘプタ（ペンタ）ノイド、68 種のモノテルペノイド、109 種のセスキテルペノイドなどが含まれる[20]（図 1-3）。ウコンの代表成分であるクルクミンの抗炎症作用については、多数の報告がなされている[21]。一方で、クルクミン以外の成分（CFT: curcumin free turmeric）の抗炎症作用についても着目されている[22]。例えば、セスキテルペノイドの ar-turmerone や curdione は、LPS (lipopolysaccharide) が誘導するマクロファージの炎症を抑制する作用を有し[23, 24]、bisacurone は TNF- α (tumor necrosis factor- α) が誘導する血管内皮細胞の接着分子の増加を抑制する作用を有する[25]。しかし、CFT のほとんどについては、抗炎症作用を含む生理作用が未だ検証されていないのが現状である。これらの化合物の作用を個別に 1 つずつ明らかにすることは、ウコンから比活性の強い医薬品リード化合物を探索する目的の達成に加え（またはそれ以上に）、ウコン熱水エキスのような混合物の複合的な作用を解明する目的を達成する上で重要であると考えられる。

1-2. ウコン熱水エキス

ウコンを原料とした利用形態としては、ウコン粉末、クルクミン、ウコン熱水エキスなどが挙げられ、それぞれの製法は、図 1-2 に示したものが代表的である[2]。ウコン粉末は、スパイスとして各種の料理に使用される。クルクミンは、ウコン根茎を有機溶媒で抽出して生産され、色素原料などとして使用される。ウコン熱水エキスは、ウコン根茎を熱水で抽出して生産される。クルクミンが有機溶媒で抽出され作製されるのに対し、ウコン熱水エキスは水で抽出され作製される。水での抽出は、有機溶媒での抽出と比較し、概して高極性の成分が抽出されやすいので、ウコン熱水エキスには、比較的高極性の成分が比較的多く含まれ、比較的低極性の成分であるクルクミンは、わずかしこ含まれないことを、クルクミンと異なる特徴とする。

ウコン熱水エキスの生理作用としては、細胞モデルでの研究において、抗ウイルス作用[3]、神経保護作用[4]、抗糖尿病作用[5]などが報告されている。また、動物モデルでの研究において、肝保護作用[6, 7]、抗うつ作用[8]、ぶどう膜炎の抑制作用[9]、抗ガン作用[10-13]、心血管保護作用[14-16]、抗ストレス作用[17]などが報告されている。クルクミンの生理作用の莫大な研究報告[18, 19]と比較すると、ウコン熱水エキスの報告数は少ない。また、現在のところ臨床試験での研究報告は見当たらないが、上記の細胞モデルや動物モデルにおける研究結果から、ヒトへの応用が期待される。

1-3. 炎症

炎症は、感染性因子や損傷に対する重要な防御応答反応である[26]。炎症は、急性と慢性のいずれかに分類される。急性炎症は、急激な炎症反応が短期間（数日～数週間）で収束することを特徴とする。急性炎症は、感染に対する主要な防御であり、損傷の治癒を促進する要因でもあるため、生体にとって必須である。一方で、慢性炎症は、緩慢な炎症反応が長期間（数ヶ月～数年）持続することを特徴とする。慢性炎症は、アテローム性動脈硬化症、糖尿病、潰瘍性大腸炎、癌、うつ病およびパーキンソン病のような中枢神経障害および認知障害などの様々な慢性疾患の発症や進展に関与する。

炎症部位において、組織マクロファージや肥満細胞、内皮細胞、また血中から炎症部位に集積した白血球は、様々なメディエーターを産生、放出して周辺の細胞に作用し、炎症反応を調節する[27]。炎症におけるメディエーターとして、プロスタグランジンやロイコトリエ

ンなどのアラキドン酸代謝物、サイトカイン、活性酸素種、NO (nitric oxide : 一酸化窒素)、ヒスタミンやセロトニンなどの作動性アミン、血小板活性化因子などが挙げられる。炎症部位において、活性化されたマクロファージが産生する TNF- α や IL-1 β (interleukin-1 β) などの炎症性サイトカインは、自身を含む白血球に作用してサイトカインの分泌を促進すること、繊維芽細胞に作用してプロスタグランジンの産生を促すこと、内皮細胞に作用して白血球の集積やサイトカインの分泌を促進することなど、周辺の様々な細胞に作用し、炎症反応を促進する (図 1-4)。よって、炎症メディエーターの産生を制御することは、慢性炎症に起因する慢性疾患を予防または治療するための有望な標的の 1 つであると考えられている [28]。

炎症部位では、TNF- α などの炎症性サイトカインが増加し、内皮細胞の表面上に存在する細胞接着分子の発現を誘導する [29]。細胞接着分子には、VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1)、ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1)、E-selectin などがあり、単球が内皮細胞に接着するのに寄与する。アテローム性動脈硬化症 [30]、炎症性腸疾患 [31]、リウマチ [32]、および肝炎 [33] など、血中の白血球が炎症部位に集積することは、様々な炎症性疾患の進行において重要なステップであると考えられている (図 1-5)。よって、単球細胞の接着を制御することは、炎症性疾患を予防または治療するための有望な標的の 1 つであると考えられている [34]。

転写因子である NF- κ B (nuclear factor κ B) は、TNF- α のような炎症性サイトカインや LPS のような感染菌の構成成分などによって活性化され、その標的遺伝子の発現を調節する [35] (図 1-6)。NF- κ B は、I κ B (nuclear factor κ B inhibitor) と複合体を形成し、不活性形態として細胞質に局在する。細胞が TNF- α などのメディエーターで刺激されると、I κ B は、IKK (I κ B kinase) によってリン酸化された後、ユビキチン化され、分解される。次に NF- κ B は核に移行し、細胞接着分子、MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1)、サイトカインなどの標的遺伝子の転写を調節する [36, 37]。VCAM-1 [38]、ICAM-1 [39]、および E-selectin [40] の遺伝子のプロモーター領域には NF- κ B の結合部位が存在し、その標的遺伝子であることが報告されている。

1-4. 炎症と気分障害

近年、疲労やうつなどの気分障害は、CNS (central nervous system : 中枢神経系) や全身に

おける炎症と密接に関連していることが報告されている[41]。運動中または運動後の疲労症状は、血中の炎症性サイトカインの増加に起因し、CNS における炎症反応の結果である可能性があると考えられている[42]。また、実験的な急性心理的ストレス[43]や慢性ストレス[44]は、血中の炎症性サイトカインを増加させる。さらに、エンドトキシンの投与によって誘導される疲労症状は、脳のマクロファージの活性化および血中の炎症性サイトカインの増加によって特徴付けられる脳の炎症と関連することが報告されている[45]。慢性疲労症候群や筋萎縮性脳脊髄炎の患者においては、神経炎症が脳領域全体に広がっており、この炎症状態は、神経心理学的症状の重篤程度と関連することが報告されている[46]。抗炎症薬の一種である cyclooxygenase-2 の阻害剤は、多発性硬化症の患者の疲労症状を軽減すること[47]や、大うつ病に関連する症状を改善すること[48]が報告されており、CNS または全身における炎症を抑制することが、抗うつ薬の新しいアプローチとして提唱されている[49]。

1-5. 本研究の目的

本研究の目的は、ウコン利用の一形態であるウコン熱水エキスの抗炎症作用について検証することであり、以下の3部から構成される。第1部では、内皮細胞を使用した *in vitro* 試験を行い、TNF- α が誘導する細胞接着分子の発現と単球の接着に及ぼすウコン熱水エキスの作用について検証し、その作用に関与する細胞内シグナル伝達経路について予備的な研究を行った。第2部では、マクロファージ細胞株を使用した *in vitro* 試験を行い、LPS が誘導するマクロファージ細胞の NO 産生に及ぼすウコン熱水エキスの作用について検証し、さらにウコン熱水エキスに含有される成分を単離同定して、各成分の作用を検証した。第3部では、ウコン熱水エキスがその抗炎症作用をもとに気分状態の改善作用を発揮することが期待されたので、健常者を対象とした臨床試験を行い、健常者の気分状態に及ぼすウコン熱水エキスの作用について検証した。



(A)



(B)

図 1-1. ウコン植物体 : (A) 地上部 (B) 根茎

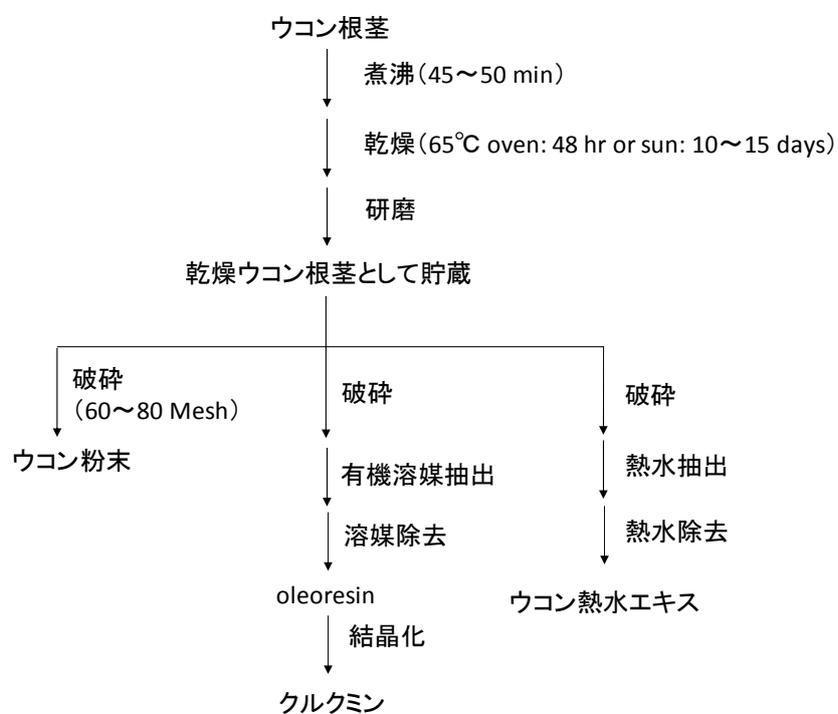
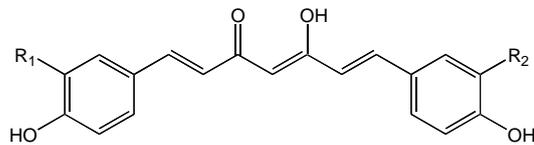


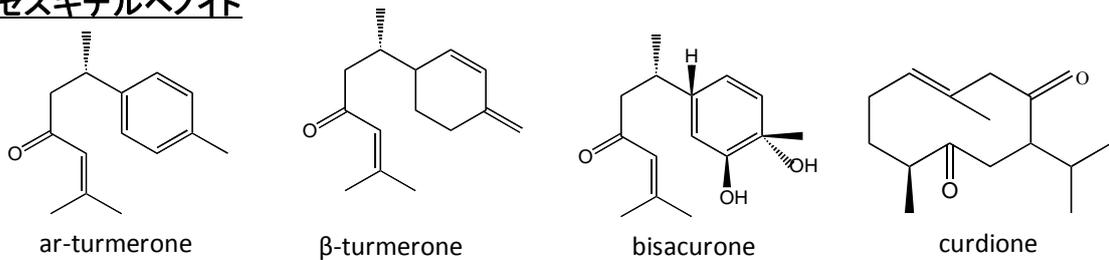
図 1-2. ウコン粉末、クルクミン、およびウコン熱水エキスの製造方法の一例

ジアリルヘプタノイド



Curcumin $R_1=OCH_3; R_2=OCH_3$
 Demethoxycurcumin $R_1=OCH_3; R_2=Hc$
 Bis-demethoxycurcumin $R_1=H; R_2=H$

セスキテルペノイド



モノテルペノイド

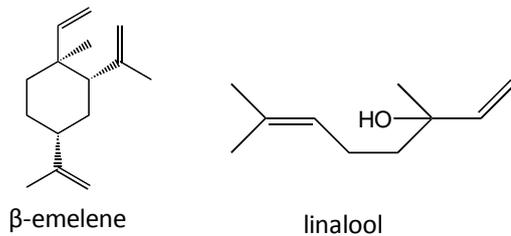


図 1-3. ウコンに含まれる成分の一例

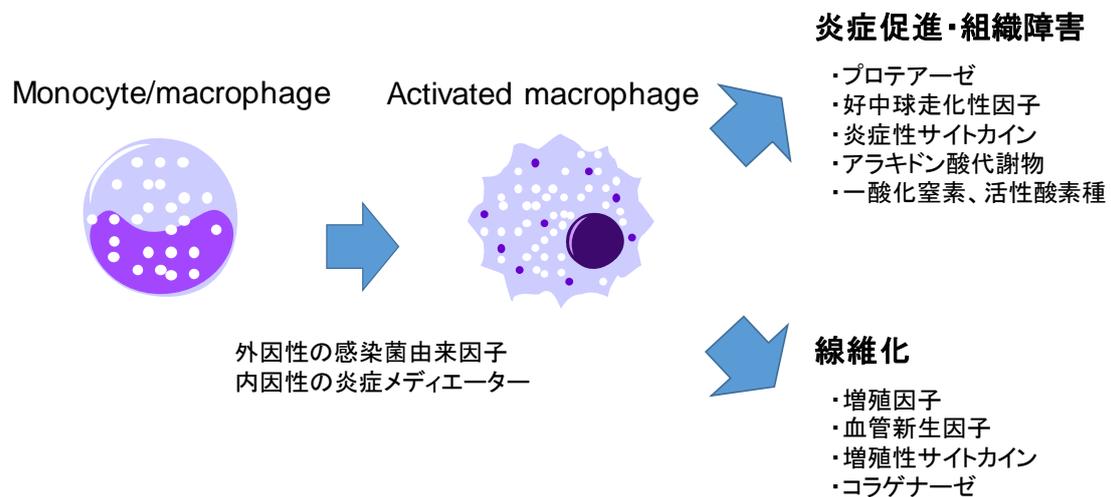


図 1-4. マクロファージの活性化と炎症反応の促進

マクロファージは、リポ多糖など外因性の感染菌由来因子や、炎症性サイトカインなど内因性の炎症メディエーターによって活性化され、炎症反応を促進する。

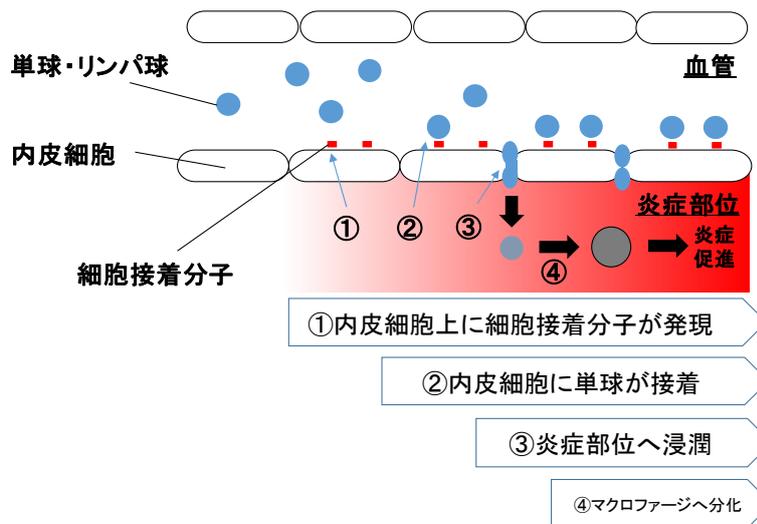


図 1-5. 炎症部位への単球の集積と炎症反応の促進

炎症部位において、内皮細胞表面上の細胞接着分子の発現が誘導される。血中の単球は、細胞接着分子を認識し、内皮細胞に接着した後、内皮細胞間から炎症部位へ浸潤する。浸潤した単球は炎症部位においてマクロファージに分化し、活性化されて炎症反応を促進する。

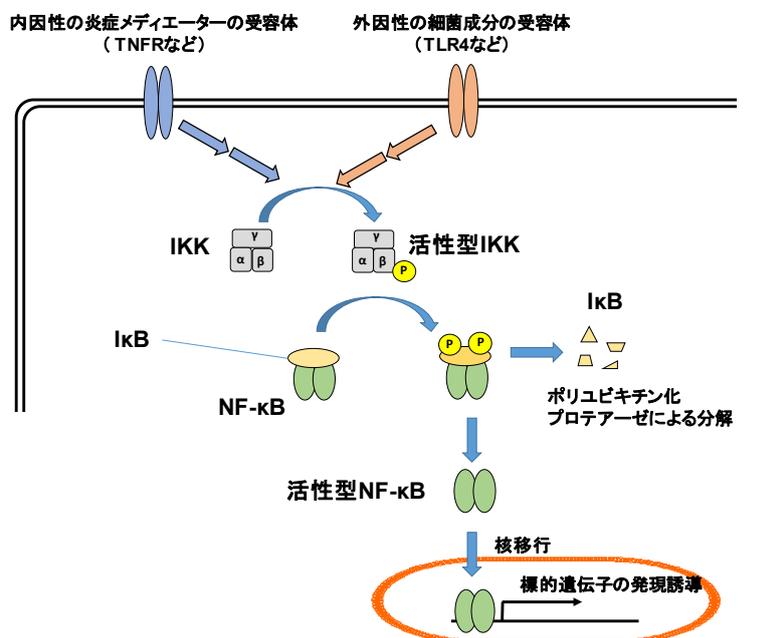


図 1-6. NF-κB による標的遺伝子の発現調節機構

NF-κB (nuclear factor κB) は、IκB (nuclear factor κB inhibitor) と複合体を形成し、不活性形態として細胞質に局在する。細胞が刺激されると、IκB は IKK (IκB kinase) によってリン酸化された後、ユビキチン化され、分解される。次に NF-κB は核に移行し、細胞接着分子やサイトカインなどの標的遺伝子の転写を調節する。

2. 内皮細胞の細胞接着分子の発現と単球の接着特性に対するウコン熱水エキスの影響

2-1. 概要

血中の単球細胞が炎症部位に集積することは、様々な炎症性疾患の進行において重要なステップの1つであるため、単球細胞の集積を抑制することは、炎症性疾患を予防または治療するための有望な標的の1つであると考えられている。血管内皮細胞上に存在する細胞接着分子は、TNF- α (tumor necrosis factor- α) などの前炎症性サイトカインによって誘導され、単球の集積に寄与する。本研究では、ヒト臍帯静脈由来の血管内皮細胞である HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) を使用した細胞試験によって、TNF- α が誘導する単球の接着と細胞接着分子のタンパク発現に及ぼすウコン熱水エキスの作用を検証した。HUVEC をウコン熱水エキスで処理すると、TNF- α が誘導する細胞接着分子のタンパク発現と単球の接着が有意に抑制された。またウコン熱水エキスは、TNF- α が誘導する I κ B α (nuclear factor κ B inhibitor) のリン酸化と分解を抑制したため、ウコン熱水エキスが NF- κ B (nuclear factor κ B) のシグナル伝達経路を阻害することが示唆された。

2-2. 方法

2-2-1. 実験材料

F-12K (Nutrient mixture F-12 Ham Kaighn's Modification) 培地、ECGS (endothelial cell growth supplement)、ペニシリン、ストレプトマイシン、トリプシン、ヘパリンナトリウム塩、および BSA (bovine serum albumin : ウシ血清アルブミン) は、Sigma-Aldrich (MO, USA) から購入した。グルタルアルデヒド、TNF- α および Immunostar® LD system は、和光純薬工業 (大阪、日本) から購入した。EDTA-2Na とカルセイン-AM は、同仁化学研究所 (熊本、日本) から購入した。FBS (fetal bovine serum : ウシ胎児血清) は、HyClone (UT, USA) から購入した。RPMI1640 培地は、Life Technologies (MD, USA) から購入した。ELISA 用の抗 VCAM-1 抗体は、Beckman Coulter (FL, USA) から購入した。ウエスタンブロッティング用の抗 VCAM-1 抗体、抗リン酸化 I κ B α 抗体、抗 I κ B α 抗体、抗 GAPDH 抗体および抗ウサギ IgG-HRP 抗体は、Cell Signaling Technology (MA, USA) から購入した。抗 ICAM-1 抗体と抗 E-selectin 抗体は、Proteintech Group (IL, USA) から購入した。抗マウス IgG-HRP 抗体は、Santa Cruz (TX, USA) から購入した。Hybond-P membrane は、GE Healthcare (WI, USA) から購入した。

2-2-2. ウコン熱水エキスの作製

ウコン (*C. longa*) の根茎を熱水 (>95°C) に浸漬して抽出した後、上清を減圧下で加熱濃縮し、噴霧乾燥して粉末状のウコン熱水エキスを得た。ウコン熱水エキスには、3.02 g/kg の bisacurone と 1.25 g/kg のクルクミンが含有されることを確認した。F-12K 培地 (2%FBS) にウコン熱水エキスを溶解して実験に使用した。

2-2-3. 細胞の培養

ヒト臍帯静脈由来の内皮細胞である HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) は、倉敷紡績 (大阪、日本) から入手した。入手した細胞を 10% FBS、30 μ g/mL ECGS、10 U/mL ヘパリンナトリウム塩、100 U/mL ペニシリンおよび 100 μ g/mL ストレプトマイシンを含有する F-12K 培地に細胞を懸濁し、コラーゲンをコートした 100mm ディッシュに播種した後、5% CO₂、37°C で細胞を培養した。細胞を 80% コンフルエントになるまで増殖させた

後、0.25% トリプシン、0.05% EDTA-2Na および 0.85% NaCl で細胞を剥離し、1 : 5 の分割比で継代した。全ての試験において、3~8 回継代した細胞を使用した。ヒト単球 THP-1 細胞は、JCRB 細胞バンク（東京、日本）から入手し、上記と同様の方法で 10% FBS と抗生物質を含有する RPMI1640 培地で培養した。

2-2-4. ウコン熱水エキスと TNF- α の処理

1 ウェル当たり 4×10^4 個の HUVEC をコラーゲンコートした 96 穴プレートに播種（Cell ELISA および細胞接着アッセイ用）、または 1 ウェル当たり 3×10^5 個の HUVEC をコラーゲンコートした 24 穴プレートに播種（ウエスタンプロットティング用）した後、5% CO₂、37°C で 24 時間培養した。次に、ウコン熱水エキスを含む F-12K 培地（2% FBS と抗生物質を含有）に培地を交換し、5% CO₂、37°C で 18 時間静置した。次に、各ウェルに TNF- α （100 ng/mL）を添加し、5% CO₂、37°C で 4.5 時間静置した。

2-2-5. 細胞毒性の評価

ウコン熱水エキスの細胞毒性を WST-1 法で評価した。ウコン熱水エキス C と TNF- α の処理を行った後、10 mM の WST-1 と 0.4 mM の 1-メトキシ PMS を含む水溶液を培地に添加し、37°C で 1 時間静置した後、マイクロプレートリーダー Infinite M200（Tecan（Grödig、Austria））を用いて 450 nm の吸光度を測定した。

2-2-6. Cell ELISA

Cell ELISA 法を使用して、細胞の表面に発現した VCAM-1、ICAM-1、または E-selectin のタンパク量を測定した。ウコン熱水エキスと TNF- α の処理を行った細胞を PBS で洗浄した後、1.0% グルタルアルデヒドを添加し、15 分間静置して固定処理を行った。Milli-Q 水で洗浄した後、2% BSA を含む PBS を添加し、4°C で一晩静置してブロッキング処理を行った。Milli-Q 水で洗浄した後、抗 VCAM-1 抗体、抗 ICAM-1 抗体または抗 E-selectin 抗体を添加し、室温で 2 時間静置した。Milli-Q 水で洗浄した後、抗 IgG-HRP 抗体を添加し、室温で 1 時間静置した。Milli-Q 水で 5 回洗浄した後、*o*-フェニレンジアミン塩酸塩を添加し、一定時間後、マイクロプレートリーダーを用いて 492 nm の吸光度を測定した。

2-2-7. ウェスタンブロット

細胞溶解物の調製およびウェスタンブロットは、以前に発表された方法で行った[50]。細胞溶解物(タンパク質として 5 μ g)を 10%SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。Hybond-P membrane にブロットした後、VCAM-1、ICAM-1、E-selectin、リン酸化 I κ B α 、I κ B α 、または GAPDH のいずれかに対する抗体と結合させた。次に抗 IgG-HRP 抗体と結合させた後、化学発光検出システム (Immunostar® LD system) を用いて発色させた。

2-2-8. 細胞接着アッセイ

以下に記載した方法で、HUVEC に接着した単球 THP-1 細胞の相対数を測定した。1.5 μ g/mL カルセイン-AM 溶液を THP-1 の沈殿に添加して細胞を懸濁した後、37°C で 30 分間静置して THP-1 をカルセイン-AM で標識した。次に、THP-1 を PBS で 2 回洗浄した後、F-12K 培地 (2%FBS と抗生物質を含有) に懸濁した。THP-1 の懸濁液を 1 ウェル当たり 1×10^5 個で、HUVEC が存在する 96 穴プレートに加えた。次に、プレートを 37°C で 30 分間静置して THP-1 を HUVEC に接着させた後、F-12K 培地 (2%FBS と抗生物質を含有) で 3 回洗浄し、マイクロプレートリーダーで蛍光強度 (490 nm 励起および 530 nm 発光) を測定した。

2-2-9. 統計解析

One-way ANOVA を使用して全群のデータを解析した後、Tukey-Kramer の多重比較検定を使用して各群の有意差を検定した。有意水準は $P < 0.05$ に設定し、平均値と標準偏差としてデータを示した。

2-3. 結果

2-3-1. 細胞生存率に対するウコン熱水エキスの影響

WST-1 アッセイを用いてウコン熱水エキスの細胞毒性を評価した (図 2-1)。TNF- α 処理の有無にかかわらず、100-800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のウコン熱水エキス処理によって HUVEC の細胞生存率は、有意に変化しなかった。100-800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度域において、ウコン熱水エキスの細胞毒性は発揮されないことが確認された。

2-3-2. 細胞接着分子に対するウコン熱水エキスの影響

TNF- α が誘導する細胞接着分子のタンパク発現に対するウコン熱水エキスの影響を評価した。HUVEC を 100-800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のウコン熱水エキスで 18 時間前処理し、次に TNF- α を添加し、4.5 時間処理した。その後、Cell ELISA 法を用いて、細胞接着分子 (VCAM-1、ICAM-1、E-selectin) の細胞表面のタンパク発現を評価した。ウコン熱水エキスの処理は、TNF- α が誘導する VCAM-1 のタンパク発現を濃度依存的に抑制した。400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のウコン熱水エキス処理でほぼ完全に抑制し、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のウコン熱水エキス処理で完全に抑制した (図 2-2 A)。またウコン熱水エキスの処理は、TNF- α が誘導する ICAM-1 と E-selectin のタンパク発現も濃度依存的に抑制した。400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のウコン熱水エキス処理で部分的に抑制し、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のウコン熱水エキス処理で完全に抑制した (図 2-2 B, C)。ウェスタンブロットを用いて評価した細胞接着分子の全タンパク発現に対する影響においても、細胞表面のタンパク発現の結果と相関する結果が得られた (図 2-3)。

2-3-3. 単球の接着に対するウコン熱水エキスの影響

内皮細胞の表面における細胞接着分子の発現増加は、単球の接着を促進することが知られている [29]。TNF- α が誘導する単球の接着に対するウコン熱水エキスの影響を評価した。ヒト単球 THP-1 細胞を蛍光色素で標識し、HUVEC に接着した細胞の相対数を蛍光強度で評価した。HUVEC を TNF- α で処理した場合、HUVEC に接着する単球 THP-1 細胞の細胞数が顕著に増加した。800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のウコン熱水エキス処理は、TNF- α が誘導する単球 THP-1 細胞の接着を有意に減少させた (図 2-4)。

2-3-4. I κ B のリン酸化と分解に対するウコン熱水エキスの影響

TNF- α は NF- κ B シグナル伝達経路を介し細胞接着分子の発現を誘導することが知られている[35]。TNF- α は I κ B のリン酸化と分解を誘導する。I κ B のリン酸化と分解は NF- κ B の核移行を誘導し、核移行した NF κ B は細胞接着因子を含む標的遺伝子の発現を誘導することが知られている[36,37]。抗リン酸化 I κ B と抗 I κ B α 抗体を用いたウェスタンブロットを使用して、TNF- α が誘導する I κ B のリン酸化と分解に対するウコン熱水エキスの影響を評価した。HUVEC を TNF- α で処理すると、I κ B のリン酸化および分解が誘導された。これらの誘導は、100-800 μ g/mL のウコン熱水エキス処理によって濃度依存的に抑制された (図 2-5)。この結果は、ウコン熱水エキス処理によって TNF- α が誘導する NF- κ B シグナル伝達経路の活性化が抑制されたことを示唆した。

2-4. 考察

この研究では、ウコン熱水エキスが TNF- α によって誘導される内皮細胞の細胞接着分子のタンパク発現並びに単球細胞の内皮細胞への接着を抑制することを示した。

ウコン熱水エキスは、TNF- α が誘導する細胞接着分子のタンパク発現を濃度依存的に抑制したが、VCAM-1 に対する抑制様式と ICAM-1 または E-selectin に対する抑制様式の間に、異なる点が認められた。400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の処理濃度では、ウコン熱水エキスは VCAM-1 タンパク発現をほぼ完全に抑制したが、ICAM-1 および E-selectin のタンパク発現を部分的にしか抑制しなかった。一方、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の処理濃度では、ウコン熱水エキスは VCAM-1、ICAM-1 および E-selectin のタンパク発現を完全に抑制した。単球の接着を抑制するために必要なウコン熱水エキスの処理濃度が 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった結果を踏まえると、VCAM-1 だけでなく ICAM-1 および E-selectin もまた、単球の接着に重要な役割を果たしているものであると考えられる。

VCAM-1 の発現調節には酸化ストレスが関連していると考えられており[51]、抗酸化物質は NF- κB シグナル伝達経路の抑制を介し、サイトカインが誘導する内皮細胞の VCAM-1 発現を抑制することが報告されている[52, 53]。本研究において、ウコン熱水エキスは I κB のリン酸化と分解の抑制を介し VCAM-1 の発現を抑制することが示唆され、抗酸化剤における報告結果と同様の結果が得られた。さらに、抗酸化剤は TNF- α またはサイトカインが誘導する VCAM-1 の発現を選択的に抑制し、ICAM-1 または E-selectin の発現は抑制しないことが報告されている[25, 52-54]。本研究において、ウコン熱水エキスは ICAM-1 または E-selectin よりも VCAM-1 の発現をより効率的に抑制し、抗酸化剤の報告結果と同様の傾向を示した。さらに、ウコンの水抽出物は、ピロガロールが誘導する PC12 細胞内の活性酸素の産生を抑制することが示されている[4]。まとめると、ウコン熱水エキスは抗酸化メカニズムを介し VCAM-1 のタンパク発現を抑制している可能性が考えられる。今後、TNF- α で処理した HUVEC において、ウコン熱水エキスの抗酸化作用を検証する必要があると考えられる。

本研究において、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のウコン熱水エキス処理では、I κB のリン酸化と分解が明確に抑制され、細胞表面の VCAM-1 発現もほぼ完全に抑制された。I κB のリン酸化と分解は、NF- κB の核移行を促進し、核に移行した NF- κB は、細胞接着分子の遺伝子発現を誘導する

ことが知られている[36, 37]ことから、ウコン熱水エキスは NF- κ B の活性化を抑制することによって、VCAM-1 の発現を抑制することが示唆された。

一方で、400 μ g/mL のウコン熱水エキス処理では、IkB のリン酸化と分解が明確に抑制されたにも関わらず、細胞表面の ICAM-1 と E-selectin の発現は部分的にしか抑制されなかった。細胞接着分子は、NF- κ B 以外の転写因子によってもその遺伝子発現が調節されている。例えば、VCAM-1 の調節に AP-1 (activating protein 1)、SP-1 (specificity protein 1)、GATA、および IRF (IFN regulatory factor) が関与し、ICAM-1 の調節に AP-1 や SP-1 が関与し、E-selectin の調節に AP-1 や CRE/ATF が関与することが報告されている[35, 38-40, 55-57]。また近年、マイクロ RNA が標的遺伝子の発現を調節することが報告されている[58]。例えば、VCAM-1 の調節にはマイクロ RNA の一種である miR-126 が関与[59]し、ICAM-1 の調節には miR-17-3-p が関与し、E-selectin の調節には miR-31 が関与する[60]ことが報告されている。高濃度のウコン熱水エキス (800 μ g/mL) は、ICAM と E-selectin の遺伝子発現を調節する NF- κ B 以外の転写因子やマイクロ RNA などにも影響を及ぼすことによって、細胞表面に発現した ICAM-1 と E-selectin を抑制している可能性が考えられた。

現在までに、主にフェノール化合物およびテルペノイドなど、少なくとも 235 種の化合物がウコンから単離・同定されている[20]。このうちの化合物の 1 つである bisacurone は、10 ~ 50 μ M の濃度域において、TNF- α が誘導する内皮細胞の VCAM-1 発現を抑制することが報告されている[25]。本研究で使用されたウコン熱水エキスは、3.02 g/kg の bisacurone を含有する。本研究におけるウコン熱水エキスの最も有効な濃度 800 μ g/mL においては、bisacurone として約 10 μ M の濃度と算出される。既報では 10 μ M の bisacurone 単独で活性が認められた。したがって、ウコン熱水エキスの VCAM-1 抑制作用に、bisacurone は少なくとも部分的に寄与するものであると考えられる。一方で、ウコンの代表的な化合物であるクルクミンは、20 μ M の濃度において、TNF- α が誘導する内皮細胞の VCAM-1 発現を抑制するが、10 μ M の濃度では抑制しないことが報告されている[61]。本研究で使用されたウコン熱水エキスは、1.25 g/kg のクルクミンを含有する。本研究におけるウコン熱水エキスの最も有効な濃度 800 μ g/mL においては、クルクミンとして約 4 μ M の濃度と算出される。既報では 10 μ M のクルクミン単独で活性が認められなかった。したがって、ウコン熱水エキスの VCAM-1 抑制作用に、クルクミンがどの程度寄与しているかは不明である。

2-5. 結論

本研究の結果は、ウコンの熱水エキスは、TNF- α が誘導する細胞接着分子の発現を抑制することによって、単球の内皮細胞への接着を抑制することを示した。本研究の結果は、様々な炎症性疾患の予防や治療にウコンの熱水エキスを応用できる可能性があることを示唆するものであると考えられる。

2-6. 図表

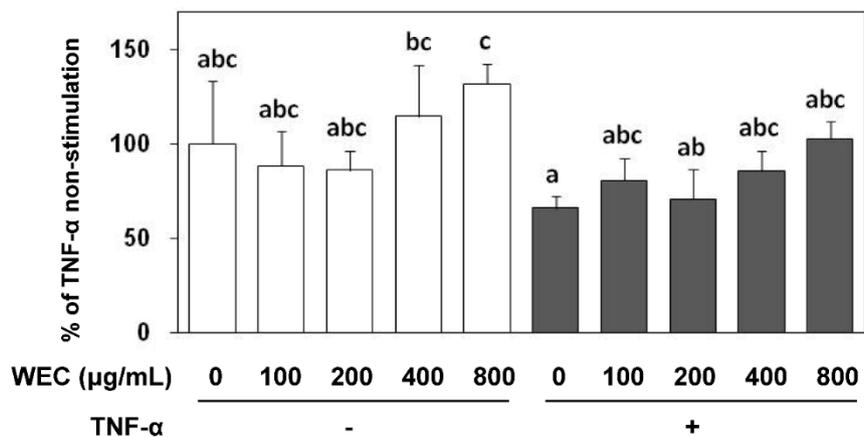


図 2-1. 細胞生存率に対するウコン熱水エキス (WEC) の影響

HUVEC をウコン熱水エキス (WEC) で 18 時間前処理し、続いて 100 ng/mL の TNF- α を添加して 4.5 時間共処理した後、WST-1 法で HUVEC の細胞生存率を測定した。ウコン熱水エキス (WEC) と TNF- α が未処理の時の細胞生存率を 100 とし、それに対する相対値として各データを示した。各データは 3 ウェルの測定値の平均値と標準偏差で示した。また、共通した記号のないデータ間には、Tukey-Kramer の多重比較検定で有意差が認められたことを示す。

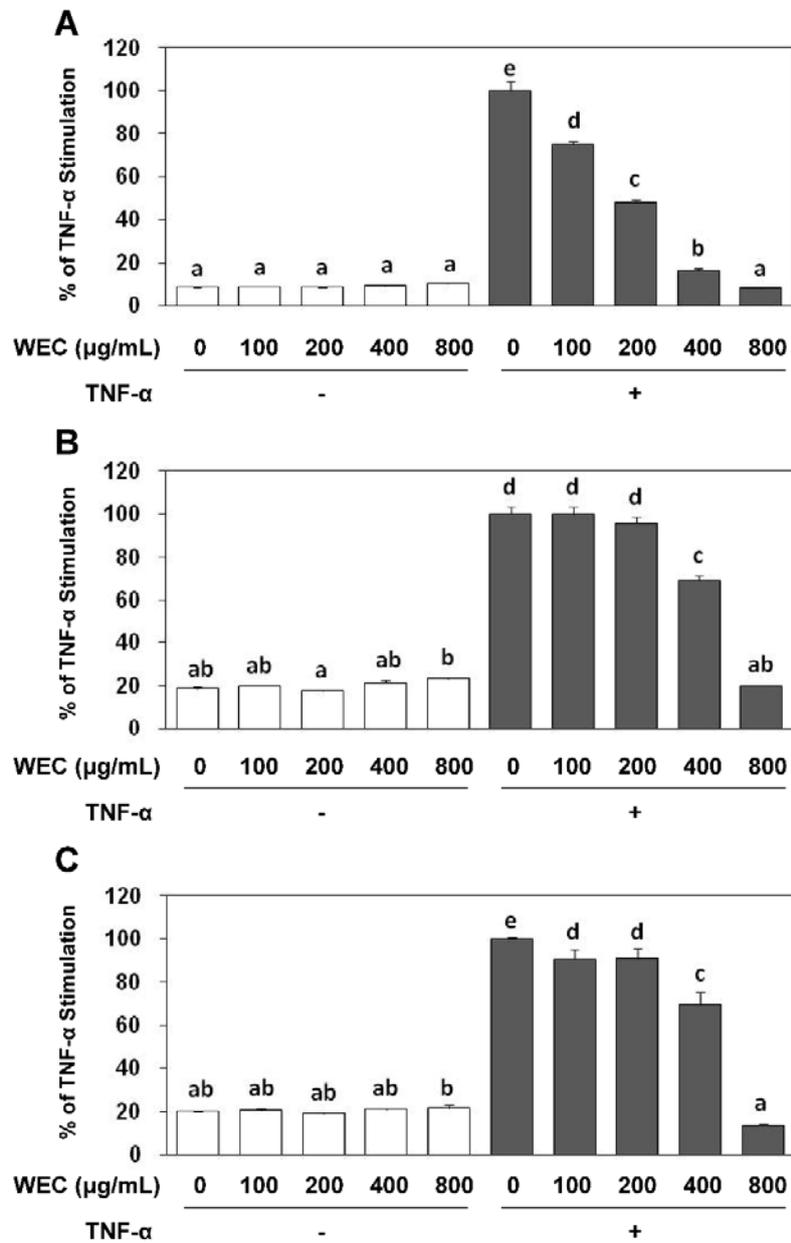


図 2-2. TNF- α が誘導する VCAM-1 (A)、ICAM-1 (B)、および E-selectin (C) の細胞表面のタンパク発現に対するウコン熱水エキス (WEC) の影響

HUVEC をウコン熱水エキス (WEC) で 18 時間前処理し、続いて 100 ng/mL の TNF- α で 4.5 時間共処理した後、Cell ELISA 法で細胞接着分子の細胞表面のタンパク発現を測定した。ウコン熱水エキス (WEC) と TNF- α が未処理の時の測定値を 100 とし、それに対する相対値として各データを示した。各データは 3 ウェルの測定値の平均値と標準偏差で示した。また、共通した記号のないデータ間には、Tukey-Kramer の多重比較検定で有意差が認められたことを示す。

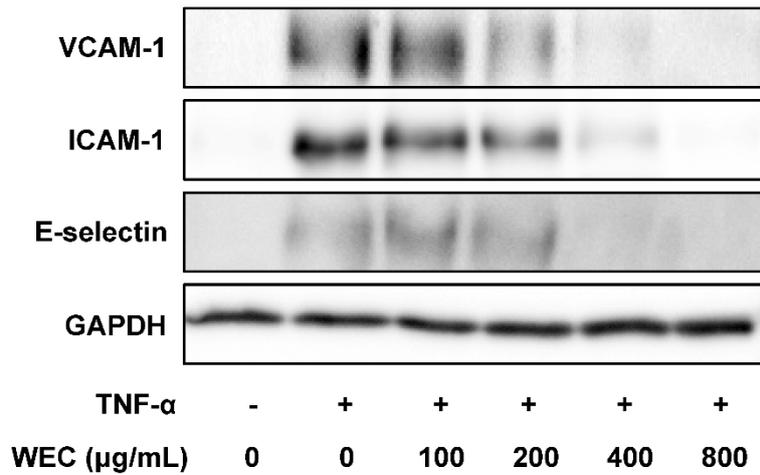


図 2-3. TNF- α が誘導する VCAM-1、ICAM-1、および E-selectin の全タンパク発現に対するウコン熱水エキス (WEC) の影響

HUVEC をウコン熱水エキス (WEC) で 18 時間前処理し、続いて 100 ng/mL の TNF- α で 4.5 時間共処理した後、ウェスタンブロット法で細胞接着分子の全タンパク発現を測定した。試験を 2 回行い、結果の妥当性を確認した。

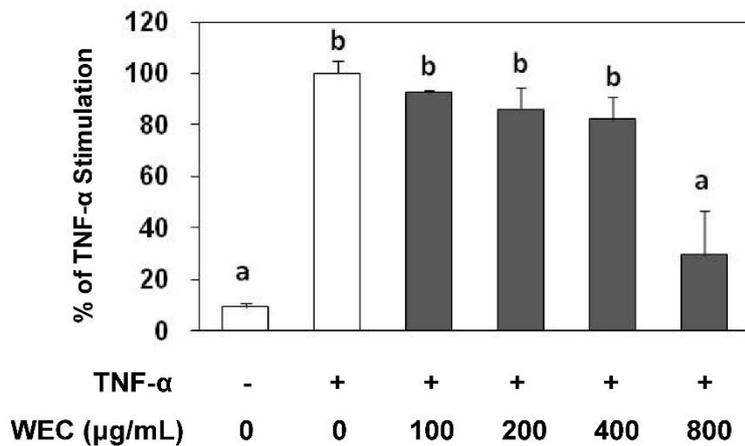


図 2-4. TNF- α が誘導する単球の接着に対するウコン熱水エキス (WEC) の影響

HUVEC をウコン熱水エキス (WEC) で 18 時間前処理し、続いて 100 ng/mL の TNF- α で 4.5 時間共処理した後、HUVEC に蛍光標識したヒト単球 THP-1 細胞を添加して 30 分間静置した後、Method に記載の方法で HUVEC に接着した単球 THP-1 細胞の相対数を測定した。TNF- α で処理しウコン熱水エキス (WEC) で未処理の時の測定値を 100 とし、それに対する相対値として各データを示した。各データは 3 ウェルの測定値の平均値と標準偏差で示した。また、共通した記号のないデータ間には、Tukey-Kramer の多重比較検定で有意差が認められたことを示す。

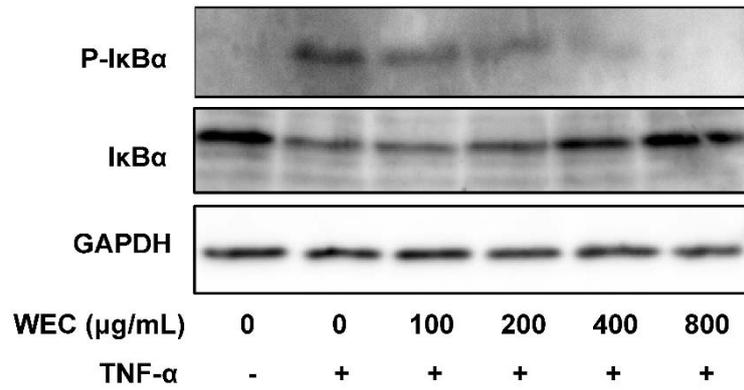


図 2-5. TNF- α が誘導する I κ B のリン酸化と分解に対するウコン熱水エキス (WEC) の影響
 HUVEC をウコン熱水エキス (WEC) で 18 時間前処理し、続いて 100 ng/mL の TNF- α で 4.5 時間共処理した後、抗リン酸化 I κ B 抗体と抗 I κ B 抗体を用いたウェスタンブロット法で、リン酸化した I κ B と I κ B を測定した。試験を 2 回行い、結果の妥当性を確認した。

3. マクロファージの PGE2 と NO の産生に対するウコン熱水エキスおよびその含有成分の影響

3-1. 概要

ウコン熱水エキスには抗炎症作用があり、当該作用を基にした様々な生理作用があることが報告されている。ウコンにはクルクミンを始め様々な抗炎症活性成分が含まれていることが報告されているが、その全容は明らかでなく、なお探索の余地がある。本研究では、ウコン熱水エキスの抗炎症作用に寄与する化合物を探索することを目的として、ウコン熱水エキスを分画し、LPS (lipopolysaccharide) が誘導するマクロファージ細胞株 RAW264.7 の NO (nitric oxide : 一酸化窒素) の産生を抑制する作用を指標として、各画分の抗炎症作用を評価した。活性画分から 8 つの成分を単離し、1 つの新規成分 : (6*S*)-2-methyl-6-(4-hydroxymethyl-phenyl)-2-heptene-4-one (**2**) を同定し、4 つの既知成分 : (6*S*)-2-methyl-6-(4-hydroxyphenyl)-2-heptene-4-one (**4**)、bisabolone-4-one (**5**)、curcumenone (**6**)、および turmeronol A (**8**) を同定し、3 つの成分 : 2-methyl-5-hydroxy-6-(3-hydroxy-4-methylphenyl)-2-heptene-4-one (**1**)、2-methyl-6-(2,3-epoxy-4-methyl-4-cyclohexene)-2-heptene (**3**)、および 4-methylene-5-hydroxybisabola-2,10-diene-9-one (**7**) の平面構造を決定した。**1, 4, 7, 8** には濃度依存的な PGE2 (prostaglandin E2) と NO の産生抑制作用が認められ、それ以外には濃度依存的な NO の産生抑制作用が認められた。ウコン熱水エキスの抗炎症作用は、単体では微弱ながら多数存在する活性成分が集積・相互作用した結果表出すると考えられた。本報告は、ウコン熱水エキスの抗炎症作用に寄与する活性成分を部分的に明らかにし、その全容を解明するための一助になると考えられた。

3-2. 方法

3-2-1. 分画

ウコン熱水エキスは、高砂香料株式会社（東京、日本）から商用加工食品用原料を入手して使用した。ウコン熱水エキスは、破碎したウコン根茎を熱水で抽出し、残渣を除去した抽出液に 1/2 量の賦形剤（デキストリン）を添加した後、スプレードライで水を蒸発させて粉末化して作製した。

ウコン熱水エキスの粗分画方法の概要を図 3-1 に示した。ウコン熱水エキス 2 kg を 90 %メタノール 20 L で常温下 2 時間、攪拌して抽出した後、抽出後の残渣を再度 90 %メタノール 5 L で常温下 2 時間、攪拌して抽出した。両抽出液を併せてろ過した後、ロータリーエバポレーターでメタノールが完全に蒸発して水になるまで濃縮した。濃縮液（1.2 L）に酢酸エチル 0.5 L を加え、分液ロートで水と酢酸エチルの二層分配を行った。これを 4 回繰り返し、酢酸エチル画分を併せてエバポレーターで濃縮乾固し、粘性のあるオイル状の酢酸エチル画分 56.44g を得た。

酢酸エチル画分の全量をメタノールに溶解した後、分取用の HPLC で分画した。カラムは、ODS-A-HG（100×240 mm、5 μ m、株式会社 YMC（京都、日本））を使用した。Fr.1～4 の移動相にはメタノール/水（50:50、v/v）を使用し、Fr.5 の移動相にはメタノールを使用した。各溶出液をエバポレーターでメタノールが蒸発するまで濃縮した後、凍結乾燥で乾固し、粘性のある固形物 Fr.1～5 を得た（Fr.1 : 11.00g、Fr.2 : 6.78g、Fr.3 : 6.82g、Fr.4 : 4.96g、Fr.5 : 14.74g）。

Fr.5 のうち 7.0g をメタノールに溶解した後、分取用の HPLC で再度分画した。カラムは、ODS-A-HG（100×225 mm、10 μ m、株式会社 YMC（京都、日本））を使用した。Fr.5-1～5-6 の移動相にはメタノール/水（60:40、v/v）を使用し、Fr.5-7 の移動相にはメタノールを使用した。各溶出液をエバポレーターでメタノールが蒸発するまで濃縮した後、凍結乾燥で乾固し、粘性のある固形物 Fr.5-1～Fr.5-7 を得た（Fr.5-1 : 0.776g、Fr.5-2 : 0.326g、Fr.5-3 : 0.434g、Fr.5-4 : 0.688g、Fr.5-5 : 0.525g、Fr.5-6 : 1.042g、Fr.5-7 : 2.136g）。

3-2-2. 精製と構造決定

Fr.5 および Fr.5-1～Fr.5-7 を、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計を付属し

た HPLC (LC/FT-ICR-MS) で分析した。分析装置は、Ultimate 3000 HPLC システムと FT-ICR-MS Velos Pro (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) を使用した。カラムは UK-C18 (5×250 mm、3 μm、インタクト株式会社 (京都、日本)) を使用した。0.1%のギ酸を含む水 (LC-MS グレード、溶媒 A) とアセトニトリル (LC-MS グレード、溶媒 B) を移動相として使用し、勾配条件は、溶媒 B として 15-65% (0-25 分)、65-95% (25-30 分)、95% (30-40 分)、95-15% (30-30.1 分)、15% (30.1-44.1 分) とした。流速は 0.5 mL/分、カラムオープン温度は 30°C とした。ESI 設定 (ポジティブモード) は、スプレー電圧 : 3.5kV、キャピラリー温度 : 300°C とした。

以下に記載する方法によって、各分画物 (Fr.5-2~Fr.5-6) から主要成分を単離し、核磁気共鳴 (NMR) 装置 ECA-500 (日本電子 (東京、日本)) と高感度旋光計 SEPA-200 (堀場製作所 (京都、日本)) を使用して単離物の化学構造を解析した。

50 mg の Fr.5-2 をリサイクル分取 HPLC (LC9110、日本分析工業 (東京、日本)) に供した。カラムは Inertsil (ODS-3、20 x 250 mm、5 μm (ジエルサイエンス (東京、日本)) を用いた。移動相は 80%メタノールを用い、流速は 5 ml/min とした。検出は 240 nm とした。カラムを 8 周させた後、最もシグナル強度が大きいピークを分取し、分取薄層クロマトグラフ (PLC Silicagel 60 F254、1 mm、Merck (NJ, USA)) に供した。展開槽の組成は、ヘキサン : 酢酸エチル (2:1、v/v) とした。UV 吸収を示す 3 つの主要なスポット (Rf=6.5 : Fr.5-2-a、Rf=5.8 : Fr.5-2-b、Rf=4.8 : Fr.5-2-c) を回収した。収量はそれぞれ、Fr.5-2-a : 4.7mg、Fr.5-2-b : 4.6 mg、Fr.5-2-c : 10.7 mg であった。

12.2 mg の Fr.5-3 をリサイクル分取 HPLC に供した。条件は Fr.5-2 と同様に行った。カラムを 10 周させた後、シグナル強度が最も大きいピーク (Fr.5-3-a) と、その直前に溶出するピーク (Fr.5-3-b) を分取した。収量はそれぞれ、Fr.5-3-a : 8.0 mg、Fr.5-3-b : 1.2 mg であった。

132.5 mg の Fr.5-4 をリサイクル分取 HPLC に供した。移動相は 65%メタノールを用い、それ以外の条件は Fr.5-2 と同様に行った。1 周目の保持時間 55 -62 min のピークを分取した。収量は 27.6 mg であった。

92.8 mg の Fr.5-5 を分取薄層クロマトグラフ (PLC Silicagel 60 F254、1 mm、Merck (NJ, USA)) 2 枚にアプライし、クロロホルム : メタノール (96:4、v/v) で展開させた。UV 吸収を示す主要スポット (Rf=0.57) を回収した。収量は 29.6 mg であった。

200.0 mg の Fr.5-6 を分取薄層クロマトグラフに供した。条件は Fr.5-5 と同様に行った。極めて薄く UV 吸収を示すスポット ($R_f=0.52$) を回収した。続いて全量をリサイクル分取 HPLC に供した。条件は Fr.5-4 と同様に行った。1 周目の保持時間 92-102 min のピークを分取した。収量は 6.8 mg だった。

3-2-3. 抗炎症作用の評価

マウス腹腔マクロファージ由来株化細胞 RAW264.7 は、理化学研究所 BRC 細胞材料開発室から入手し使用した。細胞を 1 ウェルあたり 1.5×10^5 個となるように 96 穴プレートに播種し、DMEM (10%FBS)、 37°C 、5% CO_2 下で 24 時間培養した。培養後、サンプルを含有する DMEM (FBS free) に交換し 37°C 、5% CO_2 下で 1 時間静置した後、LPS (E. Coli O127:B8、Sigma、L3129) を終濃度 20 ng/mL となるように添加し、 37°C 、5% CO_2 下で 12 時間処理した。処理後、Griess 法を使用して上清中の NO 代謝物 (亜硝酸塩) の濃度を測定し、これを細胞の NO 産生量の指標とした。また処理後、Parameter™ Prostaglandin E2 (R&D、SKGE004B) を用いた競合 ELISA 法を使用し、添付のプロトコールに従って、上清中の PGE2 (prostaglandin E2) を測定した。

3-3. 結果

3-3-1. 粗分画物の評価

ウコン熱水エキス、90%メタノール抽出物、酢酸エチル画分および水画分の NO 産生抑制作用を評価した (図 3-2)。ウコン熱水エキスは、75-600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において濃度依存的に LPS で誘導された NO の産生を抑制した。ウコン熱水エキスの 90%メタノール抽出物は、12.5-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において濃度依存的に LPS で誘導された NO の産生を抑制したことから、90%メタノール抽出によって活性成分がほぼ回収されたことが示唆された。また、90%メタノール抽出物を二層分配した酢酸エチル画分は、6.25-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において濃度依存的に LPS で誘導された NO の産生を抑制し、一方で水画分は LPS で誘導された NO の産生を抑制しなかったことから、活性成分はほぼ酢酸エチル画分に回収されたことが示唆された。

3-3-2. HPLC 分画物の評価

酢酸エチル画分を HPLC 分画した Fr.1~Fr.5 の NO 産生抑制作用を評価した (図 3-3)。全ての画分は、3.1-25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において濃度依存的に LPS で誘導された NO の産生を抑制した。Fr.5 で最も高い比活性がみとめられ、また Fr.5 の比活性は HPLC 分画する前の酢酸エチル画分の比活性よりも高かった。さらに、Fr.5 の収量は、Fr.1~5 の収量の中で最も高かった。よって活性成分は Fr.5 に最も多く含まれると判断し、Fr.5 を再度 HPLC 分画に供して Fr.5-1~Fr.5-7 に分画した。Fr.5-1~Fr.5-7 の NO 産生抑制作用を評価した (図 3-4)。全ての画分は、3.1-25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において濃度依存的に LPS で誘導された NO の産生を抑制し、Fr.5 の中に多数の活性成分が散在することが示唆された。

3-3-3. 精製と構造決定

Fr.5 および Fr.5-1~Fr.5-7 を LC/FT-ICR-MS で分析した。(図 3-5)。Methods に示す方法により、Fr.5-2 にあるピーク D から 3 種の化合物 Fr.5-2-a、Fr.5-2-b、Fr.5-2-c を単離し、Fr.5-3 にあるピーク B から化合物 Fr.5-3-a を単離し、Fr.5-3 にあるピーク B' から化合物 Fr.5-3-b を単離し、Fr.5-4 にあるピーク A から化合物 Fr.5-4 を単離し、Fr.5-5 にあるピーク C から化合物 Fr.5-5 を単離し、Fr.5-6 にあるピーク X から化合物 Fr.5-6 を単離した。Fr.5-6 にあるピーク curcumin は、市販試薬と比較した結果、クルクミノイド類と推測された。単離した各化

化合物について、Method に示す方法により、比旋光度、NMR、LC/FT-ICR-MS を用いて化学構造を解析した。

Fr.5-2-a の分析結果を以下に示す。分析の結果、Fr.5-2-a は既知化合物の(6*S*)-2-methyl-6-(4-hydroxyphenyl)-2-heptene-4-one (図 3-6. 4) [62] と同定した。比旋光度 $[\alpha]_D^{23} + 40.4$ (CH₃OH)、¹H NMR (500 MHz, METHANOL-*d*₃) δ ppm 1.20 (d, *J*=7.45 Hz, 3 H) 1.86 (d, *J*=1.15 Hz, 3 H) 2.04 (d, *J*=1.15 Hz, 3 H) 2.57 - 2.72 (m, 2 H) 3.12 - 3.22 (m, 1 H) 6.12 (t, *J*=1.15 Hz, 1 H) 6.65 - 6.72 (m, 2 H) 7.02 (d, *J*=8.59 Hz, 2 H)、¹³C NMR (126 MHz, METHANOL-*d*₃) δ ppm 20.95, 22.88, 27.75, 36.93, 53.95, 116.26, 125.35, 128.88, 138.65, 156.83, 157.14, 203.02、FT-ICR-MS calculated for C₁₅H₂₁O₂, 233.1536 [M + H]⁺; found, 233.1528。

Fr.5-2-b の分析結果を以下に示す。分析の結果、2-methyl-5-hydroxy-6-(3-hydroxy-4-methylphenyl)-2-heptene-4-one (図 3-6. 1) と平面構造を決定した。比旋光度 $[\alpha]_D^{23} + 32.0$ (CH₃OH)、¹H NMR (500 MHz, METHANOL-*d*₃) δ ppm 1.17 (d, *J*=6.30 Hz, 3 H) 1.85 - 1.90 (m, 3 H) 2.07 - 2.11 (m, 3 H) 2.11 - 2.17 (m, 3 H) 2.92 - 3.00 (m, 1 H) 4.12 (d, *J*=5.73 Hz, 1 H) 6.16 (dt, *J*=2.72, 1.22 Hz, 1 H) 6.65 (dd, *J*=7.45, 1.72 Hz, 1 H) 6.68 (d, *J*=1.72 Hz, 1 H) 6.95 (d, *J*=7.45 Hz, 1 H)、¹³C NMR (126 MHz, METHANOL-*d*₃) δ ppm 15.95, 15.99, 21.27, 27.97, 44.35, 82.75, 115.38, 120.14, 122.01, 123.75, 131.62, 143.61, 156.44, 159.08, 203.23。FT-ICR-MS calculated for C₁₅H₂₁O₃, 249.1485 [M + H]⁺; found, 249.1478。

Fr.5-2-c の分析結果を以下に示す。分析の結果、新規化合物の(6*S*)-2-methyl -6-(4-hydroxymethyl-phenyl)-2-heptene-4-one (図 3-6. 2) と同定した。比旋光度 $[\alpha]_D^{23} + 38.9$ (CH₃OH)、¹H NMR (500 MHz, METHANOL-*d*₃) δ ppm 1.23 (d, *J*=6.87 Hz, 3 H) 1.87 (d, *J*=1.15 Hz, 3 H) 2.04 (d, *J*=1.15 Hz, 3 H) 2.62 - 2.77 (m, 2 H) 3.22 - 3.30 (m, 1 H) 4.55 (s, 2 H) 6.10 - 6.18 (m, 1 H) 7.20 (d, *J*=8.02 Hz, 2 H) 7.26 (d, *J*=8.02 Hz, 2 H)、¹³C NMR (126 MHz, METHANOL-*d*₃) δ ppm 20.97, 22.77, 27.78, 37.26, 53.53, 65.20, 125.25, 128.05, 128.42, 140.68, 146.97, 157.30, 202.50。FT-ICR-MS calculated for C₁₅H₂₁O₂, 233.1536 [M + H]⁺; found, 233.1534。

Fr.5-3-a の分析結果を以下に示す。分析の結果、既知化合物の bisabolone-4-one [62, 63] (図 3-6. 5) と同定した。比旋光度 $[\alpha]_D^{23} - 19.6$ (CH₃OH)、¹H NMR (500 MHz, METHANOL-*d*₃) δ ppm 0.82 (d, *J*=6.87 Hz, 3 H) 1.75 - 1.85 (m, 1 H) 1.91 (s, 3 H) 1.94 - 1.98 (m, 3 H) 1.98 - 2.03 (m, 1 H) 2.12 (s, 3 H) 2.19 (dt, *J*=12.03, 4.58 Hz, 1 H) 2.31 - 2.51 (m, 4 H) 2.69 - 2.91 (m, 1 H) 5.81 (d, *J*=1.15 Hz, 1 H) 6.19 (d, *J*=1.15 Hz, 1 H)、¹³C NMR (126 MHz, METHANOL-*d*₃) δ ppm 16.65,

21.01, 24.26, 24.32, 27.83, 29.03, 31.72, 50.00, 50.97, 125.04, 127.29, 157.46, 165.57, 202.92, 203.33。
FT-ICR-MS calculated for C₁₅H₂₃O₂, 235.1693 [M + H]⁺; found, 235.1680。

Fr.5-3-b の分析結果を以下に示す。分析の結果、既知化合物の curcumenone [64] (図 3-6. 6) と同定した。比旋光度 $[\alpha]_D^{23} + 10.0$ (CH₃OH)、¹H NMR (500 MHz, METHANOL-*d*₃) δ ppm 0.45 (qt, *J*=4.58, 2.29 Hz, 1 H) 0.73 (q, *J*=3.82 Hz, 1 H) 1.14 (s, 3 H) 1.52 - 1.68 (m, 2 H) 1.83 (s, 3 H) 2.07 (s, 3 H) 2.13 (s, 3 H) 2.52 (dd, *J*=65.30, 16.04 Hz, 2 H) 2.53 (t, *J*=7.45 Hz, 2 H) 2.85 (br. s., 2 H)、¹³C NMR (126 MHz, METHANOL-*d*₃) δ ppm 19.32, 21.23, 23.69, 23.84, 24.54, 25.59, 28.84, 30.06, 44.55, 49.88, 129.56, 149.67, 204.20, 211.96。FT-ICR-MS calculated for C₁₅H₂₃O₂, 235.1693 [M + H]⁺; found, 235.1684。

化合物 Fr.5-4 の分析結果を以下に示す。分析の結果、4-methylene-5-hydroxybisabola-2,10-diene-9-one [65, 66] (図 3-6. 7) と平面構造を決定した。比旋光度 $[\alpha]_D^{23} - 8.4$ (CH₃OH)、¹H NMR (500 MHz, METHANOL-*d*₃) δ ppm 0.89 (d, *J*=6.87 Hz, 3 H) 1.50 - 1.57 (m, 1 H) 1.79 - 1.86 (m, 1 H) 1.91 (d, *J*=1.15 Hz, 3 H) 2.12 (d, *J*=1.15 Hz, 3 H) 2.14 - 2.22 (m, 1 H) 2.25 - 2.55 (m, 2 H) 2.45 (br. s., 1 H) 4.36 (dd, *J*=5.16, 2.86 Hz, 1 H) 4.99 (d, *J*=54.99 Hz, 2 H) 5.73 (d, *J*=10.31 Hz, 1 H) 6.15 (dd, *J*=10.02, 2.58 Hz, 1 H) 6.18 - 6.21 (m, 1 H)、¹³C NMR (126 MHz, METHANOL-*d*₃) δ ppm 17.15, 21.04, 27.83, 33.35, 34.57, 37.61, 49.81, 69.75, 113.86, 125.18, 128.89, 134.23, 146.41, 157.39, 203.38。FT-ICR-MS calculated for C₁₅H₂₁O, 217.1587 [M + H - H₂O]⁺; found, 217.1577。

Fr.5-5 の分析結果を以下に示す。分析の結果、既知化合物の turmeronol A [67] (図 3-6. 8) と同定した。比旋光度 $[\alpha]_D^{23} + 40.4$ (CH₃OH)、¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 1.23 (d, *J*=6.87 Hz, 3 H) 1.87 (d, *J*=1.15 Hz, 3 H) 2.12 (d, *J*=1.15 Hz, 3 H) 2.21 (s, 3 H) 2.55 - 2.76 (m, 2 H) 3.20 - 3.30 (m, 1 H) 6.04 (dt, *J*=2.43, 1.36 Hz, 1 H) 6.67 (d, *J*=1.72 Hz, 1 H) 6.70 (dd, *J*=7.45, 1.72 Hz, 1 H) 7.03 (d, *J*=7.45 Hz, 1 H)、¹³C NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 15.37, 20.77, 21.92, 27.68, 35.31, 52.56, 113.49, 118.74, 121.46, 124.02, 130.90, 145.92, 153.88, 155.63, 200.21。FT-ICR-MS calculated for C₁₅H₂₁O₂, 233.1536 [M + H]⁺; found, 233.1528。

化合物 Fr.5-6 の分析結果を以下に示す。分析の結果、2-methyl-6-(2,3-epoxy-4-methyl-4-cyclohexene)-2-heptene (図 3-6. 3) と平面構造を決定した。比旋光度 $[\alpha]_D^{23} - 17.2$ (CH₃OH)、¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 0.83 (d, *J*=6.87 Hz, 3 H) 1.30 - 1.36 (m, 2 H) 1.41 - 1.49 (m, 1 H) 1.61 (s, 3 H) 1.62 - 1.66 (m, 1 H) 1.69 (d, *J*=1.15 Hz, 3 H) 1.73 (dt, *J*=13.89, 2.51 Hz, 1 H) 1.81 (t, *J*=1.72 Hz, 3 H) 1.95 - 2.01 (m, 1 H) 2.01 - 2.07 (m, 2 H) 3.95 (s, 1 H) 3.96 - 3.99 (m, 1

H) 5.10 - 5.16 (m, 1 H) 5.53 - 5.56 (m, 1 H)、¹³C NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 14.38, 17.69, 20.46, 25.70, 26.04, 29.74, 30.47, 35.19, 40.55, 67.93, 69.14, 124.62, 129.93, 131.37, 136.70。 FT-ICR-MS calculated for C₁₅H₂₃, 203.1794 [M + H - H₂O]⁺; found, 203.1790; calculated for C₁₅H₂₅O, 221.1900 [M + H]⁺; found, 221.1894。

3-3-4. 単離した化合物の評価

単離した化合物の NO と PGE2 の産生抑制作用を評価した (図 3-7)。化合物 **1**、**4**、**7**、**8** は、濃度依存的に LPS で誘導された NO と PGE2 の産生を抑制した。また化合物 **2**、**3**、**5**、**6** は、濃度依存的に LPS で誘導された NO の産生を抑制し、PGE2 の産生を抑制しなかった。

3-4. 考察

ウコン熱水エキスの抗炎症作用に寄与する化合物を探索することを目的として、ウコン熱水エキスを分画し、LPS が誘導するマクロファージ細胞株 RAW264.7 の NO 産生を抑制する作用を指標として各画分の抗炎症作用を評価した。活性画分から 8 つの成分を単離し、Fig. 7 に示す 1 つの新規成分 (2) と 4 つの既知成分 (4, 5, 6, 8) を同定した。1, 4, 7, 8 に濃度依存的な NO と PGE2 の産生抑制作用が認められ、それ以外に濃度依存的な NO の産生抑制作用が認められた。

化合物 2 は新規に同定された成分であるが、本研究では、化合物 1 についての UV スペクトルや IR スペクトルのような基本的な分析の一部が実施されず、今後の課題として残った。また、化合物 1 と 3 は、それらの平面構造から判断すると新規成分であると考えられたが、本研究では、それらの立体構造が同定されておらず、今後の課題として残った。

単離された化合物は、6 を除きすべてビサボラン型のセスキテルペノイドに分類される化合物であった。PGE2 産生抑制作用の認められた化合物 1, 4, 7, 8 は、すべてベンゼン環に水酸基が直接結合した構造を有していた。同じくビサボラン型セスキテルペノイドでベンゼン環に水酸基が 1 つ結合した構造を有する化合物 turmeronol B を購入し、PGE2 抑制作用を評価したところ、高い比活性 (I.C.50 : <1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) が認められた。一方、ベンゼン環に水酸基が 2 つ結合した構造を有するビサボラン型セスキテルペノイド化合物 bisacurone の比活性 (I.C.50 : >25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と、水酸基を持たないビサボラン型セスキテルペノイド化合物 ar-turmerone の比活性 (I.C.50 : 21.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) は、いずれ水酸基が 1 つ結合した化合物である化合物 1, 4, 7, 8 や turmeronol B の比活性よりも弱かった。

これらの結果から、ビサボラン型のセスキテルペノイドの中でも、ベンゼン環に水酸基が 1 つ結合した化合物の活性が比較的高いと考えられた。水酸基の位置は活性を規定していないので、水酸基の数によって定められる化合物の極性が活性を規定するのに重要であると考えられた。NO 産生抑制作用は、化合物 1, 4, 7, 8 に加え、化合物 2, 3, 5, 6 でも認められたが、明確な構造活性相間は認められなかった。

LPS のような炎症刺激は、NF- κ B や AP-1 のような細胞内シグナル伝達経路を介し、PGE2 の産生酵素である COX-2 (cyclooxygenase-2) と NO の産生酵素である iNOS (inducible nitric oxide synthase) の遺伝子発現を誘導する [68, 69]。化合物 1, 4, 7, 8 は、抑制強度に違いはあ

るものの、PGE2 と NO の両方に対し抑制作用を示した。化合物 **1, 4, 7, 8** は、NF- κ B や AP-1 のような経路の抑制を介し、COX-2 と iNOS の両方を抑制して PGE2 と NO の両方を抑制している可能性が考えられる。一方で、化合物 **2, 3, 5, 6** は、NO 抑制作用のみが明確に認められた。例えば JAK/STAT (janus kinase/signal transducers and activators of transcription) 経路は、iNOS の誘導に関与する[69] が、COX-2 の誘導には関与しない。化合物 **2, 3, 5, 6** は、このような iNOS の誘導に特異的な細胞内シグナル伝達経路に影響している可能性が考えられる。今後、各成分の抑制メカニズムを精査することが課題である。

クルクミンはウコンの主要な成分であり、NF- κ B や AP-1 の抑制を介した抗炎症作用が報告されている[70, 71]。本報告で使用した熱水エキスの抗炎症作用に対し、クルクミンが一定の寄与をしていると推測されるが、ウコン熱水エキス中のクルクミン含量が微量(およそ 0.2 mg/g)なので、クルクミン単体でウコン熱水エキスの全活性を説明するに不十分である。同じく今回得られた化合物群もウコン熱水エキス中の含量が微量なので、単体でウコン熱水エキスの全活性を説明するに不十分である。熱水エキスの全活性は、多成分の複合的な効果の結果から説明が可能と考えられる。今後、今回得られた化合物群やクルクミンなど多成分を組み合わせた時に細胞に及ぼす作用を精査することが必要である。また、生体 (vivo) における抗炎症作用については、他の作用点(臓器・組織・細胞レベル、炎症メディエーターレベル)への作用も検証する必要がある。天然エキスの混合物の複雑性を解明するために、化合物群の併用作用や、他の作用点に及ぼす作用を引き続き検証していくことが重要であると考えられる。

3-5. 結論

ウコン熱水エキスの抗炎症作用に寄与する化合物を探索することを目的として、ウコン熱水エキスを分画し、LPS が誘導するマクロファージ細胞株 RAW264.7 の NO 産生を抑制する作用を指標として各画分の抗炎症作用を評価した。活性画分から 8 つの成分を単離し、1 つの新規成分と 4 つの既知成分を同定した。うち 4 つの成分に濃度依存的な PGE2 と NO の産生抑制作用が認められ、4 つの成分に濃度依存的な NO の産生抑制作用が認められた。本報告は、ウコン熱水エキスの抗炎症作用の活性に寄与する成分を部分的に明らかにし、混合物の活性の複雑性を解明するための一助になると考えられた。

3-6. 図表

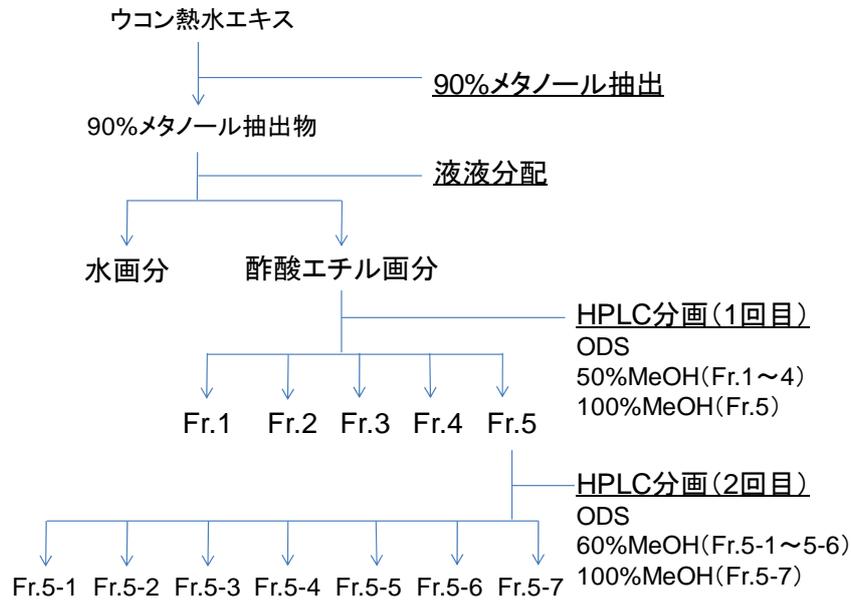


図 3-1. ウコン熱水エキス分画方法の概要

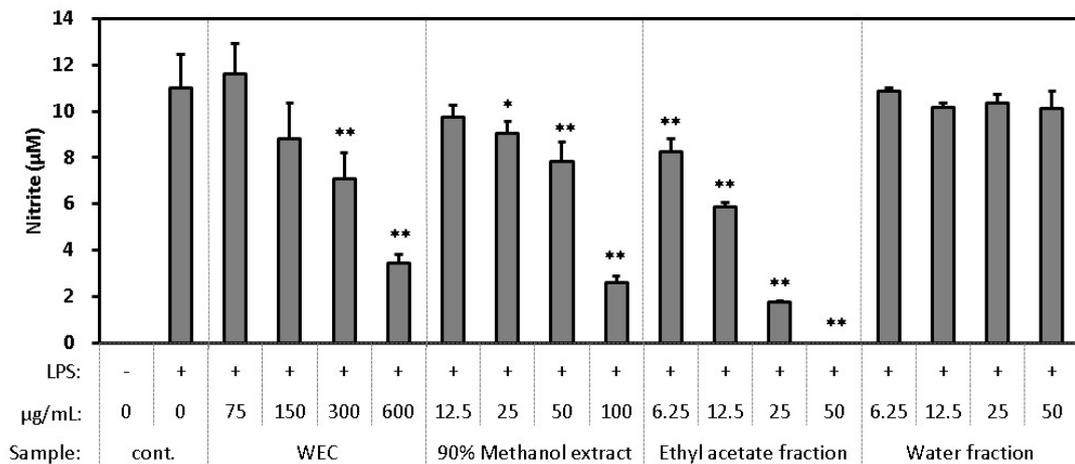


図 3-2. LPS が誘導するマクロファージ細胞株 RAW264.7 の NO 産生に対するウコン熱水エキス (WEC) およびその粗画分の影響

1.5×10⁵/ウェルの濃度で細胞を 96 ウェルプレートに播種し、DMEM (10%FBS) 中で 24 時間培養した。次に、各検体を含む DMEM (FBS free) と交換し、1 時間前処理した。次に、LPS を終濃度 20 ng/mL とするよう添加し、12 時間処理した。その後、Griess 法で培地中の亜硝酸塩を測定した。3 回の測定値の平均と標準偏差を示した。Dunnett の多重比較検定を用いて、control (+) と各検体の有意差を比較した結果を示した (* P < 0.05, ** P < 0.01)。

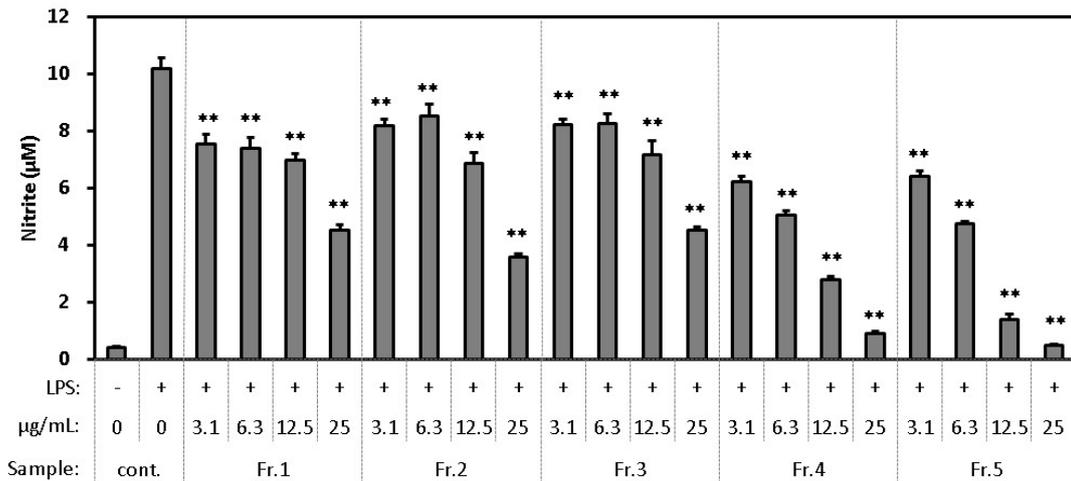


図 3-3. LPS が誘導するマクロファージ細胞株 RAW264.7 の NO 産生に対する HPLC 分画物 (Fr. 1~5) の影響

1.5×10⁵/ウェルの濃度で細胞を 96 ウェルプレートに播種し、DMEM (10%FBS) 中で 24 時間培養した。次に、各検体を含む DMEM (FBS free) と交換し、1 時間前処理した。次に、LPS を終濃度 20 ng/mL となるように添加し、12 時間処理した。その後、Griess 法で培地中の亜硝酸塩を測定した。3 回の測定値の平均と標準偏差を示した。Dunnnett の多重比較検定を用いて、control (+) と各検体の有意差を比較した結果を示した (* P < 0.05, ** P < 0.01)。

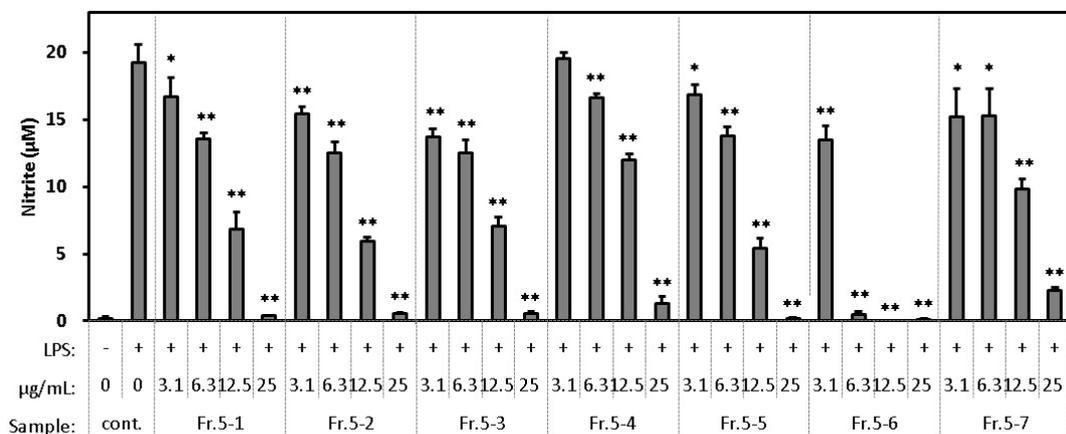


図 3-4. LPS が誘導するマクロファージ細胞株 RAW264.7 の NO 産生に対する HPLC 分画物 (Fr. 5-1~5-7) の影響

1.5×10⁵/ウェルの濃度で細胞を 96 ウェルプレートに播種し、DMEM (10%FBS) 中で 24 時間培養した。次に、各検体を含む DMEM (FBS free) と交換し、1 時間前処理した。次に、LPS を終濃度 20 ng/mL となるように添加し、12 時間処理した。その後、Griess 法で培地中の亜硝酸塩を測定した。3 回の測定値の平均と標準偏差を示した。Dunnnett の多重比較検定を用いて、control (+) と各検体の有意差を比較した結果を示した (* P < 0.05, ** P < 0.01)。

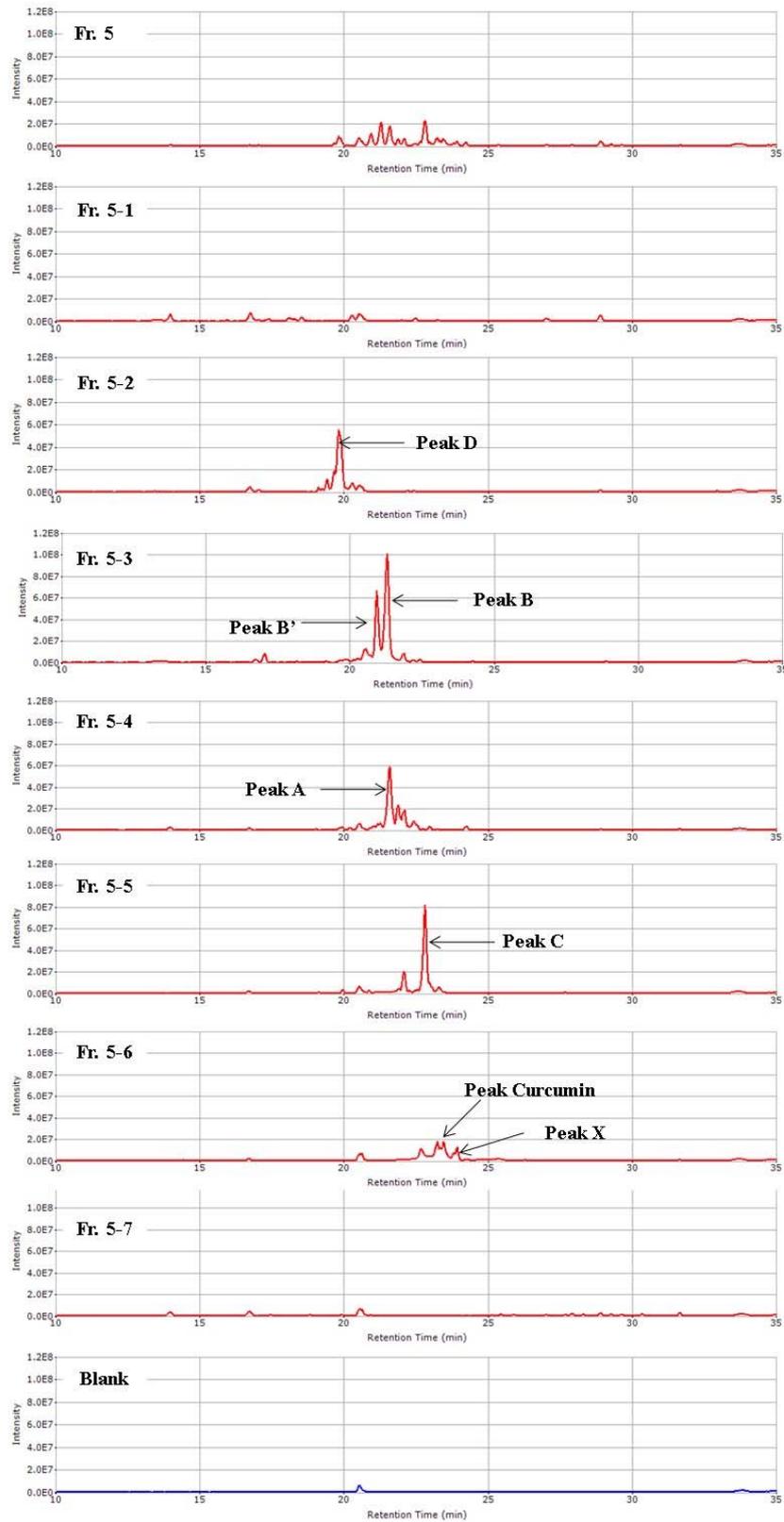


図 3-5. ウコン熱水エキスの HPLC 分画物 (Fr. 5, Fr. 5-1~5-7) の MS 分析

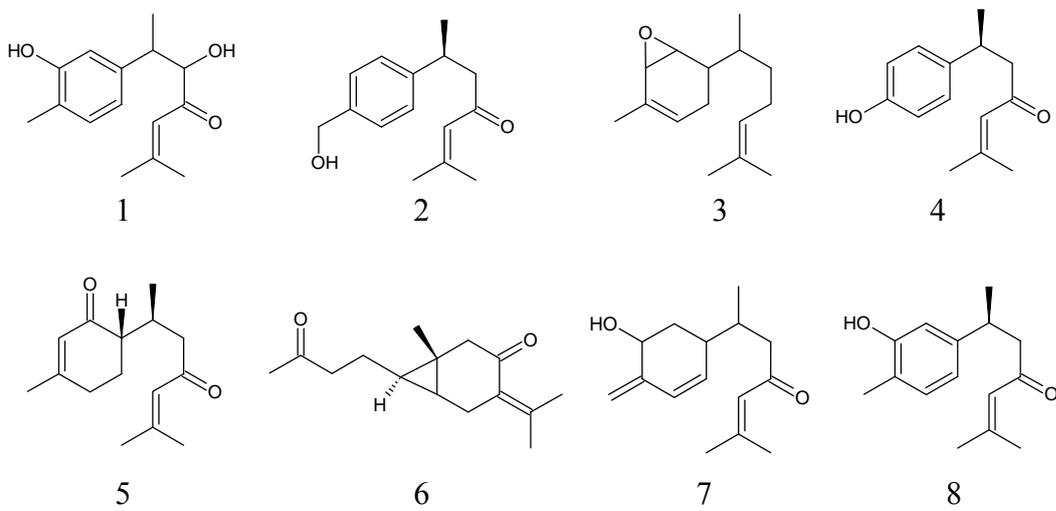


図 3-6. ウコン熱水エキスから単離された化合物の化学構造式

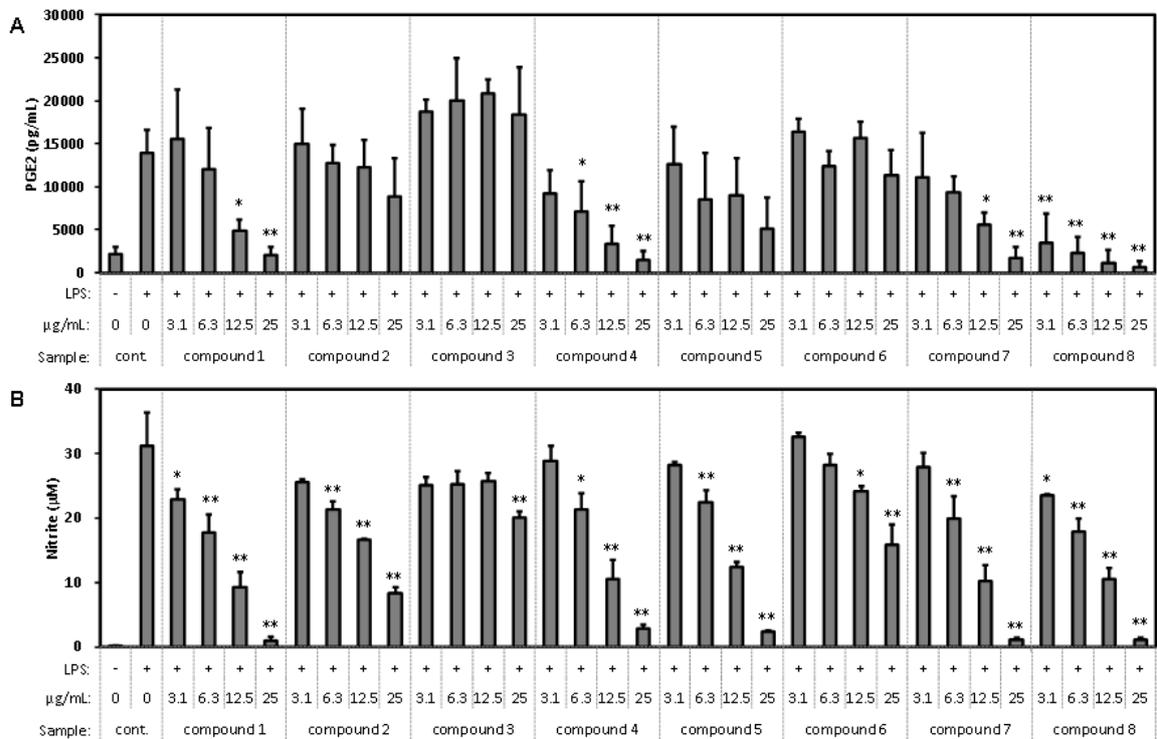


図 3-7. LPS が誘導するマクロファージ細胞株 RAW264.7 の PGE2 産生 (A) と NO 産生 (B) に対するウコン熱水エキスから単離された化合物 (compound 1~8) の影響

1.5×10⁵/ウェルの濃度で細胞を 96 ウェルプレートに播種し、DMEM (10%FBS) 中で 24 時間培養した。次に、各検体を含む DMEM (FBS free) と交換し、1 時間前処理した。次に、LPS を終濃度 20 ng/mL となるように添加し、12 時間処理した。その後、競合 ELISA 法で培地中の PGE2 を測定し、Griess 法で培地中の亜硝酸塩を測定した。3 回の測定値の平均と標準偏差を示した。Dunnnett の多重比較検定を用いて、control (+) と各検体の有意差を比較した結果を示した (* P < 0.05, ** P < 0.01)。

4. 健常者の気分状態に対するウコン熱水エキスの影響

4-1. 概要

疲労や不安などの気分障害は、中枢神経系または全身における炎症と密接に関連している。ウコンは、スパイスとして広く使用されており、抗炎症作用を有することが報告されている。ウコン熱水エキスが気分状態に及ぼす影響を検証することを目的として、無作為化二重盲検プラセボ対照並行群間比較臨床試験を実施した。48名の被験者を無作為に3群に割付けた後、150 mgのウコン熱水エキスを含む錠剤（L-WEC群）、900 mgのウコン熱水エキスを含む錠剤（H-WEC群）、またはプラセボの錠剤（プラセボ群）を毎日8週間摂取させた。7種の異なる気分状態を測定するためのアンケートであるPOMS（profile of mood states）を用いて、被験者の気分状態を4週間ごとに測定した。介入前から介入後8週間までの「疲労」スコアの変化量は、L-WEC群の方がプラセボ群よりも有意に低かった。この結果は、150mgのウコン熱水エキスを毎日摂取することで、疲労を改善する可能性があることを示唆する。

4-2. 方法

4-2-1. 被験者

2014年4月に、アルコールを飲用する習慣のある20～64歳の被験者を募集し、試験参加の適格性を評価した。組入基準は、ASTが40 IU/L未満、ALTが45 IU/L未満、BMIが18～30 kg/m²であり、ALTの高い被験者から順に48名とした。除外基準は、糖尿病・肝疾患・腎疾患・心疾患への罹患、深刻な病歴、処方薬による治療、臨床試験のガイドラインに準拠していない、試験責任医師が不適切と判断した参加者、とした。122名の募集者うち、48名（男性27名、女性21名、平均年齢45.4歳）が被験者として適格と判断された。試験中に脱落した被験者はいなかった（図4-1）。被験者は、試験中に日常的な食習慣を継続するよう指示された。試験プロトコールは、医療法人 健昌会 福島健康管理センター（大阪、日本）の倫理審査委員会で承認され、承認番号は25915であった。本試験は、1975年のヘルシンキ宣言（2013年改訂）に則り行われた。被験者に本試験の手順が充分説明され、すべての被験者から試験開始前に文書による同意を得た。

4-2-2. ウコン熱水エキスの作製

ウコン熱水エキスは以下の手順で作製した。ウコンの根茎を熱水（98℃、1時間）で抽出した後、残渣を除いた上清を減圧下で加熱濃縮し、デキストリンと混合した後、噴霧乾燥して粉末とした。ウコン熱水エキスには、1.78 g/kgのbisacuroneを含有することを確認した。

4-2-3. 試験デザイン

48名の健常者を、無作為化二重盲検プラセボ比較臨床試験の被験者として組入れた。組入れ後、被験者は無作為に3群に割当てられた。割当て後、各群の被験者にウコン熱水エキス150mgを含む錠剤（L-WEC群）、ウコン熱水エキス900mgを含む錠剤（H-WEC群）、またはウコン熱水エキスをデキストリン置換した錠剤（プラセボ群）を毎日8週間摂取させた。被験者は、食生活を含めた生活習慣を変えないよう指示された。試験期間中、被験者は、健康状態、服薬状況、および食事状況について毎日日誌に記録した。介入前、介入後4週目、介入後8週目、および介入終了後4週間目にPOMS（profile of mood states）のアンケートを実施した。本試験は、2014年4月から8月の間に、医療法人 健昌会 福島健康管理セ

ンター（大阪、日本）で実施された。

4-2-4. POMS

7種の異なる気分状態を評価するために開発された POMS を使用して、被験者の気分状態を測定した[72]。横山は、質問項目を英語から日本語に翻訳し、さらに 65 項目から 30 項目に圧縮し被験者の負担を軽減した「日本語 POMS 短縮版」を開発した[73]。この日本語 POMS 短縮版は、約 5,600 人の日本人に対して適用実施され、その信頼性が確認されている。30 の質問項目および評価尺度を表 4-1 に示す。各質問項目について「全くなかった」(0 点)から「非常に多くあった」(4 点)まで、5 段階 (0~4 点) のいずれに該当するかが、被験者自身によって回答される。回答結果は、「緊張 - 不安」、「抑うつ - 落込み」、「怒り - 敵意」、「活気」、「疲労」、「混乱」の 6 つの評価尺度のスコア算出に使用される。合計の評価尺度である「総合的な気分の障害」は、唯一のポジティブスコアである「活気」を他の 5 つのネガティブスコアの合計から減じ算出される。

4-2-5. 統計解析

Dunnett の多重比較検定を用いて、プラセボ群と試験群 (L-WEC 群もしくは H-WEC 群) のベースライン値を比較した。また、Dunnett の多重比較検定を用いて、POMS の「総合的な気分の障害」スコアおよび 6 つの個別スコアについて、プラセボ群と試験群 (L-WEC 群もしくは H-WEC 群) の試験開始前からの変化量を比較した。すべての解析には、Statcel2 ソフトウェア (OMS Publishing、所沢、日本) を用いた。p 値が 0.05 未満を示す検定結果において、統計的な有意差が存在すると判断した。

4-3. 結果

4-3-1. ベースライン特性

48名の被験者全員が試験を完了した。また、48名全員を統計分析の対象とした。ベースライン特性を表4-2に示した。すべての評価項目において、プラセボ群と試験群の間に有意差は認められなかった。

4-3-2. POMS

介入前から介入4週目、介入8週目、もしくは介入終了後4週目にかけてのPOMSスコアの変化量を表4-3に示した。プラセボ群において、「疲労」スコアが時間とともに増加する傾向が認められたが、WEC群では「疲労」スコアの増加が認められなかった。介入前から介入8週目までの「疲労」スコアの変化量は、L-WEC群の方がプラセボ群よりも有意に低かった。他のPOMSスコアのいずれも、すべての時点において、有意な群間差は認められなかった。

4-4. 考察

本試験の結果、プラセボ群では「疲労」スコアが増加する傾向が認められる一方で、L-WEC 群および H-WEC 群では増加が認められず、介入前から介入 8 週目までの「疲労」スコアの変化量は、WEC 群の方が低かった。特に、L-WEC 群とプラセボ群との間に統計的な有意差が認められた。本試験の結果は、150 mg のウコン熱水エキスを毎日摂取すると、疲労感が改善される可能性があることを示唆する。

ウコン熱水エキスは、細胞モデル[74]および動物モデル[6, 9]において、抗炎症作用を有することが示されている。疲労やうつ病などの気分障害は、CNS や全身における炎症と密接に関連していることが示唆されており[41]、抗うつ薬の新しいアプローチとして、CNS や全身における炎症を抑制することが提唱されている[49]。したがって、本試験で認められた「疲労」スコアに対するウコン熱水エキスの影響は、その抗炎症作用に起因する可能性が考えられる。しかしながら、それらの関連を明らかにするためには、血清炎症マーカーを測定するなどしてウコン熱水エキスがヒトの炎症状態に及ぼす影響を検証し、気分障害と炎症状態の相関関係を明らかにすることが必要であると考えられる。

今日までに、少なくとも 235 の化合物（主にフェノール化合物およびテルペノイド）が、ウコンから単離・同定されている[20]。ウコンの重要な成分であるクルクミンは、抗炎症作用を有することが報告されている[21]。一方で、ウコンに含まれるクルクミン以外の成分（curcumin free turmeric: CFT）も抗炎症活性を含む多くの生物学的活性を有することが報告されている[22]。そのうちの 1 つである bisacurone についても、抗炎症作用を有することが報告されている[25]。また、ウコン熱水エキスは、エタノールが誘導する炎症を抑制し、ウコン熱水エキスに含まれる bisacurone も同様の作用を示すことが報告されている[6]。疲労に対するウコン熱水エキスの影響がその抗炎症作用に起因するのであれば、クルクミンや bisacurone はこの抗炎症作用に少なくとも部分的に寄与している可能性がある。これらの化合物の寄与を明らかにするために、精製されたクルクミンや bisacurone の化合物が疲労に及ぼす影響を検証することが必要である。また、クルクミンや bisacurone 以外の活性成分についても、さらなる研究が必要である。ウコンの化学的複雑性および伝統医薬としての幅広い用途を包括的に解析できるような、全体論的な研究の方法について、まずは研究の方法論にまで遡って検討すべきであろうということが提唱されている[75]。

4-5. 結論

本研究の結果は、150 mg のウコン熱水エキスを毎日摂取することは疲労を改善する可能性があることを示唆する。気分障害に対するウコン熱水エキスの影響を明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

4-6. 図表

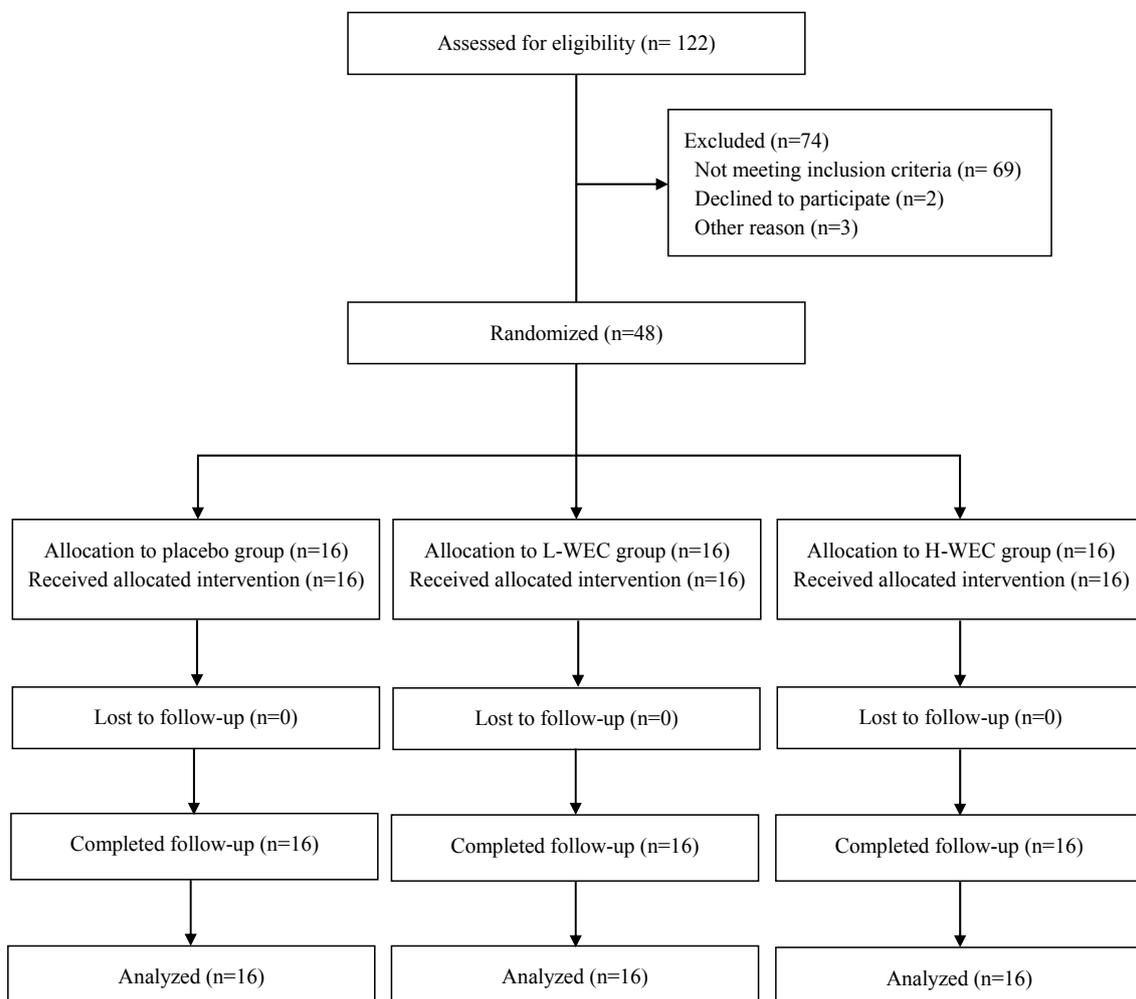


図 4-1. 被験者のフローチャート

表 4-1. 日本語 POMS 短縮版の質問項目

<p>「緊張—不安(Tention-Anxiety)」</p> <p>(1) 気がはりつめる</p> <p>(6) 落ち着かない</p> <p>(12) 不安だ</p> <p>(16) 緊張する</p> <p>(20) あれこれ心配だ</p>	<p>「活気(Vigor)」</p> <p>(4) 生き生きする</p> <p>(8) 積極的な気分だ</p> <p>(10) 精力がみなぎる</p> <p>(27) 元気がいっぱいだ</p> <p>(30) 活気がわいてくる</p>
<p>「抑うつ—落ち込み(Depression-Dejection)」</p> <p>(7) 悲しい</p> <p>(11) 自分はほめられるに値しないと感じる</p> <p>(15) がっかりしてやる気をなくす</p> <p>(17) 孤独でさびしい</p> <p>(21) 気持ちが沈んで暗い</p>	<p>「疲労(Fatigue)」</p> <p>(3) ぐったりする</p> <p>(13) 疲れた</p> <p>(19) へとへとだ</p> <p>(22) だるい</p> <p>(23) うんざりだ</p>
<p>「怒り—敵意(Anger-Hostility)」</p> <p>(2) 怒る</p> <p>(9) ふきげんだ</p> <p>(14) めいわくをかけられて困る</p> <p>(25) はげしい怒りを感じる</p> <p>(28) すぐかっとなる</p>	<p>「混乱(Confusion)」</p> <p>(5) 頭が混乱する</p> <p>(18) 考えがまとまらない</p> <p>(24) とほうに暮れる</p> <p>(26) 物事がてきぱきできる気がする</p> <p>(29) どうも忘れっぽい</p>

表 4-2. 被験者のベースライン値

	Placebo		L-WEC		H-WEC	
<i>N</i>	16		16		16	
Sex, male:female	9	: 7	9	: 7	9	: 7
Age, y	46.4	± 9.5	45.0	± 13.2	44.8	± 9.4
Weight (kg)	60.4	± 10.7	60.1	± 9.0	61.9	± 10.3
BMI (kg/m ²)	23.1	± 1.9	22.9	± 3.1	23.1	± 2.8
POMS						
Tension-anxiety	43.3	± 9.5	40.8	± 7.0	43.4	± 11.3
Depression-dejection	44.6	± 8.7	44.7	± 6.3	45.3	± 6.6
Anger-hostility	43.3	± 4.3	46.6	± 9.1	42.9	± 6.9
Vigor	45.9	± 11.4	49.8	± 8.0	42.8	± 10.7
Fatigue	44.6	± 7.5	44.1	± 7.7	42.8	± 7.6
Confusion	46.9	± 10.9	44.6	± 6.9	47.1	± 6.7
Total mood disturbance	177	± 39	171	± 30	179	± 34

Note: BMI, body mass index; POMS, Profile of Mood States; WEC, water extract of *Curcuma longa*. Values are numbers or means ± standard deviations.

表 4-3. POMS スコアのベースラインからの変化量

	Week 4	Week 8	4 weeks after intervention
Tension-anxiety			
Placebo	-0.9 ± 4.2	-1.3 ± 4.9	-0.2 ± 5.9
L-WEC	-1.6 ± 5.1	-1.2 ± 5.1	0.6 ± 7.4
H-WEC	-1.8 ± 8.1	-3.4 ± 9.4	-3.6 ± 9.3
Depression-dejection			
Placebo	0.8 ± 3.8	0.3 ± 2.8	0.6 ± 4.5
L-WEC	-0.9 ± 7.3	-0.1 ± 8.8	0.6 ± 9.3
H-WEC	-2.1 ± 5.5	-1.7 ± 6.3	-1.9 ± 6.3
Anger-hostility			
Placebo	0.8 ± 6.4	-0.5 ± 6.5	0.3 ± 5.1
L-WEC	-3.6 ± 7.5	-3.3 ± 5.8	-2.5 ± 8.1
H-WEC	-2.3 ± 6.8	-1.7 ± 5.5	-0.7 ± 5.1
Vigor			
Placebo	-5.3 ± 8.0	-5.3 ± 7.9	-5.8 ± 8.4
L-WEC	-2.7 ± 6.5	-2.4 ± 7.8	-3.6 ± 7.6
H-WEC	-1.8 ± 7.0	-1.6 ± 5.6	-4.8 ± 5.4
Fatigue			
Placebo	1.6 ± 5.0	3.1 ± 5.3	2.4 ± 5.8
L-WEC	-0.8 ± 5.5	-1.0 ± 5.3*	1.1 ± 6.6
H-WEC	-0.3 ± 2.8	-0.7 ± 4.7	-0.1 ± 5.9
Confusion			
Placebo	2.1 ± 3.7	1.1 ± 5.6	1.6 ± 4.5
L-WEC	-0.7 ± 5.8	0.6 ± 5.5	0.3 ± 6.9
H-WEC	-0.3 ± 5.0	1.6 ± 6.4	0.9 ± 6.5
Total mood disturbance			
Placebo	9.8 ± 15.3	7.9 ± 16.9	10.4 ± 18.7
L-WEC	-4.9 ± 22.2	-2.6 ± 22.0	3.6 ± 30.8
H-WEC	-4.9 ± 25.0	-4.3 ± 27.2	-0.6 ± 27.9

Note: WEC, water extract of *Curcuma longa*. Data are mean values ± standard deviations. * $p < 0.05$ compared with the placebo group at each indicated time point.

5. 結語

本研究では、2種類の細胞試験を実施して、ウコン熱水エキスの（1）内皮細胞の細胞接着分子の発現を抑制し、単球の内皮細胞への接着を抑制する作用、（2）マクロファージのNOの産生を抑制する作用を実証し、ウコン熱水エキスの抗炎症作用を一部明らかにすることができた。

また、（1）の作用はNF- κ Bシグナル伝達経路の抑制に起因することが示唆され、ウコン熱水エキスの抗炎症作用の機序を一部明らかにすることができた。加えて、（2）の作用を有する成分をウコン熱水エキスから単離・同定し、ウコン熱水エキスの抗炎症作用に寄与する成分を一部明らかにすることができた。

また本研究において、健常者を対象とした臨床試験を実施し、ウコン熱水エキスの気分状態に対する影響を評価することで、ウコン熱水エキスの摂取が疲労を改善する可能性があることが示唆された。本作用がウコン熱水エキスの抗炎症作用に起因するのかどうか、今後精査する必要があるが、ウコン熱水エキスの抗炎症作用をヒトに応用することに対し、期待がもたれる結果が得られたと考えられる。

6. 引用文献

- [1] Ravindran PN. Turmeric: the genus *Curcuma*. Boca Raton: CRC Press; 2007. Chapter 1, Turmeric – The golden spice of life; p. 1-13.
- [2] Premavalli KS. Turmeric: the genus *Curcuma*. Boca Raton: CRC Press; 2007. Chapter 13, Turmeric as spice and flavorant; p. 437-450.
- [3] Kim HJ, Yoo HS, Kim JC, Park CS, Choi MS, Kim M, Choi H, Min JS, Kim YS, Yoon SW, Ahn JK. Antiviral effect of *Curcuma longa* Linn extract against hepatitis B virus replication. *J Ethnopharmacol.* 2009;124:189-96.
- [4] Koo BS, Lee WC, Chung KH, Ko JH, Kim CH. A water extract of *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) rescues PC12 cell death caused by pyrogallol or hypoxia/reoxygenation and attenuates hydrogen peroxide induced injury in PC12 cells. *Life Sci.* 2004;75:2363-75.
- [5] Mohankumar S, McFarlane JR. An aqueous extract of *Curcuma longa* (turmeric) rhizomes stimulates insulin release and mimics insulin action on tissues involved in glucose homeostasis in vitro. *Phytother Res.* 2011;25:396-401.
- [6] Uchio R, Higashi Y, Kohama Y, et al. A hot water extract of turmeric (*Curcuma longa*) suppresses acute ethanol-induced liver injury in mice by inhibiting hepatic oxidative stress and inflammatory cytokine production. *J Nutr Sci.* 2017;6:e3.
- [7] Sengupta M, Sharma GD, Chakraborty B. Hepatoprotective and immunomodulatory properties of aqueous extract of *Curcuma longa* in carbon tetra chloride intoxicated Swiss albino mice. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2011;1:193-9.
- [8] Yu ZF, Kong LD, Chen Y. Antidepressant activity of aqueous extracts of *Curcuma longa* in mice. *J Ethnopharmacol.* 2002;83:161-165.
- [9] Gupta SK, Agarwal R, Srivastava S, Agarwal P, Agarwal SS, Saxena R, Galpalli N. The anti-inflammatory effects of *Curcuma longa* and *Berberis aristata* in endotoxin-induced uveitis in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:4036-4040.
- [10] Kuttan R, Bhanumathy P, Nirmala K, George MC. Potential anticancer activity of turmeric

(*Curcuma longa*). *Cancer Lett.* 1985;29:197-202.

- [11] Azuine MA, Kayal JJ, Bhide SV. Protective role of aqueous turmeric extract against mutagenicity of direct-acting carcinogens as well as benzo [alpha] pyrene-induced genotoxicity and carcinogenicity. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1992;118:447-52.
- [12] Deshpande SS, Ingle AD, Maru GB. Inhibitory effects of curcumin-free aqueous turmeric extract on benzo[a]pyrene-induced forestomach papillomas in mice. *Cancer Lett.* 1997;118:79-85.
- [13] Deshpande SS, Ingle AD, Maru GB. Chemopreventive efficacy of curcumin-free aqueous turmeric extract in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced rat mammary tumorigenesis. *Cancer Lett.* 1998;123(1):35-40.
- [14] Zhang W, Liu D, Wo X, Zhang Y, Jin M, Ding Z. Effects of *Curcuma Longa* on proliferation of cultured bovine smooth muscle cells and on expression of low density lipoprotein receptor in cells. *Chin Med J (Engl).* 1999;112:308-11.
- [15] Mohanty I, Arya DS, Dinda A, Joshi S, Talwar KK, Gupta SK. Protective effects of *Curcuma longa* on ischemia-reperfusion induced myocardial injuries and their mechanisms. *Life Sci.* 2004;75:1701-1711.
- [16] Mohanty I, Arya DS, Gupta SK. Effect of *Curcuma longa* and *Ocimum sanctum* on myocardial apoptosis in experimentally induced myocardial ischemic-reperfusion injury. *BMC Complement Altern Med.* 2006;6:3.
- [17] Zafir A, Banu N. Antioxidant potential of fluoxetine in comparison to *Curcuma longa* in restraint-stressed rats. *Eur J Pharmacol.* 2007;572:23-31.
- [18] Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. *AAPS J* 2013;15:195-218.
- [19] Vera-Ramirez L, Pérez-Lopez P, Varela-Lopez A, Ramirez-Tortosa M, Battino M, Quiles JL. Curcumin and liver disease. *Biofactors.* 2013 Jan-Feb;39(1):88-100.
- [20] Li S, Yuan W, Deng G, Wang P, Yang P, Aggarwal BB. Chemical composition and product quality control of turmeric (*Curcuma longa* L.). *Pharmaceutical Crops.* 2011;2:28-54.

- [21] Menon VP, Sudheer AR. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv Exp Med Biol.* 2007;595:105–125.
- [22] Aggarwal BB, Yuan W, Li S, et al. Curcumin-free turmeric exhibits anti-inflammatory and anticancer activities: identification of novel components of turmeric. *Mol Nutr Food Res.* 2013;57:1529–1542.
- [23] Lee SK, Hong CH, Huh SK, et al. Suppressive effect of natural sesquiterpenoids on inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) activity in mouse macrophage cells. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2002;21:141–148.
- [24] Oh OJ, Min HY, Lee SK. Inhibition of inducible prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 expression by curdione from *Curcuma zedoaria*. *Arch Pharm Res.* 2007;30:1236–1239.
- [25] Sun DI, Nizamutdinova IT, Kim YM, et al. Bisacurone inhibits adhesion of inflammatory monocytes or cancer cells to endothelial cells through down-regulation of VCAM-1 expression. *Int Immunopharmacol.* 2008;8:1272–1281.
- [26] Laveti D, Kumar M, Hemalatha R, Sistla R, Naidu VG, Talla V, Verma V, Kaur N, Nagpal R. Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: a review. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2013;12:349-361.
- [27] Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. *ロビンス基礎病理学 (原書 8 版)*. 東京: 丸善出版; 2011. 第 2 章, 急性および慢性炎症; p. 53-62.
- [28] Tabas I, Glass CK. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science.* 2013;339:166-172.
- [29] Bevilacqua MP, Nelson RM, Mannori G, Cecconi O. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annu Rev Med.* 1994;45:361-378.
- [30] Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:2292-2301.

- [31] Danese S, Semeraro S, Marini M, Roberto I, Armuzzi A, Papa A, Gasbarrini A. Adhesion molecules in inflammatory bowel disease: therapeutic implications for gut inflammation. *Dig Liver Dis.* 2005;37:811-818.
- [32] Grober JS, Bowen BL, Ebling H, Athey B, Thompson CB, Fox DA, Stoolman LM. Monocyte-endothelial adhesion in chronic rheumatoid arthritis. In situ detection of selectin and integrin-dependent interactions. *J Clin Invest.* 1993;91:2609–2619.
- [33] Ramadori G, Moriconi F, Malik I, Dudas J. Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair. *J Physiol Pharmacol.* 2008;59 Suppl 1:107-117.
- [34] Ulbrich H, Eriksson EE, Lindbom L. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24:640-647.
- [35] Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J.* 1995;10:899-909
- [36] Tak PP, Firestein GS. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest.* 2001;107:7–11.
- [37] Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:649-683.
- [38] Iademarco MF, McQuillan JJ, Rosen GD, Dean DC. Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J. Biol Chem.* 1992;267:16323-16329.
- [39] Voraberger G, Schäfer R, Stratowa C. Cloning of the human gene for intercellular adhesion molecule 1 and analysis of its 5'-regulatory region. Induction by cytokines and phorbol ester. *J Immunol.* 1991;147:2777-2786.
- [40] Schindler U, Baichwal VR. Three NF-kappa B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression. *Mol Cell Biol.* 1994;14:5820-5831.
- [41] Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness

- and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9:46-56.
- [42] Vargas NT, Marino F. A neuroinflammatory model for acute fatigue during exercise. *Sports Med.* 2014;44:1479-1487.
- [43] Steptoe A, Hamer M, Chida Y. The effects of acute psychological stress on circulating inflammatory factors in humans: a review and meta-analysis. *Brain Behav Immun.* 2007;21:901-912.
- [44] Kiecolt-Glaser JK, Preacher KJ, MacCallum RC, Atkinson C, Malarkey WB, Glaser R. Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:9090-9095.
- [45] Sandiego CM, Gallezot JD, Pittman B, Nabulsi N, Lim K, Lin SF, Matuskey D, Lee JY, O'Connor KC, Huang Y, Carson RE, Hannestad J, Cosgrove KP. Imaging robust microglial activation after lipopolysaccharide administration in humans with PET. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:12468-12473.
- [46] Nakatomi Y, Mizuno K, Ishii A, Wada Y, Tanaka M, Tazawa S, Onoe K, Fukuda S, Kawabe J, Takahashi K, Kataoka Y, Shiomi S, Yamaguti K, Inaba M, Kuratsune H, Watanabe Y. Neuroinflammation in Patients with Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis: An ¹¹C-(R)-PK11195 PET Study. *J Nucl Med.* 2014;55:945-950.
- [47] Wingerchuk DM, Benarroch EE, O'Brien PC, Keegan BM, Lucchinetti CF, Noseworthy JH, Weinshenker BG, Rodriguez M. A randomized controlled crossover trial of aspirin for fatigue in multiple sclerosis. *Neurology.* 2005;64:1267-1269.
- [48] Müller N, Schwarz MJ, Dehning S, Douhe A, Ceroveckí A, Goldstein-Müller B, Spellmann I, Hetzel G, Maino K, Kleindienst N, Möller HJ, Arolt V, Riedel M. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib has therapeutic effects in major depression: results of a double-blind, randomized, placebo controlled, add-on pilot study to reboxetine. *Mol Psychiatry.* 2006;11:680-684.
- [49] Berton O, Nestler EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7:137-151.
- [50] Nishiumi S, Ashida H. Rapid Preparation of a plasma membrane fraction from adipocytes and

muscle cells: application to detection of translocated glucose transporter 4 on the plasma membrane. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007;71:2343-2346.

- [51] Griendling KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2175-2183.
- [52] Weber C, Erl W, Pietsch A, Ströbel M, Ziegler-Heitbrock HW, Weber PC. Antioxidants inhibit monocyte adhesion by suppressing nuclear factor-kappa B mobilization and induction of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells stimulated to generate radicals. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:1665-1673.
- [53] Marui N, OffermannMK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW, Medford RM. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 1993;92:1866-1874.
- [54] Zhang WJ, Frei B. Alpha-lipoic acid inhibits TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. *FASEB J.* 2001;15:2423-2432.
- [55] Neish AS, Williams AJ, Palmer HJ, Whitley MZ, Collins T. Functional analysis of the human vascular cell adhesion molecule 1 promoter. *J Exp Med.* 1992;176:1583-1593.
- [56] Neish AS, Read MA, Thanos D, Pine R, Maniatis T, Collins T. Endothelial interferon regulatory factor 1 cooperates with NF-kappa B as a transcriptional activator of vascular cell adhesion molecule 1. *Mol Cell Biol.* 1995;15:2558-2569.
- [57] Neish AS, Khachigian LM, Park A, Baichwal VR, Collins T. Sp1 is a component of the cytokine-inducible enhancer in the promoter of vascular cell adhesion molecule-1. *J Biol Chem.* 1995;270:28903-28909
- [58] Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23:175-205.
- [59] Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT, Lowenstein CJ. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105:1516-

1521.

- [60] Suárez Y, Wang C, Manes TD, Pober JS. Cutting Edge: TNF-Induced MicroRNAs regulate TNF-induced expression of E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 on human endothelial cells: feedback control of inflammation. *J Immunol*. 2010;184:21-25.
- [61] Kumar A, Dhawan S, Hardegen NJ, Aggarwal BB. Curcumin (Diferuloylmethane) inhibition of tumor necrosis factor (TNF)-mediated adhesion of monocytes to endothelial cells by suppression of cell surface expression of adhesion molecules and of nuclear factor-kappaB activation. *Biochem Pharmacol*. 1998;55:775-783.
- [62] Zeng Y, Qiu F, Takahashi K, et al. New sesquiterpenes and calebin derivatives from *Curcuma longa*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2007;55:940-943.
- [63] Bohlmann F, Zdero C, Robinson H, et al. Germacranolides from *Lychnophora* species. *Phytochemistry*. 1982;21:1087-1091.
- [64] Ohshiro M, Kuroyanagi M, Ueno A. Structures of sesquiterpenes from *Curcuma longa*. *Phytochemistry*. 1990;29:2201-2205.
- [65] Li W, Feng JT, Xiao YS, et al. Three novel terpenoids from the rhizomes of *Curcuma longa*. *J Asian Nat Prod Res*. 2009;11:569-575.
- [66] Li HM, Lei C, Luo YM, et al. Intermedins A and B; new metabolites from *Schisandra propinqua* var. *intermedia*. *Arch Pharm Res*. 2008;31:684-7.
- [67] Imai S, Morikiyo M, Furihata K, et al. Turmeronol A and turmeronol B, new inhibitors of soybean lipoxygenase. *Agric Biol Chem*. 1990;54:2367-2371.
- [68] Kang YJ, Mbonye UR, DeLong CJ, et al. Regulation of intracellular cyclooxygenase levels by gene transcription and protein degradation. *Prog Lipid Res*. 2007;46:108-125.
- [69] Kleinert H, Pautz A, Linker K, et al. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol*. 2004;500(1-3):255-266.
- [70] Singh S, Aggarwal BB. Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin

(diferuloylmethane). *J Biol Chem*. 1995;270:24995–25000.

- [71] Chen YR, Tan TH. Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway by curcumin. *Oncogene*. 1998;17:173–178.
- [72] McNair DM, Lorr M, Droppleman LF. (eds). 1971. EITS manual for the profile of mood states, Educational and Industrial Testing Service, San Diego.
- [73] 横山和仁. POMS 短縮版 手引と事例解説 (初版). 東京: 金子書房; 2005.
- [74] Kawasaki K, Muroyama K, Yamamoto N, Murosaki S. A hot water extract of *Curcuma longa* inhibits adhesion molecule protein expression and monocyte adhesion to TNF- α -stimulated human endothelial cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2015;79:1654-1659.
- [75] Nelson KM, Dahlin JL, Bisson J, Graham J, Pauli GF, Walters MA. The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin. *J Med Chem*. 2017;60:1620-1637.

7. 謝辞

博士學位論文を遂行するにあたり、ご指導いただきました同志社大学大学院生命医科学研究科・市川 寛教授に御礼申し上げます。

本研究に対する貴重なご助言ならびにご指導いただきましたハウスウェルネスフーズ株式会社の山本 佳弘博士、室崎 伸二博士、室山 幸太郎博士、田岡 幸一氏、山本 憲朗博士に感謝致します。第二部の精製および構造決定を実施いただきましたハウス食品グループ本社株式会社の青柳 守紘氏に感謝致します。第二部の細胞試験を実施いただきましたハウスウェルネスフーズ株式会社の奥田 知夏氏に感謝致します。

本研究を行うにあたり、アドバイスや励ましの言葉を下さった方々、様々な形でご協力を頂いたハウスウェルネスフーズ株式会社 開発研究所 研究部のメンバーや技術員の方々に感謝致します。

最後に、優しく見守ってくれた方々や家族に心より感謝致します。