

【原 著】

ハトムギ *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf の有用成分に関する研究A Study on the Useful Components of Adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf)滝本裕子¹, 鈴木信孝^{2,*}, 川畑哲郎³, 只野 武³, 太田富久³,
徳田春邦², 許 鳳浩², 井上正樹¹Yuko TAKIMOTO¹, Nobutaka SUZUKI^{2,*}, Teturo KAWABATA³, Takeshi TADANO³,
Tomihisa OHTA³, Harukuni TOKUDA², XU FengHao², Masaki INOUE¹¹ 金沢大学医薬保健研究域医学系分子移植学講座² 金沢大学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³ 金沢大学医薬保健学総合研究科環境健康科学講座

【要 旨】

ハトムギ子実の熱水抽出エキスであるヨクイニン¹は、漢方薬として利用され、ヒト乳頭腫ウィルス性疾患である疣贅等に用いられている。ハトムギの子実の有用成分についてはいくつかの報告があるが、外殻、薄皮、渋皮についての薬理的有用性については未だ明確になっていない。今回ハトムギの穀実(子実、外殻、薄皮、渋皮)のメタノール抽出エキスの癌細胞に対する作用と有用成分に関する検討を行なったところ、抽出エキスの一部の画分はHeLa細胞(ヒト子宮頸癌由来)に対して有意な細胞増殖抑制作用を示した。さらに、増殖抑制作用が認められた画分から化合物として5,7-dihydroxychromoneとcoixolを単離した。以上より、ハトムギ穀実のメタノール抽出エキスは癌予防に有用である可能性が示された。

【キーワード】

ハトムギ, 癌化学予防,
5,7-dihydroxychromone, coixol

はじめに

ハトムギ (Coix seed, Adlay, pearl barley, Job's tears : 学名 *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) は、イネ科 (Gramineae), ジュズダマ属の一年生草本でモチ性の種子 (穎果) を有している。ムギという名を有してはいるが、分類上はトウモロコシの近縁にあたる。

ハトムギの子実の熱水抽出エキスであるヨクイニンは、古来より漢方薬として利用され、わが国では疣贅の保険適応を受けており、抗酸化作用、免疫賦活作用、抗高脂血症作用、抗炎症作用、筋弛緩作用、抗糖尿病作用、利尿作用など多岐にわたる薬理作用が報告されている¹⁾。なかでも近年ハトムギの抗腫瘍作用に注目が集まり、中国ではハトムギの抗癌注射剤である kanglaite が開発され、様々な進行癌に対して使われている²⁻⁴⁾。

薬物を投与することにより発癌を抑制する癌の化学予防、例えば、乳癌に対して抗エストロゲン薬であるタモキシフェンを用いた予防法などもこれに該当し、レチノイド (ビタミン誘導体) の一つであるイソトレチノインも口腔内の白斑症 (前癌病変) に有効なことが報告⁵⁾ されるなど、世界的にも化学予防に有用な化合物の探求がなされているのは周知の事実である。

受理日: 2013年6月20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

これまでハトムギの子実の活性成分についてはいくつか報告がみられるが、子実以外の有用成分については未知の部分が多い。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、癌の化学予防に応用可能なハトムギ機能性食品の開発に取り組んできたが¹⁾、今回、ハトムギ穀実(子実・外殻・薄皮・渋皮)のメタノール抽出物のヒト由来癌細胞に対する増殖抑制作用について検討し、有用成分の同定を試みた。

方法

1. ハトムギのメタノール抽出およびエキスの分画(図1)

破碎したハトムギ(種子名:あきしずく,氷見産)5.9 kgあたり30 Lのメタノールを加え、24時間室温で抽出し、得られたメタノール抽出液を濃縮乾固し、エキス142.9 gを得た。得られたエキスを *n*-Hexane と 90% MeOH で分配し、90% MeOH 可溶部をさらに EtOAc と H₂O で分配し、4つの画分 *n*-Hexane 画分, EtOAc 画分, *n*-BuOH 画分, H₂O画分を得た。

これら画分のうち、EtOAc可溶性画分について、SiO₂クロマトグラフィー(*n*-Hexane:EtOAc=9:1, 4:1, 2:1, 1:1, MeOH)で分画し、18個の画分(Fr. a1~a18)を得た。

また、*n*-BuOH可溶性画分をSiO₂クロマトグラフィー(CHCl₃:MeOH:H₂O=14:2:0.1, 10:2:0.1, 7:3:0.5, 6:4:1,

0:1:0)で分画し、10個の画分(Fr. b1~b10)を得た。

2. ハトムギ由来画分のヒト由来癌細胞に対する増殖抑制活性

ハトムギに含まれるヒト由来癌細胞増殖抑制活性を示す成分を探索するため、メタノール抽出エキスより得られた画分について、HeLa細胞(ヒト子宮頸癌由来)に対する細胞増殖に及ぼす影響をMTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, yellow tetrazole)法により評価した。細胞は5%ウシ胎児血清(FBS)を含むD-MEM(SIGMA-ALDRICH JAPAN)を用い、37°C, 5.0% CO₂環境下インキュベーター内で培養した。1×10⁴ cells/wellの割合になるように培地(5% FBS含有)で調製し、その細胞懸濁液を96 well plateに150 μLずつ加え、CO₂インキュベーターで24時間培養した。サンプルはDMSOに溶解し、最終濃度10, 50 μg/mLとなるように調製した。また、DMSOは最終濃度0.1%になるように調製した。

調製したサンプル溶液を24時間培養した細胞に50 μLずつ投与し、CO₂インキュベーター内でさらに72時間培養した。コントロール群には、DMSOのみを加え、サンプル投与群の細胞と同様に培養した。

各時間培養後、培地を吸い取り、新たに各wellに培地を90 μL, MTT溶液(Nacalai tespue)10 μLを加え、アル

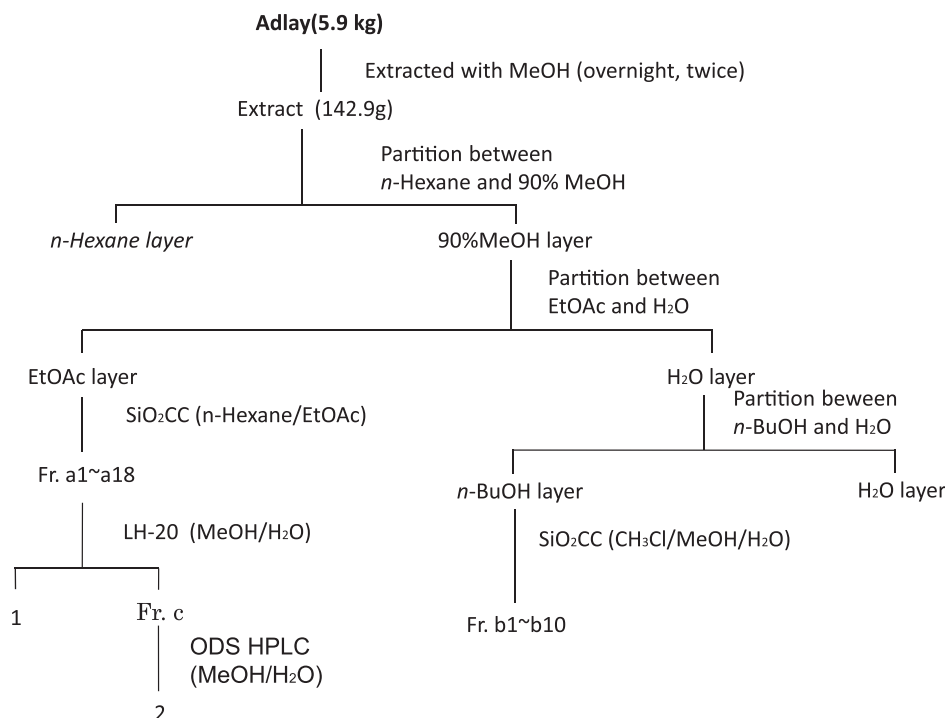


図1 ハトムギ穀実のメタノール抽出ならびに化合物1,2の分離

ミホイルで遮光し, CO₂ インキュベーター内で3時間インキュベートし, 各 well に 10 w/v% SDS-DMF 溶液 (Wako) を 150 μ L ずつ添加し, さらに 18 時間インキュベートし, 570 nm での吸光度を測定した (reference wave: 750 nm).

細胞生存率 (%) は, サンプル投与時の平均吸光度÷コントロール群での平均吸光度×100で計算し, 結果は平均値±標準偏差 (mean±S.D) で表記した. また, コントロール群と検体との間における有意差検定は, Student's-t 検定を用い, 5% 未満の危険率をもって有意差ありと判定した.

3. ハトムギエタノール抽出画分中の化合物の単離

ハトムギのメタノール抽出エキスから得られた Fr. a12 をさらに LH-20 クロマトグラフィーを用いて分画し, 化合物 1 を得た. さらに ODS HPLC で精製することにより, 化合物 2 を単離した. 化合物 1 と 2 は NMR を測定することにより構造決定した.

結果

1. ハトムギ由来画分のヒト癌細胞に対する増殖抑制活性

ハトムギのメタノール抽出により得られた 4 つの画分 (*n*-Hexane 画分, EtOAc 画分, *n*-BuOH 画分および H₂O 画分) の HeLa 細胞に対する影響について検討したところ, EtOAc 画分および *n*-BuOH 画分では弱いながらも有意な細胞増殖抑制活性が認められた (図 2).

次に, EtOAc 画分を SiO₂ クロマトグラフィーで分画して得られた Fr. a2, a4, a6, a8, a10, a12, a14 および a16 の HeLa 細胞に対する影響について検討した. その結果 Fr.a2 (50 μ g/mL) と Fr.a4 (50 μ g/mL) に比較的強い有意な

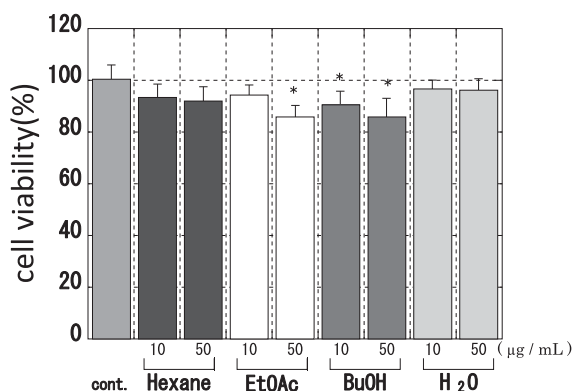


図 2 濃度 10, 50 μ g/mL の *n*-Hexane, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O 画分のヒト HeLa 細胞の増殖に及ぼす影響 (n=4, mean±S.D. *p<0.05)

細胞増殖抑制活性が認められ, Fr. a12, Fr. a14 (10 μ g/mL) および Fr. a16 (50 μ g/mL) には比較的弱い有意な細胞増殖抑制作用が認められた (図 3).

さらに, *n*-BuOH 画分を SiO₂ クロマトグラフィーで分画して得られた Fr. b1~b10 について, HeLa 細胞に対する影響を検討した. その結果 Fr. b1 (50 μ g/mL) および Fr. b5 (10 μ g/mL) に有意な細胞増殖抑制活性が認められた (図 4).

2. ハトムギのエタノール画分から得られた化合物の同定

ハトムギのメタノール抽出エキスから得られた化合物 1 および 2 (図 1) を NMR 測定により構造決定した.

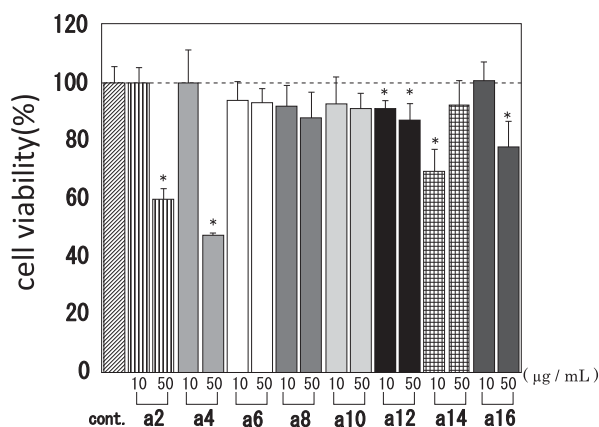


図 3 濃度 10, 50 μ g/mL の a2, a4, a6, a8, a10, a12, a14, a16 画分のヒト HeLa 細胞の増殖に及ぼす影響 (n=8, mean±S.D. *p<0.05)

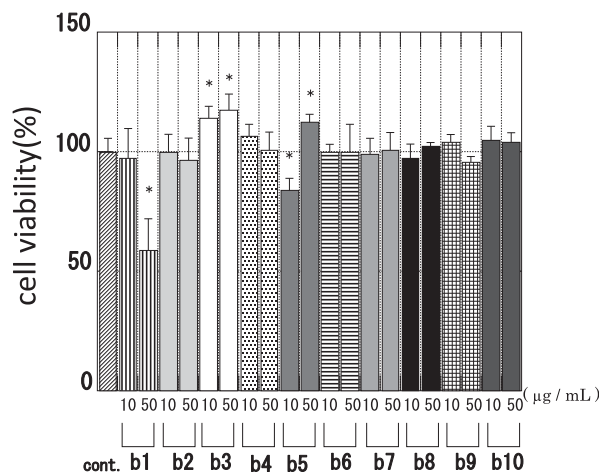


図 4 濃度 10, 50 μ g/mL の b1~b10 画分のヒト HeLa 細胞の増殖に及ぼす影響 (n=10, mean±S.D. *p<0.05)

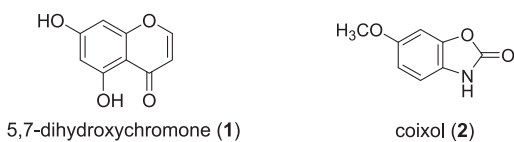


図5 ハトムギ穀実のメタノール抽出物のうち癌細胞増殖抑制活性を示す画分から得られた2種類の化合物 (1) 5,7-dihydroxychromone (2) coixol

化合物1 5,7-dihydroxychromone

化合物1は、¹H-NMR スペクトルデータを文献⁶⁾と比較した結果、すべてのデータが一致したことから、5,7-dihydroxychromone と同定した (図5)。

化合物2 coixol

化合物2は¹H-NMR および¹³C-NMR スペクトルデータを文献⁷⁾と比較した結果、すべてのデータが一致したことから、coixol と同定した (図5)。

考 察

ヨクイニンの抗腫瘍活性については、ヨクイニンのエーテル脱脂後のアセトン抽出エキスがマウスのエールリッヒ腹水癌を抑制したことから一連の研究が始まった¹⁾。そして、coixenolide という脂質が単離・合成され、この物質がヨクイニンの抗腫瘍活性の薬理活性成分であるとされた。しかし、その後、coixenolide の存在は微量成分であることも確認されておらず、ヨクイニンには coixenolide を含むものと含まないものがある可能性も指摘されている¹⁾。その他、活性画分が遊離脂肪酸混合物であるとする報告や、不飽和脂肪酸 (リノール酸) であるとする報告等がみられるが、いまだ明確にはなっていない¹⁾。

ハトムギ子実由来の抗癌剤である Kanglaite 注射剤は、現在中国やロシアにおいて多くの患者に投与されており、アメリカでもいくつかの臨床試験が進行中である⁸⁾。Kanglaite の抗癌機序としては、Fas/FasL pathway の誘導 (アポトーシス) にあると考えられており、さらに、Kanglaite は Cyclooxygenase-2 (COX-2) の選択的阻害作用を有していることが明らかになっている⁹⁾。このように、ハトムギの子実の抽出物に関する抗癌作用については多くの報告があるが、われわれが今回行ったハトムギの穀実、すなわち子実と外殻、薄皮、渋皮の抗癌作用について研究され始めたのはごく最近のことである。Chen らは、ハトムギの外殻のアセトン抽出物が antimutagenic activity (抗変異活性) を有することを報告し、6種類の強力な antimutagenic activity を持つ化合物 p-

hydroxybenzaldehyde, vanillin, syringaldehyde, trans-coniferylaldehyde, sinapaldehyde, と coixol を同定した¹⁰⁾。このうち trans-coniferylaldehyde と sinapaldehyde は、DPPH radicals の消去作用を持ち、好中球様白血球において TPA stimulated superoxide anion の生成を抑制することも明らかにしている。また、trans-coniferylaldehyde は、培養細胞において tert-butyl hydroperoxide で誘発される DNA の2重ラセンの破壊を防ぎ、この化学予防作用は p38, ERK1/2, JNK, MEK1/2, MSK1/2 kinase signals の活性化によるものと推察している。さらに、これら6種類の化合物中 trans-coniferylaldehyde が最も癌化学予防に重要な働きをすると報告している。われわれはメタノール抽出物の抗腫瘍増殖抑制画分から coixol を分離同定したが、Chen らの coixol が antimutagenic activity を持つとする報告とも符合している。

ハトムギの bran (糠:ぬか) の生物活性についても研究され始めている。胃がんの細胞株に対しては、子実のエタノール抽出物よりも、糠のエタノール抽出物の方が増殖抑制能力が高いと報告されている¹¹⁾。また、ハトムギ糠のエタノール抽出物は、ラットの大腸の前がん病変である ACF (preneoplastic aberrant crypt foci) の数を容量依存的に減少させることも報告されており¹²⁾、これは以前に、ハトムギ糠のエタノール抽出物の酢酸エチル画分が、RAS と Ets2 癌遺伝子の発現を抑制し、COX-2 タンパクの発現を有意に抑制することによって大腸の前がん病変抑制につながっているという報告¹³⁾とも一致している。ハトムギ糠のメタノール抽出物の酢酸エチル画分がヒト肺癌細胞株 A549 と大腸癌細胞株 HT-29 等に対し抗増殖作用を有し、有効成分の一つとして methyl dioxindole-3-acetate も分離同定されている¹⁴⁾。最近、Chung らは、ハトムギ糠のエタノール抽出物から2種類の新規 lactam 化合物 coixspirolactam D, coixspirolactam E と新規な spiroenone である coixspiroenone と7種類の既知化合物である coixspirolactam A, coixspirolactam B, coixspirolactam C, coxlactam, coixol, ethyl dioxindole-3-acetate, isoindol-1-one ならびに新規リグナンである zhepiresionol, ficusal を単離し、このうちラクタム化合物と spiroenone が最も強い抗腫瘍成分であると報告している¹⁵⁾。

今回われわれは、腫瘍の増殖抑制作用を示す EtOAc 画分から 5,7-dihydroxychromone を分離同定したが、2011年に Chen らもハトムギ糠から同一の化合物を単離している。この化合物はもともと落花生の殻から単離され^{16,17)}、その抗菌・抗真菌作用¹⁷⁾についてはよく知られていたものである。5,7-dihydroxychromone が抗腫瘍活性を有するか否かについては、現在のところ不明であり、今後検討

する必要があると思われる。しかし、アフリカなど熱帯地方に群生しているシダの仲間である *Macrothelypteris torresiana* (Gaud.) から新しく発見されたフラボノイドである 2-(cis-1,2-dihydroxy 4-oxo-cyclohex-5-enyl)-5,7-dihydroxy-chromone (DEDC) については、ヒト肝癌細胞 HepG2 やヒト神経芽細胞種 SH-SY5Y 細胞に対して強い抗腫瘍活性があることが報告されており、その機序は癌細胞のアポトーシス誘導である^{18,19)}とされていることから、5,7-dihydroxychromone そのものが抗腫瘍作用を有する可能性は高いように思われる。

われわれは以前からハトムギの外殻、薄皮、渋皮の機能性に着目し、疣贅、尖圭コンジローマをはじめ子宮頸癌などヒト乳頭腫ウイルス性疾患について研究し、「腫瘍又はヒト乳頭腫ウイルス性疾患の予防剤又は治療剤」としてハトムギの外殻、薄皮、渋皮を応用することを考案した（日本国特許 第3590042号）が、ヒト乳頭腫ウイルス性疾患に有効なハトムギの有用成分に関する研究は未だ行われていないのが現状であるので、今後は、今回の試験で見出された coixol や 5,7-dihydroxychromone をはじめいくつかのハトムギ有用成分のヒト乳頭腫ウイルス性疾患に対する作用についても研究を行う予定である。

結 論

ハトムギ穀実のメタノール抽出エキスの癌細胞増殖抑制効果を示す画分から、5,7-dihydroxychromone と coixol を単離した。ハトムギメタノール抽出エキスは、癌の化学予防に有用であると考えられた。

謝 辞

本研究を進めるにあたり御指導を賜りました島野康子研究員に感謝いたします。また、研究用にハトムギをご恵与くださいました JA 氷見市に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 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.
- 2) Qi F, Li A, Inagaki Y, et al. Chinese herbal medicines as adjuvant treatment during chemo- or radio-therapy for cancer. *Biosci Trends* 2010; 4(6): 297–307.
- 3) Zhu L, Yang Z, Wang S, et al. Kanglaite for Treating Advanced Non-small-cell Lung Cancer: A Systematic Review. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 2009; 12(3): 208–215.
- 4) Lu Y, Li CS, Dong Q. Chinese herb related molecules of cancer-

- cell-apoptosis: a minireview of progress between Kanglaite injection and related genes. *J Exp Clin Cancer Res* 2008; 27: 31.
- 5) Lotan R, Xu XC, Lippman SM, et al. Suppression of retinoic acid receptor-beta in premalignant oral lesions and its up-regulation by isotretinoin. *N Engl J Med* 1995; 332(21): 1405–1410.
 - 6) Chen HJ, Chung CP, Chiang W, et al. Anti-inflammatory effects and chemical study of a flavonoid-enriched fraction from adlay bran. *Food Chem* 2011; 126: 1741–1748.
 - 7) Nagao T, Otsuka H, Kohda H, et al. ; Benzoxazinones from *Coix lachryma-jobi var.ma-yuen*. *Phytochemistry* 1985; 24(12): 2959–2962.
 - 8) Normile D, Yimin D. The new face of traditional Chinese medicine. *Science* 2003; 299: 188–190.
 - 9) Dong QH, Zhong X, Zheng S. Effect of Kanglaite injection on cyclooxygenase activity in lung carcinoma A549 cell. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2005; 30(20): 1621–1623.
 - 10) Chen HH, Chiang W, Chang JY, et al. Antimutagenic constituents of adlay (*Coix lachryma-jobi L. var. ma-yuen Stapf*) with potential cancer chemopreventive activity. *J Agric Food Chem* 2011; 59(12): 6444–6452.
 - 11) Chung CP, Hsia SM, Lee MY, et al. Gastroprotective activities of adlay (*Coix lachryma-jobi L. var. ma-yuen Stapf*) on the growth of the stomach cancer AGS cell line and indomethacin-induced gastric ulcers. *J Agric Food Chem* 2011; 59(11): 6025–6033.
 - 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) Lee MY, Lin HY, Cheng F, et al. Isolation and characterization of new lactam compounds that inhibit lung and colon cancer cells from adlay (*Coix lachryma-jobi L. var. ma-yuen Stapf*) bran. *Food Chem Toxicol* 2008; 46(6): 1933–1939.
 - 15) Chung CP, Hsu CY, Lin JH, et al. Antiproliferative lactams and spiroenone from adlay bran in human breast cancer cell lines. *J Agric Food Chem* 2011; 59(4): 1185–1194.
 - 16) Pendse R, Rama Rao AV, venkataraman K. 5,7-dihydroxychromone from *Arachis Hypogaea* shells. *Phytochemistry* 1973; 12: 2033–2034.
 - 17) Vaughn SF. Phytotoxic and antimicrobial activity of 5,7-dihydroxychromone from peanut shells. *J Chem Ecology* 1995; 21(2): 107–115.
 - 18) Liu H, Xiao Y, Xiong C, et al. Apoptosis induced by a new flavonoid in human hepatoma HepG2 cells involves reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction and MAPK activation. *Eur J Pharmacol* 2011; 654(3): 209–216.
 - 19) Liu H, Jiang C, Xiong C, et al. DEDC, a new flavonoid induces apoptosis via a ROS-dependent mechanism in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicol In Vitro* 2012; 26(1): 16–23.

ABSTRACT

A Study on the Useful Components of Adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf)

Yuko TAKIMOTO¹, Nobutaka SUZUKI², Teturo KAWABATA³, Takeshi TADANO³, Tomihisa OHTA³,
Harukuni TOKUDA², XU FengHao², Masaki INOUE¹

¹ Department of Molecular Reproductive Biology, 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 College of Medicinal Pharmaceutical and Health Sciences Laboratory of Environmental and Health Sciences, Kanazawa University

Hot water extract of adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) seed, commonly called Yokuinin, has been used as herbal medicine for treating verruca vulgaris, et al. Although there have been a number of studies on the usefulness of Yokuinin, the pharmacological assessment of its husk, pellicle, and astringent skin remains unclear. In this line, we evaluated the effect of methanol extract from all parts of adlay grain (seed, husk, pellicle, astringent skin) on cancer cells and identified its useful chemical components. Results revealed that a fraction of the extract have weak growth-suppressing activity on human cervical cancer cell line (HeLa cell). In particular, 5,7-dihydroxychromone and coixol were isolated and identified from the active fraction. This indicates the possible cancer chemopreventive efficacy of methanol extract from adlay. Moreover, further tests are needed to determine the role of 5,7-dihydroxychromone.

Key words: *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf, cancer chemoprevention, 5,7-dihydroxychromone, coixol