

かいわれ大根の生長と培養ヒト歯根膜線維芽細胞の形態変化に及ぼすウコンの効果

Effect of curcuma longa on the growth of japanese radish and the shape change of human peliodontal ligament derived fibroblasts

山口和美・鈴木幸江・川瀬俊夫*・西口栄子

Kazumi Yamaguchi, Yukie Suzuki, *Toshio Kawase, Eiko Nishiguchi

(湘南短期大学歯科衛生学科)

*(神奈川歯科大学歯科生体工学教室)

緒言

生薬のウコンは、ショウガ科に属し、中国ではきょうおうという。ウコンは、春ウコン、秋ウコン、がじゅつの三種類が良く知られている。その成分のほとんどは糖質で30~50%を占め、次いでタンパク質や食物繊維、脂肪、ミネラル類、精油類であるが、特殊成分としてウコンの色素であるクルクミン、精油分、ミネラル等が含まれることが特徴である。三種類のウコン特殊成分含有量を比較してみると、春ウコンでは、クルクミンおよびその誘導体等の黄色色素が約0.3%、精油成分6.0%（主成分セスキテルペン類（ターメロン、クルクモール、 β -エレメン等）約78%、モノテルペン類（カンファー・カンフェン等）約3.3%、ミネラル約6.0%、その他フラボノイド・タンニン等である。秋ウコンは、クルクミンおよびその誘導体等の黄色色素約3.6%、精油分1.5%、そのうち、主成分セスキテルペン類（ターメロン・デヒドロターメロン・ジギベレン等約70%、モノテルペン類（シネオール等）約1.0%、ミネラル約0.85%である。がじゅつは、クルクミンおよびその誘導体等の黄色色素はなく、精油成分の主成分セスキテルペン類（ターメロン・クルクモール・ク

ルクマジオール・クルコロン・クルゼレノン・アズレンセデロン等）約50%、モノテルペン類（シネオール・カンファー・カンフェン・フラノジエノン・ピネン等）約45%、ミネラル約1.3%、その他サポニン・フラボン系配糖体・樹脂・粘液・ゴム質等である。¹⁾

ウコンの効果との関係で良く知られているのは、クルクミンと精油成分である。特に、クルクミンの効果については多くの研究者によって報告されている。Pulla Reddy A.Ch, Lokesh B.R.²⁾、Sreejavan N., Reo MN,³⁾ Bonte F et. al.⁴⁾、Sugiyama Y et. al.⁵⁾ はクルクミンの抗酸化作用について報告している。また Ashok k et. al.⁶⁾、Ruby JA et. al.⁷⁾、小林ら⁸⁾、阿部⁹⁾はクルクミンに抗炎症作用があることを、Stoner G.B. et. al.¹⁰⁾、Subhash C et. al.¹¹⁾、Henry P.C.¹²⁾、Takuji T¹³⁾は抗腫瘍作用があることを報告をしている。

我々は、これらのウコンの効果に注目して、ウコンのかいわれ大根の発芽・生長への影響、培養ヒト歯根膜線維芽細胞への影響を観察した。

対象と方法

1. ウコン溶液でのかいわれ大根の発芽・生長状態の観察

試験液を入れた透明なプラスチック容器の上に、5 mm 方眼の金網を置き、その上に薄く綿花を置き試験液が伝わるようにした。その上に条件が同じかいわれ大根の種子を100粒重ならないように蒔いた。

Control には蒸留水を用い、試験液は春ウコン溶液 (0.05%、0.01%、0.005%、0.001%)、秋ウコン溶液 (0.05%、0.01%、0.005%、0.001%)、がじゅつ溶液 (0.05%、0.01%、0.005%、0.001%) を用いた。

綿花が充分試験液に浸るように種子を撒いた綿花を試験液で濡らし、陽の当たる窓ガラス越しに置いて、室温を25°C に設定した。発芽するまでは、表面を紙で覆い、発芽後取り去った。綿花が乾燥しないように1日1回同じ検液を補充し、かいわれ大根の成長状態を観察した。3回実験を行い判定した。

2. ヒト歯根膜線維芽細胞の培養

歯根膜由来の線維芽細胞 (HPLF) は、kawase^{14,15)}らによる歯根膜組織片の explant によるサンドイッチ法により、遊走した細胞を初代培養細胞として得た。培養は dish にて行い、5%牛胎児血清 (FCS: Whittaker bioproducts)、50 μ g/ml アスコルビン酸 (和光純薬) および抗生物質 (100units/ml penicillin & 100 μ g/ml streptomycin Gibco#600-5/40) を含む Dulbecco's modified Eagle medium (D-MEN: 日本製薬) 中に懸濁させ、37°C、5% CO₂、湿度95%以上の CO₂ incubator 内で培養した。細胞継代は、0.25% trypsin (1/250, Difco laboratories) を含む PBS (-) (Ca²⁺, Mg²⁺ free phosphate buffered saline: 日本製薬) を用いて行い、6-10継代の細胞を用いた。

D-MEN buffer 中に懸濁させて、(約1.8×10⁴/cm²) 24穴マイクロプレーに分注し、5%CO₂、37°C で4日間培養して、ほぼ confluent の状態の細胞を用いた。

3. ウコンによる培養ヒト歯根膜線維芽細胞の形態変化の観察

培養ヒト歯根膜線維芽細胞に春ウコン溶液 (0.05%、0.005%、0.001%)、秋ウコン溶液 (0.05%、0.005%、0.001%)、がじゅつ溶液 (0.05%、0.005%、0.001%) を作用させ、撒種後1日、3日、5日の細胞の状態を位相差顕微鏡 (Nikon TE300) で観察した。

結果

1. かいわれ大根の発芽・生長におよぼすウコンの効果

春ウコン、秋ウコン、がじゅつの各0.05%、0.01%、0.005%、0.001%溶液をプラスチック容器に入れ、かいわれ大根の発芽・生長状態を観察した。その結果、1日目の発芽状態には差が見られなかった。3日目の生長状態 (最も伸びた茎の長さ) を観察した結果、control では、平均生長は2.33±0.58cm (平均値±標準偏差)、春ウコン溶液では、0.05%溶液4.20±0.00cm、0.01%溶液4.33±0.58cm、0.005%溶液3.93±0.12cm、0.001%溶液4.10±0.58cm、秋ウコン溶液では0.05%溶液4.00±0.00cm、0.01%溶液3.33±0.58cm、0.005%溶液2.93±0.12cm、0.001%溶液4.00±1.00cmであった。がじゅつ溶液では、0.05%溶液3.67±0.58cm、0.01%溶液3.67±0.58cm、0.005%溶液3.90±0.12cm、0.001%溶液1.00±0.00cmであった。3日目の茎の生長状態は三種類のウコンの間に有意差はなかった。5日目の生長状態は、control では6.67±1.15cmであった。春ウコン溶液では、0.05%溶液8.80±0.58cm、0.01%溶液8.33±0.58cm、0.005%溶液8.00±1.00cm、0.001%溶液8.33±0.58cmであった。秋ウコン溶液では0.05%溶液8.67±0.58cm、0.01%溶液8.00±1.00cm、0.005%溶液7.17±0.24、0.001%溶液8.00±0.00cmであった。がじゅつ溶液では、0.05%溶液8.33±0.58cm、0.01%溶液8.00±0.58cm、0.005%溶液7.00±1.00cm、0.001%溶液6.83±1.04cmであった。5日目の茎の生長状態は三種類のウコンの間に有意差はなかった。7日目の生長状態は、control では、8.50±0.50cm

であった。春ウコン溶液では、0.05%溶液 $11.20 \pm 0.58\text{cm}$ 、0.01%溶液 $10.47 \pm 1.44\text{cm}$ 、0.005%溶液 $9.67 \pm 0.58\text{cm}$ 、0.001%溶液 $9.67 \pm 1.18\text{cm}$ であった。秋ウコン溶液では0.05%溶液 $10.67 \pm 0.58\text{cm}$ 、0.01%溶液 $10.33 \pm 0.58\text{cm}$ 、0.005%溶液 $8.33 \pm 0.58\text{cm}$ 、0.001%溶液 $8.33 \pm 0.58\text{cm}$ であった。がじゅつ溶液では、0.05%溶液 $9.00 \pm 1.73\text{cm}$ 、0.01%溶液 $8.83 \pm 0.29\text{cm}$ 、0.005%溶液 $9.17 \pm 0.76\text{cm}$ 、0.001%溶液 $8.50 \pm 0.50\text{cm}$ であった(図1、図2、図3、図4)。7日目の茎の生長状態は三種類のウコンの間に有意差はなかった。各

生育日数において、平均生長は、三種のウコンの間に有意な差は見られなかったが春ウコンの生長が良好であった。

2. 培養ヒト歯根膜線維芽細胞の形態におよぼすウコンの効果

培養ヒト歯根膜線維芽細胞の形態に及ぼすウコンの影響を観察した結果、コントロールでは、5日間の培養で細胞の形態は変化せず、細胞の状態も良好であった(図5)。0.05%春ウコン溶液、0.05%秋ウコン溶液、0.05%がじゅつ溶液を作用させて培養した結果、0.05%春ウコン溶

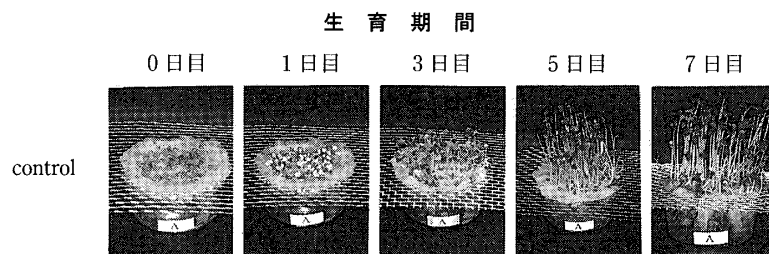


図1. 蒸留水によるかいわれ大根の発芽・生長状態

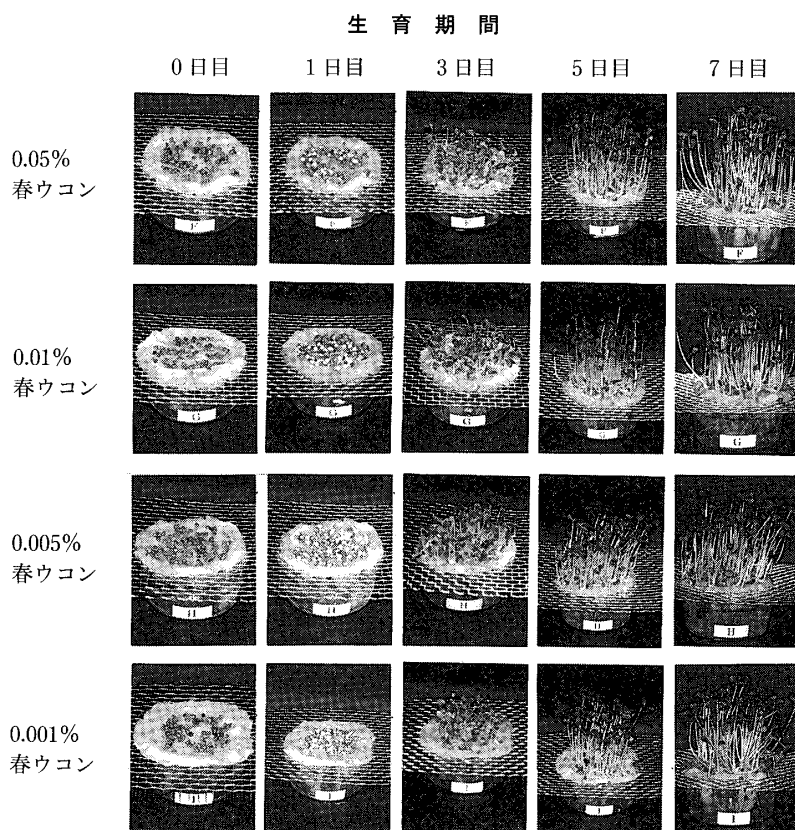


図2. 各種濃度の春ウコン溶液によるかいわれ大根の発芽・生長状態

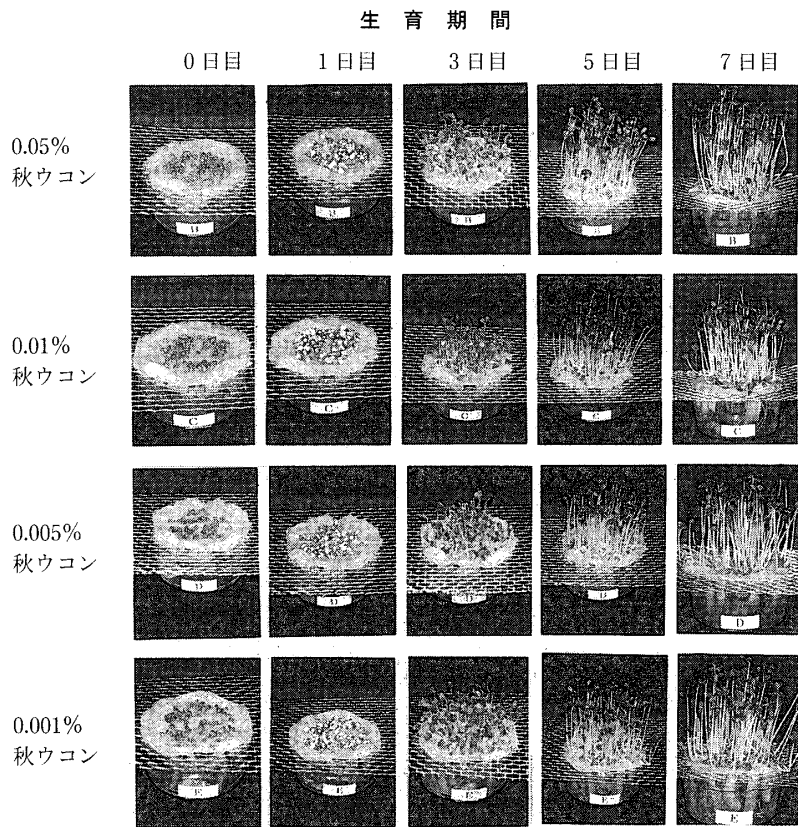


図3. 各種濃度の秋ウコン溶液によるかいわれ大根の発芽・生長状態

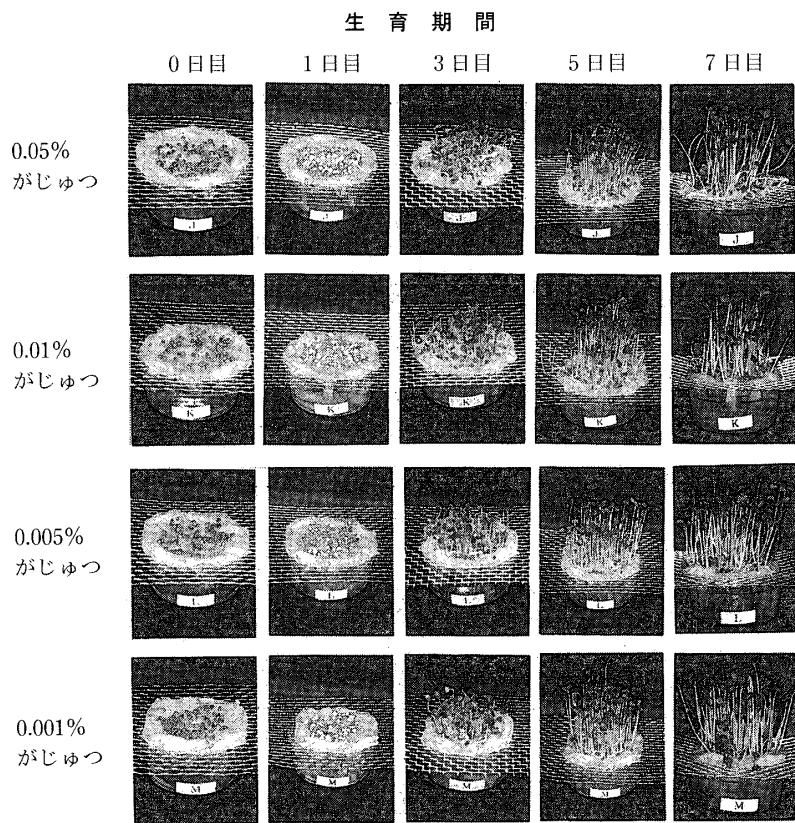


図4. 各種濃度のがじゅつ溶液によるかいわれ大根の発芽・生長状態

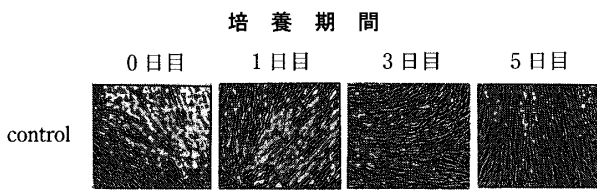


図5. ウコン無添加培地での培養による培養ヒト歯根膜線維芽細胞の形態変化

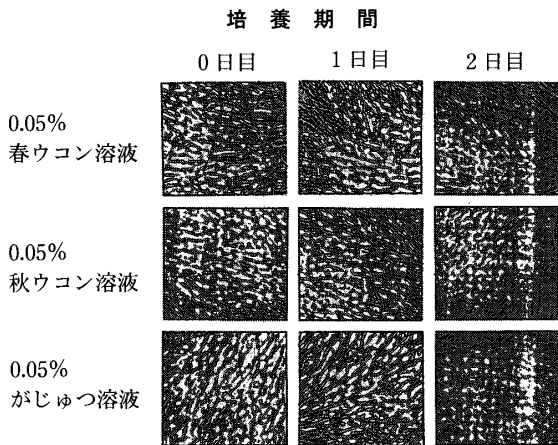


図6. 高濃度(0.01%)の春ウコン、秋ウコン、がじゅつ溶液での培養による培養ヒト歯根膜線維芽細胞の形態変化

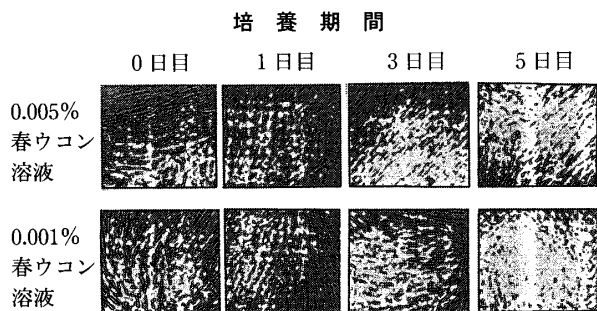


図7. 各種濃度の春ウコン溶液での培養による培養ヒト歯根膜線維芽細胞の形態変化

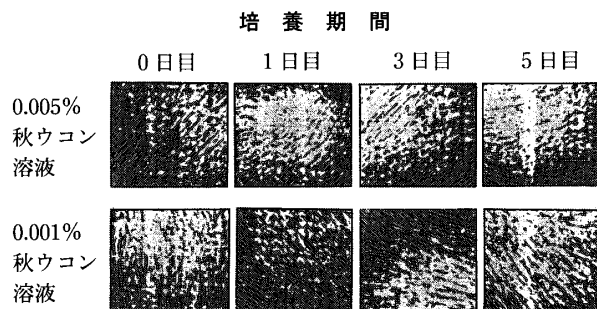


図8. 各種濃度の秋ウコン溶液での培養による培養ヒト歯根膜線維芽細胞の形態変化

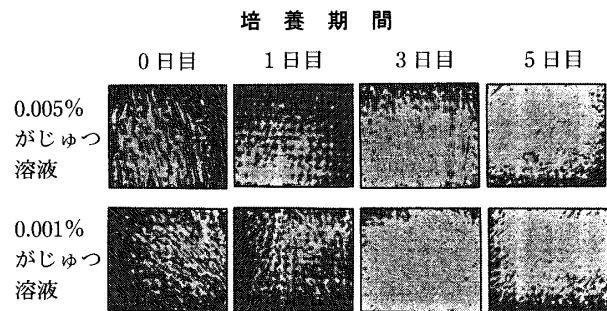


図9. 各種濃度のがじゅつ溶液での培養による培養ヒト歯根膜線維芽細胞の形態変化

液では細胞の形態に大きな変化は観察されなかったが、0.05%秋ウコン溶液、0.05%がじゅつ溶液では作用後、1日目で細胞の形態に変化が現れ、溶解が始まった。2日目では、3種類のウコン溶液共に細胞の形態変化は著しく、細胞の溶解も進んだ。溶解の程度は、0.05%がじゅつ溶液、0.05%秋ウコン溶液、0.05%春ウコン溶液の順であった(図6)。

0.001%春ウコン溶液、0.001%秋ウコン溶液、0.001%がじゅつ溶液では、作用後、1日目、3日目、5日目の細胞の状態はcontrolと同様に細胞の形態変化も観察されず、状態は良好であった。0.005%春ウコン溶液では、0.001%春ウコン溶液同様に作用後、1日目、3日目、5日目の細胞の形態に異常は観察されず、細胞の状態は良好であった(図7)。0.001%秋ウコン溶液、0.005%秋ウコン溶液では作用後、1日目、3日目、5日目の細胞はcontrolと同様に形態変化は観察されず細胞の状態は良好であった(図8)。0.001%がじゅつ溶液、0.005%がじゅつ溶液ではcontrolと同様に作用後、1日目、3日目、5日目の細胞に形態変化は観察されず細胞の状態は良好であった(図9)。

考察

ウコンは熱帯アジア諸国に産生するショウガ科多年生の植物で、多くの研究者によってその効能が研究され、利胆、芳香性胃健、止血、抗炎症作用等への効果が報告されている¹⁾。クル

クミンは cyclooxygenase と 5-lipoxygenase の dual inhibitor であり、抗酸化作用を有している。我々も、秋ウコン、春ウコン、がじゅつの抗酸化能について観察した結果、秋ウコン、春ウコンに大きな差はないが秋ウコン、春ウコン、がじゅつの順に抗酸化能が観察された¹⁶⁾。この結果は Pulla reddy A.Ch と Lokesh B.R.²⁾、Sreejavan N. と Reo M.N.³⁾、Bonte F. et. al.⁴⁾等が報告している結果と一致する。また、Stoner G.B. と Mukhtar, H.¹⁰⁾は curucumin の腫瘍抑制効果もこの抗酸化作用によるとしている。クルクミンの抗酸化作用として、活性酸素の除去または安定、反応中間機構への作用による発症の阻害、酸素分子による酸化反応の抑制、ある種の酸化酵素の活性の抑制、体内における金属イオンの酸化特性の軽減などがあげられている。

我々は、かいわれ大根の発芽・生長状態を観察することでウコンの植物の生長に及ぼす効果を観察した。その結果を control と比較すると、生長3日、5日、7日共に、春ウコン溶液、秋ウコン溶液、がじゅつ溶液の順に生長状態が良好であったが、3日目は0.01%春ウコン溶液での生長が良く、秋ウコン溶液、がじゅつ溶液は共に0.001%濃度で生長が良好であった。5日目は、春ウコン溶液、秋ウコン溶液の0.05%濃度の生長が良く、次いでがじゅつ溶液の0.05%濃度での生長が良好であった。7日目は0.05%春ウコン溶液、0.05%秋ウコン溶液の生長が良好であった。三種類のウコンのうち春ウコン、秋ウコンは高濃度の溶液の方が低濃度の溶液より効果的であった。中でも春ウコン溶液での生長が良好であった。また、培養中のヒト歯根膜線維芽細胞へウコンを作用させて細胞の形態変化を観察した場合、0.05%の高濃度の溶液で培養した場合、培養2日目で、いずれの場合も細胞が溶解した。その中で春ウコン溶液での溶解の程度が軽いようであった。低濃度での培養では、培養5日目で0.001%、0.005%の春ウコン溶液、秋ウコン溶液、がじゅつ溶液共に細胞の形態に変

化は観察されず、細胞の状態は良好であった。

かいわれ大根の生長にウコンが効果を示す理由は、ウコンの成分の何によるかは、本実験では明らかではないが、ウコンの成分のうち、抗酸化能を持つ成分であるクルクミンは、春ウコン0.3%、秋ウコン3.6%、がじゅつ0%、又、精油分は、春ウコン6%、秋ウコン1~5%、がじゅつ1~1.5%、ミネラル類は、春ウコン6%、秋ウコン0.8%、がじゅつ1.3%となっており、精油分、ミネラル等に関係があることも考えられる。また、培養ヒト歯根膜線維芽細胞に対しては、ウコンによる培養ヒト歯根膜線維芽細胞の細胞破壊も報告されているが、濃度によることも考えられる。低濃度の場合には、細胞破壊は起こらないのではないかと考える。高濃度で細胞破壊が生じる原因も本実験では明らかに出来ない。今後更なる観察が必要と考える。

以上の結果より、かいわれ大根の発芽・生長にはある程度の高濃度(0.01~0.05%程度)、培養ヒト歯根膜線維芽細胞の成長には低濃度(0.001~0.005%程度)の春ウコンが効果的と考える。

参考文献

- 1) 尾崎寿：自然薬草 ウコンの活力、保育社現代書林、(1997)
- 2) A.Ch. Pulla Reddy and Belur R.Lokesh., Studies on the inhibitory effects of curucumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron., Molecular and Cellular Biochemistry., 137, 1-8, (1994)
- 3) Srejayan, N., Reo, MN., Freeradical scavenging activiof curcuminoids., Arzneimi-ttel-Forschung., 46(2), 169-71, (1996)
- 4) Bonte, F., Noel Hudson, Ms., Wepierre, J., Meybeck, A., Protective effect of curcuminoids on epidermal skin cells under free oxygen radical stress., Planta Medica., 63(3), 265

- 266, (1997)
- 5) Sugiyama, Y., Kawakisi, S., Osawa, T., Involvement of β -diketone moiety in the anti-oxidative mechanism of tetrahydrocurcumin., *Biocem Pharm.*, 52, 519, (1996)
 - 6) Ashok Kumar, Subhash Dhawan, Neil JH and Bharat BA., Curucmin (Diferuloylmetane) inhibition of tumor necrosis factor (TNF)-mediated adhesion of monocytes to endo-thelial cells by suppression of cell surface expression of adhesion molecules and of nuclear factor-k β activation., *Biochemical phamacology.* 55, 775-783, (1998)
 - 7) Ruby John Anto, Girija Kuttan, K.V. Dinesh babu, K.N. Rajasekharan and Ramadasan Kuttan, Anti-inflammatory activity of natural and synthetic curcuminoid., *Pharm. Pharmacol. Common.*, 4, 103-106, (1998)
 - 8) 小林達也、橋本修、児浦利哉、小泉昭、小林朋子、馬島徹、堀江孝至、クルクミンのリンパ球の IL- 5 産生に及ぼす影響、日本胸部疾患学会雑誌、34、増刊225、(1996)
 - 9) 阿部義昭、橋本修、石井久美子、羽田憲彦、林伸一、小林達也、吉田祥子、堀江孝至、クルクミンのヒト末梢単球のサイトカイン産生に及ぼす影響、日本胸部疾患学会雑誌、34、増刊225、(1996)
 - 10) Stoner, GB., Mukhtar, H., Polyphenoles as cancer chmoprevebtivive sgents., 22, 169-180, 1995
 - 11) Subhash C.Gautam, Yong X.Xu, Kirit R.Pindolia, Nalini Janakiraman and Robert A.Chapman., Nonselective inhibition of proliferation of transformed and nontransformed cells by the anticancer agent crucumin (diferuloylethane) ., *Biochemical Phamacology.*55, 1333-1337, (1998)
 - 12) Henry P.Ciolino, Phillip J.Daschner, Thomas T.Y. Wang and Grace Chao Yeh., Effect of curcumin on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1 A 1 in MCF- 7 human Breast carcinoma cells., *Biochemical Phamacology.* 56, 197-206, (1998)
 - 13) Takuji Tanaka, Hiroki Makita, Masaami Ohnishi, Yoshinobu Hirose, Aijin Wang, Hideki Mori, Kumiko Satoh, Akira Hara, and Hiroshi Ogawa., Chemoprevention of 4-nitro-Quinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary curcumin and hesperidin: Comparison with the protective effect of β -carotene., *Canser research.* 54, 4653-4659, (1991)
 - 14) kawase T, Sato S, Yamada M, Hiyama A, Miyake K and Saito S:Human periodontal ligament cells in vitro:characterigation of alkaline phosphatase., *J.Bone Miner Res.*, 1 :13A, (1986)
 - 15) Kawase T, Sato S, Miyake K and Saito S:Alkaine phosphatase of human periodontal-ligament fibbbroblast-like cells., *Adv. Dent. Res.*, 2, 234-239, (1988)
 - 16) 山口和美、鈴木幸江、西口栄子、食品の酸化性について、湘南短期大学紀要、13、15-22, (2002)