

食品抗酸化物による血管内皮細胞障害防止効果の解析 (I)

: 血管内皮酸化障害モデルの作成

葛 谷 恒 彦
松 口 貴 子
舩 谷 真 奈
北 尾 悟 憲
杉 谷 義 憲

序論

現在、日本では食生活の欧米化や運動不足など生活様式の急速な変容にともない、肥満、高血圧、糖尿病、高脂血症などが急増し、深刻な問題となっている。これらはいずれも動脈硬化性疾患の発症・進行を促進することから、生活習慣病と総称し、その一次予防の重要性が指摘されつつある。生活習慣病の原因には、多数の要因が関与するが、そのひとつとして活性酸素生成に基づく生体酸化障害があげられる。低比重リポタンパク (LDL) の酸化や、血管内皮細胞由来の一酸化窒素 (NO) の酸化失活が動脈硬化の成立に律速段階として関与することもその一例である。

このような生体酸化障害を防止することを目的として、抗酸化物質を適用する方策が試みられつつあるが、その効果については一定した見解を見るに至っていない。その原因の一つとして、従来の研究は抗酸化ビタミンとして知られるビタミン A、C、E を用いたものが多いが、その抗酸化活性が生体内で十分効果を発揮していない可能性も考えられる。一方、食品化学の進歩と相俟って、これらのビタミン類より強力な抗酸化能をもつ食品因子 (フラボノイド、カロテノイドなど) が数多く見出され、これらの因子を機能性食品あるいはサプリメントとして食生活に適用していくことが期待されている。フランス、イタリアなどにおいて相対的に動脈硬化性疾患発症の少ない理由が、アントシアニン (ポリフェノール) 含有量の多い赤ワインを常飲する習慣に起因するとの疫学研究の示唆によってこの期待はより増しつつある。

食品抗酸化物を生活習慣病の予防に適用していく上で困難な点は、多種類の因子が食品に複合して存在し、かつこれら摂食後の生体内利用も多様であるため、抗酸化因子の効果を科学的に追求し難いことである。現在多用されつつある抗酸化食品・サプリメントも利用者の健康志向に便乗したブームの域を出ない。このため、食品抗酸化物を有効利用するためのステップとして、食品から純化・濃縮した抗酸化物質が生体細胞のレベルで有効に酸化障害を防止し得るか否かを検討する必要がある。

目的

本研究では、生活習慣病の発症・進展に深くかかわる、“活性酸素”に着目し、活性酸素を除去する働きがある抗酸化物質が生体内でどのように作用するかを明らかにする目的で、ヒト細胞を用いて酸化障害モデルを作成し、抗酸化物質の細胞障害抑制効果の解析を試みた。血管内皮細胞における活性酸素の生成は、LDLの酸化や一酸化窒素（血管内皮依存性血管弛緩物質）の酸化失活を通じて動脈硬化性血管障害を発症・進展させることから、本研究では血管内皮を細胞対象とした。酸化障害を模擬する方法としては数種類あるが、今回は、細胞障害を可能な限り基準化させるために一定量の活性酸素を外因的に負荷する方法を用いた。

研究材料

1. 機器

CO₂ インキュベーター (MCO-17AIC)、バイオクリーンベンチ (MCV-B91F) は三洋電機 (株) のものを使用した。卓上多本架遠心機 (LC100)、オートクレーブ (BS-245) はトミー工業 (株) のものを使用した。マイクロプレートリーダーは日本バイオ・ラッドラボラトリーズ (株) のものを使用した。-80°Cディープフリーザー (ULT-390-3JA) は、朝日ライフサイエンス (株) のものを使用した。デジタルカメラ (CH-20-11S)、倒立顕微鏡 (CK30-F100) は OLYMPUS のものを使用した。

2. 試料

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞、培地 (EGM Bullet-Kit)、トリプシン (0.025%) / EDTA (0.01%)、HBSS (HEPES 緩衝塩溶液)、TNS (トリプシン中和液) を CAMBREX 社から購入した。H₂O₂ を三菱瓦斯化学 (株) から購入した。クメンヒドロペルオキシド溶液 (以後「クメン」)、界面活性薬 Tween20 をキシダ化学 (株) から購入した。乳酸脱水素酵素活性測定試薬は極東製薬工業 (株) から購入した。

3. 試料の調整方法

(i) 培地

内皮細胞 Basal Medium (EBM) に hEGF (ヒト上皮細胞成長因子)、Hydrocortizone (副腎皮質ホルモン)、BBE (牛の脳から抽出したたんぱく質)、FBS (子牛の血清)、Gentamicin / Amphotericin-B (抗生物質)、Penicillin / Streptomycin (抗生物質) を加えた。

(ii) リン酸緩衝液 (PBS)

1 ℓ ビーカーに KCl 2 g、KH₂PO₄ 2 g、NaCl 80g、Na₂HPO₄・12H₂O 28.85g を入れ、800ml まで精製水を入れた。pH メーターで、溶液の pH を 7.4 に調製した。1 ℓ メスシリンダーで 1 ℓ にメスアップし、試薬ビンに入れ、アルミホイルをかけてオートクレーブで滅菌し、常温で保存した。実験に使用する際は、この溶液を精製水で 10 倍に薄め、オートクレーブで滅菌し、冷蔵庫で保存した。

方法

1. 血管内皮細胞の調整

- (i) 凍結細胞が入ったセラムチューブを 37°C の恒温槽で融解し、クリーンベンチ内で遠沈管に細胞を取り出した。培地を 5 ml 加え、遠心分離 (1,500rpm、6 分)、上澄みを除去した後、再び培地 5 ml を加えた。細胞が均一になるように懸濁、血算盤で細胞数をカウントし、底面積 75cm² のフラスコ (以後フラスコとする) に 20 ~ 80 万個ずつ播いた。
- (ii) 37°C、CO₂ 5.0% に設定したインキュベーター内で細胞がコンフルエントになるまで培養した。その期間 2 ~ 3 日毎に培地の交換を行った。その際には PBS で洗浄し、死滅細胞を取り除いた後、新たな培地を加えた。
- (iii) コンフルエントになった細胞を培養プレートから分離、継代した。継代の方法は、培地を吸い出した後 HBSS で洗浄し、トリプシン、EDTA 処理を約 3 分間行った後、TNS で残存するトリプシンを中和失活させた。続いて遠心分離 (1,500rpm、6 分)、上澄みを除去した後、新しい培地を加えた。細胞が均一になるように懸濁し、血算盤で細胞数 (n) をカウントした。細胞数は、 $n \times 10^4 \text{ cells} / \text{ml} \times \text{懸濁液量} \times 0.7$ (細胞の生存率) で求め、20 ~ 80 万個になるようにフラスコに播いた。
- (iv) 上記の継代操作を繰り返して細胞を分裂・増殖させ、7 代目の継代を上限として、以下に述べる細胞障害実験に供するため、底面積 2.0cm² の培養プレート (24 穴) に細胞を播いた。

2. 細胞死の判定

(i) 細胞の形態

①自然死

添加物の含んでいない培地 (EBM) を 1 時間、細胞に与え顕微鏡で観察したところ、紡錘状の形態をした細胞がプレート底面一層に敷き詰まった形態を呈し、ごく一部の円形縮小化した細胞が浮遊していた (図 1 左)。

② Tween20 による細胞死

全細胞を死滅させる目的で強い界面活性 (細胞膜破綻) 作用をもつ Tween20 を細胞に与え、

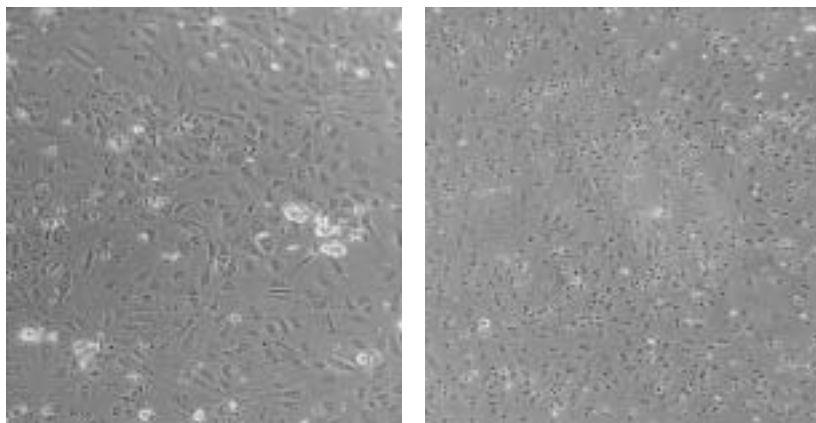


図 1 : 自然死の細胞形態 (左) 5 % Tween20 負荷による細胞形態 (右)

* 倍率 100 倍

1 時間後に観察した。図 1 右に示すように、ほぼすべての細胞が円形縮小化し、浮遊した。

(ii) 乳酸脱水素酵素 (LDH) アッセイ

細胞膜の障害で細胞質から培地に出る逸脱酵素、乳酸脱水素酵素 (LDH) を乳酸→ピルビン酸、NAD→NADH、ニトロテトラゾリウムブルー→ホルマザンの反応と共役させて、発色反応を 560nm の吸光度で測定した。具体的には、細胞を 24 穴 (1 ウェル = 2.0cm²) に 5 万個ずつ継代 (3 日間)、培養した。細胞シートに、培地で希釈した各濃度の Tween20、及び酸化剤を 24 穴に 1 ml ずつ入れ換え、時間ごとに培地 50 μl を採取、96 穴 (1 ウェル = 0.32cm²) に 50 μl 移し、発色試薬を 50 μl ずつ加えた。インキュベーター内 (37°C、CO₂ 5.0%) で 30 分間反応させた後、反応停止液を 100 μl ずつ加え、吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

結果

1. 細胞死の基準化：Tween20 による細胞死 (100%細胞死)

Tween20 による細胞障害を明らかにするために、その濃度並びに時間依存性を検討した。時間差実験では、0.5% Tween20 を与えた。その結果、吸光度は反応時間とともに上昇し、60 分後にピークに達した (図 2)。濃度差実験では、5% に希釈したものが一番高い吸光度を示

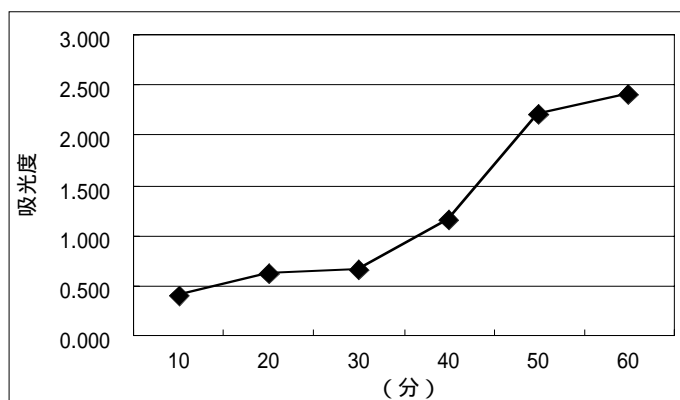


図 2 : 0.5% Tween20 負荷による時間差実験

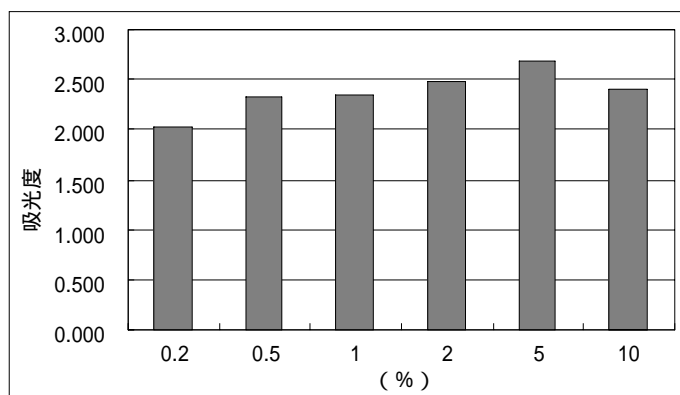


図 3 : Tween20 負荷による濃度差実験

した(図3)。これより、5%、60分を100%細胞死とした(図1右)。

2. 血管内皮細胞の酸化障害モデル

(i) 過酸化水素 (H_2O_2)

細胞の酸化障害を誘起させるために、各濃度の H_2O_2 を一定時間細胞と反応させた。自然死による LDH の活性を 0% とし、上記の実験で得た 5% Tween20 の 1 時間後の LDH の活性を 100% として酸化障害率を求めた。

その結果、0.1 mM、0.5 mM の負荷では細胞形態は、自然死とほぼ同様で、酸化障害率も 10% 以下と低かった。1 mM 負荷では細胞は紡錘状から円形状へと変化しつつあり、浮遊細胞も自然死と比べ増加し、酸化障害率も反応時間に関係なくほぼ 40% であった。5 mM では、自然死のような形態ではなく、紡錘状に見えるが細胞が連なって浮遊していた。酸化障害率の値は、1 時間後に 50% を超えた。10mM では Tween20 を与えたような細胞形態に類似し、円形縮小化していた。酸化障害率は、5 mM とほぼ同等であった(図4、5)。

反応時間別にみると 1 時間後が最も高い数値を示し、3 時間以降になると下降した。

(ii) クメンヒドロペルオキシド (クメン)

クメンによる酸化障害では、時間差実験と濃度差実験を同時に行った。酸化障害率は、 H_2O_2 と同様に算出した。

その結果、0.1mM、0.5mM 負荷では、自然死のような形態ではなく、紡錘状に見えるが細胞が連なって浮遊していた。酸化障害率は 20% 以下と低かった。1 mM、5 mM、10mM での形態は、Tween20 を与えたような形態に近くなり、円形縮小化して差が見られなかったが、酸化障害率では、1 mM で 3 時間後に 70% 以上になり、5 mM、10mM ではほぼ 100% に近い値を示した(図6、7)。

考察

本研究においては、食品抗酸化物質の生体作用を究明していく一環として、ヒト由来培養血管内皮細胞に活性酸素を外因性に負荷することにより細胞レベルの酸化障害モデルを作成した。細胞障害モデル作成にあたっては、細胞の形質が均一でかつ細胞数がある程度一定である細胞集団が確保できること、細胞障害の程度が評価可能であること、生体内酸化障害を模擬する酸化ストレス負荷が再現し得ることが基本条件となる。

まず、細胞の調整については、ヒト臍帯静脈から単離された初代血管内皮細胞を用いて継代培養を重ねることによって増殖させ、細胞数を確保することが可能であった。細胞継代を繰り返すと、一般に細胞は分化が進行し、血管内皮細胞においても毛細血管様の管腔を形成することが知られているが、今回は継代数を 3 代から 8 代までに限定することによって、均一な細胞形態をもつ細胞を調整することが出来た。そのため実験の際にすべての実験対象の細胞数が一定になるよう、底面積 2.0cm^2 の 24 穴プレートに細胞を 5 万個ずつ継代し、3 日間培養することにした。この間に細胞はコンフルエント状態となり細胞増殖が停止する(血管内皮細胞は 2 次元方向にのみ一層に増殖し、プレート底面を覆うと増殖が停止する) ために、細胞数がある程度基準化し得た

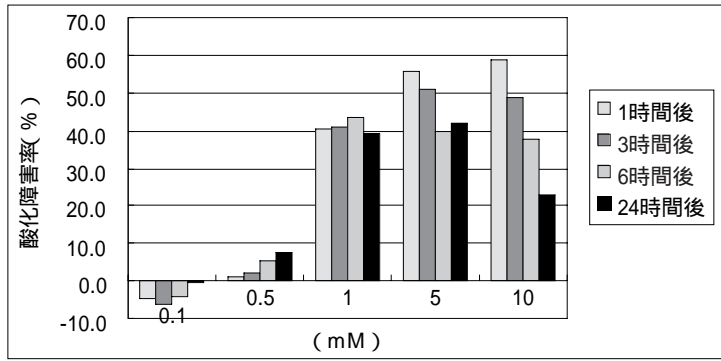


図4：過酸化水素負荷による酸化障害率

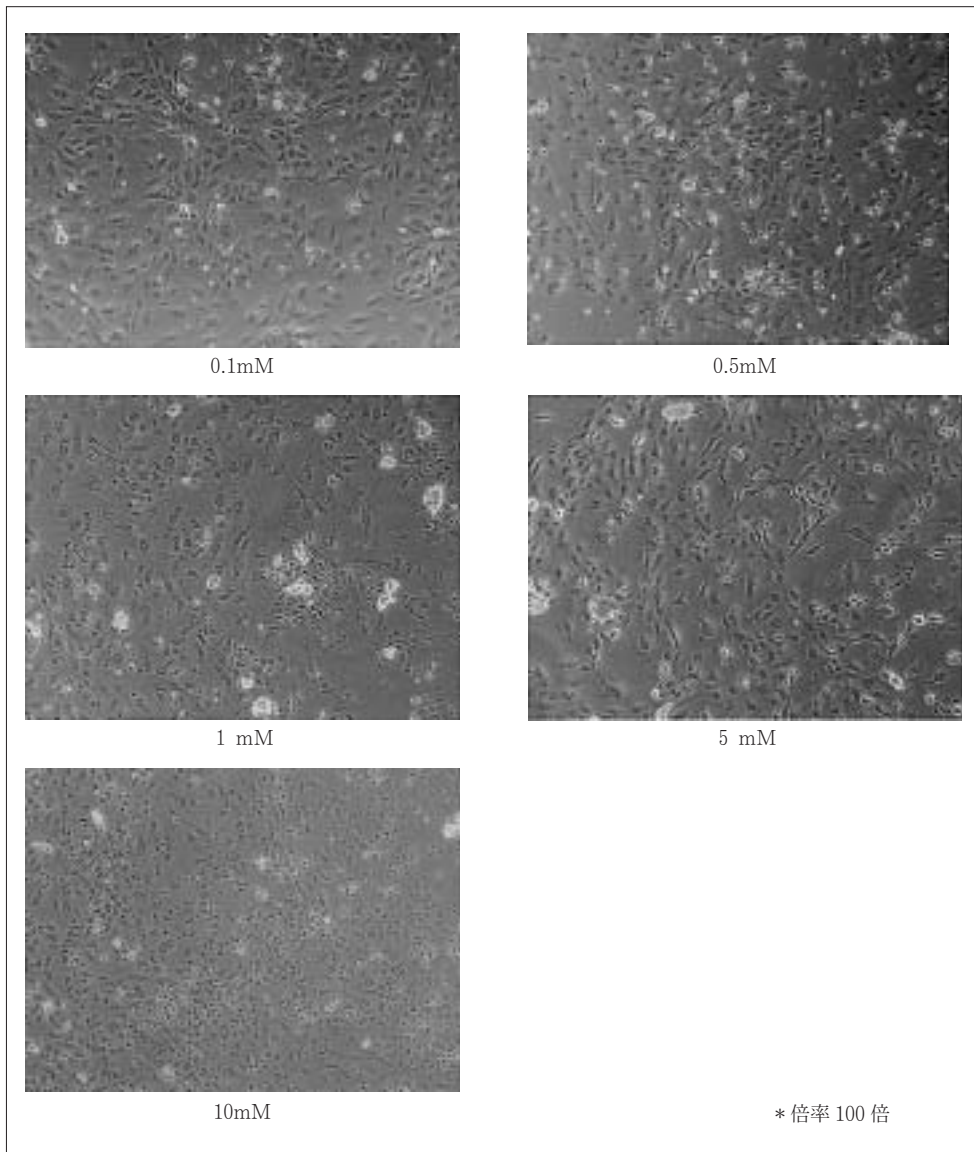


図5：過酸化水素負荷による細胞形態変化

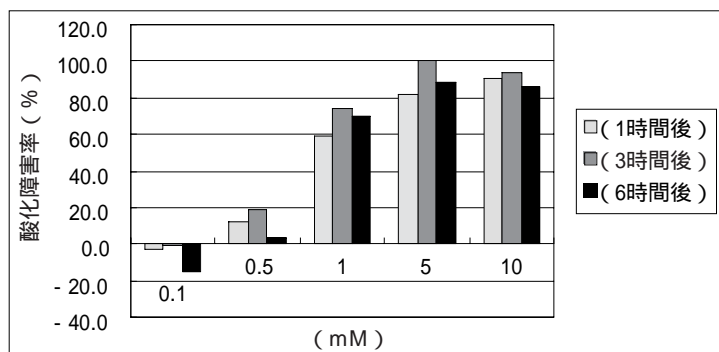


図6：クメンヒドロペルオキシド負荷による酸化障害率

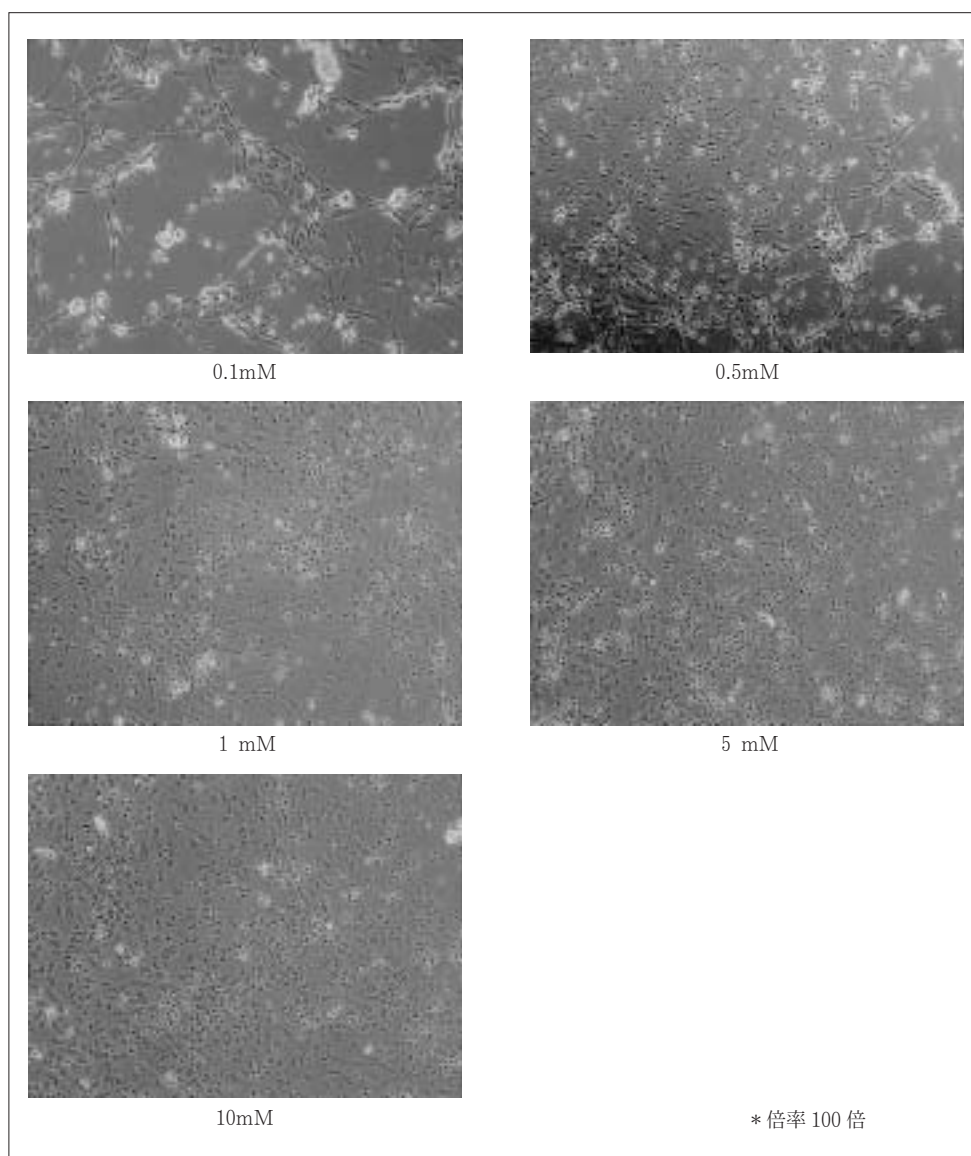


図7：クメンヒドロペルオキシド負荷による細胞形態変化

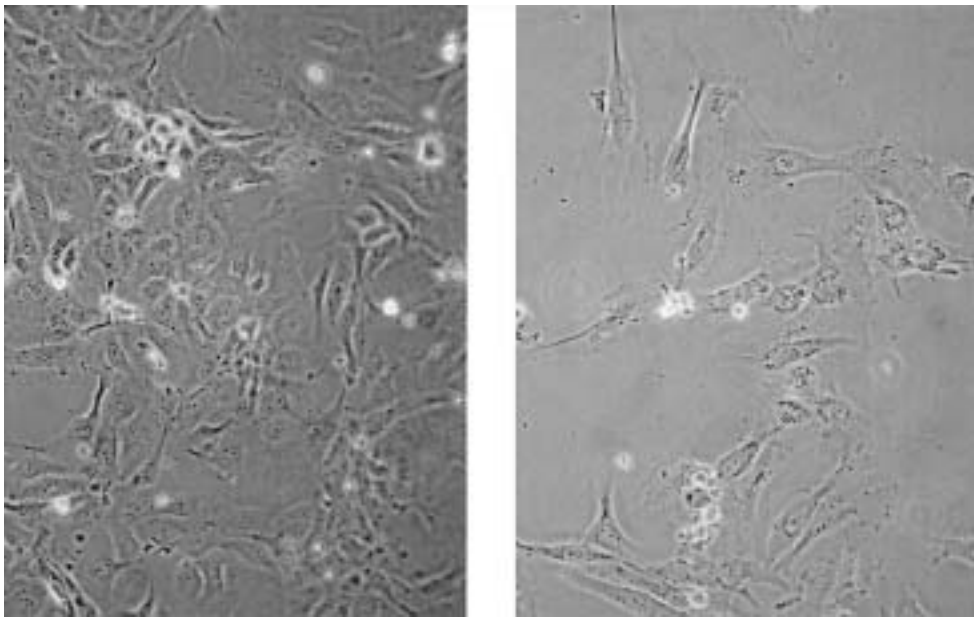


図 8 : 4 代目の細胞形態 (左) 8 代目の細胞形態 (右)
* 倍率 200 倍

めである。

細胞障害の評価は不可逆性の障害、すなわち細胞死の進行を細胞形態の観察と細胞質から培地に逸脱した乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を測定することによって行った。これは、細胞の酸化障害は主として細胞膜の破綻をもたらし、細胞の円形・縮小化を通じて細胞内高分子蛋白質が細胞外に逸脱するという、いわゆるネクロシスの死滅過程を経ることが解っていることによる。今回は、強力な界面活性を有する 5% Tween20 を反応させることによってほぼ全ての細胞が形態学的に死滅化し、かつ培地中の LDH 活性の上昇がピークに達するために、この条件を 100% 細胞死として規定した。尚、細胞調整中には僅かながら自然死する細胞も含まれるため、無処置の条件での LDH 活性を測定し補正することとした。

次に、酸化ストレスの負荷方法として、今回は過酸化水素 (H_2O_2)、脂質過酸化物クメンヒドロペルオキシドを外因性に投与することとした。低酸素・再酸素化を負荷したり、ミトコンドリア電子伝達系の脱共役薬や内因性抗酸化酵素の阻害薬を用いる方法も報告されているが、これらは一定した酸化ストレス負荷するという点で困難が予想されたために行わなかった。

今回、 H_2O_2 では、5 mM、10mM で負荷 1 時間後に酸化障害率が 50% に、クメンヒドロペルオキシドでは、5 mM で負荷 3 時間後に酸化障害率がほぼ 100% の高値を示した。これは、それぞれ内因性抗酸化酵素、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼで消去されずに残存した活性酸素が細胞の酸化障害に導いたものと考えられた。細胞の酸化障害率からみると、食品抗酸化物質の障害抑制効果を解析するにはクメンヒドロペルオキシドの方がより適切と考えられるが、生体内で生じる H_2O_2 による酸化障害の方がより生理的なモデルとも言える。今後、食品抗酸化物質の作用を追及していく上では、これら酸化障害モデルを並行して検討する必要がある。

今回、細胞に酸化ストレスを負荷する条件を設定するために、 H_2O_2 とクメンヒドロペルオキシドの濃度と反応時間を変えて解析したところ、比較的高濃度（5 mM、10mM）の H_2O_2 を負荷した場合、反応時間が延長するとともに見かけ上酸化障害率が低下する結果を得た。この原因は明らかではないが、高濃度の H_2O_2 を添加した場合、残存した H_2O_2 が培地に逸脱したLDH酵素蛋白を直接酸化し酵素活性を障害した可能性が一因として考えられる。いずれにしても、 H_2O_2 を用いて酸化障害モデルを作成する場合、5 mM以上の濃度を設定する際は少なくとも3時間以内の反応時間にとどめることが必要と考えられる。

今回、細胞障害モデル作成に際して調整した培養細胞は可能な限り継代数を一定にするよう心がけたが、継代数が増加すると細胞障害が変動する傾向が認められた（図8左：4代目、図8右：8代目）。これは、継代培養の手法として、トリプシン/EDTA処理を必要とするために、細胞に侵襲が加わり、このために細胞形質が変化し得る可能性が考えられた。また、培養細胞をコンフルエント状態にする際、プレートに播く細胞数を一定にしない場合にも、細胞障害が変動する傾向が認められた。これは、プレートに播く細胞数の多寡によって細胞分裂回数が異なるために、細胞形質が変化することに由ると考えられた。したがって、食品抗酸化物質の酸化障害抑制効果を解析する上においては、これらの変動因子を極力回避する注意が必要である。

参考文献

- 活性酸素と医食同源：分子論的背景と医食の接点を求めて
井上 正康編著、共立出版（東京）、1996
- 活性酸素：生物での生成・消去・作用の分子機構
中野 稔、浅田 浩二、大柳 善彦 編、共立出版（東京）、1996
- 活性酸素測定マニュアル
浅田 浩二、中野 稔、柿沼 カツ子 編、講談社サイエンティフィック、1998
- <http://www.hamt.or.jp/KENSA/VISITOR/TEST/CHEMICAL/ldh.html>
- <http://www.naoru.com/ldh2.htm>
- <http://www2.health.ne.jp/word/d2005.html>
- http://jns.ixla.jp/users/terada38480/myweb_002.htm
- <http://health.nikkei.co.jp/seikatu/no21/n21d.cfm>
- <http://homepage1.nifty.com/ikiiki-kenko/QA46.htm>
- <http://www.bekkoame.ne.jp/ro/t-fukui/kousanka.htm>
- <http://www.pio.co.jp/cgi-bin/vz/call.cgi?ID=AGC35C&Page=content1-1.html>
- <http://taisetsu.asa.hokkyodai.ac.jp/taisetsu/reports/v31/yazawaw.html>