

新しいラジカル発生 azobis 化合物 (AIPH) の 血管内皮細胞障害作用に関する研究

葛 谷 恒 彦
奥 谷 敦 子
辰 巳 未佐子
長谷川 朋 子
北 尾 悟

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伴い、肥満、高血圧、糖尿病、脂質異常症などいわゆる生活習慣病が急増し、深刻な社会問題となっている。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、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、主要因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、ヒト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。従来の研究では抗酸化物質としてビタミン A、C、E が用いられてきたが、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や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。ここ数年では緑茶由来のポリフェノールであるカテキン類が、強い抗酸化能を持っていることが発見され、緑茶が注目されているのも一例である。

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、食品因子の酸化障害抑制効果を細胞レベルで検討するために、ラジカルを定量的に発生させる働きのある物質として開発された azobis 化合物を用いて細胞酸化障害モデル作製を試みた。ヒト血管内皮細胞におけるラジカルの生成は、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、本研究ではヒト血管内皮を細胞対象とした。

研究材料

1. 機器

CO₂ インキュベータ (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-2Bullet-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。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。

2,2'-Azobis [2-(2-imidazolin-2-yl) propane] Dihydrochloride (以後「AIPH」) は和光純薬工業 (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-2) に FBS (子牛の血清)、Hydrocortizone (副腎皮質ホルモン)、hFGF-B (組換えヒト繊維芽細胞成長因子、塩基性)、VEGF (血管内皮増殖因子)、R³-IGF-1 (組換え長 R3 インシュリン様成長因子)、Ascorbic Acid (アスコルビン酸)、hEGF (ヒト上皮細胞成長因子)、GA-1000 (ゲンタマイシン; 抗生物質、アンホテリシン-B; 抗真菌薬)、Heparin (抗凝固作用)、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 KCl2g、KH₂PO₄2g、NaCl80g、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 に調整した。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。

(iii) AIPH

和光純薬工業（株）から購入した AIPH（分子量 323.27）を使用した。AIPH は両親媒性であるため、無添加の培地（EBM-2）を溶媒とし、1 mM、5 mM、10mM、100mM の 4 濃度の AIPH 溶液を用いて、細胞処理を行った。

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 加え細胞が均一になるように懸濁し、血算盤で細胞数をカウントし、底面積 75 cm² のフラスコ（以後フラスコとする）に 30~90 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（1000 rpm、5 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、 $n \times 10^4 \text{ cells/ml} \times \text{懸濁液量} \times 0.7$ （細胞の生存率）で求め、底面積 2.0 cm² の培養プレート（24 穴）の 1 ウェルに 5 万個になるように播いた。細胞障害モデル作製においては、継代装作を 5 回繰返したものをを用いた。

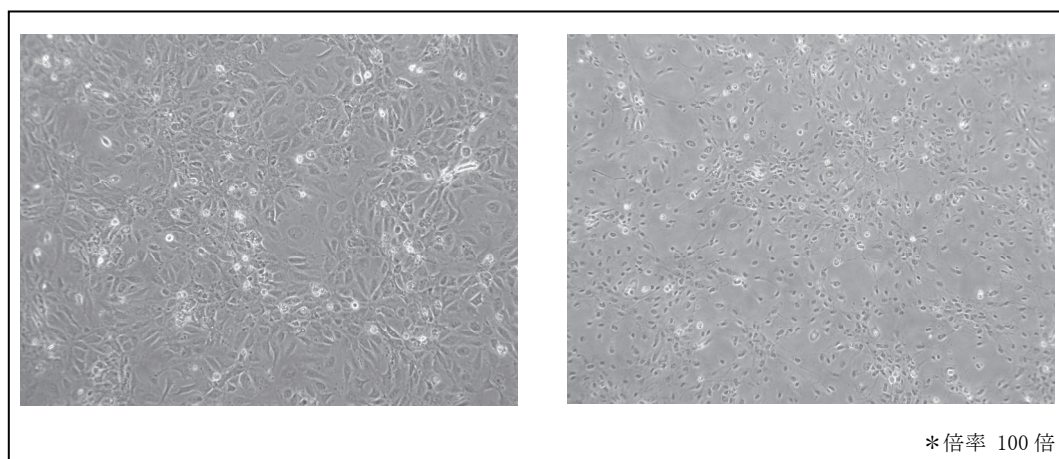


図 1 : 自然死の細胞形態 (左) 5% Tween20 負荷による細胞形態 (右)

2. 細胞死の判定

(i) 細胞の形態

①自然死 (コントロール)

添加物の含まない培地 (EBM-2) 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)。この細胞形態を細胞障害モデルのコントロールとした。

②Tween20 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 5 % Tween20 を細胞に与え、1 時間後に観察すると全ての細胞が円形縮小化した (図 1)。この細胞形態を 100% 細胞死とした。

(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遊出する逸脱酵素、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 560 nm 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 万個ずつ継代し、3 日間培養した後、シート状となった細胞に培地で希釈した 5 % Tween20、及び各濃度の酸化剤を 1ml ずつ入れ換え、設定時間経過後、各ウェルから 96 穴 (1 ウェル=0.32cm²) に 50 μl ずつ移し、発色試薬を 50 μl ずつ加えた。インキュベータ内 (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. AIPH 負荷

(i) リン酸緩衝液 (PBS)

細胞の酸化障害を誘起させるため、溶媒としてリン酸緩衝液 (PBS) を使用し、37°C で AIPH (1 mM、10mM、100mM) を添加した。細胞障害の進行は、細胞形態の変化を倒立顕微鏡を用いて、添加直後、1 時間、3 時間、24 時間後まで観察した。

その結果、1 時間後の細胞形態は、1 mM、10mM の負荷では、細胞が紡錘状から円形状へと変化しつつあり、浮遊細胞も添加直後と比べて増加した。100mM では、紡錘状に見えるが細胞が連なって浮遊していた。3 時間後では、1 mM、10mM、100mM の負荷共に Tween20 を与えた形態 (100% 細胞死) に近くなり、AIPH の濃度差による差は見出せなかった。さらに 3 時間後では、コントロール (溶媒のみ添加) も細胞障害を受けて円形縮小化し、各濃度の AIPH 負荷と差が見られなかった (図 2)。

(ii) 培地 (EBM-2)

AIPH 添加において、コントロールとして設定したリン酸緩衝液置換によって細胞障害が確認された。このため、溶媒として培地 (EBM-2) を使用し、1 mM、5 mM、10mM、100mM の AIPH を用いて、(i) と同様に細胞処理を行った。

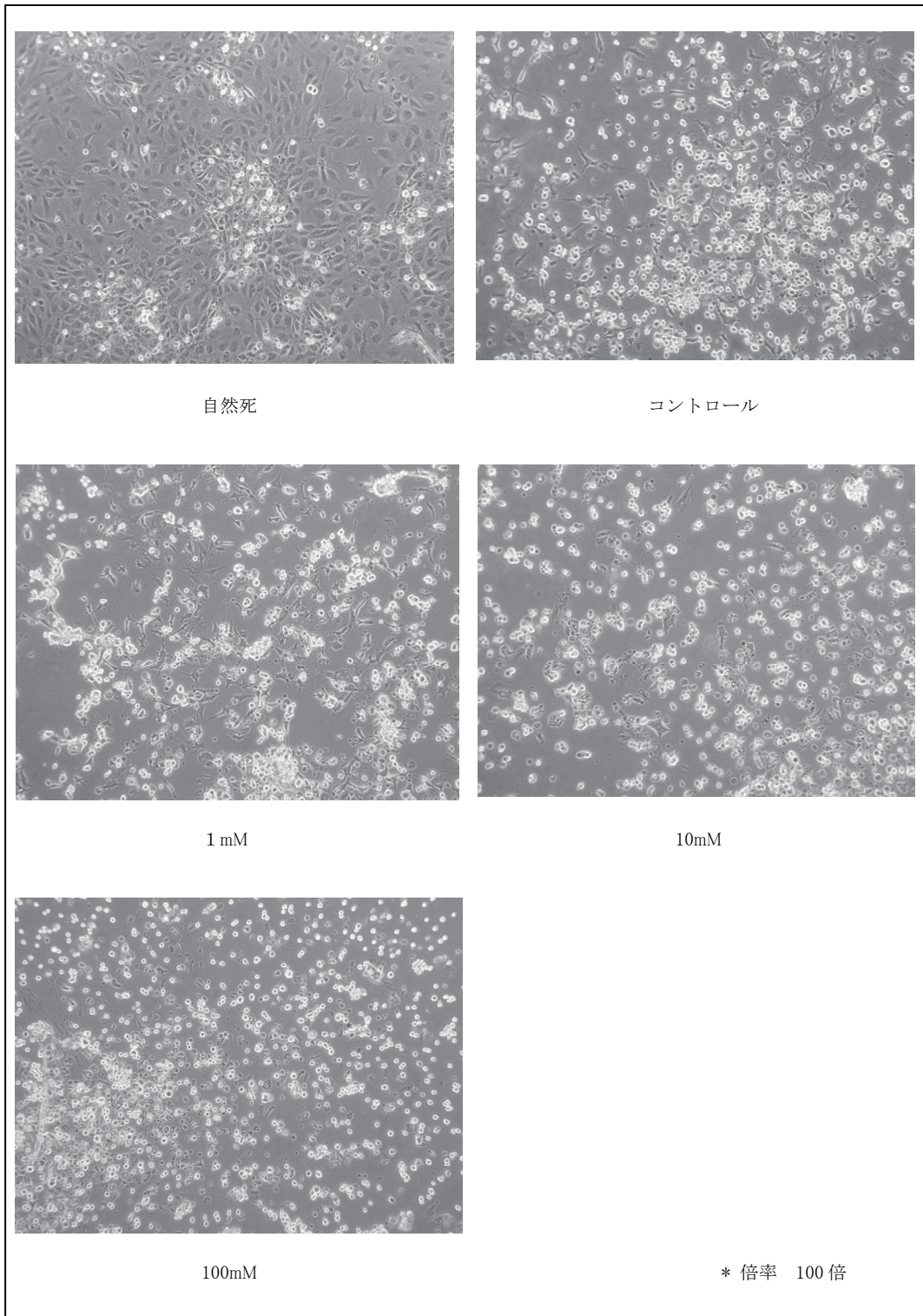


図2：培地変換（血清～PBS）による細胞形態変化

その結果、1時間後の細胞形態は、1mM、5mM、10mMの負荷では、自然死とほぼ同様であり、吸光度はいずれも0.200以下であったが、必ずしも一定の傾向を示さなかった。100mM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。しかし、吸光度は0.230以下であり、コントロールの吸光度と比較して明らかな差は認められず、細胞形態では確認された細胞障害がLDHアッセイでは確認されなかった(図5)。1mM、5mM、10mM、100mM負荷3時間後では、吸光度(平均値±標準偏差)においてAIPH・1mM負荷群 0.144 ± 0.089 、5mM負荷群 0.162 ± 0.111 、10mM負荷群 0.155 ± 0.095 、100mM負荷群 0.173 ± 0.017 と細胞形態の変化とLDHアッセイで測定した吸光度の値とは並行しなかった(図3、6)。さらに、死細胞数を目視によってカウントした結果、死細胞数はAIPH負荷濃度に伴い、増加傾向を示したが、LDHアッセイで求めた吸光度においては、濃度に依存した差が見られなかった(図4)。また24時間後では、1mM負荷の細胞は、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おり、吸光度の値は、 0.369 ± 0.120 であった。5mM、10mM、100mM負荷の細胞は、ともに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。吸光度は、AIPH・5mM負荷群 0.507 ± 0.241 、10mM負荷群 0.166 ± 0.057 、100mM負荷群 0.314 ± 0.096 と細胞形態の変化とLDHアッセイで測定した吸光度の値とは並行しなかった。さらに、24時間後では、添加したAIPHの濃度が高くなるに従って、LDHアッセイによる吸光度が少なからず減少傾向を示していた(図7)。

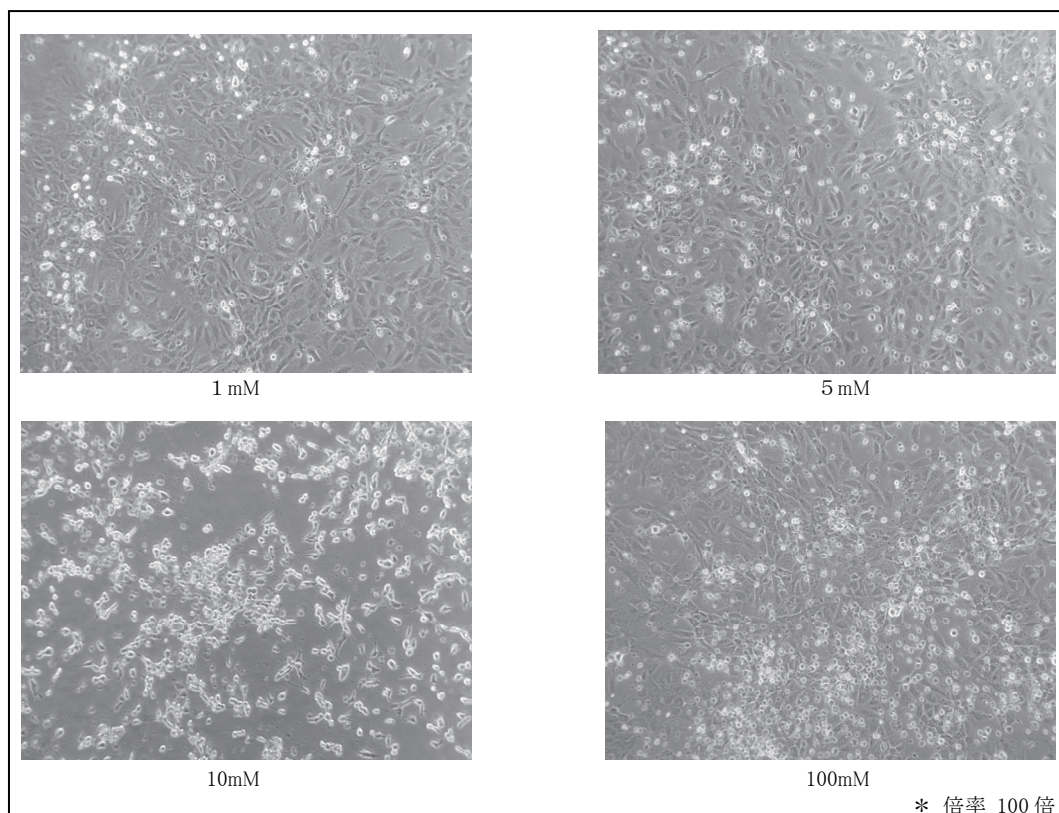


図3 : AIPH 負荷による細胞形態変化 (EBM-2)

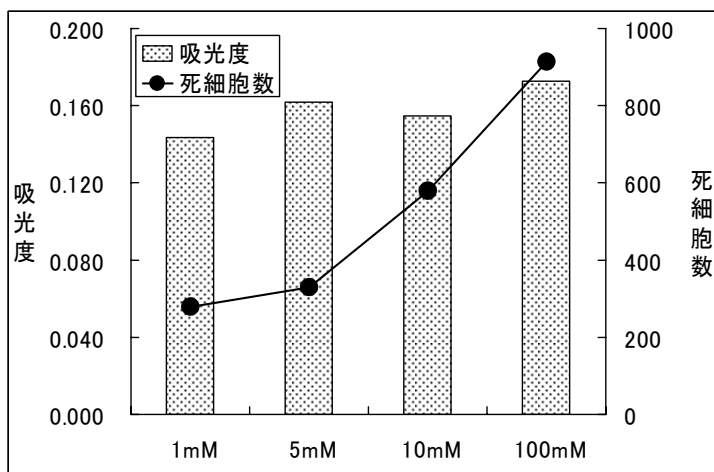


図4：AIPH 負荷 3 時間後の吸光度と死細胞数

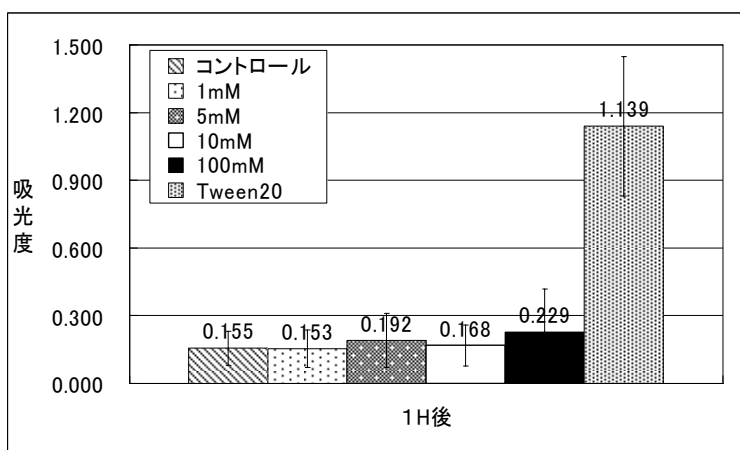


図5：AIPH 負荷 1 時間後の吸光度(平均値±標準偏差)

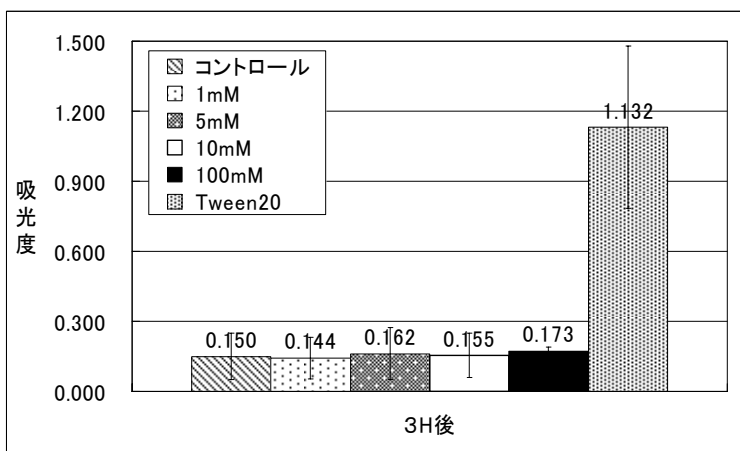


図6：AIPH 負荷 3 時間後の吸光度 (平均値±標準偏差)

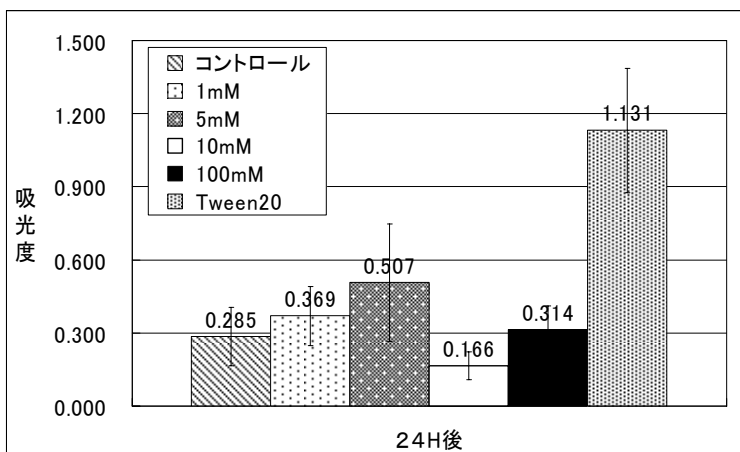


図 7 : AIPH 負荷 24 時間後の吸光度

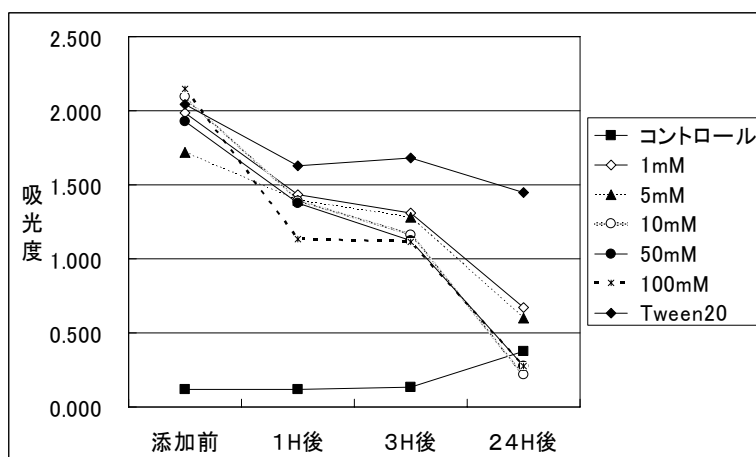


図 8 : AIPH 添加後の吸光度 (Tween20 負荷後 1 時間)

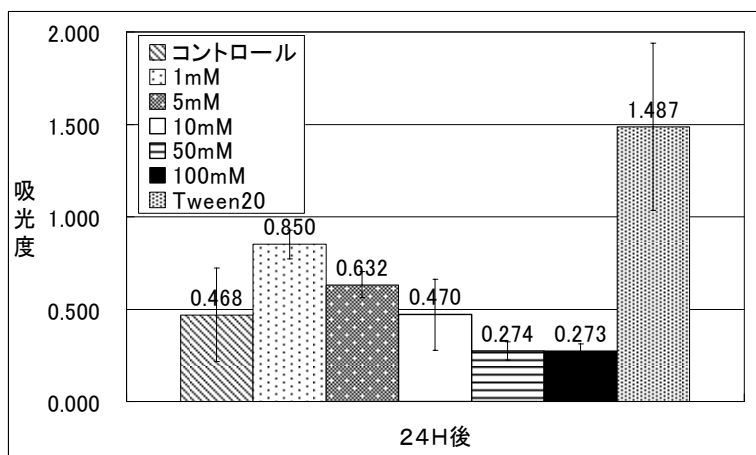


図 9 : Tween20 負荷後による AIPH 添加 24 時間後の吸光度 (平均値±標準偏差)

2. Tween20 負荷後による AIPH の乳酸脱水素酵素活性

AIPH 負荷濃度が高くなるに従い、LDH アッセイによる吸光度が減少することから、残存する AIPH が LDH アッセイに直接影響を及ぼす可能性が示唆された。このことを検証するため、血管内皮細胞を 5 % Tween20 に 1 時間浸し、100% 細胞死としたものの上から 1 mM、5 mM、10 mM、50 mM、100 mM の AIPH を添加し、添加前、1 時間、3 時間、24 時間後において、LDH アッセイを行った。

その結果、AIPH 添加後、時間経過と共に、また濃度が高くなるに従って吸光度は減少傾向を示した (図 8)。24 時間後の吸光度 (平均値±標準偏差) は 1 mM 負荷群 0.673 ± 0.203 、5 mM 負荷群 0.602 ± 0.081 、10 mM 負荷群 0.370 ± 0.188 、50 mM 負荷群 0.274 ± 0.051 、100 mM 負荷群 0.275 ± 0.056 と顕著な差が現れた (図 9)。

考察

本研究においては、血管壁の酸化障害とその防止策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、細胞レベルでの酸化障害作用を検討した。酸化ストレス負荷実験にあたっては、細胞の継代数を均一化した。この行程により、本研究において、基本条件となる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と仮定した。

まず、酸化ストレスの負荷方法として、今回は酸化剤 AIPH を外因的に投与することとした。AIPH は温度依存性に一定量のペルオキシラジカルを発生させる両親媒性の化合物であることから、一定温度 (37°C) 条件化に細胞内外で一定した酸化ストレスを賦与し得ると考えられるからである。リン酸緩衝液 (PBS) を溶媒として使用した場合、濃度に依存して細胞形態に変化が見られたが、細胞障害の比較対照となるコントロール群が障害を受け、添加 3 時間後には、すべての細胞が円形縮小化した。これは、細胞培地をリン酸緩衝液に置換し、血清を除去すると、その操作自体で血管内皮細胞が障害されるためである。このため、培地 (EBM-2) に AIPH を添加することによって酸化ストレスを負荷することとした。この場合、AIPH の濃度に依存して時間経過と共に円形縮小化した死細胞の量が増大することが、倒立顕微鏡を用いた観察により確認された。この際、LDH アッセイで求めた吸光度は、細胞形態変化とは並行しなかった。さらに AIPH 負荷 24 時間後では、濃度が高くなるに従って吸光度が減少したため、これは負荷した際に残存している AIPH のラジカル発生が LDH アッセイに直接影響することに由ると考えられた。

その原因としては、AIPH が酸化剤であることから、乳酸がピルビン酸になる反応段階において、必要な酵素である LDH の活性を阻害するのではないかということが挙げられる。またその他の原因として考えられることは、本来は発色試薬が還元されることによってジホルマザンが生成されるはずが、AIPH が代わりに還元されることにより、本来の反応を阻害し、発色を抑制しているのではないかということである。このことは、5 % Tween20 に 1 時間浸し、100% 細胞死させた上から、各濃度の AIPH を添加した際に、濃度に比例し、時間経過と共に LDH アッセイによる吸光度が減少することからも証明されたとと言える。24 時間後に最も顕著に数値が現れるのは、AIPH が

長い半減期で持続的にペルオキシラジカルを発生させるという特性からではないかと考えられる。

今回、AIPH 添加による血管内皮障害作用について、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が、AIPH には一定の減衰傾向があり、LDH アッセイを行っている間にもラジカルを発生し続けるという可能性がある。そのため、血管内皮細胞障害の程度を LDH 活性で評価する場合は、AIPH を用いることは適さないと考えられる。今後、酸化障害モデルを作成するに当たっては、細胞障害作用の評価方法の検討や、AIPH に代わる試薬を用いた酸化障害モデルの作成が必要である。

参考文献

- ・葛谷恒彦, 松口貴子, 初谷真奈, 北尾悟, 杉谷義憲～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～大阪樟蔭女子大学論集第 42 号 (2005) : P97-105
- ・YASUKAZU YOSHIDA・NANAKO ITOH・YOSHIRO SAITO・MIEKO HAYAKAWA・ETSUO NIKI ; Application of Water-soluble Radical Initiator, 2,2'-Azobis-[2-(2-imidazolin-2-yl)propane] Dihydrochloride, to a Study of Oxidative Stress ; Free Radical Research ,Vol.38 No.4 (2004) :P375-384