

# アポトーシスに関する研究 ( 5 )

## 食品の抗酸化力とマウスのアポトーシスに 及ぼす抑制効果

Study on Apoptosis (5)

Antioxidant activity of foods and its suppressive effect  
on the apoptosis in mice.

道家 晶子

Shoko DOKE

### Abstract

To study effect of a series of natural plant polyphenols , widely distributed in foods on the apoptotic pathway , cell proliferation and levels of apoptosis were determined . Some antioxidant foods were evaluated in terms of LDH activity, Caspase 3 activity, Mouse Cytochrome C concentrations in the cultured lymph cells treated with the Etoposide . Significant inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis were observed in all sample , especially in the taros . These results indicate that diets containing high levels of antioxidant foods may protect Lymph cells against Etoposide-induced apoptosis .

Keywords : apoptosis , taros , antioxidant

### はじめに

前報<sup>1)</sup>で食品によるアポトーシス誘導・実行経路に及ぼす影響について実験を用いて検討した。A172 細胞にアポトーシスを誘導促進する食品や成分は、トマトが最も効果的で次いで、たまねぎ、大根、枝豆が続いた。さらに、ビタミン C、もずく、しいたけ、きゅうりの順に促進した。実験に用いた試料の中ではビタミン E、ビタミン B<sub>6</sub>、緑茶は、コントロール群と差異がほとんど見られなかった。一方、マウスの正常な脾臓細胞がダメージを受けた時、通常の免疫反応ではアポトーシスは誘導される。この誘導を抑制する食品や成分を検討したところ、緑茶が最も効果的で、次いでビタミン B<sub>6</sub>、もずく、ビタミン E、ビタミン C の順に続き、実験に用いた全ての試料においてアポトーシスを抑制する何らかの効果が認められた。食品や成分の効果判定にはアポトーシスの判定法のひとつである代謝酵素活性測定法による乳酸脱水素酵素活性 (LDH 活性) を用いたが、この値が各実験系でそれぞれ異なることもわかった。正常細胞とがん細胞で食品や成分によって LDH 活性は異なり、効果の大きさも異なっていた。トマトには、カロテノイド色素のリコピンを含み、たまねぎには、フラボノイド色素のケルセチン、大

根にはビタミン C があり、枝豆にはポリフェノール類のイソフラボン含有する。ビタミン C は、水溶性抗酸化ビタミンで、もずくは、フコースに硫酸やウロン酸が結合した多糖類、食物繊維のなかまフコイダンをもつ。しいたけには、ーグルカンなどの多糖類、きゅうりには、テルペンやフラボノール配糖体のイソクエルシトリンなどを含む。緑茶には、カテキン類など抗酸化成分をもち、ビタミン B<sub>6</sub> には一重項酸素のクエンチャーとしての抗酸化作用がある。

そこで、本報では抗酸化成分とアポトーシス誘導の促進および抑制に及ぼす影響を明らかにするため、ダメージを受けたマウスの脾臓細胞を用いて抗酸化力の高い食品を加えた時の LDH 活性、カスパーゼ 3 およびシトクロム C 濃度を指標にして、抗酸化成分とアポトーシス誘導の抑制についての関係を明らかにすることを目的とした。今回、実験に使用した食品は、ポリフェノール類や抗酸化ビタミン類などを含む抗酸化成分をもち、ラジカル消去作用の強い食品の中から選定した。抗酸化力の影響によりマウス脾臓リンパ細胞がダメージを受けた時、細胞のアポトーシス誘導を抑制する食品について作用機構を検討するため以下の実験を行った。

## 方法

**試料** 食品の抗酸化力をラジカル消去活性から調べた 1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル (DPPH) 法を用いた報告<sup>2)</sup>を基に、抗酸化力の高かった食品の中から里芋・ビール酵母・落花生・大豆・わかめ・はとむぎを選び試料とした。試料は粉末状態の各食品 1 g を精秤し純水 50ml を加え乳鉢で磨砕後、1000rpm 10 分間遠心分離した上清を実験に供した。

正常細胞は、通常固形飼料 (CE-2 日本クレア《株》) で飼育した Balb/c メス 7 週令マウス脾臓からリンパ球を前報<sup>1)</sup>と同様の手順で調製した。

**試薬** LDH 活性の測定には微量毒性試験用試薬 MTX-LDH(極東製薬工業《株》)キットを用いた。培養液は RPMI-1640 メディウム (SIGMA 社) 死細胞の判定にはトリパンブルー染色液 (ワコー社) 細胞刺激剤には Etoposide (4'-demethyl epipodophyllotoxin 9-(4,8-o-etylidene-D-glucopyranoside) SIGMA) Cytochrome C の測定は、Mouse Cytochrome C Immunoassay (TECHNE 社, USA) Caspase 3 の測定は、Caspase 3 Apoptosis Detection Colorimetric BioGene Kit (US Biologicals 社, USA) を使用した。

**装置・器具** 細胞培養用 96 穴平底および 96 穴丸底マイクロプレート (Invitrogen 社, USA) マイクロプレートリーダー (岩城硝子《株》) 高速遠心分離機 (久保田商事《株》) CO<sub>2</sub> インキュベーター (《株》ヒラサワ) 位相差顕微鏡 (オリンパス光学工業《株》) を使用した。

**操作法** マウスリンパ球は前報<sup>1)</sup>と同様に調製後、 $2 \times 10^4$ 個/ml になるよう細胞懸濁液を調製した。滅菌シャーレにリンパ球入り培養液 15ml 入れ、これに各試料 1% 溶液を 1.5ml 加え、さらに 0.1% エトポシド溶液を 1.5ml ずつ添加して 37 下 CO<sub>2</sub> 濃度 5% 条件下で 5 時間培養後、各シャーレのアポトーシス状態について試料を加えなかったコントロール群と比較した。各群は、3 個ずつ揃え、操作はすべてクリーンベンチ内で行った。LDH の測定とトリパンブルー染色後の顕微鏡下観察と細胞数のカウントは、前報<sup>1)</sup>と同様に行った。マウスシトクロム C の測定は、Mouse Cytochrome C Immunoassay キットの操作手順に従い、Mouse Cytochrome C kit control、Mouse Cytochrome C conjugate concentrate、Wash buffer、Substrate solution、Mouse Cytochrome C standard を調製後測定した。また、カスパーセ 3 の測定は Caspase 3 apoptosis detection, colorimetric biogene キットの手順に従い Cell lysis buffer、Reaction buffer、DEVD-pNA、DTT、Dilution buffer を用いて濃度を吸光度測定した。

## 結果および考察

マウスから調整したリンパ球入り培養液に食品から抽出した試料液を添加した後、エトポシド溶液を加え、リンパ球のアポトーシスが誘導される割合をトリパンブルー細胞分染法で細胞

数をカウントしアポトーシスが誘導された割合を百分率で表した数値を表 1 に示した。コントロール群には、何も試料を加えなかった時のリンパ球数を 100 として、各実験群 3 個のシャーレ中のアポトーシスを起こした細胞数の平均値を求め誘導割合をパーセントで算出した。この実験系では誘導割合が少ないほど、アポトーシスを抑制していると判定した。

表 1 よりコントロール群のシャーレが最も死細胞数が多くアポトーシスを明らかに誘導していた。各試料液を添加した群の中で最も死細胞数が少なかった、すなわちアポトーシスを抑制したのは里芋を添加した群であった。

エトポシドは、ポドフィロトキシンから半合成された抗悪性腫瘍薬である。今回実験に使用した濃度では、リンパ球の約 8 割にアポトーシスを起こしていた。試料を添加した群は、すべてコントロール群よりアポトーシスを抑制していた。今回選定した試料は、食品のラジカル消去活性を測定した先の報告<sup>2)</sup>で比較の数値が高かった食品である。このラジカル消去活性の実験では数値が高い方から順に、里芋、はとむぎ、ビール酵母、わかめ、大豆、落花生であったが、表 1 のアポトーシス抑制率結果もこの順番によく一致していた。抑制率の最も低かった落花生でも約半数の正常細胞を維持していた。ラジカル消去活性の高い、すなわち抗酸化力の大きい食品ほど今回の実験における脾臓リンパ球のアポトーシス抑制率が大きくなる傾向にあった。表 1 の結果より、この実験におけるアポトーシス過程には、活性酸素によるラジカル反応が関与しているか、アポトーシスの実行過程の酵素などが作用している可能性が考えられた。

表 1 エトポシド溶液を加えたリンパ球に食品を添加した時のアポトーシス誘導割合

食品名	アポトーシスを誘導した割合 (%)
コントロール	100
里芋	28*
はとむぎ	32*
ビール酵母	32*
わかめ	52*
大豆	52*
落花生	56*

\* 値は 3 回の平均値

次いで、表 1 と同一な条件で実験したシャーレの各 LDH 活性を測定した結果を表 2 に示した。コントロール群の 545nm における吸光度を 1.0 とすると、里芋添加群が最少値を示し順に小さい方から、はとむぎ、ビール酵母、わかめ、大豆、落花生と続いた。この場合、LDH 活性が小さいほどアポトーシスを抑制していると判定した。表 1 で差が見られなかったはとむぎと

## アポトーシスに関する研究(5)

ビール酵母、わかめと大豆については差異がなかった。表2の結果は、表1の結果ともよく一致しており、今回の実験系では里芋が最もリンパ球アポトーシスを抑制していることがわかった。

表2 エトポシド溶液を加えたリンパ球に食品を添加した時のLDH活性の変化

食品名	LDH 活性 A <sub>545nm</sub>
コントロール	1.0 ± 0.01 <sup>*a</sup>
里芋	0.29 ± 0.01 <sup>b</sup>
はとむぎ	0.41 ± 0.01 <sup>c</sup>
ビール酵母	0.42 ± 0.02 <sup>c</sup>
わかめ	0.58 ± 0.01 <sup>d</sup>
大豆	0.60 ± 0.02 <sup>d</sup>
落花生	0.66 ± 0.03 <sup>e</sup>

\* 平均 ± S.D.

里芋は、水分 84.1%、炭水化物 13.1%、カリウム 640mg%、ビタミン B 群はあるが、A は 1 μg%、E は 0.6mg%、C は 6 mg% と抗酸化ビタミンは多くない。不溶性の食物繊維がやや多く総量 2.3mg 含む。炭水化物は主にでんぷんで、ペントザン、ガラクトン、デキストリン、ショ糖も含まれる。粘質物は、ガラクトンとタンパク質が結合した糖タンパクで里芋に特徴的な成分である。実験で使用した他の試料と大きくことなるのはムチンなど粘質物である。これまで、ムチンとアポトーシスの関係を述べた報告はないが、ムチンには胃の粘膜を保護し損傷を防ぐので胃潰瘍を予防する効果や、滋養強壮、虚弱体質の改善、皮膚の保水性や弾力性を保ち美肌効果、消化不良や便秘改善などの効能が知られている。

細胞の種類や刺激物の種類により抑制率は異なる結果が予想されるが、エトポシド溶液の刺激によるリンパ球へのダメージには、活性酸素によるラジカル反応が含まれており、里芋の抗酸化力の利用と粘質物の作用でアポトーシスを半減させる可能性が示唆された。

近年、抗ガン作用をもつとして、アガロオリゴ糖やフコイダン、水溶性キトサンなどのヌルヌル成分によるアポトーシス作用が報告されているので、マウスの正常な脾臓リンパ細胞がダメージを受ける時、リンパ球のアポトーシス防御や抑制に粘質物が関与することも考えられた。また、抗酸化力が高いほど、抑制率も大きくなっていることから食品に含有するポリフェノール類や抗酸化ビタミン類の影響も示唆された。

はとむぎにはプロラミン、グルレリンなどのタンパク質と炭水化物のでんぷんが多い。穀類の中で唯一薬効が知られ鎮痛、

利尿、消炎などがある。<sup>3)</sup>はとむぎは抗酸化力を示すことから薬効成分の中にポリフェノール類などが考えられた。

ビール酵母は、アミノ酸、ビタミンおよびミネラル類が豊富で、効酸化ビタミンも多い。わかめにも粘質物アルギン酸があるが、今回の実験系では、里芋の粘質物の方に比較的作用が強く認められた。大豆にはイソフラボンの影響が容易に推察される。落花生は脂肪酸組成で約半数を占めるオレイン酸の影響も考えられるがビタミン E やビタミン B1、ナイアシン、B6、葉酸、パントテン酸などの B 群の関与を推測した。

アポトーシスは細胞内で複雑な情報伝達が行われるが、アポトーシスの機構には、3つあると言われている。アポトーシスシグナルがどのように細胞に受容され、伝達されるか誘導の機構 その情報を処理しアポトーシスのスイッチを入れる決定機構 最後に DNA 断片化を中心とする実行機構である。<sup>4)</sup>

今回の結果は、どの段階に関わっているのかを明らかにするため、カスパーゼの活性化機構で、多くのアポトーシス刺激により用いられる経路であるミトコンドリア経路を予想して、カスパーゼ活性化に必須な因子のひとつであるシトクロム C の漏出を調べた。シトクロム C の細胞質タンパク質 Apaf-1 への結合の結果、自己活性化が誘導される。<sup>5)</sup>アポトーシス実行過程における関連酵素のひとつで DNA 断片化や核クロマチン凝集を導くと言われているカスパーゼ 3 についても検討した。

表3 シトクロム C 濃度測定結果

食品名	シトクロム C (ng/ml)
コントロール	1.0 ± 0.1 <sup>*</sup>
里芋 他	1.0 ± 0.2

\* 平均 ± S.D.

表3に示したようにシトクロム C の測定結果は、いずれもコントロール群と比べ、どの食品添加群にも有意差が認められなかった。シトクロム C の実験結果から今回の作用経路は、ミトコンドリアを介さない経路なのかもしれない。ミトコンドリア非依存経路による可能性も検討すべきであるが、コントロールの値とほぼ同じ数値なので細胞調製中にシトクロム C の損失があった可能性もある。

表4 カスパーゼ 3 濃度測定結果

食品名	A <sub>402</sub>
コントロール	1.2 ± 0.02 <sup>*</sup>
里芋 他	0.6 ± 0.03

\* 平均 ± S.D.

また、表4のカスパーゼ 3 濃度測定実験においてはカスパー

(提出期日 平成16年11月26日)

ゼ濃度の比較を405nmにおける吸光度で示した。里芋をはじめ食品添加群とコントロール群には有意差が見られたが、食品添加群の間では、有意差が認められなかった。誘導剤の濃度や培養条件の検討の必要性があるものの、アポトーシス抑制率の変化量が少ないため検体中の微量な差が検出できなかったことも考えられた。この2つの結果から先に記述した3つの機構のうち、今回は最初の誘導段階で食品成分がアポトーシスシグナルを阻止することによってアポトーシスを抑制していることが考えられた。

ビタミンCでも知られているように抗酸化物質は特定の濃度や反応条件下で、まったく反対の作用、すなわち酸化促進作用を示すことがあると言われている。<sup>6)</sup>本実験により濃度が適切であれば、食品の抗酸化力を利用してリンパ球のダメージを防ぐ可能性が示唆された。

## 要約

食品によるアポトーシス制御に関する一連の実験で、今回は、抗酸化力をもつ食品が正常なリンパ細胞がダメージを受けた時に受けるアポトーシス誘導を抑制することの可能性について調べた。通常食で4週間飼育した7週令マウス脾臓リンパ球を用いて予め食品抽出試料を加えておいた後、エトポシド溶液で刺激して細胞を観察し、アポトーシスを引き起こした細胞数から抑制率を測定した。今回用いた試料の中では、里芋が最も抑制効果が高く、実験に用いた試料の中では抗酸化力の大きい食品ほどアポトーシス誘導を抑制する割合も高くなる傾向にあった。細胞の種類や刺激物の種類により抑制率は異なる結果が予想されるが、エトポシド溶液の刺激によるリンパ球へのダメージには、活性酸素によるラジカル反応が含まれており、里芋の抗酸化力の利用と粘質物の作用でアポトーシスを半減させる可能性が示唆された。また、これらの食品による作用点はアポトーシスシグナルが細胞に受容される最初の誘導段階で関与している可能性が考えられた。

## 参考文献

- 1) 道家晶子 アポトーシスに関する研究(4)食品とアポトーシス 岐阜市立女子短期大学研究紀要 第53輯 p 121~124
- 2) 道家晶子 食品の組み合わせによる抗酸化力の変化 岐阜市立女子短期大学研究紀要 第53輯 p 125~129
- 3) 杉田浩一他編集『日本食品大事典』p.20 医歯薬出版
- 4) 田沼靖一監修『アポトーシス実験プロトコル2 応用編』p.84 秀潤社
- 5) 長田重一、山本雅編集『細胞の誕生と死』p.132 共立出版
- 6) 平成16年日本ビタミン学会市民公開講座要旨集 p.8