

アポトーシスに関する研究 (7)

栄養状態とアポト - シス応答は関係がある

Study on Apoptosis (7)
Nutritional status also plays a role in apoptosis.

道家晶子

Shoko Doke

Abstract

The role of Vitamin B6 in lymphocytes injury induced by reactive oxygen species was examined in the spleen of Balb/c mice using ultraviolet radiation. The oxygenation injury of the lymphocytes in mice as blocked by catechin, flavon, -lipotic acid, vitamin E, C and B6. The control mice fed perfect food were superior to the B6-deficient mice in the apoptotic reaction result from overexposure of the spleen lymphocytes to ultraviolet waves. These results indicate that the good nutrition reduce the risks of strong oxidant activity, are essential to the prevention of the cell death program. The consumption of food products containing moderate amounts of vitamin C, catechin, flavone, and vitamin B6 can lead to measurable and significant improvements in antioxidant status and biomarkers of oxidative stress in mice.

Keywords: ビタミン B 6 欠乏、アポトーシス誘導抑制、抗酸化成分

はじめに

前報¹⁾で、ビタミン B6 (B6) 欠乏食群のマウスはリンパ球数が少なく免疫も低下した。B6 欠乏状態下では蛋白質の代謝不全がおこりマウスの体重増加も少なく、アポトーシスが誘導されやすい。活性酸素によりダメージを受けたマウス脾臓リンパ球に対し、添加した B6 によるアポトーシス抑制率は水溶性抗酸化ビタミンの代表であるビタミン C に比べ B6 添加群で効果が大きく B6 欠乏群のマウス脾臓細胞に特異的な結果と考えられた。B6 はビタミン C より抗酸化力が小さいため、これらの結果は抗酸化力の大小によるものではないと推察された。

アポトーシスのメカニズムについては、既に多くの研究報告があり主要経路は、ほぼ明らかにされている。²⁾また、ある種の食品にがん細胞のアポトーシス誘導効果があり、その作用機構が明らかになる前に既に健康食品になっているものもある。しかし、栄養とアポトーシスの関係を調べた報告は見当たらず新しい知見が期待できると考え、B6 不足に伴うたんぱく質利用不全とアポトーシスの誘導・実行過程に及ぼす影響について検討した。

紫外線は、アポトーシスを引き起こすシグナルのひとつで、日常生活においても係わりが深い。今回は、特に紫外線照射に伴う細胞のアポトーシス誘導に着目し、ビタミンを中心とした食品中の成分がどのように作用し、アポトーシス抑制効果を示すかについて検討した。

方法

本実験の手順をフローシートで表すと以下のようになった。実験用動物 Balb/c マウス を生後 4 w から 7 w まで完全食群・ビタミン B6 欠乏食群で飼育後、脾臓からリンパ球を調製

細胞数は 2×10^6 培養液/RPMI1640 培地で調整

1.0mg% 食品抗酸化成分を添加

Vitamin C, B6, E,

Catechin

-lipoic acid

Flavone

ラジカット (エダラボン)

紫外線照射 10min.15uw / cm^2 (MODEL UVGL-5 8

MINERALIGHT LAMP, UVP inc.)

細胞死の判定

ヘキスト染色およびトリパンブルー細胞分染法で死細胞観察

LDH 値 (乳酸脱水素酵素活性) 測定

還元型グルタチオン濃度測定

カスパーゼ 3 濃度測定

アポトーシスに関する研究(7)

LDH 測定用キットは Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co.,Ltd. グルタチオン測定キットは Cayman Chemical Company (USA) 製を使用した。実験用動物と飼料は、中部科学資材(株)から調達した。また、各種実験機器についてはCO₂インキュベーター(IWAKI)位相差顕微鏡(OLYMPUS)、96穴マイクロプレートリーダー(IWAKI)は、前報¹⁾と同じものを使用した。ヘキスト染色後の蛍光顕微鏡観察は岐阜大学医学部にて行った。食品抗酸化成分は、前報¹⁾と同様、7種類の抗酸化物質、すなわちビタミン B6 にはピリドキシン塩酸塩、ビタミン E は -トコフェロール、ビタミン C は L-アスコルビン酸を用い、その他、-リポ酸、フラボン、DL-カテキン、ラジカット(三菱ウェルファーム製エダラボン)を選定した。その他の試薬類、キットはすべて Wako Pure Chemical Industries, Ltd.から購入した。

食品抗酸化成分の添加後、直ちに紫外線照射後 24 時間後のリンパ球の状態を顕微鏡による形態観察、キットによる各種生化学検査を実施した。動物実験については、「動物の保護及び管理に関する法律」及び「実験動物の飼育及び保管に関する基準」のもとに実験計画、動物の選択、飼育管理、実験操作を行った。現在、本学における動物実験委員会の設置を検討中である。

結果

マウス脾臓リンパ球に紫外線照射を行い 1.0mg%の食品成分溶液に調製したカテキン、-リポ酸、フラボノイド、ビタミン E・C・B6 をあらかじめ添加した条件下におけるリンパ球のアポトーシス誘導の抑制率をコントロールとして、ラジカットを添加したときのLDHを100%として各吸光度より算出した。B6 欠乏マウスを用いた実験結果を表 1 に示した。

表 1 紫外線照射した B6 欠乏マウス脾臓に抗酸化成分を加えた時のアポトーシス抑制率

主な抗酸化成分	抑制率 (%) *
ラジカット	100
カテキン	72
フラボン	15
-リポ酸	10
ビタミン B6	21
ビタミン C	55
ビタミン E	21

*n=3

表 1 より、最も抑制率が高かったのはカテキンであった。次いで、ビタミン C が続き、ビタミン E と B6 は同様な数値となった。

これらの結果は、コントロール群と B6 欠乏群では同じ傾向

を示した。また、B6 欠乏群の方がアポトーシスの誘導が大きくアポトーシスを起こしやすかった。

正常食で飼育したコントロール群と B6 欠乏食で飼育した B6 欠乏群に、紫外線照射したときの LDH、カスパーゼ 3、グルタチオン濃度の結果を図 1 ~ 3 に示した。

ヘキスト染色、トリパンプルー染色による顕微鏡観察で、アポトーシスによる細胞死を確認した。(写真は掲載していない)

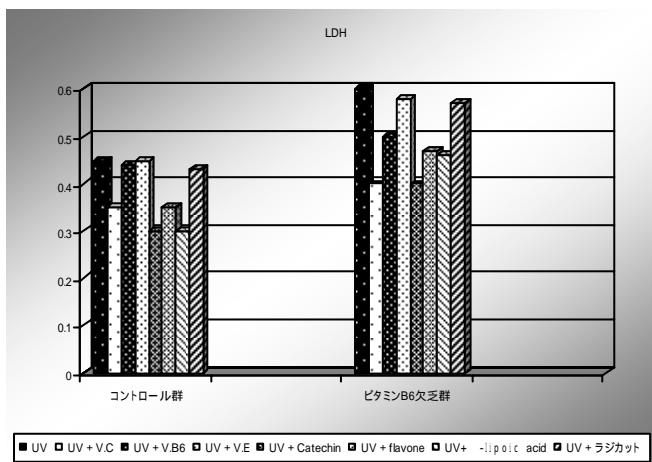


図 1 ビタミン B 6 欠乏群とコントロール群における食品抗酸化成分を添加後の LDH 値

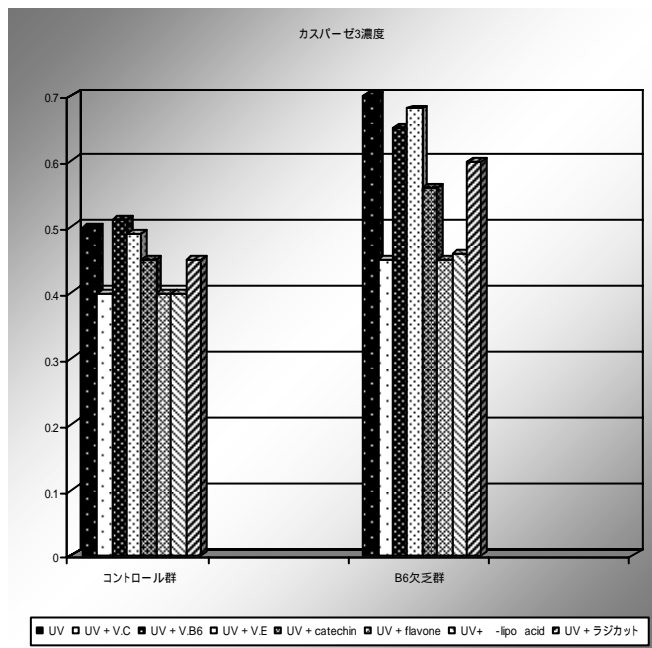


図 2 ビタミン B 6 欠乏群とコントロール群における食品抗酸化成分を添加後のカスパーゼ 3 濃度

アポトーシスに関する研究(7)

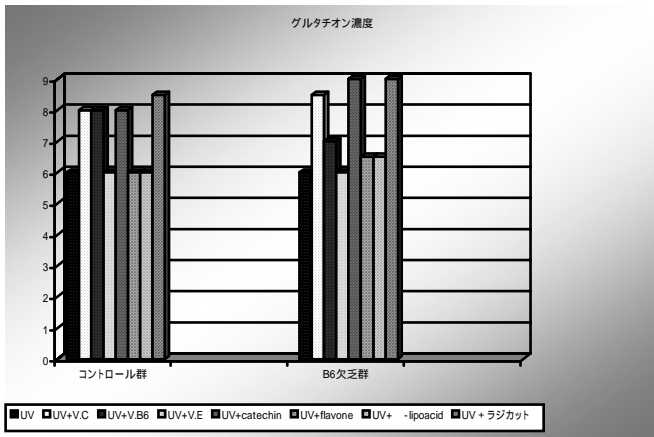


図3 ビタミンB6欠乏群とコントロール群における食品抗酸化成分を添加後の還元型グルタチオン濃度

図1から図3の結果より、アポトーシス誘導の検出実験の各指標ごとに食品成分の有効性を表2にまとめたところ、ビタミンCがラジカル消去活性実験を除き、どの指標においても最も効果的であった。

表2 アポトーシス実験の指標から見た食品成分の効果

LDH 値	カスパーゼ3活性値	還元型グルタチオン濃度	ラジカル消去活性
1 ビタミンC	1 ビタミンC	1 ビタミンC	1 ラジカット
2 カテキン	2 フラボン	2 ビタミンB6	2 カテキン
3 -リポ酸	3 -リポ酸	3 カテキン	3 ビタミンC
4 フラボン	4 カテキン	4 ラジカット	4 ビタミンE

考察

マウス脾臓リンパ球に紫外線照射後の細胞へのアポトーシス誘導を食品中の抗酸化成分による抑制が可能であるかを調べた実験結果より以下のことが明らかとなった。

完全食群(コントロール群) ビタミンB6欠乏食群のマウス脾臓リンパ球は、UV照射でアポトーシスを起こし、特にB6欠乏群でアポトーシス誘導割合が大きかった。

リンパ球のLDH値、還元型グルタチオン量、カスパーゼ3活性、ラジカル消去力の4つの指標より、7種類の抗酸化成分の中では、V.Cは抗酸化力の実験結果を除く3つ全ての指標でアポトーシス抑制効果が高いことが認められた。カテキンは、4つ全ての指標で効果が認められた。フラボンと、-リポ酸は、LDHとカスパーゼ3の指標のみで、グルタチオンは見られなかった。ビタミンB6は、グルタチオンの結果で顕著であ

った。また、B6欠乏食群においてもコントロール群と同じ傾向にあり、その抑制効果は大きかった。

食品成分によるアポトーシス誘導抑制効果は、カテキン、V.Cは抗酸化力によるものと考えられ、ビタミンB6は、ラジカル消去力より還元型グルタチオン量の変化に直接起因していると考えられた。-リポ酸と、フラボンは、カスパーゼ3活性増加に影響するものと推察された。

ビタミンCは、主要な水溶性抗酸化物質で、酸化障害から生体を保護している。また、鉄や銅の還元のほか、SOD(スーパーオキシドジスムターゼ)を還元し多くの酸化還元反応に関与している。このほか、コラーゲンの合成、神経伝達物質のノルエピネフリンとセロトニン合成に必須である。免疫機能を高める働きも知られている。³⁾本研究においてもビタミンCの作用が最も効果的であった。

一方、ビタミンEは、α、β、γ、δの型があるが、α-トコフェロールのビタミンE活性が最も高い。ビタミンEは、脂溶性の抗酸化物質として重要で、組織中の活性酸素や遊離基を消去して酸化障害を防いでいる。このほか、抗凝血作用、白血球の抗体産生を亢進して食能を高める作用がある。³⁾今回、培養系が水溶性だったために、ビタミンEの効果が出にくかったと思われた。

-リポ酸は、チオクト酸とも呼ばれ、2004年6月に食品として認可された成分で、すでになんらかの健康食品として販売されている。水溶性、脂溶性の両方で活性酸素を消去することが出来、非常に強い抗酸化作用をもつと言われている。本実験でも最も効果があると予想したが、ラジカル消去活性も高い方ではなく、アポトーシスに及ぼす効果もビタミンCには及ばなかった。口から摂取する場合、チオクト酸アミドの形でないと吸収率が悪いとも言われているため、過大な効果は期待しないほうがよいと思われた。

フラボンは、フラボノイドの一種でかんきつ類に多く含まれており、抗ヒスタミン作用、抗アレルギー作用、抗がん作用も報告されている。アポトーシスの反応においてもカスパーゼ3酵素反応に深く関与することが考えられた。

カテキンは、フラバノールで、広義のタンニンの一種であり、渋味を有する成分でもある。カテキンは、茶、コーラ、大黄、りんご、もも、なし、カカオ豆などに広く含まれる。⁴⁾近年は、中性脂肪蓄積予防効果などで注目を浴びている物質である。本実験においても予想に反してカテキンの効果は大きく期待できる成分であった。カテキンによるDNAポリメラーゼの阻害によりアポトーシス誘導が抑制されるものと考えられた。

グルタチオンは、グルタミン酸、システイン、グリシンからなるトリペプチドで、還元型グルタチオンは、ヒトの組織内で細胞から活性酸素を除去する抗酸化剤として機能する。酸化型のグルタチオンは、グルタチオン還元酵素によって還元型に戻

る。アポトーシスが起きている多くの細胞では、還元型のグルタチオンレベルの減少が見られる。グルタチオンを増やす食品には、スプラウト、ブロッコリー、カリフラワーなどのアブラナ科野菜、牛レバー、真鱈、赤貝、ビール酵母に含まれている。

前報¹⁾でラジカスカベンジャーのラジカットを基準に抗酸化活性をDPPHラジカル消去活性実験と比較したところ、カテキンが最も強く、次いでビタミンC、ビタミンEの順となり、フラボン、-リボ酸と共にビタミンB6は抗酸化力は弱い。カテキンよりもビタミン類の方が紫外線照射で誘導されたリンパ球のアポトーシス抑制作用が大きかったため、抗酸化力の強さと必ずしも相関していない。

よって、紫外線照射などのリンパ球への影響を最小限に抑えるには、ビタミンCの効果はあるが単に抗酸化成分を含む食品やサプリメントの補充では不十分であり、いろいろな食品の組み合わせにより相互補完的な作用が効果的であろう。

要約

マウス脾臓リンパ球に紫外線照射実験した結果から食品成分のカテキン、-リボ酸、フラボノイド、ビタミンE・C・B6をあらかじめ添加した条件下ではリンパ球のアポトーシスの誘導が抑制されることが明らかとなった。

栄養状態の異なるコントロール群とビタミンB6欠乏群でのヘキスト染色、トリパンブルー細胞分染法による死細胞の観察結果、LDH活性値、カスパーゼ3濃度、還元型グルタチオン濃度からビタミンB6欠乏食群のマウスはリンパ球数が少なくアポトーシスが誘導されやすい。しかし、ビタミンC、カテキンなど適切な食品成分でこれらの細胞死へのダメージを防ぐことが可能であった。栄養状態が異なるとアポトーシスにおける反応も異なることが明らかとなり、よい栄養状態に保つことは細胞死プログラムにおいてもきわめて重要であった。適切な食品選択を組み合わせた健康によい食生活の重要性を改めて認識する結果となった。

参考文献

- 1) 道家晶子 食品とアポトーシス 岐阜市立女子短期大学 研究紀要 第55輯 pp. 73 - 76 2005
- 2) 辻本賀英 細胞死・アポトーシス集中マスター (株)羊土社 2006
- 3) 東京都老人総合研究所ホームページより一部引用
- 4) 桜井芳人編、総合食品学事典、(株)同文書院 2005
- 5) 杉田浩一、平宏和、田島眞、安井明美編、日本食品大事典、医歯薬出版(株)2005

(提出期日 平成18年11月27日)