

骨芽細胞-SaOS-2-の増殖に及ぼすプロポリス および野菜汁発酵液の影響

徳田修司*・長岡良治*・矢野原良民**

(1997年10月15日 受理)

Effects of propolis and fermented vegetable juice on osteoblasts proliferation

Shuji TOKUDA*, Ryoji NAGAOKA*, Yoshitami YANOHARA**

はじめに

著者らは、骨形成に作用する因子を探ることを目的として、骨芽細胞-SaOS-2-を用いた検討を行っている。今回は、SaOS-2の増殖に及ぼす赤血球溶血液の影響について報告した¹²⁾。

近年、食品成分の持つ特別な生理的機能をより積極的に健康な生活に活用しようという考えから厚生省も機能性食品の市場導入に取り組んでいる⁷⁾¹⁰⁾。しかし、一方では体に良いと言われながら科学的検討がなされないまま経験的に民間のなかで健康食品として使われているものが多い。

プロポリスは、ミツバチが植物から集めてきた物質をもとに作り出した抗菌作用の強い物質で、古来から民間薬として使われてきている¹⁾³⁾。最近の研究により、主成分は、フラボノイドであり他にもたくさんの化学成分を含み、多くの生理的活性を持つことがわかっている²⁾⁴⁾⁶⁾⁸⁾¹¹⁾。今回、オーストラリア産の50%アルコール抽出プロポリスの作用について検討した。

野菜汁発酵液は、枯草菌、乳酸菌など数種類の発酵菌を用いて、パン酵母や野菜圧搾汁などを主成分とした培地で一定期間発酵させて抽出した液体である。わが国において古くから生体内代謝活性調節因子として作られ、民間で使われているものである。これに関する基礎的な科学的研究報告は全く見当たらない。

これらの2つの生理活性を持つと考えられる健康補助食品が骨芽細胞の増殖に及ぼす作用について検討した。

方 法

材 料

①骨芽細胞：理化学研究所より譲渡を受けた骨芽細胞、SaOS-2 (Cell No. RCB 0428) を用いて、培養し増殖の測定に用いた。

*鹿児島大学教育学部 健康教育学

**生物機能工学研究所

- ②**プロポリス, 野菜汁発酵液**: 株式会社「日野樹脂」より提供を受けた, オーストラリア産の50%アルコール抽出のプロポリスと数種類の発酵菌(枯草菌, 乳酸菌, 麹菌など)を使って数種類の野菜の圧搾汁とパン酵母などを培地にして発酵, 熟成させたものの抽出液(商品名: ENZAMIN)を基本培養液に一定濃度(1%)加えて用いた。

細胞培養

- ①**培養液**: 基本培養液は, 10%FBS (GIBCO BRL) および1%抗生物質-抗真菌剤

(Penicillin-G, Streptomycin, Amphotericin B; GIBCO BRL), 1.5 g/1のNaHCO₃を含むダルベッコ改変 Eagle 培地 (D-MEM: GIBCO BRL) を用いた。

プロポリス添加培養液は, 上記の基本培養液にアルコール抽出プロポリスの蠟(ワックス)成分だけを取り除き, 0.45 μ mのポアサイズのフィルターで濾過滅菌したものを1%の濃度で加え, pH調整してプロポリス添加培養液(P-Medium)とした。

野菜汁発酵液添加培養液は, 野菜汁発酵液を1 μ mと0.45 μ mのフィルターで段階的に濾過したものを同様に基本培地に1%の割合で加えpH調整して野菜汁発酵液添加培養液(E-Medium)とした。

- ②**培養方法と細胞増殖の測定**: 細胞は, CO₂インキュベーター (ESPEC BNA-111) を用い, 37°C, 5%-CO₂, 飽和水蒸気 conditions で培養した。

はじめ25cm²のフラスコで継代培養し, サブコンフルエントな状態になった SaOS-2を適当な濃度(今回: 470個/mm³)になるように基本培養液で希釈, 浮遊させた。この細胞浮遊液を6枚のエライザプレート[(a)~(f)]にそれぞれ①対照, ②P-Medium, ③E-Medium用の各5ウエルに100 μ lづつ播き, 細胞が安定するまで基本培養液で培養した。

6時間インキュベートしてから倒立顕微鏡を用いて細胞の定着を確認し, それぞれの培養液

- ①対照-基本培養液, ②P-Medium, ③E-Mediumに取り替えて培養を開始した。

細胞の増殖の測定は, 細胞が安定してそれぞれの培養液に交換してから, 12時間後に(a)プレート, 24時間後に(b)プレート, 36時間後に(c)プレート, 48時間後に(d)プレート, 60時間後に(e)プレート, 84時間後に(f)プレートの順に細胞増殖度を測定した。12時間経過毎にすべて培養液は新しいものと取り替えた。

(f)のプレートについては, 12時間毎の培養液交換の時①~③の各5ウエルの培養液を回収し, 培養液中のタンパク質濃度とカルシウム濃度を測定した。

測定方法

- ①**培養細胞の増殖測定**

細胞の増殖度の測定は, 相対的な細胞量の測定であるMTT法によって行った。

細胞中の酸化還元酵素が無色のテトラゾリウム塩を還元して不溶性のフォルマザンを形成するのでこの色素を抽出して450nm~540nmで比色定量する Cell Titer 96 Assay (Promega) を使用した。

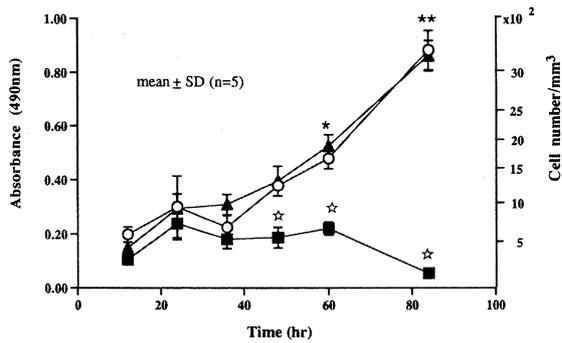


Fig. 1. Cell Proliferation curve

○ control ▲ E-Medium ■ P-Medium

☆ Significantly different from respective control and E-Medium (P<0.01)

*, ** Significantly different from 12 hour's values

* (P<0.02) * (P<0.01)

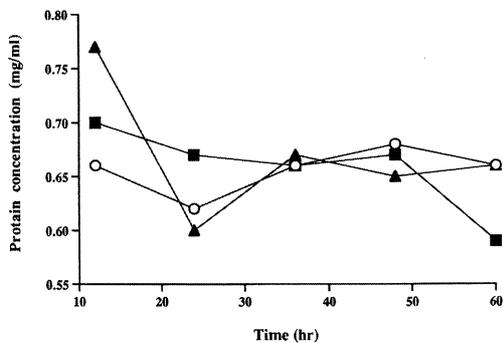


Fig. 2 Changes of protein concentration in culture medium

○ control ▲ E-medium ■ P-Medium

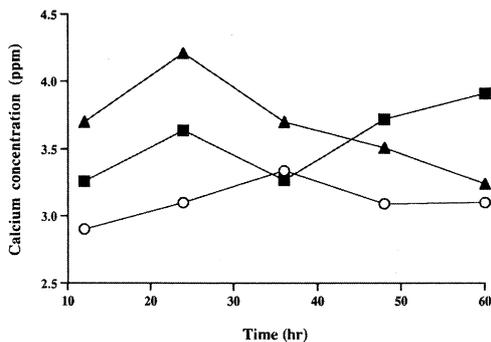


Fig. 3 Changes of calcium concentration in culture medium

○ control ▲ E-Medium ■ P-Medium

比色定量は、マイクロプレートリーダー MPR-A4i (東ソー) を用いた。

②培養液中のタンパク質濃度の測定

12時間毎に回収した(f)プレートの培養液中のタンパク質濃度は、Bio-Rad Protein assay kit を用いて測定した。タンパク質標準液も同様の Bio-Rad のものを用いた。

③培養液中のカルシウムイオン濃度の測定

タンパク質測定と同様に12時間毎に回収した(f)プレートの時間培養液中のカルシウムイオン濃度の測定は、イオンクロマトグラフィー (東ソー; CM-8000, CCPD, CO-8000) で測定した。

〔測定条件〕

カラム：TSK-gel IC-Cation (東ソー)

溶離液：0.5mM エチレンジアミン+1mM 酒石酸

流速：1.2ml/min, カラム温度：35℃

試料注入量：100 μl

Ca スタンダード：原子吸光分析用標準液

(ナカライテスク)

結果

(1) 細胞の増殖

Fig. 1に培養12時間から84時間までの細胞の増殖曲線を示す。対照群と E-Medium 群は、ほぼ同じ傾向で細胞が増殖し、60時間後および80時間後に顕著な増加を示した。

これらに比べ P-Medium 群は、吸光度で48時間後にはじめの1.8倍、60時間後には2.1倍となり、84時間後には逆にはじめの0.5倍に減少した。

対照群は、吸光度で60時間後は2.4倍、84時間後は4.4倍であり、E-Medium 群は、それぞれ3.5倍、5.8倍であった。

(2) 培養液中のタンパク質およびカルシウムイオン濃度

Fig. 2と Fig. 3に培養液を交換する毎に回収した(f)プレートの12時間毎の培養液中のタンパク質とカルシウムイオン濃度の変動を示す。

タンパク質は、E-Medium で24時間後に急激な減少が見られた。その後は、P-Medium で60時間後にわずかに減少した。

カルシウムイオン濃度についても顕著な変動は見られず、P-Medium の60時間後にやや高い値であった。

考 察

SaOS-2は、1975年に女兒の骨肉腫より樹立されたヒト骨芽細胞様細胞である。細胞の doubling 時間は、約37時間である⁹⁾ と言われており、本実験においても対照群と E-Medium 群でほぼ同様の増殖性が認められた。P-Medium 群では、そのような増殖性が認められず、むしろ84時間後には減少傾向であった。プロポリスの抗菌作用に関してはたくさんの報告があり¹⁾⁻⁵⁾、その効果が認められ、東欧諸国ではすでにプロポリスを配合した医薬品や化粧品が開発されている²⁾。

また、他の抗ウイルス作用¹¹⁾、麻酔作用²⁾、免疫作用²⁾⁸⁾、抗腫瘍作用⁶⁾ などの多くの働きのあることが報告されている。抗腫瘍作用に関しては、ヒト肝癌や子宮癌由来の培養細胞において検討されたものであり⁶⁾、骨芽細胞を用いて検討された報告は見当たらない。

今回の骨芽細胞をもちいた細胞増殖に及ぼすプロポリスの影響は、松野⁶⁾が述べているように培養骨芽細胞でも生存率を悪くするものであることがわかった。プロポリスの成分である新規クレロダン系ジテルペンが、細胞増殖サイクルのS期に細胞を停める作用があり、さらに細胞膜の性状にも変化を与え、イオン透過性の攪乱などを介して細胞を死滅させるものと考えられている⁶⁾。

一方、野菜汁発酵液の骨芽細胞に及ぼす影響に関しては、研究報告が全く見当たらず、今後の研究の成果を待たねばならない。今回の結果は、対照群とあまり差が認められないが培養12時間目の値からの増殖度でみると60時間後には対照群の2.4倍に対して、E-Medium 群は3.5倍、84時間後には対照群の4.4倍に対してE-Medium 群は5.8倍といずれも E-Medium 群が増殖度は高い。添加した濃度によっても異なるであろうが僅かながらも増殖を促進していると考えられる。経験的には疲労回復作用、成長促進作用、代謝異常改善作用があると言われていたが、それが単なる栄養としての働きなのかまた成長因子と考えられる成分を含むのかは今後の検討に待たねばならない。

まとめ

骨芽細胞 (SaOS-2) を用いて、骨芽細胞の増殖に与えるプロポリスおよび野菜汁発酵液の作用について検討した。その結果、プロポリスを1%の濃度で加えた培養液で培養した骨芽細胞は、増殖が抑制された。一方、野菜汁発酵液を同じく1%の濃度で添加した培養液で培養した骨芽細胞は、対照群とほぼ同じ傾向の増殖を示した。培養初期の値と比較してみると培養60時間、84時間後には僅かではあるが対照群より E-Medium 群の方が増殖が促進されていた。

以上のことからプロポリスには、骨芽細胞の増殖を抑制する作用が考えられ、野菜汁発酵液には、添加する濃度にもよると思われるが、僅かに増殖を促進する働きがあるものと考えられる。

参 考 文 献

- 1) 阿賀創 他 (1992) : ブラジル産プロポリスの抗菌作用 医学と生物学 124 (5) ; 205-209
- 2) 井上浩郷 (1988) : プロポリスの化学成分と生体反応 ミツバチ科学 9 (3) ; 115-126
- 3) 川合芳文 他 (1987) : プロポリスの抗菌活性と化粧品への応用 フレグランス ジャーナル 83 ; 29-30
- 4) 松田忍 (1994) : プロポリス - 健康補助食品 - FOODS & FOOD INGREDIENTS JOURNAL OF JAPAN 160 ; 65-731
- 5) 松田忍 (1994) : プロポリス - 健康補助食品 - ミツバチ科学 15 (4) ; 145-154
- 6) 松野哲也 (1992) : プロポリスに含まれる生理活性物質 - 抗ガン物質の探索を中心に - ミツバチ科学 13 (2) ; 49-54
- 7) 村上浩紀 他 (1992) : 食品と生体防御 講談社サイエンティフィック
- 8) 森安純子 他 (1993) : プロポリスのマクロファージ機能に及ぼす作用 BIOTHERAPY 7 (3) ; 364-365
- 9) 大谷周造 他 (1992) : 生体の科学 43 (5) ; 457
- 10) 須見洋行 (1995) : 食品機能学への招待 - 機能性食品とその効能 - 三共出版
- 11) 立藤智基 他 (1993) : ブラジル産プロポリスの抗ウイルス作用 生薬学雑誌 47 (1) ; 60-64
- 12) 徳田修司 (1993) : 骨芽細胞増殖に及ぼす赤血球溶血液の影響 鹿児島大学体育科報告 27 ; 21-25