

## Oyster extract は anoxia-reoxygenation による 血管内皮細胞障害を抑制する

内藤 裕二, 増井 康治, 吉田 憲正, 真鍋 浩樹,  
上村 学, 吉川 敏一, 近藤 元治  
(京都府立医科大学第1内科\*)

### **Crassostrea gigas extract attenuates endothelial injury induced by anoxia-reoxygenation**

Yuji NAITO, Koji MASUI, Norimasa YOSHIDA, Hiroki MANABE, Manabu UEMURA,  
Toshikazu YOSHIKAWA, and Motoharu KONDO  
*First Department of Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine*

The effects of *Crassostrea gigas* extract (JCOE) on endothelial injury were investigated using a cell line HAEC, human aortic human aortic endothelial cell. Cells were subjected to hypoxia in a chamber with 95% nitrogen and 5% carbon dioxide for 4 hours. Reoxygenation was initiated by replacing the media and putting the cells in an environment of room air plus 5% carbon dioxide. Anoxia-reoxygenation induced cellular oxidative stress, which was determined by the levels of reduced glutathione as well as the levels of intracellular reactive oxygen species. Cell viability of HAEC cells subjected to anoxia-reoxygenation significantly decreased. Pretreatment of JCOE for 24 hours at a dose of 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  significantly reversed the decrease of cell viability induced by anoxia-reoxygenation, and also reversed the decrease in cellular glutathione levels. These results show that JCOE contains one of effecting functional food factors for reducing the oxidative stress in endothelial cells.

牡蠣肉エキス (*Crassostrea gigas extract*: JCOE) は日本クリニク(株)によって製造されたカキニクエキスの純正抽出パウダーであるが、その保有する微量栄養素がガン予防、糖尿病、アドリアマイシンによる細胞傷害の予防に有効性であることを示唆する研究が開始されている。日本食品分析センターに依頼した成分分析の結果では、アミノ酸類を大量に含み、抗酸化活性の高いタウリンを5.11%含有し、微

---

\* 所在地：京都市上京区河原町通広小路上路梶井町465 (〒602-8566)

微量元素類も豊富に含まれている。JCOEは、活性酸素消去作用<sup>1)</sup>、活性酸素、活性窒素種による細胞障害に対する保護作用が報告され、その作用機構にJCOEのグルタチオン (GSH) 代謝に及ぼす影響が指摘されている。GSH代謝に及ぼす効果については、Tapieroら<sup>2)</sup>も同様の報告をしており、最近ではヒト健常ボランティアにより臨床薬理的検討を示している<sup>3)</sup>。それによると、1週間のJCOEの服用後、赤血球のアゾ化合物による溶血反応が抑制され、抗酸化能が増加していた。また、グルタチオン合成が亢進した結果、血清中GSHは約1.5倍に増加していた。ラットにおいても同様の報告がある<sup>4)</sup>。

今回、血管内皮を用いた anoxia-reoxygenation モデルを作製し、JCOEの影響について検討したので報告する。

## 実験方法

血管内皮細胞としてHAEC (human aortic endothelial cell) 細胞を96 well culture dishに播種し、confluent monolayerの状態 で用いた。anoxia-reoxygenation stressによる内皮細胞障害に対する検討は、各種濃度のJCOEを加えた培養液で24時間培養処理したHAECに大気コントロール培養 chamber (Bellco Co.) を用いて、4時間の (anoxia95%N<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) 後、1~2時間のreoxygenationを加えた。細胞障害性については、WST-1 assayならびにLDH releaseにより viabilityを測定した<sup>5)</sup>。細胞内GSHは glutathione reductase とDTNB溶液を用いて、酵素的recycling 法により測定した<sup>2)</sup>。細胞内活性酸素産生量は、c-DCFH-DA (5-(and-6)-carboxy-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) をプローブとして評価した<sup>6)</sup>。

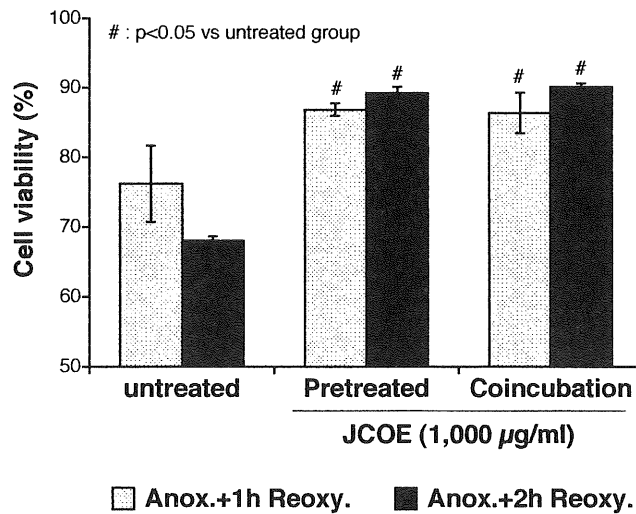
## 結果と考察

### 1. Anoxia-reoxygenation 障害

4時間のanoxiaでは、viabilityの低下は認められず、LDH releaseも認めなかった。Reoxygenation後、経時的にviabilityの低下、LDH releaseが認められた。細胞内GSHは有意に低下し、DCF蛍光の有意な増加が認められた。以上の結果は、anoxia-reoxygenationによりHAEC細胞に酸化ストレスが惹起され、細胞障害が惹起されたものと考えられる。LDH releaseとviabilityの低下が並行していることより、細胞死はnecrosisと判断できる。

### 2. JCOEの細胞保護作用

24時間の前培養により、JCOE (1,000 $\mu$ g/ml) の影響を検討したが、培養後に洗浄した細胞においても、anoxia-reoxygenationに対する抑制効果が認められた (図1)。JCOEはHAEC細胞内GSH濃度を増加させ、anoxia-reoxygenation後のGSH低下を抑制した。JCOEには直接的な活性酸素消去作用を有する<sup>1)</sup>が、今回認められた細胞保護作用は、培養の後、洗浄した細胞にも認められることより、直接的な活性酸素消去によるものでないことは明らかである。HAECにおいても、過去にラットRGM-1細胞で報告した機構と同様に、JCOEによるGSH合成亢進を介した細胞内GSHの増加が細胞保護に作用している可能性が高いが、その詳細にはさらなる検討を要すると考える。



**Fig. 1** Anoxia-reoxygenationによる血管内皮細胞障害に対するJCOEの効果

### おわりに

血管内皮細胞 (HAEC) を用いた anoxia-reoxygenation 障害モデルにより, JCOE の細胞保護作用を確認した。

### 文 献

- 1) Yoshikawa, T., Y. Naito, Y. Masui *et al.* (1997) *Biomed. Pharmacother.* 51 : 328-332
- 2) Tapiero, H. and K.D. Tew (1996) *Biomed & Pharmacother* 50 : 149-153
- 3) Tapiero, H., L. Gate, S. Dhalluin *et al.* (1998) *In Vivo* 12 : 305-9
- 4) Gate, L., M. Schultz, E. Walsh *et al.* (1998) *In Vivo* 12 : 299-303
- 5) Bergmeyer, H.D. (1954) *Methods of Enzymatic Analysis*. 3rd ed. Verlag Chemie, Weinheim, Germany
- 6) Giardino, I., D. Edelstein and M. Brownlee (1996) *J. Clin Invest.* 97 : 1422-1428