

平成 21年 6月 15日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007年度～2008年度
 課題番号：19591145
 研究課題名（和文） ヒト好中球の活性酸素産生顆粒の細胞内動態を制御するシグナル伝達機構の解析
 研究課題名（英文） Analysis of the signal transduction mechanism regulated the intracellular dynamics of superoxide-producing granules in human neutrophils
 研究代表者
 瀬口 春道（SEGUCHI HARUMICHI）
 神戸女子大学・家政学部・教授
 研究者番号：90030866

研究成果の概要：

健康な成人女性の末梢血より好中球を単離し、protein kinase Cの賦活剤であるPMAで刺激、好中球細胞質内の顆粒に活性酸素を産生させ、この活性酸素を、酸化されると蛍光を発するH₂DCFDAで標識した。各種の植物に含まれるpolyphenol, catechin, tocopherol (vitamin E)の抗酸化剤をPBSで1mM, 10mM, 100mMの3段階の濃度で作用させ、抗酸化の程度を蛍光顕微鏡で形態学的に観察して評価するとともに、Flow cytometryを用いて、レーザーの励起光488nmを用いて、580nmの緑色の蛍光をgateG1で前方および側方蛍光強度を測定し、阻害度を生化学的定量的に測定した。その結果、polyphenol, catechin, tocopherolは濃度に比例して、抗酸化度は正の相関を示した。In vitroではなるが、その阻害度はpolyphenolが97.4%、tocopherolが43.0%、catechinが44.4%であった。このように、自然の中で日中太陽からの紫外線に曝されることから、これらの植物由来の化学物質は、自身を護る働きを持つものであるが、程度の差はあれ、ヒト好中球で産生される活性酸素に対して、強力な抗酸化作用を有することが明らかとなった。なお、本研究は本学のヒト研究倫理委員会の承認を得て実施された研究である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	2,800,000	840,000	3,640,000
平成20年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血液免疫学・活性酸素・抗酸化・ポリフェノール類・蛍光標識・サイトフルオメトリー・ヒト・好中球

1. 研究開始当初の背景

好中球は、人体では体内に侵入した細菌を認識して、血管より組織中へ遊走し、貪食し、強力な活性酸素で酸化殺菌する作用を持つ、生体内で生体防御の第一線で働く重要な細胞である。この活性酸素を産生するのは NADPH oxidase なる酵素で、この酵素は従来形質膜にあるとされていたが、我々は酵素組織細胞化学的方法を応用して、特殊顆粒に類似の現在分泌顆粒と呼ばれる顆粒の限界膜にあることを見出した。またこの顆粒中に産生された活性酸素は細菌を貪食していない時には好中球外へ放出され、細菌を貪食した場合は、この貪食胞内へ放出され、酸化殺菌に働くことを見つけた。この機構を制御するメカニズムを明らかにすれば、活性酸素による組織細胞の障害に由来する各種の疾患を予防することができる、臨床的に有意である。また、この活性酸素陽性顆粒の標識には、酸化されると蛍光を発する H₂DCFDA を用い、蛍光顕微鏡、あるいは共焦点蛍光顕微鏡で観察することが、その細胞内動態の研究には非常に有利であることを報告している。

2. 研究の目的

種々の疾患が活性酸素の酸化作用により、好中球の周囲の正常の組織細胞が傷害されることにより、惹起することが指摘されている。それゆえ好中球のこの活性酸素産生ならびに顆粒の動態を制御する情報伝達機構を明らかにすることは、この傷害機序により生じる疾患を予防するためにも重要である。先ず抗酸化作用をもつといわれる物質で、栄養に関連する植物由来の polyphenol、catechin、tocopherol (vitamin E) の抗酸化作用について、その細胞内動態ならびに抗酸化作用の程度について検索し、活性酸素陽性顆粒の細胞内動態を明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

健康な成人女性の末梢血を 6%Dextran 2ml を入れた試験管(以下すべてプラスチック製)に入れ、30 分間室温に精置し、赤血球を沈殿させる。上澄みをプラスチックスポイトで採取し、pH7.3 の分離用 PBS 緩衝液(2.7M NaCl, 0.05M KCl, 0.02M KH₂PO₄, 0.13M Na₂HPO₄) 10ml を入れた試験管に取り、1000 回転で 5 分間遠心分離する。得られたペレットにスポイトで 2ml の分離用 PBS を

加え、ピペッティング後、2ml の Histopaque を加え、その後 1500 回転 10 分間遠心分離する。得たペレットに混入している赤血球を冷却した蒸留水を 1ml を加えて、10 数回ピペッティングする。その後分離用 PBS を加えて、1000 回転 15 分間遠心分離する。得たペレットは tripine blue 弁別染色法で 95% の細胞は生きており、98% の細胞は好中球で、あることを白血球分画検査法で確認している。protein kinase C の賦活剤である PMA で好中球を刺激して、NADPH oxidase を活性化し、産生された活性酸素を H₂DCFDA で蛍光標識した。10mM H₂DCFDA を DMSO に溶解し、保存液とし、これより 4μl を蛍光顕微鏡用あるいは Flow Cytometry 用試料に加え 37°C 20 分間恒温水槽中で震とうし、観察あるいは測定に供した。阻害実験では、それに polyphenol、catechin、tocopherol (vitamin E) 等の抗酸化剤を 100mM、10mM、1mM の 3 段階で 37°C 20 分間恒温水槽中で作用させ、それぞれの活性酸素産生の阻害の割合を、形態学的に蛍光顕微鏡で観察するとともに、生化学的定量的に flow cytometry で前方ならびに側方の蛍光強度を測定し、活性酸素の阻害度を求めた。

4. 研究成果

1) polyphenol

Flow cytometry の測定結果

阻害剤 polyphenol を用いないで、好中球を PMA で刺激し、活性酸素を産生させると、前方および側方の蛍光散乱強度のスクエッチャで好中球 1 万個のゲート 1 のヒストグラムの蛍光濃度の平均は 1879.55 であった。Polyphenol を 100mM、10mM、1mM の濃度の調整し、好中球活性酸素産生溶液に作用させ、どの程度阻害されているかを測定すると、これらの濃度のいずれにおいても、蛍光強度は低下していた。すなわちゲート 1 での蛍光濃度の平均は、100mM では 49.66、10mM では 297.54、1mM では 1171.00 であった。Polyphenol はその濃度勾配に比例して、活性酸素の産生を阻害することが明らかとなった。またその阻害の効果は、100mM で 97.4%、10mM で 84.17%、1mM で 37.7% であった。

蛍光顕微鏡による観察

同一視野を明視野像と蛍光顕微鏡像で観察した。Polyphenol を作用させない場合には、明視野像でみられる敷石のように並んだ細胞内の顆粒には、蛍光顕微鏡で蛍光を発しているのが観察された。Polyphenol を上記の濃度で作用させた場合、flow cytometry での阻

害の効果に応じて、蛍光顕微鏡による観察で、細胞内の顆粒が減少していた。

2) catechin

Flow cytometry の測定結果

Catechin を抗酸化剤として用いた場合、catechin 無添加では、flow cytometry の前方および側方の蛍光強度のスキッタグラムのゲート1での蛍光濃度は 1690.46 であった。100mM、10mM、1mM の catechin を作用させると、それぞれのゲート1での蛍光強度は、100mM 添加で、1046.57、10mM 添加で、1227.84、1mM 添加で、1235.83 であった。Catechin も polyphenol と同様に、濃度勾配に比例して活性酸素産生を阻害し、その効果は、100mM で 44.4%、10mM で 34.7%、1mM では 34.4%の阻害効果を示した。

蛍光顕微鏡による観察

蛍光顕微鏡による観察でも、明視野像と蛍光顕微鏡像を比較することにより、好中球内の顆粒で蛍光を発する割合は、添加した catechin の濃度に比例して、上記の割合で減少していくのが観察された。

3) tocopherol

Flow cytometry の測定結果

Tocopherol (vitamin E)では、本物質無添加の場合、好中球での活性酸素の産生を flow cytometry で測定すると、ゲート1での蛍光強度は 1879.55 であった。

蛍光顕微鏡による観察

蛍光顕微鏡観察においても、ほとんどすべての好中球において、多数の顆粒が蛍光を発しているのが観察された。阻害実験では、100mM tocopherol のゲート1での蛍光強度は 1070.49、10mM は 1451.73、1mM で 1478.93 であった。その阻害効果は 100mM で 43.0%、10mM で 22.8%、1mM で 21.3%であった。

結論

今回検索した抗酸化物質の効果は濃度に比例して、正の相関を示し、その阻害度は、polyphenol が 97.4%、catechin が 36.5%、tocopherol が 43.0%、であった。このように今回検索した植物由来のこれらの化学物質は in vitro ではあるが、強力な抗酸化作用を示すことがヒト好中球で明らかとなった。また、Flow Cytometry を用いた生化学的、定量的方法は、H₂DCFDA を用いて、産生された活性酸素を測定し、形態学的に観察するのに、非常に簡便で、精密な方法であることを強調したい。

特に polyphenol は強い抗酸化作用を示した。polyphenol は一般に多くの物質を包含し、その解析は困難であるが、いわゆるフレンチパラドックスならびに種々の疫学的研究により疾病予防の効果があることが知られているが、本実験からも、示唆される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

①原田有紀帆(指導：瀬口春道)：Polyphenol のヒト好中球活性酸素産生への抑制効果に関する研究。神戸女子大学家政学部紀要、42：61-62、2009

②元木友美(指導：瀬口春道)：ビタミン E (トコフェロール) のヒト好中球活性酸素産生に対する抗酸化作用について。42：67-68、2009

③森川真衣(指導：瀬口春道)：ヒト好中球の活性酸素産生へのカテキンの効果。42：71-72、2009

[学会発表] (計1件)

竹本美紀、原田有紀帆、元木友美、森川真衣、小林俊博、エバ ガルシア デル サス、瀬口春道：各種抗酸化物質によるヒト好中球における活性酸素産生の阻害効果について。解剖学雑誌、84：63、2009

[図書] (計6件)

①塩田浩平、瀬口春道、大谷 浩、杉本哲夫：グレイ解剖学 原著第1版、エルゼビア・ジャパン、1-1082、2007

②瀬口春道：解剖学用語、監修日本解剖学会、編集解剖学用語委員会、2007

③瀬口春道、小林俊博、エバ ガルシア デル サス：原著第6版受精卵からヒトになるまで、基礎的発生学と先天異常、医歯薬出版、2007

④瀬口春道、小林俊博、エバ ガルシア デル サス：原著第7版ムーア人体発生学、医歯薬出版、2007

⑤Seguchi H.:Terminologia Histologica、International Terms for Human Cytology and Histology, ed. Federative International Committee on Anatomical Terminology. International Federation of Anatomical Associations, Wolters Kluwer / Lippincott Williams & Wilkins、2007

⑥瀬口春道：脊髄・馬尾、1 章脊椎・脊髄の発生と成長、奇形、最近整形外科学大系(総編集：越智隆弘、第 10 卷：専門編集：戸山芳昭、中山書店、2-7、2008

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬口春道 (SEGUCHI HARUMICHI)

神戸女子大学・家政学部・教授

研究者番号：90030866

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

小林俊博 (KOBAYASHI TOSHIHIRO)

高知大学・医学部・解剖学教室・助教

研究者番号：

竹本美紀 (TAKEMOTO MIKI)

神戸女子大学・大学院家政学研究科・博士後

期課程・院生

原田有紀帆 (HARADA YUKIHO)

神戸女子大学・大学院家政学研究科・博士前

期課程・院生

元木友美 (MOTOGI YUMI)

神戸女子大学・大学院家政学研究科・博士前

期課程・院生

森川真衣 (MORIKAWA MAI)

神戸女子大学・大学院家政学研究科・博士前

期課程・院生