

## 動物培養細胞におけるセレンウムの機能と生理有効性

安本 教 傳・中 島 政 英  
(京都大学食糧科学研究所\*)

### Physiological Function and Efficiency of Selenium Compounds in Cultured Animal Cells

Kyoden YASUMOTO and Masahide NAKAJIMA  
*Research Institute for Food Science, Kyoto University*

Growth Response of animal cells in culture to selenium (Se) are less well established than those for other nutrients. We added 0.01 to 1 ppm of selenite, selenomethionine (SeMet), and Ebselen (2-phenyl-1, 2-benzoisoselenazol-(2H)-one) to the culture medium and investigated their effects on proliferation and glutathion peroxidase (GSHPx) activity of rat hepatocyte in primary culture (HPC) and of human hepatoblastoma (HeP G2) cells in culture. Among the Se compounds tested, selenite increased most significantly GSHPx activity in HPC from Se-deficient rats and maintained the enzyme activity in HPC from Se-sufficient rats. The proliferation of HeP G2 cells was stimulated by all of the Se compounds tested. GSHPx activities increased by the addition of selenite and Se-Met, but not by Ebselen addition. Ebselen and selenite showed an additive effect on the proliferation of Hep G2 cells.

セレンウム (Se) は、哺乳動物にとって必須の微量元素である。その生理的機能の多くは、過酸化物の代謝に重要な役割を果たしている酵素グルタチオンペルオキシダーゼ (GSHPx) の反応中心を構成していることで説明することができる。

一方、動物培養細胞にとっても、細胞の生育や GSHPx 活性発現に Se が必要である。Se をその反応中心に有している GSHPx は、細胞内で生成する過酸化物を還元して細胞内構成成分を酸化障害から守り、各オルガネラ膜の安定化の役割を演じている重要な因子である。もし細胞中の Se が欠乏すると、細胞内の GSHPx 活性が十分に発現できず、細胞が酸化障害にさらされる結果、その正常な生育が阻まれる危険がある。

本研究は、Se の生理的役割の解明を目的とした研究の一環として、培地に添加した Se 化合物が、動物培養細胞の増殖・維持および GSHPx 活性に及ぼす影響を調べたものである。

---

\*所在地：京都府宇治市五ヶ庄 (〒611)

## 実験方法

### 1 Se化合物

代表的な Se 化合物として、亜セレン酸ナトリウム（以下亜セレン酸）、セレノメチオニン（SeMet）、そして、それ自身で GSHPx 様活性を有している有機 Se 化合物、2-フェニル-1, 2-ベンゾイソセレナゾール-3 (2H)-オン（以下エブセレン）の3つを選んだ。エブセレンは第一製薬より供与を受けた。

### 2 初代肝培養細胞

離乳直後の Wistar 系雄ラットに、とら酵母を主タンパク質源とする Se 欠乏飼料、およびこれに 0.1ppm の Se を亜セレン酸の形態で添加した Se 充足飼料を与えて<sup>1,2)</sup>、離乳直後から5カ月間飼育した。

肝細胞は、中村らのコラゲナーゼ灌流法によって分離した<sup>3)</sup>。Se 欠乏及び充足ラットの各々から得た肝細胞を、培養ディッシュに撒き、コウシ血清10%を含む Williams'E 培地で1日培養後、Se 化合物を添加して6, 12, 18, 24, 48時間培養した。ちなみに、基礎培地中の Se 含量は分析により0.002ppm であった。

### 3 Hep G2

ヒト肝ガン由来の株細胞 Hep G2は、American Type Culture Collection から入手した。10%胎児ウシ血清を添加した Eagle の MEM 培地を用いて2, 4, 6日間培養した。ちなみに、培地中の Se 含量は0.001ppm であった。

### 4 測定法

GSHPx 活性は Carmagnol らの方法<sup>4)</sup>、DNA 量は Brunk らの方法<sup>5)</sup>、Se 含量は Watkinson の蛍光法<sup>6)</sup>によって求めた。GSHPx 活性は DNA あたりで計算し、DNA 量はウェルあたりで求めた。

## 結果と考察

### 1 初代培養肝細胞の GSHPx 活性

#### 1.1 Se 欠乏ラット由来細胞

Se 欠乏ラット由来肝細胞の場合、培養開始直後の GSHPx 活性は0.7U/mg DNA と非常に低い値を示したが、亜セレン酸を0.01, 0.1, 1 ppm 添加すると、培養時間の経過にもなって GSHPx 活性が増加し、48時間培養後では、無添加のものが1.5U/mg DNA であったのに対して4ないし5 U/mg DNA の活性を示した。10ppm 添加すると細胞は24時間で死滅した。

SeMet を添加した場合は、48時間培養後によく活性が上がり始めた程度で、亜セレン酸と比べると GSHPx 活性は低値にとどまった。エブセレンを添加した場合も SeMet と同様に、Se 無添加の場合とくらべてもほとんど GSHPx 活性に変化が認められなかった。

#### 1.2 Se 充足ラット由来肝細胞

Se 充足ラット由来の肝細胞は、培養開始直後では、23U/mg DNA の活性を示したが、Se 無添加で培養していくと細胞内の GSHPx 活性が漸減した。亜セレン酸を添加して培養した場合でも、1 ppm 添加のものが GSHPx 活性をわずかに維持している以外は、無添加のものと同じで変わりがなかった。なお、Se 欠

乏ラット由来肝細胞を死にいたらしめた10ppmの濃度のSeを加えても、Se充足ラット由来の肝細胞には異常が認められなかった。

SeMet添加の場合もGSHPx活性を維持することができなかった。エブセレン添加の場合、全体として、GSHPx活性の維持する傾向がみられたが、48時間後には、無添加のものと差はなかった。

これらのことから、肝細胞においては、亜セレン酸やSeMetの形態のSeは、細胞内にとりこまれてGSHPxの構成成分になり、特に亜セレン酸添加の場合に有効であるが、エブセレンの形態では細胞内に取り込まれないか、あるいは取り込まれたとしてもGSHPxを構成しないということが示唆された。

## 2 ヒト肝ガン由来株細胞, Hep G2の生育

ここでは、細胞DNA量を指標とした細胞増殖と、細胞内のGSHPx活性、このふたつに対するSeの添加効果を検討した。

Se無添加の場合と比べると、亜セレン酸の0.001, 0.001ppm, SeMetの0.01, 0.1, 1ppm, エブセレンの0.001~1ppm添加でDNA量が有意に増加、すなわち増殖促進効果が認められた。なお、亜セレン酸1ppm, SeMetおよびエブセレン10ppm添加で細胞は24時間以内に死滅した。

GSHPx活性は、亜セレン酸の添加で顕著に増加した。またSeMet添加でも活性上昇が認められた。しかし、エブセレンを添加した場合には、その濃度においてもGSHPx活性はSe無添加の場合と同様であった。

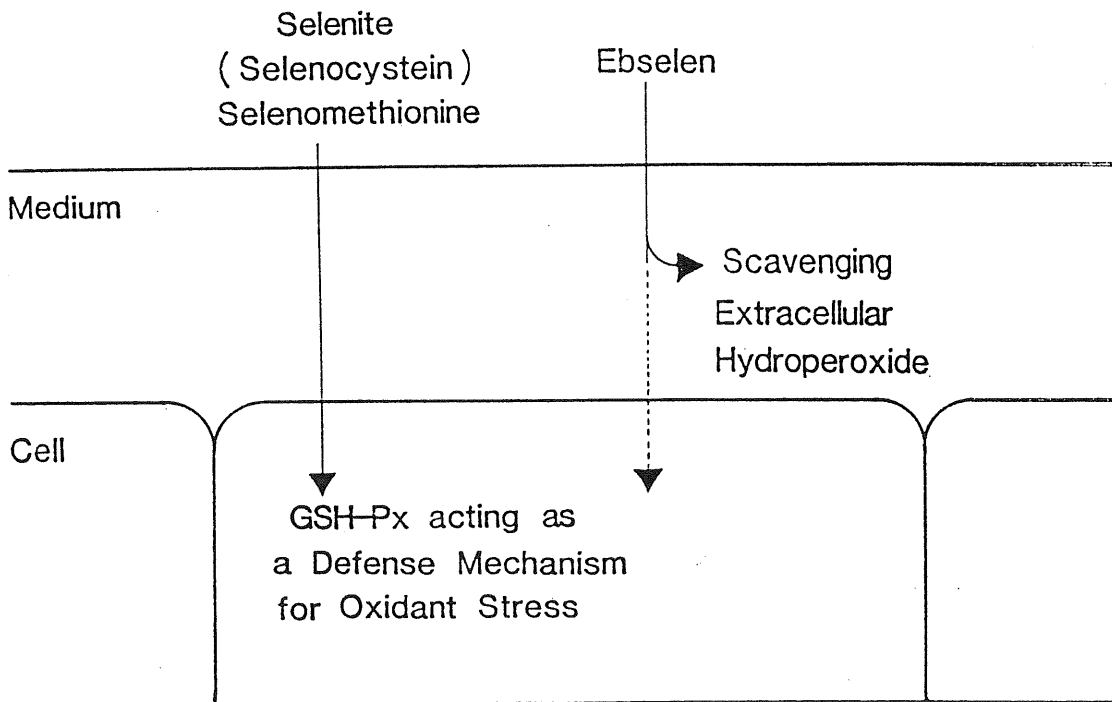


Fig. 1. Postulated Function of Selenite, Selenomethionine and Ebselen in Cultured Animal Cell.

これらの実験結果から、本研究にて検討した Se 化合物は Fig. 1 に示したような経緯を経て生理的な機能を発揮するものと考えられる。すなわち、亜セレン酸や SeMet の形態の Se は細胞内で GSHPx に取り込まれて、細胞内の過酸化水素等の過酸化物を分解し、細胞内組織の変成防止や細胞の正常な生育を助長する役割を担う。一方エブセレンは、細胞内に入り込むかどうかは不明であるが、もし細胞外に存在するならば、それ自身が有している GSHPx 様活性を以て<sup>7)</sup>、培地中の過酸化物質を還元するか、あるいは細胞内に取り込まれて、細胞の生育を助けるのであろう。

## 文 献

1. 安本教傳, 鈴木鐵也, 金天浩 (1986) 微量栄養素研究 3 : 111-117
2. KIM, C. H., T. SUZUKI, M. YOSHIDA and K. YASUMOTO(1988)Nutr. Res. 8 : 767-775
3. 中村敏一 (1987)「初代培養肝細胞実験法」, 学会出版センター : pp. 1-350
4. CARMAGNOL, F., P. M. SINET and H. JEROME(1983)Biochem. Biophys. Acta 759 : 49-57
5. BRUNK, C. F., K. C. JONES and T. W. JAMES(1979)Anal. Biochem. 92 : 497-500
6. WATKINSON, J. H. (1966)Anal. Chem. 38(1) : 92-97
7. WENDEL, A., M. FAUSEL, H. SAFAYHI, G. TRIEGS and R. OTTER (1984) Biochem. Pharmacol. 33 : 3241-3245