

水産加工食品中のコレステロール酸化物とその細胞毒性

大谷貴美子¹・宮原郁¹・亀井正治²・湯浅勲¹

(¹大阪市立大学生活科学部, ²大阪市立環境科学研)

Cholesterol Oxides in Japanese Traditional Marine Products and Their Cytotoxicity

Kimiko OHTANI¹, Kaoru MIYABARA¹, Masaharu KAMEI², Isao YUASA¹,

¹Faculty of Human Life Science, Osaka City University, ²Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences

Cholesterol is easily oxidized enzymatically and non-enzymatically, producing various kinds of cholesterol oxides. Several kinds of cholesterol oxides are identified and quantitated in food and animal tissues. Cholesterol oxides have a wide variety of effects both *in vitro* and *in vivo* which may be involved in human diseases. However, the mechanism of biological effects of cholesterol oxides is not elucidated. In this study, we examined the contents of cholesterol oxides in Japanese traditional marine products, salted and semi-dried Shishamo and Surume, dried squid, and the biological effects of a few kinds of cholesterol oxides on cultured rat hepatocytes, which were freshly prepared by perfusing collagenase.

A very small amount of 7- α - and 7- β -hydroxycholesterol, 5 α , 6 α -, and 5 β , 6 β -epoxide, and 7-ketocholesterol were identified in both Shishamo and Surume.

7-Ketocholesterol, concentration of 100 μ M, showed a strong cytotoxicity for hepatocytes, and it killed hepatocytes without the release of LDH to the culture medium. Moreover, carboxy-PTIO, the chemicals for the selective elimination of NO radical, increased viability of hepatocytes, indicating that NO radical is involved in the cell death of hepatocytes.

コレステロールは種々の条件下で酸化され、数多くのコレステロール酸化物を生成し¹⁾、動脈硬化の発症²⁾や発癌³⁾等、生体に対して重大な影響を及ぼすことが報告されている。しかしながら、その作用メカニズムについては十分には解明されていない。また、我々日本人が日常どのような分子種のコレステロール酸化物を摂取しているのかについても殆ど報告がない。そこで、本研究では、日本人の伝統的水産加工食品の中からししゃもと剣先するめについて、含まれているコレステロール酸化物の同定と、培養肝細胞を用いた細胞毒性の検討を行った。

所在地：大阪市住吉区杉本3-3-138 (〒558)

実験方法

1. 水産加工食品中のコレステロール酸化物

試料を粉碎後、脂質を抽出し、ケン化後、不ケン化物をTLCに供し、コレステロール酸化物を分画した。ついでTMS化後、GC、およびGC-MS分析に供した。

2. 細胞毒性の実験

肝細胞は、コラゲナーゼ灌流法にて調製し、一晩前培養後、各種実験に供した。細胞の生存率は中性色素法⁴⁾で、細胞膜の傷害は、培養液中の乳酸脱水素酵素⁵⁾を、NOラジカルは培養液中のNO₂をGriess試薬⁶⁾を用い測定した。コレステロール、リン脂質の測定はキットを用いた。

結果および考察

ししゃも、するめともに、量的には非常に僅かではあったが、7 α -、7 β -hydroxycholesterol、5 α 、6 α -、5 β 、6 β -epoxideおよび7-ketocholesterolの存在が確認された。海外の文献^{7,8)}でも、乳製品や卵黄パウダーなどの長期保存時におけるコレステロール酸化物の量はppm単位であると報告されている。つまり、我々がこういった食品を摂取しても、そこに含まれているコレステロール酸化物が、直接、生体に対して重大な影響を及ぼすことは少ないと考えられる。一方、我々の生体の中、例えば、血漿中には、 μ M単位のコレステロール酸化物が存在することが報告されている⁹⁾。そこで、培養肝細胞を用いて、いくつかのコレステロール酸化物の細胞毒性について検討を行った。Fig. 1に、細胞の生存率に及ぼす影響について示したが、特に、Triolと7-ketocholesterol添加により生存率が有意に低下した。そこで、最も生存率の低下が著しかった7-ketocholesterolについて、LDHの培養液中への溶出について検討を行ったところ、Fig. 2に示すように、LDHの溶出は殆ど認められず、7-ketocholesterolによる肝細胞死は細胞膜の傷害によるものではないことが示唆された。また、Fig. 3には、7-ketocholesterol添加4時間後の細胞膜のリン脂質およびコレステロール含有量を示したが、特に、コレステロール含有量が有意に高値を示し、膜の流動性が大きく変化していることが示唆された。また、近年、アポトーシスとの関連が示唆されている¹⁰⁾NOラジカルについて検討を行ったところ、特に7-ketocholesterol添加

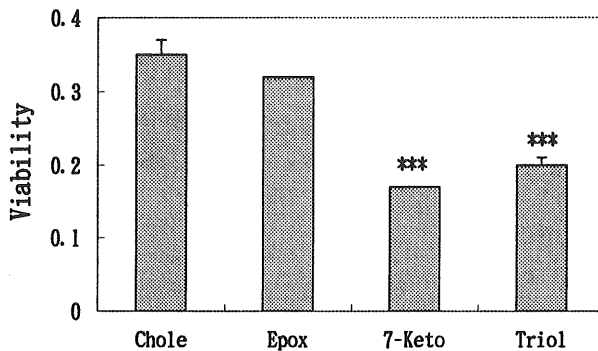


Fig. 1 Effect of cholesterol oxide on the cell viability.

Liver cells were cultured for 24h after the addition of each 100 μ M cholesterol oxide.

***p<0.005

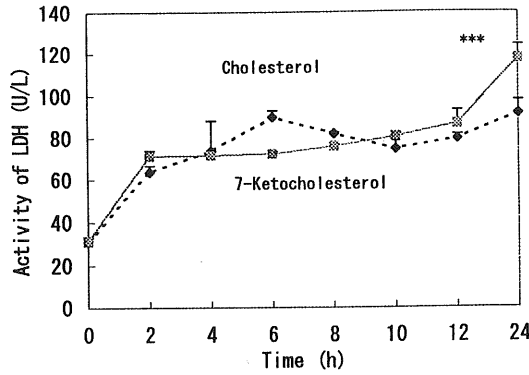


Fig. 2 Time course of the release of LDH into culture medium. Cells were cultured with 100 μ M cholesterol oxide. *** p<0.005

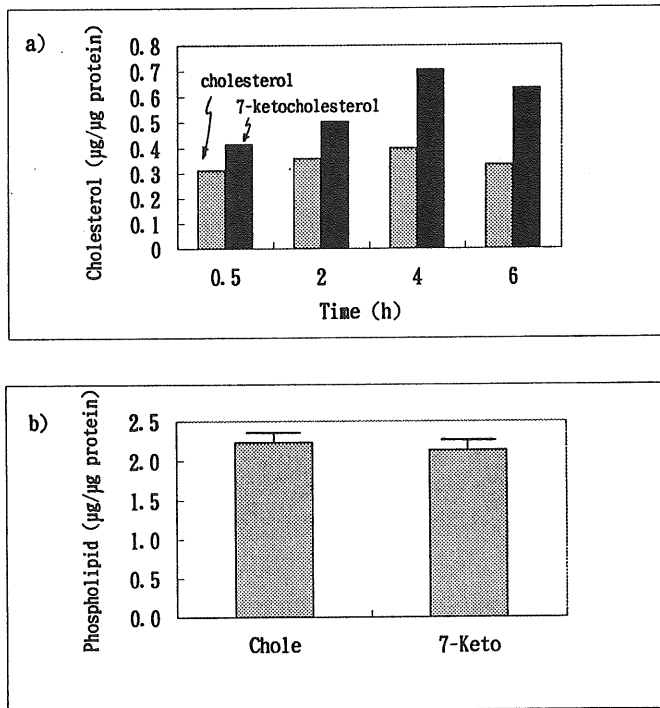


Fig. 3 Time course of the content of cholesterol in the cell membrane and the content of phospholipid 4h after the addition of 100 μ M cholesterol oxide into culture medium. *p<0.05

群で培養初期に急激な NO ラジカルの生成が示され、細胞死への NO ラジカルの関与が示唆された。そこで、NO ラジカルの選択的消去剤、carboxy-PTIO、を 7-ketocholesterol 添加30分前に添加し、細胞の生存率に及ぼす影響を検討した。結果は、Fig. 4 に示したが、carboxy-PTIO 添加により生存率がコントロール群と同レベルに維持され、7-ketocholesterol による細胞死に NO ラジカルが関与していること

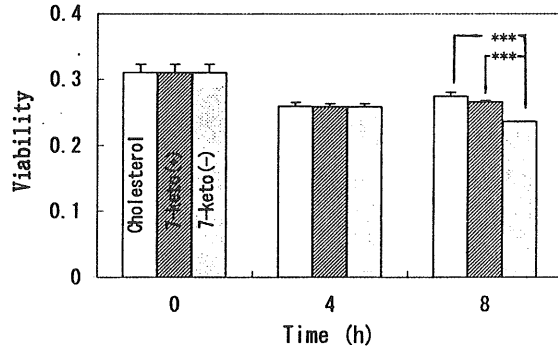


Fig. 4 Effect of carboxy-PTIO on the cell viability.

Cells were cultured with (+) or without (-) 100 μ M carboxy-PTIO. After 30min, 100 μ M cholesterol oxide was added to the culture medium.

***p<0.005

が示唆された。以上の結果より、培養液に7-ketocholesterolを加えると、細胞膜の流動性に変化が生じ、それがなんらかのシグナルを介し、NOラジカルの生成を促進させ、細胞死が誘発されたものと考えられた。また細胞膜の傷害が認められなかったことから、細胞死はアポトーシスによるものと考えられ、現在、この仮説について検討をおこなっている。

文 献

- 1) L.L. Smith (1992) Biological effects of cholesterol oxide, CRC press, pp.7
- 2) C.B. Taylor, S.K. Peng, K.J. Safarik, B. Kapusinska, W. Bochenek, and J. Hill (1983) Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., 42, 789
- 3) S. Reddy, C.W. Martin, and E.L. Wynder (1977) Cancer Res., 37, 1697
- 4) S-Z Zhang, M.M. Lipsky, B.F. Trump, and I-C. Hsu (1990) Cell Biology and Toxicology, 6, 219
- 5) F. Kubowitz and P. Ott (1943) Biochem. Z., 314, 94
- 6) S. Kondo, N. Ishiguro, H. Iwata, I. Nakashima, and K. Isobe (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun., 197, 1431
- 7) J. Nourooz-Zadeh and L.-Å. Appelqvist (1988) J. Food Sci., 53, 74
- 8) J. Nourooz-Zadeh and L.-Å. Appelqvist (1987) J. Food Sci., 52, 57
- 9) I. Bjorkheim, O. Breuer, B. Angelin, and A.A. Wikstrom (1988) J. Lipid Res., 29, 1031
- 10) Kitajima, K. Kuwahara, T. Nakajima, Y. Soejima, T. Matsuyama, and I. Maruyama (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun., 204, 244