

培養血管平滑筋細胞における 脂質代謝に関する研究

第 2 編

脂肪酸代謝に及ぼす抗酸化剤の影響について

岡山大学医学部第 2 内科教室 (主任: 木村郁郎教授)

出 宮 通 孝

(昭和62年 9 月26日受理)

Key Words: 平滑筋細胞, 脂肪酸分析, α -トコフェロール, コエンザイム Q₁₀, 抗酸化剤

結 言

血管平滑筋細胞は動脈硬化の形成および進展に大きく関与しており¹⁻³⁾過酸化脂質生成の主座⁴⁾となることが知られている。一方粥状硬化巣にはコレステロールを含む脂質球が蓄積され⁵⁻⁶⁾、主座を占める変性平滑筋細胞内の脂質にはオレイン酸エステルが多く含まれるとの報告⁷⁾がある。一般に動脈壁細胞の含む複合脂質にはコレステロールエステル(CE), トリグリセライド(TG), リン脂質(PL)等があり、正常壁と動脈硬化壁を比較すると、これらの脂質の脂肪酸構成に相違があるとの報告⁸⁾もある。動脈硬化巣への脂質の蓄積は血液中の成分であるリポ蛋白と動脈壁との相互作用に密接な係わりをもち、血清のリポ蛋白濃度の変化は直接にあるいは間接に動脈壁に影響を及ぼすといわれている。動脈壁内での脂質蓄積を行う脂肪酸の起源は、その半分が血清中より取り込まれ、残りの半分は細胞内で合成される⁹⁾。著者は動脈硬化現象の一つと考えられる平滑筋細胞の増殖過程における脂肪酸代謝、ならびに抗酸化剤添加による影響を観察する目的で、正常家兔、高脂血症家兔および老化家兔を作製し各々の大動脈中膜より得られた平滑筋細胞を用い、培養液中に抗酸化剤として α -Tocopherol (α -Toc), Coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀)を添加し培養細胞の増殖期における脂肪酸構成比の変化を、CE, TG, PL, の各脂質

分画において検討を行った。

材 料・方 法

1. 実験動物及び飼育法

2.0~2.5kgの雄性日本白色家兔を用い、以下の3種類に分けて飼育した。

1) 正常家兔 (NR): オリエンタル標準飼料 (CR-2) にて12週間飼育した。

2) 高脂血症家兔 (HL): 1%コレステロール添加飼料にて12週間飼育した。

3) 老化家兔 (Aged): CR-2 にて2年間以上飼育した。

2. 細胞分離培養法

Ross の方法¹⁰⁾に準じ、NR, HL および Aged の各々の大動脈中膜より平滑筋細胞を分離し各種培養細胞を作製した。

3. 抗酸化剤添加培養液の作製

Cornwell らの方法¹⁰⁾に準じ、 α -Toc の添加に際し dl- α -Toc (エーザイ) に溶媒としてエタノールを用い10% FCS 加 RPMI-1640をベースに5 μ g/ml, 10 μ g/ml の2系列の濃度に調整した。CoQ₁₀の添加についても同様の方法で行い、濃度は2 μ g/mlに調整した。

4. 実験培養法

NR, HL, Aged の3種の家兔より得られた平滑筋細胞は、3~7継代を経たのち実験に用いた。抗酸化剤添加培養液に単離化した各種培養細胞を播き37°C 5% CO₂の条件下で5日間の培

養を行った。細胞増殖が単層群生状態になる5日目のシャーレを採取し細胞および培養液を測定に供した。尚、詳細に関しては、第1編に記したので省略する。

5. 測定法

1) 細胞増殖度および細胞内過酸化脂質量の測定

培養細胞の増殖度は、1シャーレ当たりのDNA量で表わし、DNAの測定はHinegardnerの方法¹¹⁾を用いた。過酸化脂質量は、1シャーレ当たりのTBA量で表わし、その測定は、真杉らの方法¹²⁾に準じた。細胞単位当たりの過酸化脂質量は、TBA量をDNA量で除して求めた。

2) 細胞および培養液中の脂肪酸構成比の測定

培養細胞が単層群生状態になる培養5日目のシャーレを採取し培養液中の脂肪酸については、培養液を1500rpm, 10minの遠沈を行った上清を測定に供した。また細胞は、シャーレのままPBSを加えてよく洗浄し0.25%トリプシン-EDTA液にて細胞をシャーレより剥離させ、さらに単離させたものを細胞浮遊液として測定に供した。

(1) 培養液中総脂質の抽出

培養液の遠沈上清0.2mlをFolch法¹³⁾にて、クロロホルム-メタノール(2:1 v/v)溶液10mlを添加し、よく攪拌し2時間静置した。下層5mlに水2mlを加え、よく攪拌の後2000rpm 10min遠沈し上層を密栓付き試験管にとりN₂ガスにて蒸発乾固させメチル化の試料とした。

(2) 細胞総脂質の抽出

細胞浮遊液0.5mlを超音波破碎装置にて150W 20secの間かけて、細胞を十分に破碎した後、クロロホルム-メタノール(2:1 v/v)溶液10mlを添加し、よく攪拌の後2時間静置した。再度よく攪拌静置の後、下層5mlに水2mlを加え洗浄し、さらに攪拌し2000rpm 10min遠沈し上層を試験管にとりN₂ガスにて蒸発乾固させ薄層クロマトグラフの試料とした。

(3) 薄層クロマトグラフによる細胞脂質の分画法

Krellらの方法¹⁴⁾に基づき行った。薄層プレートとしてEASTMAN CHROMAGRAPH SILICAGEL SHEET (Kodak)を60℃の乾燥室内で3時間乾燥させて用いた。前記の蒸発乾

固された細胞総脂質を酢酸エチル50 μ lにて溶解しHamilton-syringeを用い薄層シート上にスポットとして3回塗布した。混合溶媒としてはヘキサン:エーテル:酢酸(82:18:1 v/v/v)を用い、ガラス製展開槽内に濾紙を敷きつめ密封した。またシートの両側には標準器としてCE・TG・PLの混合物を塗布した。15cmの展開が終了した後シートを展開槽より取り出し両側の標準品の展開部分をはさみで切り取り、I₂ガスで着色し展開距離による位置確認を行った。シートの試料は展開距離によってCE, TG, PLに分けてはさみで切断した。各々の試料のCEとTGは、クロロホルム-メタノール(9:1 v/v)溶液3mlにて3回の抽出を行い、またPLについてはメタノール6mlを用いて3回の抽出を行った。これらの抽出物は密栓付き試験管内でN₂ガスにて蒸発乾固させ、メチル化の試料とした。

(4) 細胞および培養液試料のメチル化

細胞脂質のCE, TG, PLの各分画の抽出乾固物並びに培養液中の総脂質抽出乾固物はStoffelらの方法¹⁵⁾に準じ0.5mlドライベンゼン添加で溶解した後、塩酸メタノール5mlを加え、よく攪拌し内部標準としてペンタデカン酸50 μ gを添加し、さらに攪拌の後、密栓をして100℃2時間加熱した。冷却後、石油エーテル3mlで2回抽出し、上層をN₂ガスにて蒸発乾固しアセトン50 μ lに溶解しガスクロマトグラフィー分析の試料とした。

(5) ガスクロマトグラフィー分析

10% FON 充填の直径3mm, 長さ2.0mのガラスカラムをもちい、Injection temp. 230℃, Initial temp. 220℃, Final temp. 230℃の条件の元で試料の分析を行った。ガスクロマトグラフは島津(GC-7A)を用い、日本電子科学の卓上型平衡記録計(U-228)でチャート記録し、同時に島津のクロマトパック(C-E4A)を用いて同定可能であったミリスチン酸(14:0)、パルミチン酸(16:0)、パルミトレイン酸(16:1)、ステアリン酸(18:0)、オレイン酸(18:1)、リノール酸(18:2)およびアラキドン酸(20:4)の7種の脂肪酸のピーク面積比(%)を算出し検討を行った。

成 積

1. 正常家兎由来の平滑筋細胞 (NR-SMC) の脂肪酸構成 (表 1)

1) コレステロールエステル (CE) 分画について

培養 5 日目の平滑筋細胞の CE 分画の脂肪酸構成比について α -Toc 5 μ g/ml の添加によって 18 : 2 の低下を認め、 α -Toc10 μ g/ml の添加では 18 : 2 の低下に加え 18 : 1 の著明な上昇が認められた。一方 CoQ₁₀ の添加は 14 : 0 の低下のみを認めた。

2) トリグリセライド (TG) 分画について

α -Toc 5 μ g/ml の添加は 18 : 1 の上昇を示し、 α -Toc10 μ g/ml の添加では 16 : 0 の上昇、18 : 1 の著明な上昇に加え、20 : 4 の低下も認められた。しかしながら CoQ₁₀ による影響は有意でなかった。

3) リン脂質 (PL) 分画について

α -Toc 5 μ g/ml の添加は 18 : 0 の上昇と 18 : 2 の低下を示し、 α -Toc10 μ g/ml の添加では 18 :

0 の上昇を認めたのみであった。一方 CoQ₁₀ の添加は 18 : 2 の低下のみを示した。

2. 高脂血症家由来の平滑筋細胞 (HL-SMC) の脂肪酸構成 (表 2)

1) CE 分画について

α -Toc 5 μ g/ml の添加は 18 : 1 の著明な上昇、18 : 2 の著明な低下を示した。 α -Toc10 μ g/ml の添加では 16 : 0 の低下に加え 18 : 1 のさらに著明な上昇および 18 : 2 の低下が認められた。また CoQ₁₀ の添加でも 18 : 1 の上昇がみられた。

2) TG 分画について

α -Toc 5 μ g/ml の添加は 18 : 1 の著明な上昇と 18 : 2 の著明な低下を示し、 α -Toc10 μ g/ml の添加では 16 : 0 の上昇、18 : 0 の上昇に加え 18 : 1 のさらに著明な上昇が認められた。また 18 : 2 は検出不能に至るほどの著明な低下を示した。CoQ₁₀ の添加では 18 : 1 の上昇と 18 : 2 のより著明な低下がみられた。

3) PL 分画について

α -Toc 5 μ g/ml の添加は 16 : 0 の低下と 18 : 0 の著明な上昇に加え 18 : 2 の低下をも示した。

表 1 抗酸化剤添加培養の 5 日目における正常家兎血管平滑筋細胞 (NR-SMC) の脂肪酸構成比 (%)

M \pm SD * p<0.05 ** p<0.01

	Control	α -Toc 5 μ g/ml	α -Toc 10 μ g/ml	CoQ ₁₀ 2 μ g/ml	
Cholesterol ester	14:0	3.5 \pm 1.0	2.9 \pm 1.2	3.2 \pm 0.6	1.9 \pm 1.1*
	16:0	26.7 \pm 4.3	26.4 \pm 2.3	24.3 \pm 3.6	23.6 \pm 2.9
	16:1	6.4 \pm 0.6	6.8 \pm 1.1	5.3 \pm 1.2	4.3 \pm 1.9
	18:0	16.8 \pm 2.7	17.2 \pm 1.4	15.9 \pm 1.2	17.8 \pm 1.8
	18:1	27.0 \pm 2.3	29.9 \pm 1.9	32.7 \pm 2.1**	29.6 \pm 2.3
	18:2	9.4 \pm 1.2	7.0 \pm 0.9**	7.6 \pm 1.2*	8.4 \pm 1.7
	20:4	5.1 \pm 1.1	4.9 \pm 1.3	6.3 \pm 0.9	4.9 \pm 1.5
Triglyceride	14:0	7.6 \pm 0.8	6.7 \pm 0.9	5.9 \pm 1.2	7.3 \pm 0.6
	16:0	31.2 \pm 1.2	32.4 \pm 2.1	33.4 \pm 1.1*	31.7 \pm 0.9
	16:1	8.3 \pm 2.1	10.1 \pm 1.7	9.8 \pm 1.1	10.1 \pm 1.9
	18:0	20.8 \pm 2.1	18.6 \pm 1.4	18.6 \pm 3.1	21.1 \pm 2.3
	18:1	29.3 \pm 1.1	31.4 \pm 1.4*	34.2 \pm 1.9*	30.9 \pm 1.7
	18:2	2.1 \pm 1.1	0.9 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1	1.4 \pm 0.2
	20:4	2.9 \pm 1.3	3.7 \pm 1.2	1.1 \pm 0.9*	2.1 \pm 1.3
Phospholipid	14:0	3.0 \pm 0.6	2.9 \pm 0.3	2.4 \pm 0.2	2.6 \pm 1.4
	16:0	20.4 \pm 1.2	22.4 \pm 2.4	18.2 \pm 4.6	19.8 \pm 0.9
	16:1	4.2 \pm 0.8	3.6 \pm 0.9	1.8 \pm 2.4	2.6 \pm 1.4
	18:0	14.2 \pm 0.9	15.9 \pm 1.2*	15.4 \pm 0.4*	14.8 \pm 1.2
	18:1	24.2 \pm 1.9	26.4 \pm 3.6	24.5 \pm 2.9	23.2 \pm 4.5
	18:2	3.9 \pm 0.7	2.3 \pm 1.2*	3.3 \pm 0.6	2.7 \pm 0.9*
	20:4	26.8 \pm 5.4	26.9 \pm 3.4	30.4 \pm 1.9	29.0 \pm 2.5

表 2 抗酸化剤添加培養の 5 日目における高脂血症家兎血管平滑筋細胞 (HL-SMC) の脂肪酸構成比 (%)

M \pm SD * p<0.05 ** p<0.01

*** p<0.001

	Control	α -Toc 5 μ g/ml	α -Toc 10 μ g/ml	CoQ ₁₀ 2 μ g/ml	
Cholesterol ester	14:0	10.4 \pm 1.2	10.2 \pm 2.3	8.4 \pm 0.9	14.3 \pm 1.2
	16:0	28.4 \pm 2.6	27.9 \pm 3.4	24.2 \pm 1.8*	29.9 \pm 2.9
	16:1	4.9 \pm 2.1	5.9 \pm 2.4	5.7 \pm 1.6	5.3 \pm 2.1
	18:0	14.7 \pm 3.2	11.3 \pm 3.8	12.2 \pm 2.6	11.2 \pm 2.9
	18:1	24.3 \pm 2.6	30.9 \pm 2.6**	36.3 \pm 2.4***	27.4 \pm 1.4*
	18:2	6.7 \pm 1.2	3.6 \pm 0.3**	4.1 \pm 0.6*	4.7 \pm 2.3
	20:4	4.2 \pm 1.1	2.9 \pm 2.1	3.1 \pm 1.4	4.3 \pm 1.9
Triglyceride	14:0	6.3 \pm 0.9	7.1 \pm 1.7	4.5 \pm 0.7	3.9 \pm 1.2
	16:0	30.8 \pm 2.4	31.4 \pm 1.9	34.4 \pm 2.1*	27.8 \pm 3.5
	16:1	9.7 \pm 4.2	9.1 \pm 3.6	10.1 \pm 2.8	10.4 \pm 1.9
	18:0	18.3 \pm 0.9	17.6 \pm 2.7	20.3 \pm 1.1*	19.4 \pm 1.1
	18:1	24.4 \pm 1.2	27.6 \pm 1.7**	28.7 \pm 1.4**	27.4 \pm 1.6*
	18:2	1.8 \pm 0.3	0.5 \pm 0.2**	trace***	0.9 \pm 0.2***
	20:4	4.3 \pm 2.6	2.3 \pm 1.2	1.8 \pm 1.2	1.9 \pm 0.8
Phospholipid	14:0	2.7 \pm 0.4	2.6 \pm 0.3	2.1 \pm 0.4*	2.3 \pm 0.6
	16:0	19.8 \pm 2.9	14.5 \pm 3.6*	14.6 \pm 2.9*	16.4 \pm 2.1
	16:1	3.9 \pm 0.8	3.8 \pm 0.9	4.6 \pm 0.8	5.1 \pm 0.5*
	18:0	10.3 \pm 1.6	13.9 \pm 0.9**	14.9 \pm 1.1***	12.7 \pm 1.5*
	18:1	26.4 \pm 1.8	27.4 \pm 2.1	28.4 \pm 1.9	27.6 \pm 1.9
	18:2	3.6 \pm 0.4	3.1 \pm 0.2*	2.9 \pm 0.2**	2.7 \pm 0.6*
	20:4	29.9 \pm 2.2	28.1 \pm 2.8	26.0 \pm 1.9*	29.7 \pm 1.9

α -Toc10 μ g/mlの添加では14:0の低下, 16:0の低下, 18:0の著明な上昇に加え, 18:2の著明な低下と20:4の低下も認められた。またCoQ₁₀の添加でも16:1の上昇, 18:0の上昇および18:2の低下がみられた。

3. 老化家兔由来の平滑筋細胞 (Aged-SMC) の脂肪酸構成 (表3)

1) CE分画について

α -Toc10 μ g/mlの添加によってのみ14:0の低下が認められ, 低濃度の α -TocやCoQ₁₀の添加

による影響はみられなかった。

2) TG分画について

α -Toc, CoQ₁₀の添加による影響はみられなかった。

3) PL分画について

α -Toc10 μ g/mlの添加によってのみ14:0の低下が認められ, 低濃度の α -TocやCoQ₁₀の添加による影響はみられなかった。

4. 培養液中の総脂肪酸構成 (表4)

α -TocやCoQ₁₀の添加による影響はNR-SMC, HL-SMC, Aged-SMCのいずれの細胞培養液中でも有意差はみられなかった。

表3 抗酸化剤添加培養の5日目における老化家兔血管平滑筋細胞 (Aged-SMC) の脂肪酸構成比 (%)
M \pm SD * p<0.05

	Control	α -Toc 5 μ g/ml	α -Toc 10 μ g/ml	CoQ ₁₀ 2 μ g/ml	
Cholesterol ester	14:0	11.4 \pm 0.8	11.6 \pm 0.9	9.8 \pm 0.9*	9.9 \pm 1.2
	16:0	33.7 \pm 5.2	36.7 \pm 4.9	34.2 \pm 2.1	36.8 \pm 4.3
	16:1	3.7 \pm 1.3	3.6 \pm 1.1	3.9 \pm 1.1	3.3 \pm 1.2
	18:0	17.4 \pm 1.7	19.7 \pm 4.7	19.6 \pm 2.1	19.8 \pm 4.4
	18:1	26.6 \pm 4.2	24.4 \pm 3.6	28.3 \pm 4.9	23.3 \pm 7.2
	18:2	2.7 \pm 1.4	1.9 \pm 1.2	1.9 \pm 1.1	1.6 \pm 1.3
	20:4	2.6 \pm 1.2	1.8 \pm 1.1	1.8 \pm 0.8	2.3 \pm 1.3
Triglyceride	14:0	6.7 \pm 1.2	4.7 \pm 1.3	5.4 \pm 0.8	6.4 \pm 1.2
	16:0	27.4 \pm 3.4	29.4 \pm 2.6	26.4 \pm 2.3	27.8 \pm 1.2
	16:1	7.2 \pm 2.1	6.8 \pm 1.2	7.8 \pm 3.4	7.9 \pm 0.9
	18:0	18.0 \pm 2.9	17.6 \pm 2.1	19.2 \pm 1.9	18.3 \pm 3.4
	18:1	26.7 \pm 2.6	25.3 \pm 1.4	28.1 \pm 1.4	29.9 \pm 1.7
	18:2	3.4 \pm 0.9	3.8 \pm 0.6	2.9 \pm 1.1	3.6 \pm 0.4
	20:4	4.7 \pm 1.3	3.9 \pm 1.1	3.6 \pm 1.4	2.3 \pm 1.7
Phospholipid	14:0	4.2 \pm 1.0	3.6 \pm 2.1	2.4 \pm 0.6*	3.8 \pm 0.7
	16:0	24.5 \pm 6.4	30.6 \pm 8.3	29.2 \pm 6.2	28.7 \pm 4.3
	16:1	3.3 \pm 1.2	2.1 \pm 0.9	3.9 \pm 0.4	2.6 \pm 0.7
	18:0	15.0 \pm 2.3	16.4 \pm 3.5	13.2 \pm 2.1	14.7 \pm 1.9
	18:1	20.4 \pm 6.6	21.4 \pm 3.2	26.4 \pm 7.2	23.9 \pm 4.9
	18:2	0.9 \pm 0.6	1.3 \pm 0.8	1.2 \pm 0.4	1.8 \pm 1.1
	20:4	24.3 \pm 9.2	22.2 \pm 4.5	20.3 \pm 6.4	24.3 \pm 4.6

考 按

動脈硬化の原因は動脈壁での平滑筋細胞の増殖ならびに脂肪球の蓄積によって生ずるといわれ, その脂肪球にはコレステロールエステルが多く含まれることは, よく知られている¹⁶⁾¹⁷⁾. Geerらによると動脈壁の脂肪素病巣にはオレイン酸コレステロールが多く含まれ, 一方, 正常部位にはリノール酸コレステロールが多いとの報告がなされている。動脈壁の代謝に注目すると, 動脈の壁細胞は受動的に血液中より種々の外因性脂肪酸を取り込む一方, 能動的にも自ら必要に応じて脂肪酸を合成している。しかしながら, 大動脈での脂肪酸合成能力は肝臓のそれに比して1/10にみえないとの報告⁶⁾もある。一般に, 脂肪酸合成には次の3経路が考えられている。まず de novo 合成はサイトゾールでの, いわゆる malonyl CoA 経路であり全脂肪酸合成の約半分

表4 抗酸化剤添加培養の5日目における培養液中の総脂肪酸構成比 (%)

	Control			α -Toc 10 μ g/ml			CoQ ₁₀ 2 μ g/ml		
	NR	HL	Aged	NR	HL	Aged	NR	HL	Aged
14:0	3.2 \pm 0.8	3.1 \pm 0.7	3.9 \pm 0.3	3.9 \pm 0.6	3.3 \pm 0.7	4.2 \pm 1.1	3.7 \pm 0.6	3.5 \pm 0.3	2.9 \pm 0.4
16:1	28.7 \pm 2.3	30.1 \pm 2.1	25.6 \pm 3.9	30.6 \pm 1.9	34.6 \pm 2.4	27.3 \pm 0.9	30.8 \pm 2.2	31.4 \pm 1.9	29.9 \pm 1.8
16:1	15.1 \pm 1.9	13.0 \pm 1.7	17.3 \pm 1.6	12.5 \pm 2.4	13.7 \pm 1.6	12.1 \pm 3.1	13.9 \pm 1.1	16.5 \pm 2.0	17.7 \pm 3.1
18:0	19.5 \pm 1.5	21.4 \pm 1.1	17.8 \pm 2.5	20.8 \pm 0.9	19.6 \pm 1.7	21.4 \pm 1.7	19.5 \pm 0.9	21.1 \pm 1.5	17.0 \pm 2.1
18:1	22.3 \pm 2.1	23.6 \pm 2.4	22.9 \pm 3.0	21.6 \pm 1.9	20.7 \pm 2.1	24.3 \pm 1.3	20.8 \pm 0.9	19.7 \pm 1.3	19.9 \pm 1.6
18:2	1.2 \pm 0.1	0.9 \pm 0.3	2.1 \pm 0.8	1.0 \pm 0.6	1.3 \pm 0.1	1.7 \pm 0.4	3.5 \pm 2.4	2.1 \pm 1.3	1.0 \pm 0.2
20:4	7.6 \pm 0.9	6.9 \pm 1.2	5.4 \pm 1.1	7.6 \pm 1.5	9.8 \pm 2.1	7.1 \pm 0.9	5.8 \pm 1.3	7.7 \pm 1.8	8.7 \pm 2.0

を占めるといわれている。次にはミトコンドリアでの chain elongation を主とする合成であり acetate または acyl CoA を基質として炭素数を 2 個増やす働きをする¹⁹⁾²⁰⁾。最後はマイクロソームでの chain elongation および monounsaturatation, desaturatation を主とするものであり、この系では malonyl CoA と acyl CoA を基質として利用している。以上の経路を経て脂肪酸は、acyl CoA となって細胞内に取り込まれ合成されコレステロールエステル、トリグリセライド、リン脂質の形で蓄積された後、加水分解によって再び Free fatty acid (FFA) となって再合成に利用される。一方、合成された多価不飽和脂肪酸は、サイクロオキシゲナーゼ系を介しプロスタグランジンやトロンボキサンの形成に携わる他、リポキシゲナーゼ系を介してロイコトリエンをも形成し、これらは生体内の活性物質として種々の病態に重要な役割を持つといわれている。

現在抗酸化剤の役割については数多くの知見があるが、著者は第 1 編で、抗酸化剤の α -Toc が培養血管平滑筋細胞の増殖を亢進せしめ、細胞内の過酸化脂質を抑制することを示した。その中で細胞増殖について、培養 5 日目まで α -Toc の添加が NR-SMC, HL-SMC, Aged-SMC の各細胞種全てを亢進させ、特に HL-SMC に於て顕著であったこと、CoQ₁₀ の添加では影響がみられなかったことを示した(図 1)。また細胞内過酸化脂質の α -Toc による抑制については、培養 5 日目 HL-SMC に於てのみ有意であったことなどを示した(図 2)。以上の結果を踏まえ、本実験では培養血管平滑筋細胞が単層群生状態になる培養 5 日目の脂肪酸代謝について各々の脂質分画の脂肪酸構成比を求め、細胞増殖度ならびに細胞内過酸化脂質との関連を比較検討した。まず CE 分画の脂肪酸構成比について、NR-SMC では α -Toc の添加は 18:1 の相対的な増加と 18:2 の相対的な低下を示し、HL-SMC ではこの影響はより著明となり、しかも 16:0 の低下と 18:0 の低下傾向をも示したことは細胞増殖の過程で 16:0 → 18:0 への chain elongation, 18:0 → 18:1 の monounsaturatation, 18:2 → 20:4 の desaturatation と chain elongation の経路の亢進を意味し、これらの脂肪酸合成の主

座がマイクロソームにある為²⁰⁾ Acyl CoA synthetase や Acyl CoA cholesterol transferase が活性化され、18:1 の形で細胞内に蓄積されると考えられる。一方 18:2 は外因性で培養液中には一定量しか存在せず 20:4 → プロスタグランジン、ロイコトリエンへの経路、もしくは 18:2 → 過酸化脂質への経路の亢進が示唆されるかもしれない。一方、Aged-SMC においては α -Toc, CoQ₁₀ の脂肪酸代謝への影響は明確でなく、このことは Aged-SMC が細胞増殖の低下

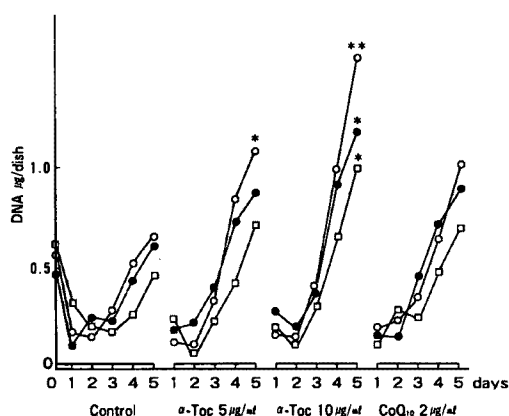


図 1 培養血管平滑筋細胞の増殖度に及ぼす抗酸化剤添加の影響

● = NR-SMC, ○ = HL-SMC, □ = Aged-SMC
* P < 0.05 ** P < 0.01

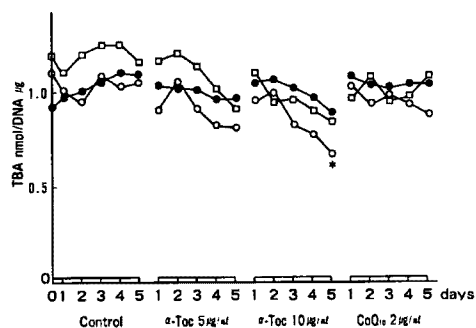


図 2 培養血管平滑筋細胞の過酸化脂質量に及ぼす抗酸化剤添加の影響

● = NR-SMC, ○ = HL-SMC, □ = Aged-SMC
* P < 0.05

や抗酸化剤への反応の低下を介して細胞内の18:1の蓄積をも抑制し、細胞の活性が低下した一種の老化現象を、継代された培養細胞が受け継いでいることを意味しHL-SMCの細胞活性の亢進との比較で、細胞の性質の相違がみられたことで大変興味深い。次にTG分面の脂肪酸構成比についてNR-SMCでは α -Tocの添加は16:0の増加、18:1の増加に加え20:4の低下がみられ、またHL-SMCでは、これらの影響はさらに亢進され18:0の増加、18:2の著明な低下、および14:0の低下傾向もみられた。即ちこのことは14:0 \rightarrow 16:0、16:0 \rightarrow 18:0のchain elongationの亢進、および18:0 \rightarrow 18:1へのmonounsaturatationへの経路の亢進が示唆される。St. Clairらによると大動脈中の18:1は脂質分面中では、TG分面よりもCE分面に多く含まれ、18:1のコレステロール合成に関わる特殊性と報告²¹⁾している。一方18:2は、 α -Toc添加によりCE分面同様、TG分面でも低下しておりHL-SMCに於ては殆ど検出不能のレベルまでの低下を示した。この理由は18:2が外因性であり、細胞増殖に伴う膜合成の増加の為18:2 \rightarrow 20:4となって利用される以外にプロスタグランジンやロイコトリエンおよび過酸化脂質の原料になったとも推測²²⁾される。その結果として過酸化脂質が抑制を受け、 α -Tocが細胞増殖を亢進せしめたと考えられる。しかしながらAged-SMCにおいては、CE分面と同様に α -Tocの影響は著明でなく細胞の活性の低下を示唆せしめた。最後にPL分面の脂肪酸構成比について、NR-SMCにおいては α -Tocの添加は18:0の増加、18:2の低下を示し、HL-SMCでは、これらの亢進に加え14:0の低下、16:0の低下さらには20:4の低下をも示した。このことは細胞増殖に伴う膜脂質への供給に14:0 \rightarrow 16:0 \rightarrow 18:0のchain elongationおよび18:2 \rightarrow 20:4のchain elongation, desaturatationの経路の亢進が関与しており、20:4の低下から即ち20:4の利用、消費の可能性が示唆された。Cornwellらは培養平滑筋細胞に20:4を添加しプロスタグランジンなどの生理活性物質の生成が増加したことを報告²³⁾し、本実験の20:4の低下が消費であった可能性のあること

と一致した。一方PL分面において18:1の増加がみられなかったことは、PLとCEやTGとの間に脂肪酸代謝の面で何等かの違いがあると考えられた。既に木畑らは、エステル化に於て脂肪酸の種類が限定されることを報告し、この知見とも一致した。Aged-SMCについては、 α -Tocに対し反応性が低下するに留まらず、18:2の増加、18:0の低下傾向といった反対の影響を持ったことは、細胞膜の脆弱性や細胞代謝に何等かの欠陥や異常の存在が推測された。CoQ₁₀の添加による影響はNR-SMCではCE分面の14:0の低下とPL分面の18:2の低下、HL-SMCでのCE分面の18:1の低下、TG分面の18:1、18:0の増加と18:2の低下、PL分面の16:1、18:0の増加と18:2の低下などがみられた。CoQ₁₀は α -Tocとは異なった脂肪酸代謝の変動を示したものの生体にとって今後とも注目に価する抗酸化剤と考えられる。

培養液中の総脂質の脂肪酸構成比に関する検討では、NR-SMC、HL-SMC、Aged-SMCの細胞種間での有意差はみられなかった。その理由としては、培養後の液中の脂肪酸構成比と培養に用いたfetal calf serumの脂肪酸構成比とが近似しており、細胞のそれとは分面に差があったことで、細胞は培養液中から、または培養液中へ特異な脂肪酸のみの取り込みや放出がなかったことが推測される。即ち18:2を例にとると、これはあくまで外因性であり培養系の中では一定量しか存在しないにもかかわらず培養液中では脂肪酸構成比の変化はみられずこのことから裏づけられる。また過酸化脂質も培養液中へは放出されず、プロスタグランジンやロイコトリエンなどの生理活性物質の如き細胞外へと放出されるもの²³⁾と著しく異なっていることで興味深い事実であった。Morrisonらによると生体の脂肪酸代謝では、組織のFFAの取り込みは血液中よりの16:0が多いとの報告²⁴⁾がある。しかし内因性にも細胞内で脂肪酸の合成が生じている。動脈硬化に於て硬化巣での脂肪酸合成の約半分がform cell内で生じ²⁵⁾、その種類では18:1、20:3が多く20:4が少ないとの報告²⁶⁾がある。また脂質の分面では、CEには18:1、TGには18:0と18:1、PLには18:0が多く

エステル化されるとの報告²¹⁾もある。培養細胞を用いた著者の実験で、 α -Toc の添加が前記の脂肪酸代謝に近似した結果を呈したことは、動脈硬化における脂肪酸代謝と α -Toc が培養細胞の脂肪酸代謝に与える影響が似ているとも考えられるが、このことが直ちに α -Toc の動脈硬化促進作用を意味する訳ではない。 α -Toc が細胞の増殖度を高め、細胞内活性も高めている事実は、むしろ動脈硬化現象が細胞レベルあるいは組織レベルでの修復に対する一種の過剰反応とも認識できる。抗酸化剤の抗動脈硬化作用については尚一層の研究が望まれる。

結 語

正常、高脂血症および老化の3種の家兎を作製し、各々の大動脈中膜より得られた平滑筋細胞の培養を行い、抗酸化剤として α -Toc, CoQ₁₀ を培養液中に添加し細胞増殖の5日目における培養細胞および培養液中の脂肪酸代謝を観察し検討を行った。

1. α -Toc を添加した培養細胞の CE 分画ならびに TG 分画の脂肪酸構成比の変化ではオレイ

ン酸 (18:1) の上昇とリノール酸 (18:2) の低下がみられた。

2. α -Toc を添加した培養細胞の PL 分画ではステアリン酸 (18:0) の上昇とリノール酸 (18:2) およびアラキドン酸 (20:4) の低下がみられた。

3. α -Toc のこれらの影響は、3種類の細胞の中では HL-SMC が最も著明であり、Aged-SMC が最も低下していた。

4. CoQ₁₀ の添加による脂肪酸構成比への影響は α -Toc に比し低下していた。

5. 抗酸化剤の添加による培養液中での総脂質の脂肪酸構成比への影響は認められなかった。

稿をおえるにあたって御指導ならびに御校閲を賜った恩師大村郁郎教授に深謝するとともに、終始御指導をいただいた木畑正義講師に感謝の意を表する。

尚本論文の要旨は第25回日本老年医学会総会において発表した。

文 献

1. Ross R and Glomset JA : The pathogenesis of arteriosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med* (1976) 295, 369—377.
2. Ross R and Glomset JA : The pathogenesis of arteriosclerosis (second of two parts). *N Engl J Med* (1976) 295, 420—425.
3. Fischer-Dzoga K, Fraser R and Wissler RW : Stimulation of proliferation in stationary primary cultures of monkey and rabbit smooth muscle cells. : I. Effects of lipoprotein fractions of hyperlipemic serum and lymph. *Exp Mol Pathol* (1976) 24, 346—359.
4. Glavind J, Hartmann S, Clemmesen J, Jessen KE and Dam H : Studies on the role of lipoperoxides in human pathology. II. The presence of peroxidized lipids in the atherosclerotic aorta. *Acta Pathol Microbiol Scand* (1952) 30, 1—6.
5. Miller JS, Gavino VC, Ackerman GA, Sharma HM, Milo GE, Geer JC and Cornwell DG : Triglycerides, lipid droplets, and lysosomes in aorta smooth muscle cells during the control of cell proliferation with polyunsaturated fatty acids and vitamin E. *Lab Invest* (1980) 42, 495—506.
6. Stein O, Vanderhoek J and Stein Y : Cholesterol ester accumulation in cultured aortic smooth muscle cells. : Induction of cholesterol ester retention by chloroquine and low density lipoprotein and its reversion by mixtures of high density apolipoprotein and sphingomyelin. *Atherosclerosis* (1977) 26, 465—482.
7. Smith EB, Evens PH and Downham MD : Lipid in the aortic intima. The correlation of mor-

- phological and chemical characteristics. *J Atheroscler Res* (1967) 7, 171—186.
8. Dayton S and Hashimoto S : Regulation of cholesterol esterification in arterial and hepatic microsomal preparations. (Abstr.) VIII. World Congress of Cardiology, (1978) 39—42.
 9. Ross R : The smooth muscle cell, II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J Cell Biol* (1971) 50, 172—186.
 10. Cornwell DG, Huttner JJ, Milo GE, Panganamala RV, Sharma HM and Geer JC : Polyunsaturated fatty acids, vitamin E, and the proliferation of aortic smooth muscle cells. *Lipids* (1979) 14, 194—207.
 11. Hinegardner RT : An improved fluometric assay for DNA. *Anal Biochem* (1971) 39, 197—201.
 12. 真杉文紀, 中村哲也 : Sodium dodecyl sulphate 可溶化による肝チオバルビツール酸値とビタミン E, 薬物によるその変動. *ビタミン* (1977) 51, 21—29.
 13. Folch J, Lees M and Stanley GHS : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* (1957) 226, 497—509.
 14. Krell K and Hashim SA : Measurement of serum triglycerides by thin-layer chromatography and infrared spectrophotometry. *J Lipid Res* (1963) 4, 407—412.
 15. Stoffel W, Chu F and Ahrens Jr EH : Analysis of long chain fatty acids by gas-liquid chromatography. *Anal Chem* (1959) 31, 307—308.
 16. Morisaki N, Murano S, Shinomiya M, Sasaki N, Shirai K, Matsuoka N, Mizobuchi M, Akikusa B, Saito Y and Kumagai A : Lipid metabolism in arteriosclerotic arterial wall of rats. *Atherosclerosis* (1982) 43, 51—57.
 17. Smith EB, Slater RS and Chu PK : The lipids in raised fatty and fibrous lesions in human aorta. *J Atheroscler Res* (1968) 8, 399—419.
 18. Wakil SJ : Mechanism of fatty acid synthesis. *J Lipid Res* (1961) 2, 1—24.
 19. Sprecher H : The organic synthesis of unsaturated fatty acids. *Prog Chem Fats other lipids* (1978) 15, 219—254.
 20. Morisaki N, Matsuoka N, Shirai K and Kumagai A : Studies on acyl-CoA synthetase in rat arterial wall. *Atherosclerosis* (1980) 37, 439—447.
 21. St Clair RW, Lofland Jr HB and Clarkson TB : Composition and synthesis of fatty acids in atherosclerotic aortas of the pigeon. *J Lipid Res* (1968) 9, 739—747.
 22. Ohkawa H, Ohishi N and Yagi K : Reaction of linoleic acid hydroperoxide with thiobarbitric acid. *J Lipid Res* (1978) 19, 1053—1057.
 23. Gavino VC, Miller JS, Ikharebha SO, Milo GE and Cornwell DG : Effect of polyunsaturated fatty acids and antioxidants on lipid peroxidation in tissue cultures. *J Lipid Res* (1981) 22, 763—769.
 24. Morrison ES, Scott RF, Kroms M and Frick J : Uptake, oxidation, and esterification of free fatty acids in normal and atherosclerotic rabbit aorta. *J Biochem Med* (1974) 11, 153—164.
 25. Adams CWM, Bayliss OB and Ibrahim MZM : The distribution of lipids and enzymes in the aortic wall in dietary rabbit atheroma and human atherosclerosis. *J Pathol Bacteriol* (1963) 86, 421—430.
 26. Filipovic I and Rutenmüller M : Comparative studies on fatty acid synthesis in atherosclerotic and hypoxic human aorta. *Atherosclerosis* (1976) 24, 457—469.

Studies of lipid metabolism in cultured smooth muscle cells.

Part II. Effect of antioxidants on fatty acid metabolism.

Michitaka DEMIYA

**Second Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan**

(Director : Prof. I. Kimura)

The effects of antioxidants on the fatty acid composition of cultured aortic smooth muscle cells obtained from normal, hypercholesterolemic and aged rabbits were studied in vitro. α -Tocopherol and coenzyme Q₁₀ were used as antioxidants.

Cell lipid extracts were separated into cholesterol ester (CE), triglyceride (TG) and phospholipid (PL) fractions by thin layer chromatography. The fractions were analyzed by gas-liquid chromatography for fatty acid composition. Upon addition of α -tocopherol, the proportion of oleate (18:1) increased and that of linoleate (18:2) decreased in the CE and TG fractions, but that of stearate (18:0) increased and those of linoleate and arachidonate (20:4) decreased in the PL fraction.

These effects of α -tocopherol were most significant in HL-SMC, and almost no change in Aged-SMC was observed.

Addition of coenzyme Q₁₀ resulted small changes in the fatty acid composition of the cultured cells and culture media.