

大動脈中膜平滑筋細胞培養に関する研究

第 2 編

加齢及び糖尿病ラット由来細胞におけるビタミン E の 細胞増生に対する影響

岡山大学医学部第二内科教室（主任：木村郁郎教授）

石 岡 達 司

（昭和62年 4 月30日受稿）

Key words：ビタミン E，大動脈中膜平滑筋培養
過酸化脂質，糖尿病，加齢

緒 言

過酸化脂質が動脈壁に及ぼす影響は、尚未知の部分も多くこの問題は動脈硬化発生、進展に於いて興味ある課題である。

Ross の障害説¹⁾に従えば、動脈硬化発現には中膜平滑筋細胞の内膜層への遊走及び過増生が主たる原因と考えられている。また、過酸化脂質は Glavind^{2,3)} が報告するごとくアテローム巣に多く、LDL や fibrin 等と共に中膜平滑筋細胞に対し何らかの影響を及ぼすものと推測される。

脂溶性ビタミンとして知られるビタミン E は膜磷脂質中の多価不飽和脂肪酸を安定化し膜安定化作用および、抗酸化剤としての作用を有している。それ故、動脈硬化発症および進展に於いて抗酸化作用を有するビタミン E が脂質過酸化反応を介して動脈硬化発症および進展に関与することが容易に推測される。事実、ビタミン E が動脈硬化ないし動脈病変を予防することは古くより知られている。たとえば、ビタミン E 欠乏食でウサギやモルモットを飼育すると中膜壊死、石灰化、繊維化と内皮化の繊維化が見られビタミン E の投与によりこの変化が抑制される⁴⁾。

また、筆者は、大動脈平滑筋培養実験において過酸化脂質の影響を観察し長期的立場では加

齢及び糖尿病のモデルにて検討した、短期的立場ではアドリマイシン添加実験にて検討した。その結果、細胞内過酸化脂質と細胞増生が負の相関関係にあることそして加齢では顕著でないが糖尿病ではその罹病期間の延長に伴って細胞増生が低下することを認めた⁵⁾。

今回、ビタミン E を大動脈平滑筋培養液中に添加し加齢および糖尿病或いはアドリマイシン添加により増加した過酸化脂質による細胞増生や細胞内過酸化脂質の変化を動脈硬化症の一現象としてとらえビタミン E の平滑筋細胞に対する影響を検討した。

実験材料及びに方法

1. 動物並びに飼育法

第一編に述べた如くである。

2. 実験方法

A) 加齢ラット及び糖尿病ラット由来平滑筋細胞培養に対するビタミン E 添加の検討

正常ラットを自然に加齢させた状態で 5, 9, 17, 25 ヶ月齢のそれぞれのラットより大動脈を採取しそれぞれの月齢ラットに由来する平滑筋培養細胞系を 4 種類作製した。また、STZ により発症させた糖尿病ラットからも加齢ラットと同様に 5, 9, 17 月齢すなわち、糖尿病罹病期間 0, 4, 12 ヶ月ラットに由来する平滑筋培養細胞系を 3 種類作製した。加齢ラット及び糖尿病ラッ

ト由来の平滑筋培養細胞の計6種類の系に対して10% FCS加RPMI培養液とビタミンEを添加した10% FCS加RPMI培養液により培養したそれぞれの平滑筋細胞の細胞倍加時間と培養4日目の細胞内過酸化脂質、培養液過酸化脂質を測定した。尚、平滑筋細胞内過酸化脂質及び培養液過酸化脂質測定法、倍加時間測定法は、第1編において詳述した。

組織培養におけるビタミンEの添加法：95%エタノール100mlにdl- α -トコフェロール（エーザイ社製）500mgを溶解して作製したトコフェロール液100 μ lを、マイクロシリンジを使用して37°C、10%牛胎児血清加RPMI(Gibco社製)49.9mlに撹拌しながらゆつくりと添加した。その培養液0.22 μ lをミリポアフィルターに通じた後実験に供した。なお、エタノールの最終濃度は、0.19%とし、ビタミンE濃度は阿部法⁶⁾により測定した。

B) アドリアマイシン添加平滑筋細胞におけるビタミンE添加の検討

5ヵ月齢正常ラット由来平滑筋細胞を使用した。アドリアマイシン添加は、生理食塩水に溶解後、培養液に添加し最終濃度を 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} Mの3種類とし、生理食塩水のみを添加したものを対照とした。さらに、アドリアマイシンを添加した3種類の平滑筋細胞群に対しそれぞれビタミンE添加群とビタミンE無添加群を作製した。その6種類の平滑筋細胞に対し、それぞれ半数を細胞増生率（対照例に対する倍加時間の逆数比）に使用し他の半数を細胞内過酸化脂質、培養液過酸化脂質の測定に供し

た。

成 績

1: 加齢ラット及び糖尿病ラット由来平滑筋細胞培養に対するビタミンEの影響

大動脈を採取した時のラットの月齢に対応して加齢ラット由来中膜平滑筋培養細胞の細胞増生をFig. 1に示した。すなわち、ビタミンE添加群およびそれぞれの対照群の細胞増生を5ヵ月齢のエタノール添加群を対照(100%)とした増生率として表現し、加齢に対するビタミンEの影響を観察した。ビタミンE添加による平滑筋細胞増生の増加率は、5ヵ月183%、9ヵ月157%、17ヵ月140%、25ヵ月114%と加齢に比例して低下した。一方、糖尿病ラット由来平滑筋細胞についても同様な検討を行った。すなわち、加齢由来平滑筋細胞と同様に糖尿病由来細胞について罹病期間に対するビタミンEの影響を5ヵ月齢由来エタノール添加細胞を対照(100%)とした増生率として表現した。糖尿病由来ビタミンE添加細胞の細胞増生率は、9ヵ月（罹病期間4ヵ月）114%、17ヵ月（罹病期間12ヵ月）100%と罹病期間に比例して明らかに低下した。(Fig. 2) ビタミンEの細胞増生に対する影響は加齢群に比較して糖尿病群に於いて顕著であったが、特に糖尿病群の長期罹病例では、ビタミンEの影響はまったく認められなかった。

次に、大動脈を採取した時のラットの月齢に対応して、加齢ラットおよび糖尿病由来中膜平滑筋の培養第4日の細胞内過酸化脂質についてビタミンEの影響を検討した。尚、対照は同月

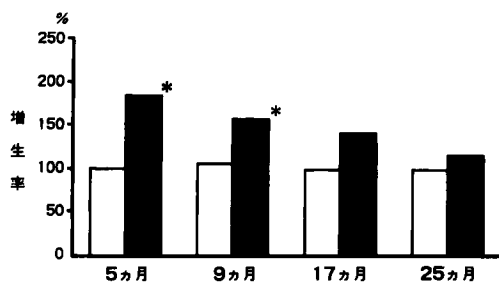


Fig. 1 加齢ラット由来平滑筋細胞の細胞増生と月齢の関係に対するビタミンEの影響 □: 対照群 ■: ビタミンE添加 (*P<0.01)

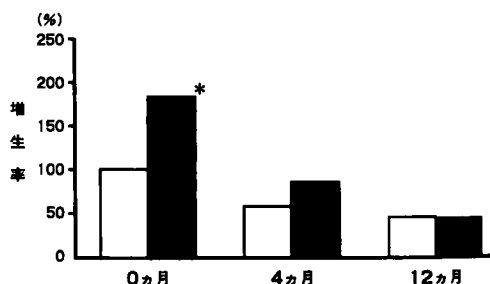


Fig. 2 糖尿病ラット由来平滑筋細胞の細胞増生と罹病期間の関係に対するビタミンEの影響 □: 対照群 ■: ビタミンE添加 (*P<0.01)

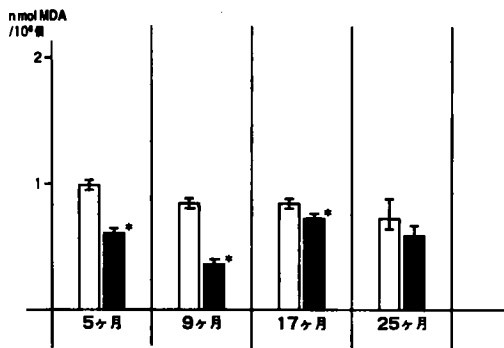


Fig. 3 加齢ラット由来平滑筋細胞の細胞内過酸化脂質と月齢の関係に対するビタミンEの影響 □: 対照群 ■: ビタミンE添加 (*P<0.01)

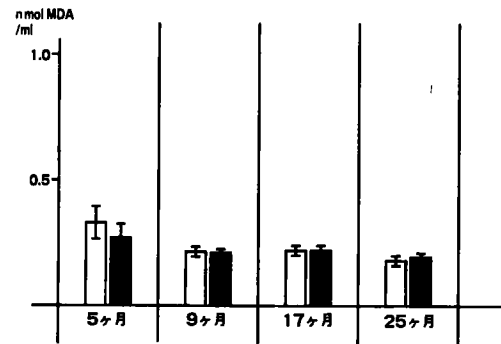


Fig. 5 加齢ラット由来平滑筋細胞の培養液中過酸化脂質と月齢の関係に対するビタミンEの影響 □: 対照群 ■: ビタミンE添加

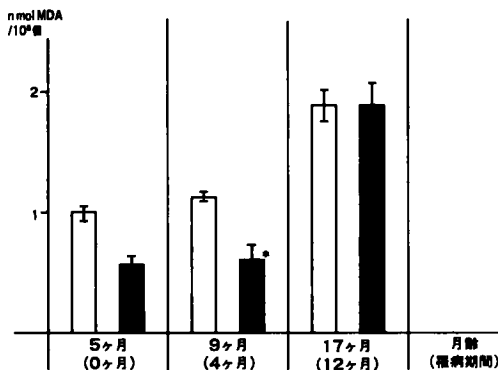


Fig. 4 糖尿病ラット由来平滑筋細胞の細胞内過酸化脂質と罹病期間の関係に対するビタミンEの影響 □: 対照群 ■: ビタミンE添加 (*P<0.01)

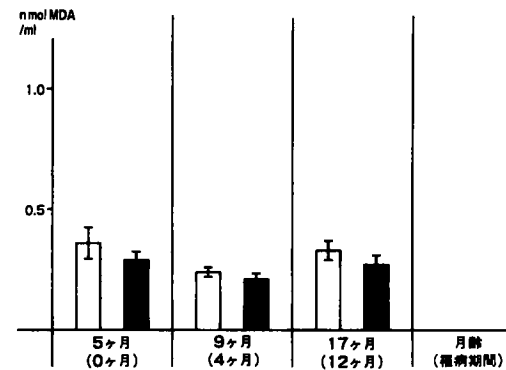


Fig. 6 糖尿病ラット由来平滑筋細胞の培養液中過酸化脂質と罹病期間の関係に対するビタミンEの影響 □: 対照群 ■: ビタミンE添加

齢のエタノール添加培養細胞とした。加齢ラットより採取しビタミンEを添加して培養を行なった平滑筋細胞の細胞内過酸化脂質は生後5ヵ月齢0.71nmol MDA/10⁶, 9ヵ月齢0.48nmol MDA/10⁶, 17ヵ月齢1.30nmol MDA/10⁶, 25ヵ月齢0.96nmol MDA/10⁶であった。対照は5ヵ月1.63nmol MDA/10⁶, 9ヵ月1.10nmol MDA/10⁶, 17ヵ月1.44nmol MDA/10⁶, 25ヵ月1.30nmol MDA/10⁶とビタミンE群の細胞内過酸化脂質は常に対照群に対して低値であった (Fig. 3)。一方、糖尿病ラット由来平滑筋細胞におけるビタミンE添加群では9ヵ月齢 (罹病期間4ヵ月) 1.12nmol MDA/10⁶, 17ヵ月齢 (罹病期間12ヵ月) 1.80nmol MDA/10⁶であった。対照群では9ヵ月齢 (罹病期間4ヵ月) 1.36nmol MDA/10⁶, 17ヵ月齢 (罹病期間12ヵ月)

1.30nmol MDA/10⁶であった (Fig. 4)。糖尿病群に於いても加齢群と同様にビタミンEにより細胞内過酸化脂質は低下したが加齢群に比較してその低下は顕著であった。同様な検討を培養液過酸化脂質についても行なった。ラットの月齢に対応して、加齢ラットおよび糖尿病由来中膜平滑筋の培養第4日の培養液過酸化脂質についてビタミンEの影響を検討した。加齢ラット群のビタミンE添加培養液中過酸化脂質は生後5ヵ月齢0.25nmol MDA/ml, 9ヵ月齢0.22nmol MDA/ml, 17ヵ月齢0.21nmol MDA/ml, 25ヵ月0.16nmol MDA/mlであった。対照は5ヵ月0.36nmol MDA/ml, 9ヵ月0.21nmol MDA/ml, 17ヵ月0.21nmol MDA/ml, 25ヵ月0.19nmol MDA/mlでありビタミンE群と対照群には差を認めなかった (Fig. 5)。

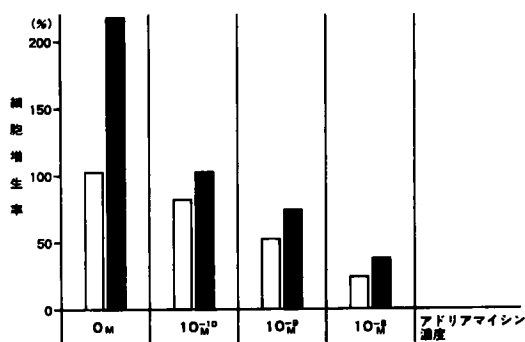


Fig. 7 アドリアマイシン添加による大動脈平滑筋細胞増殖の変化に対するビタミンEの影響

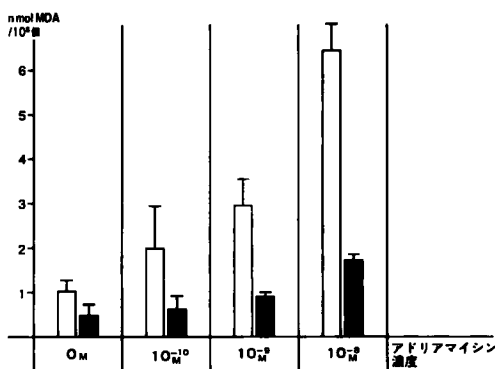


Fig. 8 アドリアマイシン添加による大動脈平滑筋細胞内過酸化脂質の変化に対するビタミンEの影響 □: アドリアマイシン ■: アドリアマイシン+ビタミンE (* $P < 0.01$)

一方、糖尿病ラット由来平滑筋細胞におけるビタミンE添加群では9ヵ月齢(罹病期間4ヵ月)0.23 nmol MDA/ml, 17ヵ月齢(罹病期間12ヵ月)0.32 nmol MDA/mlであった。対照群では9ヵ月齢(罹病期間4ヵ月)0.20 nmol MDA/ml, 17ヵ月齢(罹病期間12ヵ月)0.25 nmol MDA/mlであった。(Fig. 6)。加齢群と同様に糖尿病群においても培養液中過酸化脂質に対してビタミンEの影響は認めなかった。

2. アドリアマイシン添加平滑筋細胞におけるビタミンEの影響

アドリアマイシン添加細胞の増殖率は生理食塩水添加の対照群に比較して培養液中アドリアマイシン濃度 $10^{-10}M$ では71%, $10^{-9}M$ では37%, $10^{-8}M$ では25%であった。さらにビタミンEを添加するとエタノール添加の対照群に対して培養液中アドリアマイシン濃度 $10^{-10}M$ では

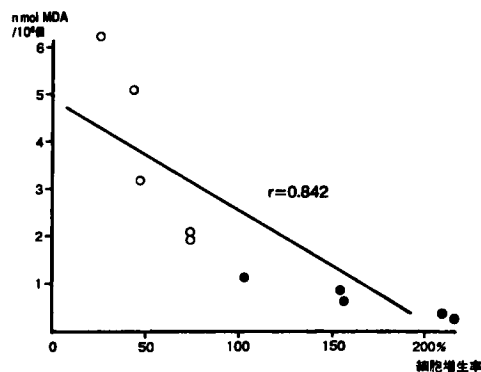


Fig. 9 大動脈平滑筋細胞培養における細胞内過酸化脂質と細胞増殖の関係 ○: アドリアマイシン添加群 ●: ビタミンE添加群

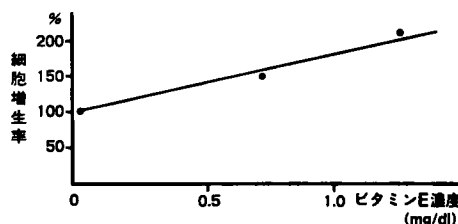


Fig. 10 大動脈平滑筋細胞の細胞増殖と培養液中ビタミンE濃度の関係

93%, $10^{-9}M$ では70%, $10^{-8}M$ では52%であった (Fig. 7)。ビタミンE添加群は、常にアドリアマイシン単独添加群よりもアドリアマイシンによる細胞増殖の抑制が少なかった。

ビタミンEを添加した群の細胞内過酸化脂質は、アドリアマイシン濃度 $10^{-10}M$ では0.58 nmol MDA/ 10^{10} 個, $10^{-9}M$ では0.78 nmol MDA/ 10^{10} 個, $10^{-8}M$ では1.56 nmol MDA/ 10^{10} 個であった。対照群では、アドリアマイシン濃度 $10^{-10}M$ では1.96 nmol MDA/ 10^{10} 個, $10^{-9}M$ では2.79 nmol MDA/ 10^{10} 個, $10^{-8}M$ では6.43 nmol MDA/ 10^{10} 個でありアドリアマイシン添加により増加した細胞内過酸化脂質はビタミンE添加により明かに低下した (Fig. 8)。

平滑筋培養液過酸化脂質は、アドリアマイシン、ビタミンE併用添加群およびその対照群ともに約0.2 nmol MDA/mlでありビタミンEによる影響は認めなかった。

次に、アドリアマイシン添加実験における細胞内過酸化脂質と5ヵ月齢平滑筋培養細胞を対

照とした細胞増殖率について検討した。Fig. 9に示すごとく細胞内過酸化脂質と細胞増殖率は負の相関 ($r=0.84$) を示した。

最後に、ビタミンE濃度に対する平滑筋細胞の影響を調べるために正常5ヵ月ラット由来平滑筋を使用し3種類のビタミンE濃度における細胞増殖率をエタノール単独添加群を対照 (100%) として観察した。培養液 ビタミンE濃度0.70 mg/dl では160%, 1.22 mg/dl では243%であった。尚、対照群の培養液ビタミンE濃度は、0.32 mg/dl であった (Fig. 10)。

考 察

近年、動脈硬化発現について多くの検討が行なわれているが、過酸化脂質の動脈硬化発現および進展に関する意義は尚未知な部分も多い。

今回、過酸化脂質の生成を阻止する物質として知られているビタミンEを平滑筋培養液に添加し、ビタミンEの影響を細胞増殖や細胞内過酸化脂質の変化として捉えた。その結果、加齢および糖尿病由来平滑筋細胞においてビタミンEは何れの時期においても細胞内過酸化脂質を低下した、細胞増殖を亢進させた。しかし、ビタミンEによる改善度は加齢および糖尿病罹病期間の延長に比例して低下した。また、ビタミンEはアドリアマイシンにより惹起された平滑筋細胞内過酸化脂質の増加、細胞増殖の低下を抑制した。そして、ビタミンEの効果は、濃度依存性であった。

Cornwellは培養液中にビタミンE, CoQ, Menadione等を添加し平滑筋細胞の増殖率が亢進したことを報告^{7,8,9)}し、ビタミンE等のスカベンジャーが動脈硬化発症予防に有益な物質と推測している。事実、In vivoでは、ビタミンEが動脈硬化ないし動脈病変を予防することが知られている。たとえば、ビタミンE欠乏食でウサギやモルモットを飼育すると中膜壊死、石灰化、繊維化と内皮の繊維化が見られビタミンEの投与によりこの変化が抑制される⁴⁾。また、高コレステロール食で飼育したウサギの動脈硬化をビタミンEが抑制¹⁰⁾する。或いは、ヒトの動脈硬化巣においてビタミンEが低下している¹¹⁾。

しかしながら、Ross¹⁾は、動脈硬化発現には

中膜平滑筋の内膜層への遊走及び過増殖が主たる原因と提唱している。この障害説に従えば、ビタミンEが中膜平滑筋の細胞増殖を亢進させることは動脈硬化発症、進展を促進させるのではという考えに連なりIn vitroの報告と異なり都合が悪い。

一方、吉田¹²⁾は、内膜平滑筋と中膜平滑筋の性質の差を認め中膜平滑筋の増殖は、むしろ修復機転に作用する可能性を示した。この報告によれば、今回の加齢及び糖尿病由来の中膜平滑筋の増殖能がビタミンEにより亢進している結果は、修復能の増加を意味し、ひいては動脈硬化発現を遅延するとも考えられる。即ち、ビタミンEは、中膜平滑筋の細胞増殖を亢進させる点に於いて動脈硬化の修復因子であることが推測可能である。

アドリアマイシンはアントラサイクリン系の抗癌剤であり、今回は過酸化反応促進物質¹³⁾として使用したが本来は、DNAの合成抑制作用を有している。それゆえ、今回の実験結果がアドリアマイシンのDNA抑制作用を表現しているとも考えられるが使用したアドリアマイシン濃度がかなり低い点やビタミンEによりその影響が抑制された事実よりその危惧は否定的である。そして、癌治療の臨床に於いてビタミンEがアドリアマイシンの心毒性を低下させる報告¹⁴⁾もあり興味深い。

また、今回の実験において、アドリアマイシン添加により生じた細胞内過酸化脂質の増加や細胞増殖抑制が、ビタミンEによりほぼ完全に除去された。

しかし、高度な加齢及び長期間糖尿病に罹患した細胞ではビタミンE添加によって、わずかに正常域に近づくか、まったく反応を示さなかった。このことは、過酸化脂質の増加が加齢にともなう動脈の変化¹⁵⁾あるいは、糖尿病のMacro-angiopathyの発生の一因であることを推察せしめるものであるとともに長期間過酸化脂質により生じた中膜平滑筋の変化ないしは変質といったものがビタミンEの使用によっても不可逆性のものであることを示唆した。即ち、加齢に伴い動脈硬化が進展し、その上に糖尿病状態が加わるとすれば、動脈壁の障害は加速度的に進

行することを推察させた。一方、過酸化脂質による平滑筋の変化が初期段階であれば、ビタミンEにより改善する可能性も示された。しかも、ビタミンEによる平滑筋に対する改善効果は濃度依存性である事実は *In vitro* のみならず臨床においても興味がある。すなわち、近年、血清ビタミンEや組織中ビタミンEは無ペーカリポタンパク血漿等の特殊な疾患に限らずかなりの疾患において低下しているという報告^{16,17)}もあり、ビタミンEの低下する疾患では、過酸化脂質を介した血管障害が進行し、その状態が長期間持続すると不可逆的な血管障害に移行すると推測される。

今後、ビタミンEがどのようにして細胞内に取り込まれ細胞増生に影響をおよぼすかを明らかにすればビタミンEの動脈硬化症に対する評価もより明確となるであろう。

結 語

1) 加齢および糖尿病由来大動脈平滑筋細胞培養において、ビタミンEは何れの時期においても細胞内過酸化脂質を低下した、細胞増生を亢進させた。しかし、ビタミンE添加による改善効果は加齢および糖尿病期間の延長に比例して低下した。

2) ビタミンEはアドリアマイシンにより惹起された平滑筋細胞内過酸化脂質の増加、細胞増生の低下を抑制した。そして、ビタミンEの効果は、濃度依存性であった。

稿を終わるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました恩師木村郁郎教授に深謝します。さらに、直接ご指導、ご教示をいただいた木畑正義講師に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は第24回日本老年病学会にて発表した。

文 献

1. Ross R et al: The pathogenesis of atherosclerosis. *N Engl J Med* (1976) 295, 369-377, 420-425.
2. Glavind T, Hartmann S, Clemmesen T, et al: 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.
3. 福住一雄, 岩田圭明: アテローム性動脈硬化症血管の脂質 (第2報) 腹部大動脈脂質の透析と大動脈に存在する脂質-タンパク質複合体の脂質. *油化学*, 12, (1963) 12, 93-97.
4. Lowe G: A lesion in the aorta of vitamin E deficient animals. *J Pathol Bacteriol* (1955) 50, 246-249.
5. 石岡達司: 大動脈中膜平滑筋細胞培養における検討. (第一編) 加齢, 糖尿病ラットにおける過酸化脂質の細胞増生に対する影響について (in print).
6. 阿部皓一, 勝井五一郎: 血清トコフェロールの蛍光定量. *栄養と食糧*, (1976) 28, 277-280.
7. Victor Gravano G, James SM, Samuel OI, George EM and David GC: Effect of polyunsaturated fatty acids and antioxidants on lipid peroxidation in tissue cultures *J. Lipid Res* (1981) 22, 763-769.
8. Morisaki N, Lindsey TA, Stiffs TM et al: Fatty acid metabolism and cell proliferation. Evaluation of pathways for the generation of lipid peroxides. *Lipid* (1984) 19, 381-394.
9. Morisaki N, Sprecher H, Milo GE and Cornwell DG: Fatty acid specificity in the inhibition of cell proliferation and its relationship to lipid peroxidation and prostaglandin biosynthesis. *Lipids* (1982) 17, 893-899.
10. Iwakami M: Peroxides as a factor of atherosclerosis. *Nagoya J Med Sci* (1965) 28, 50-66.
11. 福本新一: Vitamin E の脂質代謝および実験的粥状硬化症におよぼす影響について. *体質医学研究所報告*, (1965) 16, 1-45.
12. 吉田洋二: 動脈内膜細胞. *動脈硬化*, (1984) 12, 1033-1039.

13. Mimnaugh ED, Trush MA, Gram TE: Stimulation by adriamycin of rat heart and liver microsomal NADPH-dependent lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* (1981) **30**, 2797–2804.
14. Charles EM: Adriamycin. The role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science* (1977) **197**, 165–167.
15. Yagi K: A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med* (1976) **15**, 212–216.
16. Sokol RJ, Heubi JE, Iannaccone ST, Bove KE: Vitamin E deficiency with normal serum vitamin E concentration in children with chronic cholestasis. *New Engl J Med* (1984) **310**, 1209–1212.
17. Weder B, Meienberg O, Wildi E, Meier C: Neurologic disorder of vitamin E deficiency in acquired intestinal malabsorption. *Neuro* (1984) **34**, 1561–1565.

Studies on aortic medial smooth muscle cell culture
Part 2. The effects of vitamin E on the proliferation of
cells derived from aged or diabetic rats

Tatsuji ISHIOKA

The Second Department of Internal Medicine Okayama University Medical School

(Director: Prof. I. Kimura)

We found in the segment of this study that lipid peroxides inhibit the proliferation of aortic medial smooth muscle cells derived from rats with streptozotocin-induced diabetes (STZ-rats) and normal cells cultured in an adriamycin-containing medium. It was then supposed that vitamin E, an antioxidant, may restore cell proliferation by its inhibitory effect on lipid peroxides. This led us to study the effect of vitamin E on the proliferation of cells derived from STZ-rats and normal cells cultured in an adriamycin-containing medium.

The growth rate of normal cells was increased by the addition of vitamin E. However, its effect was reduced with aging. on the other hand, the growth rate of cells derived from STZ-rats was hardly affected and intracellular synthesis of lipid peroxides was not attenuated by the addition of vitamin E. The effect of vitamin E on cell proliferation and the synthesis of intracellular lipid peroxides was not found in cells obtained 12 months after STZ injection.

Adriamycin inhibited normal cell proliferation concentration-dependently with an increase in intracellular lipid peroxides. However, when normal cells were planted in a medium containing adriamycin and vitamin E, the effect of adriamycin on cell proliferation was reduced. Namely, when lipid peroxides coexisted with adriamycin for a short period of time, vitamin E prevented the effect of lipid peroxides on cell proliferation. However, when they remained in the cells for a long period of time, vitamin E did not show any inhibitory effect on the lipid peroxides.

The results suggest that the effect of vitamin E on cell proliferation is dependent on the period of intracellular existence of lipid peroxides.