原 著

白金ナノコロイドによる過酸化水素由来細胞障害性の抑制

長 尾 清 香¹⁾ 佐 藤 拓 也¹⁾ 加 藤 伸 一¹⁾
チェン リ¹⁾ 宮 本 有 正²⁾

抄録：近年、活性酸素は様々な炎症性疾患との関連性が示唆されており、様々な機構によって組織に損傷を与えることが知られている。活性酸素への防御については、生体内に備えられている内因性抗酸化システムに加えて、近年では抗酸化物質に注目が集まっている。白金ナノコロイドは、平均粒径約2 nmの白金粒子が分散したコロイド状溶液であり、過酸化水素等の活性酸素を触媒的に消去する新規抗酸化物質である。そこで、われわれは活性酸素由来の炎症を白金ナノコロイドが抑制するのではないかと考え、基礎研究の第一歩としてヒト口腔上皮細胞を用いた *in vitro* 実験を実施した。その結果、過酸化水素の添加による細胞活性の低下及び細胞からの IL-8 産生量増加を、白金ナノコロイドが抑制することが明らかとなった。本研究より、白金ナノコロイドによる、活性酸素由来の炎症に対する抑制効果が期待される。

キーワード：白金ナノコロイド、過酸化水素、IL-8、炎症

緒 言

活性酸素とは、酸素分子が水に還元される過程において生じる反応性の高い分子種および、紫外線照射によって生成する一重項酸素を指す。前者には、スーパーオキシドアニオン、過酸化水素、および過酸化水素から容易に生成されるヒドロキシラジカルが含まれる。これらの活性酸素は生体内においては、シグナル伝達におけるメッセンジャーや感染防御の1つの手段として利用される一方で、DNA やタンパク質、脂質に損傷を与えることが知られている^{1,2)}。このような活性酸素の中でも比較的安定で、生体内に多く存在している過酸化水素は、ヒドロキシラジカルの前駆体であると共にグルタチオンやチオレドキシンを介した細胞内のシグナル伝達に深く関わっている²⁻⁴⁾。肺や気管支の上皮細胞を用いた研究によると、過酸化水素刺激によって IL-8 の産生が促進されるために慢性的な炎症が生じることが示唆されている⁵⁻⁷⁾。口腔内においてもいくつかの炎症性疾患について活性酸素が関与している可能性が現在までの研究によって示唆されている。口腔癌患者の唾液では酸化ストレスによる DNA 損傷の結果生じる 8-OHdG (8-hydroxydeoxyguanosine) 量の増加や唾液中の抗酸化物質量の低下が認められている⁸⁾。再発性アフタを有する患者の赤血球については、活性酸素を除去する酵素群の活性低下が報告されている⁹⁾。歯周病患者の唾液においては 8-OHdG 量の増加が認められることが報告されて

いる¹⁰⁾。さらに、歯周病患者から採取した歯根膜細胞では、 H_2O_2 刺激によって IL-8 が産生され、過酸化水素を除去する酵素であるカタラーゼの添加によってこの IL-8 産生が抑制されることが示されている¹¹⁾。

近年ではこのような活性酸素を除去するために、抗酸化物質が注目を浴びている^{12,13)}。抗酸化物質にはビタミン類やポリフェノールなどが知られているが、宮本らは様々な活性酸素に対する触媒的消去効果があるものとして白金ナノコロイドを開発した¹⁴⁾。そこで長年歯科材料を開発してきたわれわれは、この白金ナノコロイドを口腔内に適用することで、活性酸素由来の炎症に効果が認められるのではないかと考えた。今回その研究の第一歩として、口腔上皮細胞への過酸化水素の影響を検証すると共に、新しい抗酸化物質である白金ナノコロイドの効果を *in vitro* において実験したので、報告する。

実験材料および方法

1. 過酸化水素除去能の測定

100mM 過酸化水素 (H_2O_2 ; 和光純薬株式会社) 0.1ml とサンプル 0.2ml を混合し、37℃でインキュベーションする。60 分後、イオン交換水にて 1000 倍希釈し、測定試料とする。ルミネッセンサー JNR II (AB-2300, ATTO 社) を用いて、測定試料 0.15ml に反応液 0.05ml を加え、40 秒間の発光量を積算する。反応液は、0.2% シュウ酸ジエステル (TDPO, 和光純薬株式会社)、0.02% ピレン (和光純薬株式会社) をアセトニトリルに溶解して作製する。コントロールにはイオン交換水又はエタノールをサンプルとした試料を用い、測定された発光量を基準として過酸化水素除去率を算出する。測定に用いたサンプルは、0.01mM

¹⁾ 株式会社ジーシー 研究所

²⁾ 東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻細胞応答化学分野

〔受付：2009 年 3 月 16 日、受理：2009 年 5 月 10 日〕

Table 1 Concentrations of samples for H₂O₂ removal assay

抗酸化物質	濃度
白金ナノコロイド	0.01mM
アスコルビン酸ナトリウム (ビタミン C)	0.1% (約 5.1mM)
α-トコフェロール (ビタミン E)	0.1% (約 2.3mM)
カテキン	0.1% (約 3.5mM)

Fig. 1 Mechanism of H₂O₂ detection

白金ナノコロイドと、抗酸化剤として一般的に用いられているアスコルビン酸ナトリウム (ビタミン C; 和光純薬株式会社), α-トコフェロール (ビタミン E; 和光純薬株式会社), カテキン (東京化成工業株式会社) の4種類とした。このうち、ビタミン E およびカテキンはエタノールにて調製し、コントロールはエタノールとした (Table 1)。

本測定は、シュウ酸ジエステルと過酸化水素の反応生成物である 1,2-ジオキセタンジオンが蛍光物質ビレンを励起させ、励起蛍光物質から発生する光を検出するという機構を利用している (Fig. 1)¹⁵⁾。すなわち、測定試料中の過酸化水素濃度が高い程、発光強度が高くなる。

2. KB 細胞の過酸化水素刺激

本実験にはヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (KB 細胞, 大日本製薬株式会社) を用いた。細胞は 10% ウシ胎児血清 (FBS: Hyclone 社) および 1% ペニシリン-ストレプトマイシン (ペニシリン 10,000U/mL, ストレプトマイシン 10mg/mL; SIGMA 社) 含有 MEM eagle's Medium (MEM: L-グルタミン, 炭酸水素ナトリウム含有, SIGMA 社) にて、37°C, 5% CO₂ 存在下で培養した。継代培養には、トリプシン-EDTA 溶液 (ブタトリプシン 0.5g/L, EDTA・4Na 0.2g/L, SIGMA 社) を用いて継代数 3 回以下の細胞を実験に供した。

細胞を 24 穴および 96 穴プレート (Becton Dickinson) 上に $7.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ になるように播種した後、10% FBS 含有 MEM にて一晩培養した。その後、血清による細胞への影響を最小限に抑えるために、1% FBS 含有 MEM に交換した。24 時間後、細胞へ 500μM 過酸化水素 (H₂O₂; 和光純薬株式会社) および白金ナノコロイド (C-Pt; アプト株式会社) を添加した。以下の各実験方法に記載している所定時間培養した後、各アッセイに供した。白金ナノコロイドは滅菌水を用いて終濃度が 0.01mM と 0.1mM となるように調製した。

(1) WST アッセイ

96 穴プレート上で細胞を過酸化水素刺激した後、24 時間後に反応液 110μl へ交換して 37°C, 5% CO₂ 存在下で 30 分間インキュベーションした。反応液は、10% FBS 含有 MEM に WST-8 (TetraColor ONE, 生化学バイオビジネス株式会社) を 1/10 量添加して作製した。インキュベーション後、培養上清 100μl を 96 穴マイクロプレート (IWAKI) に採取して、マイクロプレートリーダー (SpectraMax M2, Molecular Devices) を用いて波長 450nm にて吸光度を測定した。WST 活性は、過酸化水素および白金ナノコロイド非添加群を基準とし、白金ナノコロイドによる影響を相対的に評価した。

Fig. 2 Flowchart of *in vitro* KB cell study

(2) ELISA

24 穴プレート上で KB 細胞を過酸化水素刺激した後、24 時間後にその培養上清を回収した。回収した培養上清は、遠心して (13200rpm, 4°C, 5 分間) 上清を回収し、ELISA に用いるまで -20°C にて保存した。ELISA を利用した各サンプル中の IL-8 の測定には、Human IL-8 Screening Set (ENDOGEN 社) を用いた。

(3) 定量的 RT-PCR

24 穴プレート上で KB 細胞を過酸化水素刺激した後、1, 3, 6, 24 時間後に TRIzol (invitrogen 社) を用いて通法に従って細胞より RNA を抽出した。得られた RNA について、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems 社) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。逆転写反応は、サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System9700, Applied Biosystems 社) を用いて、25°C 10 分間、37°C 120 分間、85°C 5 秒間の条件下で行い、得られた cDNA はエチジウムブロマイド含有 1% アガロースゲルにて電気泳動を行って確認した。合成した cDNA を基に、各細胞の IL-8 mRNA 発現量を、TaqMan Universal PCR Master Mix および TaqMan Gene expression Assays (Applied Biosystems 社) を用いて、リアルタイム PCR (7500 Fast real-time PCR system, Applied Biosystems 社) により測定した。IL-8 mRNA 相対発現量は、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) を用いて各細胞群における mRNA 発現量を標準化した後、各培養時間における過酸化水素非添加群の IL-8 mRNA 発現量を基準として算出した。

3. 統計学的分析

実験結果は、一元配置分散分析 (ANOVA) を用いて群

間の比較を行った後、Tukey 検定により多重比較を行った。

結 果

1. 各種抗酸化物質による過酸化水素除去能の測定

各抗酸化物質の過酸化水素除去率は、白金ナノコロイドが $99.9 \pm 0.0355\%$ 、ビタミン C が $29.9 \pm 8.38\%$ 、ビタミン E が $38.5 \pm 7.02\%$ 、カテキンが $29.8 \pm 15.5\%$ であり、白金ナノコロイドは有意に高い過酸化水素除去率を示した ($P < 0.01$)。一般的に広く用いられている抗酸化剤と比較して、白金ナノコロイドは低濃度でも高い過酸化水素除去率を有することが明らかとなった (Fig. 3)。

2. KB 細胞を用いた白金ナノコロイドの効果の検証

(1) 過酸化水素による細胞障害性

過酸化水素刺激により KB 細胞の WST 活性が $58.3 \pm 6.60\%$ に低下したことから、KB 細胞への細胞障害性が認められた。白金ナノコロイド添加群は、白金ナノコロイド非添加群と比較して WST 活性が 0.01mM で $72.1 \pm 2.71\%$ 、0.1mM で $89.3 \pm 4.66\%$ と有意に高く ($P < 0.01$)、KB 細胞への細胞障害性の抑制が認められた (Fig. 4)。また、白金ナノコロイドが過酸化水素による KB 細胞への細胞障害性を濃度依存的に抑制した。

(2) 過酸化水素刺激 KB 細胞から産生される IL-8 への影響

過酸化水素刺激により、KB 細胞より $2610 \pm 204.5\text{pg/ml}$ の IL-8 が産生された。IL-8 産生量は、0.01, 0.1mM の白金ナノコロイドを添加することで、それぞれ $2073 \pm 209.9\text{pg/ml}$ 、 $371.0 \pm 28.45\text{pg/ml}$ と有意に低下した ($P < 0.01$)。特に、白金ナノコロイド 0.1mM の添加群の IL-8 産

Fig. 3 H₂O₂ removal ratio of antioxidants
H₂O₂ removal by antioxidants is shown. Either water or EtOH was used as the baseline control. Data are expressed as means $\pm$ SD (n = 5).

Fig. 4 H₂O₂ induced Cytotoxicity
Evaluation of cytotoxicity was carried out after 24 hrs of culture. Data are expressed as means $\pm$ SD (n = 8).
**P* < 0.01 vs. control (treated with H₂O₂)

生量は、過酸化水素非刺激群の 320.0 ± 37.53 pg/ml と同等であった (*P* = 0.946, Fig. 5)。

(3) 過酸化水素刺激 KB 細胞において発現する IL-8 mRNA への影響

過酸化水素刺激により、KB 細胞内の IL-8 mRNA 相対発現量は 6 時間後まで増加が認められた。6 時間後の IL-8

mRNA 相対発現量は白金ナノコロイド非添加群で 1229 ± 496.4 を示し、0.01, 0.1mM の白金ナノコロイドの添加によりそれぞれ 610.5 ± 134.4 , 37.31 ± 10.36 と KB 細胞内の IL-8 mRNA 相対発現量は濃度依存的に抑制され、特に 0.1mM 白金ナノコロイドの添加によって顕著に抑制された (*P* < 0.01, Fig. 6)。

Fig. 5 H₂O₂ induced IL-8 production

Cellular production of IL-8 in culture after 24 hrs detected by ELISA is shown. Data are expressed as means $\pm$ SD (n = 5).

* $P < 0.01$ vs. control (treated with H₂O₂)

Fig. 6 H₂O₂ induced IL-8 mRNA expression

Kinetics of IL-8 mRNA expression induced by H₂O₂ after 1, 3, 6, 24 hrs of culture estimated by quantitative RT-PCR is shown. Data are expressed as fold increase over spontaneous mRNA expression at each time after normalization by GAPDH expression levels.

* $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ vs. control (treated with H₂O₂ at 6hrs)

考 察

肺や気管支の上皮細胞においては、生体内に最も多く存在している過酸化水素によって炎症が惹起されることが知られており⁵⁻⁷⁾、逆に活性酸素によって惹起された炎症は、抗酸化物質によって抑制されることも報告されている^{12,13)}。また、歯根膜細胞でも、抗酸化酵素の添加によって H_2O_2 由来の IL-8 産生量が抑制されることが示されている¹¹⁾。

白金ナノコロイドの過酸化水素除去率は、ビタミン C、ビタミン E、カテキンと比較すると非常に高い結果が得られた (Fig. 3)。このことは、ビタミン C、ビタミン E、カテキンは過酸化水素と 1 対 1 で反応するのに対して、白金ナノコロイドは触媒的に反応するという特徴のためであると考えられる¹⁴⁾。この結果より、白金ナノコロイドが過酸化水素刺激による KB 細胞への影響を軽減する可能性が、十分に期待できることが示唆された。

KB 細胞を用いた過酸化水素刺激による細胞への影響については、過酸化水素非刺激群と比較すると、WST アッセイによる結果では細胞生存率が 58.3% まで低下した (Fig. 4)。さらに、過酸化水素刺激によって、KB 細胞から IL-8 が産生されることが確認された。KB 細胞からの IL-8 産生については、炎症性サイトカインの 1 つである IL-1 α によっても確認されている¹⁶⁾。IL-8 は自然免疫応答反応を担うサイトカインの 1 つで、好中球の局所遊走を引き起こし、その結果 IL-8 が産生された部位に炎症が惹起されると考えられている。これらのことから、KB 細胞においても、過酸化水素刺激によって炎症反応が惹起されることが示唆される。

過酸化水素刺激による KB 細胞への影響の内、細胞障害性については、白金ナノコロイドの添加により、濃度依存的に細胞生存率の上昇が認められた (Fig. 4)。また過酸化水素刺激した KB 細胞からの IL-8 産生については、白金ナノコロイドの添加により濃度依存的に抑制された。特に 0.1mM 白金ナノコロイド添加群においては、過酸化水素非刺激群と同等レベルにまで IL-8 産生量が抑制された (Fig. 5)。さらに、過酸化水素刺激 KB 細胞中の IL-8 mRNA 発現量においても、白金ナノコロイド添加群においては発現量の低下が認められ (Fig. 6)、過酸化水素刺激 KB 細胞からの IL-8 産生量の低下は、発現レベルから抑制されていることが明らかとなった。

今回の報告では、過酸化水素刺激が口腔上皮細胞に与える影響として、細胞障害性および炎症性サイトカインの産生が示され、結果として炎症を惹起することが推測された。また、この過酸化水素刺激による口腔上皮細胞からの細胞障害性および IL-8 産生については、白金ナノコロイドが転写レベルから抑制することが明らかとなった。しかし今

回の研究からは、白金ナノコロイドが口腔上皮細胞における過酸化水素刺激から IL-8 産生までのどのカスケードを抑制するかについては明らかとなっていないため、今後のさらなる研究が待たれる。

結 論

白金ナノコロイドによって、KB 細胞の過酸化水素由来細胞障害性が抑制されることが示唆された。白金ナノコロイドによる、活性酸素由来の炎症に対する抑制効果が期待される。

引用文献

- 1) Halliwell B, Gutteridge JMC and Cross CE: Free radicals, antioxidants, and human diseases: Where are we now? *J Lab Clin Med* 119 : 598-620, 1992.
- 2) Chapple ILC: Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol* 24 : 287-296, 1997.
- 3) Rahman I and MacNee W: Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J* 16 : 534-554, 2000.
- 4) 中村 肇, 増谷 弘, 淀井淳司: レドックス制御機構. 日本生化学会 編集: 酸化ストレス・レドックスの生化学, 共立出版, 東京, 2000, 12-27 頁
- 5) Lakshminarayanan V, Beno DWA, Costa RH, et al: Differential Regulation of Interleukin-8 and Intercellular Adhesion Molecule-1 by H_2O_2 and Tumor Necrosis Factor- α in Endothelial and Epithelial cells. *J Biol Chem* 272 : 32910-32918, 1997.
- 6) Lakshminarayanan V, Drab-Weiss EA and Roebuck KA: H_2O_2 and Tumor Necrosis Factor- α Induce Differential Binding of the Redox-responsive Transcription Factors AP-1 and NF- κ B to the Interleukin-8 Promoter in Endothelial and Epithelial Cells. *J Biol Chem* 273 : 32670-32678, 1998.
- 7) Moodie FM, Marwick JA, Anderson CS, et al: Oxidative stress and cigarette smoke alter chromatin remodeling but differentially regulate NF- κ B activation and proinflammatory cytokine release in alveolar epithelial cells. *The FASEB J* 18 : 1897-1899, 2004.
- 8) Bahar G, Feinmesser R, Shpitzer T, et al: Salivary analysis in oral cancer patients: DNA and protein oxidation, reactive nitrogen species, and antioxidant profile. *Cancer* 109 : 54-59, 2007.
- 9) Cimen MY, Kaya TI, Eskandari G, et al: Oxidant/antioxidant status in patients with recurrent aphthous stomatitis. *Clin Exp Dermatol* 28 : 647-650, 2003.
- 10) Sawamoto Y, Sugano N, Tanaka H, et al: Detection of periodontopathic bacteria and an oxidative stress marker in saliva from periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 20 : 216-220, 2005.
- 11) Lee ES, Bak EJ, Kim M, et al: Induction of IL-8 in periodontal ligament cells by $H(2)O(2)$. *J Microbiol* 46 : 579-584, 2008.
- 12) Graziani G, D'Argenio G, Tuccillo C, et al: Apple polyphenol extracts prevent damage to human gastric epithelial cells

- in vitro and to rat gastric mucosa in vivo. Gut 54 : 193-200, 2005.
- 13) Rahman I, Biswas SK and Kirkham PA: Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. Biochem Pharmacol 72 : 1439-1452, 2006.
- 14) Kajita M, Hikosaka K, Iitsuka M, et al: Platinum nanoparticle is a useful scavenger of superoxide anion and hydrogen peroxide. Free Radic Res 41 : 615-626, 2007.
- 15) 今井一洋, 小林伸一郎: 化学発光の高速液体クロマトグラフィー検出系への応用. 臨床化学 9 : 247-253, 1980.
- 16) Sakoda K, Yamamoto M, Negishi Y, et al: Simvastatin Decreases IL-6 and IL-8 Production in Epithelial Cells. J Dent Res 85 : 520-523, 2006.
- 別冊請求先: 長尾清香 〒174-8585 東京都板橋区蓮沼町 76-1
株式会社ジーシー研究所

The Inhibitory Effect of Platinum Nanoparticle on Oxidative Cytotoxicity

Sayaka NAGAO¹⁾, Takuya SATO¹⁾, Shinnichi KATO¹⁾,
Li CHEN¹⁾, and Yusei MIYAMOTO²⁾

¹⁾ *R & D Dept., GC Corporation*

²⁾ *Laboratory for Biochemistry of Cell Responsiveness, Department of Integrated Biosciences,
Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo*

J. Jpn. Oral Muco. Membr., 15 : 29 ~ 36, 2009

Abstract : Reactive oxygen species are associated with many inflammatory conditions and tissue damages. Antioxidant agents are used to neutralize the negative impacts of reactive oxygen species. Platinum nanoparticle is a novel antioxidant agent formulated in colloidal solvent (average diameter; 2 nm). It acts as a catalyst and removes all kinds of reactive oxygen species, such as H₂O₂. In this study, the effect of Platinum nanoparticle on oral epithelial cells was assayed. Platinum nanoparticle inhibited cytotoxicity and IL-8 production induced by H₂O₂. The results indicated that Platinum nanoparticle has an inhibitory effect for inflammation derived from reactive oxygen species.

Key words : Platinum nanoparticle, H₂O₂, IL-8, inflammation

Reprint requests to Sayaka NAGAO, R & D Dept., GC Corporation, 76-1 Hasunuma-cho, Itabashi-ku, Tokyo, 174-8585, Japan.

[Received March 16, 2009 : Accepted May 10, 2009]