チャイニーズハムスター V79 細胞の増殖に対する エルカ酸およびブラシジン酸の影響

鬼頭 誠, 山森 泰子

(京都大学食糧科学研究所)

昭和 53 年 3 月 31 日 受 理

Effect of Erucic and Brassidic Acids on Growth of Chinese Hamster V79 Cells

Makoto KITO and Yasuko YAMAMORI

Research Institute for Food Science, Kyoto University, Kyoto

Chinese hamster V79 cells were grown in Eagle's MEM with 6% delipidated fetal bovine serum at 37°C in atmosphere of 5% CO₂ and 95% air. When erucic, brassidic and palmitic acids were added to the medium as a fatty acid-bovine serum albumin complex, they inhibited the growth of V79 cells. However, linoleic acid stimulated the growth. The inhibition by erucic acid was weak and released in the presence of normal fetal bovine serum. The inhibition by brassidic acid remained even after the cells were transferred to the brassidic acid free medium. The growth strongly inhibited by palmitic acid was recovered by replacing the medium by the medium without this fatty acid.

(Received March 31, 1978)

人口増加に伴い食糧の供給を増大させることが要望されているが、その際に食糧の質的レベルだけではなく安全性の面でも十分な配慮がなされねばならないことはいうまでもない。この目的のためにわれわれは食糧の素材の安全性に対する検討を行っている。

エルカ酸 (*cis*, C_{22:1}Δ¹³) はナタネ油を構成する脂肪酸の一つであるが、オスラットの心筋に障害を発生させるナタネ油の本体であることが示されている^(1,2)。現在、品種改良によりエルカ酸含量のきわめて低いナタネ油が得られている。しかし、エルカ酸含量が 0.3~1.3% 程度のナタネ油でもやはり心筋障害が生ずるといわれている⁽³⁾。

本研究ではエルカ酸の標的であるオスラットの心筋ではなく、エルカ酸の毒性効果がないと考えられるチャイニーズハムスターの肺由来の培養細胞 V79 の増殖に対するエルカ酸およびその異性体であるブラシジン酸 (*trans*, C_{22:1}Δ¹³) の影響を検討した。

実 験 方 法

細胞培養 チャイニーズハムスター V79 は京都大

理学部生物物理学教室岡田研究室より恵与された。2mM L-グルタミン、26mM 炭酸水素ナトリウムおよび 6% 牛胎児血清を含むイーグル MEM 4 ml を含む 6 cm フアルコンプラスチックシャーレに 10⁵ 個の細胞を植え、37°C で 5% CO₂, 95% 空気中で生育させた。培地は 2 日ごとに交換した。細胞数はトリプシン処理後血球計算板で計測した。

脂肪酸の添加 脂肪酸の添加は牛胎児血清を脱リビドした牛胎児血清⁽⁴⁾と置き換えることにより行った。脂肪酸は過酸化物を除くために、メタノール-水混液 (3:1, v/v) で洗浄した⁽⁵⁾後、直ちに脂肪酸フリーの牛血清アルブミン 2% を含む 1mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) に加え、アルブミン-脂肪酸複合体を形成せしめ⁽⁶⁾、50 μl を培地に添加した。

放射性エルカ酸のとり込み [14-¹⁴C] エルカ酸 (フランス CEA 社製) 1 μCi を 4.5×10⁵ 個の細胞を含むシャーレに加えた。エルカ酸の濃度は 5 μM であった。24 時間インキュベートした後、細胞を集め Bligh and Dyer 法⁽⁷⁾で脂質を抽出した。キャリアーとして各種リン脂質を加えた後、クロロホルム-メタノール-28% ア

ソモニア水 (200 : 120 : 15, by vol.) を一次元展開, クロロホルム-メタノール-アセトン-酢酸-水 (200 : 150 : 100 : 15 : 10, by vol.) を二次元展開に用いる TLC で脂質を分離した。各スポットを I_2 蒸気で検出した後、掻き取って放射能を Packard 液体シンチレーションカウンタで測定した。

実験結果

脱リピドした血清を用いる培養

脱リピドした血清は残存脂質をわずかに含有していたが、主要な脂肪酸としてパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸であり、リノール酸やアラキドン酸はわずかに存在した。この血清を加えた場合、培地中には脂肪酸として $1 \sim 1.8 \mu\text{M}$ の範囲で存在した。Fig. 1 に示すように、脱リピドした血清の場合は無処理の血清に比して増殖曲線はゆるやかであった。しかしリノール酸をアルブミン複合体として $10 \mu\text{M}$ 加えることにより無処理の場合に近づいた。したがって脱リピドした血清を含む培地では、増殖に利用される脂肪酸が減少していることが理解される。

エルカ酸、ブラシジン酸、パルミチン酸の影響

脱リピドした血清を含む培地にエルカ酸、ブラシジン酸、パルミチン酸をアルブミン複合体として加えた。いずれの脂肪酸も濃度に比例して阻害した (Fig. 2) が、

Fig. 1. Growth of V 79 Cells with or without Delipidation of Fetal Bovine Serum. With delipidation, Δ ; without delipidation, $\square$; addition of linoleic acid ($10 \mu\text{M}$) to the delipidated medium, $\circ$.

阻害の程度はパルミチン酸 > ブラシジン酸 > エルカ酸の順に強かった。したがってこれらの脂肪酸は欠乏した脂肪酸の代替とはなりえず、むしろ細胞の増殖に対して阻害的に作用していると考えられる。しかしこの実験では、細胞がプラスチック壁に付着する前に、脂肪酸を添加していることになる。したがって細胞がプラスチック壁に付着するのをこれらの脂肪酸が阻害している可能性が考えられる。そこで2日間あらかじめ増殖させた状態のところへ脂肪酸をアルブミン複合体として加えたところ、ブラシジン酸、パルミチン酸はやはり阻害したが、エルカ酸はわずかに影響したに過ぎない (Fig. 3)。一方無処理の血清を含む培地にエルカ酸、ブラシジン酸を加えると、エルカ酸による阻害はまったくみられなくなった (Fig. 4)。またブラシジン酸による阻害も弱かった。これは血清中に存在する過剰の脂肪酸によりその作用が拮抗的に抑制されたものと考えられる。

[$^{14}\text{-}^{14}\text{C}$] エルカ酸のとり込み

上記の結果だけではエルカ酸が細胞内にとり込まれて作用しているかどうかは不明である。そこでエルカ酸が細胞内とくに膜リン脂質にとり込まれていることを [$^{14}\text{-}^{14}\text{C}$] エルカ酸を用いて調べた。24 時間のインキュー

Fig. 2. Effects of Erucic, Brassidic and Palmitic Acids on Growth of V 79 Cells in the Delipidated Medium. No addition, Δ ; erucic acid, $\circ$ ($10 \mu\text{M}$), $\bullet$ ($25 \mu\text{M}$), $\bullet$ ($50 \mu\text{M}$); brassidic acid, $\square$ ($10 \mu\text{M}$), $\blacksquare$ ($25 \mu\text{M}$), $\blacksquare$ ($50 \mu\text{M}$); palmitic acid, $\triangle$ ($10 \mu\text{M}$), $\blacktriangle$ ($25 \mu\text{M}$), $\blacktriangle$ ($50 \mu\text{M}$).

Fig. 3. Effects of Erucic, Brassidic and Palmitic Acids on V 79 Cells during Growth. Symbols are indicated in Fig. 2.

Fig. 4. Effects of Erucic and Brassidic Acids on Growth of V 79 Cells in the Medium Containing Normal Fetal Bovine Serum. Symbols are indicated in Figs. 1 and 2.

ジョンで、培地に加えた放射能の約 12% がリン脂質にとり込まれた。Table I に示すように、そのほとんどがホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンにとり込まれた。

ブラシジン酸とパルミチン酸の残存効果

あらかじめブラシジン酸、パルミチン酸で阻害した細胞を、2日後に Fig. 5 の矢印の点で脂肪酸を加えない培地に移すと、パルミチン酸で阻害された細胞はやがて増殖を再開したが、ブラシジン酸で阻害された細胞はもは

Table I. Incorporation of [^{14}C] Erucic Acid into Phospholipids of V 79 Cells after 24-hr Incubation

Phospholipids	Distribution of radioactivity (%)
Sphingomyelin	1.3
Phosphatidylcholine	62.7
Phosphatidylethanolamine	19.6
Cardiolipin	1.8
Phosphatidylglycerol	trace
Phosphatidylinositol	6.1
Phosphatidylserine	5.8
Phosphatidic acid	1.6
Lysophosphatidylcholine	0.3
Lysophosphatidylethanolamine	0.8

Fig. 5. Depletion of Brassidic and Palmitic Acids during Growth of V 79 Cells. Symbols are indicated in Fig. 2.

や回復しなかった。

考 察

エルカ酸はシス型のモノ不飽和脂肪酸であるが、物理的・化学的性質はかなり飽和脂肪酸に近い性質をもっている。エルカ酸は細胞内にとり込まれて中性脂質に入るものもあるが、代謝されて $\text{C}_{20:1}$ 、 $\text{C}_{18:1}$ または $\text{C}_{24:1}$ となることが知られている⁽⁸⁾。それゆえに細胞に対する毒性は比較的低いように思われる。しかし膜リン脂質にそのままとり込まれた場合は、特異な性質のゆえに膜の構造と機能に何らかの障害を与える可能性がある。特にトランス型であるブラシジン酸の場合はエルカ酸よりもさらに

飽和酸に近い性質をもっている。したがってこの脂肪酸はおそらく構造的には不飽和脂肪酸として認識されて膜リン脂質に入ると考えられるが、飽和酸に類似の性質をもつゆえに膜の構造と機能に対して強い損傷を与えるものと考えられる。この点に関しては分子種のレベル⁽⁹⁻¹¹⁾で現在研究中である。パルミチン酸による阻害は、この脂肪酸を除去することにより生育が回復することから、一時的な perturbation によるものと考えられる。

要 約

チャイニーズハムスター V 79 細胞の増殖は脱リビド血清の存在下でエルカ酸、ブラシジン酸、パルミチン酸によって阻害された。エルカ酸による阻害は弱く、無処理の血清の存在でその阻害は解除された。ブラシジン酸による阻害はブラシジン酸を培地から除いても残存した。パルミチン酸による阻害はこの脂肪酸を加えてない培地に移すことにより回復した。

動物培養細胞の培養を懇切丁寧にご指導いただいた京都大学理学部生物物理学教室岡田節人教授ならびに浜田義雄博士に感謝いたします。また脂質分析にご協力くだ

さった本研究室西原正照氏に感謝いたします。

- (1) A. M. M. Abdellatif and R. O. Vles : *Nutr. Metabol.*, **12**, 285 (1970).
- (2) J. L. Beare-Rogers, E. A. Nera and B. M. Craig : *Lipid*, **7**, 548 (1972).
- (3) J. L. Beare-Rogers and E. A. Nera : *ibid.*, **12**, 769 (1977).
- (4) B. E. Cham and B. R. Knowles : *J. Lipid Res.*, **17**, 176 (1976).
- (5) J. J. Mulligan, R. D. Lynch, E. E. Schnerberger and R. P. Geyer : *Biochim. Biophys. Acta*, **470**, 92 (1977).
- (6) D. A. Rintoul and R. D. Simoni : *J. Biol. Chem.*, **252**, 7916 (1977).
- (7) E. G. Bligh and W. J. Dyer : *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911 (1959).
- (8) N. Ong, J. Bezard and J. Lecerf : *Lipid*, **12**, 563 (1977).
- (9) M. Kito, M. Ishinaga, M. Nishihara, M. Kato, M. Sawada and T. Hata : *Eur. J. Biochem.*, **54**, 55 (1975).
- (10) M. Nishihara, M. Ishinaga, M. Kato and M. Kito : *Biochim. Biophys. Acta*, **431**, 54 (1976).
- (11) M. Ishinaga, M. Nishihara, M. Kato and M. Kito : *ibid.*, **431**, 426 (1976).