酸・タバコ煙成分による細胞傷害に対する トレハロースの保護作用†

阿賀美穂[§], 宮田 学, 牛尾知恵, 吉實知代, 有安利夫,
新井成之, 太田恒孝, 福田恵温

株式会社林原生物化学研究所 研究センター
医薬研究部門

Trehalose Protects Cells from Injury Caused by
Acids or Cigarette Smoke Constituents
(Studies on cytoprotective properties of trehalose)

Miho Aga[§], Manabu Miyata, Chie Ushio,
Chiyo Yoshizane, Toshio Ariyasu, Shigeyuki Arai,
Tsunetaka Ohta and Shigeharu Fukuda

Research Center, Biomedical Institute, Hayashibara
Biochemical Laboratories, Inc., 675-1
Fujisaki, Okayama, Okayama 702-8006

This study was conducted to assess the effects of trehalose on the morphology and the measurement of viability of cells treated with acids, cigarette smoke extract (CSE) and phenol (a CSE constituent) using *in vitro* cultured human cells. While cells treated with 0.2% (w/v) ascorbic acid were damaged, cells treated with 0.5% (w/v) trehalose, preserved their shapes even in the presence of an identical concentration of ascorbic acid. In addition, the mean values of cell viability after treatment with 0.2% (w/v) citric acid, one-fourth diluted CSE, and 0.2% (w/v) phenol, were 8%, 37% and 50%, respectively. Under the same conditions, when 1%, 2.5% and 2.5% of trehalose were added to the cell culture, the mean values of cell viability increased to 54%, 55% and 81%, respectively. These results suggest that trehalose protects cells from damage induced by stimulants in the oral cavity, indicating that trehalose is suitable for the formulations of products such as throat candies.

(Received Mar. 2, 2007; Accepted May 17, 2007)

Keywords: trehalose, cytoprotection, acids, cigarette smoke constituents

キーワード: トレハロース, 細胞保護, 酸, タバコ煙成分

非還元性二糖類であるトレハロースは, 動植物から微生物にわたり自然界に広く分布し, 細菌, 植物, 昆虫およびヒト細胞に乾燥や凍結融解に対する耐性を付与し, 保護作用を有することが知られている^{1)~4)}. このような組織保護作用を有しているトレハロースには, 乾燥や凍結以外の細胞に傷害を与えるストレスに対しても保護作用を示す可能

性が期待される. 我々は, トレハロースの細胞保護作用を期待できる部位として口腔粘膜に着目した.

酸を多く含む飴の多食や過度の喫煙により, 口腔内に痛みや違和感を覚えることがあるが, その際, 口腔内の細胞は傷害を受け, 炎症反応が始まっている⁵⁾と報告されている. そこで, これらの炎症の原因となる刺激物質である酸やタバコの煙成分に対してもトレハロースは, 細胞保護作用を発揮し, 痛みや違和感を緩和するのではないかと考え, 口腔や気道粘膜のモデルとしてそれぞれの細胞株を用い, トレハロースの作用を検討した.

1. 実験方法

(1) 細胞および試薬

トレハロースと対照として用いた二糖類であるマルトースは, 株式会社林原商事製. アスコルビン酸, クエン酸, 25% グルタルアルデヒド溶液, メチレンブルーは, 和光純薬工業株式会社製. リン酸塩緩衝液は, 日水製薬株式会社製. Cell counting kit-8⁶⁾ は, 株式会社同仁化学研究所製. タバコ (マイルドセブン) は, 日本たばこ産業株式会社製. 96 穴マイクロプレートは, 住友ベークライト株式会社製. 口腔粘膜および気道関連細胞として American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA) より入手したヒト鼻咽頭癌由来細胞株 (KB 細胞)⁷⁾⁸⁾ を用い, 培養には 10% ウシ胎児血清を含む DMEM 培地 (日水製薬株式会社) を使用した. また, 正常ヒト気管支/気管上皮細胞 (NHBE 細胞)^{9)~13)} は, タカラバイオ株式会社より購入し, 培養には BEGM[®] BulletKit[®] (タカラバイオ株式会社) を用いた. 細胞は, すべて 37°C, 5% CO₂ 存在下, 相対湿度 95% の条件下で培養した.

(2) タバコ煙エキス (Cigarette smoke extract, 以下 CSE) の調製

タバコ 5 本の煙中の揮発成分と粒子成分を, 自作の吸引装置 (図 1) を用いてリン酸塩緩衝液 6 mL 中に細かく泡立てながら溶解し, CSE を調製した. CSE は, 茶褐色の溶液で, タール臭があった. 希釈には細胞培養に使用する培地を用いた.

(3) 酸による細胞傷害に対するトレハロースの保護作用

1) アスコルビン酸

アスコルビン酸は還元力が強いいため, 生細胞の代謝を測定する Cell counting kit-8 では, 細胞傷害作用を定量的に評価できなかった (データ掲載なし). そこで, 細胞をグルタルアルデヒド溶液で固定後, メチレンブルー溶液で染色して細胞傷害を形態的に評価した. KB 細胞は, 96 穴マイクロプレートに 5×10^4 個/穴で播種し, 16 時間培養後, コンフルエントに単層を形成したところで培養上清を吸引除去し, 0.2% (W/V) アスコルビン酸とトレハロースまたはマルトースを 0.125~0.5% (W/V) 含む培地に置き換え, 1, 3 及び 6 時間処理した. その後, 2.5% グルタルアルデヒド溶液で 15 時間固定した後, 0.05% メチレンブルー溶液

† トレハロースの細胞保護作用に関する研究

〒702-8006 岡山県岡山市藤崎 675-1

[§] 連絡先 (Corresponding author), fujisaki@hayashibara.co.jp

図 1 CSE 調製装置

タバコ 5 本を燃焼させ、煙を吸引ポンプでリン酸塩緩衝液 6 mL 中に泡立てながら溶解し、CSE を調製した。

①：ゴム製管にタバコ装着。②：煙が通るプラスチック製管は、リン酸塩緩衝液中に浸す。③：リン酸塩緩衝液 6 mL。④：ゴム製管の試験管側の端は空中にあり、もう一端は吸引ポンプに連結。

で 15 分間染色して顕微鏡観察を行った。

2) クエン酸

KB 細胞を 96 穴マイクロプレートに 5×10^4 個/穴で播種し、16 時間培養後、コンフルエントに単層を形成したところで培養上清を吸引除去し、0.2% (W/V) クエン酸とトレハロースまたはマルトースを 0.125~1% (W/V) 含む培地に置き換え、1.5 時間培養した。細胞傷害の程度は、Cell Counting Kit-8 により評価した。得られた測定値より、未処理群の吸光度を 100% として細胞生存率を算出した。値は 2 点の平均で表した。

(4) フェノールおよび CSE による細胞傷害に対するトレハロースの保護作用

NHBE 細胞を 96 穴マイクロプレートに 1.6×10^4 個/穴で播種した後、一晚培養し、細胞が培養面の 70% を占める状態となった時点で培養上清を吸引除去し、0.15~0.30% (W/V) フェノールまたは 8 倍~4 倍希釈 CSE とトレハロースまたはマルトースを 2.5% (W/V) 含む培地に置換し、さらに 3 時間培養した。細胞傷害の程度は、Cell counting kit-8 で評価した。得られた測定値より、未処理群の吸光度を 100% として細胞生存率を算出した。値は平均±標準偏差で表した ($n=3$)。0.20% フェノール単独処理群とトレハロースまたはマルトース添加群との 2 標本の比較を Student の t 検定で行った。また、4 倍希釈 CSE 単独処理群とトレハロースまたはマルトース添加群との比較については、Tukey-kramer の HSD 検定で行った。危険率 5% 未満 ($p<0.05$) を統計学的に有意と判断した。

2. 実験結果

(1) 酸による細胞傷害に対するトレハロースの保護作用

1) アスコルビン酸

未処理群に比べ、0.2% アスコルビン酸で 3 時間培養し

図 2 アスコルビン酸による細胞傷害に対するトレハロースの保護作用

KB 細胞を 96 穴マイクロプレートに播種し、37°C、5% CO_2 で 16 時間培養後、培養上清を吸引除去し、0.2% (W/V) アスコルビン酸とトレハロースまたはマルトースを 0.125~0.5% (W/V) 含む培地に置き換え、3 時間培養した。A, 未処理群; B, 0.2% アスコルビン酸単独処理群; C, 0.2% アスコルビン酸+0.5% トレハロース添加群; D, 0.2% アスコルビン酸+0.25% トレハロース添加群; E, 0.2% アスコルビン酸+0.125% トレハロース添加群; F, 0.2% アスコルビン酸+0.5% マルトース添加群; G, 0.2% アスコルビン酸+0.25% マルトース添加群; H, 0.2% アスコルビン酸+0.125% マルトース添加群。

た群では、細胞質が萎縮、濃染し核の周囲にわずかに認められるのみであり、細胞間隙が開き、細胞の辺縁に一部見られる突起も隣接する細胞には届いていなかった (図 2A および B)。一方、これらのアスコルビン酸の細胞傷害による変化は各糖質 0.5% 添加群では認められず、細胞質が広く核も明らかで未処理群とほぼ同様の形態であった (図 2A, C および F)。また、0.25%, 0.125% の糖質添加群では、糖質の濃度に依存した細胞傷害の抑制が認められた (図 2D, E, G および H)。0.25% 糖質添加群では、アスコルビン酸による細胞傷害に対する抑制効果に糖質間での差は認められなかった。しかし、0.125% 糖質添加群では、トレハロース添加群の方がマルトース添加群よりも、細胞間隙が少なく、また、細胞質が大きいものが多い見受けられた (図 2D, E, G および H)。

2) クエン酸

図 3 に示すように、0.2% クエン酸添加後 1.5 時間目の KB 細胞の生存率は、僅か 8% であった。このクエン酸による細胞傷害は各糖質により濃度依存的に緩和されたが、トレハロースでは、0.5%, 1% 添加でのみ効果が認められ、0.25% 以下の濃度では効果が認められなかった。一方、マ

図 3 クエン酸による細胞傷害に対するトレハロースの保護作用

KB 細胞を 96 穴マイクロプレートに播種し、37℃, 5% CO₂ で 16 時間培養後、培養上清を吸引除去し、0.2% (W/V) クエン酸とトレハロースまたはマルトースを 0.125~1% (W/V) 含む培地に置き換え、1.5 時間培養した。細胞生存率は、未処理群の吸光度を 100% として算出した。値は 2 点の平均で表した。

ルトースでは 0.125% 以上の濃度で効果が認められた。また、1% 糖質添加群での生存率は、トレハロースまたはマルトースでそれぞれ 54% と 43% であった。このクエン酸による細胞傷害に対する糖質の保護効果は、糖質の濃度依存的に認められたが、添加した糖質の種類と濃度によって、その効果の程度に違いがあった。

(2) タバコ煙成分による細胞傷害に対するトレハロースの保護作用

1) フェノール

表 1 に示したように、フェノール単独処理群の NHBE 細胞の生存率は、フェノール濃度の増加に依存して減少した。0.20% フェノール単独処理による生存率は、50.4% であった。一方、同時にトレハロースあるいはマルトースをそれぞれ 2.5% 添加した場合、いずれの糖質でも細胞の生存率は約 80% であり、有意 ($p < 0.05$) に細胞傷害作用を抑制した。このフェノールによる細胞傷害に対する抑制効果は、糖質間で差は認められなかった。

2) CSE

表 2 に示したように、CSE 単独処理群の NHBE 細胞の生存率は CSE の濃度に依存して減少した。4 倍希釈した CSE で 3 時間処理した後の NHBE 細胞の生存率は 36.9% であった。一方、同濃度の CSE に 2.5% トレハロースを同時に添加した場合、細胞生存率は 54.7% であり、有意 ($p <$

表 1 フェノールによる細胞傷害に対するトレハロースの保護作用

フェノール単独処理群	細胞生存率 (%)	糖質添加群	細胞生存率 (%)
フェノール 0.15%	78.7±17.2		
フェノール 0.20%	50.4±7.2	トレハロース 2.5%	81.0±4.6*
		マルトース 2.5%	83.8±5.7*
フェノール 0.30%	39.9±6.1		

NHBE 細胞を 96 穴マイクロプレートに播種した後、37℃, 5% CO₂ で一晩培養し、培養上清を吸引除去後、フェノールとトレハロースまたはマルトースを 2.5% (W/V) 含む培地に置換し、3 時間培養した。細胞生存率は、未処理群の吸光度を 100% として算出した。値は平均±標準偏差で表した。($n=3$), *; $p < 0.05$ 0.20% フェノール単独処理群と比較した場合 (Student's *t*-test)。

表 2 CSE による細胞傷害に対するトレハロースの保護作用

CSE 単独処理群	細胞生存率 (%)	糖質添加群	細胞生存率 (%)
CSE×8dil	77.6±18.5		
CSE×6dil	48.7±6.2		
CSE×4dil	36.9±1.5	トレハロース 2.5%	54.7±3.6*
		マルトース 2.5%	45.7±9.3

NHBE 細胞を 96 穴マイクロプレートに播種した後、37℃, 5% CO₂ で一晩培養し、培養上清を吸引除去後、CSE とトレハロースまたはマルトースを 2.5% (W/V) 含む培地に置換し、3 時間培養した。細胞生存率は、未処理群の吸光度を 100% として算出した。値は平均±標準偏差で表した。($n=3$), *; $p < 0.05$ ×4dil CSE 単独処理群と比較した場合 (Tukey-Kramer's test)。

0.05) に細胞傷害が抑制された。しかし、CSE と 2.5% マルトース添加群の生存率は 45.7% であり、CSE 単独処理群との間に有意な差は認められなかった。また、2.5% トレハロース添加群と 2.5% マルトース添加群との間にも有意な差は認められなかった。

3. 考 察

細胞傷害物質である酸またはタバコ煙成分とトレハロースを同時に添加した培地で口腔関連細胞を培養すると、トレハロースにより細胞傷害が緩和されることが確認された。また、酸に対する細胞保護効果の程度については、糖質対照として使用したマルトースとトレハロースで比較すると、傷害物質の種類、糖質の添加濃度により違いはあったが、糖質の濃度依存的に効果が認められた。また、糖質 0.125% の低濃度では、アスコルビン酸による細胞傷害に対する保護効果において、トレハロースがマルトースより優れており、細胞の形状を安定に保持できると考えられた。このアスコルビン酸による細胞傷害は、pH7 付近である同濃度のアスコルビン酸ナトリウムでは傷害が認められなかったことにより、pH の変化によるものと考えられる(データ掲載なし)。

一方、タバコ煙成分に対する細胞傷害については、マルトースもタバコ煙成分の一つであるフェノールによる傷害を緩和したが、様々な物質の複合体である CSE による細胞傷害は緩和せず、トレハロースにのみ保護効果が確認された。タバコの煙には、数千もの化学物質が含まれており、それによる細胞傷害には、ラジカルによる酸化損傷が関係している¹²⁾とも考えられている。現在までの知見により、糖質は、タンパク質安定化作用^{14)~16)}などにより生体膜を安定化させることで細胞保護効果を発揮すると考えられている。今回のトレハロースによる細胞保護効果の機序としては、抗酸化作用、タンパク質の安定化や保水作用などが複合的に働いている可能性が考えられる。糖質間の効果の違いについては、トレハロースがラジカル捕捉作用¹⁷⁾を持つことや、マルトースに比べてより強いタンパク質安定化作用を有していることによるものと推測される。

今回、トレハロースには、乾燥や凍結に対する細胞保護作用以外にも酸やタバコの煙成分に対する保護作用があることが示された。このトレハロースの作用を有効に発揮させるために、刺激物質を含む食品への配合や、のど飴、うがい薬等への適用が示唆される。

4. 要 約

トレハロースが口腔内細胞を酸やタバコなどの傷害物質から保護するかについて検討した。培養ヒト細胞粘膜モデルに酸またはタバコ煙成分と同時にトレハロースを添加し、傷害の程度を形態的または定量的に評価した。その結果、トレハロースには、酸またはタバコ煙成分による傷害から細胞を保護する作用があることが示された。これらのことより、のど飴等へのトレハロースの配合添加の有用性

が示唆された。

文 献

- 1) Eroglu, A., Russo, M.J., Bieganski, R., Fowler, A., Cheley, S., Bayley, H. and Toner, M. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **18**, 163-167 (2000).
- 2) Guo, N., Puhlev, I., Brown, D.R., Mansbridge, J. and Levine, F. Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nat. Biotechnol.* **18**, 168-171 (2000).
- 3) Leslie, S.B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J.H. and Crowe, L.M. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3592-3597 (1995).
- 4) Hino, A., Mihara, K., Nakashima, K. and Takano, H. Trehalose levels and survival ratio of freeze-tolerant versus freeze-sensitive yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1386-1391 (1990).
- 5) Mio, T., Romberger, D.J., Thompson, A.B., Robbins, R.A., Heires, A. and Rennard, S.I. Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **155**, 1770-1776 (1997).
- 6) Nagafuji, S., Okabe, H., Akahane, H. and Abe, F. Trypanocidal Constituents in Plants 4. Withanolides from the Aerial Parts of *Physalis angulata*. *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 193-197 (2004).
- 7) Chang, M., Wu, H., Lee, J., Lee, P., Chang, H., Hahn, L., Lin, B., Chen, Y. and Jeng, J. The induction of prostaglandin E2 production, interleukin-6 production, cell cycle arrest, and cytotoxicity in primary oral keratinocytes and KB cancer cells by areca nut ingredients is differentially regulated by MEK/ERK activation. *J. Biol. Chem.*, **279**, 50676-50683 (2004).
- 8) Ogawa, M., Koyanagi, J., Sugaya, A., Tsuda, A., Ohguchi, H., Nakayama, K., Yamamoto, K. and Tanaka, A. Cytotoxic activity toward KB cells of 2-Substituted Naphtho [2,3-*b*] furan-4,9-diones and their related compounds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 1009-1012 (2006).
- 9) Hellermann, G.R., Nagy, S.B., Kong, X., Lockey, R.F. and Mohapatra, S.S. Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells. *Respir. Res.*, **3**, 22-29 (2002).
- 10) Matsuo, M., Shimada, T., Uenishi, R., Sasaki, N. and Sagai, M. Diesel exhaust particle-induced cell death of cultured normal human bronchial epithelial cells. *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 438-447 (2003).
- 11) Vijayalakshmi, N.A., Januszkiewicz, A. and Nath, J. Pro-inflammatory responses of human bronchial epithelial cells to acute nitrogen dioxide exposure. *Toxicol. Sci.*, **197**, 149-164 (2004).
- 12) Fields, W.R., Leonard, R.M., Odom, P.S., Nordskog, B.K., Ogden, M.W. and Doolittle, D.J. Gene expression in normal human bronchial epithelial (NHBE) cells following *in vitro* exposure to cigarette smoke condensate. *Toxicol. Sci.*, **86**, 84-91 (2005).
- 13) Nylander-French, L.A. and French, J.E. Comparative *in vitro* cytotoxicity of ethyl acrylate and tripropylene glycol diacrylate to normal human skin and lung cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, **36**, 611-616 (2000).
- 14) Carpenter, J.F. and Crowe, J.H. An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with

- dried proteins. *Biotechnology*, **28**, 3916–3922 (1989).
- 15) Pereira, C.S., Lins, R.D., Chandrasekhar, I., Freitas, L.C.G. and Hunenberger, P.H. Interaction of the disaccharide trehalose with a phospholipid bilayer : A molecular dynamics study. *Biophys. J.*, **86**, 2273–2285 (2004).
- 16) Kaplan, F. and Guy, C.L., Beta-Amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant Physiol.*, **135**, 1674–1684 (2004).
- 17) Benaroudj, N., Lee, D.H. and Goldberg, A.L. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.*, **276**, 24261–24267 (2001).
- (平成 19 年 3 月 2 日受付, 平成 19 年 5 月 17 日受理)
-