

# チーズのガン細胞に対するアポトーシス誘導物質の検索とその構造に関する研究

○井越 敬司、大倉典之、小林弘昌

## はじめに

最近、食品の三次機能として食品によるガン細胞増殖抑制に関する研究が病気予防の視点から注目されている。

当研究室では、チーズの機能性について研究してきており、現在までにチーズから ACE 阻害ペプチドや抗酸化成分を見出している。そこで本研究では、チーズの機能性の一つとしてガン細胞増殖抑制能について検討した。すなわち、ヒト白血病細胞株 HL-60 を用いて、チーズのガン細胞増殖抑制およびアポトーシス誘導効果を調べ、またその成分の構造について明らかにした。

## 材料および方法

### 1. 供試チーズ

供試チーズとして、市販チーズ 11 種類および雪印乳業より提供されたブルーチーズを使用した。

### 2. 試料調製

試料は、チーズの凍結乾燥物をメタノールで抽出した。これをチーズメタノール可溶性画分(CMF)として本実験に用いた。

### 3. 細胞株と細胞培養

細胞は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクより分譲されたHL-60ヒト白血病細胞を用いた。本細胞は 37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下でウシ胎児血清(FBS) 10%とペニシリンストレプトマイシン 1%を含んだRPMI1640 培地を用いて培養した。

### 4. 細胞増殖抑制の測定

培養後の細胞を 2 × 10<sup>5</sup> cells/ml に調製し、96 穴マイクロプレートのウェルに 100 μl 播種した。播種後、ジメチルスルホキシドに溶解させたCMFを 1 μl 添加し、24 時間培養した。培養後、各ウェルにCell

Counting Kit-8(同仁堂)を 10μl 添加し、37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で 3 時間反応させた。反応後、吸光度(450nm)を測定し、次の式にて細胞増殖抑制率(%)を求めた。

$$\text{細胞生存率(\%)} = 100 - [(A_s - A_b) / (A_c - A_b)] \times 100$$

As = 検体の吸光度(サンプル+細胞)  
Ab = ブランクの吸光度(サンプルのみ)  
Ac = 陰性対照の吸光度(細胞のみ)

## 5. アポトーシスの検出

HL-60 細胞を培養し、細胞数が 2 × 10<sup>5</sup> cells/ml となるように調製した。CMFを培地に対して 1%の濃度になるように添加し、37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で6時間培養した。培養後、DNAを常法に従って抽出し、2%アガロースゲルで電気泳動を行った。電気泳動後、DNAのヌクレオソーム単位での断片化を観察した。

## 結果および考察

### 1. チーズの HL-60 細胞増殖抑制効果

CMF の HL-60 細胞に及ぼす影響について調べ、その結果を Fig.1 に示した。モッツアレラ(非熟成チーズ)、ゴーダ、エダムおよびパルメザンチーズなどの乳酸菌熟成タイプではほとんど活性が認められなかった。また、一次スターターとして、プロピオン酸菌を使用したグリエールおよびエメンター

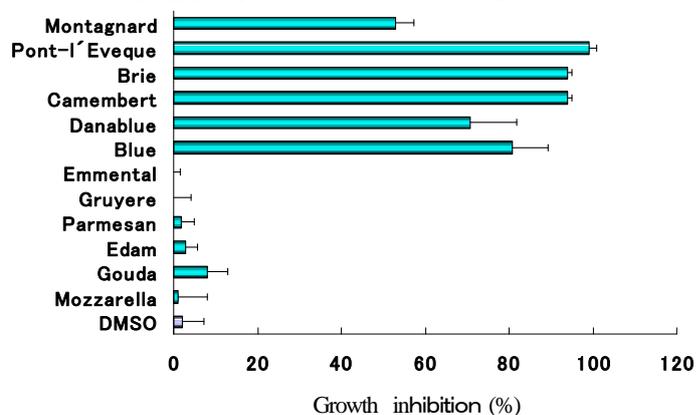


Fig. 1 The growth of inhibition in HL-60 cells

ルなどのスイスチーズにおいても、同様の結果であった。一方、モンタニヤール、ポンレベックなどのウォッシュタイプ、ブリーやカマンベールなどの白カビ熟成タイプおよびダナブルーやブルーチーズなどの青カビ熟成タイプにおいて高い細胞増殖抑制効果が認められた。従って、これらチーズ中に HL-60 細胞の増殖抑制成分が存在することが示唆された。

## 2. チーズのアポトーシス誘導効果

CMF を添加した細胞を用いて、アガロースゲル電気泳動を行った。その結果を Fig.2 に示した。

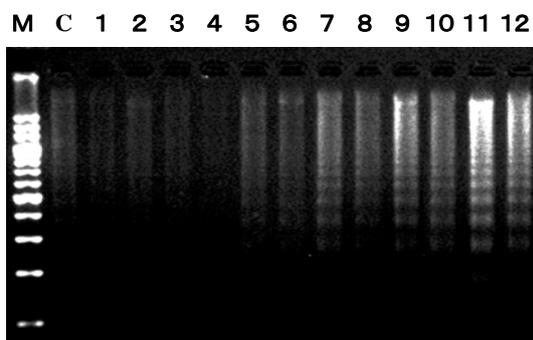


Fig. 2 Analysis of DNA fragmentation patterns

M; makker C; control 1; Mozzarella 2; Gouda 3; Edam 4; Parmesan 5; Gruyere 6; Emmental 7; Blue 8; Danablu 9; Camembert 10; Brie 11; Pont-l'Eveque 12; Montagnad

Fig.1 において増殖抑制が認められなかった乳酸菌熟成タイプおよびスイスチーズでは、アポトーシスに特徴的なヌクレオソーム単位での DNA の断片化は検出されなかった。しかし、細胞増殖抑制活性の高かったウォッシュおよびカビチーズにおいては、DNA の断片化が検出された。従って、これらチーズによる細胞死はアポトーシス誘導によるものと考えられた。

## 3. 熟度の異なるブルーチーズの HL-60 細胞増殖抑制効果とアポトーシス誘導効果

0 から3ヶ月間、熟成させたブルーチーズより調製された CMS の HL-60 細胞増殖抑制効果(Fig.3)とアポトーシス誘導効果について調べた。その結果、熟成の進行とともに、細胞増殖抑制活性とアポトーシス誘導効果の増加が認められた。従って、チーズ中の細胞増殖抑制成分は熟成中に生成する成分と考えられた。

## 4. ブルーチーズからの増殖抑制成分の分離およ

## びその構造

HL-60 細胞増殖抑制成分はブルーチーズの凍結乾燥物より、メタノール抽出、ヘキサン処理した後、増殖抑制活性の認められたヘキサン画分を ODS カラムによる HPLC にて活性画分を分離した。その結

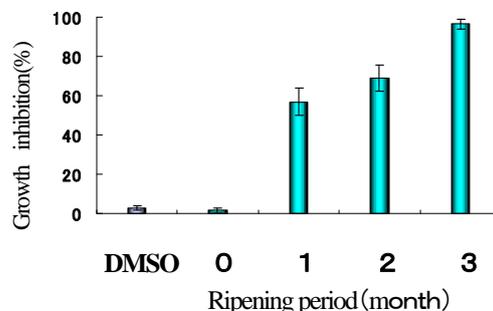


Fig. 3 The growth of inhibition in HL-60 cells by Methanol Extract Blue cheese during

果、二つの活性ピーク(4, 5)を得た(Fig. 4)。次いでこれら活性成分の<sup>1</sup>H-NMRによる構造解析の結果、両者ともに脂肪酸であると推定された。そこで両試料をメチルエステル化後、ガスクロマトグラフィーにより既知脂肪酸との同定を行った。その結果、4と5はパルミチン酸およびオレイン酸とそれぞれ同定された。両脂肪酸の増殖抑制活性を市販品で調べたところ、共に活性が認められた。従ってブルーチーズ中のHL-60 細胞増殖抑制性成分は遊離脂肪酸のパルミチン酸およびオレイン酸であることが知られた。

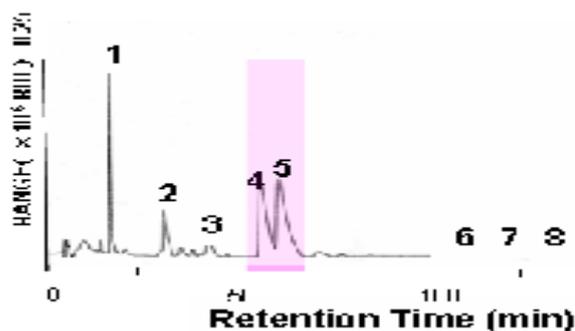


Fig4 Separation of HL60 growth inhibition substance by reversed-phase HPLC

本研究においてバイオテクノロジー研究推進会より研究助成を受けました。厚くお礼を申し上げます。

問い合わせ先:

〒869-1404 熊本県阿蘇郡長陽村河陽

九州東海大学 農学部 井越敬司

Tel : 0967-67-3936

E-mail: kigoshi@ktmail.ktokai-u.ac.jp