

第5章 アルギン酸酵素分解産物の生理活性について

緒言

現在、海藻から抽出されたアルギン酸は良質の食物繊維で、食品の粘着剤や増量剤として利用されている。利用は食品のみならず、医薬品、化粧品、印刷、歯科材料と多岐にわたっている。しかし、その利用は殆どが高分子であり、オリゴマーとしての利用は稀であり、未だ実用化に至っていない。近年、難消化性多糖質を酵素分解して機能性オリゴ糖を調製する研究が盛んである。フラクトオリゴ糖¹⁰⁴⁾やキチン・キトサンオリゴ糖など有用なオリゴ糖の開発が相次いでいる。海藻多糖の多くは難消化性であるから機能性オリゴ糖の原料となり得ると考えられている。アルギン酸についても例外ではない。

1992年、Akiyama *et al.* は酵素分解で得たアルギン酸オリゴマーにビフィズス菌の成長促進作用があることを報告している⁷⁵⁾。1993年、Yonemoto *et al.* は、平均分子量 1,800 のアルギン酸オリゴマーに小松菜の成長促進効果があることを報告している。また、この効果は高分子アルギン酸にはないこともわかっている⁷⁶⁾。1994年、Tomoda *et al.* は、平均重合度 4 の同オリゴマーに大麦の幼根の成長促進作用があることを報告している⁷⁷⁾。同年、Natsume *et al.* は、大麦の根の成長に作用するアルギン酸オリゴマーの重合度依存性を調べ、重合度 3 が、根の成長速度を最も効果的に速めたことを明らかとしている⁷⁸⁾。2000年、Iwasaki *et al.* は、アルギン酸オリゴマー混合物にレタスの幼根促進作用があることを見出し、特に重合度 3～6 に強い効果が現れることを報告している⁷⁹⁾。最近の報告では、2001年、Hiura *et al.* がアルギン酸オリゴマーナトリウム塩に血圧上昇抑制作用があることを報告している⁸⁰⁾。オリゴマーの生理活性については以上の報告に過ぎない。

本研究において、*Pseudoalteromonas* sp. No. 272 株が産生するアルギン酸リアーゼの基質特異性が PG、PM の両ウロン酸にあることが分かった。ゆえに、本酵素によって両基質の不飽和オリゴマーを得ることができ、かつ本酵素の比活性が高いことから効率良くオリゴマーを得ることができる。

第 1 節で、幾つか報告のある高等植物幼根の成長促進作用について、ニンジン (双子葉植物) とイネ (単子葉植物) を用いて行った。これまでに報告されている植物の根の成長促進作用の実験は、種子から根が出た状態 (seedling) での結果である。今回、著者は幼根の先端から約 1 cm カットしたもの (excised root) を試料とすると再現性の良い結果が得られることがわかったのでこの方法を用いて実験を行った。第 2 節では、免疫賦活作用について検討した。このことは、1991 年 Otterlei *et al.* が、高分子アルギン酸がヒト単球を刺激し、TNF- α (tumor necrosis factor- α)、interleukin-6、interleukin-1 を誘発することを報告している。特に、PM ブロックにこの効果が顕著に現れている^{71,72)}。オリゴマーについての免疫賦活作用の報告はこれまでにない。そこでヒト末梢血より白血球を得、オリゴマーを作用させ、その刺激によってある種のサイトカインが誘発され、それが癌細胞の増殖を抑えるかを U937 細胞を用いて調べた。この実験系は、2001 年に Liao *et al.* によってクロマメの中のある多糖質がヒト白血球に作用し U937 細胞を分化させる¹⁰⁵⁾ことからヒントを得た。

第 1 節 アルギン酸オリゴマーの高等植物幼根の成長促進作用

実験材料

アルギン酸オリゴマーは、第 4 章 2 節 3. 不飽和アルギン酸オリゴマーの調製法に従って行った。アルギン酸オリゴマー混合物の調製は、PG、PM を蒸留水に溶解し、これに酵素溶液を加え 30°C で反応させ、凍結乾燥により得た。ニンジン (*Daucus carota var. sativus*) の種子はトーホク株式会社より、イネ (*Oryza sativa japonica*) の種子は石川農業大学より提供していただいた。

実験方法

1. ニンジンの種子の滅菌

ニンジン種子 (0.5 g) をガーゼに包み、流水で 4 時間洗浄した。この操作により、種子の表面を覆っている発芽阻止物質を洗い流す。十分に水洗いした後、70% エタノール約 50 ml に 30 秒浸して、種子の表面を覆うタンパク質、脂質等の物質を取り去った。その後、滅菌水約 70 ml で 2 回エタノールを洗い流し、0.5% 次亜塩素酸 300 ml とガーゼに包んだ種子を減圧瓶に入れ、10 分間減圧し、種子の表面と次亜塩素酸を接触しやすくし、滅菌操作がより効率良く出来るようにした。その後、大気中で 50 分間、同液でスターラーで攪拌しながら滅菌操作を続けた。その後、0.1% HgCl₂ 約 30 ml に 2 分間浸し、常時オートクレーブした滅菌水 100 ml で全ての試薬を洗い流した。最後の滅菌水処理は、4 回行った。

2. ニンジンの種子の播種と成長試験

シャーレ (90 x 20 mm) に 0.8% 寒天培地を作った。これに、先程滅菌処理を施した種子を並べた。その後、25°C (±2°C) で 5 日～ 6 日間 暗所でインキュベートした。その後、幼根の先端から約 1 cm をハサミで切断し、正確な長さを記録し、フィルター滅菌で注入した様々な濃度のアルギン酸オリゴマー (0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 2.00 mg/ml) を含む B5 medium に移した。B5 medium の組成は Table 17 に示す。このときの寒天の含有量も 0.8% であった。B5 medium に移してから 5, 10, 15 日後の幼根の長さを測定した。

Table 17. Composition of B5 Medium (pH 5.8~6.0) in 1 L of H₂O

KNO ₃	2.5 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.15 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25 g
(NH ₄)SO ₄	0.134 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.17 g
EDTA·Ferric Salt	43 mg
KI	0.75 mg
H ₃ BO ₃	3 mg
MnSO ₄ ·4H ₂ O	13.4 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025 mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025 mg
Nicotinic acid	1 mg
Pyridoxine·HCl	1 mg
Thiamine·HCl	10 mg
Inositol	100 mg
Sucrose	30 g

3. イネの種子の滅菌

イネについては、種子の滅菌処理が困難であったので皮を剥がして行った。皮を剥がした種子をガーゼに包み、0.1% HgCl₂ 100 ml で 25 分間スターラーで攪拌しながら滅菌操作を行った。その後常時オートクレーブした滅菌水 100 ml で全ての試薬を洗い流した。最後の滅菌水処理は、4 回行った。

4. イネの種子の成長試験

ニンジンと同様、寒天培地で 5、6 日間発芽させた。その後、幼根の先端から約 1 cm をハサミで切断し、様々なアルギン酸オリゴマーを含む B5 medium に移してから、4、8 日後の幼根の長さを測定した。

結果および考察

1. ニンジン、イネの成長促進効果

a) PG、PM について

酵素処理を施していない PG、PM についての結果を Fig. 44 に示す。(A) がニンジン、(B) がイネの結果である。この図からも明らかなように、終濃度 0.5 mg/ml の PG、PM を含む B5 medium で培養したがニンジン、イネの両幼根の成長を促進することはなかった。

b) 酵素消化オリゴ G、オリゴ M 混合物について

酵素消化して得られた各オリゴマーを終濃度 0.5 mg/ml を含む B5 medium で培養した。結果を Fig. 45 に示す。(A) がニンジン、(B) がイネの結果である。ポリマー体では認められなかった幼根の成長促進効果が酵素消化産物においては見られた。酵素消化アルギン酸オリゴマーが幼根の成長促進効果に必須であるように思われた。ニンジン、イネ共に G オリゴマー混合物の方が M オリゴマー混合物よりも促進効果が高かった。植物の幼根の成長促進効果実験においては、緒言でも述べた通り、ポリマー体よりも酵素消化により得たオリゴマーの方が生理活性を有することは、以前の報告にもある⁷⁹⁾。

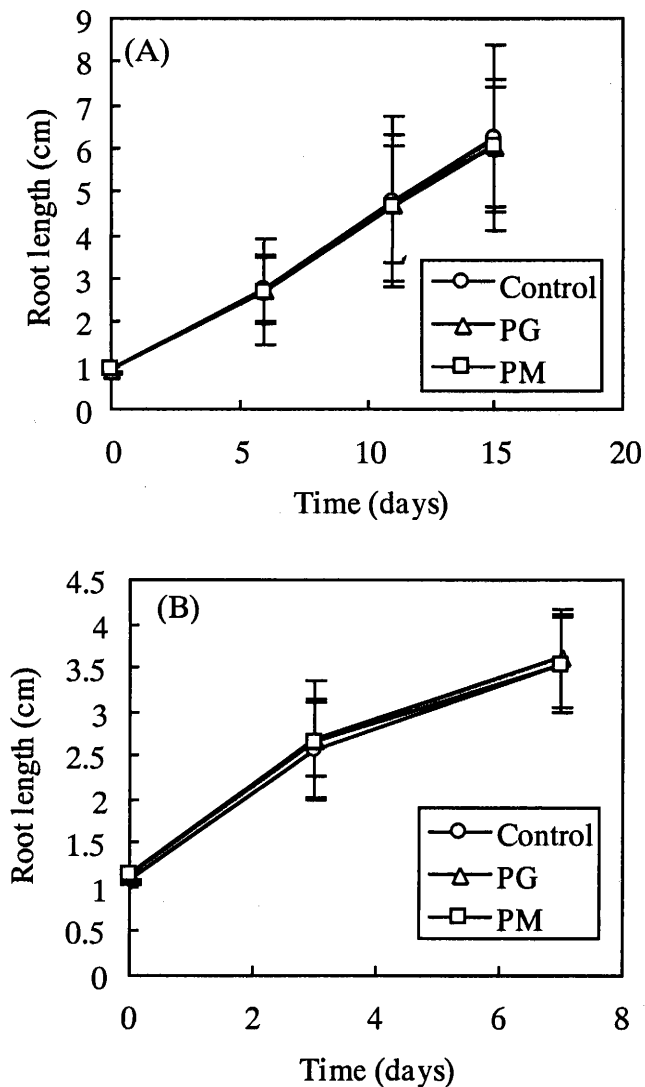


Fig. 44. Effects of PG and PM on the Root Elongation of Carrot (A) and Rice (B).

Surface sterilized seeds were placed on agar medium at 25°C in the dark. The roots (1-1.5 cm) emerging from seed were excised after 5 or 6 days and cultured again on B5 medium containing 0.5 mg/ml of PG and PM in the dark. The root length was measured at 4 or 5 days interval. Each value is the mean \pm SD (n=10).

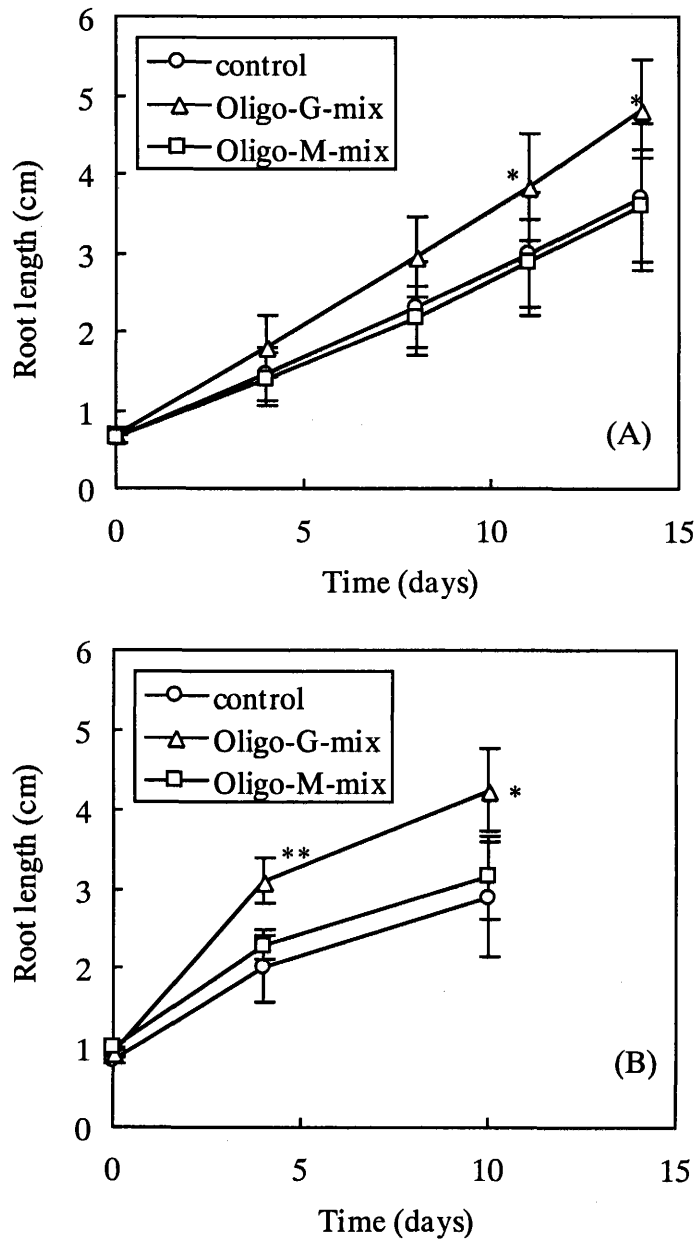


Fig. 45. Effects of Oligogulonate and Oligomannuronate Mixtures on the Root Elongation of Carrot (A) and Rice (B).

The experiment was done by the same as in those described in Fig. 44 with a final concentration of oligogulonate and oligomannuronate mixtures at 0.5 mg/ml. Each value is the mean \pm SD (n=5). Dunnet multiple comparison test: *P<0.05, **P<0.01

2. Gオリゴマー効果の濃度依存性について

ニンジン、イネ共に成長促進効果の見られた G オリゴマーについて濃度依存性を調べた。結果を Fig. 46 に示す。(A) がニンジンについて終濃度 0、0.25、0.5、0.75、2.0 mg/ml であり、4、8、15 日目にそれぞれ測定した結果である。(B) はイネについて 15 日後の結果を示してある。ニンジン、イネ共に終濃度 0.75 mg/ml が最も成長促進効果が認められた。特にニンジンについては、0.75 mg/ml を頂点に濃度依存性が認められた。一方、イネはニンジンのように規則性は認められなかったものの、終濃度 0.75 mg/ml が最も効果的であった。

3. G オリゴマー効果の重合度依存性について

濃度依存性の実験で最も効果のあった終濃度 0.75 mg/ml でどの重合度が効果的であるかを調べた。結果を Fig. 47 に示す。(A) がニンジンについて、(B) がイネについての結果である。ニンジン、イネ共にコントロールと比較して DP 3~9 の G オリゴマーすべてにおいて成長促進効果が認められ、そのうち最も効果があったのは DP 5 であり、その後重合度が増すにつれて効果は減少した。さらに、G オリゴマーの成長促進作用はイネよりもニンジンに対しての方が差がはっきり認められた。これまでの報告によると、DP 3~6 のオリゴマーに生理活性が見出されており今回の結果もこれと合致した。しかし、M よりも G のオリゴマーにこれらの幼根成長促進効果がみられる理由は明らかでない。植物細胞への接触の難易、細胞壁表面物質 (アクセプター) との接触親和性、細胞内部への何らかの成長促進に関わる情報の伝達の相違などに関係するかもしれないが、これらのメカニズムは今後の研究にかかるところである。

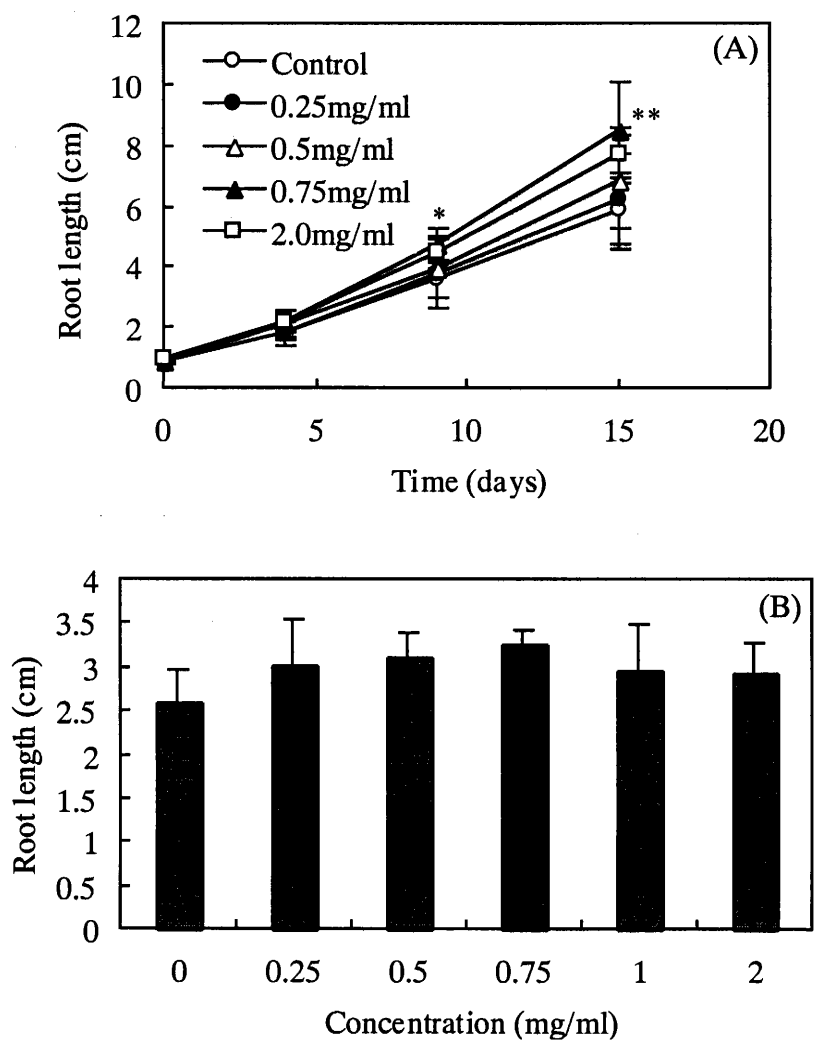


Fig. 46. Effects of Concentration of Oligoguronate Mixtures on the Root Elongation of Carrot (A) and Rice (B).

The experiment was done by the same as in those described in Fig. 44 with various concentrations of oligoguronate mixtures. In case of rice, the values were taken at 15 days of the culture. Each point represents the mean \pm SD (n=5). Dunnett multiple comparison test: *P<0.05, **P<0.01.

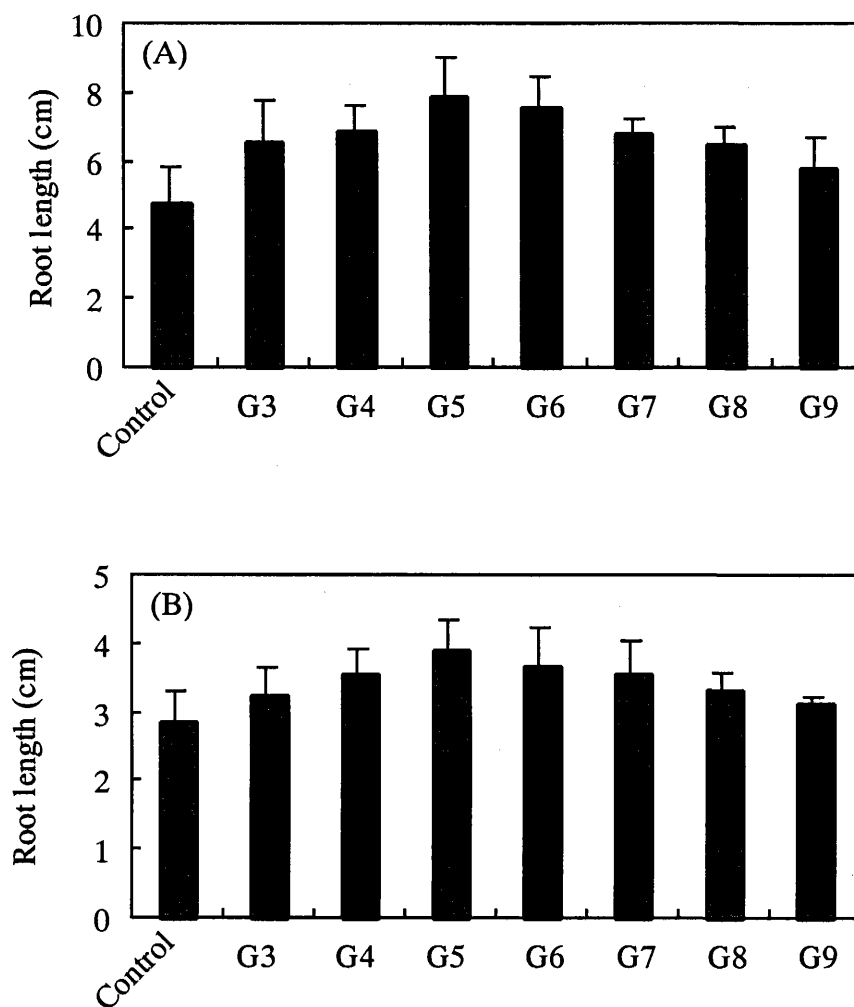


Fig. 47. Effects of Degree of Polymerization (DP) of Oligogulonate on the Root Elongation of Carrot (A) and Rice (B).

The experiment was done by the same as in those described in Fig. 44 with various DPs of oligogulonate at 0.75 mg/ml. The values were taken at 15 days of the culture. Each point represents the mean \pm SD (n=5).

第2節 アルギン酸オリゴマーの癌細胞増殖抑制効果

実験材料

アルギン酸酵素分解産物の調製は、第4章第2節3.不飽和アルギン酸オリゴマーの調製法に従って行った。Gオリゴマー混合物(G-mix)、Mオリゴマー混合物(M-mix)は、純水中で酵素消化を行い、凍結乾燥にて標品を得た。ヒト骨髄性白血病由来U937細胞(浮遊細胞)は、理化学研究所の細胞開発銀行より入手した。Phytohemagglutinin (PHA) はシグマ社製、caspase-3の蛍光基質(Ac-DEVD-MCA)とcaspase-3阻害剤の蛍光基質(Ac-DEVD-CHO)はペプチド研究所より購入した。Heochst 33258 (H 33258) は和光純薬社製を用いた。

実験方法

1. ヒト末梢血からの白血球(単球)の分離と mononuclear cells-conditioned medium (MNC-CM) の調製

健康人(25歳)より真空採血管(7-ml、EDTA含む)(テルモ社製)を用い、約50ml採血した。血液とRPMI 1640培地を等量混ぜ、希釈した。4.5mlのFicoll-Hypaque (Pharmacia社製)を含む15-ml容ファルコンチューブに2倍希釈した血液6mlを層を成すように静かに注ぎ、遠心分離(400 x g、30分間、18°C)した。単核細胞層を別のファルコンチューブに移し、約3倍量のRPMI 1640培地を加え、懸濁し、遠心分離(350 x g、10分間、4°C)で2回洗浄した。ペレットを終濃度が 1.5×10^6 cells/mlになるように10%牛胎児血清(56°C、30分加熱処理を行ったもの)を含むRPMI 1640培地に懸濁した。

また、さらに得られた白血球を1時間培養することで、単球(付着細胞)とリンパ球(浮遊細胞)に分け、単球を用いた実験も行った。

上記の方法で調製した白血球と様々な濃度のアルギン酸オリゴマー(酵素消化産物)を10%(V/V)の割合で35mmのディッシュに入れ、全体で1mlにし、37°Cで24時間培養した。24時間後、遠心分離(900 x g、5分間、4°C)し上清を得、フィルター(45 μm)(Advantec社製)滅菌し、-80°Cに保存した。以上の操作で得られた mononuclear cells-conditioned medium (MNC-CM) を以後の実験に用いた。

2. MNC-CM の U937 細胞に対する細胞毒性

24 穴プレートの各ウェルに 1×10^5 個の U937 細胞を播種した (10% BSA を含む RPMI 1640 培地中)。特に表記しないかぎり、各ウェルに MNC-CM を 30% (V/V) 添加し、 37°C で 72 時間培養した。72 時間後、細胞をトリパン・ブルー染色を行い、血球計算板 (Kayagaki 社製) にて生細胞 (白色細胞) を測定した。

3. 核の形態変化

2.MNC-CM の U937 細胞に対する細胞毒性と同条件で U937 細胞を培養した後、培養液を $1,500 \times g$ で 10 分間遠心分離し、上清を除き、ペレットに 1% グルタルアルデヒド溶液を添加し、室温で 30 分間細胞を固定した。 $500 \times g$ で 5 分間遠心分離した後、PBS (phosphate buffered saline) を 1 ml 加え細胞を洗浄し、さらに $500 \times g$ で 5 分間遠心分離した後、 $20 \mu\text{l}$ の PBS を添加した。そこに 1 mM ヘキスト 33258 溶液を $2 \mu\text{l}$ 添加し、蛍光顕微鏡 (Zeiss 社製、Axiovert 200) で核形態の観察を行った。

4. Caspase-3 様活性測定

2.MNC-CM の U937 細胞に対する細胞毒性と同条件で培養した後、培養液を $500 \times g$ で 10 分間遠心分離し、細胞を沈殿させ、培地を取り除き、1 ml の PBS を添加して、細胞を懸濁させマイクロチューブに移し、 $500 \times g$ で 5 分間遠心分離して上清を除いた。それに $70 \mu\text{l}$ の細胞溶解液 (10 mM HEPES / KOH, pH 7.4, 2 mM EDTA, 0.1% CHAPS, 5 mM DTT, 1 mM PMSF) を添加し、ピペットマン P-200 で 30 回ほどピペッティングを行った。その後、凍結融解を行い、 $21,300 \times g$ で 10 分間遠心分離して、上清を試料溶液とした。種々の MCA 基質原液 (10 mM in DMSO) を、反応緩衝液 (0.1 M トリス塩酸緩衝液 pH 8.0) で 500 倍に希釈したものを基質溶液とした。反応緩衝液 (あるいは阻害剤) $5 \mu\text{l}$ と基質溶液 $25 \mu\text{l}$ をマイクロチューブに入れ、 37°C で 10 分間インキュベートし、それから $25 \mu\text{l}$ の試料溶液を添加し、 37°C で 10 分間反応させた。反応後、反応停止液 (0.2 M グリシン溶液 pH 2.8) $745 \mu\text{l}$ で反応停止させ、励起波長 380 nm、蛍光波長 460 nm で、遊離した MCA の蛍光強度を蛍光光度計で測定した。なお、酵素活性は、 37°C で 1 分間に 1 pmol の

MCA 基質を水解する酵素量を 1 単位 (1 unit) とした。比活性は、タンパク質 1 mg 当たりの活性 (units/mg) で表した。

$$\text{Units / mg (protein)} = F2 / F1 \times 1000 \times (25 / 800) \times 10 / \text{mg (protein)}$$

F1 ; 1 pmol MCA の蛍光強度

F2 ; 基質分解に伴う蛍光強度

5. Gオリゴマーによって誘導されたサイトカインの熱安定性と透析による分子量推定

アルギン酸オリゴマーがサイトカインを誘導することはこれまでの実験から予測される。次に、これまで見られた毒性が LPS (Lipopolysaccharide) 由来でないことと、ある種のタンパク質性の物質であることを熱安定性と透析によって調べた。

透析は、100 μ l の MNC-CM (G オリゴマー終濃度 ; 1000 μ g/ml) を透析膜に入れ、50 ml の 10% FBC を含む RPMI 1640 培地に対して 4°C にて 24 時間行った。細胞毒性実験は 2.MNC-CM の U937 細胞に対する細胞毒性に従って行った。熱安定性は、100 μ l の同様の MNC-CM を 100°C で 60 分間熱処理した。その後、先程と同様に細胞毒性実験を行った。

6. 抗 TNF- α 抗体による毒性中和実験

単球由来の conditioned medium の毒性物質は、TNF- α である可能性が高い。そこで、TNF- α の抗体を用いた毒性の中和実験を行った。24 穴プレートの各ウェルに抗 TNF- α 抗体 (R&D system 社製) 終濃度 3 μ g/ml、conditioned medium (DP 4、6、8 ; 500 μ g/ml) 10% 加えた。そこに各ウェル 1×10^5 個の U937 細胞を播種し (10% FBC を含む RPMI 1640 培地中)、37°C で 72 時間培養した。72 時間後、細胞をトリパン・ブルー染色を行い、血球計算板にて生細胞 (白色細胞) を測定した。

結果および考察

1. 酵素処理、未処理のアルギン酸から調製した MNC-CM の U937 細胞に対する毒性と毒性物質の性状

PG、PM、G-mix、M-mix (終濃度 1000 $\mu\text{g/ml}$) の U937 細胞に対する毒性実験を行った結果を Fig. 48 に示す。(A) は PG、PM、G-mix、M-mix の作用で得られた MNC-CM の結果である。(B) はポジティブコントロールとして PHA の作用で得られた MNC-CM の結果である。結果からも明らかなように、酵素分解を受けていない PG、PM より得られた MNC-CM は細胞毒性が全く認められなかったのに対して、酵素消化混合物は共に終濃度 1000 $\mu\text{g/ml}$ で強い増殖抑制効果が認められた。これは、ポジティブコントロールの PHA の終濃度 40 $\mu\text{g/ml}$ と同程度であった。この毒性の濃度依存性を調べた結果を Fig. 49 に示す。(A) は G-mix、(B) は M-mix の結果である。濃度依存的に毒性は発現されており、G-mix の方が M-mix よりも強い毒性があるように思われた。また、同濃度の G-mix、M-mix を直接 U937 細胞に作用させた結果が Fig. 50 である。G-mix、M-mix 共に直接的な効果は認められなかった。やはり、ウロン酸オリゴマーそのものに毒性を有するのではなく、白血球に作用し、ある種のサイトカインの放出を誘導する働きがアルギン酸酵素消化産物にはあるものと思われる。

酵素消化混合物 (G-mix) の作用により得られたサイトカインの熱処理、透析を行い、毒性の低下がないか調べた結果を Table 18 に示す。100°C で 60 分間処理 (+ Heat-treated MNC-CM) すると、未処理のもの (+ MNC-CM) と比較して毒性が低下した。一方、透析 (+ Dialyzed MNC-CM) を行ったものは毒性の低下は認められなかった。以上の結果より、ウロン酸オリゴマーを白血球に作用させることで得られるサイトカインは、タンパク質性の物質であることが示唆された。

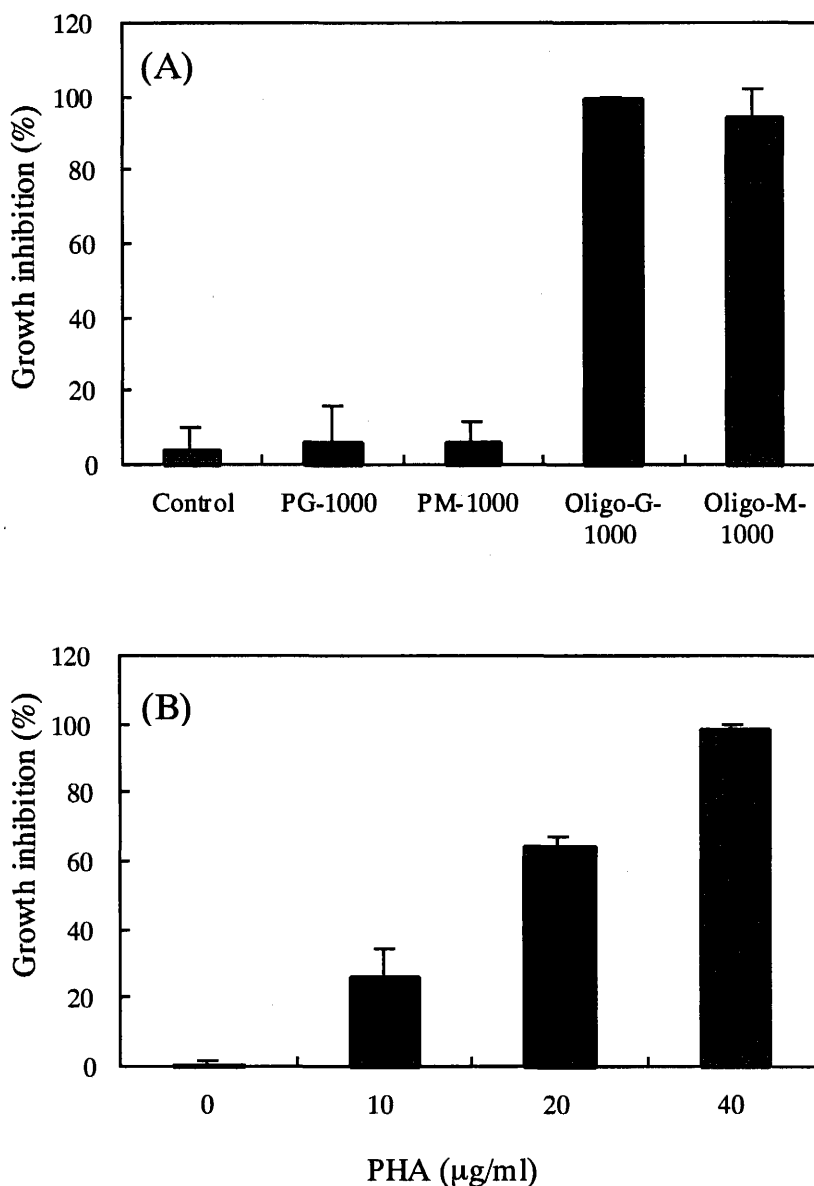


Fig. 48. Effect of MNC-CM Prepared from Mononuclear Cells Cultured with Various Samples on the Growth of U937 Cells.

(A) MNC-CM prepared with 1000 $\mu\text{g/ml}$ of polyguluronate (PG-1000), polymannuromate (PM-1000), depolymerized guluronate oligomers (Oligo-G-1000), and mannuromate oligomers (Oligo-M-1000) or without alginates (control) were added to U937 cells at final 30% in growth medium, and cells were cultured for 3 days. Numbers of viable cells were counted by Trypan blue dye exclusion test. (B) Effects of MNC-CM prepared from mononuclear cells cultured with varying concentrations (0-40 $\mu\text{g/ml}$) of phytohemagglutinin (PHA) of the growth of U937 cells were examined similarly as in (A). Each bar represents S.D.

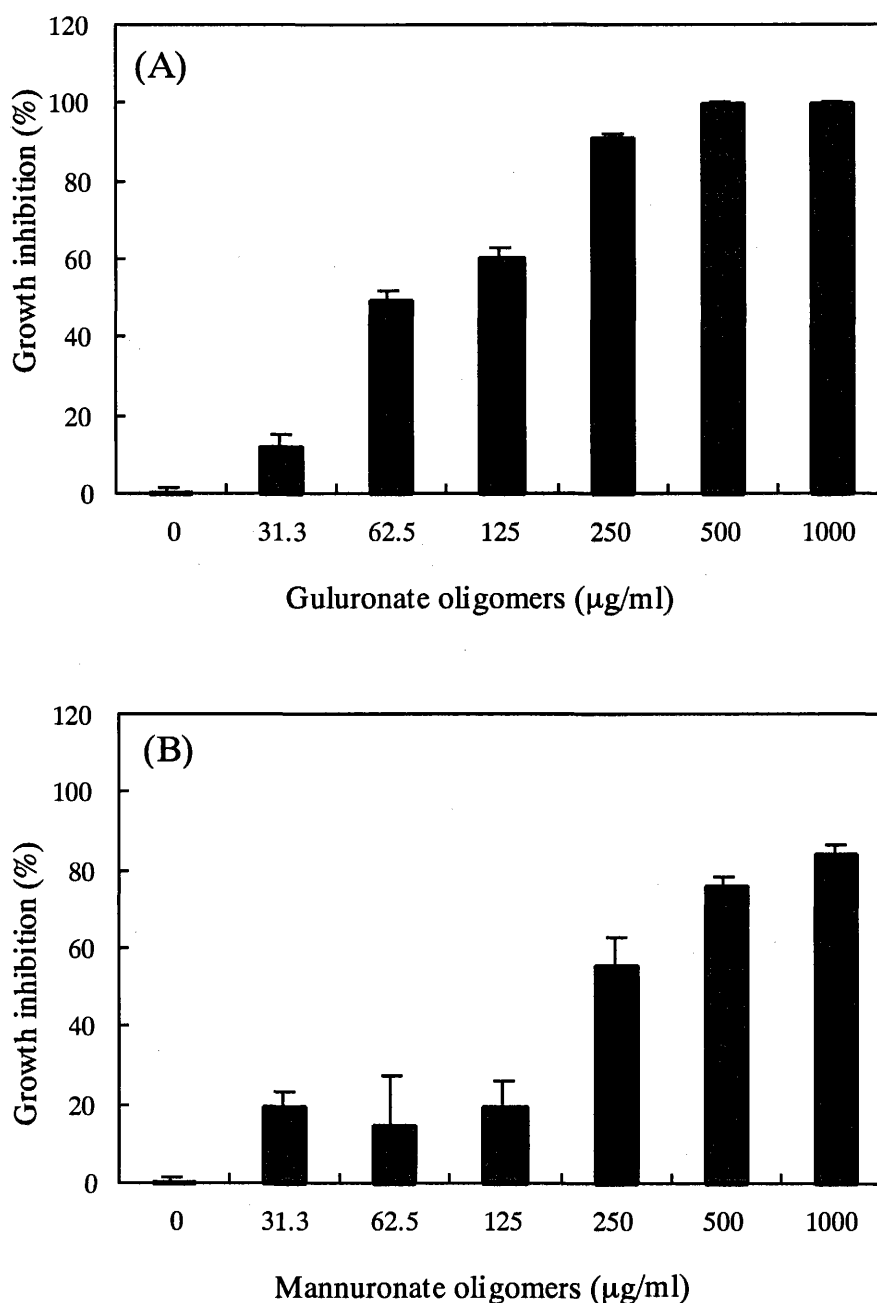


Fig. 49. Effects of MNC-CM Prepared from Mononuclear Cells Cultured with Varying Concentrations of Depolymerized Guluronate Oligomers (A) and Mannuronate Oligomers (B) on the Growth of U937 Cells.

MNC-CM prepared with varying concentrations of depolymerized guluronate oligomers (0-1000 $\mu\text{g/ml}$) or mannuronate oligomers (0-1000 $\mu\text{g/ml}$), depolymerized uronate oligomers (Oligo-G-1000) were added to U937 cells at final 30% in growth medium, and cells were cultured for 3 days. Numbers of viable cells were counted by Trypan blue dye exclusion test. Each bar represents S.D.

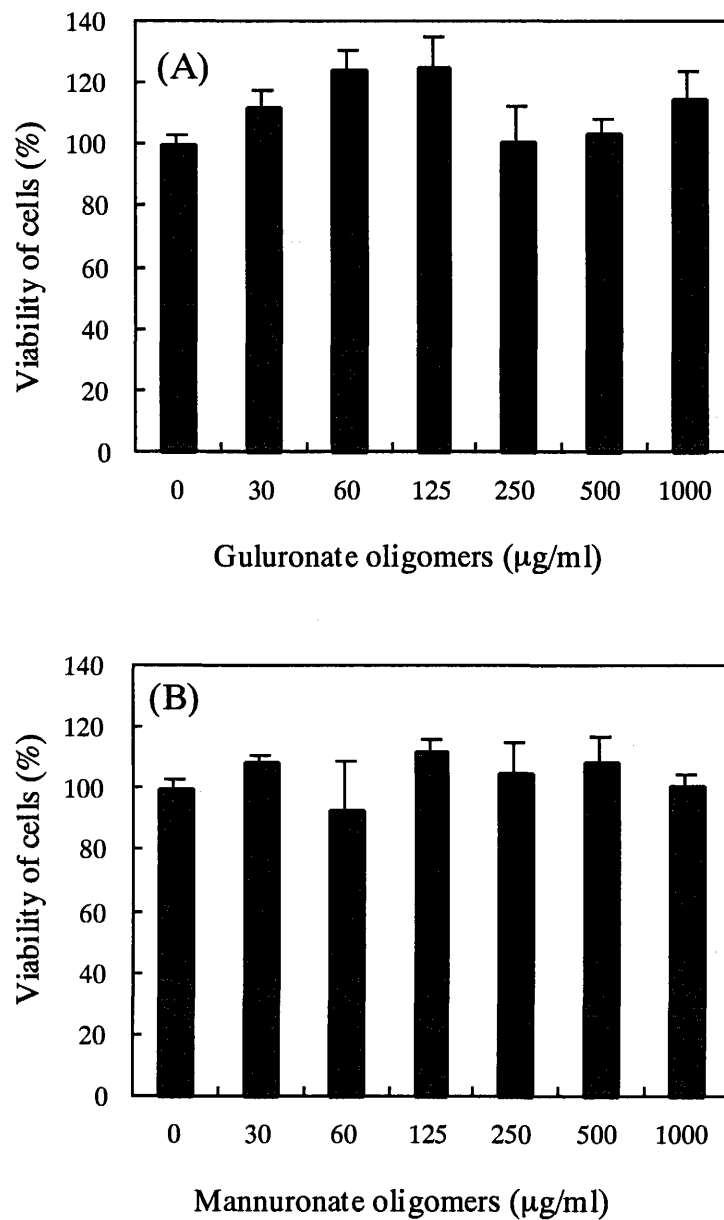


Fig. 50. Effects of Depolymerized Guluronate Oligomers (A) and Mannuronate Oligomers (B) on the Growth of U937 Cells.

Varying concentrations of depolymerized guluronate oligomers (0-1000 µg/ml) or mannuronate oligomers (0-1000 µg/ml) were added to U937 cells in growth medium, and cells were cultured for 3 days. Numbers of viable cells were counted by Trypan blue dye exclusion test. Each bar represents S.D.

Table 18. Effect of Heat-treatment and Dialysis on the Cytotoxicity of MNC-CM Prepared from Mononuclear Cells Cultured with Depolymerized Guluronate Oligomers

One hundred μ l of MNC-CM prepared with depolymerized guluronate oligomers was dialyzed against 50 ml of RPMI 1640 medium containing 10% FBC for 24 h at 4°C, and then examined its effect on the growth of U937 cells as described in the text. For heat stability study, 100 μ l of MNC-CM from same source was incubated for 60 min at 100°C, and then its activity was examined similarly.

	Number of viable cells ($\times 10^4$)
Control without MNC-CM	140.7 \pm 12.9
+ MNC-CM	20.6 \pm 14.1
+ Heat-treated MNC-CM	80.0 \pm 4.3
+ Dialyzed MNC-CM	29.7 \pm 9.0

2. アルギン酸オリゴマーから調製した MNC-CM の U937 細胞に対するアポトーシスによる核の形態変化と caspase-3 様活性

G-mix、M-mix から調製した MNC-CM が U937 細胞に対する毒性は、典型的なアポトーシスであるように思われた。そこで、ヘキスト染色を行い核の形態変化を蛍光顕微鏡にて観察した。結果を Fig. 51(A) に示す。MNC-CM 添加 24 時間後、5~15% の細胞がアポトーシスによる核の形態変化を起こしていた。さらに、caspase-3 様活性の測定を行った。結果を Fig. 51 (B) に示す。G-mix、M-mix から調製した MNC-CM を作用させた U937 細胞において caspase-3 様活性が顕著に増加した。コントロールと比較して G-mix が 5 倍、M-mix が 2.5 倍活性が強かった。

(A)

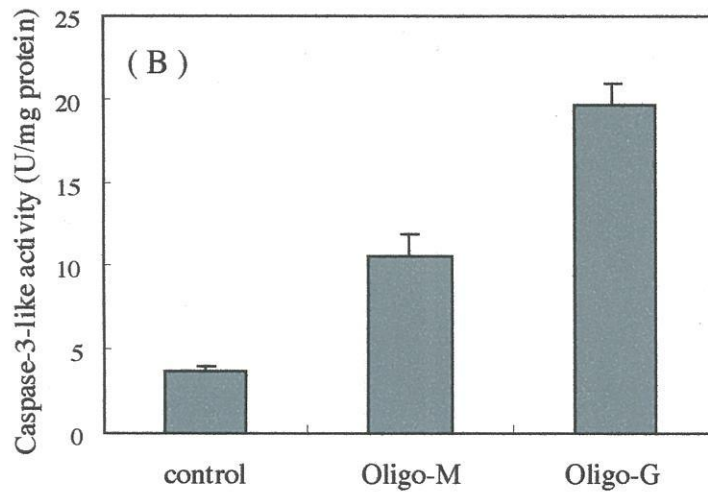
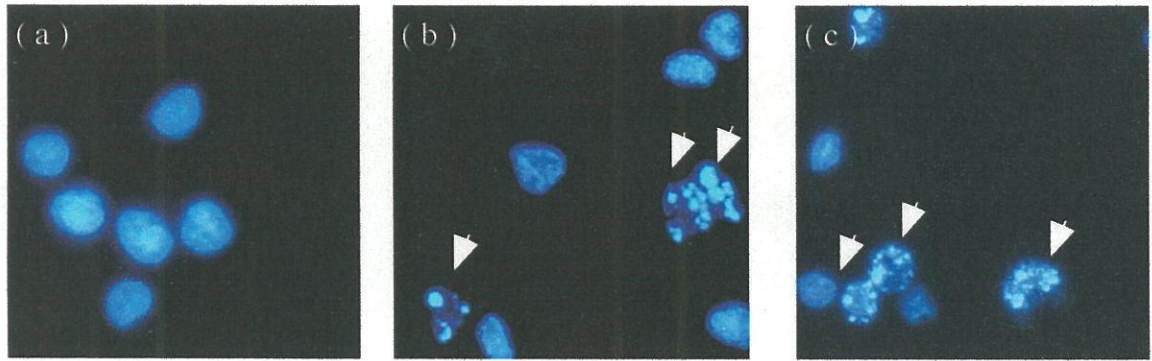


Fig. 51. Apoptotic Changes in U937 Cells Treated with MNC-CM Prepared with Depolymerized Alginate Oligomers.

(A) Cells (5×10^5 cells/ml) in the growth medium were incubated without (a) or with MNC-CM prepared with depolymerized guluronate oligomers (b) or manuronate oligomers (c) for 24 h at 37°C . Then, the cells were fixed with 1% glutaraldehyde, stained with Hoechst 33258 ($40 \mu\text{M}$), and view under a fluorescence microscope. (B) Cells (6×10^5 cells/ml) were incubated similarly as described in (A) for 24 h. Then, caspase-3 like activity in the lysate prepared from each treated cells was measured using the fluorescent substrate Ac-DEVD-MCA as described under Materials and Methods. Each bar represents S.D.

3. 抗 TNF- α 抗体による毒性中和実験

ヒト末梢血より調製した白血球からさらに単球を単離精製した。単球にアルギン酸オリゴマー (G4、G6、M4、M6) を作用させて MNC-CM を調製し、U937 細胞に作用させたところ、これまでと同様な細胞毒性が認められた。単球由来のサイトカインは、TNF- α である可能性が高い。そこで、抗 TNF- α 抗体で細胞毒性の中和が見られるか実験した。結果を Fig. 52 に示す。結果からも明らかのように、抗 TNF- α 抗体 で毒性が中和された。これまでの実験においてアルギン酸オリゴマーが白血球に作用して、誘導させたサイトカインは TNF- α であった。今後さらにサイトカイン誘導機構、誘導量の更なる検討とアルギン酸オリゴマーの重合度依存性の解明が期待される。

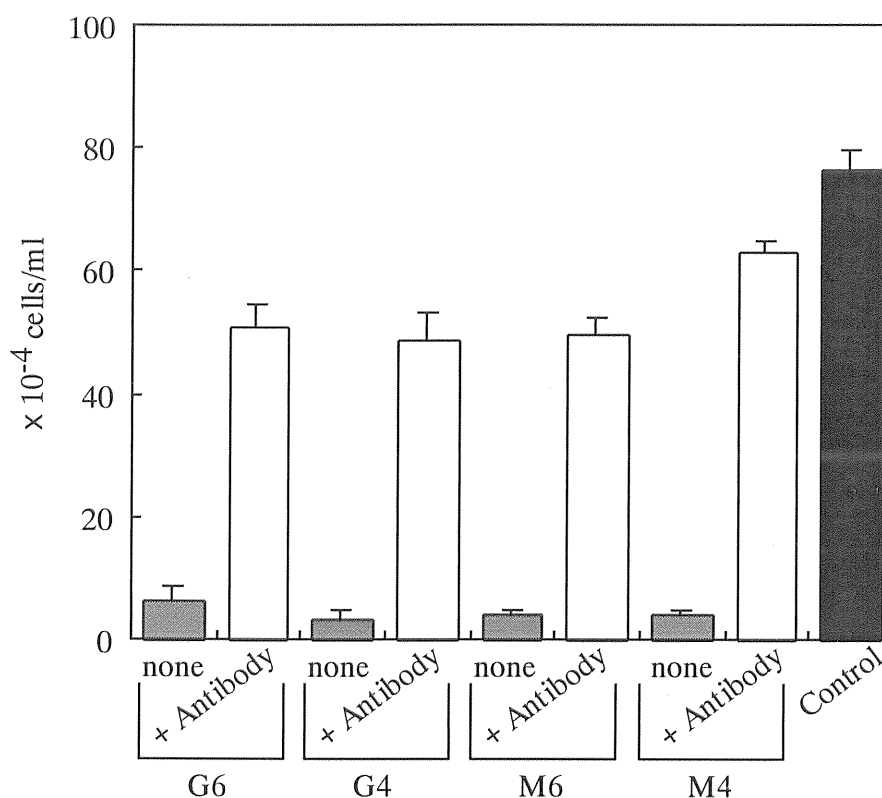


Fig. 52. Effects of Anti TNF- α Antibody on the Cytotoxicity of the MC-CM Prepared with Depolymerized Alginate Oligomer (G6, G4, M6, M4).

The MC-CM prepared with 500 $\mu\text{g/ml}$ of alginate oligomers were pretreatment with anti TNF- α antibody (final 3 $\mu\text{g/ml}$) for 10 min at room temperature and then added to U937 cells at final 10 % (V/V) in growth medium, and cells were cultured for 3 days at 37°C. Numbers of viable cells were counted by Trypan blue dye exclusion. Each bar represents S.D.