

# 海洋深層水はCa/Mg比の増加による 正常ヒト線維芽細胞の石灰化を抑制する

Deep seawater suppresses the calcification of normal human fibroblasts induced  
by the increase in the Ca/Mg ratio

山田勝久<sup>1</sup>・鈴木正宏<sup>1</sup>・野村道康<sup>1</sup>・柴田雄次<sup>2</sup>・今田千秋<sup>2</sup>

Katsuhisa YAMADA<sup>1</sup>, Masahiro SUZUKI<sup>1</sup>, Michiyasu NOMURA<sup>1</sup>, Yuji SHIBATA<sup>2</sup> and Chiaki IMADA<sup>2</sup>

## Abstract

We have previously reported in this journal that the increase of Ca/Mg ratio causes a decrease in cell viability of cultured normal human fibroblasts (NB1 cells), especially in aged cells. In this report, the effect of aging of cells and an increase of Ca/Mg ratio on calcification was investigated. As a result, it was shown that the calcification in NB1 cells was promoted by the increase of Ca/Mg ratio. Furthermore, the calcification advanced significantly with cell aging. Even in these cases, however, it was revealed that the calcification in cells was inhibited by the addition of deep seawater collected at the station of Izu-Akazawa, Japan. Considering these results, the application of deep seawater can be regarded as a promising approach to avoid the calcification of cells, because Ca/Mg ratio has been on the rise with the westernization of the contemporary Japanese diet.

**Key Words:** Calcium, Calcification, Deep seawater, Fibroblast, Magnesium

## 要 旨

我々は正常ヒト由来培養線維芽細胞（以後、NB1細胞）を用いてCa/Mg比に関する研究を行い、その増加が特に老化した細胞の活性を低下させることをすでに本誌で報告した。また本論文ではCa/Mg比の増加がNB1細胞の石灰化を促進し、さらにこの現象は細胞の老化に伴って顕著となることが示唆された。しかしながらこのような場合においても、伊豆赤沢海洋深層水の添加により、NB1細胞の石灰化が抑制されることがわかった。本研究の結果から、食の欧米化に伴いCa/Mg比が増加する傾向にある現代の日本の食餌において、海洋深層水の利用は細胞の石灰化を抑制する点で健康維持上、一つの有用なアプローチになると期待される。

**キーワード：**カルシウム、石灰化、海洋深層水、線維芽細胞、マグネシウム

## 1. 緒 言

1989年、わが国最初の海洋深層水（以後、DSW）が高知県室戸市の陸上設置型施設で取水された。その後各地に陸上設置型のDSW取水施設が建設され、

今日では産業面、雇用面で成功を納めつつある地域も出てきている。地球最後の有望資源として注目されているDSWは、海洋温度差発電や低温利用のみならず、ヒトの健康分野に利用することが大いに期待されている（高橋、2000）。我々はDSWをヒトの

<sup>1</sup> 株式会社ディーエイチシー（〒106-0047 東京都港区南麻布2-8-21 南麻布MICビル7F）

<sup>2</sup> 国立大学法人東京海洋大学 大学院（〒108-8477 東京都港区港南4-5-7）

健康分野に利用するにあたり、DSWに豊富に含まれるミネラル類に着目した。周知のとおり、海水と陸水ではミネラル組成に大きな違いがある。海水は陸水よりもNaを多含するが、より重要な知見として、海水中に豊富に含まれるMg量及びそれに伴う海水と陸水におけるCaとMgの存在バランス（以後、Ca/Mg比）の相違（鷹城，1990）に興味を持たれた。

このCa/Mg比が関与する健康分野での調査研究では、食餌から摂取されるCa/Mg比の増加が虚血性心疾患による死亡リスクを上昇させるというKarpunen *et al.* (1978)の報告が広く知られている。さらにOrimo (1986)は、虚血性心疾患の主因子である動脈硬化のイニシエーターとして、Caが血管組織内に沈着して生じる軟部組織石灰化を指摘している。この軟部組織石灰化の生成機序が次第に詳らになり、加齢とともに活性が上昇するアルカリフォスファターゼ（以後、ALP）の作用が組織の石灰化に大きく影響することがわかってきている（斎藤ら，2008）。今日ではこれらの研究成果を網羅的にまとめた報告（Lee, 2011）もあり、軟部組織石灰化機序に関する基礎的な知見は充実するに至っている。

一方我々は、ヒト皮膚由来の線維芽細胞から樹立されたNB1細胞を用いた研究で、Ca/Mg比の増加が特に老化したNB1細胞の細胞活性を著しく低下させること、ならびにこの条件下においてDSWの添加が細胞活性の低下を抑制することをすでに本誌で報告した（山田ら，2015）。その後の関連文献の調査で知り得た、アポトーシスが石灰化に関与し、特に動脈硬化の初期病変が細胞内小器官、おそらくはミトコンドリア内へのCa沈着に始まるという塩井（2010）の所見、さらにはPeterson *et al.* (1986)の皮膚由来線維芽細胞内のCa量が増加に伴い増加するという報告及び藤岡・横山（2005）の動脈硬化の予防にMgが関与しているという報告等を考慮すると、NB1細胞の老化とCa/Mg比の増加に伴う細胞の石灰化に対してMgを多含する海水の効果が期待される。最近、岡田（2012）はヒト皮膚由来線維芽細胞を用いて石灰化誘導培地による腎臓の全身性石灰化症のメカニズムを調査して報告していることから、我々は継代回数が異なるNB1細胞を用いて細胞の老化と

石灰化との関係について調査するとともに、Ca/Mg比と石灰化との関係についても併せて調査することにした。これに加えて細胞の石灰化が起こる条件下で、石灰化抑制効果が期待されるMgを多含し、さらに近年日本を初め、台湾、韓国といったアジア地域で注目されている海水であるDSWについて、その直上で取水したSSWを比較対照として添加効果を調査した。さらにDSWに含まれる主要ミネラルが細胞の石灰化に及ぼす影響についても検討したので、これらについて報告する。

## 2. 材料と方法

### 2.1 試薬

NaCl（特級，和光純薬），KCl（特級，和光純薬），CaCl<sub>2</sub>（特級，和光純薬），MgCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O（特級，和光純薬），PBS（-）（Ca，Mgを含有しない等張リン酸緩衝液，細胞培養用，日水製薬），イーグルMEM（細胞培養用，日水製薬），3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide（生化学用，ナカライテスク，以後MTT），トリプシン-EDTA（2.5 g/L Trypsin: 1 mM EDTA solution，ナカライテスク），牛胎仔血清（Biological Industries Ltd.，以後FBS），DSW（伊豆赤沢，北緯34°50'19"，東経139°08'11"，深度800 m，2015年3月30日取水），SSW（深度0 m，2015年3月30日取水），石灰化染色キット（コスモバイオ），ヘキサデシルピリジニウムクロロドー水合物（特級，和光純薬），Triton X-100（生化学用，シグマ），ラボアッセイALP（和光純薬），NaCl（特級，和光純薬），KCl（特級，和光純薬）。

### 2.2 細胞及び継代培養

正常ヒト由来培養線維芽細胞（NB1細胞，RGB RCB0222，理化学研究所バイオリソースセンター，以後NB1細胞）を1枚の培養シャーレ（φ90，日本ジェネティック）に播種し，コンフルエント状態まで培養後，トリプシン-EDTAを用いてNB1細胞を剥離させて新しい培養シャーレ2枚に継代し，この操作を重ねて継代回数とした。なおNB1細胞の培養は，すべて37℃，5%CO<sub>2</sub>の条件で行い，細胞の増殖

及び前培養は10%FBS含有イーグルMEM培地を用いた。

### 2.3 石灰化度及び細胞活性

継代数が7, 9, 11及び18回のNB1細胞をそれぞれ培養シャーレ2枚分のNB1細胞を用いて96穴マイクロプレート(培養細胞用, イワキ)に $2 \times 10^4$ 個/穴になるように播種し(この操作で継代数がそれぞれ8, 10, 12及び19回に達した), 2日間の前培養後, ヒトの血清中のCa濃度を参照して細胞試験用培地の組成を構築した。血清中よりもすでに高いCa濃度に設定されている10%FBS含有イーグルMEM (Ca, 3.7 mM; Mg, 0.9 mM; 培地組成表及びFBSの分析結果から算出)は,  $50 \mu\text{L}/\text{穴}$ として希釈して用いることにした。これに評価系中のCa終濃度が新たに2.9 mMとなるように10 mM Ca相当の $\text{CaCl}_2$ 水溶液を $40 \mu\text{L}/\text{穴}$ 加えた。次にCa/Mg比の調整には10 mM Mg相当の $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 水溶液を20または $40 \mu\text{L}/\text{穴}$ 添加( $20 \mu\text{L}/\text{穴}$ の場合は, 精製水 $20 \mu\text{L}/\text{穴}$ を追加)した後, Ca及びMgを含まないPBS(-)を $50 \mu\text{L}/\text{穴}$ 添加して, 最後に精製水を $20 \mu\text{L}/\text{穴}$ 添加して全量 $200 \mu\text{L}/\text{穴}$ として培地を調製した。なおこの培地中のCa及びMgの濃度は, それぞれCa/Mg=1でCa:Mg=2.9 mM:2.9 mMであり, Ca/Mg=2では, Ca:Mg=2.9 mM:1.45 mMである。これらの培地を用いて16時間培養した後, 培地を除去して新しく $50 \mu\text{L}/\text{穴}$ のPBS(-)を加えて2回洗浄した後,  $50 \mu\text{L}/\text{穴}$ の冷メタノールを添加し, 氷冷下, 30分間静置してNB1細胞を固定した。固定後メタノールを除去して,  $50 \mu\text{L}/\text{穴}$ の精製水で2回洗浄した後風乾した。乾燥後, 石灰化染色キットの操作要領に準じて調製した染色液を $50 \mu\text{L}/\text{穴}$ ずつ添加し, 30分間室温条件下で静置して染色した。染色後, 染色液を除去してキット付属の洗浄液を石灰化染色キットの操作要領に準じて調製し,  $50 \mu\text{L}/\text{穴}$ ずつ添加して非特異的に染色された色素を洗浄して除去した。これらの操作でCa沈着部が特異的に染色された96穴プレートを室温で十分乾燥させた後, 鶴見ら(2009)の方法に準じて10% (v/v) ヘキサデシルピリジニウムクロリド水和物水溶液を調製し, こ

の溶液を $50 \mu\text{L}/\text{穴}$ ずつ添加し,  $37^\circ\text{C}$ で1時間色素を抽出した後, 570 nmにおける吸光度(以後,  $\text{OD}_{570}$ )を測定して石灰化度とした( $n=8$ )。またあらかじめ細胞活性残存率の測定用として, 上述の固定操作を施さずに準備しておいた96穴プレートのNB1細胞については, MTT還元法(山田ら, 2007)によりマイクロプレートリーダー(モデル550, バイオラッド)を用いて $\text{OD}_{570}-\text{OD}_{655}$ の値を測定した( $n=8$ )。

### 2.4 DSW添加効果

DSWはCaよりもMgを豊富に含むことに着眼し, DSWによる細胞石灰化抑制効果を確認することにした。試験にあたっては, 培養基として24穴マイクロプレートを用い, Ca/Mg=2の条件で顕著な細胞石灰化が見られた継代回数18回のNB1細胞を $1.2 \times 10^5$ 個/穴になるように播種した(この段階で継代回数は19回)。DSWの石灰化抑制効果については, 24穴マイクロプレートを使用するため培地全量を2.3石灰化度及び細胞活性の方法の $200 \mu\text{L}/\text{穴}$ から $1,000 \mu\text{L}/\text{穴}$ の5倍量となったため, 培地組成の各水溶液もすべて5倍量としたほかは, 2.3の方法に準じて試験を行った。したがって本試験では2.3の方法の精製水 $20 \mu\text{L}/\text{穴}$ の代わりに種々の濃度のDSW水溶液を $100 \mu\text{L}/\text{穴}$ の5倍量を添加して調査した。なお比較対照としてはDSW取水点の直上で採水したSSWを用いた。さらに本試験において石灰化抑制効果を発現しているDSW中の成分を追究するために, 石灰化抑制効果においてSSWとの有意差が認められたDSWの添加濃度におけるNa, K, Mg及びCa濃度をNaCl, KCl,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 及び $\text{CaCl}_2$ の各水溶液で調製し, 2.3の方法の精製水 $20 \mu\text{L}/\text{穴}$ の代わりに $100 \mu\text{L}/\text{穴}$ の5倍量を添加して各ミネラルが石灰化に与える影響を調査した。なお石灰化抑制効果は, 2.3の方法に準じて石灰化度を測定して判定した( $n=4$ )。

### 2.5 ALP活性

播種時の継代回数が20回のNB1細胞を用いたほかは, 2.4の方法に準じて試験を行った。さらに有意な石灰化抑制効果が認められたDSW添加濃度中に

Table 1. Concentration of various mineral elements contained in DSW and SSW of Izu-Akazawa. Asterisk indicates a significant difference between DSW vs. SSW ( $p < 0.05$ , Student's  $t$  test).

Mineral element	Concentration (mM)	
	DSW	SSW
Na	441.3 ± 12.9	394.6 ± 33.7
K	9.6 ± 1.1	8.5 ± 0.8
Mg	50.9 ± 0.9*	45.0 ± 1.5
Ca	9.5 ± 0.7	8.5 ± 0.7

含まれる主要なミネラルであるMg及びCaの影響について検討するために、DSW中の濃度に相当する量の $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 及び $CaCl_2$ を添加し (Table 1), NB1細胞内のALP活性に与える影響を調査した。試験終了後、各評価培地を除去して $50 \mu L$ /穴のPBS (-)でNB1細胞を2回洗浄した。これらの穴に10% (v/v) Triton X-100含有PBS (-)を $0.1 mL$ /穴ずつ添加して $37^\circ C$ で1時間インキュベーションを行った後、これらのNB1細胞の抽出液を試料溶液としてALP活性キットを用いて測定し、1穴当りの活性として算出した ( $n=4$ )。また別に、上述の2.4の操作に準じて細胞活性を測定してALP活性の変化を考察した。

## 2.6 統計処理

得られたデータは、必要に応じて平均値±標準偏差で表した。なお、データ間の有意差は、二群間の有意差ではT検定を、また多重比較の有意差はTukey法によりそれぞれ検定した。

## 3. 結果

### 3.1 石灰化度

8, 10, 12及び19回の継代回数のNB1細胞について、培地中のCa/Mg=1及び2における石灰化度をFig. 1に示す。この図からもわかるように、いずれの継代回数のNB1細胞においても、Ca/Mg比の増加 (Mg量の減少)は石灰化を有意 ( $p < 0.01$ )に促進した。さらに、NB1細胞の継代回数の増加に伴い、石灰化度が顕在化する傾向が見られた。なおCa/Mg比が細胞活性に与える影響については、継代回数が最も少な

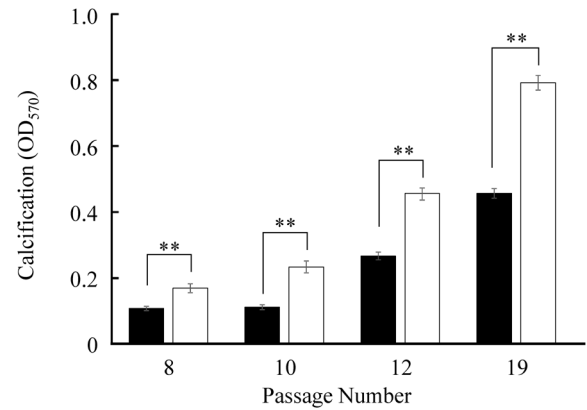


Fig. 1. Influence of Ca/Mg ratios to the calcification in NB1 cells with cell aging, in the case of 2 mM Ca. Calcification was measured by the calcium stain assay kit. ( $n=8$ , Mean±SD, \*\* $p < 0.01$ ) ■, Ca/Mg=1; □, Ca/Mg=2

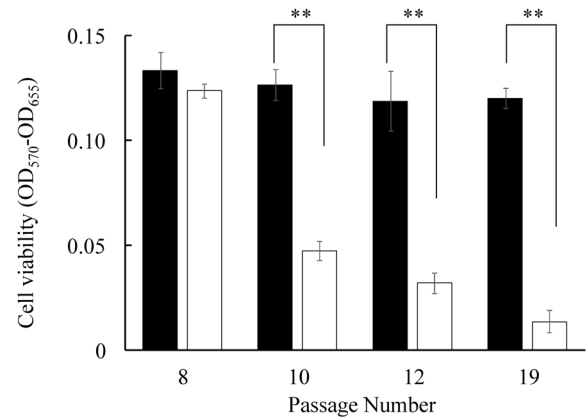


Fig. 2. Influence of Ca/Mg ratios on the cell viability of NB1 cells with cell aging, in the case of 2 mM Ca. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. ( $n=8$ , Mean±SD, \*\* $p < 0.01$ ) ■, Ca/Mg=1; □, Ca/Mg=2

い8回のNB1細胞にはCa/Mg比の増加に呼応した低下は見られなかったが、継代回数が10回以上のNB1細胞では、Ca/Mg比の増加に伴って細胞活性は著減した (Fig. 2)。

### 3.2 DSW添加効果

継代回数が19回のNB1細胞を用いて、Ca/Mg=2の条件下でDSWを添加した場合の石灰化に与える影響を検討した結果、Fig. 3に示すようにDSWには添加濃度に依存した石灰化抑制効果が認められ、2% (v/v)以上の添加濃度で有意な石灰化抑制効果を示した。一方、比較対照であるSSWにも同様に石灰化抑制効果が見られたが、有意な効果 ( $p <$

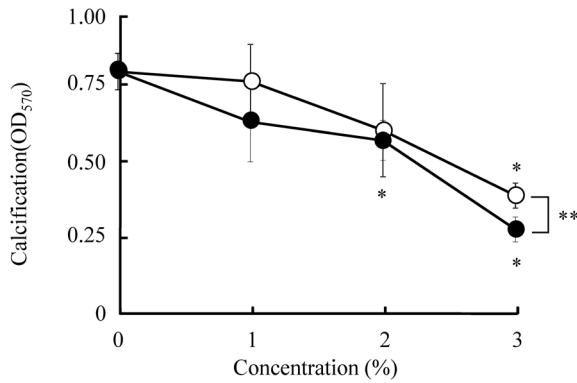


Fig. 3. Comparison of DSW and SSW in the inhibitory effect to the calcification in 19th passage NB1 cells cultured with the medium composed to Ca/Mg=2. Calcification was measured by the calcium stain assay kit ( $n=8$ , Mean $\pm$ SD). Asterisk indicates a significant difference between the following groups: 2% DSW vs. control; 3% DSW vs. control; 3% SSW vs. control ( $p<0.05$ , Tukey's test, ANOVA); 3% DSW vs. 3% SSW ( $p<0.01$ , Student's  $t$  test). ●, DSW; ○, SSW

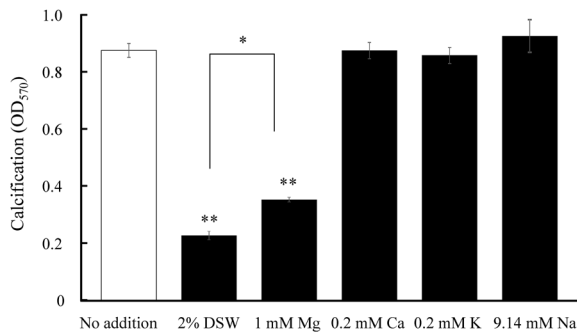


Fig. 4. Supplemental effect of various minerals included in 2% DSW to the calcification on 19th passage NB1 cells cultured with the medium composed to Ca/Mg=2. Calcification was measured by the calcium stain assay kit ( $n=4$ , Mean $\pm$ SD). Two asterisks indicate a significant difference between the following groups: DSW vs. No addition; Mg vs. No addition ( $p<0.01$ , Student's  $t$  test). Single asterisk indicates a significant difference between DSW and Mg ( $p<0.05$ , Student's  $t$  test).

0.05) が出現した添加濃度が3% (v/v)であった。添加濃度が3% (v/v)における石灰化抑制効果をDSW及びSSW間で比較した結果、DSWはSSWに比べて有意に石灰化抑制効果が高いことがわかった ( $p<0.01$ )。次に石灰化抑制効果においてSSWとの有意差を示したDSW中の石灰化抑制因子を探索するために、有意な石灰化抑制効果が認められた2% (v/v) DSW中に含まれる主要なミネラルであるNa, K, Ca,

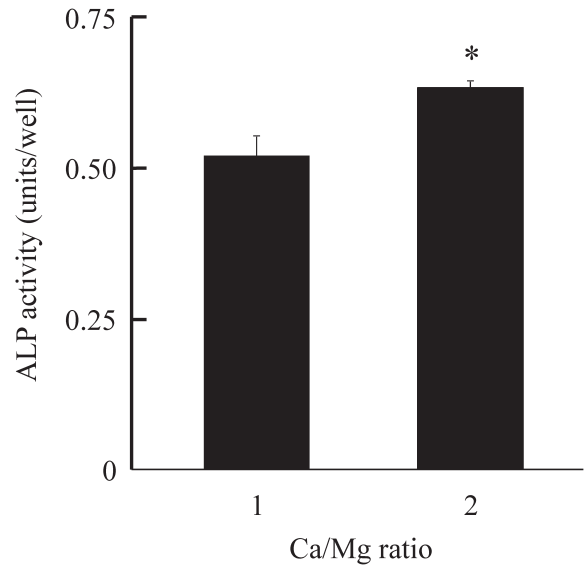


Fig. 5. ALP activity of 20th passage NB1 cells in the case of Ca/Mg=1 and 2. ALP activity was measured by marketed ALP assay kit ( $n=4$ , Mean $\pm$ SD). Asterisk indicates a significant difference between Ca/Mg=1 and 2 ( $p<0.05$ , Student's  $t$  test).

Mgの各相当濃度に調製した水溶液を用いて石灰化抑制効果を調査した結果、Fig. 4に示すようにNa, K及びCaには石灰化抑制効果は全く認められなかったのに対し、Mgには顕著な石灰化抑制効果が認められた ( $p<0.01$ )。しかしながらMgの単独添加では、DSWが示した石灰化抑制効果には及ばなかった ( $p<0.05$ )。

### 3.3 ALP活性

継代回数が20回のNB1細胞を用いて、Ca/Mg比が細胞内のALP活性に与える影響を調査したところ、Ca/Mg比の増加に伴い細胞内のALP活性は有意に ( $p<0.05$ ) 上昇した (Fig. 5)。ALP活性が上昇するCa/Mg=2の条件下でDSWを終濃度として2% (v/v) 添加したNB1細胞のALP活性について調査した結果、DSWには顕著なALP活性の低下効果が認められた (Fig. 6)。さらに、細胞の石灰化に関与するDSW中の主要ミネラルであるMgがALP活性に与える影響について、2% (v/v) DSW中の相当濃度を設定して調査した結果、DSW及びMgのいずれにもALP活性の抑制効果が認められた。しかしながらMgの単独添加では、DSWが示した石灰化抑制効果には及ばなかった (Fig. 6)。

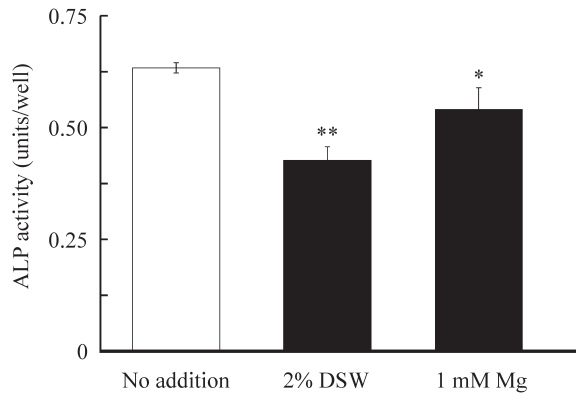


Fig. 6. Supplemental effect of various minerals included in DSW to the ALP activity on 20th passage NB1 cells cultured with the medium composed to Ca/Mg=2. ALP activity was measured by marketed ALP assay kit ( $n=4$ , Mean $\pm$ SD). Two asterisks indicate a significant difference between DSW vs. No addition ( $p<0.01$ , Student's  $t$  test). Asterisk indicates a significant difference between Mg vs. No addition ( $p<0.05$ , Student's  $t$  test).

#### 4. 考 察

本研究では評価培地中のCa濃度が石灰化に大きく影響すると思われたので、まず培地中のCa濃度を設定した。濃度設定にあたっては健康なヒトの血清中のCa濃度 (2-3 mM) を参考にした。我々がNB1細胞の培養に用いている10% (v/v) FBS含有イーグルMEM培地のCa濃度は3.7 mM (Mg濃度は0.9 mM) であり、健康なヒトの上限値を超えていること、またその後の試験において10 mM Ca相当CaCl<sub>2</sub>水溶液や10 mM Mg相当MgCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O水溶液及びDSWをはじめ種々のミネラル水溶液を添加して評価することを考慮し、本研究では評価培地のベースとなる10% (v/v) FBS含有イーグルMEM培地をすべての試験区において50  $\mu$ L/穴 (通常の4倍に希釈) を用いることにした。これに伴いイーグルMEM培地のアミノ酸を初めとする栄養成分も4倍希釈されるので細胞活性の著減が懸念されたが、本評価の培養時間である16時間では、Fig. 2に示すように継代回数が8回のNB1ではCa/Mg比にかかわらず細胞活性は維持された。しかしながら継代回数がより多い10回以上のNB1については、Ca/Mg=1の条件下では細胞活性は維持されたが、Ca/Mg=2では継代回数

の増加に伴って細胞活性が低下する傾向が認められた。これらの現象は、各試験区において培地中のCa濃度が同一であり、また栄養成分の濃度についても希薄ながらも同一の条件であることから、Ca/Mg比 (Mg濃度の多寡) による影響であると思われた。なお本研究における評価培地中のCa終濃度は2.3で述べた方法で2.9 mMに固定し、Ca/Mg=1及び2に調製しているため、Ca/Mg=1の試験区では、Ca : Mg = 2.9 mM : 2.9 mM、Ca/Mg=2の試験区では、Ca : Mg = 2.9 mM : 1.45 mMとMgの濃度を変動させた以外、NB1に対する栄養成分であるFBS及びイーグルMEMの終濃度は同一条件になるようにして、可能な限りCa/Mg比の変化に伴うNB1の細胞活性と石灰化程度の変動を相対的に確認し得る試験系の設定に努力した。Fig. 1に示したようにNB1細胞の石灰化が、継代回数の増加に伴ってその程度が強くなり、加えてCa/Mg比の増加 (Mg量の減少) が石灰化の程度を有意に上昇させた現象は、Fig. 2に示した継代回数の増加と細胞活性の低下現象を考えると、塩井ら (2010) が培養平滑筋細胞を用いた研究で述べている石灰化に先行して細胞のアポトーシスが生じるという現象と類似しており、NB1細胞でも老化やCa/Mg比の増加に伴うアポトーシスが細胞の石灰化を誘導する可能性が示唆された。また継代回数が10回の老化していないと思われるNB1細胞においてもCa/Mg比の増加 (Mg量の減少) が石灰化を促したことは、線維芽細胞が存在する生体の軟部組織における石灰化に対して、年齢にかかわらずCa/Mg比の増加が影響する可能性を示唆したものと考えられ、今後さらなる研究が必要と思われる。なお、Ca/Mg比の増加が血管の恒常性に大きな影響を与えることは今日では周知の事実であるが、本研究の結果から、細胞レベルではあるがMg摂取不足によるCa/Mg比の増加が細胞の石灰化を導く要因となる可能性が示唆された。

一方、Ca/Mg=2で石灰化が促進された条件のNB1細胞に対して、DSW及びSSWを添加することにより添加濃度依存的に石灰化を抑制する傾向が見られたが、DSWとSSWの効果について添加濃度が2% (v/v) 以下では各々石灰化度のばらつきが大き

く両者間に有意差は得られていない。この石灰化度のばらつきは、細胞自身に潜在的に存在する何らかの要因がDSWやSSWに対する感受性として影響しているのかも知れない。この点についてはヒト歯根膜細胞を用いた研究でALP活性と細胞石灰化程度が相関するという報告があるので(鶴見ら, 2009), これを参考にALP活性との相関を考慮して今後さらなる詳細な研究が必要と思われる。次に3% (v/v) の添加濃度においてDSWとSSWの間の有意差が生じた要因を考察するために、Table 1でDSW及びSSW中の主要ミネラル含有量を比較した。DSWとSSW間で主要ミネラルの含有量に有意差 ( $p < 0.05$ ) を認めるのはMgだけであることから、3% (v/v) 添加においてDSWとSSW間に有意な石灰化抑制効果を示した原因成分はMgであろうと推察された。そこでDSW中のMgを初め、Na, K及びCaの合計4種類の主要ミネラルの水溶液を調製し、DSW中の存在濃度に合わせて添加して各ミネラル添加区の石灰化抑制効果について調査した。その結果、Na, K及びCa添加区には、石灰化抑制効果が全く見られなかったが、Mg添加区には顕著な石灰化抑制効果が認められた。この結果からもDSWやSSWに見られた石灰化抑制効果の本質成分がMgである可能性が示唆された。一般にSSWは降雨や陸水の影響を受けて希釈され易いが、本研究の対象となった伊豆赤沢の海洋環境においても海水中に含まれるミネラル量はSSWよりもDSWの方が多傾向が見られる (Table 1)。したがって石灰化抑制効果においてSSWとDSWの間に差異が認められたのはミネラル含有量の差異によるものと推察され、特にMg濃度が大きな要因と思われた。しかしながらDSW中と同濃度に調製したMg溶液添加区の効果は、DSW添加区の効果には及ばなかったことを考えると、Ca/Mg=2におけるNB1細胞の石灰化に対するDSW添加における石灰化抑制効果が、Mg単独によって発現しているものではない可能性が示唆された。木村(2001)は、海水中に存在する多くの微量元素、例えば亜鉛、コバルト、鉛、セレン、銅、金、銀、白金、鉄、クロム、ニッケル、マンガン等は、生体内で多くの相互関係が証明されていると述べており、さらに安井

(2003)は、飲料水中のCa及びMg含有量の低下はAlの体内吸収を助長し、その蓄積を招いて健康を害する可能性があるとして報告しているように、ミネラル間には相互作用が存在するため、培養細胞であっても単独のミネラルによる機能性を論じることは難しいと思われる。したがって本研究においてDSW添加区に見られた石灰化抑制作用についても、Mg以外にもDSW中に含まれる他種のミネラルの関与が推察された。

先述のとおり、血管の石灰化研究で汎用される培養平滑筋細胞において、その石灰化に先行して細胞のアポトーシスやALP活性が上昇する現象が知られている(塩井, 2010)。本研究の結果、NB1細胞でもアポトーシスに先行して見られる細胞活性の低下現象と細胞石灰化程度に高い相関が認められた。またALP活性と継代回数には正の相関が認められ、Ca/Mg比の増加によりALP活性は有意 (Fig. 5,  $p < 0.05$ ) に増加した。すでに我々はNB1細胞において継代回数及びCa/Mg比と細胞活性の間の負の相関を報告しているが(山田ら, 2015)、本研究の結果、Ca/Mg比の増加に伴い石灰化度が上昇したNB1細胞ではALP活性も増加していたことから、培養平滑筋細胞だけでなく培養線維芽細胞においてもALP活性の上昇に伴って石灰化が生じる可能性が示唆された。SSW添加区におけるALP活性のデータはないが、SSWより顕著に石灰化が抑制されたDSW添加区ではALP活性が低下していたことから、石灰化抑制効果は、ALP活性の抑制に起因する可能性が推察された。しかし、DSW中の(もちろん、SSW中でも)主要な石灰化抑制成分と思われるMg添加区のALP活性低下効果は緩慢であり、DSWが示したALP活性抑制効果に及ばなかったことを考慮すると、DSWのALP活性低下効果についても、DSWに含まれる多種多様な微量因子が関与している可能性があると思われた。

本研究の結果、Ca/Mg比の増加がNB1細胞の石灰化を促し、その現象は老化に伴って顕在化する傾向が見られた。またDSWはNB1細胞の石灰化に対して顕著な抑制効果を示した。その主たる作用因子はDSW中のMgであると推察されたが、Mg単独では

石灰化抑制効果がDSWに劣ること、さらにMg単独では石灰化に先行して上昇するALP活性に対する抑制効果が緩慢であることなどから、DSWの石灰化抑制効果はMg単独による作用ではなく、DSW中の他の成分も関与していると考えられた。

最後に、培地中のCa/Mg比の増加に伴う細胞の石灰化現象の抑制にあたり、Mgを多含する海水の応用が考えられた。そこで我々は、海水の中でもSSWに比べて生菌数が少なく無機栄養塩に富み、地球上の様々なミネラルをその存在量の多寡にかかわらず含有しているうえに、安定した水質を保ち、地球最後の資源と注目されているDSW（藤田・高橋、2006）に着目した。ヒトへの利活用を考慮すると海水中に生菌数が少ないというDSWの特徴は衛生面から有益であり、さらにDSWが持つ水質安定性は、海水の恒常的な利活用においては重要な要素である。上述の背景の下、我々は本研究をヒトの健康分野における基盤研究と位置づけて着手した。その結果、DSW及びSSWのどちらにも細胞石灰化抑制効果が認められた。現在の日本では、太平洋側、日本海側の各地で上述の資源的価値を有するDSWが日常的に汲み上げられており、かつ幅広い分野への積極的な利活用が切望されている現状を考慮すると、ヒトへの利活用において海水の中でもDSWは特別な位置づけにあると考えられることから、我々は本研究で得られたDSW添加によるNB1細胞の石灰化抑制効果について、その作用メカニズムの解明とともに、NB1細胞の石灰化研究に関するより好適な培地条件を初めとする実験系の確立等、さらに検討を進めて行く予定である。

## 参考文献

藤岡由夫・横山光宏 (2005) マグネシウムと循環器疾患 マグネシウムと動脈硬化～血管の石灰化を含めて～. *Clin. Calcium*, 15, 221-225.  
 藤田大介・高橋正征 (2006) 海洋深層水利用学. 成山堂書店, 東京, pp. 19-23.  
 Karppanen, H., R. Pennanen and L. Passinen (1978) Miner-

als, coronary heart disease and sudden coronary death. *Adv. Cardiol.*, 25, 259-24.

木村美恵子 (2001) 海のミネラルと健康. 深層海水と健康研究会誌, 1, 39-58.

Lee, D. (2011) Vascular calcification: Inducers and inhibitors. *Mater. Sci. Eng. B.*, 176, 1133-1141.

岡田悦子 (2012) 腎性全身性線維症の石灰化誘導機序について. *Kitakanto Med. J.*, 62, 113-114.

Orimo, H. (1986) Role of Ca in the initiation and progression of atherosclerosis. *Ther. Res.*, 5, 6-14.

Peterson, C. and J. E. Goldman (1986) Alterations in calcium content and biochemical processes in cultured fibroblasts from aged and alzheimer donors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 2758-2762.

斎藤英治・長江慶之・輪千浩史・瀬山義幸 (2008) メンケベルグ型動脈硬化症における細胞外マトリックスの発現変動と骨粗鬆症治療薬の影響. *薬学雑誌*, 128, 385-392.

塩井 淳 (2010) 血管石灰化・リモデリングと糖尿病. *J. Coll. Angiol.*, 50, 561-567.

鷹城一夫 (1990) マグネシウム資源とマグネシウムの製造方法. *素材物性学雑誌*, 3, 97-117.

鶴見亜有子・小林 誠・村山怜一郎・臼井通彦・小出容子・山本松男 (2009) ヒト歯根膜細胞中に存在するアルカリフォスファターゼ陽性細胞と陰性細胞の特徴. *Dent. Med. Res.*, 29, 28-39.

安井昌之 (2003) 水の質と安全性に迫る水とミネラルミネラルの量とバランスの重要性. *食の科学*, 305, 12-23.

山田勝久・今田千秋・土屋孝弘・宮本勝城・辻坊裕・小林武志・濱田(佐藤)奈保子 (2007) 海洋環境より分離された糸状菌培養液の美白素材への応用研究. *日本化粧品技術者会誌*, 41, 254-261.

山田勝久・鈴木正宏・野村道康・柴田雄次・今田千秋 (2015) 種々のカルシウム／マグネシウム比で培養したヒト線維芽細胞の活性と海洋深層水添加効果. *海洋深層水研究*, 15, 99-106.

山田志津香・林 善彦 (2006) 骨が細胞分化と骨形成に関する転写因子とシグナル伝達機構. *生体医工学*. 44, 490-495.

山村辰二 (1995) 培養ヒト歯根膜由来線維芽細胞の石灰化能に対するエストロゲンの作用に関する研究. *広歯誌*, 27, 26-37.

(2016年1月31日受付, 2016年6月14日受理)