

正常ヒト由来線維芽細胞の石灰化に対する電気透析海洋深層水とアルカリフォスファターゼ活性阻害剤の相乗的抑制効果

Synergistic inhibitory effect of electrodyalyzed deep seawater and alkaline phosphatase inhibitors on the calcification of normal human fibroblasts

山田勝久¹・柴田雄次²・山本 樹・野村道康¹

Katsuhisa YAMADA¹, Yuji SHIBATA¹, Tatsuki YAMAMOTO¹ and Michiyasu NOMURA¹

Abstract

Deep seawater (DSW) inhibits the calcification of normal human dermal fibroblasts (NHDF) caused by UVA irradiation. Previously, we reported that the expression of the alkaline phosphatase (ALP) activity of NHDF was induced on the calcification of NHDF caused by UVA irradiation and that DSW suppressed the expression of the ALP activity induced by UVA irradiation. The purpose of this study is to research the relationship between the expression of the calcification and the ALP activity of NHDF induced by UVA irradiation using DSW and two kinds of well-known ALP inhibitors. In this study, electrodyalyzed deep seawater (EDW) was prepared, because its evaluation was better than DSW in the irritation test using SIRC cells from rabbit cornea. First, the effect of EDW on the calcification of NHDF caused by UVA irradiation was investigated. Next, the effect of EDW on ALP activity was investigated. Furthermore, effects of etidronic acid (ETA) and homo arginine (HA), which were well-known as ALP inhibitors, were investigated on the calcification of NHDF caused by UVA irradiation. As a result, it was suggested that the suppressive effect of these inhibitors on the calcification of NHDF caused by UVA irradiation was limited. So, the effect of the use of both EDW and an ALP inhibitor was investigated on the calcification caused by UVA irradiation at the last step in this study. As a result, the addition of both EDW and ALP inhibitors remarkably inhibited the calcification of NHDF caused by UVA irradiation. It was suggested that the addition of both EDW and ALP inhibitors has a synergistic effect on inhibition of the calcification, because this inhibitory effect on the calcification was not able to be explained by the suppressive activity on ALP activity only.

Key Words: ALP inhibitor, calcification, electrodyalyzed deep seawater, fibroblast, synergistic effect

要 旨

海洋深層水 (DSW) は、UVA照射により生じる正常ヒト皮膚由来線維芽細胞 (NHDF) の石灰化を抑制する。以前著者らはUVA照射により生じるNHDFの石灰化において、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の亢進が誘導されることおよびDSWがALP活性の亢進を制御することを報告した。本研究の目的は、DSWおよび2種の周知のALP活性阻害剤を用いて、UVA照射により生じるNHDFの石灰化とALP活性の関係を検討することである。本研究にあたり、ウサギの角膜由来細胞 (SIRC) を用いた刺激性試験において、電気透析された海洋深層水 (EDW) の評価がDSWより良好であったので、EDWを本研究の対象とした。初めに、UVA照射により生じる石灰化に対する影響を検討し、次にALPの活性に対する影響を検討した。別に、ALP活性阻害剤であるSodium etidronate (ETA) およびHomo arginine (HA) のUVA照射により生じる石灰化に対する影響を検討した。その結果、EDWを含むALP活性阻害成分によるUVA照射で生じるNHDFの石灰化抑制効果は、単独では限定的なものであった。そこで最後に、EDWとALP活性抑制剤との同時使用によるUVA照射により生じるNHDFの石灰化に対する作用について検討した。その結果、それらの同時使用はUVA照射により生じるNHDFの石灰化を顕著に抑制した。この結果は、EDWおよびALP活性阻害剤のALP活性阻害効果の和だけでは説明できないことから、これらの同時使用はUVA照射により生じるNHDFの石灰化に対して相乗的な作用を有することが示唆された。

キーワード： ALP活性阻害剤、石灰化、線維芽細胞、相乗効果、電気透析海洋深層水

¹ 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)

1. 緒 言

わが国におけるDSWの利用研究は、1985年に科学技術庁（現文部科学省）のアクアマリン計画「海洋深層水資源の有効利用技術に関する研究」に端を発している。1989年には、わが国初の陸上設置型海洋深層水取水施設が開設されているので、既に30有余年の研究実績を有する。一方著者らは、2007年から静岡県伊東市で取水深度800 mのDSWの取水を開始して、産業利用への活用に向けた研究に着手して今日に至っている。周知のとおりDSWの活用分野は多岐に渡るが、著者らは特に、DSWをヒトの健康産業分野に活用することを目的として研究を続けている。DSWのヒトの健康分野への利用研究では、専ら加工調製したDSW飲料水のヒト臨床研究が多く、生活習慣病である脂質異常症、高血圧症、糖尿病、動脈硬化などに効果あったとの報告がある（山本，2018）。しかしながら、DSW飲料水摂取による各症状の改善における作用機序は未だ明らかにされておらず、検討すべき課題として残されている。その中で著者らは動脈硬化という異所性石灰化に対するDSWの作用に着目している。最近の研究で、動脈硬化の素因でもある軟部組織の石灰化は、DSWにより抑制されることが*in vitro*研究を通してわかってきた（山田ら，2016）。またUVAが照射されたNHDFでも石灰化が誘導されるが、この時生体組織石灰化のマーカーであるALPの活性が亢進する。このUVA照射で誘導されるALP活性の亢進をDSWが抑制することを初めて報告した（山田ら，2017）。これまでの研究から、UVA照射により生じる石灰化でも、動脈石灰化の機序（塩井，2010）と同様に、ALP活性の亢進を伴うことがわかったので、この石灰化現象に対して既存のALP活性阻害剤が抑制作用を発現する期待が持たれた。ALPは骨化制御因子の一つであり、生体内でヒドロキシアパタイトと結合しているピロリン酸がALPによってモノリン酸に分解されると組織の石灰化が進展する（渡辺・宮本，2014）。石灰化の進展は、骨や歯等の硬組織では歓迎されるが、臓器や血管等、本来柔軟性を要求される組織の石灰化は異所性石灰化と呼ばれ

て組織の機能障害を来す。生命に直接影響する疾病の一つである動脈硬化はそうした機能障害を起こした血管であり、その素因となるのが動脈の石灰化である。動脈の中膜には、動脈の健全性維持という重要な責任を担う血管平滑筋細胞（VSMC）が存在するが、動脈の石灰化に伴ってそのALP活性が亢進することから（塩井，2010）、ALP活性と石灰化の間には強い相関があることが知られている。実際に周知のALP活性阻害剤であるエチドロン酸（ETA）誘導体が異所性石灰化に奏功した報告（佐藤ら，2003）もあり、組織の石灰化にALP活性が大きく関与していることに疑いがないが、生体内の石灰化とNHDFへのUVA照射により生じる石灰化には、その機序において若干の相違があることを著者らは報告しており（山田ら，2019）、UVA照射により生じる石灰化とそれにより誘導されるALP活性の関係については、まだ詳細な検討に至っていない。

上述の背景の下、本研究では、UVA照射により生じるNHDFの石灰化とALP活性の関係について検討するために、実際に海洋深層水をヒトに利用することを想定して、細胞に対する刺激性がより低いDSWの電気透析処理水であるEDWおよび周知のALP活性阻害剤を用いて、NHDFへのUVA照射で誘導されるALP活性およびUVA照射により生じる石灰化への影響について検討した。その結果、若干の知見が得られたので本報にて述べる。

2. 材料と方法

2.1 SIRCを用いた刺激性試験

本研究にあたり、将来的に外用使用も考慮して供試水の刺激性試験にはウサギ角膜由来細胞（SIRC, JCRB9122, JCRB細胞バンク）を用いた。SIRCは一般に刺激に対する感度が高く、再現性も良いことから、化粧品安全性試験の眼粘膜刺激性試験代替法にも供されており（岡本，2005）、またわれわれの事前の検討においてNHDFよりも薬剤感受性が高く（データ未提示）、刺激性試験にはより好適であると考えられた。そこで岡本ら（1990）の方法を参考にDSWを電気透析処理装置（ASTOM, 陽極側膜；C66-

Table 1 Composition of elements contained in DSW and EDW in Izu-Akazawa

Elements	Concentration (mg/L)	
	DSW	EDW
Na	9,643 ± 570	554 ± 54**
K	422 ± 15	11 ± 1**
Ca	397 ± 23	245 ± 30*
Mg	1,220 ± 17	1,193 ± 40
B	5.5 ± 0.2	4.9 ± 0.3
Cl	18,332 ± 225	4,042 ± 87**

(n = 3, mean ± SD, *p < 0.05, **p < 0.01, Student's t-test, Asterisks indicate significant differences between DSW and EDW)

10F, 陰極側膜; AMX-SB) により1価の塩類を低減させた海洋深層水であるEDWの細胞刺激性についてDSWと比較した (Table 1). すなわちSIRCを96穴マイクロプレート (培養細胞用, イワキ) に15,000個/穴播種したのち, 10% (v/v) FBS含有イーグルMEM培地 (日水製薬) で1日間前培養 (37°C, 5%CO₂) を行った. 前培養後, 評価試料の含有濃度が20および30% (v/v) となるように10% (v/v) FBS含有イーグルMEM培地を調製し, これに交換してさらに3日間培養 (37°C, 5%CO₂) を行った. その後培地を除去して新たに10% (v/v) FBS含有イーグルMEM培地および80 mg/mlニュートラルレッド (NR, 特級) PBS (-) (日水製薬) を各々100 μl/穴ずつ添加して, 1時間培養 (37°C, 5%CO₂) を行った. 培養後, 培地を除去して1% (v/v) 酢酸 (特級) 含有エタノール (特級) を100 μl/穴添加し, 細胞内に取り込まれたNRを抽出して, マイクロプレートリーダー (MTP-810, コロナ電気) でOD₄₉₂を測定し, 試料無添加区の測定値をNR取込率100として, 試料添加区の測定値を相対値で表わした. 本試験ではNR取込率の低下により刺激性が示唆される. なお, 陽性対照として, 25および50 μg/mlのドデシル硫酸ナトリウム (SDS, 特級) を用いた.

2.2 UVA照射により生じるNHDFの石灰化に対するEDWの作用

NHDF (NB1RGB RCB0222, 理化学研究所バイオリソース研究センター) を1枚の培養シャーレ (φ90, 日本ジェネティックス) に播種し, 10% (v/v) FBS含有α-MEM培地 (ナカライテスク) を用いてコンフ

ルエント状態になるまで常法にて培養した. この状態のNHDFを常法で2枚の培養シャーレに継代した. なお本研究にあたっては, この要領で継代して増殖したNHDFを96穴マイクロプレートに播種して試験に供した.

上述で用意したNHDFを10% (v/v) FBS含有イーグルMEM培地に懸濁した後, 96穴マイクロプレートに20,000個/穴 (100 μl) となるように播種して2日間前培養を行ったのち, 山田ら (2017) の方法に準じてUVA照射試験に供した. UVA照射後に置換する石灰化誘導培地として, 1穴あたり100 μlの10% (v/v) FBS含有イーグルMEM培地, 20 μlの20 mM CaCl₂ (和光), 10 μlの20 mM MgCl₂ · 6H₂O (和光) および25 μlのPBS (-) に終濃度が0.5-2.5% (v/v) になるようにEDWを添加して精製水で全量を200 μl/穴に調整して1日間培養を行ったのち, 鶴見ら (2009) の方法に準じて石灰化の判定を行った. すなわち, UVA照射後1日間石灰化誘導培地で培養したNHDFの培地を除去して50 μl/穴のPBS (-) で1回洗浄したのち, 100 μl/穴の冷メタノール (和光) を添加して30分間 (氷冷下) 静置し, 細胞を固定した. 固定後, 冷メタノールを除去して50 μl/穴の精製水で2回洗浄したのち風乾した. 風乾後に石灰化染色キット (コスモバイオ) 付属の操作要領に従って調製した染色液を50 μl/穴ずつ添加して染色 (37°C, 30分間, 静置) した. 次に染色液を除去してキット付属の洗浄液を用いて無吸着の色素を洗い流す操作を繰り返した. 洗浄後, 室温で十分に乾燥させたのち, 100 μl/穴の10% (v/v) ヘキサデシルピリジニウムクロリド溶液 (和光) を添加して特異的に吸着した色素を抽出 (37°C, 60分間) したのち, OD₅₇₀値を測定した. なおUVA照射後に評価試料の代わりに精製水を用いた他は同様に操作した試料無添加区のOD₅₇₀値を石灰化度1として, 試料添加区の石灰化度を相対値で表わした.

2.3 EDWのALP酵素活性に対する作用

ALP (*E. coli* A19由来, 製造番号318-01531, 富士フィルム和光) を37.5 mUnitsになるように50 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 9.0, 特級) で調製したALP溶液

10 μ lと各濃度に調整した試料溶液20 μ lを混合して5分間プレインキュベーション(37°C)した後、これに20 μ lの0.5 M トリス塩酸緩衝液(pH 9.0)と20 μ lの10 mM *p*-ニトロフェニルリン酸溶液(特級)を混合したのち、100 μ lの4M NaCl(特級)を添加し、精製水で全量170 μ lとした試験用液を添加して混合し、さらに10分間インキュベーション(37°C)を行った。インキュベーション後、0.5 N NaOH 100 μ lを添加して反応を停止し、各反応液を96穴マイクロプレートリーダーに200 μ l/穴ずつ移してOD₄₀₅値を測定した。なお評価試料の代わりに精製水を用いた他は同様に操作した試料無添加区のOD₄₀₅値を100として試料添加区のALP活性を相対値で表した。

2.4 UVA照射により生じるNHDFの石灰化に対するALP活性阻害剤の作用

2.2の要領でNHDFを播種した96穴マイクロプレートを同じく2.2の要領でUVA照射試験に供した。UVAを照射後、2.2で示した石灰化誘導培地のEDWの代わりに、終濃度が0.001-0.1 mMとなるようにETAを、また終濃度が0.1-10.0 mMとなるようにHAを添加して精製水で200 μ l/穴となるように調整して1日間培養を行ったのち、2.2の要領で石灰化の判定を行った。

2.5 UVA照射により生じるNHDFの石灰化に対するEDWとALP活性阻害剤の同時使用による作用

2.2の要領でNHDFを播種した96穴マイクロプレートを2.2の要領でUVA照射試験に供した。UVAを照射後、終濃度として0.5および2.5% (v/v) EDWと0.001 mM ETAおよび1 mM HAの同時使用となるように精製水で全量が200 μ l/穴に調整して1日間培養を行ったのち、2.2の要領で石灰化の判定を行った。

2.6 EDWとALP活性阻害剤の同時使用によるALPの酵素活性に対する影響

2.5でEDWとALP活性阻害剤の同時使用により、UVA照射により生じるNHDFの石灰化抑制における

相乗作用が認められたので、その作用機序を検討するために生体の石灰化において重要なALPの酵素活性に対して、2.3の要領でEDWとALP活性阻害剤の同時使用による影響を検討した。なお評価にあたり、各試料の濃度は相乗的な石灰化抑制作用を呈した濃度である2.5% (v/v) EDW, 0.001 mM ETAおよび1 mM HAを設定した。

2.7 UVA照射したNHDFのALP活性に対するEDWおよびALP活性阻害剤の作用

UVA照射されたNHDFのALP活性について、2.2の方法に準じてUVAを照射した後、各試料を添加して5時間培養したNHDFのALP活性を山田ら(2017)の方法に準じて測定した。すなわち培地を除去して50 μ l/穴のPBS(-)でNHDFを2回洗浄した。これらの穴に10% (v/v) Triton X-100含有PBS(-)を50 μ l/穴ずつ添加して4°Cで1時間インキュベーションを行って得られた細胞溶解液のALP活性について、市販キット(ALP活性キット, 和光純薬)を用いて測定した($n=6$)。また同じ上清の蛋白量について市販キット(DCプロテインアッセイ, バイオラッド)を用いて測定し、蛋白量あたりの比活性として補正した。UVA照射によるALP活性の変化については、未照射の細胞内ALP比活性を1.0とし、UVA照射5時間後のALP活性の変化を相対値として表した。一方試料添加による影響については、同じくUVA照射5時間後の試料無添加区(Control)のALP活性を100として、各試料の添加による変化を相対値で表した。

2.8 統計処理

得られたデータは、平均値 \pm 標準偏差で表わした。なお、2群間のデータの有意差はStudent's *t*-testにより検定した。また多群間のデータの有意差はTukey test (ANOVA)により検定した。

3. 結 果

3.1 SIRCを用いたEDWの刺激性試験

SIRC細胞を用いてEDWの刺激性をDSWと比較し

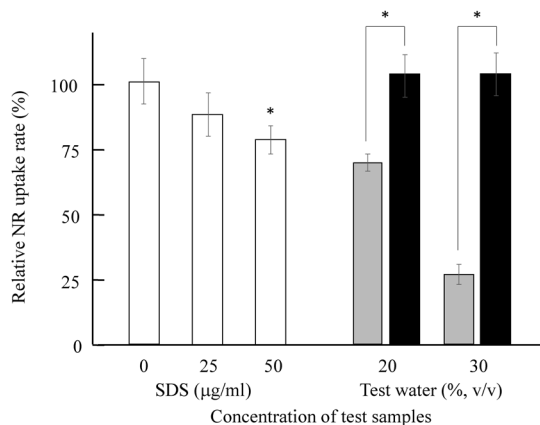


Fig. 1 Comparison of NR uptake rate between DSW vs. EDW as the irritation test using SIRC ($n=8$, mean \pm SD). Left panel: An asterisk indicates a significant difference between 50 μ g/ml SDS and control ($*p<0.05$, Steel-Dwss test, ANOVA). Right panel: Asterisks indicate significant differences between DSW and EDW at the concentrations of 20 and 30%, respectively ($*p<0.05$, Student's t -test); SDS, \square ; DSW, \blacksquare ; EDW, \blacksquare .

た結果, Fig. 1に示すとおりEDWは評価濃度が30% (v/v)でもNRの取り込み量は低下しなかった. また20および30% (v/v)の同濃度におけるNR取り込み量の比較では, EDWはDSWと比べて有意に高値 ($p<0.05$)を示した.

3.2 UVA照射により生じるNHDFの石灰化に対するEDWの作用

UVA照射により生じるNHDFの石灰化をDSWが抑制することは既にわかっていたが(山田ら, 2017), EDWの作用はわかっていなかったので本研究で初めて検討した. その結果, EDWは0.5-2.5% (v/v)に渡るすべての評価濃度において, UVA照射により生じるNHDFの石灰化を抑制する傾向が見られたが, 有意な効果は確認できなかった(Fig. 2).

3.3 EDWのALP酵素活性に対する作用

3.2でUVA照射により生じるNHDFの石灰化抑制傾向が認められたEDWについて, 細胞の石灰化において重要な酵素であるALPの活性に対する作用を2.2で述べた*E. coli*由来のALP酵素を用いて検討した. その結果, 0.5% (v/v)の濃度でもALP活性を

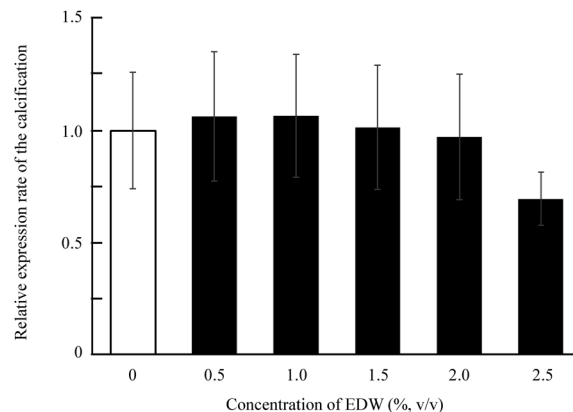


Fig. 2 Supplementation effect of EDW on the calcification of NHDF caused by UVA irradiation ($n=6$, mean \pm SD).

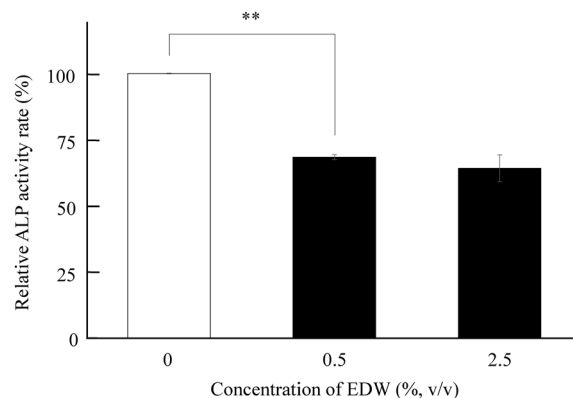


Fig. 3 Effect of EDW on ALP activity ($n=3$, mean \pm SD). Asterisks indicate a significant difference between 0.5% EDW and control (** $p<0.01$, Student's t -test).

有意 ($p<0.01$)に阻害することがわかった(Fig. 3).

3.4 UVA照射により生じるNHDFの石灰化に対するALP活性阻害剤の作用

ALP活性阻害剤であるETAおよびHAについて, UVA照射により生じるNHDFの石灰化に対する作用について検討した. その結果, ETAは0.001 mMという低い評価濃度でも有意な石灰化抑制作用 ($p<0.05$)が認められたが, 用量依存的な効果はみられなかった(Fig. 4). 一方, HAは0.1 mMおよび1 mMという評価濃度ではその作用は認められず, 10 mMの評価濃度で有意な石灰化抑制作用 ($p<0.05$)が認められた(Fig. 5).

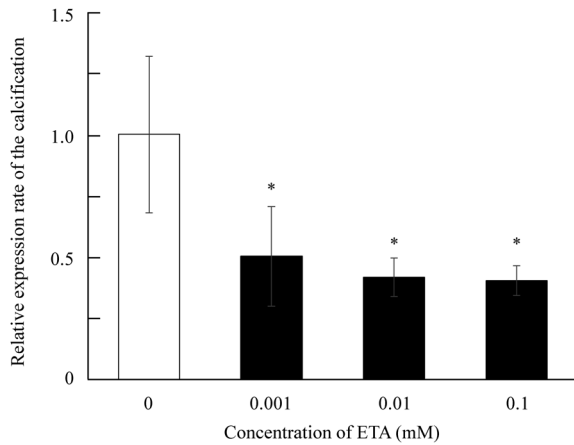


Fig. 4 Supplementation effect of ETA on the calcification of NHDF caused by UVA irradiation ($n=8$, mean \pm SD). Asterisks indicate significant differences between the following groups: 0.001 mM ETA vs. control; 0.01 mM ETA vs. control; 0.1 mM ETA vs. control ($*p<0.05$, Tukey test, ANOVA).

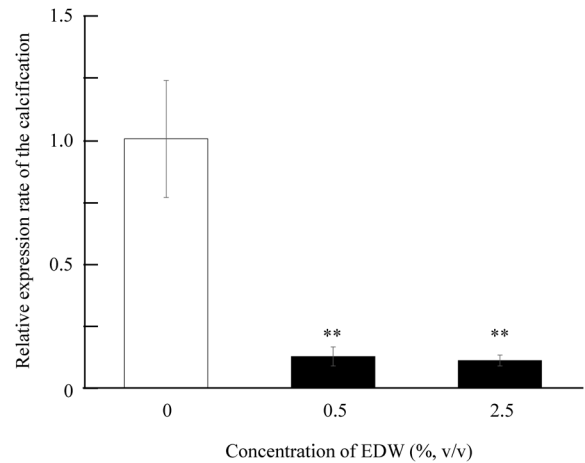


Fig. 6 Effect of the using of both EDW and 0.001 mM ETA on the calcification of NHDF caused by UVA irradiation ($n=8$, mean \pm SD). Double asterisks indicate significant differences between the following groups: 0.5% EDW+0.001 mM ETA vs. control, 2.5% EDW+0.001 mM ETA vs. control ($**p<0.01$, Tukey test, ANOVA).

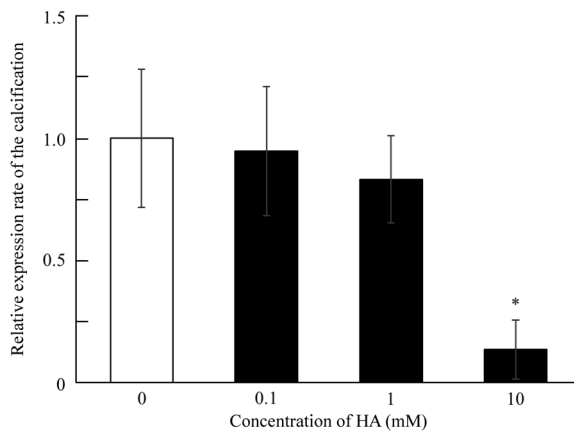


Fig. 5 Supplementation effect of HA on the calcification of NHDF caused by UVA irradiation ($n=8$, mean \pm SD). An asterisk indicates a significant difference between 10 mM HA and control ($*p<0.05$, Tukey test, ANOVA).

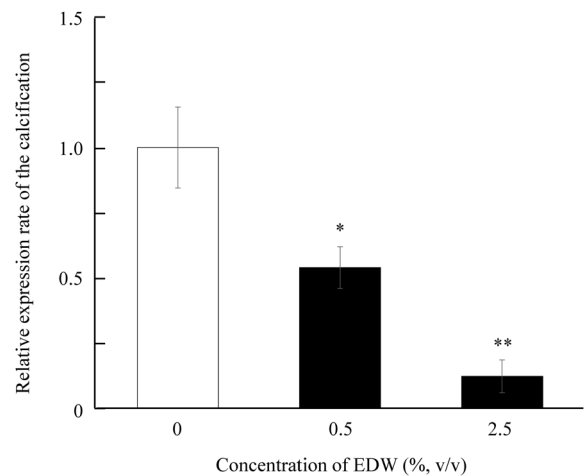


Fig. 7 Effect of the using of both EDW and 1 mM HA on the calcification of NHDF caused by UVA irradiation ($n=8$, mean \pm SD). An asterisk indicates a significant difference between 0.5% EDW+1 mM HA and control ($p<0.05$, Tukey test, ANOVA). A double asterisk indicates a significant difference between 2.5% EDW+1 mM HA and control ($**p<0.01$, Tukey test, ANOVA).

3.5 UVA照射により生じるNHDFの石灰化に対するEDWとALP活性阻害剤の同時使用による作用

UVA照射により生じるNHDFの石灰化に対するEDWとETAおよびHAとの同時使用による作用を検討した。その結果、単独でも有意な石灰化抑制作用 ($p<0.05$) を呈した評価濃度である0.001 mMのETAと、逆に単独では石灰化を抑制しなかった0.5% (v/v) EDWを同時使用したところ、Fig. 6に示

すとおりの顕著な ($p<0.01$) 石灰化抑制作用が発見した。また単独では石灰化を抑制しなかった1 mMという評価濃度のHAと0.5および2.5% (v/v) EDWとの同時使用でも有意な ($p<0.05$) 石灰化抑制作用が認められた (Fig. 7)。

3.6 ALPの酵素活性自身に対するEDWとALP活性阻害剤の同時使用による作用

細胞石灰化の鍵となる酵素であるALPの酵素活性自身に対するEDWとETAとの同時使用による作用について検討した。その結果、2.2で述べた*E. coli*由来のALP酵素の活性に対して2.5% (v/v) EDWと0.001 mM ETAの同時使用は、各々単独使用に比べて有意な作用亢進は認められなかった (Fig. 8)。また2.5% (v/v) EDWと1 mM HAとの同時使用による作用についても検討したが、ETAの場合と同様に、

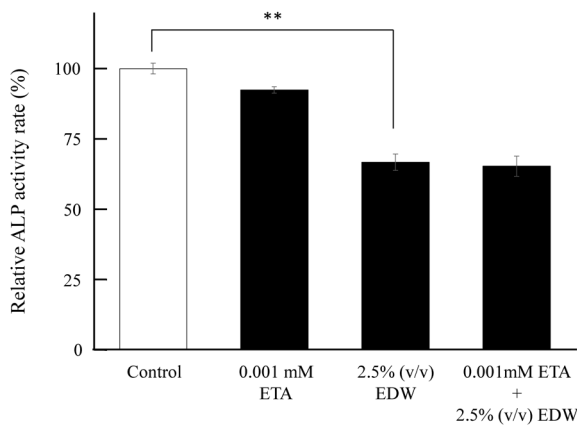


Fig. 8 Comparison of suppressive effect on ALP activity between the following groups: 0.001 mM ETA vs. 2.5% EDW vs. the using of both 0.001 mM ETA +2.5% EDW vs. control ($n=3$, mean \pm SD). A double asterisk indicates a significant difference between 2.5% EDW and control (** $p<0.01$, Tukey test, ANOVA).

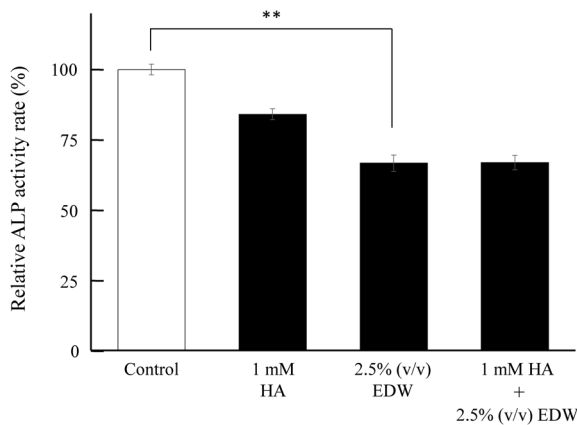


Fig. 9 Comparison of suppressive effect on ALP activity between the following groups: 1 mM HA vs. 2.5% EDW vs. the using of both 1 mM HA +2.5% EDW vs. control ($n=3$, mean \pm SD). A double asterisk indicates a significant difference between 2.5% EDW and control (** $p<0.01$, Tukey test, ANOVA).

各々単独使用に比べて有意な作用亢進は認められなかった (Fig. 9).

3.7 UVA照射したNHDFのALP活性に対するEDWおよびALP活性阻害剤の作用

UVA照射後に5時間培養したNHDFのALP活性は顕著に ($p<0.01$) 上昇した (Fig. 10)。これに対してUVA照射で生じる石灰化に対する抑制作用が見られた0.5% (v/v) EDWおよびALP活性阻害剤の0.001 mM ETAや1 mM HAの単独添加は、NHDFのALP活性を顕著に ($p<0.01$) 抑制したが (Fig. 11)、これらを同時に使用してもALP活性抑制効果につ

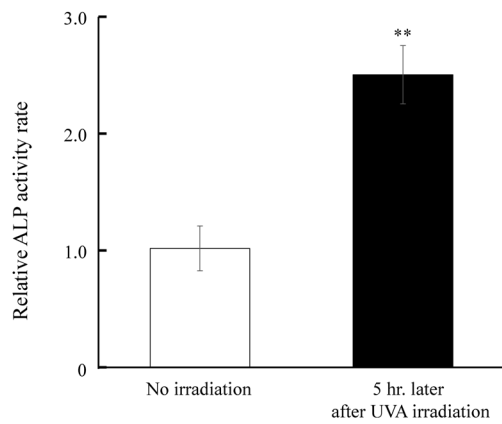


Fig. 10 Increasing ALP activity of NHDF irradiated by UVA. A double asterisk indicates a significant difference between UVA irradiation and no irradiation ($n=6$, mean \pm SD, ** $p<0.01$, Student's *t*-test).

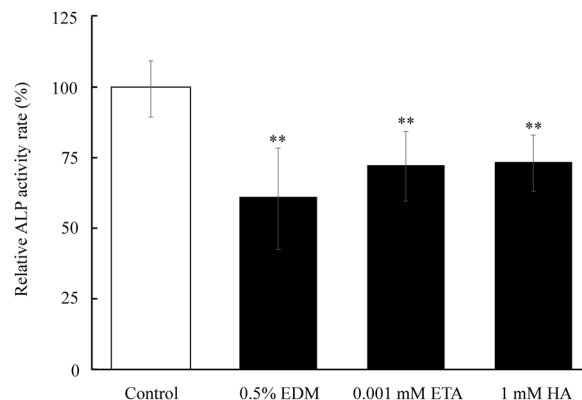


Fig. 11 Supplementation effect of ALP inhibitors on ALP activity of NHDF irradiated by UVA. Double asterisks indicate significant differences between the following groups (0.5% EDW vs. control; 0.001 mM ETA vs. control; 1 mM HA vs. control). ($n=6$, mean \pm SD, ** $p<0.01$, Tukey test, ANOVA)

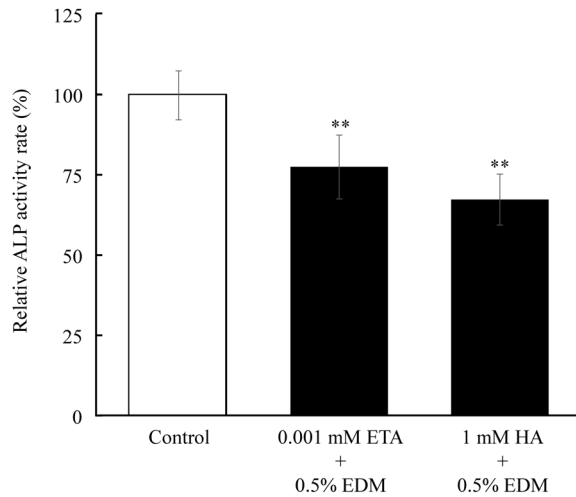


Fig. 12 Supplementation effect of combined ALP inhibitors on ALP activity of NHDF irradiated by UVA. Double asterisks indicate significant differences between the following groups (0.5% EDW+0.0001 mM ETA vs. control; 0.5% EDW+1 mM HA vs. control). ($n=6$, Mean \pm SD, ** $p<0.01$, Tukey test, ANOVA)

いては石灰化抑制効果で見られたような相乗的な作用は認められなかった (Fig. 12).

4. 考 察

動脈の石灰化において、動脈組織の構成成分の生産を担う VSMC の ALP 活性が亢進することが知られている (塩井, 2010)。この ALP 活性の亢進は、生体内で Ca^{2+} をキレートして可溶化しているピロリン酸のリン酸エステルを分解してモノリン酸化し、ヒドロキシアパタイトの遊離を促す。生成したヒドロキシアパタイトは生体の石灰化の基盤的成分であることは周知のとおりである。著者らは UVA 照射により NHDF に石灰化が生じること、この石灰化に対して DSW が抑制作用を有していることを見出し、さらにこの NHDF の石灰化現象に伴い ALP 活性が亢進するが、DSW はこの ALP 活性の亢進に対しても抑制することを併せて見出した (山田ら, 2017)。上述の知見から著者らは、UVA 照射により生じる NHDF の石灰化には、ALP 活性の亢進を伴うことから、既存の ALP 活性阻害剤が UVA 照射により生じる NHDF の石灰化に対する作用について関心を寄せるとともに、この石灰化を抑制する DSW の機序と

して ALP 活性に対する作用にも関心を寄せた。そこで本研究では、ALP 活性の阻害が UVA 照射により生じる NHDF の石灰化に及ぼす影響について検討することにした。既存の ALP 活性阻害剤として、動脈をはじめとした生体の軟部組織石灰化の治療薬であり、ALP の拮抗阻害剤である ETA および ALP の不拮抗阻害剤として知られる非必須アミノ酸である HA (鈴木, 2016) の阻害形式が異なる 2 種類の ALP 活性阻害剤を用いて、UVA 照射により生じる石灰化に対する作用を検討した。その結果、ETA および HA のいずれにも石灰化を抑制する作用が確認された。ETA は 0.001 mM という低い評価濃度で石灰化抑制作用が認められたが、用量依存的な効果はみられなかった。また HA は 10 mM という高い評価濃度でなければ石灰化抑制作用が発現しない等、UVA 照射により生じる石灰化に対する ALP 活性阻害剤の石灰化抑制効果は限定的であることが示唆された。一方 EDW については、本研究で設定した 0.5–2.5% (v/v) の全ての評価濃度において、有意な石灰化抑制作用はみられなかった。このことから UVA 照射により生じる NHDF の石灰化に対する EDW の抑制作用は、以前著者らが確認している DSW の作用 (山田ら, 2017) に比べて劣ることがわかった。Louvet ら (2013) は、ヒト由来 VSMC を用いた研究で、 Mg^{2+} が高リン酸培地により誘導される細胞の石灰化を抑制したと報告している。また Oca ら (2014) は、 Mg^{2+} が VSMC の骨芽細胞への転換を抑制したと報告している。これらの報告は、いずれも Mg^{2+} による VSMC の石灰化抑制に Mg^{2+} が関与することを示唆したものであるが、本研究に供した EDW は、DSW とほぼ同濃度の Mg を含有しているにもかかわらず (Table 1)、石灰化抑制効果に差異が見られたのは、EDW は DSW の電気透析処理による含有成分組成の変化に起因すると推察された。即ち、DSW の石灰化抑制効果はそれに含まれる Mg^{2+} と電気透析処理で減じられる他の物質との相乗的な作用が可能性の一つとして考えられる。本研究を通して EDW の石灰化抑制作用は DSW に比べて劣ると思われたが、EDW の細胞に対する刺激性が DSW に比べて非常に低いことがわかったので、ヒトへの利

用を考慮して引き続きEDWの検討を継続した。上述の生体組織の石灰化において重要となるALPの酵素活性自身に対するEDWの直接的な作用を検討したところ、0.5% (v/v) で活性阻害傾向がみられたが、用量依存的な作用ではなかった (Fig. 3)。そこで本研究のEDWとALP活性阻害剤を同時に供与したところ、ALPの酵素活性に対して顕著な抑制効果を示さない濃度 (Figs. 8, 9) でも、UVA照射により生じるNHDFの石灰化に対する有意な ($p < 0.05$) 抑制効果が確認された (Figs. 6, 7)。またUV照射により上昇するNHDFのALP活性に対して (Fig. 10), EDWをはじめALP活性阻害剤は、細胞内ALP活性を有意に ($p < 0.01$) 抑制したが、これらの同時使用による細胞内ALP活性の抑制効果は各々単独供与の場合に比べてほとんど変化は見られなかったことから (Figs. 11, 12), これらの同時使用による明瞭な石灰化抑制機序の説明としては未だ不十分であると思われた。従ってALP活性抑制剤をはじめ、EDWが有するALPに対する活性阻害作用は、UVA照射により生じるNHDFの石灰化に対して抑制的に働くものの、その作用は限定的であると思われた。

本研究の結果から、UVA照射により生じるNHDFの石灰化に対して、ALP活性阻害は限定的な抑制効果に留まり、明瞭な石灰化抑制には至らないこと、そして各々単独では明瞭な石灰化抑制作用を有さないEDWとETAおよびHAでも、これらを同時に使用することにより、明瞭な石灰化抑制作用が発現したことから、EDWとALP活性阻害剤の同時使用による相乗効果の発現が推察された。なおこの相乗効果の機序として、EDWとALP活性阻害剤によるALP活性抑制効果の和だけでは説明が難しいと思われた (Figs. 8, 9, 12)。従ってUVA照射により生じるNHDFの石灰化に対するEDWとALP活性阻害剤の同時使用による抑制効果は、ALP活性阻害作用とは異なる別の機序に起因する可能性が推察されたので、今後著者らは、UVA照射により生じるNHDFの石灰化機序とその制御機構について、さらに詳細な検討を計画している。

参考文献

- Louvet, L., J. Büchel, S. Steppan, J. Passlick-Deetjen and Z. A. Massy (2013) Magnesium prevents phosphate induced calcification in human aortic vascular smooth cells, *Nephrol. Dial. Transpl.*, 28, 869-878.
- Oca, A. M., F. Guerrero, J. M. Martinez-Moreno, J. A. Madueño, C. Herencia, A. Peralta and Y. Almaden (2014) Magnesium inhibits Wnt/ β -catenin activity and reverses the osteogenic transformation of vascular smooth muscle cells, *PLOS ONE*, 9, e89525.
- 岡本裕子 (2005) 局所刺激性試験代替法の開発と応用, *日薬理誌*, 125, 350-357.
- 岡本裕子・神崎紀子・田中宣征 (1990) 眼刺激性試験の代替法の研究—溶血法と培養細胞を用いた方法の比較検討—溶血法と培養細胞を用いた方法の比較検討—, *粧技誌*, 23, 272-279.
- 佐藤朱美・田中好子・浅野美和子・内田啓子・久保和雄・大坪由里子・網代晶子・岩田晶子・斎藤まどか・秋葉 隆 (2003) エチドロン酸二ナトリウム (EHDP) が奏功した巨大な異所性石灰化の2透析例, *透析会誌*, 36, 1725-1730.
- 塩井 淳 (2010) 血管石灰化・リモデリングと糖尿病, *管脈学*, 50, 561-567.
- 鈴木邦明 (2016) アルカリ性ホスファターゼという酵素と硬組織形成, *北海道歯誌*, 37, 2-10.
- 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, *Dental Med Res.*, 29, 28-39.
- 厚生省薬務局審査課監修 (1996) 化粧品・医薬部外品製造申請ガイドブック, 薬事日報社, 東京, 引用ページ.
- 山田勝久・鈴木正宏・野村道康・柴田雄次・今田千秋 (2016). 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, *海深研*, 17, 1-8.
- 山田勝久・柴田雄次・野村道康・今田千秋 (2017) UVA照射により誘導される正常ヒト線維芽細胞の石灰化に対する海洋深層水の抑制効果, *海深研*, 18, 1-7.
- 山田勝久・柴田雄次・山本 樹・野村道康・今田千秋 (2019) 培養ヒト皮膚由来線維芽細胞の石灰化に対するUVAの影響, *香粧会誌*, 43, 303-308.
- 山本 樹・山田勝久・鈴木信孝・許鳳浩・高橋正征 (2018). 海洋深層水の未病・予防医学分野における展望, *日補完代替医療会誌*, 15(2), 67-77.
- 渡辺隆一・宮本健史 (2014) 生体内の石灰化機構, *日腎会誌*, 56, 1196-1200
- (2021年6月23日受付; 2021年8月16日受理)