

# Ca/Mg 比の増加に伴う正常ヒト皮膚由来線維芽細胞の石灰化と海洋深層水の添加効果

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

(<sup>1)</sup> 株式会社ディーエイチシー, (<sup>2)</sup> 東京海洋大学)

## 1. 目的

海洋深層水（以後、DSW）のヒトの健康分野への利用にあたり、そこに含まれるミネラル類の特徴（Ca/Mg 含有比が陸水と逆転していることやヒトの血漿中の組成に近似していること）については、非常に興味を持たれるところである。しかし、その摂取意義に関する研究報告が少ないのが現状である。そこで我々は、昨年の本大会で正常ヒト皮膚由来培養線維芽細胞（以後、NB1 細胞）を用いて Ca/Mg 比の増加が細胞の活性を顕著に低下させること、さらに DSW はこの現象を軽減することを報告した<sup>1)</sup>。また Karppanen らの報告<sup>2)</sup>で周知となった Ca/Mg 摂取比と虚血性心疾患発症リスクの相関の背景には、老化に伴う動脈硬化（メンケベルグ型動脈硬化）が潜んでいることが今日ではわかっている。一般に動脈硬化は血管の石灰化を伴っており、その発症機序に関しては既に血管由来の培養細胞を用いた多くの研究がなされ、現在では老化した細胞が石灰化に至るメカニズムについて詳細に解明されている<sup>3)</sup>。一方、血管由来細胞と同様に老化する皮膚細胞における石灰化の知見は見当たらない。そこで今回は Ca/Mg 比の増加および DSW の添加が、NB1 細胞の石灰化に与える影響について調査することを目的とした。

## 2. 方法

各継代数の NB1 細胞を 96 穴マイクロプレートに  $2 \times 10^4$  個/穴となるように播種して 2 日間前培養を行った。前培養後、培地を交換し、CaCl<sub>2</sub>（試薬特級）で Ca 濃度が 2 mM になるように調製した後、MgCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O（試薬特級）で Ca/Mg 添加比が 0, 1 および 2 となるように培地を調製した後、各濃度の DSW を添加して 1 日間培養した。次に DSW 中の主要なミネラル成

分である Mg に着目し、石灰化抑制効果が認められた DSW 濃度中の Mg 量と同濃度に相当する MgCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O を用いて効果を比較した。なお細胞の石灰化度は、アリザレンレッド S のカルシウム特異的結合反応に基づく市販のキット（Calcified nodule stein kit, コスモバイオ）を用いて染色した後、各穴に 3% (v/v) 酢酸含有 50% (v/v) エタノールを 100  $\mu$ l ずつ添加して色素を抽出し、マイクロプレートリーダー（OD<sub>450</sub>, Bio Rad）を用いて測定した。

## 3. 結果および考察

NB1 細胞において、老化（継代数の増加）が石灰化に深く関係することが示唆された。また細胞の継代数にかかわらず、Ca/Mg 比の増加は石灰化を誘導した。さらに石灰化が誘導される Ca/Mg = 2 の条件下で DSW を添加した結果、添加濃度依存的に石灰化が抑制された。DSW の石灰化抑制効果の本質を究明するにあたり、我々は DSW 中の主要なミネラルである Mg に着目した。DSW 添加で有意な石灰化抑制効果が認められた 1% (v/v) DSW 中の Mg 濃度に相当する 2mM Mg を細胞に供した結果、Mg にも顕著な石灰化抑制効果が確認されたが、DSW の効果には及ばなかった。このことから DSW 中には Mg 以外にも石灰化抑制成分が存在することが推察された。

今後は NB1 細胞の石灰化機序をはじめ、DSW 中の石灰化抑制成分についても詳細に研究を進めたいと考えている。

1) 山田ら (2015) **海深研**, 15, 99-106.

2) Karppanen *et al* (1978) *Adv. Cardiol.*, **25**, 9-24.

3) 塩井 (2010) *J. Jpn. Coll. Angiol.*, **50**, 561-567.