

ビタミンCの謎：ビタミンCの細胞死と活性酸素の抑制効果による関係

The mystery of vitamin C: relationship between cell death of vitamin C and inhibitory effect of active oxygen

叶 晨陽

指導教員：佐藤 拓己

東京工科大学 バイオ情報メディア研究科 バイオニクス専攻 アンチエイジングフード研究室

キーワード：アスコルビン酸、活性酸素量、細胞死、 H_2O_2

1. 背景 目的

ビタミンC(アスコルビン酸)は抗酸化剤と言われるが、その存在は未だに謎にみている。本実験では、アスコルビン酸(AA)によって細胞死と活性酸素量の相関関係を検証した。アスコルビン酸 $1\mu M$ 、 $3\mu M$ 、 $10\mu M$ 、 $30\mu M$ 、 $100\mu M$ の濃度で実験を行った。活性酸素量は蛍光色素のDCFで定量し、spark10Mマイクロプレートリーダーで計測した。細胞死はMTTで染色し、分光光度計で吸光度を測り、細胞の死亡率を計算した。

アスコルビン酸は抗酸化剤として用いられる。エンジオール基を持つ、酸化剤の作用より、プロトン 2 個放出してデヒドロアスコルビン酸に変わる。高濃度のアスコルビン酸(AA)は抗酸化剤であるが、高濃度のAAはがん細胞に強い毒性がある。ガン治療は高濃度のAA点滴がある。AAの高濃度点滴とは、日常で摂取できない濃度のAAを直接血管に点滴で投与すること。

今まで高濃度のAAの作用については明瞭したが、血中濃度より遥かに低い濃度のAAと血中濃度付近濃度のAA作用はまだ明らかになっていない。このため、本実験では血中濃度より遥かに低い濃度のAAに活性酸素と細胞死の抑制効果があるのか検討した。

2. 実験方法

2.1 活性酸素量の測定

24well プレートに細胞をまき、 CO_2 インキュベーターに一時間定着する。培養液を吸い取り、各well

に培養液とDCFを入れ、AとCはPBS緩衝液を入れる。BとDはアスコルビン酸を入れる。Spark10Mに準備した H_2O_2 、PBS、24wellプレートをセットして、吸光度測定する。30分からSpark10MはAとBにPBSを添加し、CとDに H_2O_2 を添加する。spark10Mマイクロプレートリーダーで180分を測定する。測定をしたら、excelでデータを処理する。

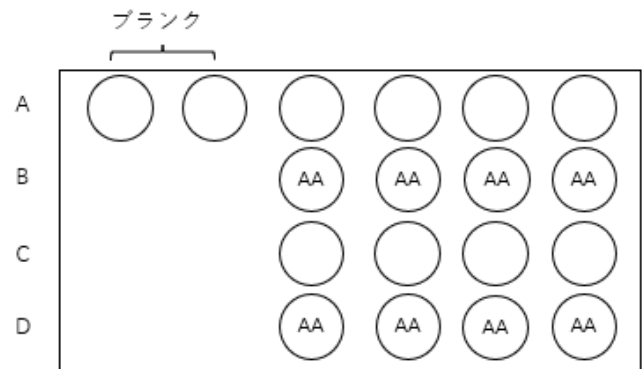


図1 24well プレート

2.2 細胞死の測定

24well プレートに細胞をまき、左側12個wellにPBS緩衝液を入れる。右側12個wellにアスコルビン酸溶液を入れる。A、B、C、Dに $0\mu M$ 、 $20\mu M$ 、 $50\mu M$ 、 $100\mu M$ の H_2O_2 を添加する。 CO_2 インキュベーターに24時間培養する。

二日目は培養液を吸い取り、 $0.5mL$ のMTT溶液を入れ、 CO_2 インキュベーターに2時間培養する。 $1mL$ のMTT buffersを各wellに添加する、 CO_2 インキュベーターに24時間培養する。

三日目は各wellをピペットマンでピペッティングする、吸光度測定wellに分注する。吸光度計

に吸光度測定し、excel でデータを処理する。

3. 結果と考察

アスコルビン酸 1 μ M、3 μ M、10 μ M、30 μ M、100 μ Mの濃度には活性酸素を抑制した、ベースラインさえ抑制効果があった。AA は活性酸素の量を抑制するにも、細胞死の抑制効果は全く見られなかった。

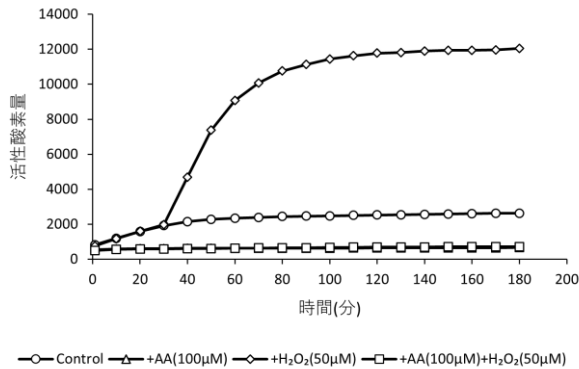


図2 アスコルビン酸 100 μ Mの活性酸素に対する効果

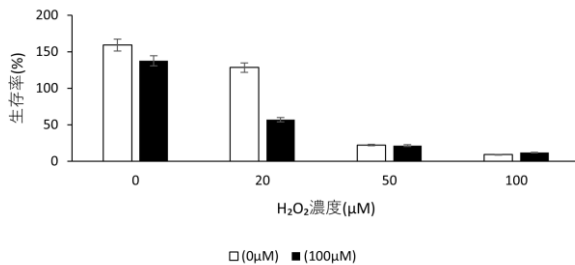


図3 アスコルビン酸 100 μ Mの活性酸素に対する効果

図2から見ると、100 μ Mのアスコルビン酸は活性酸素量をベースライン以下に抑制したが、細胞の生存率は予想通りになっていなかった。逆に細胞死を促進効果があると考えられる。

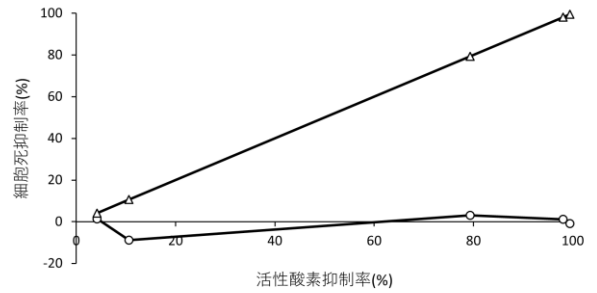


図4 細胞死抑制と活性酸素量抑制の相関図
図4から見ると、上の線は想定している細胞死抑制と活性酸素量抑制の相関関係ですが、実際の結果は下の線になっている。

アスコルビン酸 1 μ M、3 μ M、10 μ M、30 μ M、100 μ Mの濃度には活性酸素を抑制した、特に30 μ M、100 μ Mはほぼ100%の活性酸素量を抑制した。しかも、細胞の生存率は全然伸びていなかった、むしろ細胞死を促進している。

4. 今後の展望

今後はアスコルビン酸以外の試薬を使って、細胞死と活性酸素量の機序を解明するよう研究を進める。

本提案では細胞レベルで老化を防ぐ、言い換えるとアンチエイジングを期待している。