

原 著

ω3多価不飽和脂肪酸の胃粘膜上皮細胞修復に与える影響

獨協医科大学越谷病院 消化器内科

高田 博信 高橋 盛男 高田 洋 桑山 肇

医学総合研究所

相馬 良一

要 旨 魚脂に含まれるω3多価不飽和脂肪酸 (ω3 polyunsaturated fatty acid : ω3 PUFA) であるイコサペンタ酸エチル (eicosapentaenoic acid : EPA) は潰瘍性大腸炎などに対して臨床効果があると報告されている。一方, EPAは胃潰瘍の予防に対して有効であるという *in vivo* の報告もある。そこで今回我々は胃上皮細胞の培養系を用いて上皮細胞の修復に対するEPAの影響を検討した。胃粘膜上皮細胞はラット正常胃粘膜より分離した細胞株であるRGM-1を用いた。Prostaglandin (PG) は細胞上清をELISA法にて測定した。細胞数はWST-8法により測定した。細胞障害は上清のLDHを測定することにより評価した。上皮細胞の修復は、単層培養細胞にスクレーパーを用いて上皮細胞に円形欠損を作成し、時間をおいて欠損面積を測定して、速く欠損面積が減少したものを修復促進と評価した。EPAをω6多価不飽和脂肪酸 (ω6 polyunsaturated fatty acid : ω6 PUFA) のみを含む培養液に添加すると、上皮細胞修復は濃度依存的に促進した。EPAは、PGE₂の遊離を抑制した。EPAを添加しても生存細胞の数や障害に影響は認められなかった。以上の成績より、ω6 PUFAであるリノール酸のみで、ω3PUFAが存在しない培養液では、上皮修復に不利でありω3PUFAであるEPAを補うことにより修復は回復すると結論された。

Key Words : ω3多価不飽和脂肪酸, eicosapentaenoic acid, 胃潰瘍, 修復

諸 言

胃潰瘍形成における *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) の関与は様々な証拠により確立された。しかし、*H. pylori* 感染者の大多数に潰瘍形成がないのも事実である。*H. pylori* 感染に加え何らかの因子が関与している可能性が高い。その中で重要な候補である食事性因子の影響に関する知見は数少ない。人類の長い歴史の中で現代人の食事は大きく変貌してきている。近年、脂肪酸摂取量は増加し特に動物性脂肪摂取量は著しく増加している¹⁾。動物の肉には飽和脂肪酸、植物油では一般にω6多価不飽和脂肪酸 (ω6 polyunsaturated fatty acid, 以下ω6)、魚介類ではω3多価不飽和脂肪酸 (ω3 polyunsaturated fatty acid, 以下ω3) の比率が高く、こうした摂取する脂肪酸のバランスの違いが人体に影響することが知られ

ている²⁾。米国において、この約130年間にω3 : ω6は2 : 3から1 : 10と大きく変化している³⁾。相対的にω3の摂取量が大幅に減少している。日本においてはその変化は劇的で、この変化はわずか40年ぐらいの間に起きている¹⁾。人体は必要な脂肪酸の大部分を合成できるが、ω3とω6は合成できない。またそれぞれは、同じ系列の脂肪酸を合成することはできるが、他系列の脂肪酸への転換はできない。したがってω3、ω6の両者を食事より摂取しなくてはならない。これらの脂肪酸は体内でエネルギーとなるほか、一部の脂肪酸はリン脂質に取り込まれ細胞膜の構成成分や脳などの神経組織の生理的活性物質の源として利用される。従って、食物のω3とω6の割合が体内の細胞膜の構成成分を左右する。実際我々の培養細胞を用いた検討によれば、ω3の比率の高い培養液で培養した細胞の構成成分はω3の含有比率が高く、ω6の場合も同様であった⁴⁾。さらにω3、ω6はプロスタグランディン (prostaglandin : PG) 等のエイコサノイドの基質となる。ω3はPGE₃などになり、ω6はPGE₂などになる。この系は互いに独立しており、摂取された不飽和脂肪酸に著しく偏りがある場合に、生体

平成16年6月14日受付, 平成16年8月31日受理
別刷請求先: 高田博信

〒343-8555 埼玉県越谷市南越谷2-1-50
獨協医科大学越谷病院 消化器内科

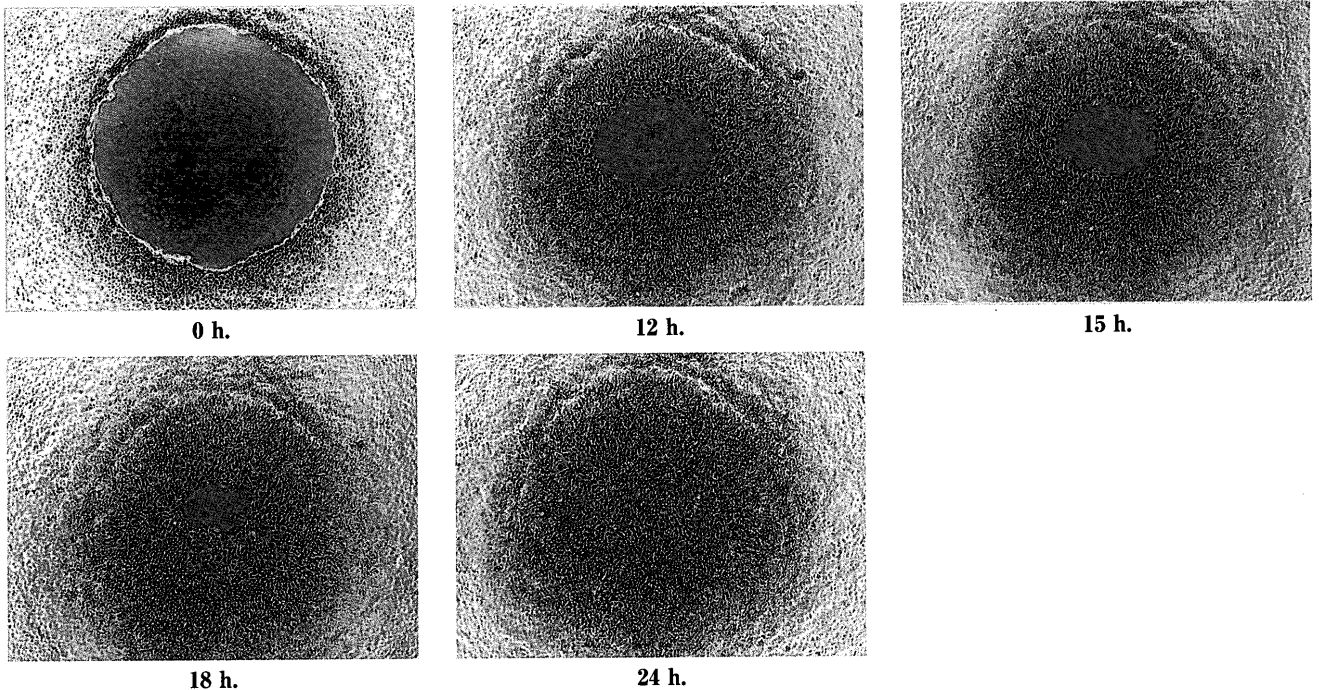


図1 円形欠損作成直後，12時間後，15時間後，18時間後，24時間後と時間をおって上皮を位相差顕微鏡により40倍の拡大率でデジタルカメラを用いて撮影した。時間の経過に伴い欠損部分が修復された。

内で産生されるエイコサノイドの割合が変わる可能性がある。グリーンランドにおける疫学調査によりイヌイット人には心筋梗塞や血栓性疾患が欧米白人に比べて非常に少ないことが報告されている⁵⁾。さらにイヌイット人には関節リウマチ，乾癬，潰瘍性大腸炎などの慢性炎症性疾患も少ないことが報告されている⁶⁾。伝統的な生活をしているイヌイット人は魚やアザラシなどの海洋動物を多く摂取しており，これらの中には²⁾イコサペンタ酸エチル (eicosapentaenoic acid : EPA) やドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acids : DHA) などの ω 3が多く含まれる。これら疫学研究に引き続いて， ω 3の投与が疾患に与える影響を確認するために多くの臨床研究がなされた。全身性エリテマトーデス，潰瘍性大腸炎，クローン病などにEPAまたはDHAを持続的に投与すると病状が改善または再燃の抑制することが示された^{7~9)}。 ω 3の臨床的有効性の機序については抗血小板作用，血清脂質改善作用，動脈の弾力性保持作用，さらに抗炎症作用（トロンボキサン A_2 ， PGE_2 ，インターロイキンIなどのメディエーター産生の抑制），免疫調節作用などが報告されている^{10~12)}。潰瘍予防に対するEPAの影響については有効に働く^{13,14)}，逆に増悪に働くとの相反する報告¹⁵⁾がなされている。我々は以前より培養細胞の円形欠損モデルを用いて細胞修復を検証してきた¹⁶⁾。そこで今回このモデルを用い， ω 6の摂取が多い現代食生活と同様の状況を想定し， ω 6のみを含む培養液と，そ

こに ω 3を加えた培養液の細胞修復と細胞損傷に及ぼす影響を検討した。

方 法

1. 胃粘膜上皮細胞

正常ラット胃粘膜上皮細胞株である，RGM-1¹⁷⁾を用いた。RGM-1は培養液（Ham's F12/10% FBS）を用い培養プレートにまき，37℃のCO₂インキュベーター中で単層を形成するまで48時間培養した。

2. 修復の評価

細胞の修復は，円形欠損モデルを用いて評価した¹⁶⁾。つまりコンフルエントの単層培養細胞に特注のスクレーパーを用いて径約1 mmの円形欠損を作成した。これを経時的に位相差顕微鏡により40倍の拡大率でデジタルカメラを用いて撮影した。撮影された写真の円形欠損部分をAdobe Photoshop (Adobe Systems)で抽出しデジタルデータとした。こちらのデータを米国NIH (National Institute of Health)よりパブリックドメインとして供給されている画像解析ソフトであるNIH Imageで面積を測定した。円形欠損作成直後の面積を100%とし，それぞれの時間においてコントロールと比較して欠損面積が有意に減少したものを統計学的に修復促進と評価した (図1)。

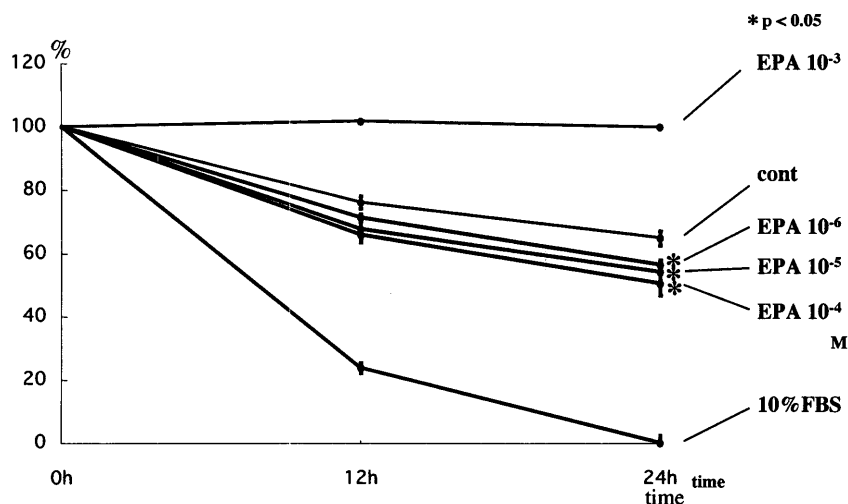


図2 ω 3多価不飽和脂肪酸欠乏状態の培養液にEPAを添加すると濃度依存的に胃粘膜上皮細胞の修復が促進した。(* : $p < 0.05$)

3. 培養液

培養液はHam's F12 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.) を用いた。この培養液の脂肪酸組成は ω 6であるリノール酸のみである。これに2%の濃度でFBS (Sigma) を添加した。

4. 添加脂肪酸

添加脂肪酸は ω 3であるEPA (Sigma) を用いた。ヒトの生体でEPAを1800 mg/日内服している場合の血清EPA濃度は 3×10^{-4} Mであると報告¹⁸⁾があるが、今回我々は円形欠損作成直後にHam's F12/2% FBSにEPAを 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} Mの濃度で投与した。またコントロールはEPAを添加しないHam's F12/2% FBSのみとした。

5. Prostaglandin (PG) の測定

PGは円形欠損作成24時間後、Prostaglandin E2 EIA Kit-Monoclonal (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI.) を用い、説明書に添って培養細胞上清のPGE₂を測定した。

6. LDHの測定

胃上皮細胞破壊に対するEPA投与の影響を検討するためLDHを測定した。円形欠損作成12時間後と24時間後にCytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assayキット (Promega, WI) を用いて、培養上清中に遊離したLDH活性を測定した。

7. WST-8 assay

EPAの胃上皮細胞の細胞増殖または細胞破壊の影響

を検討するためWST-8 assayを測定した。WST-8 assayはMTT assayの変法で、生細胞数を反映する。これらはCell Counting Kit (同仁化学研究所, 熊本) を用いて円形欠損作成の24時間後に測定した。

8. 統計学的解析

各データは平均値±標準誤差で表記した。EPAを添加していないコントロール (Ham's F12/2% FBS) と各濃度のEPAを添加した群間の有意差の検定にはANOVAにFisher's PLSD法を組み合わせ用い、 $p < 0.05$ を統計的に有意とした。

結 果

1. 胃上皮細胞修復に対するEPAの影響

修復の評価はRGM-1単層培養細胞に円形欠損を作成し、その面積を経時的に12時間後と24時間後に測定し比較した。10% FBS添加培養液による修復が最も速かった。コントロールに 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} MのEPAを添加すると濃度依存的に修復は回復した (図2)。

2. WST-8分析による胃上皮細胞数に対するEPAの影響

EPA 10^{-3} Mの濃度では細胞が死滅したが、 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} Mの濃度では生存細胞の数に差は認められなかった (図3)。したがって、EPAによる細胞修復の回復は、細胞増殖によるものではないことが示唆された。

3. 培養液中へのLDH遊離に与えるEPA投与の影響

LDHを測定することにより胃上皮細胞障害を評価した。EPA 10^{-3} Mの濃度ではLDH遊離の著明な増加を認

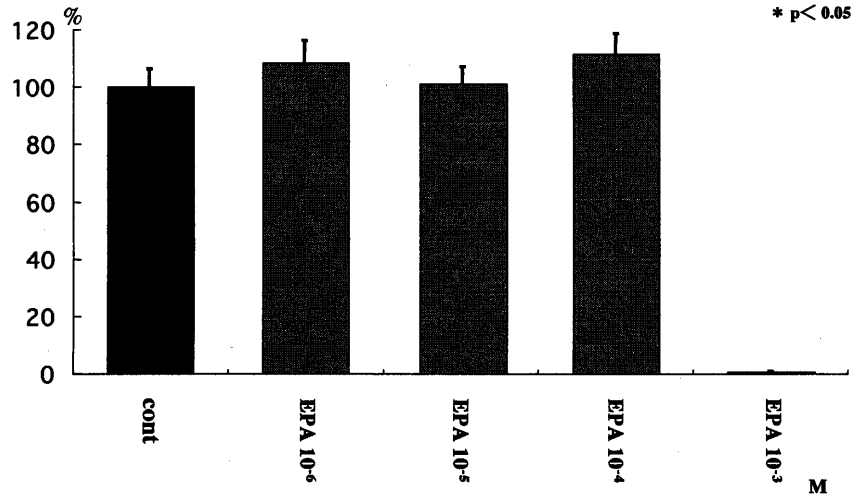


図3 EPA 10⁻³ Mでは細胞は強い障害を受けて、値は低値であるが、10⁻⁶、10⁻⁵、10⁻⁴ Mの濃度では有意な差がなかった。

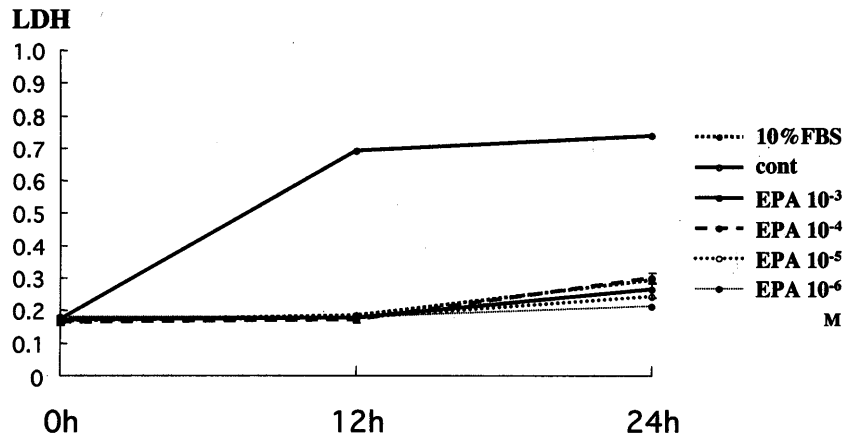


図4 EPA 10⁻³ Mでは細胞は障害を強く受けるためLDHの値は有意に上昇したが、10⁻⁶、10⁻⁵、10⁻⁴ Mの濃度では有意な変化はなかった。

めた。10⁻⁶、10⁻⁵、10⁻⁴ Mの濃度ではコントロールと比べLDH遊離に差は認めなかった(図4)。したがってEPA 10⁻⁶、10⁻⁵、10⁻⁴ Mの濃度では細胞障害を引き起こさないことが示された。

4. 胃上皮細胞によるPGE₂遊離

EPA添加後24時間のPGE₂遊離量を測定した。EPAは、10⁻⁵、10⁻⁴ M濃度で、コントロールと比べPGE₂遊離を有意に抑制した(図5)。PGE₂は細胞修復に促進的に働くエイコサノイドであるが¹⁶⁾、本実験系ではEPAの細胞修復にPGE₂は関わっていないと考えられた。

考 察

我々は、胃粘膜上皮細胞培養の欠損修復モデルを用い

た検討で、 ω 3であるEPAが細胞修復を促進することを示した。このモデルではWST-8分析の結果では細胞数に変化はみられなかった。したがって、修復に増殖は関わっておらず、細胞遊走のみで細胞は修復されることが示唆された。しかしEPAは一般的に生理活性物質とは考えられていないので、今回の検討では遊走促進の機序は不明である。

脂肪酸は細胞膜の重要な構成成分である。 ω 3や ω 6もそのまま、あるいはその系列の脂肪酸として、膜の構成成分となる。したがって、 ω 3と ω 6の摂取割合により細胞の構成成分が変化することは報告されている¹⁹⁾。我々は、通常培養液と、EPAを添加した培養液で、RGM-1を長期培養し、ガスクロマトグラフィーにより細胞の脂肪酸分析を行うと、EPAの添加により細胞成

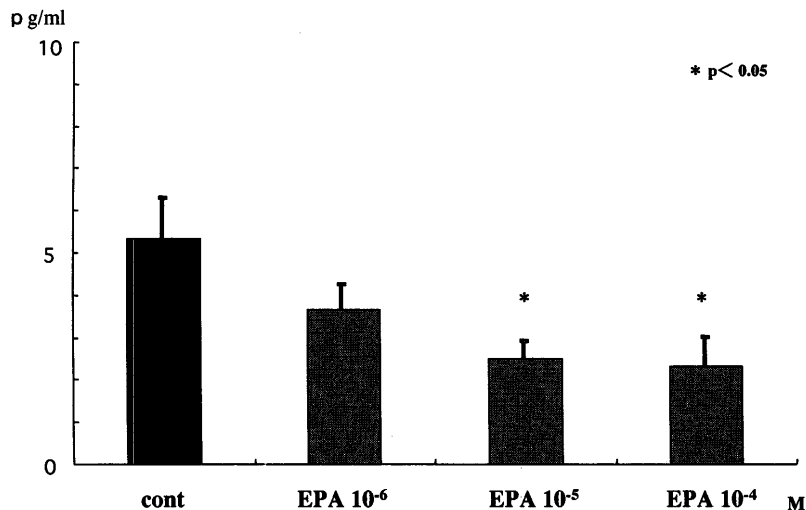


図5 ω 3を添加した培養液では ω 6のみの培養液に比べて、PGE₂の産生は抑制されていた。

分の ω 3/ ω 6比率は上昇することを示した⁴⁾。

膜の構成成分が変化することにより膜の機能が変化する。例えばカルシウムチャンネルなどが変化することが知られている¹⁹⁾。これによりFBSに含まれる活性物質に対する反応性が変化し、細胞遊走が増幅される可能性はある。また、 ω 3と ω 6の摂取割合の変化により、産生されるエイコサノイドの割合も変化する。今回、 ω 3投与により、 ω 6系のエイコサノイドであるPGE₂の産生は減少したことを示した。 ω 3系エイコサノイドの増減を示すことは出来なかったが、これは ω 3系エイコサノイドの測定系が現在確立していないためであり、我々は ω 3系のエイコサノイド産生は増加していると推定している。

ω 6のみの栄養で培養された細胞に比べて、 ω 3であるEPAを加えてもLDH放出に変化がないことを示した。またWST-8 assayでも同様にEPA添加により有意な変化はなかった。これらは修復にかかわる細胞遊走に細胞増殖、細胞障害が関与していないことを示す。メカニズムの詳細は不明であるが、培養液中の ω 3と ω 6の脂肪酸含有比率をみた場合、 ω 3が低い状況は細胞防御に不利であることが示唆された。

EPAは生理活性因子ではなく、多くの栄養素のなかの一つであり、また、生体構成物質の一つである。過去の疫学調査、多くの臨床研究をみても推察できるように ω 3は重要な栄養素の一つである^{2, 5-14)}。胃粘膜においても ω 3の摂取不足の状態では修復に不利な影響があると推定できる。ただし、胃の潰瘍形成、修復では*H. pylori*が主要な病因であるため、その他の因子の重要性は認知されにくい。今回の検討は ω 3の摂取不足が潰瘍誘発、修復遅延の一因子である可能性を示唆した。これ

を検証するため現在我々は ω 3含有比率が高い餌、あるいは ω 6含有比率が高い餌で飼育したラットの胃に慢性胃潰瘍モデルである酢酸潰瘍を作成し、*in vivo*での潰瘍修復の過程を検討中である。

結 論

ω 3であるEPAを ω 6であるリノール酸を含む培養液中に添加すると胃粘膜上皮細胞の修復は促進される。胃粘膜細胞にとって ω 3は重要な栄養素であり、摂取不足の状態は修復にとって不利に働く可能性があることが示唆された。

謝 辞 獨協医科大学越谷病因消化器内科島村幸恵氏、荒井紀子氏、中川俊夫氏、教室員各位に感謝致します。

文 献

- 1) 厚生省保健医療局生活習慣病対策室栄養調査係：平成10年国民栄養調査結果の概要。臨床栄養，**96**：401-415，2000。
- 2) 浜崎智仁：魚食・魚油投与と疾病，疫学，治療学，**28**：617-620，1994。
- 3) Leaf A, Weber PC. : A new era for science in nutrition. Am J Clin Nutr, **45** : 1048-1053, 1987.
- 4) 高田博信, 高橋盛男, 桑山 肇：細胞膜多価不飽和脂肪酸・ ω 3/6比率と潰瘍修復。実験潰瘍，**30**：51-55，2003。
- 5) Dyerberg J, Bang HO, Stoffersen E, et al : Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? : Lancet, **15** : 117-119, 1978.

- 6) Kromann N, Green A. : Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950 - 1974. *Acta Med Scand*, **208** : 401-406, 1980.
- 7) Salomon P, Kornbluth AA, Janowitz HD. : Treatment of ulcerative colitis with fish oil n-3-omega-fatty acid : an open trial. *J Clin Gastroenterol*, **12** : 157-161, 1990.
- 8) Walton AJ, Snaith ML, Locniskar M, et al : Dietary fish oil and the severity of symptoms in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*, **50** : 463-466, 1991.
- 9) Belluzzi A, Brignola C, Campieri M, et al : Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease. *N Engl J Med*, **334** : 1557-1560, 1996.
- 10) 平井愛山, 寺野 隆, 田村 泰 : エイコサペンタエン酸由来のプロスタグランジン, ロイコトリエン. *治療学*, **28** : 634-636, 1994.
- 11) 松村竜太郎, 鏡味 勝, 杉山隆夫ほか : エイコサペンタエン酸と自己免疫疾患. *治療学*, **28** : 641-643, 1994.
- 12) 寺野 隆, 田村 泰 : 多価不飽和脂肪酸と炎症. *治療学*, **25** : 57-61, 1991.
- 13) al-Harbi MM, Islam MW, al-Shabanah OA, et al : Effect of acute administration of fish oil (omega-3 marine triglyceride) on gastric ulceration and secretion induced by various ulcerogenic and necrotizing agents in rats. *Food Chem. Toxicol*, **33** : 553-558, 1995.
- 14) Das UN. : Hypothesis : cis-unsaturated fatty acids as potential anti-peptic ulcer drugs. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **58** : 377-380, 1998.
- 15) Olafsson SO, Hallgrimsson J, Gudbjarnason S. : Dietary cod liver oil decreases arachidonic acid in rat gastric mucosa and increases stress-induced gastric erosions. *Lipids*, **35** : 601-605, 2000.
- 16) Takahashi M, Ota S, Hata Y, et al : Hepatocyte growth factor as a key to modulate anti-ulcer action of prostaglandins in stomach. *J. Clin Invest*, **98** : 2604-2611, 1996.
- 17) 松井裕史, 武藤 弘 : 胃粘膜細胞培養 (RGM1) とその応用. *G. I. Research*, **5** : 312-316, 1997.
- 18) 熊谷 朗 : 高純度EPAの経口投与による生体内動態. *EPAの医学*, 中山書店, 東京 : 95-112, 1994.
- 19) Asano M, Nakajima T, Hazama H, et al : Influence of cellular incorporation of n-3 eicosapentaenoic acid on intracellular Ca^{2+} concentration and membrane potential in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, **138** : 117-127, 1998.

ω 3 Polyunsaturated Fatty Acid and Ulcer Healing

Hironobu Takada, Morio Takahashi, Ryouichi Soma, Hajime Kuwayama

Departments of Gastroenterology and Hepatology, Koshigaya Hospital, Dokkyo University School of Medicine, Japan

BACKGROUND

Epidemiological studies have shown that a high consumption of fish is associated with a low prevalence of peptic ulcers, which is still controversial. The beneficial effect of eicosapentaenoic acid (EPA), which is abundant in fish oil, on gastric ulcers and on ulcerative colitis has been clinically demonstrated. However, the mechanism of the anti-ulcer action of EPA is not known. In the present study, we investigated the effect of EPA on gastric restitution using in vitro culture restitution model.

METHODS

1. Ras normal gastric epithelial cell line, RGM-1 was used.
2. Epithelial cell restitution was assessed by round wound

restitution assay 3. PGE₂ was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). 4. Assessment of cell damages were determined by WST-8 assay (modified MTT assay) and LDH release.

RESULTS

1. EPA accelerated the restitution of PGM-1. 2. EPA inhibited PGE₂ release. 3. EPA did not influence the damage of RGM-1 damage, as assessed by WST-8 assay. 4. EPA did not have any effect on LDH release.

CONCLUSION

Addition of EPA accelerated the restitution of gastric epithelial cells, when n3 polyunsaturated fatty acid is deficient.