

Coccomyxa gloeobotrydiformis の II型コラーゲン 関節炎モデルマウスに対する効果

Effects of Coccomyxa gloeobotrydiformis, on murine
models of arthritis of collagen induced arthritis

小金澤将太・鷺見 亮・森 伸夫・小島正章・安倍千之・菊川忠裕
Shouta Koganezawa, Ryo Sumi, Nobuo Mori, Masaaki Kojima, Chiyuki Abe and Tadahiro Kikukawa

Abstract

The effects of Coccomyxa gloeobotrydiformis were studied using animal experimental models, type II collagen-induced arthritis (CIA) in DBA/1J mice. Coccomyxa significantly reduced both incidence and severity of paw swelling in DBA/1J mice. Coccomyxa gloeobotrydiformis reduced serum levels of interleukin-1 β and anti-type II collagen antibody were also suppressed by 50 mg Coccomyxa. These results suggested that Coccomyxa has anti-arthritis effects and may be identified as a valuable therapeutic agent for inflammatory articular lesions.

Key words: *anti-inflammatory agent, Coccomyxa gloeobotrydiformis, type II collagen arthritis, models of arthritis*

緒言

コッコミクサ(学名:Coccomyxa gloeobotrydiformis : Coccomyxa)は、分類学的にはクロレラに近い種である。クロレラと比較するとタンパク質含量は少なく、炭水化物は約3倍と多いことが特徴である¹⁾。北極圏に生息する微細藻類であり、極寒の地で生息するため強固な細胞壁を保持せず多糖質を細胞外に放出している。Coccomyxaに含まれる多糖質は免疫系や癌細胞に直接影響を与え、強い抗癌活性を有することが発表されている²⁾。さらに、微細藻類には抗酸化作用や抗腫瘍作用、免疫増強作用があるが、抗炎症作用に関する研究はない。

関節リウマチ(Rheumatoid Arthritis : RA)は急性炎症から慢性炎症へと病態の経過をたどり、病変の首座が関節である全身性炎症性の自己免疫疾患である。手指、足指の小関節の腫脹から始まり、左右対称性に骨破壊へと進行する。一般的な経過として、手関節や手や足の小関節の炎症で初発することが多い^{3),4)}。RAの発症要因としては遺伝的要因と環境要因が考えられる。遺伝的要因ではHLA-DR遺伝子、環境要因としてはウイルス感染や細菌感染などの外的要因が関与しているとされている。

DBA/1JマウスはII型コラーゲン誘導関節炎モデル(Type II Collagen Induced Arthritis : CIA)であり、明確に急性炎症が先行し、生体調節が起こり慢性炎症の所見が顕著になる。DBA/1JマウスマodelにはウシII型Collagenに初回免疫としてフロイント完全アジュバント(Freund's Complete Adjuvant : FCA)、1週間後に追加免疫としてフロイント不完全アジュバント(Freund's Incomplete Adjuvant : FIA)を使用してCIAモデルを作成する。追加免疫後1週目に、発赤・腫脹を伴う多関節炎を四肢に認める。四肢の発症部位は、前肢の左右、後肢の左右にランダムに起こる。肘、手、膝、足の大関節に発症する。CIAモデルは手指や足指の関節にも発症する。発赤・腫脹は1~2ヶ月間持

続して徐々に消退するが、後に関節強直をきたすものである⁵⁾。

関節炎モデル動物とヒト RA の類似点は、末梢関節や脊椎関節の急性反復性関節炎、変形性関節症、進行性・破壊性関節における炎症はモデル動物、ヒト RA ともにみることができる⁶⁾。さらに、DBA/1 J マウスはヒト RA の急性炎症から慢性炎症へ移行する過程を反映している。相違点は、ヒト RA は一部解離がみられ、リウマトイド因子(Rheumatoid Factor : RF)の産生および炎症の増悪寛解を繰り返すのに対して、DBA/1 J マウスモデルでは認められない。

RA の病理組織像は滑膜細胞の増殖、血管新生、炎症細胞の浸潤、軟骨・骨破壊と進行する。自己免疫の異常により炎症をおこした滑膜細胞は血管新生を起こしながら増殖・多層化し、HLA-DR などの class II 抗原や TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 を含む炎症性サイトカインの産生を増加させる。さらに蛋白質分解酵素のマトリックスメタロプロテアーゼ-3(Matrix Metalloproteinase)を産生する。炎症が進むにつれ、パンヌス形成や肉芽組織を増殖させ、骨および軟骨に浸潤する⁷⁾。

本実験では、FCA/FIA の系で惹起した DBA/1 J マウスにおいて、新規機能性を持つ食品素材である Coccoomyxa の乾燥粉末および熱水抽出による抗炎症作用について検討した。

【材料と方法】

DBA/1 J マウス(雄、4 週齢：日本チャールスリバー社)を用い、各群 5 匹とした。飼育開始後 7 日間予備飼育をして実験に供した。DBA/1 J マウスモデルの作製は 0.3% ウシ II 型 Collagen(II C:3 mg/ml, コラーゲン技術研究会, 製品 K-41)を用い、初回免疫としてフロイント完全アジュバント(Freund's Complete Adjuvant : FCA 和光純薬社製)、1 週間後に追加免疫としてフロイント不完全アジュバント(Freund's Incomplete Adjuvant : FIA(和光純薬))を使用し、マウス尾根部皮内に 150 μ g/0.1 ml 投与して II 型コラーゲン関節炎(CIA)を誘発した。各群のマウスは、初回免疫から 24 時間後、平均体重で群分けを行い各群のマウスを 5 匹とした。

Coccoomyxa 無投与群(Control 群)、Coccoomyxa 乾燥粉末および熱水抽出 0.5 mg 群、5 mg 群、50 mg 群、100 mg 群、ステロイド(デキサメタゾン(dexamethasone : DEX))群の 10 群とした。Coccoomyxa 100 mg/kg として、乾燥粉末および熱水抽出は、80 mg を秤量し、精製水 5 ml に加え攪拌する。そこから希釈をおこない 50 mg/kg、5 mg/kg、0.5 mg/kg を調製し、5 回/週で 0.1 ml をゾンデにより経口投与した。ステロイドは週 3 回腹腔内投与した。ステロイドは carboxymethyl cellulose sodium salt(和光純薬)に懸濁し、1 mg/kg の濃度を体重換算し 3 回/週で腹腔内投与した。対照群は、0.1 ml の飲用水を 5 回/週で経口投与した。

飼育室は温度 22°C ± 5°C、湿度 50% ± 10%、プラスチックゲージに床敷用チップを用いた。DBA/1 J マウスを 1 週間の予備飼育後、体重測定により各群 5 匹、Control 群、Coccoomyxa 0.5 mg、5 mg、50 mg、100 mg の 5 群に分けた。飼料には特殊系繁殖用飼料(固形飼料、CMF(オリエンタル酵母工業))、飲料水には水道水を用い、採食量を 3 回/週、体重を 2 回/週で測定した。

1. 関節炎モデルの作製方法

予備飼育後 DBA/1 J マウスは、初回免疫として FCA を用い、ウシ II 型 Collagen(II C(コスモバイオ社))を 150 μ g/0.1 ml で尾根部皮内に投与した。初回免疫から 1 週目で、追加免疫として FIA を用い、初回免疫と同様に II C を投与した。また、初回免疫から 1 週ごとに各群 5 匹ずつ屠殺による採血をおこなった。

2. 測定項目

1) 関節炎評価法

関節炎発症の評価は、無変化を 0 点、1 指あるいは複数指の腫張を 1 点、全体に見られる発赤と腫

腫を2点、全体に見られる強度の腫脹を3点、4肢の合計を最大12点とし、週に2回、評価を行った。

2) 抗 ds-DNA 抗体の測定

各週の経時的な断首により採取した血漿中の抗 ds-DNA 抗体は ELISA 法によって測定した。被験マウス血漿と反応させた後、抗体と反応させ、基質溶液で呈色後、450 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー(BIO-RAD 社)で測定した。

3) 抗 II型コラーゲンの測定

各週の経時的な断首により採取した血漿中の抗 II型コラーゲン抗体は Chondrex 社の ELISA 法によって測定した。ELISA 法にて抗 II型コラーゲン抗体値を測定する際、血清を2段階希釈により30,000 倍希釈をおこなった。希釈した被験マウス血清と反応させた後、抗体と反応させ、基質溶液で呈色後、490 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー(BIO-RAD 社)で測定した。

【結果】

1) 採食量および体重曲線

採食量は各群同様の推移であった(図 1)。体重は Control 群、Coccomyxa 群で増加した(図 2)。

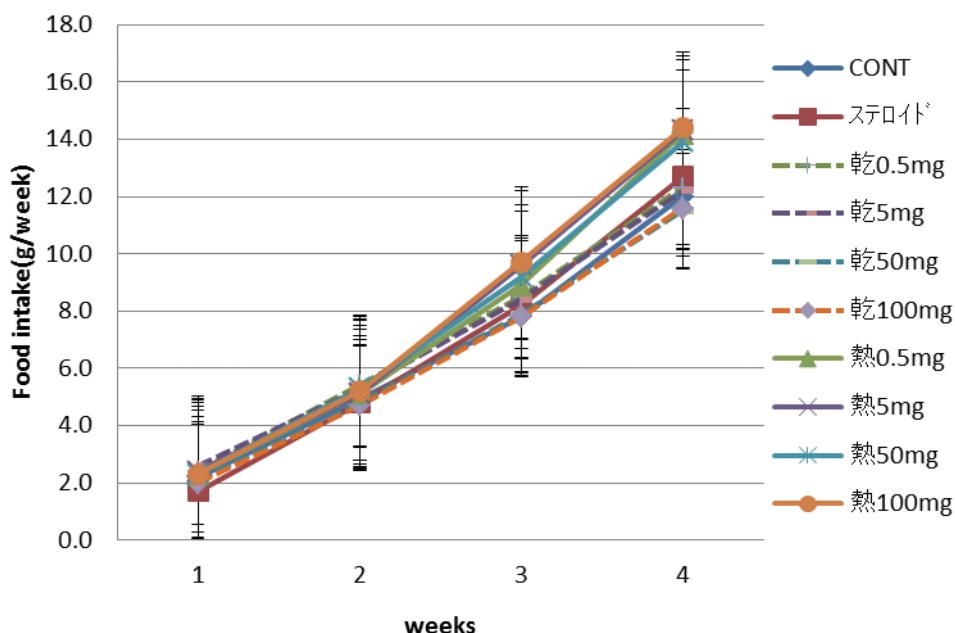


図 1. DBA/1 J マウス採食量

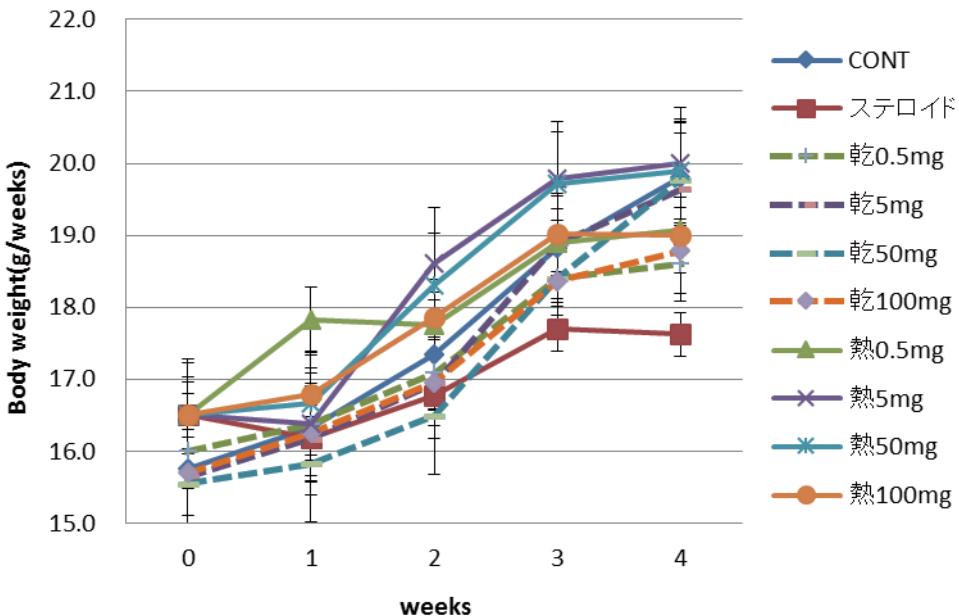


図2. DBA/1 J マウス体重曲線

2) 関節炎発症率

発症率は、発症した四肢の数/1群のマウスの肢数×100%で求め、結果を図3に示した。ステロイド群、乾燥粉末50 mg群、熱水抽出5 mg群では、1固体の発症もなく炎症の抑制が認められた。Control群、乾燥粉末5 mg群、乾燥粉末0.5 mg群では週齢が増すごとに発症率が増加している。これはスコアとの相関があり、熱水抽出0.5 mg群を除き、発症率が高値であるものはスコア値も高値(60%)になっていることが認められた。

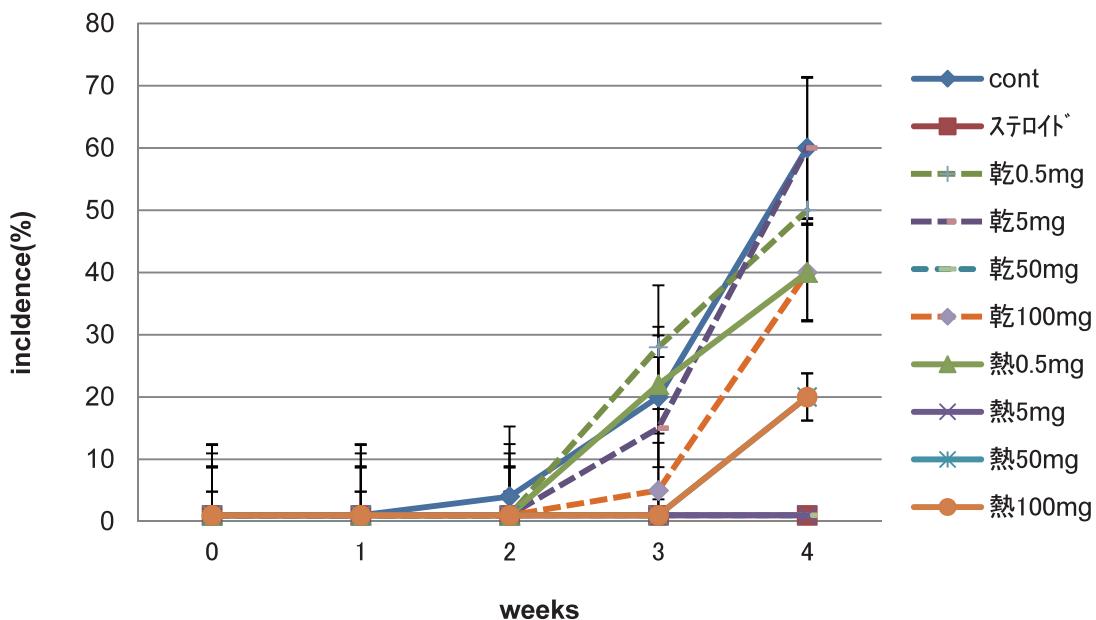


図3. DBA/1 J マウス関節炎発症率

3) 関節炎スコア

Coccomyxa 投与開始後、週ごとに各群 1 匹あたりの平均を算出し、スコア写真を図 4 に示した。また、結果を図 5 に示した。関節炎スコアでは、Control 群と比較して、熱水抽出 0.5 mg 群が高値になった。これは屠殺マウスのサンプリングの際にスコアが高値であるマウスを避けてサンプリングをおこなった結果と考えられる。これにより 1 固体あたりの炎症を判断し、熱水抽出 0.5 mg 群、Control 群、乾燥粉末 5 mg 群の順に炎症が重度であると考えられた。ステロイド群、乾燥粉末 50 mg、熱水抽出 5 mg 群では、1 固体の発症もないとため、関節炎スコアは 0 となる。



図 4. DBA/1 J マウス Scale 0～Scale 3

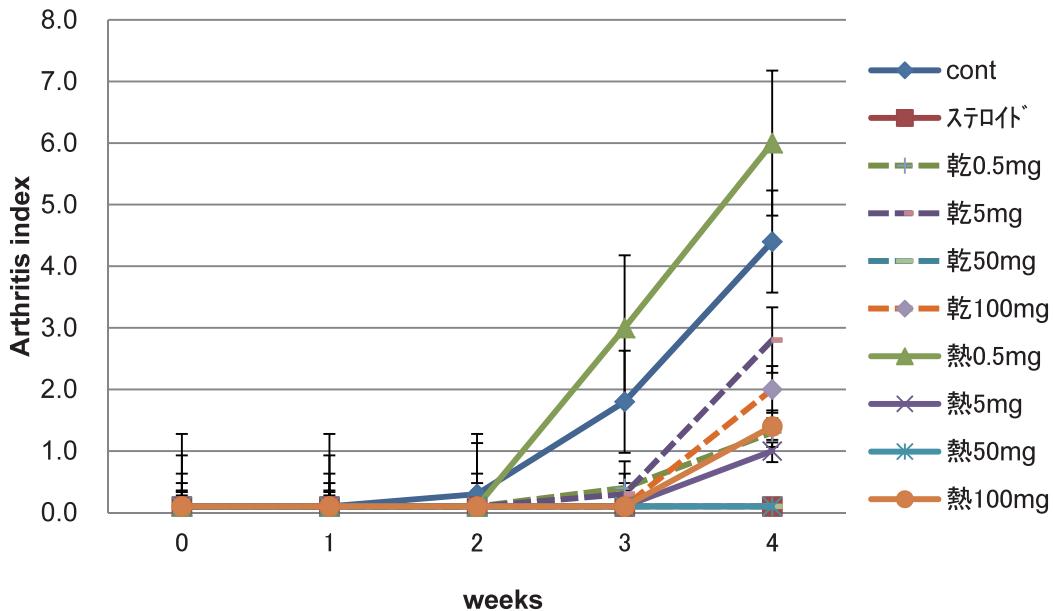


図5. DBA/1 J マウス関節炎スコア

4) 抗 ds-DNA 抗体値の定量

免疫学的評価および抗炎症作用に関する評価では、抗 ds-DNA 抗体の結果を図 6 に示した。抗 ds-DNA 抗体は 2 週目から 3 週目にかけて Control 群と比較して乾燥粉末 0.5 mg 群、乾燥粉末 5 mg 群、乾燥粉末 50 mg 群では抑制傾向が認められるが、乾燥粉末 100 mg 群、熱水抽出 5 mg 群では抑制傾向が認められなかった。Control 群、乾燥粉末 100 mg 群では急激な抗 ds-DNA 抗体値の増加を認めた。

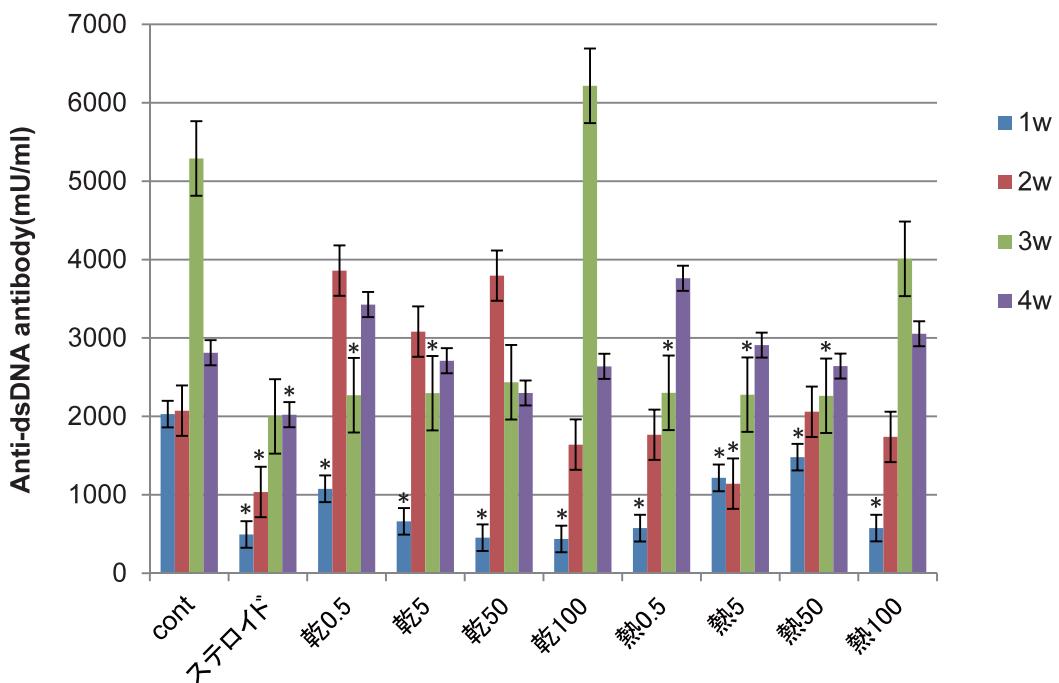


図6. DBA/1 J マウス抗 ds-DNA 抗体値の定量

5) 抗II型コラーゲン抗体値の定量

抗II型コラーゲン抗体の結果を図7に示した。抗II型コラーゲン抗体値はControl群、乾燥粉末50 mg群の2週目を除いた各群において4週目で抗体値がピークになっている。

3週目以降では、抗II型コラーゲン抗体値は慢性期に自己抗体の増加を確認した。

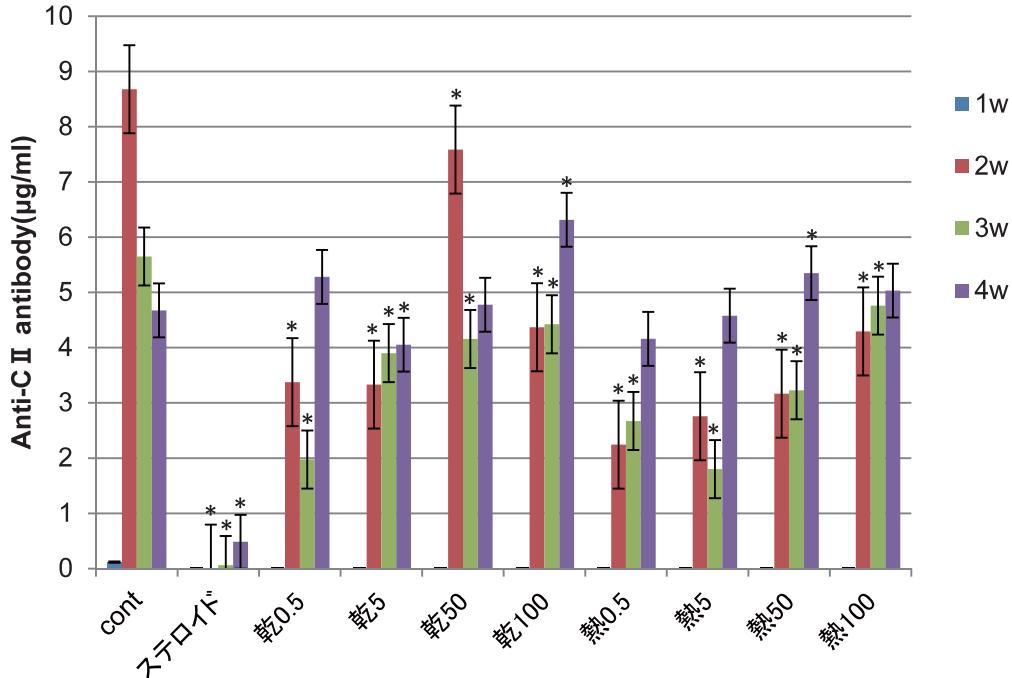


図7. DBA/1 J マウス抗II型コラーゲン抗体値の定量

【考察】

本研究では Coccomyxa の乾燥粉末および熱水抽出を使用し、DBA/1 J マウス II型コラーゲン誘導関節炎に対する Coccomyxa の抗炎症作用を検討した。

1995年 安倍らは^{5),8)}、関節炎の質を検討するため初回免疫でウシII型コラーゲン 200 μg、追加免疫でウシII型コラーゲン 200 μg とし、免疫賦活剤の使用には初回免疫で FCA を同量用い、追加免疫で FIA を尾根部皮内へ投与して関節炎の発症を惹起した。その結果、II型コラーゲン量を減ずることにより炎症強度を中程度の強度を得ることが可能となった。さらに、病理学的には骨新生、破骨細胞、パンヌス形成を中心とした急性炎症期の変化より慢性炎症期移行することを明確にした。

今回予備実験をおこなった結果より、発症率および四肢の関節炎症のスコア化を明確にするため、初回免疫はウシII型コラーゲン 150 μg、追加免疫はウシII型コラーゲン 150 μg とした。免疫賦活剤の使用は、初回免疫 FCA を同量用い、追加免疫では FIA を同量用いて、二連式注射筒によりエマルジョンを作製し、尾根部皮内へ投与して関節炎の発症を起こした。関節炎症は中程度の強度を用いて、この関節炎モデルに対する Coccomyxa の抗炎症作用について検討した。

抗炎症作用の観点から、外見的症状として発症率とスコアを測定し、ELISA 法で抗 ds-DNA 抗体価および抗II型コラーゲン抗体価を測定した。

Coccomyxa の乾燥粉末および熱水抽出を投与することにより抗 ds-DNA 抗体価および抗II型コラーゲン抗体価は抑制されると考えていた。しかし、慢性期においては有意差がみられなかった。これは炎症が強すぎると効能を見ることができないからである。

天然物では、小青竜湯や柴苓湯(TJ-114)などの生薬では、炎症抑制効果があり、副作用も軽症とされている⁹⁾。小青竜湯はサイトカイン産生能低下やCD4+T細胞数を減少させ、Th2亢進を抑制する作用がある¹⁰⁾。また、TJ-114は血清の抗II型コラーゲン抗体の産生を抑制することが知られている。これらのことから、Coccomyxaは小青竜湯と柴苓湯に類似した作用があるのではないかと考えられる。

今回の実験において、Coccomyxa乾燥粉末50mg群で急性期における抑制がみられた。小青竜湯および柴苓湯は100mg/kgがヒト常用量であるとされている。Coccomyxa投与量が50mg/kg/dayより、体重60kgのヒトに換算すると、3.0g/kg/dayが常用量ではないかと推測できる。

ヒト関節リウマチの病態は滑膜間葉系細胞が炎症におけるサイトカインネットワークを形成して関節破壊にまで陥る。同時に炎症細胞から放出されたケミカルメディエーターによって活性化された滑膜細胞や破骨細胞によって激しい骨・軟骨破壊へとすすむ。これらは炎症・免疫反応に預かるヒト関節リウマチの骨・軟骨関節・滑膜炎発症に連座する重要な生体反応で起こるが、この過程の解析は報告されていない^{10),11)}。

Coccomyxa投与群では、Control群と比較して乾燥粉末50mg群において急性期における発症率、関節炎スコア、抗ds-DNA抗体値の減少が認められたため、Coccomyxaによって発症および炎症の抑制がされていたと考えた。

のことから最適濃度は乾燥粉末50mgに近いものである。現在、ヒト関節リウマチの生薬治療法について繁用されている処方として、急性炎症ではTJ-28(越婢加朮湯)、TJ-53(疎経活血湯)などがあり、慢性炎症においてはTJ-30(真武湯)、TJ-97(大防風湯)などがある¹²⁾。今回のCoccomyxaでは急性期において炎症抑制が認められたため、TJ-28(越婢加朮湯)、TJ-53(疎経活血湯)に類似した炎症抑制機構であると考察できる。TJ-114は抗II型コラーゲン抗体の産出抑制を介して、生薬効能が発現することが認められている⁹⁾。

外見的所見である関節炎の発症率は、Control群3匹/5匹に比較してCoccomyxa乾燥粉末5mgは2匹/5匹である。Control群と比較して、乾燥粉末5mg群では発症率に相違は認めない。その他のCoccomyxa乾燥粉末・熱水抽出群では有意差のある抑制を認めた。特にステロイド群、乾燥粉末50mg群、熱水抽出5mg群では発症を認めなかった。関節炎をスコア化した結果より、4週目のCoccomyxa熱水抽出0.5mg群では2匹/5匹が発症しており、この発症スコアも12点と高いものを残したためと考えられる。その他の群では、Control群に比較して関節炎および関節炎スコアはともに低値であり、外見的症状からCoccomyxa投与による関節炎抑制効果を明確にした。

自己抗体産生能に関する所見では、抗ds-DNA抗体価および抗II型コラーゲン抗体価の定量をおこなった。抗ds-DNA抗体価の定量では、1週目では、Control群に比較して、全群で抗ds-DNA抗体価の抑制を認めた。特に乾燥粉末50mg群、乾燥粉末100mg群では80%程度の抑制が認められ、ステロイド群と同程度であった。3週目では、Control群と比較して、乾燥粉末100mg群を除いた各群では60%程度の抗ds-DNA抗体価の抑制を認めた。4週目では、Control群と比較して、ステロイド群、乾燥粉末50mg群では20%程度の抗ds-DNA抗体価の抑制を認めた。全抗ds-DNA抗体価の傾向として、Control群と比較すると、急性期である1週目では各群において70~80%の抗ds-DNA抗体価の抑制を認めた。慢性期に移行する3週目において、乾燥粉末0.5mg群、乾燥粉末5mg群、乾燥粉末50mg群では15~40%の抑制を認めた。

抗II型コラーゲン抗体価の定量では、1週目ではControl群と比較して、各群で有意差のある抗II型コラーゲン抗体価の抑制を認めた。全抗II型コラーゲン抗体価の傾向として、Control群と比較すると、ステロイド群では、各週で有意差のある抗II型コラーゲン抗体価の抑制を認めた。

外見的所見および自己抗体産生能に関する所見では、Coccomyxa乾燥粉末群に比較してCoccomyxa熱水抽出群は関節炎の発症率および関節炎スコアは低値であった。自己抗体産生能に関する所見では、追加免疫後3週目では、Coccomyxa熱水抽出群の自己抗体産生がCoccomyxa乾燥

粉末群に比較してより強い抑制傾向であった。

抗 ds-DNA 抗体価の変動は、マウスの生体機能を考えるうえで、薬剤的効果に対して抵抗性は強く、急性期から慢性移行期では Coccomyxa の影響はみられないものの、4 週目では Coccomyxa 乾燥粉末 50 mg 群、乾燥粉末 100 mg 群で抑制傾向があった。熱水抽出群では、全体的に抑制傾向がみられたが、100 mg 群の 4 週目では抑制はみられなかった。一般的に、生薬系の効果にはベルシエグレンの傾向がみられるように、高濃度になると抑制効果が減ずることが認められた。

抗 II 型コラーゲン抗体価の変動は、ウシ II 型コラーゲンの免疫により自己抗体が生成された。抗 II 型コラーゲン抗体価は、抗原性が持続する限り抗体価が増加する傾向が認められるが、急性期から慢性期にむかう 2 週目から 3 週目で抑制を認めた。

今後、Coccomyxa には、n-3 系脂肪酸である EPA や DHA の合成素材である α -リノレン酸を含有しており^{13),14)}、抗炎症作用について明確にすることが重要であるとともに、Coccomyxa の有用成分の同定と Coccomyxa による、免疫ネットワークの作用点を解析する。

【文献】

- 1) 江口文陽：コッコミクサの機能性食材としての可能性. Food Style 21,15: No.2, p 26-28,2011
- 2) 林 勝彦,US Patent 100072213 B 1 (16,October,2001).
- 3) 豊島 聰, 田坂捷雄, 尾崎承一：医学・薬学のための免疫学（第二版）. 東京化学同人 2008, p 131-136
- 4) 京極方久, 安倍千之, 澤井高志・編：関節炎モデル. 日本医学館, 2000, p 17-24, p 17-24 p 25-31 p 62-68
- 5) Trentham DE, Townes AS, Kang AH. ; Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. J Exp Med 146 ; 857-868. 1977
- 6) 安倍千之, 菊川忠裕, 小松靖弘, 後藤 眞, 藤平栄一, 平野伸一：関節炎の質 4 系の関節炎モデルにおける早期病変の解析. 炎症 15(5) : 395-399, 1995
- 7) 安倍千之：関節炎モデル. 炎症 11(6) : 551-558, 1991
- 8) Courtenay, J.S., Dallman, M.J., Dayan, A.D., Martin, A., Mosedale, B. : Immunization against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. Nature 283 : 666-668,1980
- 9) 池田孔己, 金子 篤, 山本雅浩, 竹田秀一, 油田正樹：オプアルブミン感作マウスによる小青竜湯の抗原提示細胞と CD 4+T 細胞の相互作用に及ぼす影響. 漢方と免疫・アレルギー : 10-20, 2004
- 10) 疾患別 服葉資料マニュアル第一集 時報 1994
- 11) 菊川忠裕, 三木知博, 安倍千之, 小久保毅, 磯橋文秀, 水島 裕, 坂根 剛：マウス II 型コラーゲン関節炎抑制に対する TJ 114 の作用機序. 炎症 15(2) : 129-133, 1995
- 12) 菊川忠裕, 江口文陽, 安倍千之, 吉本博明, 檜垣宮都：2 系関節炎モデルマウスに対する Agaricus blazei Murri(CJ-01)の影響. 炎症 19(5) : 261-267, 1999
- 13) Ishida, Y., Honda, T., Mabuchi, S and Seno, O.: Sueno validation of thermally assisted hydrolysis and methylation-gas chromatography using a vertical microfurnace pyrolyzer for the compositional analysis of fatty acid components in microalgae.: J. Agric. Food Chem. 60, 4222-4226, 2012
- 14) Luning Sun., Ying Jin., Liming Dong., Ryo Sumi., Rabita Jahan Zhi Li: The neuroprotective effects of Coccomyxa Gloeobotrydiformis on the ischemic stroke in a rat model.: Int. J. Biol. Sci. 9 (8):811-817, 2013

