

DBA/1JマウスのII型コラーゲン誘発関節炎の関節病変に対する コッコミクサの効果

Effects of *Coccomyxa gloeobotrydiformis* on joint lesions in type II collagen-induced arthritis in DBA/1J mice.

菊川 忠裕¹⁾・國本あゆみ¹⁾・高橋万由花²⁾・青野 浩之³⁾
Tadahiro KIKUKAWA¹⁾・Ayumi KUNIMOTO¹⁾・Mayuka TAKAHASHI²⁾・Hiroyuki AONO³⁾

Abstract

Using *Coccomyxa gloeobotrydiformis* (*Coccomyxa*), we reported serologic analysis by the first report. The effects of *Coccomyxa* were studied using animal experimental models, type II collagen-induced arthritis in DBA/1J mice. *Coccomyxa* significantly reduced both incidence and severity of paw swelling in DBA/1J mice. *Coccomyxa* reduced serum levels of interleukin-1 β and anti-type II collagen antibody were also suppressed by 50 mg extraction *Coccomyxa*. This report performed histopathological analysis, and it was confirmed that *Coccomyxa* controlled inflammation of the bone under the microscope.

Keywords: anti-inflammatory agent, *Coccomyxa gloeobotrydiformis*, type II collagen arthritis, models arthritis

はじめに

ヒトの難病の多くに関節炎が付随する。関節炎とりわけ関節リウマチの治療薬には、メトトレキサートが多用され、非ステロイド性抗炎症剤の併用もある¹⁾。漢方薬である柴苓湯（TJ114（ツムラ株））はマウスII型コラーゲン関節炎モデルにおいて、関節病変の滑膜下軟部組織の浮腫性変性、パンヌス形成、骨・軟骨の結合織置換、フィブリンの析出、多核白血球の浸潤、線維芽細胞増殖など病理組織学的にも関節炎は軽微であり、リンパ球幼若化試験においても有意に抑制し、柴苓湯の有効性を示した。滑膜細胞の増殖抑制効果は3剤ともに見られ、IL-6の産生はTJ-107、TJ-127で抑制することを見出した^{2)、3)}。

コッコミクサ（学名：*Coccomyxa gloeobotrydiformis*）は北極圏のアラスカバロー岬より採取・単離された淡水性単細胞緑藻である。緑色植物門、緑藻綱、コッコミクサ科に属することから分類学的にはクロレラに近いがクロレラと比較するとタンパク質含有量は少なく、炭水化物は約3倍と多いことが特徴である⁴⁾。関節炎リウマチのモデルであるDBA/1JマウスにII型コラーゲン誘導関節炎を発症させて血清学的な分析を経時的に行った⁵⁾。コッコミクサの投与は、完全アジュバントを追加感作した直後から、4週間にわたって連日経口投与した。

最初の報告では、血清中の自己抗体価の解析を行い報告した⁶⁾。自己抗体の抗ds-DNA抗体価は、1週目では疾患対照群と比較して、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、疾患対照群と比較して、乾燥粉末100mg群を除いた各群では約60%の抗ds-DNA抗体価の抑制を認めた。4週目では、疾患対照群と比較して、ステロイド群、乾燥粉末50mg群では約20%の抗ds-DNA抗体価の抑制を認めた。全抗ds-DNA抗体価は、疾患対照群と比較して急性期の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。抗II型コラーゲン抗体価は、抗原性が持続する限り抗

¹⁾ くらしき作陽大学食文化学部：Faculty of Food Culture, Kurashiki Sakuyo University

²⁾ ノートルダム清心女子大学人間生活学部：Notre Dame Seishin University Faculty of Human Life Sciences

³⁾ あゆみ製薬株式会社：AYUMI Pharmaceutical Corporation

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向かう2週目から3週目で抑制を認めた³⁾。

血清学的自己抗体価の解析より、病理組織学的解析には、疾患対照群、ステロイド群、Coccomyxa乾燥物5mg群、50mg群、100mg群ならびにCoccomyxa熱水抽出物5mg群、50mg群、100mg群とし、マウスは各群5匹として、3週目の右前肢を用いて評価解析をした。

キーワード：抗炎症薬、コッコミクサ（学名；*Coccomyxa gloeobotrydiformis*）、Ⅱ型コラーゲン誘導関節炎、関節炎モデル

材料と方法

DBA/1J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/1Jマウスモデルの作製は0.3%ウシⅡ型Collagen（3mg/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富士フィルム和光純薬社製）、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/0.1ml投与してⅡ型コラーゲン関節炎を誘発した。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。

疾患対照群、Coccomyxa乾燥粉末および熱水抽出物の5mg群、50mg群、100mg群、ステロイドホルモン投与（デキサメタゾン（dexamethasone：DEX））群の8群とした。Coccomyxa 100mg/kgとして、乾燥粉末および熱水抽出物は、80mgを秤量し、精製水5mlに加え攪拌する、そこから希釈をおこない50mg/kg、5mg/kgを調製し、5回/週で0.1mlをゾンデにより経口投与した。

DEX群は、carboxymethyl cellulose sodium salt（和光純薬）に懸濁し、1mg/kgの濃度を体重換算し3回/週で腹腔内投与した。疾患対照群は、0.1mlの飲用水を5回/週で経口投与した。

追加免疫3週目DBA/1Jマウスは、クロロホルム麻酔下で開胸心索刺し、脱血死させた。剖検時に四肢を中性ホルマリンにて固定し、Plank-Rychlo法で脱灰した。パラフィン包埋の後に薄切し、ヘマトキシリン・エオシン染色して、光学顕微鏡下で評価解析した。

関節の所見は、予備実験として解析した関節炎を発症しないC57BL/6マウスの関節滑膜は3層以下であった。すべて顕微鏡下で観察したものをそのまま記載した。滑膜被覆細胞を例にとると、平均的所見が3層であれば3、10層であれば10とした。予備実験として解析したC57BL/6マウスの滑膜は3層以下であった。そこで検鏡の後に、3層以下を（-）、5層以下を（+）、8層以下を（++）、8層を越すものを（+++）として評価分類をした。その他の所見も、実数を記入して後に同様に階層化した。

統計処理はRIDIT解析カイ二乗検定、およびSteel多重比較検定をした。

結 果

DBA/1Jマウスは、初回免疫から27日目に四肢の腫脹症状を示し始めた。その症状は、悪化と改善を自然経過の中で呈した。追加免疫から3週目の関節の病理組織学的所見において、DEX群では、炎症は有意に抑制されていた (Fig. 1A)。疾患対照群では、重度の骨膜炎が見られ、骨膜周囲炎はパヌス形成、新骨形成、炎症性リンパ球を伴う炎症性細胞の浸潤が確認された (Fig. 1B)。

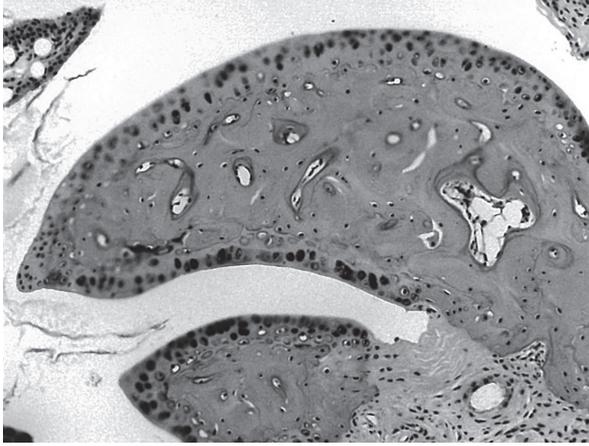


Fig. 1A

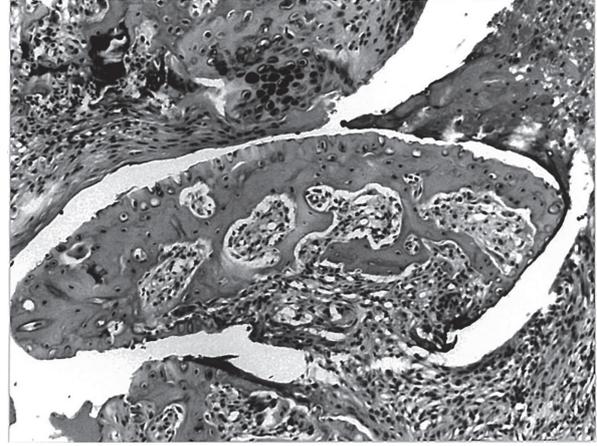


Fig. 1B

Fig.1A This is the joint image of the steroid group. There is an inhibitory effect on arthritis.

Fig.1B Severe perisitis in collagen-induced arthritis in DBA/1J mice. Perisitis accompanies pannus formation, new bone formation, and inflammatory round cell infiltration (HE stained, $\times 100$).

DEX群と疾患対照群との関節病変の比較は、病理組織学的に評価した成績を (Table 1) に示した。DBA/1Jマウスの関節炎は、滑膜病変ならびに骨軟骨病変及び炎症細胞の浸潤に分類した。DEX群に比較して、疾患対照群の滑膜病変では、滑膜細胞の重層化、滑膜下軟部組織の浮腫、骨軟骨病変では軟骨変性や肉芽組織による骨軟骨の置換といった組織変化、炎症細胞の浸潤では、線維芽細胞、リンパ球、形質細胞、多形核白血球といった免疫担当細胞の変化、パヌス形成を検鏡して評価した。その結果、DEX群ではすべての関節病変部において有意に抑制した。

Table 1 Effect of Steroid-treated group and disease control group on the joint lesions in mice.

Groups	Dose(mg/kg)	Synovial lesions								Bone or cartilage						Inflammatory cell infiltration															
		Multiplication of synovial lining cells				Subsynovial soft tissue edema				Bone/cartilage replaced by granulation			Pannus formation			Fibroblasts			Polymorphonuclear leucocytes												
Grading		-	+	2+	3+	SS	-	+	2+	3+	SS	-	+	2+	3+	SS	-	+	2+	3+	SS	-	+	2+	3+	SS					
Disease control	-	0	1	0	4	**	0	0	0	5	**	0	0	2	3	**	0	0	0	5	**	0	0	2	3	**	1	4	0	0	*
Steroid treatment	1	5	0	0	0	-	5	0	0	0	-	5	0	0	0	-	4	1	0	0	-	0	5	0	0	-	5	0	0	0	-

1) Histopathological findings were graded into four levels: intact(-),mild(+),moderate(2+)and severe(3). SS = Statistical significance from steroid treatment by

RIDIT analysis (multiple comparison using corrected p by Steel). SS = Statistical significance from control by chi-squared test.

* p<0.05; **p<0.01

Table 2 Effects of Coccomyxa on histologic articular lesions of the front paws in type II collagen arthritis induced in DBA/1J mice.

Arthritis	type II collagen-induced CFA/IFA					
Mouse	DBA/1J(male)					
Groups	dry matter			extraction		
Dose(mg/kg)	5	50	100	5	50	100
Number	5	5	5	5	5	5
Multiplication of synovial lining cells	n.s.	*	n.s.	*	*	n.s.
Subsynovial soft tissue edema	---	*	---	*	*	*
Villi formation	---	**	**	*	**	**
Bone/cartilage replaced by granulation	---	---	n.s.	---	*	---
Fibrin exudation	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	*
Fibroblasts	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	*
Lymphocyte	n.s.	*	n.s.	*	*	n.s.
Plasma cell	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.
Polymorphonuclear leucocytes	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.
Pannus formation	n.s.	*	*	*	*	*

n.s. : not significance, * p<0.05, ** p<0.01 --- ; Statistics not conducted

1) The disease control group and each treatment groups were subjected to the Steel test.

2) RIDIT test (multiple comparison using corrected p by Steel) and chi-square test.

Coccomyxa乾燥粉末および熱水抽出物の5mg群、50mg群、100mg群と疾患対照群との関節病変を解析した (Table 2)。乾燥粉末5mg群は、全く有効性を示していない。乾燥粉末50mg群では、滑膜病変の滑膜細胞の重層化、滑膜下軟部組織の浮腫、絨毛形成、炎症細胞の浸潤では、リンパ球の浸潤、パヌス形成で有意差のある有効性を示した。乾燥粉末100mg群では、滑膜病変の絨毛形成とパヌス形成のみ有効であった。

Coccomyxa熱水抽出物の5mg群は、滑膜病変の滑膜細胞の重層化、滑膜下軟部組織の浮腫、絨毛形成、フィブリン析出、炎症細胞の浸潤では、線維芽細胞、リンパ球、パヌス形成で有効性を示した。熱水抽出50mg群では、滑膜病変の滑膜細胞の重層化、滑膜下軟部組織の浮腫、絨毛形成、骨軟骨の肉芽組織置換、炎症細胞の浸潤では、リンパ球、形質細胞、多形核白血球、パヌス形成で有効性を示した。熱水抽出100mg群では、滑膜病変の滑膜下軟部組織の浮腫、絨毛形成、炎症細胞の浸潤では、フィブリン析出、線維芽細胞、パヌス形成で有効性を示した。

以上の結果から、Coccomyxa乾燥粉末および熱水抽出物の5mg群、50mg群、100mg群において、熱水抽出群は、乾燥粉末群に比較して相対的に有効性は高かった。乾燥粉末および熱水抽出物の両群の50mg投与群で有効性が見られた。逆に、熱水抽出50mg群ではフィブリン析出、線維芽細胞の有効性が消失していた。

考 察

病理組織学的な検討では液性免疫と細胞性免疫の共同作用から関節炎の慢性化へと進展する⁷⁾。

一般的に、生薬系の効果には釣鐘状の傾向が特徴であり、低濃度では効果がなくなり、高濃度になると抑制効果が無くなるのが認められる。追加感作後、Coccomyxa乾燥粉末および熱水抽出物を5 mg群、50mg群、100mg群経口投与を開始した。

DBA/1Jマウスの疾患対照群とCoccomyxa乾燥粉末および熱水抽出物を投与した6群間の関節病変の比較では、滑膜細胞の重層化、骨軟骨の結合組織置換、線維芽細胞増殖、多核白血球の増殖、軟骨細胞の空砲変性に対しても抑制を示した。

以上の研究結果から、Coccomyxaは誘導関節炎モデルマウスにおいて、滑膜病変、骨軟骨病変、炎症細胞の浸潤では、関節炎の発症抑制および治療効果を示した。ここでは最適用量の上限、下限が見られなく、今後は最適用量が見られる限界用量の確定が検討課題の一つである。また、Coccomyxa熱水抽出物中の有効成分が免疫学的作用機序にどのように関与しているのかの解析が重要である。

Coccomyxaは、分類学的にはクロレラに近いがクロレラと比較するとタンパク質含有量は少なく、炭水化物は約3倍と多いことが特徴である⁴⁾。さらに、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^{8)、9)}、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、免疫学的作用機序にどのように関与しているのか有効成分の解析が重要である。

文 献

- 1) Chiyuki Abe, Tadahiro Kikukawa, Yasuhiro Komatsu: Combination therapy on murine arthritis- Salazosulfa- pyridine, Bucillamine and Methotrexate. International Journal of Immunotherapy. Vol.XI, No.4, p.129-132, 1995.
- 2) 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TJ114の作用機序. 日本炎症学会雑誌. Vol.15, No.2, p.129-133, 1994.
- 3) 菊川忠裕, 安倍千之: 新規2系の関節炎モデルによる漢方薬の薬効評価. 痛みと漢方. Vol.12, p.18-24, 2002.
- 4) 江口文陽: 血液・血管の健康と食品素材 ココミクサの機能性食材としての可能性. Food Style.21. Feb 1, 2011.
- 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) 小金澤将太, 鷲見 亮, 森 伸夫, 小島正章, 安倍千之, 菊川忠裕: 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. くらしき作陽大学・作陽音楽短期大学研究紀要. 49, 145-153, 2016.
- 7) 安倍千之, 菊川忠裕, 小松靖弘, 後藤 真, 藤原栄一, 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: 395-399, 1995.
- 8) 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.
- 9) 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.

