

【原著】

クロレラの長期投与によるラットアジュバント関節炎モデルへの影響

齋藤昌子¹、中鉢博文¹、竹腰英夫¹、Kun-Yuan Lin²、Fong-Chi Cheng²、今西英世²¹ 株式会社サン・クロレラ
² リセルカバイオサイエンス(受付：平成 22 年 12 月 3 日)
(受理：平成 22 年 12 月 13 日)

要 旨

ラットアジュバント関節炎モデルを用いてクロレラの抗炎症作用を検討した。その結果、クロレラ粉末 1000 mg/kg の連続投与により、アジュバント処置肢および非処置肢の足蹠の腫脹を抑制する傾向がみられた。また、関節の破壊の程度を示す関節ラジオグラフィスコアの増加を抑制する傾向がみられ、特に、5 匹中 2 匹では片後肢の破壊が、1 匹では両後肢の破壊がまったく確認されなかった。さらに、尾の二次病変発症匹数を有意に抑制した。これらのことから、クロレラの連続経口摂取は、ラットアジュバント関節炎モデルに対する抗炎症作用を有することが明らかとなり、リウマチ性関節炎の改善に効果を有する可能性も示唆された。

キーワード：クロレラ、抗炎症作用、アジュバント関節炎

緒 言

直径 3 ~ 8 μm の単細胞緑藻であるクロレラは、タンパク質やクロロフィル、食物繊維、ミネラルさらにビタミンを含んでいることから、世界中で健康増進のために食されている^{1,2)}。

クロレラやその抽出物は、抗動脈硬化作用³⁾、ダイオキシン排出促進作用^{4,5)}、血糖降下作用⁶⁾、血圧上昇抑制作用⁷⁾などを有することが報告されている。また、我々は、クロレラ粉末品を用いた *in vitro* 試験において、シクロオキシゲナーゼ-1 (COX-1) と比較して、炎症反応に関与するシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の活性を選択的に阻害することを明らかにしている⁸⁾。

リウマチ性関節炎は、慢性かつ進行性の全身炎症性自己免疫疾患であり、進行に伴い関節の破壊と変形をきたし、やがては運動機能障害にいたる。その発症にはなんらかの免疫機構の関与が示唆されているが、原因はいまだ不明である。その治療には非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) や各種ステロイド薬、メトトレキサートが広く用いられているが、その服用は長期にわたることが多く、様々な副作用が問題となっ

ている^{9,10)} ことから、その予防や治療に漢方薬やサプリメントが用いられることも多い^{9,11,12)}。一方、これまでにリウマチ性関節炎に対するクロレラの作用に関する報告はない。

そこで、今回は、クロレラの抗炎症作用を、リウマチ性関節炎の代表的な動物モデルであるラットアジュバント関節炎モデル¹³⁾を用いて検討した。

材料と方法

1. 被験物質

被験物質は、クロレラ・ピレノイドサ種 (*Chlorella pyrenoidosa*) の乾燥粉末 ((株) サン・クロレラ製) を用いた。

2. 実験動物

5 週齢の雄性 Wister ラット (BioLasco Taiwan Co., Ltd., Taiwan) を用いた。実験動物は明暗 12 時間サイクル、温度 22-24°C、湿度 60-80% の飼育室で 1 ケージに 5 匹で 1 週間予備飼育した。その後、5 群に分け、1 群あたり 5 匹として実験を行った。第 1 群は未処置群、第 2 ~ 5 群

はアジュバント処置群とした。このうち、第 2 群は対照群、第 3 群は抗炎症薬デキサメタゾン投与群、第 4 群はクロレラ 1000 mg/kg 投与群、第 5 群はクロレラ 500 mg/kg 投与群とした。アジュバント関節炎惹起は乾燥結核死菌体 (*Mycobacterium tuberculosis*) (Difco Laboratories, Inc., USA) をホワイトミネラルオイル (Sigma, USA) に懸濁し、シリンジを用いて右後肢の足蹠皮下に 0.1 mg/0.1 ml 一回注射により行った。飼育期間中は、MF-18 固形飼料 (Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) と蒸留水を自由摂取させた。

本試験は、実験動物の管理と使用に関する指針 (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) (NRC 1996 年) に則ってリセルカバイオサイエンスにて行った。

3. 投与方法

クロレラ粉末を 2% Tween80 (Sigma, USA) 水溶液に懸濁し、アジュバント処置 7 日前から処置 21 日後までの 4 週間、1000 mg/kg および 500 mg/kg の濃度を、経口ゾンデ針を用いて 1 日 1 回連続経口投与した。デキサメタゾン (Sigma, USA) は、処置当日から 5 日間、5 mg/kg の濃度で 1 日 1 回連続経口投与した。対照群には、蒸留水を処置 7 日前から処置 21 日後までの 4 週間、10 ml/kg の容量で 1 日 1 回連続経口投与した。未処置群には何も投与しなかった。

4. 実験方法

(1) 足蹠容積測定

アジュバント処置前日に 1 回、処置当日から 3 日に 1 回の割合で処置肢の足蹠容積を Plethysmometer (Ugo Basile, Inc., Comerio, Italy) を用いた水置換により測定し、処置後の値から処置前日の値を減算することで足蹠容積増加量を算出した。ラットアジュバント関節炎モデルは、処置 3 日後にアジュバント処置肢の著しい関節炎 (一次炎症) が認められ、処置 10 日後あたりに非処置肢の持続性の関節炎 (二次炎症) が認められることが知られている¹⁴⁾。そこで、非処置肢に関しても、処置 13 日後から 3 日に

1 回の割合で足蹠容積を水置換により測定し、測定値から処置 13 日後の値を減算することで足蹠容積増加量を算出した。

(2) 二次炎症発症匹数測定

アジュバント処置後における炎症は、処置肢および非処置肢にとどまらず、二次的に尾部や耳、鼻にも認められることが知られている¹⁵⁾。そこで、試験最終日に、ラット各個体における、前肢足、尾、鼻および耳の炎症発症の有無を目視により観察した。

(3) 両後肢の X 線像撮影

試験最終日に両後肢を採取し、Xray Machine (Faxitron, X-ray LCC; Faxitron X-Ray Co., Illinois, USA) を用いて 30KV, 15 sec で X 線像を撮影した。得られた像は、次に示す指標を用いて片肢ずつ目視により 5 段階評価し、ラジオグラフィスコアとした。1=Normal、2=Minor bone deformity、3=Severe bone deformity at one site、4=Severe bone deformity at multiple sites、5=Ankylosis。

5. 統計処理

得られたデータは平均値±標準偏差で示した。未処置群と対照群の有意差検定は、Shapiro-Wilk 検定により正規性の確認を行ったところ、全ての項目で正規分布していなかったため Mann-Whitney の U 検定にて行った。対照群と、デキサメタゾン投与群、クロレラ 1000 mg/kg および 500 mg/kg 投与群の有意差検定は、Shapiro-Wilk 検定により正規性の確認を行い、正規分布している場合は、Levene の検定により分散性を確認し、等分散であれば Dunnett 法により、不等分散であれば Dunnett の T3 法により行った。正規分布していない場合は、Kruskal-Wallis の検定により群間を比較し、得られた p 値は Bonferroni 法による補正を行った。統計処理は、すべて SPSS version 15.0 を使用して行い、 $p < 0.05$ で評価した。

結 果

1. 足蹠容積

アジュバント処置肢に関しては、対照群は、未処置群と比較して持続的な腫脹が認められ、

デキサメタゾン投与群は、対照群と比較して腫脹を持続的に有意に軽減した (Fig.1)。クロレラ 1000 mg/kg 投与群では、有意ではなかったが腫脹を持続的に軽減する傾向がみられ、クロレラ 500 mg/kg 投与群についても、処置 16 日後から持続的に軽減する傾向がみられた。処置 22 日後の足蹠容積増加抑制率の平均値は、対照群と比較して、デキサメタゾン投与群では 26.5%、クロレラ 1000 mg/kg 投与群では 18.9%、クロレラ 500 mg/kg 投与群では 6.3%であった。

非処置肢に関しては、対照群は、未処置群と比較して持続的な腫脹が認められた。デキサメタゾン投与群やクロレラ 1000 mg/kg 投与群では、有意ではなかったが持続的に軽減する傾向がみられた。クロレラ 500 mg/kg 投与群では顕著な変化はみられなかった。

2. 二次炎症発症匹数

未処置群では、いずれの動物においても炎症

が確認されなかったのに対し、対照群では、5 匹全てのラットにおいて前肢および尾の炎症が確認された (100%) (Table 1)。デキサメタゾン投与群では、前肢では 3 匹で炎症が確認され(60%)、対照群と比較して炎症の抑制傾向がみられた。さらに、尾では全く炎症が確認されず (0%)、尾の炎症を有意に抑制した (p=0.003)。クロレラ 1000 mg/kg、500 mg/kg 投与群では、いずれも前肢では 4 匹 (80%)、尾では 1 匹 (20%) しか炎症が確認されず、尾の炎症を有意に抑制した (p=0.018)。鼻と耳に関してはいずれの群においても炎症は確認されなかった。

3. 両後肢関節のラジオグラフィスコア

未処置群では全ての動物で両肢ともスコア 1 で正常であり関節の破壊が確認されなかった (Fig.2)。一方、対照群では、処置、非処置の両後肢とも高く (処置肢:4.8 ± 0.5、非処置肢: 3.4 ± 0.6)、アジュバント処置による関節の破

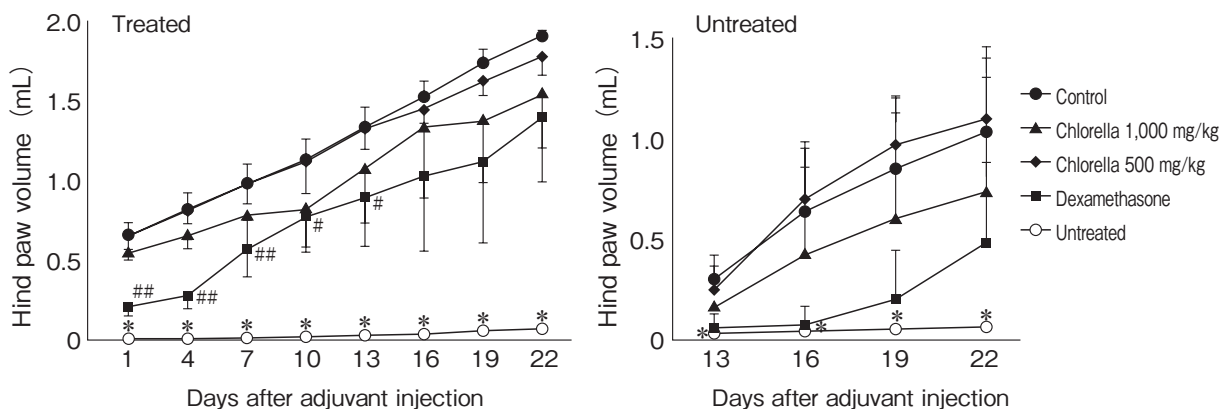


Fig.1 Effect of Chlorella Powder on paw inflammation in rats adjuvant arthritis model.

Chlorella Powder was given orally for 28 days. Dexamethasone was given orally for 5 days.

Date are expressed as the mean ± SD (n=5).

* p<0.01 vs control for Mann-Whitney's U-test. #p<0.05 and ##p<0.01 vs control for Levene's test followed by Dunnett's test or Bonferroni's test.

Table 1. Polyarthritis of front paw and tail

| | Front paw | Tail |
|-----------------------|----------------|------------------|
| Control | 5 | 5 |
| Chlorella 1,000 mg/kg | 4 | 1 [#] |
| Chlorella 500 mg/kg | 4 | 1 [#] |
| Dexamethasone | 3 | 0 ^{###} |
| Untreated | 0 [*] | 0 [*] |

* p<0.01 vs control

p<0.05 and ## p<0.01 vs control

壊が確認された。デキサメタゾン投与群では、処置肢は 1.6 ± 0.6 、非処置肢は全ての動物で 1 であり、対照群と比較して関節の破壊が有意に抑制された（処置肢： $p=0.006$ 、非処置肢： $p=0.027$ ）。クロレラ 500 mg/kg 投与群では対照群との差はみられなかったが、クロレラ 1000 mg/kg 投与群では、処置肢は 3.2 ± 2.1 、非処置肢は 2.4 ± 1.7 であり、スコアが低下する傾向がみられた。特に、処置肢、非処置肢とも、5 匹中 2 匹がスコア 1 で正常であり、1 匹は両肢ともスコア 1 であった。

考 察

クロレラの抗炎症作用を、関節リウマチの代表的なモデルであるラットアジュバント関節炎モデルを用いて検討した。その結果、クロレラの連続経口摂取により、アジュバント処置肢にあらわれる腫脹を初日から継続的に抑制する傾向が確認された。関節ラジオグラフィスコアについては、両後肢とも低下する傾向がみられ、関節の破壊が抑えられる傾向が認められた。特にクロレラ 1000 mg/kg 投与群では、5 匹中 2 匹では片後肢の破壊が、1 匹では両後肢の破壊がまったく確認されなかった。クロレラという「食品」の連続経口摂取により、後肢関節の破壊がまったくみられなかったというこの結果は、個体差を考慮しても大いに注目されるべき点といえよう。二次炎症の発症については、尾では有意に抑制し、前肢でも抑制傾向を示した。

以前我々が行った *in vitro* 試験によると、クロレラが COX-1 と比較して COX-2 の活性を選択的に阻害することが確かめられている⁸⁾。また、関節リウマチの発症に関与し、関節の破壊を促進する酵素である human matrix metallo-proteinases (MMP)-3 の活性を低下させることも報告している¹⁶⁾。今回の試験でも、クロレラの摂取が MMP-3 にも影響を与えて抗炎症作用を発揮しているのかもしれない。

今回の試験で使用した抗炎症薬デキサメタゾンは、関節リウマチの緩和にも用いられているが、長期間摂取すると消化管障害などの副作用が発生することから、使用が制限されている^{9,17)}。今回の試験において、食品であるクロレラを長期間経口摂取することにより、ラットアジュバント関節炎モデルに対する抗炎症作用が認められた。このことはすなわち、クロレラは、慢性炎症しいてはリウマチ性関節炎に対する予防または緩和作用を有する注目すべき素材といえよう。今後は、クロレラが炎症に与える影響やメカニズムについて、よりいっそう究明していきたい。

文 献

- 1) Chen JH, Jiang SJ: Determination of cobalamin in nutritive supplements and chlorella food by capillary electro-phoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Agric Food Chem* **56**: 1210-1215 2008

| | Scores | Treated X-ray analysis | Scores | Untreated X-ray analysis |
|-----------------------|--------------------|---------------------------|--------------------|-----------------------------|
| Control | 4.8 ± 0.5 | | 3.4 ± 0.6 | |
| Chlorella 1,000 mg/kg | 3.2 ± 2.1 | | 2.4 ± 1.7 | |
| Chlorella 500 mg/kg | 4.6 ± 0.6 | | 3.6 ± 0.9 | |
| Dexamethasone | $1.6 \pm 0.6^{##}$ | | $1.0 \pm 0.0^{\#}$ | |
| Untreated | $1.8 \pm 0.0^*$ | | $1.8 \pm 0.0^*$ | |

Fig.2 Radiograph scores and X-ray analysis of hind paw in rats adjuvant arthritis model.

Chlorella Powder was given orally for 28 days. Dexamethasone was given orally for 5 days. Data are expressed as the mean \pm SD (n=5).

* $p < 0.01$ vs control for Mann-Whitney's U-test. # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ vs control for Levene's test followed by Dunnett's test or Bonferroni's test. Two animals administered Chlorella Powder at 1,000 mg/kg showed normal score of 1 († score 1).

- 2) Hiromi KK, Tomoyuki F, et al.: Puri-fication and characterization of a corrinoid compound from *Chlorella* Ta-blets as an algal health food. *J Agric Food Chem* **50**: 4994-4997 2002
- 3) Cherng JY, Shih MF: Preventing dyslipidemia by *Chlorella pyrenoidosa* in rats and hamsters after chronic high fat diet treatment. *Life Sci* **76**: 3001-3013 2005
- 4) Shiro N, Taketoshi N, et al.: Mater-nal-fetal distribution and transfer of dioxins in pregnant women in Japan, and attempts to reduce maternal transfer with *Chlorella* (*Chlorella pyrenoidosa*) supplements. *Chemosphere* **61**: 1244-1255 2005
- 5) Shiro N, Hideo T, et al.: *Chlorella* (*Chlorella pyrenoidosa*) supplementa-tion decreases dioxin and increases immunoglobulin A concentrations in breast milk. *J Med Food* **10**: 134-142 2007
- 6) Shinya S, Kazuhito H, et al.: Hypo-cholesterolemic mechanism of *Chlorella*: *Chlorella* and its indigestible fraction enhance hepatic cholesterol catabolism through up-regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase in rats. *Biosci Bio-technol Biochem* **1**: 916-925 2007
- 7) Hiroshi S, Masatoshi T, et al.: Effect of *Chlorella* and its Fractions on Blood Pressure, Cerebral Stroke Lesions, and Life-span in Stroke-prone Spontaneously Hypertensive Rats. *J Nutr Sci Vitaminol* **52**: 457-466 2006
- 8) Cheng FC, Feng JJ, et al.: *Chlorella* powder inhibits the activities of peptidase cathepsin S, PLA2, cy-clooxygenase-2, thromboxane synthase, tyrosine phosphatases, tumor necrosis factor-alpha converting enzyme, calpain and kinases. *Int J Food Sci Nutr* **60**: 89-98 2008
- 9) Ikuko K, Yasuo M: Effect of Dokka-tsu-kiseigan on Hyperalgesia in Rat Chronic Arthritis Model. *Kampo and the Newest Therapy* **12**: 265-271 2003
- 10) Kremer JM, Alarcon GS, et al.: Clinical, laboratory, radiographic, and histo-pathologic features of methotrexate-associated lung injury in patients with rheumatoid arthritis. a multicenter study with literature re-view. *Arthritis Rheum* **40**: 1829-1837 1997
- 11) Machiko O, Fang T, et al.: Effect of kampo medicine extracts in adju-vant-induced arthritis in rats. *The Bone* **16**: 561-567 2002
- 12) Phillip G, John DB, et al.: Antiin-flammatory Properties of the Muscadine Grape (*Vitis rotundifolia*). *J Agric Food Chem* **53**: 8481-8484 2005
- 13) Yoshimasa K, Ken Y, et al.: Effect of Methanol Extract from Fruit Body of *Mycocleptodonoides aitchisonii* on Acute and Chronic Inflammation Models. *J Food Hyg Soc Jpn* **40**: 368-374 1999
- 14) Hideaki M, Kiyoshi T, et al.: Effect of long-term administration of *Corydalis tuber* extract on rat adjuvant arthritis. *J Trad Med* **15**: 64-69 1998
- 15) Fang T, Yucca N, et al.: Effects of Kampo Medicine on the Arthritis Score and Histological Change of Synovitis in Adjuvant-Induced Arthritis in Rats. *Jpn J Orient Med* **49**: 419-428 1998
- 16) Fong C.C, Atsui L, et al.: Effects of *Chlorella* on activities of protein tyrosine phosphatases, matrix metal-loproteinases, caspases, cytokine re-lease, B and T cell proliferations, and phorbol ester receptor binding. *J Med Food* **7**: 146-152 2004
- 17) Shinichi K, Hikaru N, et al.: Increased susceptibility of small intestine to NSAID-provoked ulceration in rats with adjuvant-induced arthritis: Involve-ment of enhanced expression of TLR4. *Life Sci* **81**: 1309-1315 2007

連絡先：齋藤 昌子
株式会社サン・クロレラ 生産開発足寄グループ
北海道足寄郡足寄町下愛冠 1 丁目 4 番地 (〒 089-3707)
Tel : 0156-25-5300 Fax : 0156-25-4706
E-mail : msaito@sunchlorella.co.jp

Effects of long-term administration of *Chlorella* in rat model of adjuvant arthritis

Masako SAITO¹, Hirofumi CHUBACHI¹, Hideo TAKEKOSHI¹,
Kun-Yuan Lin², Fong-Chi Cheng², Hideyo IMANISHI²

¹Sun Chlorella Corp
²Ricerca Bioscience, LLC

Summary

The anti-inflammatory effect of *Chlorella pyrenoidosa* (Chlorella) was investigated using rat model of adjuvant arthritis (AA). Oral preventive administration of Chlorella powder was initiated 7 days before adjuvant treatment and continued 21 days after adjuvant treatment. Long-term administration of Chlorella powder (1,000 mg/kg) significantly inhibited the secondary inflammation in tails of AA rats ($p < 0.05$). In addition, all rats had joint destruction in both adjuvant-treated and untreated hind paws in AA control group, on the other hand, in the Chlorella group, 3 of 5 rats did not show joint damage in either one hind paw or both hind paws. These results suggest that continuous oral intake of Chlorella has an anti-inflammatory effect in AA rats. Therefore, Chlorella appears to be a promising preventive agent without adverse effects for human rheumatoid arthritis.

(Med Biol **155**: 72-77 2011)

Key words: chlorella, anti-inflammatory, adjuvant arthritis

Correspondence address: Masako SAITO
Production and Development Ashoro Group, Sun Chlorella Corp.
1-4 Shimoaikappu, Ashoro-cho, Ashoro-gun, Hokkaido 089-3707, Japan
E-mail: msaito@sunchlorella.co.jp