

株式会社日本メディカル研究所御中

研究報告書

非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサ
ミン、コンドロイチン、キヤッツクローの配
合物による抗関節炎・腰痛及び抗リュウマ
チ効果に関する研究

純真学園大学保健医療学部

Graduate School of Medical Science, Suzuka University of

Medical Science(Visiting professor)

教授・漢医師・健康科学博士 具 然和

平成 26 年 10 月 10 日

要約

【目的および方法】慢性関節リュウマチは慢性の多関節炎であり、進行性に関節破壊が進展し関節変形をきたす自己免疫疾患であるが、原因ならびにその根本的治療に関してはさまざまなアプローチにもかかわらず現在まで原因不明である。また抗リュウマチ薬、非ステロイド性抗炎症剤、副腎皮質ステロイド剤、免疫調整剤など薬剤はさまざまな副作用を伴い、難治性の患者が少なくない。したがって、有効性が高く副作用の少ない抗リュウマチ薬の登場が期待されている。本研究では、抗炎症効果の報告がある非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤッツクローの配合物について、以下の検討を行った。

非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤッツクローの配合物はラットやマウスの単回および測定前数回投与による足浮腫実験により抗炎症効果が報告されているが、その効果は少ない。本実験では14日間継続投与による足浮腫実験を行い継続投与による効果の検討を行った。また、非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤッツクローの配合物群に対して抗リュウマチ効果の有無を検討した。

血清中の総IgEを測定しその消炎効果を検討し、IgG、IgMの測定を行い免疫に関する検討および、自己免疫疾患であるRAに関係しているといわれるTNF- α 、IL-4のサイトカインについても検討し、消炎効果のメカニズム的検討を行った。

非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤッツクローの配合物群は*In Vitro*での個々に対しては抗酸化効果の報告がある。本実験では*In Vivo*での抗酸化効果を、ルミネッセンスリーダーならびにSOD測定により検討した。

【結果】Carrageenan足浮腫試験において、非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤッツクローの配合物群の消炎効果が明らかとなった。非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤッツクローの配合物のTNF- α 生成抑制効果が明らかとなった。非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤッツクローの配合物群において、IL-4濃度が有意に増加した。IgEは非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤッツクローの配合物群はコントロール群と比較して、統計学的優位差を示した。IgMは、非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤッツクローの配合物群に優位な低下が見られた。IgGは、非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤッツクローの配合物群で優位に高値を示した。ルミノールおよびSODによる抗酸化測定試験において、非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤッツクローの配合物群および非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤッツクローの配合物群の抗酸化能力が明らかとなった。

【まとめ】非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤッツクローの配合物群はTNF- α 生成を抑制し、IL-4を増加させることにより、RAや自己免疫

疾患による炎症を抑制した抗リュウマチ薬として期待できる。

【研究背景】

慢性関節リュウマチは、多関節炎を主徴とした全身性炎症疾患である。関節炎病変局所では、血管新生、CD4+T-cellを主体としたリンパ球浸潤、滑膜細胞の異常増殖、骨破壊などが見られ、様々な作用により病体が形成されている。この作用にはサイトカインが関与していることが上げられており、RA 病変には、炎症性および Th1 型サイトカインである TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-12 また抗炎症性および Th2 型サイトカインなど様々なサイトカイン、ケモカインが見つかっており複雑な環境であることがわかる¹⁻²⁾。

T ヘルパー(Th)細胞はそのサイトカイン生産性により、IL-2、IFN- γ を産生し細胞性免疫に関与した Th1 型細胞と IL-4、IL-5 を産生し、液性免疫や IgE 媒介性アレルギー反応に関与した Th2 型細胞に分類される。多くの免疫疾患病態はこの Th1/Th2 型サイトカインのバランス異常が見られる。ことに自己免疫疾患であるインスリン依存型糖尿病、橋本甲状腺炎など臓器特異的自己免疫疾患においては Th1 型へ、全身性エリマトーデスなどの全身性自己免疫疾患の一部では Th2 型への偏りが見られる³⁾。

RA の複雑なサイトカインカスケードの中でも TNF- α 、IL-1、IL-6、GM-CSF などが病態形成には重要である。コラーゲン誘発性関節炎(collagen-induced arthritis : CIA) は、これらサイトカインの投与により増強し、中和抗体により抑制される。さらに TNF- α トランジェニックマウス⁴⁾や IL-1 の作用が過剰に発現した IL-1 受容体アンタゴニスト欠損マウスでは RA 様の関節炎が発症し、新しい関節炎モデルとなっていることも、これらサイトカインの過剰な機能が関節炎の発症に関与していることを示している。CIA では、IL-4 や IL-10 の投与で Th1 型細胞機能抑制を介した治療効果があり、逆に抗 IL-10 抗体や抗 TGF- β 抗体の投与は、関節炎を増悪させることから内因性に産生される IL-10 や TGF- β が疾患防御的に作用していると考えられる³⁾。

【研究目的】

慢性関節リュウマチは慢性の多関節炎であり、進行性に関節破壊が進展し関節変形をきたす自己免疫疾患であるが、原因ならびにその根本的治療に関してはさまざまなアプローチにもかかわらず現在まで原因不明である。慢性関節リュウマチの治療には狭い意味での抗リュウマチ薬、非ステロイド性抗炎症剤、副腎皮質ステロイド剤、免疫調整剤などが用いられているが、それらの薬剤はさまざまな副作用を伴い、難治性の患者が少なくない。したがって、有効性が高く副作用の少ない抗リュウマチ薬の登場が期待されている。

本研究では副作用のない天然物質であり、抗炎症効果の報告がある非変性2型コ

ラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤツクローの配合物の消炎効果の検討およびメカニズム的解析を行った。

非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤツクローの配合物はラットやマウスの単回および測定前数回投与による足浮腫実験により抗炎症効果が報告されているが、その効果は少ない。本実験では非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤツクローの配合物の14日間継続投与による足浮腫実験を行い継続投与による効果の有無について検討した。

血清中の総IgEを測定しその消炎効果を検討し、IgG、IgMの測定を行い免疫に関する検討および、自己免疫疾患であるRAに関係しているといわれるTNF- α 、IL-4のサイトカインについても検討し、消炎効果のメカニズム的検討を行った。

【研究方法】

1. 研究材料

UC-2: 40mg、グルコサミン: 100mg、コンドロイチン: 20mg、キヤツクロー: 20mg、

2. Carrageenan 足浮腫試験

Wister系ラット雄4週齢1群10匹を用い、22 \pm 3 $^{\circ}$ C、湿度60-70%の状況下で、飼料及び水は自由摂取とし1週間の予備飼育後、非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤツクローの配合物群を500ml/Kg、Control群には蒸留水の経口投与(胃ゾンデによる強制投与)を毎日行った。投与開始14日後に起炎物質1.5% Carrageenan(No.039-09691, Wako) 生理食塩水0.1mlを左後肢足蹠皮下に注入し、接種1hr後より浮腫測定装置(UGO BASILE ビーエム機器製)により測定。その後1時間ごとの足容積(ml)を4時間まで計測し、12、24、36、48、60、72時間後までの足容積(ml)および浮腫率(%)を求め、Control群に対して5%以下の危険率で有意になった場合を有効とした。浮腫率は、以下の式より求めた。

$$\text{浮腫率(\%)} = ((V_t - V_o) / V_o) * 100$$

V_t: 起炎物質接種後一定時間経過時の足容積(ml)

V_o: 起炎物質接種直後の足容積(ml)

3. BALB/C マウスの血液による Total IgE, IgG, IgM, TNF- α , IL-4 の測定

BALB/C マウス♂5週齢1群3匹を用い、22 \pm 3 $^{\circ}$ C、湿度60-70%の状況下で、飼料及び水は自由摂取とし1週間の予備飼育後、非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤツクローの配合物と非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤツクローの配合物群を500ml/Kg 経口投与(胃ゾンデによる強制投与)を1ヵ月間行い総IgE、IgG、IgM、TNF- α 、IL-4の測定を行った。

3-2. BALB/C マウスの眼底採血を100 Haematokrit-Kapillaren 75mm/75 μ lを用いて行った。採集した血液は遠心分離(Kubota 10min, 1000rpm)にかけ血清分離後、測定

に用いた。Control 群に対して 5%以下の危険率で有意になった場合を有効とした。

TNF- α 測定

PIERCE ENDOGEN 社の Mouse TNF- α ELISA Kit EMTENFA (code RPN2718)を用いて測定を行った。キットを室温に平衡し(m)TNF- α microtitre plate に、希釈した(m)TNF- α standard および Sample を定めた well に 50 μ l 加え、その後 Biotinylated Antibody Reagent を 50 μ l 加えた。Cover plate にてカバーし、室温にて 2 時間インキュベート後、Auto mini washer(バイオテック株式会社)を用いて 5 回洗浄した。洗浄後、作成した Streptavidin-HRP Solution を各 well に 100 μ l ずつ加え、Cover plate にてカバーし、室温にて 30 分インキュベート後、5 回洗浄した。TMB Substrate Solution を 100 μ l 加え室温暗所にて 30 分インキュベートし、発色確認後 Stop Solution を 100 μ l 加え MICRO PLATE READER MPR-A4 (TOYOSODA)を用い filter450nm にて測定した。

IL-4 測定

Amersham Biosciences 社の IL-4 , Mouse , Biotrak ELISA System (code RPN2712)を用いて測定を行った。キットを室温に平衡し(m)IL-4 microtitre plate に Plate reagent を 50 μ l 加え、希釈した(m)IL-4 standard、Standard diluent および Sample を定めた well に 50 μ l ずつ加えた。その後 Cover plate にてカバーし、37°C \pm 2°Cで 2 時間インキュベート後、Wash buffer にて 5 回洗浄し、Conjugate を 100 μ l 加え Cover plate にてカバーし、37°C \pm 2°Cで 1 時間インキュベートした。Wash buffer にて 5 回洗浄し、Pre-mixed TMB substrate solution を 100 μ l 加え室温暗所にて 30 分インキュベーションし Stop solution を 100 μ l 加え MICRO PLATE READER を用い filter450nm にて測定した。

総 IgE 測定

BIOTRAK 社の IgE , Mouse , Assay (code RPN2704)を用いて測定を行った。キットを室温に平衡し(m)IgE microtitre plate に、希釈した(m)IgE standard および Sample を 100 μ l 加え、Cover plate にてカバーし、室温(20-25°C)にて 30 分インキュベート後 Wash buffer にて 3 回洗浄した。その後、作成した antibody-HRP conjugate を各 well に 100 μ l ずつ加え、Cover plate にてカバーし、室温にて 30 分インキュベート後、3 回洗浄した。TMB Substrate Solution を 100 μ l 加え室温にて 15 分インキュベートし、発色確認後 Stop Solution を 100 μ l 加え MICRO PLATE READER を用い filter450nm にて測定した。

IgG , IgM 測定

ベツチル社の Mouse IgG ELISA Quantitation Kit (catalog No.E90-131)、Mouse IgM ELISA Quantitation Kit (catalog No.E90-101)ならびに ELISA Starter Accessory Package (catalog No.E101)を用いて測定を行った。96well plate に、Coating Solution を 100 μ l 加え、室温(20-25°C)にて 60 分インキュベート後、Wash buffer にて 2 回洗浄

し、Postcoat Solution を 200 μ l 加え 30 分インキュベートし、2 回洗浄した。希釈した (m)IgE standard および Sample を 100 μ l 加え、室温にて 60 分インキュベート後、4 回洗浄した。希釈した Goat anti-Mouse IgG (IgM) -Fc-HRP Solution を 100 μ l 加え 60 分インキュベート後、4 回洗浄した。作成した TMB Solution を 100 μ l 加え室温にて 10 分インキュベートし、発色確認後 Stop Solution を 100 μ l 加え MICRO PLATE READER を用い filter450nm にて測定した。

5. データの統計処理

実験結果は平均値 \pm 標準偏差で表し、一次検定として 1 群(コントロール)に対しての各試験試料投与群の評価を ANOVA 検定によりおこない、その後有意差のあるものに対して二次検定として Student の t 検定を実行し 1 群(コントロール)と各試験試料投与群との比較をおこなう。

【研究結果】

1. Carrageenan 足浮腫試験

1. 足容積(ml)

各群とも、carrageenan 接種 1 時間後に第 1 のピークがみられ 12 時間後に第 2 のピークが認められた。

非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キャッツクローの配合物群は、control 群に対し接種 12、24、36 時間に有意な足体積低下が認められ ($p < 0.05$)、60、72 時間後にも有意な低下が認められた ($p < 0.01$)。また、48 時間後には統計学的優位差は認められなかったものの、control 群に対し低値を示した。

非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キャッツクローの配合物群は、control 群に対し接種 3 時間後より有意な足体積低下が認められ ($p < 0.05$ 、 $p < 0.01$)、その効果は 72 時間後まで持続した。(Figure.1)。

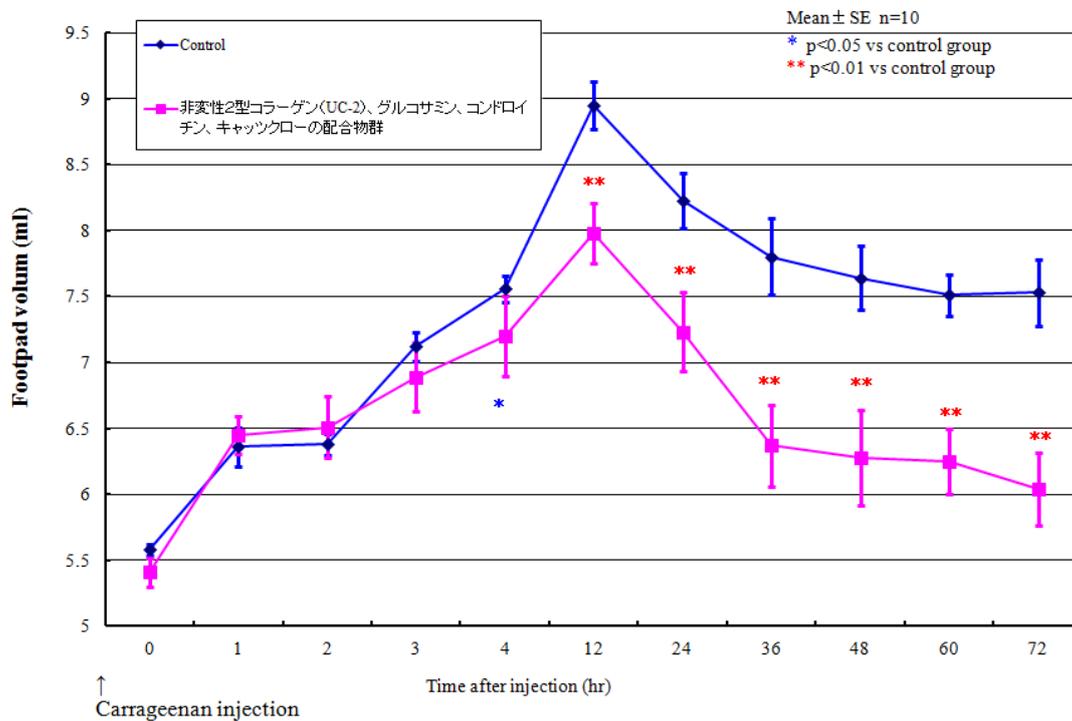


Fig.1. This image of rat food pat volum (ml). Significant differences were detected between the control group and the three administration groups on 24 and 72 hours (**p<0.01, *p<0.05).

2. 浮腫率(%)

非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤツクローの配合物群は、control 群に対し接種 24、60 および 72 時間後に有意な低下が認められた(p<0.05、p<0.01)。また、36、48 時間後には統計学的優位差は認められなかったものの、control 群に対し低値を示した。

control 群に対し、非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤツクローの配合物群と比較し、その炎症抑制効果は高く、配合量依存性が示唆された(Fig.2)。

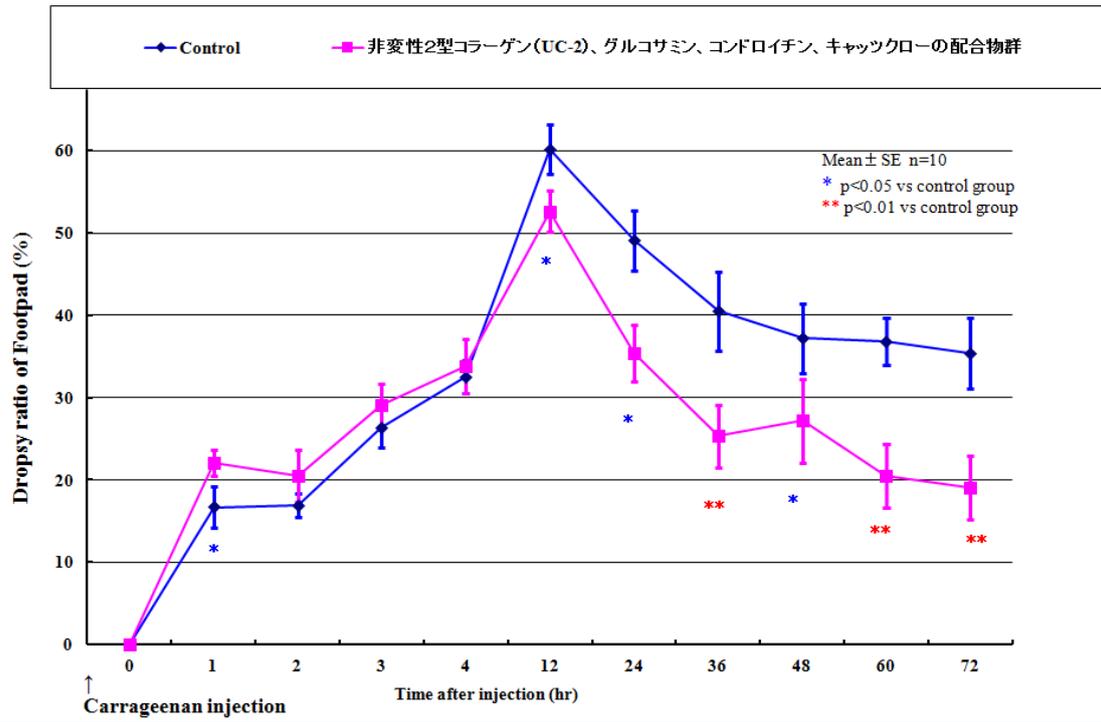


Fig.1 This image of rat food pat volum (ml). Significant differences were detected between the control group and the three administration groups on 24 and 72 hours (**p<0.01, *p<0.05).

2. BALB/C マウスの血液による Total IgE , IgG , IgM , TNF- α , IL-4 の測定

2. 1 TNF- α

control 群に対し非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤッツクローの配合物は、低値を示した。(Fig.3)。

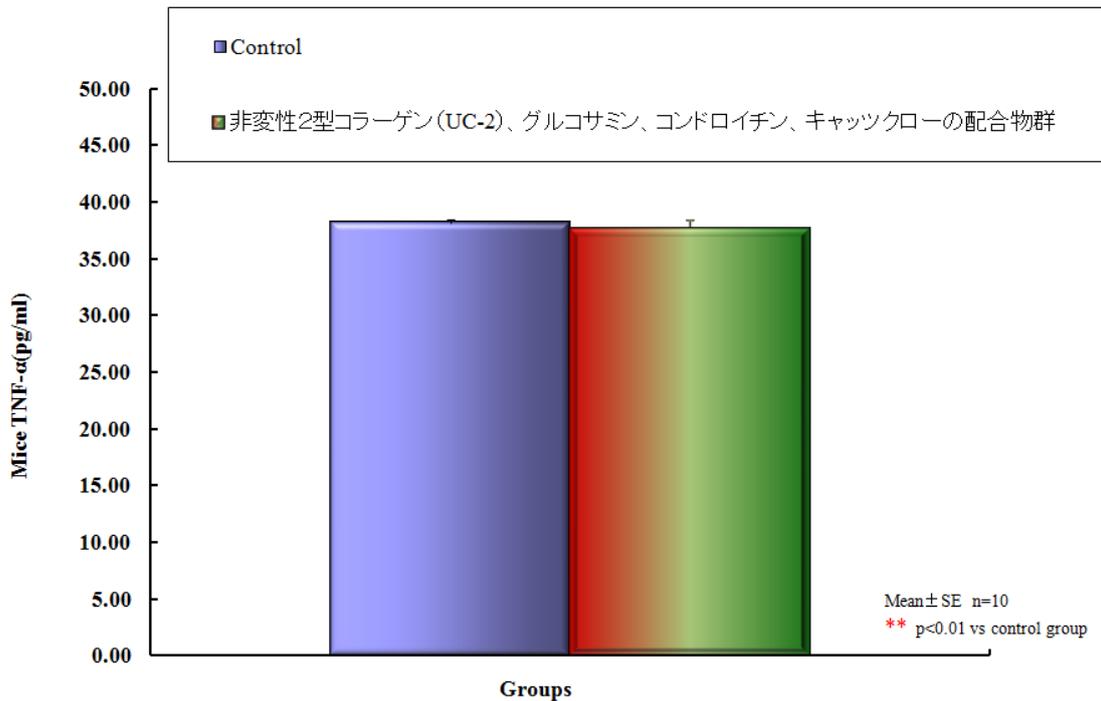


Fig.3. Blood levels of TNF- α in male mice. (pg/ml). There was significant difference in blood levels of TNF- α between the control group and the UC-2 combined group (**p<0.01).

2. 2 IL-4

control 群に対し、非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤッツクローの配合物群は、優位に高値を示した(p<0.05)。(Fig.4)。

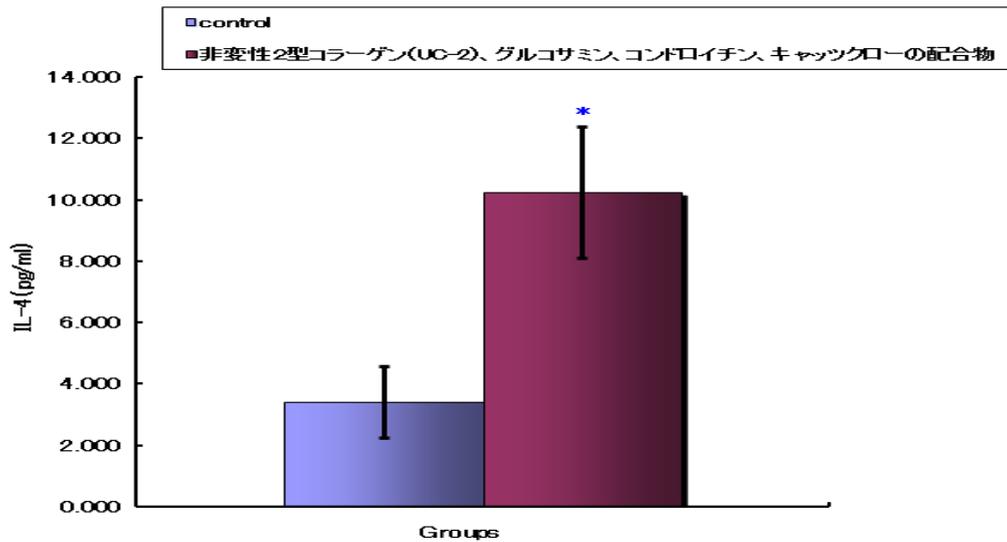


Fig.3. Blood levels of TNF- α in male mice. (pg/ml). There was significant difference in blood levels of TNF- α between the control group and the UC-2 combined group (**p<0.01).

2. 3 IgE

control 群に対し非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤツクローの配合物群は、低値を示した。(Fig.5)。

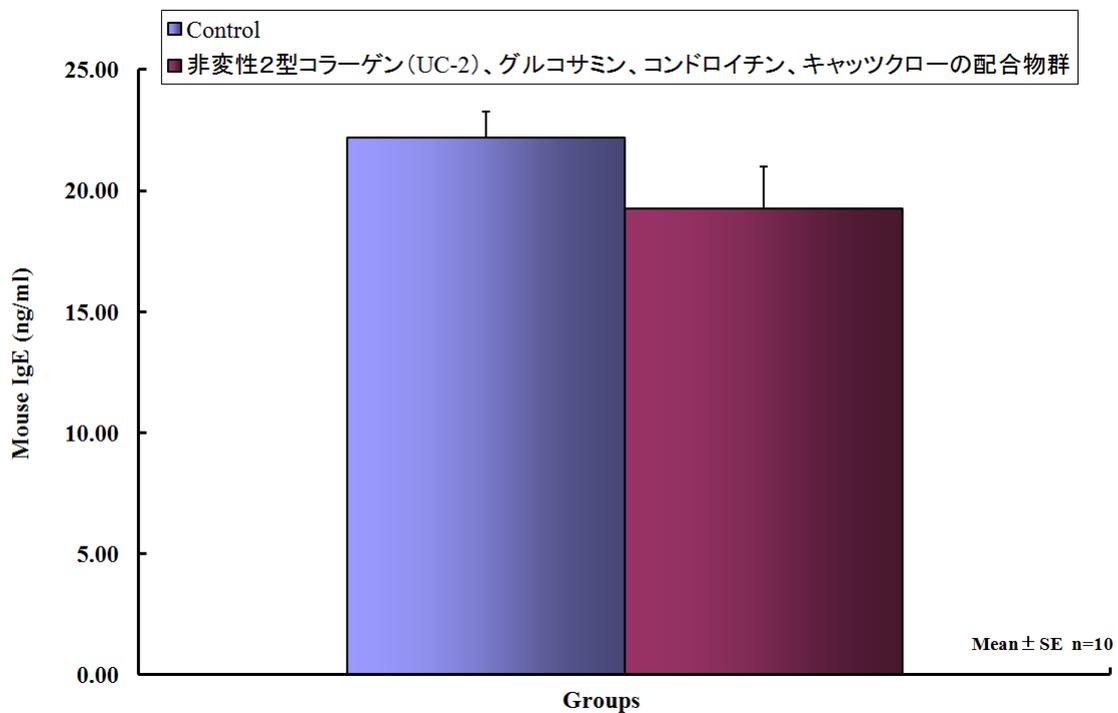


Fig.5. Blood levels of Total IgE in male mice. (ng/ml). There was no significant

difference in blood levels of Total IgE between the control group and UC-2 combined groups.

2. 4 IgM

control 群に対し非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤツクローの配合物群、非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤツクローの配合物群は優位に低値を示した($p < 0.05$) (Fig.6)。

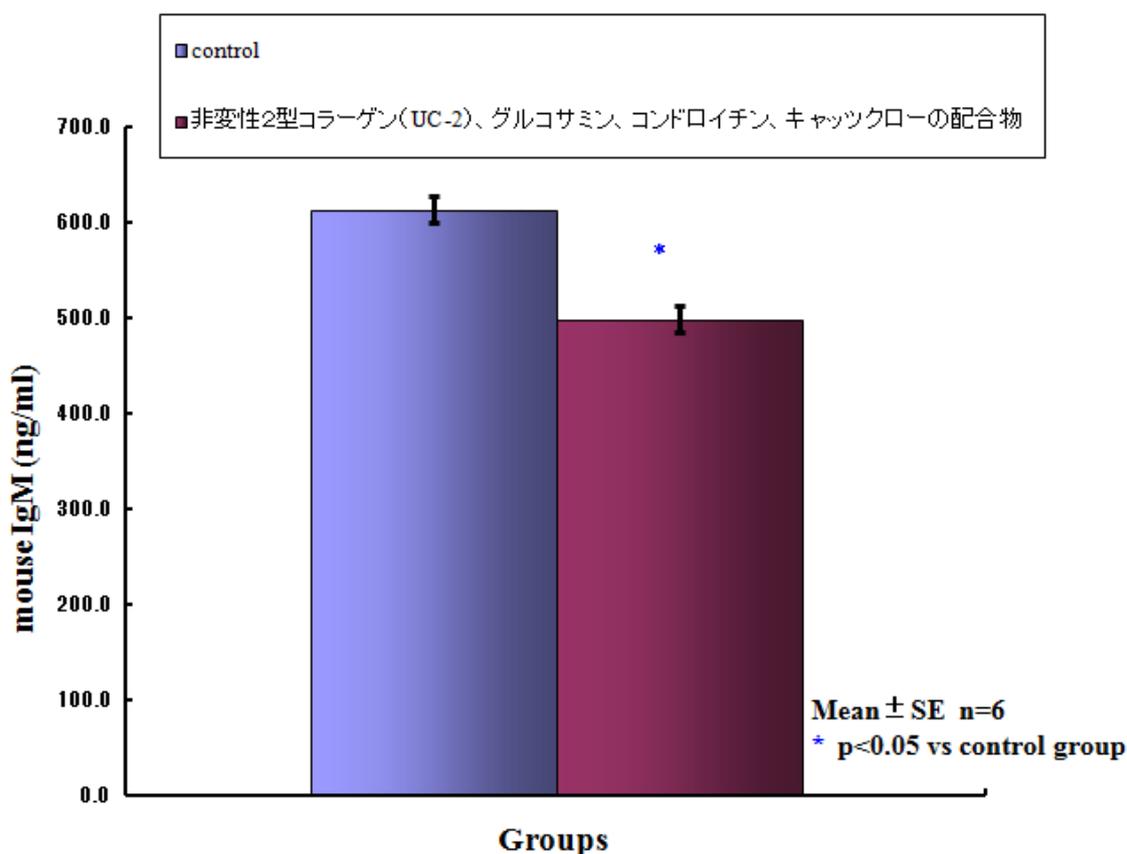


Fig. 6. Blood levels of IgM in male mice. (ng/ml). There was significant difference in blood levels of IgM between the control group and UC-2 combined group (* $p < 0.05$).

2. 5 IgG

control 群に対し非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤツクローの配合物群($p < 0.05$)群は優位に高値を示した($p < 0.01$)。 (Fig.7)。

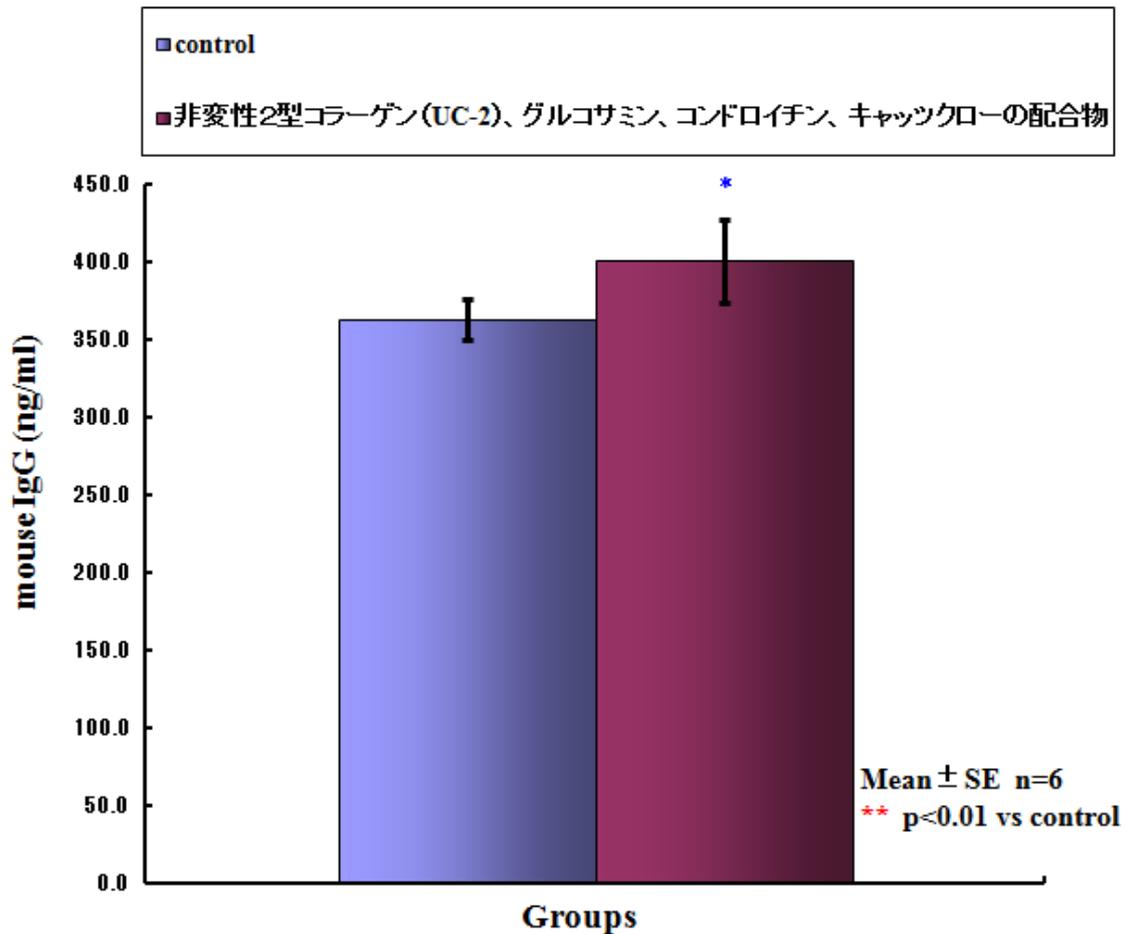


Fig.7. Blood levels of IgG in male mice. (ng/ml). There was significant difference in blood levels of IgG between the control group and the UC-2 combined group (*p<0.05).

【考察】

1. Carrageenan 足浮腫試験

環境の変化や食生活の変化からアレルギーに関する関心が高まっている。アレルギーには様々なタイプが存在したが、その根本は炎症によるものが多い。また、慢性関節リュウマチは慢性の多関節炎であり、進行性に関節破壊が進展し関節変形をきたす自己免疫疾患であるが、原因ならびにその根本的治療に関してはさまざまなアプローチにもかかわらず現在まで原因不明である。慢性関節リュウマチの治療には狭い意味での抗リュウマチ薬、非ステロイド性抗炎症剤、副腎皮質ステロイド剤、免疫調整剤などが用いられているが、それらの薬剤はさまざまな副作用を伴い、難治性の患者が少なくない。したがって、有効性が高く副作用の少ない抗リュウマチ薬、抗炎症薬の登場が期待されている。本研究では、消炎効果の検討によく用いられる Carrageenan 足浮腫試験において非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コン

ドロイチン、キャツクローの配合物群の消炎効果の検討を行った。

非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キャツクローの配合物群の成分に抗炎症作用を促すキノビク酸や抗潰瘍、抗酸化作用を示すポリフェノール系成分(フェノールグルコシド、ジヒドロキシ安息香酸、フォルフェニン)である。成分について次のような消炎効の果報がある。Yepez, A. M.らは、*Uncaria guianensis* に含まるベータシステロール酸、抗酸化物質といった植物性ステロールには消炎作用があり、新たに *Uncaria guianensis* の樹皮や根に発見されたキノビクアシッドグリコシドと呼ばれる新しい植物化学成分は *Uncaria guianensis* に含有されている最も強力な消炎成分であると報告している⁵⁾。また、Aquino, R.らは、*Uncaria tomentosa* とこれら活性成分が生体内外の様々な条件において 46~69%炎症を抑制したと報告している⁵⁾⁻¹¹⁾。

非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キャツクローの配合物群の活性成分及び作用機序は完全には明らかにされていないが、抗炎症薬の作用機序は、発痛物質プロスタグランジンの前駆物質であるアラキドン酸の代謝阻害をしたことであり、非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キャツクローの配合物はアラキドン酸の代謝を阻害したことが考えられる。

2. BALB/C マウスの血液による Total IgE , IgG , IgM , TNF- α , IL-4 の測定

種々の免疫、アレルギー反応は、アレルギー性炎症反応が主座として捉えられている^{12),13)}。これに関与した炎症性細胞には好酸球、好中球、肥満細胞、リンパ球、マクロファージさらに血小板など種々の細胞がある。これら炎症性細胞の働きには様々なサイトカインが関係している。

Mosmann と Coffman らのグループは産生したサイトカインの分泌パターンによって T ヘルパー細胞を Th1 型と Th2 型の 2 つに分類した。マウスの CD4+T 細胞クローンを樹立し検索した結果、Th1 細胞では IFN- γ と IL-2 を産生分泌し、Th2 細胞では IL-4,IL-5,IL-6,IL-10 を産生分泌したことが示された^{14),15)}。これらの Th 細胞から産生されるサイトカインのプロファイルから Th1 型細胞は細胞性免疫に、Th2 型細胞は B 細胞を中心とした液性免疫に関与している。近年この免疫現象を Th1 と Th2 のバランス変化で理解しようとした流れがある¹⁶⁾。また、これら Th1 と Th2 のバランス、およびサイトカインに着目した抗サイトカイン療法が考えられている。

RA では、すでに IL-1、TNF- α 、IL-6 を標的とした抗サイトカイン療法が臨床に導入され、その理論が実証されている^{1,2,17,18)}。1993 年、Feldmann らは遅効性リウマチ薬抵抗性の難治性 RA を対象として、マウス・ヒトのキメラ抗体(cA2)による臨床治験を行い、10mg/kg で 79%、1mg/kg で 44%の有効率を認めたとしている¹⁾。効果は抗体投与後きわめて速やかに出現し、CRP など炎症所見も 72 時間以内に改善したとしている。

抗 TNF- α 抗体治療は、血中 IL-6、IL-1 濃度および可溶性 E-セレクトリン、可溶性 ICAM-1 レベルの低下をもたらす¹⁾。また、治療中には滑膜病変部の血管の E-セレクトリン、VCAM-1、ICAM-1 の発現低下も観察される¹⁾。すなわち抗 TNF- α 抗体療法は局所での炎症性サイトカインカスケードを制御し、さらに血管新生や血管内皮細胞に対する白血球の接着も制御して、病変局所への浸潤細胞を減少させる。さらに、cA2 は細胞が分泌した TNF- α を中和しただけでなく、膜型 TNF- α 発現細胞に対しても細胞障害性に作用し、炎症細胞を減少させる¹⁾。これらの作用が相まって治療効果が増幅されていると考えられる。また、Sandoval-Chacon M らは、cat's claw が酸化ストレスに対して細胞を守り、そして NF- κ B(NF - kappaB)の起動を否定したと報告している¹⁹⁾。これらの研究は cat's claw が効率的な抗炎症因子であるということを証明している。

本研究において TNF- α は、control 群に比較し非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤツクローの配合物群に優位な低下が認められた(p<0.01)。このことより非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤツクローの配合物は TNF- α 生成を抑制し、RA や自己免疫疾患による炎症を抑制できると考えられる。

M.Sandoval らは、Cat' claw が TNF α mRNA と apoptosis の発生も防いだと報告している²⁰⁾。しかし、Wagner H らは、Uncaria tomentosa の alkaloid の食能を、Lemaire I らは、非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤツクローの配合物群によって alveolar macrophages の IL-1 と IL-6 を刺激したと報告している^{21,22)}。

また、Sheng Y らは Uncaria tomentosa の水抽出物が、Vitoro で apoptosis の誘導と人腫瘍細胞の増殖の抑制による治療効果²³⁾を報告していることから、非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤツクローの配合物群には TNF- α を活発化させる働きがあることが推察される。そのため非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キヤツクローの配合物群に有意な低下が認められなかったと考えられる。

IgE 生産量は Th 細胞(Th1、Th2)からの IL-4 や、IFN- γ を中心としたサイトカインなどにより B 細胞外部からの調節を受けると同時に、B 細胞内部での機構によっても調節されている²⁴⁾。IL-4 によるヒトの IgE 生産誘導には、抗原および IL-4 に加えて何らかのシグナルが必要である。T 細胞と B 細胞との接触、CD40 リガンド、抗 CD40 抗体(CD40 の架橋)、Epstein-Barr ウイルスの感染、グルココルチコイドなどである。これらのシグナルが IL-4 と協同して B 細胞に IgE クラススイッチを誘導した。

Seddon, B らは、胸腺内の CD4+CD8-細胞や抹消の CD4+CD45RC-細胞が調節性 T 細胞として働き、IL-4 や TGF- β を分泌したことにより自己免疫性糖尿病を抑えることを報告している²⁵⁾。このことから、IL-4 や TGF- β などの免疫抑制性サイトカインは

自己反応性 T 細胞の活性化を直接抑えることで自己免疫抑制作用を発揮している可能性がある。

Mori, A らは、マウスにおいては IgE 抗体生産能が IL-4 遺伝子発現能により規定されている可能性が強いと結論した²⁶⁾。また、Okudaira, H らは、DAB/2 マウスおよび SJL マウスに 150R の X 線照射を行い、その spleen cell を Con A で刺激して IL-4 の遺伝子発現を検討した結果、150R の X 線照射により IL-4 の遺伝子発現は増加し、IgE 抗体生産能と IL-4 遺伝子の発現能の相関を確認している²⁷⁾。

本研究において IL-4 は、control 群に比較し非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キャッツクローの配合物群に優位な増加が認められた ($p < 0.05$)。

前述した Seddon, B らの報告より推察したと、非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キャッツクローの配合物群は、IL-4 を増加させ T 細胞の活性化を直接抑え、自己免疫を抑制したと考えられ、RA における消炎効果が期待できるものと思われる²⁴⁾。しかし、非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチンの配合物群は IL-4 の増加傾向が示されたが、IgE 生産は逆に低下傾向を示している。この結果は、IgE 抗体生産能と IL-4 遺伝子の発現能の相関に反した。しかし、IgE 生産誘導には、抗原および IL-4 に加えて何らかのシグナルが必要であることから、非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチンの配合物群にはこのシグナルを抑制した働きがあるものと考えられる。

IgM、IgG 生産は B 細胞が関与している。免疫の流れは以下のようにになっている。好中球、Mφ による非特異的な一次防御が行われ、B 細胞が抗原を取り込み、class II MHC を介して Th2 に抗原提示した。Th2 細胞が抗原提示を受け、IL-4、13 等のサイトカインを放出、とくに IL-4 は未分化の Th0 を Th2 へ分化・増殖した。それにより B 細胞がさらに増殖・分化し、形質細胞がその抗原に特異的な IgG を産生し、IgG がオプソニン化した。したと、好中球貪食能の飛躍的な増強が起こり、好中球やその死骸、殺菌物質による菌や組織の残骸が膿となる。IgM から IgG へのサブクラススイッチに関して Kopf, M らは、IL-4 ノックアウトマウスでは血中の IgG1、IgE 濃度が減少されることを示し IL-4 がクラススイッチに重要なサイトカインであることを示している。また IFN- γ は IgG2a アイソタイプの生産を誘導し、IgG3、IgG1、IgG2b および IgE 生産を抑制したこと、逆に IL-4 は IgG1 と IgE 生産を誘導し、IgG3、IgG2a、IgG2b 生産を抑制したことが知られている。これらの点から、Th1 細胞の活性化は IFN- γ を介した IgG2a 生産を、Th2 細胞の活性化は IL-4 を介した IgE 産生を誘導したことになり、即時型アレルギー誘導には Th2 細胞の活性が、その抑制には Th1 細胞の活性化によって起こると考えられる。

本研究において IgM は、control 群に比較し非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キャッツクローの配合物群に優位な低下が認められた

($p < 0.05$)。また IgG は、control 群に比較し非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キャッツクローの配合物+ナノ型乳酸菌群群($p < 0.05$)、および Combination 群に優位な増加が認められた($p < 0.01$)。また非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キャッツクローの配合物群群には統計学的優位差は見られなかったものの、増加傾向が見られた。この結果は IL-4 測定の結果より考えることができる。IL-4 は、control 群に比較し非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キャッツクローの配合物+ナノ型乳酸菌群群および Combination 群に有意な増加が認められ、非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キャッツクローの配合物群群も統計学的優位差は見られなかったものの、増加傾向が見られた。先ほど述べたように IL-4 は IgG1 と IgE 生産を誘導し、IgM から IgG へのサブクラススイッチに参与した。このことから、非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キャッツクローの配合物+ナノ型乳酸菌群群および Combination 群は IL-4 産生により IgM から IgG に移行させ IgM 有意な減少と IgG の優位な増加を示したと考えられる。

以上の結果から非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キャッツクローの配合物群は T 細胞を Th1 型に傾け細胞性免疫に対し効果を発揮し、非変性2型コラーゲン(UC-2)、グルコサミン、コンドロイチン、キャッツクローの配合物群は T 細胞を Th2 型に傾け液性免疫に対し効果を発揮したものと考えられる。

参考文献

1. Feldmann, M. et al.: Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:397-440. Review..
2. Feldmann, M. et al.: Rheumatoid arthritis. *Cell.* 1996 May 3;85(3):307-10. Review.
3. Miossec, P et al.; Th1/Th2 cytokine balance in arthritis. *Arthritis Rheum.* 1997 Dec;40(12):2105-15.
4. Keffer, J. et al. : Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J.* 1991 Dec;10(13):4025-31
5. Yepez, A. M., et al. "Quinovic acid glycosides from *Uncaria guianensis*" *Phytochemistry* 30 (1991): 1635-37.
6. Aquino, R. et al., "Plant Metabolites. New Compounds and Anti-Inflammatory Activity of *Uncaria tomentosa*," *Journal of Natural Products*, 1991 Mar-Apr;54(2):453-9.
7. Aquino R., et al., "New Polyhydroxylated Triterpenes from *Uncaria Tomentosa* *Journal of Natural Products*, (1990), pp 559-564
8. Yasukawa, K. et al., "Effect of Chemical Constituents from Plants on 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetate-Induced Inflammation in Mice," *Chemical*

- and *Pharmaceutical Bulletin* 37 (1989): 1071-1073.
9. Recio, M. C. et al., "Structural Requirements for the Anti-Inflammatory Activity of Natural Triterpenoids," *Planta Medica* 61, no. 2 (1995): 182-185.
 10. De Simone, F. et al, 1988. New Quinovic Acid Glycosides from *Uncaria Tomentosa*. *Journal of Natural Products* Vol 51, No 2, pp 257-261 Mar-Apr
 11. Senatore A, et al. Phytochemical and biological study of *Uncaria tomentosa*. *Boll Soc Ital Biol Sper.* 1989 Jun;65(6):517-20.
 12. Bousquet, J. et al.: Eosinophilic inflammation in asthma. *N. Engl. J. Med.*, 323 : 1033-1039, 1990.
 13. Sterrt, N. E. and Mosmann, T. R. : Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEB J.* 5:171-177, 1991.
 14. Mosmann, T. R. and Coffman, R. L.: TH1 and TH2 cells : different pattern of cytokine secretion lead to different functional properties, *Ann. Rev. Immunol.* 7:145-173, 1989.
 15. Mosmann, T. R. et al.: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Immunol.* 136:2348-2357, 1986.
 16. Jorgensen, C. et al. : Immunological evaluation of cytokine and anticytokine immunotherapy in vivo: what have we learnt? *Ann Rheum Dis.* 1999 Mar;58(3):136-41.
 17. Camussi, G. and Lupia, E. : The future role of anti-tumour necrosis factor (TNF) products in the treatment of rheumatoid arthritis. *Drugs.* 1998 May;55(5):613-20.
 18. Sandoval-Chacon M, et al. Antiinflammatory actions of cat's claw: the role of NF-kappaB. *Aliment Pharmacol Ther.* 1998 Dec;12(12):1279-89.
 19. Wagner H, et al. The alkaloids of *Uncaria tomentosa* and their phagocytosis-stimulating action. *Planta Med.* 1985 Oct;(5):419-23.
 20. Gleich, G. J. et al.: The eosinophilic leukocyte. *Adv. Immunol.*, 39:177-459, 1986.
 21. Lemaire I, et al. Stimulation of interleukin-1 and -6 production in alveolar macrophages by the neotropical liana, *Uncaria tomentosa*. *J Ethnopharmacol.* 1999 Feb;64(2):109-15.
 22. Sheng Y, et al. Induction of apoptosis and inhibition of proliferation in human tumor cells treated with extracts of *Uncaria tomentosa*. *Anticancer Res.* 1998 Sep-Oct;18(5A):3363-8.
 23. Geha, R. S.: Regulation of IgE synthesis in humans. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 90 : 143-150, 1992.
 24. Seddon, B and Mason, D. : Regulatory T cells in the control of autoimmunity: the

essential role of transforming growth factor beta and interleukin 4 in the prevention of autoimmune thyroiditis in rats by peripheral CD4(+)CD45RC- cells and CD4(+)CD8(-) thymocytes. *J Exp Med.* 1999 Jan 18;189(2):279-88..

25. Mori, A. et al.: Interleukin-4 gene expression in high and low IgE responder mice. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 92:100, 1990.
26. Okudaira, H. et al.: Interleukin-4 gene expression and IgE responsiveness. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 94:184, 1991.
27. Gonzalez, J. et al., "Chuchuhuasha-A Drug Used in Folk Medicine in the Amazonian and Andean Areas. A Chemical Study of *Maytenus laevis*," *Journal of Ethnopharmacology* 5 (1982): 73-77.