緑藻 クロレラ *Chlorella pyrenoidosa* より得られたペプチドヘテロ多糖体の補体 C3 と腹腔マクロファージに及ぼす影響

伊藤 浩子,^{1,4} 柿沼 誠,^{1*} 藤島 雅基,²
荒川 ゆかり,² 中田 福佳,³ 伊藤 均⁴

(2014 年 8 月 18 日受付, 2014 年 11 月 19 日受理)

¹三重大学大学院生物資源学研究科, ²(株)サン・クロレラ 生産開発本部,

³パワフル健康食品(株), ⁴菌類薬理研究所

Effects of a peptidoheteroglycan prepared from *Chlorella pyrenoidosa* (Chlorophyceae) on complement C3 and peritoneal macrophages

HIROKO ITOH,^{1,4} MAKOTO KAKINUMA,^{1*} MASAKI FUJISHIMA,² YUKARI ARAKAWA,²
FUKUYOSHI NAKATA³ AND HITOSHI ITO⁴

¹Graduate School of Bioresources, Mie University, Tsu, Mie 514-8507, ²Sun Chlorella Corp., Research and Development, Shimogyo, Kyoto 600-8177, ³Powerful Healthy Food Corporation, Nakagoshio, Nagano 380-0935, ⁴Research Institute of Mycology and Pharmacology, Tsu, Mie 514-0033, Japan

We purified a peptidoheteroglycan (FA-1a) from *Chlorella pyrenoidosa* and investigated its effects on the third component of complement (C3) and peritoneal macrophages activation. In crossed immunoelectrophoresis, human serum C3 was converted by FA-1a and ATSO (positive control), and appeared as the third peak (converted C3). After oral administration (p.o.) of FA-1a to mice, the binding of C3 cleavage product (C3b) to peritoneal macrophages and the proportion of C3 positive cells were increased as shown by the immunofluorescent antibody technique. These activated macrophages enhanced phagocytosis of polystyrene latex beads. This is the first report showing that p.o. of FA-1a prepared from *Chlorella pyrenoidosa* is capable of activating C3 and macrophages. The present results indicate that FA-1a may open new perspectives in immuno-chemotherapy.

キーワード：クロレラ, ヒト血清, ペプチドヘテロ多糖体, 補体 C3, マクロファージ

クロレラは 1890 年に発見された直径 3-8 μm の淡水に生息する単細胞緑藻類で, その名称は緑と小さいを意味する 2 つのラテン語に由来している。¹⁾ クロレラは名称が示すようにクロロフィル量も多く, 緑色植物では珍しく乾燥重量当たり約 60% がタンパク質である。その他, 各種ミネラル類, アミノ酸, リン脂質など低分子成分の他に, 高分子物質としてタンパク多糖, 繊維質などを含んでいることから, 健康食品として注目されている。近年, クロレラに含まれる葉酸やビタミン B₁₂ の生理活性について報告され,^{2,3)} 動物性食品に代わる新たな供給源としても期待されている。

著者らはこれまでに, カワラタケ由来多糖体 (ATSO),^{4,5)} ヒメマツタケ由来多糖体 (ABPS,

ATOM),⁶⁾ ウミトラノオ由来多糖体 (フコイダン)⁷⁾ など, 菌類・藻類由来の抗腫瘍活性多糖体が NK 細胞, ヘルパー/インデューサー T 細胞産生増強による免疫賦活作用を示すことを認めた。また, これらの多糖体は補体第 3 成分 (C3) を活性化し, 生成された C3 cleavage (C3b) はマクロファージの C3 受容体に結合することを蛍光抗体法で観察した。クロレラ *Chlorella pyrenoidosa* 由来多糖体においても, *in vitro* の実験により抗腫瘍活性のあることが報告されているが,⁸⁾ 菌類・藻類由来多糖体と同様に生体内における補体系および食能賦活作用を有するかについては不明である。

生体の免疫監視防御機構の中で感染初期に働く原始的な機構は, マクロファージに代表される食作用と補体の

活性化に始まる一連の防御機構である。補体とマクロファージは、病原微生物を含む外因性の異物の侵入、自己由来の異物的成分、老廃物、過剰生産物、不用となった活性化物などを処理し、生体の恒常性(ホメオスタシス)を保つうえで大変重要な役割を果たしている。^{9,10)} また、補体は血清中に存在する酵素系のタンパクで体液性免疫の主要因子であり、細胞性免疫にも関与していることが知られている。¹¹⁾

従来、生体を用いた宿主介在性抗腫瘍物質の探索には、多くの費用と時間が必要であった。しかしながら著者らは、*in vivo* で試料をマウスに投与後、血液を採取して *in vitro* で二次元抗原抗体交叉免疫泳動を行い、補体第3成分を調べることで、比較的迅速に抗腫瘍活性をスクリーニングできることを見出した。¹²⁻¹⁴⁾

本研究では、クロレラ *C. pyrenoidosa* から高分子物質、ペプチドヘテロ多糖体を分離した。本物質も菌類・

藻類由来の抗腫瘍活性多糖体と類似の生物活性をもつことが推定される。そこで、先述の簡易スクリーニング法を用いて、クロレラ由来ペプチドヘテロ多糖体の生体内での反応性を補体 C3 と腹腔マクロファージの活性化を指標として調べ、生物学的応答調整作用について検討した。

材料と方法

実験材料 実験にはサン・クロレラより提供されたクロレラ粉末 (Lot. No. KTA4043) より得られたペプチドヘテロ多糖体 (FA-1a)、カワラタケ由来多糖体 ATSO,^{4,5)} およびデキストラン (ナカライテクス) の3検体を用いた。これらの検体は生理食塩水に溶解し、高圧滅菌 (115°C, 10 分間) して使用した。

多糖体画分の抽出法と細分画 多糖体画分抽出法 (Fig. 1)⁷⁾ に従って、クロレラ粉末から多糖体を調製し

Fig. 1 Extraction procedure of complement activator produced by *Chlorella pyrenoidosa*.

た。クロレラ粉末を熱水抽出 (95–100°C, 2 時間) に供し, Diafilter (G-10T, 日本真空技術㈱) を用いて抽出液から分子量 10,000 以下の低分子物質を除去した。得られた濃縮液に無水アルコールを加え, 粗多糖 FA を得た。これを水に溶解し, さらにイオン交換クロマトグラフィー (DEAE-Cellulose (Cl⁻), 和光純薬工業) に供して FA-1, FA-2, FA-3 に分画した。更に FA-1 をゲル濾過法 (Sephadex G-50, 和光純薬工業) により精製し, FA-1a を得た。

FA-1a の理化学的分析

1. 糖組成の分析 全糖については, フェノール硫酸法 (比色法) により分析した。また, 構成糖組成の分析は次のように行った。

検体 (2 mg) をジメチルスルホキシド (DMSO, 0.5 mL) に溶解し, 水酸化ナトリウム (20 mg), ヨウ化メチル (0.2 mL) を添加した。攪拌後, クロロホルム (1.5 mL) で抽出を行い, 減圧乾固してメチル化多糖を得た。これに 80% ギ酸 (1 mL) を添加し減圧乾固した後, 2 N トリフルオロ酢酸 (1 mL) によりメチル化多糖を加水分解し, 減圧乾固して部分メチル化多糖を得た。部分メチル化多糖に少量の蒸留水と水酸化ホウ素ナトリウム (5 mg) を添加し, 一晚放置後, 酢酸で水酸化ホウ素ナトリウムを分解した。さらにホウ酸を除去して部分メチル化アルジトールを得た。これに無水酢酸・ピリジン (1:1) 混合液 (1 mL) を加え 4 時間加熱後, 冷却乾固した。続いてクロロホルム (2 mL) と蒸留水 (1 mL) を添加して混合後, クロロホルム層を回収して無水硫酸ナトリウム (1.5 g) を添加し, 脱水処理を行った後, 減圧乾固した。これを蒸留水 200 μ L に溶解し, 30 μ L を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析 (島津 LC-9A 型) に供し, 構成糖の同定・定量を行った。¹⁵⁾

2. 全窒素の定量 セミマイクロケルダール法¹⁶⁾により測定した。

3. タンパクの定量 タンパク定量は Lowry 法¹⁷⁾により行った。

4. アミノ酸分析 検体 (1 mg) を 6 N 塩酸 (1 mL) と共に封管し, 110°C, 20 時間の加水分解処理後, 日立 835 型アミノ酸自動分析装置に供した。

5. 平均分子量の測定 平均分子量の測定は, ゲル濾過法 (Sephadex G-100, 和光純薬工業) により行った。ゲル濾過用多糖分子量マーカーには, α -1,6 結合の直鎖状多糖類 pullulan キット Shodex standard P-82 (昭和電工) および標準デキストラン (Sigma-Aldrich) を用いた。

6. 比旋光度の測定 比旋光度の測定には日本分光自動旋光計 (DIP-360 型) を用い, 測定温度は 25°C とした。

実験動物および飼育条件 供試した ICR/Slc 雌マウ

ス (日本エスエルシー) は 6 週齢で購入した。マウスは温度 23 $\pm$ 2°C, 相対湿度 55 $\pm$ 5%, 明暗サイクル 12 時間 (8 時開始) のバリアシステム環境下で飼育し, 固型飼料 (クレア CE-7) と水道水を自由に摂取させた。7 日間の予備飼育の後, 一般症状観察および尿検査で異常が認められなかったマウスを 1 群 10 匹としてプラスチックケージに 5 匹ずつ飼育して試験に供した。交叉免疫電気泳動法による補体活性の測定にはヒト新鮮自家血清を用いた。なお, 本実験は三重大学生命科学研究支援センター動物実験施設ならびに三重大学動物実験委員会の審議を経て, 学長承認を得て行った (承認番号: 21-26)。

交叉免疫電気泳動法による補体活性の測定 本実験では, ヒト新鮮自家血清 0.2 mL を分注した蓋付き遠心管 (2 mL) に被検物質の FA-1a 200 μ g, 陰性対照のデキストラン (分子量 228,000, 半井化学薬品) 200 μ g, 陽性対照のカワラタケ由来 ATSO 200 μ g を加え, これらを被検血清とした。各被検血清の補体活性は, 既報の抗原・抗体交叉免疫電気泳動法 (antigen-antibody crossed immunoelectrophoresis)^{5,12)} により測定した。

電気泳動は Tricine veronal buffer (TVB) (pH 8.6, μ =0.05) の条件下で行った。支持体には, agarose A-45 (ナカライテクス) を TVB で 1.2% に溶解して調製した 1.2% agarose-TVB を用いた。抗ヒト血清については, human C3 (Gene Tex. Inc.) を Freund's complete adjuvant (Difco Lab.) と共にウサギに免疫して作製した。

抗ヒト血清は, 1.2% agarose-TVB で 10 倍希釈したものを 76 $\times$ 76 mm のスライドガラス上に 5 mL 流し固め, これを immunoplate として用いた。これとは別に, スライドガラス上で被検血清 5 μ L を含む 1.2% agarose-TVB (6–7 mm 幅) を電気泳動した後, これを抗ヒト血清 10% を含む immunoplate 上に載せ, 二次元的に展開泳動を行った。なお, 泳動条件は 1.2 mA/cm, 5 時間とした。

生体内補体 C3 活性の測定 マウスに被検物質として FA-1a (50 mg/kg) または ATSO (150 mg/kg) を, 対照物質としてデキストラン (250 mg/kg) を 1 日 2 回, 7 日間連日, 胃カテーテルにより強制的に経口投与した。最終投与 2 時間後に腹腔内マクロファージを採取した。腹腔内マクロファージの採取と細胞数測定は次のように行った。

エーテル麻酔下のマウスを脱血した後, 腹腔内にリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) 3 mL を注射器で注入した。軽く腹部を揉んでから腹部の皮膚を剥ぎ, ピンセットで腹膜をつかみ, ハサミで少し切り口を開け, 駒込ピペットで腹腔滲出細胞浮遊液を全て遠心管に採取し, 直ちに氷水中に保存した。採取した

腹腔滲出細胞浮遊液は各々、遠心管に入れて遠心分離 (225×g, 3 分間) し、上清を捨て氷冷した PBS 3 mL を加えて腹腔滲出細胞を再浮遊させた。同様の操作を 3 回行い、細胞を洗浄した。最後の上清を捨てた後、無血清培地 (cosmedium 001, コスモ・バイオ) 2 mL を入れてピペットで細胞を浮遊させ、ペトリ皿 (3.5×10 mm) に移し、CO₂ インキュベーターで 37°C, 2 時間インキュベートした。この腹腔滲出細胞浮遊液の一部をメランジュールにとり、Turk 液で希釈して血球計算盤で細胞数を計測した。

採取した腹腔内マクロファージの一部は、Eagle 培地 (ニッスイ) に浮遊させ、カバースリップに付着させた。PBS でカバースリップに付着しない細胞を洗い落とし、直ちにエタノールで固定した。次いで、このカバースリップを抗マウス C3F(ab')₂ と反応させ、よく洗浄した後にフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識抗ウサギ免疫グロブリン G (Ig G) と反応させて、マクロファージの補体レセプター (CR) に結合する C3 cleavage 抗原の存在を蛍光顕微鏡で観察した。^{7,18)}

また、蛍光抗体法と並行して次の実験を行った。残りの腹腔内マクロファージを Eagle 培地に浮遊させ、ラテックスビーズ (1.1 μm, Sigma-Aldrich) を加えてよく混合した後、カバースリップを置いたシャーレに注ぎ、37°C で 2 時間インキュベートした。PBS で洗浄後、エタノールで直ちに固定し、ギムザ染色を行って抗体非依存性のラテックスビーズの貪食能を顕微鏡下で観察した。^{19,20)}

統計解析 対照のデキストラン投与群と FA-1a, ATSO 投与群との比較は Student の *t* 検定, 比率の差の検定には χ^2 検定を用いた。統計処理は Dunnett の *t* 検定で行い、5% 未満を有意差ありと判定した。

結 果

活性画分 (FA-1a) の理化学的性質 クロレラ粉末

400 g からの F1 および FA-1a (Fig. 1) の収量は、真空凍結乾燥粉末でそれぞれ 15.63 g, 253.27 mg であった。

FA-1a は平均分子量 100 万, $[\alpha]_D$ -11.6, タンパク 29.5%, 多糖 70.3% から成り、糖組成は Gal, Glc, Man, Xyl, Rha, Ara, Fru = 32:25:13:8:7:5:3 (モル比), アミノ酸組成は Glu 15.1, Asp 13.8, Ala 9.9, Leu 8.9, Thr 6.5, Lys 6.2, Val 5.9, Gly 5.8, Pro 5.5, Ser 5.4, Arg 4.8, Phe 3.6, Ileu 3.1, Tyr 2.1, His 1.7, Met 1.6, Cys 0.1 (%) であり (Table 1), 酸性アミノ酸を多く含むペプチドヘテロ多糖体 (peptidoheteroglycan) であることが判明した。

補体 C3 成分に対する作用 ヒト新鮮自家血清を用いて二次元の抗原抗体交叉免疫電気泳動を行ったところ、デキストラン (陰性対照), ATSO (陽性対照), FA-1a で Tr (トランスフェリン) と α_2 -M (マクログロブリン) のピークの変動は殆ど認められなかった (Fig. 2)。同様の結果が、宿主介在性抗腫瘍活性を示すヒメマツタケ多糖体 (ABPS),^{6,12)} チョレイマイタケ多糖体 (GUP),¹²⁾ レイシ多糖体 (GLPS),¹⁴⁾ ウミトラノオ多糖体 (GIV-A)⁷⁾ において確認されている。

デキストランでは C3 (native C3) が Tr の (-) 側の内側に沿って直立し (+) 側に裾野を形成するパターンとして出現した (Fig. 2a)。これに対して、ATSO と FA-1a では native C3 のピークは低下し、変換した C3 (converted C3) は三峰性を示して (+) 側にシフトした (Fig. 2b, c, 矢印)。デキストラン, ATSO, FA-1a の泳動パターンを比較すると、安定な α_2 -M のピークと変換した C3 のピークの比率はデキストランで最も低く、ATSO と FA-1a ではほぼ同程度であった。

腹腔内マクロファージに対する作用 デキストラン投与マウスでは、蛍光陽性細胞が 22.5% 認められた。これに対して、FA-1a 投与マウスでは 51.4%, ATSO 投与マウスでは 63.7% と著明に増加した (Table 2, Fig. 3)。

Table 1 Chemical analysis of FA-1a (peptidoheteroglycan)

Total N (%) ¹⁾		Protein (%) ²⁾		Total sugar (%) ³⁾		Molar % of component sugar ⁴⁾								[α] _D		MW ⁵⁾	
						Rha	Fru	Ara	Xyl	Man	Gal	Gluc					
5.39		29.5		70.3		7	3	5	8	13	32	25	+ 11.6		1,000,000		
Amino acid composition (%) ⁶⁾																	
Glu	Asp	Ala	Leu	Thr	Lys	Val	Gly	Pro	Ser	Arg	Phe	Ile	Tyr	His	Met	Cys	Total
15.1	13.8	9.9	8.9	6.5	6.2	5.9	5.8	5.5	5.4	4.8	3.6	3.1	2.1	1.7	1.6	0.1	100

¹⁾ Semi-micro Kjeldahl's method.

²⁾ Lowry modified method.

³⁾ Calculated as glucose by phenol-sulfuric acid method.

⁴⁾ Calculated as alditol acetates by HPLC method.

⁵⁾ Gel filtration method.

⁶⁾ Amino acid composition was determined by a HITACHI 835 amino acid autoanalyzer.

また、ラテックスビーズの食食はデキストラン投与マウスの腹腔マクロファージが取り込む総数を対照とした時、FA-1a 投与マウスでは 2.7 倍、ATSO 投与マウスでは 4.2 倍を示した (Table 2, Fig. 4)。

Fig. 2 Antigen-antibody crossed immunoelectrophoretic patterns of C3 in human serum treated with dextran (a), ATSO (b) or FA-1a (c). Immunoelectrophoresis was carried out using 1.2% agarose A-45 in tricine veronal buffer (pH=8.6, $\mu=0.05$). The right is anode and the left is cathode. Abbreviations C3, Tr, α_2 -M, and arrows ($\downarrow$: 3rd peak) indicate native C3, transferin, macroglobulin, and converted C3, respectively. This figure shows one of the six separate experiments.

考 察

本報では、クロレラよりペプチドヘテロ多糖体 (FA-1a) を分離した (Fig. 1)。しかし、多糖体抽出時には細胞膜の共通成分であり、抗原特異性をもった多糖体とリン脂質、すなわち O 抗原 (内毒素エンドトキシン) のリピド A が結合してできたり多糖体の混在する可能性も否定できない。そこで実験に供した FA-1a につきリムルス試験を実施し、陰性であることを確認した。

著者らはこれまでに菌類や藻類由来の抗腫瘍性多糖

Fig. 3 Fluorescent photomicrographs of C3 cleavage product present in peritoneal macrophages at 2 hours after p.o. of dextran (250 mg/kg) (a) or FA-1a (50 mg/kg) (b), twice a day during 7 days. Quantitative estimation of immunohistochemical staining was judged as described in Materials and Methods. Original magnification: $\times 400$.

Fig. 4 Photomicrographs of phagocytosis and ingestion of polystyrene latex beads in peritoneal macrophages at 2 hours after p.o. of dextran (250 mg/kg) (a) or FA-1a (50 mg/kg) (b), twice a day during 7 days. Quantitative estimation of immunohistochemical staining was judged as described in Materials and Methods. Original magnification: $\times 400$.

Table 2 Effects of dextran, FA-1a or ATSO on mouse macrophages

Material ¹⁾	Percentage of fluorescent cells ²⁾	Phagocytosis percent ³⁾	Intracellular number of beads/cell ⁴⁾	Total number of latex beads ingested by macrophages ⁵⁾	Rate of enhanced phagocytosis
Dextran	22.5 $\pm$ 3.8	35.4 $\pm$ 4.3	2.3 $\pm$ 0.4	110.2 $\pm$ 33.5	1.0
FA-1a	51.4 $\pm$ 4.1*	63.7 $\pm$ 7.6*	4.4 $\pm$ 0.8*	298.7 $\pm$ 58.2*	2.7*
ATSO	63.7 $\pm$ 6.9*	64.1 $\pm$ 8.0*	5.3 $\pm$ 0.9*	463.9 $\pm$ 99.1*	4.2*

¹⁾ Experimental mice were treated with dextran (250 mg/kg), FA-1a (50 mg/kg) or ATSO (150 mg/kg), twice a day during 7 days.

²⁾ Percentage of macrophages that bind fluorescent anti-C3 in mouse peritoneal macrophages after treatment with dextran, FA-1a or ATSO.

³⁻⁵⁾ Phagocytosis and ingestion of latex beads by macrophages of mouse were measured at 2 hours after treatment with dextran, FA-1a or ATSO.

²⁻⁵⁾ Values represent the mean $\pm$ standard deviation of five experiments. Significant difference: * $p < 0.05$ as compared with the dextran-treated control.

体,^{4-7,20)} 天然由来物質,^{13,14)} 漢方方剤²¹⁾などの補体活性物質について報告してきた。なお, 本実験で陽性対照として用いたカワラタケ由来多糖体 ATSO は, β -1,3 グルコシド結合をもつ直鎖のグルコース残基 3 個に対して 1 個の割合で, 1 分子のグルコースが β -1,6 グルコシド結合を介して分岐する多糖体であり, 抗腫瘍活性と補体 C3 活性を示す。⁴⁾ 本実験で C3 活性が認められた FA-1a は酸性アミノ酸を多く含むペプチドヘテロ多糖体 (peptidoheteroglycan) であり (Table 1), β (1,3) (1,6) グルカン構造を有する ATSO とは異なる物質であることが判明した。FA-1a の詳細な分子構造については不明であり, その解明が今後の検討課題である。

2 次元の抗原抗体交叉免疫電気泳動の結果から, FA-1a も ATSO と同様に C3 activator として作用することが確認された (Fig. 2)。これまでに著者らは, 宿主介在性抗腫瘍性多糖体の活性と C3 convert 活性とはほぼ平行することを報告している。¹²⁾ 補体活性化経路としては, 古典経路 (classical pathway) といわれる C1→C4→C2→C3→C5→C6→C7→C8→C9 の順で活性化する経路と, 補体第 2 経路 (alternative pathway) といわれる C1, C4, C2 を活性化することなく, C3 以降 (C3→C5→C6→C7→C8→C9) を活性化する経路が知られている。補体第 1 成分の C1 は, C1q, C1r, C1s の 3 つの成分が Ca^{2+} を介して結合した複合体である。 Ca^{2+} キレート試薬 エチレンジリコールビス (β -アミノエチルエーテル) N,N,N',N' -四酢酸 (EGTA) 10 mM 存在下で FA-1a ならびに ATSO について電気泳動を行っても, 同様の泳動パターンが認められた (実験結果は示さず)。このことより, FA-1a と ATSO は補体第 2 経路に働き, 補体 C3 を活性化することが明らかとなった。

補体 C3 を中心とした補体活性化経路は, リンパ球, マクロファージ, 赤血球, 血小板, 顆粒性白血球, 肥満細胞などの細胞性因子に作用し, これらの生物学的活性に重要な役割を果たしている。¹¹⁾ 特に生体防御反応において補体は, 免疫溶血, 溶菌, 食作用, オプソニン化, 走化性, 免疫細胞溶解, および補体依存性細胞溶解など多彩な役割を示す。さらに, 体液性免疫の主因子である補体は, 細胞性免疫にも関与している。これらの作用と FA-1a による補体 C3 の活性化との関連性の一端を明らかにするために, マクロファージの活性化に及ぼす FA-1a の影響について検討した。

マウスに対する FA-1a 経口投与により, C3 蛍光陽性細胞数および腹腔内マクロファージ数の増加, さらに腹腔内マクロファージの抗体非依存性食能の上昇が認められた (Table 2, Figs. 3, 4)。これらの結果から, 生体内補体活性化によって生成した C3 cleavage 抗原は, マクロファージ上の CR1 あるいは CR3 レセプターと結合し, これが引き金となってマクロファージのカスケー

ド的活性化に関与しているものと考えられる。また, FA-1a 経口投与により, 補体 C3 より変換された C3 cleavage (C3a, C3b, iC3b) の一つである C3b がマクロファージの細胞膜上に存在する C3b 受容体に結合し, その結果としてマクロファージの活性化が引き起こされたと考えられる。C3b が結合したマクロファージでは, アラキドン酸カスケードを介したマクロファージ活性化が起こり, その指標には食能の上昇の他にスーパーオキシド (O_2^-) 産生, コラゲナーゼ産生の増加, インターロイキン 1 (IL-1) 産生, インターフェロン産生等が用いられている。²¹⁾ 生体防御機構において重要な役割を担っているマクロファージの活性化に及ぼす FA-1a の影響を明らかにするためには, 各種指標を利用した検討が必要である。

古くから, アオサ科 *Ulva lactuca* および *Enteromorpha compressa*, シオグサ科 *Acrosiphonia arcta* などの緑藻の細胞壁多糖体の中には, L-ラムノース, D-キシロースの他に D-グルクロン酸, 硫酸エステルを含む硫酸ヘテロ多糖体の存在が知られている。²²⁾ 今後, クロレラより得られた FA-1a, さらには FA-1b, FA-1c (Fig. 1) の理化学的性質を精査し, これらの成分と硫酸ヘテロ多糖体の生物活性との関連性について明らかにすることが課題として残る。また, これまでに *C. pyrenoidosa* の抽出液からラムノースとマンノースを主な構成糖とする多糖体が単離され, *in vitro* の実験により抗腫瘍活性のあることが報告されている。⁸⁾ FA-1a にもラムノースとマンノースが構成糖として存在しているため (Table 1), *in vivo* の実験における FA-1a の抗腫瘍活性と補体 C3・マクロファージ活性との相関性について解明することも今後の課題である。

他種クロレラ (*C. vulgaris*) 抽出液では Th1 (タイプ 1 ヘルパー T) 細胞の活性化, IFN- γ (インターフェロン γ) や IL-12 の産生促進効果が見出されており,²³⁾ 悪性神経膠芽細胞腫の患者の延命効果や Quality of Life (QOL) 向上効果が期待されている。²⁴⁾ また, 本研究に用いた *C. pyrenoidosa* 抽出物においては抗腫瘍活性の他, X 線全身照射により免疫能を低下させたマウスに経口投与したところ, 脾・胸腺指数, 白血球, 血小板, 顆粒球の増加, ヒツジ赤血球抗体免疫能の促進効果, および好中球—顆粒球系前駆細胞数の著明な増加が認められている。さらに, 組織学的所見においても造血巣の回復と脾臓・胸腺障害の軽減が確認されている。²⁵⁾ また, 同クロレラ抽出液からは従来, 藻類では報告がなかったサイクリック β -(1→2)-グルカンが単離されている。²⁶⁾ このように, クロレラは免疫賦活作用や抗腫瘍作用を示す新規多糖体の探索対象として有望な藻種と考えられる。

本研究により, FA-1a は抗体非依存性の食能を亢進し, 異物排除機構を促進させることが明らかとなっ

た。このことから、抗癌剤投与時にみられる免疫抑制作用の軽減や病原微生物による感染防御の面から、生体防御機構に有利に働くことが推定される。FA-1aは免疫応答を非特異的に増強または修飾する物質として、今後の補助免疫化学療法 (adjuvant immuno-chemotherapy) においても有用であると考えられる。

文 献

- 1) Beijerinck MW. Kulturversuche mit zoochlorellen, lichenen-gonidien und anderen niederen. *Algen. Z. Bot.* 1890; **45**: 725-740 (in Dutch).
- 2) Watanabe F, Takenaka S, Kittaka-Katsura H, Ebara S, Miyamoto E. Characterization and bio-availability of vitamin B12-compounds from edible algae. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2002; **48**: 325-331.
- 3) Kittaka-Katsura H, Fujita T, Watanabe F, Nakano Y. Purification and characterization of a corrinoid compound from chlorella tablets as an algal health food. *J. Agric. Food Chem.* 2002; **50**: 4994-4997.
- 4) 伊藤 均, 志村圭志郎, 抗腫瘍性多糖. 感染症 1984; **75**: 18-22.
- 5) 志村圭志郎, 塩見俊朗, 伊藤 均, 成瀬千助. ATSO の添加により Convert した C3 の抗原・抗体交叉電気泳動像による残余 C3 活性の測定. 医学のあゆみ 1977; **103**: 20-22.
- 6) 伊藤 均. ヒメ (姫) マツタケ (岩出 101 株) [*Agaricus blazei* Murrill] の抗腫瘍効果と生物活性. *Biotherapy* 2000; **14**: 1009-1015.
- 7) Itoh H, Noda H, Amano H, Zhuang C, Mizuno T, Ito H. Antitumor activity and immunological properties of marine algal polysaccharides, especially fucoidan, prepared from *Sargassum thunbergii* of Phaeophyceae. *Anticancer Res.* 1993; **13**: 2045-2052.
- 8) Sheng J, Yu F. Preparation, identification and their antitumor activities in vitro of polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa*. *Food Chem.* 2007; **105**: 533-539.
- 9) Nishioka K. Complement and tumor immunology. *Adv. Cancer Res.* 1971; **14**: 231-293.
- 10) 伊藤浩子, 藤島雅基, 荒川ゆかり, 中田福佳, 伊藤均. マウスの補体 C3 と腹腔マクロファージに対する *Chlorella pyrenoidosa* (クロレラ) の基礎的研究. 医学と生物学 2013; **157**: 376-380.
- 11) 嶋田孝吉. 補体. 「人癌と免疫 (基礎と臨床)」(山村雄一編) (株)ライフサイエンス, 東京. 1976; 133-141.
- 12) Shimura K, Ito H, Hibasami H. Screening of host-mediated antitumor polysaccharides by crossed immunoelectrophoresis using fresh human serum. *Jpn. J. Pharmacol.* 1983; **33**: 403-408.
- 13) Ito H. Effects of the antitumor agents from various natural sources on drug-metabolizing system, phagocytic activity and complement system in Sarcoma 180-bearing mice. *Jpn. J. Pharmacol.* 1986; **40**: 435-443.
- 14) 志村圭志郎, 伊藤 均. 補体およびマクロファージ活性物質. キノコの化学・生化学, 学会出版センター, 東京. 1992; 81-86.
- 15) 立岡茂伸, 水野雅史, 湊進一郎. 免疫化学的定量法を利用したヒメマツタケ (*Agaricus blazei* Iwade strain 101) 中の免疫賦活性多糖体画分の分離および精製. 日本農芸化学会誌 (臨時増刊) 2000; 29.
- 16) Jones AS. Determination of nitrogen by Kjeldahl's method. In: Wilson CL, Wilson DW (eds). *Comprehensive Analytical Chemistry Vol. I*. Elsevier, Amsterdam-London-New York-Princeton. 1960; 495-509.
- 17) 東 隆親. 蛋白質の濃度測定法. 「免疫実験操作法 A」(右田俊介編) 日本免疫学会, 金沢. 1978; 283-291.
- 18) Wang J, Ito H, Shimura K. Enhancing effect of antitumor polysaccharide from *Astragalus* or *Radix hedysarum* on C3 cleavage production of macrophages in mice. *Jpn. J. Pharmacol.* 1989; **51**: 432-434.
- 19) Shimura K, Ito H, Hibasami H, Shiomi T, Hidaka H, Nishioka K. Enhancement of antibody-independent phagocytosis by *N*-(6-aminoheptyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W-7). *Immunol. Commun.* 1983; **12**: 363-374.
- 20) 志村圭志郎, 伊藤 均. Zymosan のハツカネズミ経口投与における腹腔マクロファージへの影響. 医学と生物学 1986; **112**: 163-166.
- 21) 志村圭志郎, 伊藤 均. 漢方方剤の補体活性系に対する作用とマクロファージに対する影響. 漢方医学 1984; **8**: 13-17.
- 22) 前田昌徹, 西沢一俊. 海藻多糖類. 「総合多糖類科学 (下) 第 1 版」(原田篤也, 三崎 旭編) 講談社サイエンティフィク, 東京. 1974; 289-348.
- 23) Hasegawa T, Ito K. Oral administration of hot water extracts of *Chlorella vulgaris* reduces IgE production against milk casein in mice. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 1999; **21**: 311-323.
- 24) Merchant RE, Rice CD. Dietary *Chlorella pyrenoidosa* for patients with malignant Glioma: Effects on immunocompetence, quality of life, and survival. *Phytother. Res.* 1990; **4**: 220-231.
- 25) 伊藤浩子, 藤島雅基, 荒川ゆかり, 中田福佳, 伊藤均. 放射線による造血障害に対する *Chlorella pyrenoidosa* (クロレラ) の予防効果. 医学と生物学 2012; **156**: 696-702.
- 26) Suarez ER, Bugden SM. First isolation and structural determination of cyclic β -(1 $\rightarrow$ 2)-glucans from an alga, *Chlorella pyrenoidosa*. *Carbohydr. Res.* 2008; **343**: 2623-2633.