

経口投与したコンドロシンのラット軟骨への³⁵S硫酸取り込み効果草野崇一,^a 五十嵐尚子,^b 酒井信夫,^b 戸井田敏彦^{*,b}Effect of Orally Administered Chondrosine on Uptake of ³⁵S Sulfate into Mice CartilageShuichi KUSANO,^a Naoko IGARASHI,^b Shinobu SAKAI,^b and Toshihiko TOIDA^{*,b}^aFuji-Sangyou Co., Ltd., 1301 Tamura-cho, Marugame City 763-8522, Japan, and ^bGraduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, 1-33 Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba 263-8522, Japan

(Received November 15, 2005; Accepted January 26, 2006)

Chondroitin sulfate is widely distributed in animal tissues and possibly plays an important role in different types of metabolic reactions as well as protecting joints, the internal wall of blood vessels, skin, bone, etc. In cartilage, glycosaminoglycans have a protective function; in particular, chondroitin sulfate stabilizes fibrous and cellular elements of the connective tissue and, at the same time, lubricates and protects the membranes in joints. Recently, chondroitin sulfate has been used as a nutraceutical for the treatment of joint diseases such as osteoarthritis, although acidic and large molecules such as chondroitin sulfate might not be able to be absorbed through digestive apparatus such as the intestine. In this study, we investigated the effects of orally administered chondrosine derived from shark chondroitin sulfate on the uptake of inorganic ³⁵S sulfate into rat cartilage and found that chondrosine stimulates the incorporation of ³⁵S sulfate into cartilage compared with intact chondroitin sulfate.

Key words—chondrosine; ³⁵S sulfate; uptake; rat cartilage

緒 言

軟骨組織に含まれるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの1つであるアグリカンは、他の機能性分子、例えばヒアルロン酸と複合体を形成し、細胞の接着、増殖、分化等の重要な細胞活動の調節に関与していることが知られている。^{1,2} 様々な原因により、この軟骨組織からのプロテオグリカンの分解・遊離が促進され、かつ組織におけるプロテオグリカンの生合成が低下すると、軟骨組織の破壊が進み、変形性関節症等の疾患が惹起するものと考えられている。³ これまでも各種軟骨疾患の予防あるいは治療を目的とするプロテオグリカン生合成促進物質についての報告があり、例えばベンゾチエピン誘導体、⁴ 肝細胞増殖因子 (HGF)、⁵ ヒアルロン酸⁶ 等が報告されている。しかしながら、安全かつ有効性に優れた軟骨細胞プロテオグリカン生成促進のための栄養補助剤 (サプリメント) あるいは医薬品につ

いては、いまだその開発途上といっても過言ではない。

一方、グルクロン酸と *N*-アセチルガラクトサミンを構成糖とするコンドロイチンやコンドロイチン硫酸は、変形性関節症の治療等に現在用いられており、^{7,8} その効果についてもアメリカ合衆国国立保健局が中心となり、結合組織疾患の予防や治療のための調査が進行中である。⁹ しかし、高分子量でかつ硫酸基、カルボキシル基を持つコンドロイチン硫酸などは、経口投与しても吸収される割合が低いため、1回に大量投与が行われている。¹⁰ さらに作用機序も明確でない上に一般的な硫酸化多糖の消化管障害等の副作用を惹起することも懸念されている。¹¹

今回、コンドロイチン硫酸から単離精製した構成2糖であるコンドロシンに着目し、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン生合成の指標として、³⁵S 標識硫酸の取り込みについて、ラット血漿、膝軟骨、剣状軟骨を対象に検討を行い、若干の知見を得たので報告する。

^a富士産業株式会社研究所, ^b千葉大学大学院薬学研究院

*e-mail: toida@p.chiba-u.ac.jp

実験の部

1. 実験動物 Wistar系オスのラット（7週齢，体重161.6—188.4g，日本エスエルシー㈱）を用いた。11日間SPF動物舎（室温 $23 \pm 3^\circ\text{C}$ ，湿度 $55 \pm 20\%$ ，照明サイクル12時間）で予備飼育し，実験に用いた。飼料（オリエンタル酵母工業㈱）及び水道水は自由に摂取させた。投与当日に各ラットの体重を測定し，群内の体重範囲が平均値の $\pm 10\%$ 以内となるように1群4匹で選択した。

2. 試薬 ^{35}S 標識硫酸ナトリウムは市販品（比放射能， 21.53 GBq/mmol ，PERKINELMER）を使用した。投与及びコンドロシン調製用のコンドロイチン硫酸は市販品（サメ軟骨由来，分子量50000，三栄源㈱）を用いた。核磁気共鳴スペクトル測定用重水はメルク㈱製（重水素純度99.9%）を用いた。

その他の試薬は市販品試薬特級をそのまま使用した。水はラットの飼育以外は精製水を用いた。

3. 投与実験 入手した ^{35}S 標識硫酸ナトリウム全量を生理食塩液で希釈して最終12mlとし， $92.5 \text{ MBq (2.5 mCi) / ml}$ の投与液を用時調製した。コンドロイチン硫酸2gに水を加えて10mlとしたのち，超音波処理を行い懸濁し， 0.2 g/ml の投与液を用時調製した。コンドロシン2gに水を加えて10mlとしたのち，超音波処理を行い懸濁し， 0.2 g/ml の投与液を用時調製した。 ^{35}S 標識硫酸ナトリウム単独投与群では， ^{35}S 標識硫酸ナトリウム投与液を 2 ml/kg の用量で25G注射付シリンジを用いてラットの尾静脈内に単回投与した。

コンドロイチン硫酸又はコンドロシンと ^{35}S 標識硫酸ナトリウムを併用投与する群では，コンドロイチン硫酸投与液は 1 g/5 ml/kg ，コンドロシン投与液は 1 g/5 ml/kg の用量で，各群の組織内濃度の測定を実施する当日まで1日1回，一定時刻に経口ゾンデを装着したシリンジを用いて胃内に強制投与し， ^{35}S 標識硫酸ナトリウム投与液は併用するコンドロイチン硫酸及びコンドロシンの初回投与1時間後に

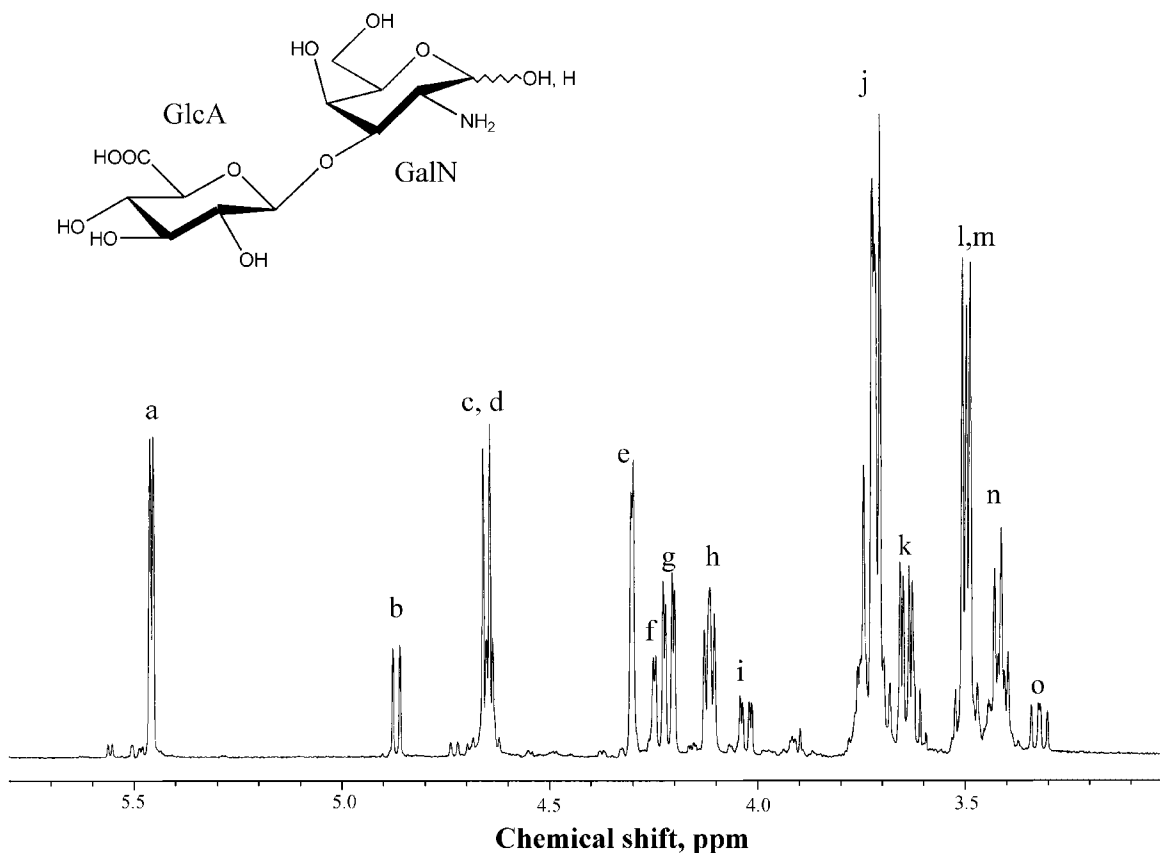


Fig. 1. ^1H -NMR Spectrum of Chondrosine Prepared from Chondroitin Sulfate

GlcA: glucuronic acid, GalN: galactosamine. a: GalN α H-1, b: GalN β H-1, c, d: GlcA β H-1. e: GalN α H-4, f: GalN β H-4, g: GalN α H-3, h: GalN α H-5; i: GalN β H-3, j: GalN H-6, k: GalN α H-2, l, m: GlcA β H-3, -4, n, o: GlcA β H-2.

2 ml/kg の用量で 25 G 注射付シリンジを用いてラットの尾静脈内に投与した。すなわち“投与後 24 時間”群に対しては試料採取 1 時間前までに計 2 回、また“投与後 72 時間”群に対しては計 4 回、コンドロイチン硫酸及びコンドロシンを投与した。 ^{35}S 標識硫酸投与後 24 時間後、72 時間後に血液及び組織を採取した。各群については 4 匹ずつのラットを用いて検討した。

取り込まれた ^{35}S 硫酸については血漿、剣状軟骨、膝関節軟骨を採取し、液体シンチレーションカウンターを用いて分析した。すなわち、血漿は腹大動脈よりヘパリンナトリウム入り真空採血管を用いて血液を採取した。遠心分離 (1800 × g, 4°C, 15 min) して得られた血漿は、その 100 μl を放射能測定用試料としてバイアルに採取し、組織溶解剤 SOLUENE-350 を 2 ml 加えて溶解した。溶解後、シンチレーター (HIONIC-FLUOR) を 10 ml 加えた。剣状軟骨、膝関節軟骨については全量を放射能測定用試料として秤量後、バイアルに採取し、組織溶解剤 SOLUENE-350 を 2 ml 加えて加温・溶解した。溶解後、シンチレーター HIONIC-FLUOR を 10 ml 加えた。得られた結果は、コンドロイチン硫酸及びコンドロシン非投与群に対して、小標本法による有意差検定 (スチューデントの *t* 検定) を行った。

4. コンドロシンの調製 コンドロシンは既報の方法¹²⁾に従いサメ軟骨由来コンドロイチン硫酸を加水分解し、電気透析装置により脱塩後、最終濃度が 90% になるようにエタノールを加えて遠心分離を繰り返し、沈殿を乾燥して調製した。コンドロシンの構造は日本電子機製 ECP600 を用いて ^1H -NMR スペクトルを測定し確認した。

結果と考察

Figure 1 に調製したコンドロシンの ^1H -NMR スペクトル及び各シグナルの帰属を示す。還元末端のガラクトサミンのアノメリックプロトンが α あるいは β 配置の違いにより、グルクロン酸に由来するシグナルも化学シフトが変化することが分かる。また、それぞれのシグナルの結合定数から、重水中でコンドロシンのガラクトサミン、グルクロン酸は椅子型コンフォーメーションをとることが推察できる。また 5.5 ppm, 4.7 ppm 付近に若干単糖に由来

するシグナルが混在するものの顕著な不純物に由来するシグナルは観察されず、98% 以上の純度のコンドロシンが調製できたことを示している。また、原料のコンドロイチン硫酸からのコンドロシンの回収率は 60% 以上であった。

Figure 2(a) にラット血漿中の ^{35}S 硫酸放射能を調べた結果を示す。72 時間後における血漿中放射能についてコンドロシン投与群で高い傾向があるが、24 時間後における有意差は観察されなかった。一方、Fig. 2(b) に示すようにラット膝関節における ^{35}S 硫酸放射能は 24 時間後におけるコンドロイチン硫酸同時投与群で ^{35}S 硫酸の取り込み低下が観察さ

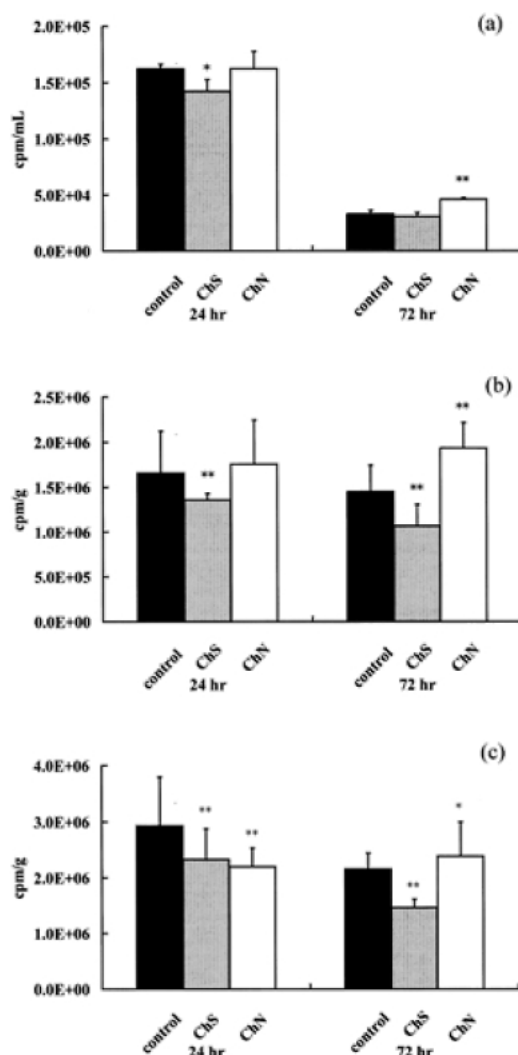


Fig. 2. $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ Concentrations in Plasma and Uptake in Cartilage Tissues of Rats after *i.v.* Administration with/without Chondrosine

a: plasma, b: articular cartilage, c: xiphoid cartilage. ChN: chondrosine, ChS: chondroitin sulfate. Each point represents the mean \pm S.E. obtained from 4 experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ against control.

れたが、コンドロシン投与群と対照群で差は見られなかった。これに対し、72時間後におけるコンドロシン投与群では明らかに³⁵S硫酸の取り込みが上昇していた。この傾向はFig. 2(c)に示すようにラット剣状軟骨においても観察され、コンドロシンは³⁵S硫酸の取り込みを上昇させる傾向が観察された。

またコンドロイチン硫酸を経口投与すると、関節における軟骨組織の分解酵素を阻害し、炎症の進行を抑制するとの報告がある^{13,14)}が、今回正常なラットを用いた場合、明確な³⁵S硫酸の取り込み低下が観察された。現在実験的炎症性関節炎モデルを用いた検討を行っている。一方、コンドロシンを経口投与した場合、顕著なラット軟骨への³⁵S硫酸の取り込みが観察された。コンドロシンの場合その分子量が小さいため、消化管からの吸収もコンドロイチン硫酸に比べて非常に高いことが予想できる。また、生体内に存在するコンドロイチン硫酸の分解系で働くグルクロニダーゼは、コンドロシンに対して作用しない可能性¹⁵⁾があり、さらには阻害作用も考えられることから、今回の結果は、コンドロシンの³⁵S硫酸取り込み促進効果というよりもむしろ、生合成されたコンドロイチン硫酸の分解抑制効果と考えられる。今後さらにコンドロシンの定量法を確立することにより、その体内動態及び生物活性について詳細に検討する予定である。

REFERENCES

- 1) Wight T. N., Heinegard D. K., Hascall V. C., "Cell Biology of Extracellular Matrix, 2nd ed., Proteoglycans: structure and function," ed. by Hay E. D., Plenum Press, NY, 1991, pp. 45-78.
- 2) Iozzo R. V., Murdoch A. D., *FASEB J.*, **10**, 598-614 (1996).
- 3) Scott D., Smith C., Lohmander S., Chard J., *Clin. Evid.*, **8**, 1212-1237 (2002).
- 4) Akiyama H., Fukumoto A., Shigeno C., Ito H., Mukai S., Hoshino T., Makino H., Nakamura T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **261**, 131-138 (1999).
- 5) Takebayashi T., Iwamoto M., Jikko A., Matsumura T., Enomoto-Iwamoto M., Myoukai F., Koyama E., Yamaai T., Matsumoto K., Nakamura T., Kurisu K., Noji S., *J. Cell Biol.*, **129**, 1411-1419 (1995).
- 6) Knudson C. B., Knudson W., *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **427** (Suppl), S152-162 (2004).
- 7) Sarzi-Puttini P., Cimmino M. A., Scarpa R., Caporali R., Parazzini F., Zaninelli A., Atzeni F., Canesi B., *Semin. Arthritis Rheum.*, **35** (1 Suppl 1), 1-10 (2005).
- 8) Baker Jr. C. L., Ferguson C. M., *Orthopedics.*, **28** (2 Suppl), s227-234 (2005).
- 9) <http://www.nih.gov/news/pr/sept99/nccam-15a.htm>.
- 10) McAlindon T. E., Biggee B. A., *Curr. Opin. Rheumatol.*, **17** (5), 647-652 (2005).
- 11) Kim H. S., Berstad A., *Scand. J. Gastroenterol.*, **27** (7), 529-537 (1992).
- 12) Rapport M. M., Weissmann B., Linker A., Meyer K., *Nature*, **168**, 996-997 (1951).
- 13) Owens S., Wagner P., Vangness Jr. C. T. J., *Knee Surg.*, **17** (4), 185-193 (2004).
- 14) Volpi N., *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metab. Disord.*, **4** (2), 119-127 (2004).
- 15) Watt D. K., Clinch K., Slim G. C., *Carbohydr. Res.*, **337**, 1235-1238 (2002).