

クロレラ由来酸性多糖, クロンA

1. 物理化学的および生物学的性質

梅 沢 巖・小宮山寛機・沢川 信之・森 緑・小島 保彦
北里研究所

(昭和 57 年 2 月 17 日受付)

淡水藻類の一種 *Chlorella pyrenoidosa* の乾燥粉末に水を加え、約 85°C で 1 時間加熱後遠心分離した上清よりエタノール濃度が 40~80% の間で沈殿する物質を集め、水に溶解後透析イオン交換セルロース、セファデックスなどを用いて精製し白色粉末を得た (クロンA)。本物質は酸性多糖で加水分解後の糖分析ではラムノースを主成分としてアラビノース、グルコース、ガラクトース、グルクロン酸が認められた。*in vitro* でウサギ脾細胞にクロンAを作用させたところ、0.01 µg/ml の濃度でも IFN 誘起能が認められた。マウスの尾静脈よりクロンAを注射して血中 IFN は 2.5 時間で最高値に達し以後漸減した。*in vivo* での感染防御作用の有無を調べるためにクロンAをマウス尾静脈より投与し一定時間後にワクシニアウイルスを注射して 8 日後に尾部に現われた、pock 数を測定したところ、24 時間前あるいは同時投与でも用いた薬量範囲内 (25~0.39 mg/kg) で著しい pock 数の減少がみられた。同様な実験をインフルエンザウイルスについても調べたところ、宿主の延命効果が認められた。

以上示したようにクロレラ由来の酸性多糖でウイルス感染阻止作用がみられ、その機序として IFN の誘起能が大きく関与していると考えられる。

ある種の植物あるいは菌体成分の多糖類にインターフェロン (IFN) 誘起能、免疫賦活化作用、制癌活性などが認められており、それらの一部はすでに臨床に応用されている¹⁻⁸⁾。

今回、われわれは淡水藻類の一種クロレラの熱水抽出物にインターフェロン誘起能およびマウスにおいてウイルス感染抑制作用を認め有効成分の抽出、精製を試みたところ、酸性多糖を分離したので本物質 (クロンA) の物理化学的および生物学的性質について報告する。

I. 材料と方法

1. クロンAの抽出、精製

明培養したクロレラピレノイドーザの乾燥粉末 (台湾緑藻工業股份有限公司より入手) 2 kg を 10 l のイオン交換水に加え、約 85°C で 1 時間加熱した後遠心分離し、上清に 40% になるようにエタノールを加え一夜放置後生じた沈殿を除き、さらに 80% になるようにエタノールを加えて沈殿物を集めた。これを水に溶解しセロファン膜を用いて水で透析後 DEAE セルロースカラムに吸着させて 0.05 M NaOH で溶出させ中和後水で透析した。次いで CM セルロースカラム (H⁺) を通過させた後、DEAE セファールセルカラム (H⁺) に吸着させて水: 1M NaCl/0.01 N HCl の linear gradient にて溶出後、

中和、透析、凍結乾燥し少量の水に溶解してセファデックス G-75 カラムクロマトグラフィーを行ない void volume の約 1.2 倍のところに溶出される Anthrone-硫酸反応陽性物質を集め凍結乾燥後白色粉末を得た (Fig. 1)。

2. 動物

4 週令の雌 ddY マウスは静岡県実験動物農協より、ウサギは体重約 2.5 kg の日本白色種を日本医科学動物資材研究所より購入し 5 日間の予備飼育後実験に供した。飼料は固型 (日本クレア) を、水は水道水を自由に摂取させた。

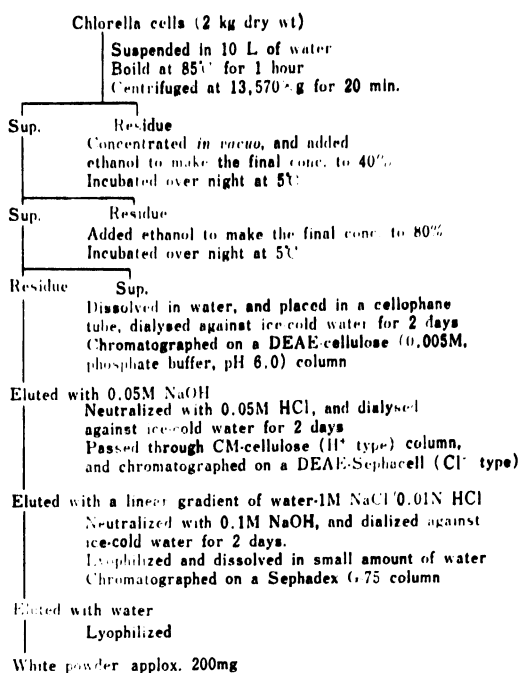
3. ウイルス

ワクシニアウイルスはウサギ皮膚で継代した D₁ 株を用いた。ウシ水疱性口内炎ウイルス (VSV) は RK-13 細胞に継代したものを使用した。インフルエンザ A/PR-8/43 (HoNo) ウイルスを経鼻的にマウスに接種し、発症したマウスの肺乳剤を、発育鶏卵に接種してウイルスを増殖させその漿尿液を種々の濃度に希釈してマウスに経鼻感染させウイルス液の LD₅₀ を求めた後実験に供した。

4. IFN 誘起能および IFN 活性の測定

主として以前報告した方法に準じて行なった^{9,10)}。即

Fig. 1 Purification procedure of Chlon A



ち *in vitro* 法として、ウサギを放血致死させ、脾を摘出し単細胞とし 2×10^7 個の脾細胞を含むように調製した浮遊液に種々の濃度のクロンAを加えた。次いでこれを 25°C で 24 時間培養しその遠心上清の IFN 活性を測定した。次に *in vivo* 法としてマウスの尾静脈に、100 mg/kg のクロンAを投与して経時的に採血しその血清中の IFN 活性を測定した。IFN 活性の測定はウサギ IFN の場合はウサギ腎株化細胞 RK-13、マウスは L 細胞を用い、ウシ水疱性口内炎ウイルス (VSV) を攻撃用ウイルスとしてブランク 50% 減少法で行なった。IFN 価は国際単位をもって表わした。

5. ウイルス感染阻止

1 群 7 匹の 5 週令雌 ddY マウスの尾静脈よりワクシニアウイルスを注射する前、同時、あるいはあとに種々の濃度のクロンAを尾静脈より投与した。ウイルス感染 8 日後にマウス尾部の皮膚に現われるポック数を観察した。一方、インフルエンザウイルスの場合は、ネンブタールをマウスの腹腔内に注入して麻酔させた後、鼻腔よりウイルス (10LD₅₀) を接種しその後のマウスの生死を観察した。

6. 制癌活性

1 群 7 匹の ddY マウス腹腔に 2.5×10^6 個の Ehrlich 細胞を移植し、同日よりクロンAを毎日 9 日間 *i. p.* 投与し、その後の宿主の延命日数を観察した。

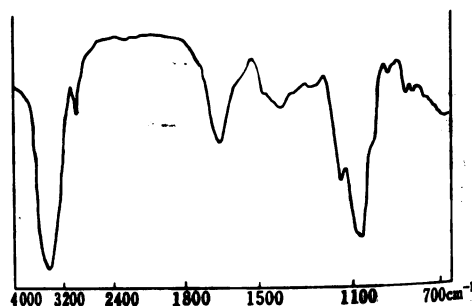
Table 1 Physicochemical properties of Chlon A

Nature	White powder
Analysis	C: 38.49, H: 6.07, N: 1.39
Rotation	$[\alpha]_D^{25} -9.52$ ($c=1$, H ₂ O)
UV Max ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$)	End absorption
Melting point	Approx. 240°C (dec.)
Color reaction	Positive: anthrone, phenol-H ₂ SO ₄ , carbazole-H ₂ SO ₄ , Molisch, Negative: Folin-Lowry
Ultracentrifugation ¹⁾	A single symmetrical peak (6.15 S)
Monosaccharide analysis ²⁾	Rha, Ara, Glc, Gal, Glc A
Solubility	Soluble in H ₂ O, insoluble in the other organic solvent

1) A solution containing 2 mg/ml of the purified Chlon A was made 0.2 M in phosphate buffer (pH 7.2) and centrifuged at 51,200 rpm in a Hitachi UCA-1 A analytical centrifuge (Rotor: RA 60 HC).

2) Chlon A (5 mg) was dissolved in 2 ml of 2 N H₂SO₄ and hydrolysed for 5 hours at 100°C. The hydrolysate was applied to thin layer silica plate (Merck art. No. 5553) previously treated with NaH₂PO₄. For gas chromatography, the hydrolysate was trimethylsilylated, and these were then injected into a 0.3 cm × 300 cm glass column containing 3% silicone GF SE-52 and chromosorb W in a Shimadzu GC 4 BM gas chromatograph. At injection, the flash heater was 265°C. The oven was preheated to 150°C, then a rise of 2°C/min was continued to 230°C. The monosaccharides were identified by comparison of their positions to known positions of authentic compounds.

Fig. 2 IR spectrum of Chlon A (KBr)



II. 結 果

1. クロンAの物理化学的性質

クロレラの熱水抽出物より精製されたクロンAの物理化学的性質を種々に検討した (Table 1)。呈色反応の結果からクロンAはウロン酸を含む糖で蛋白質は認められ

なかった。酸加水分解後シリカゲル薄層プレートおよびガスクロマトグラフィーの分析ではラムノースを主成分として少なくとも5種類の糖より構成されている。アセテート膜電気泳動 (0.1 Mピリジン-酢酸, pH 5.0) で酸性物質であることが確認された。

2. クロンAの毒性

クロンAを生理的食塩水に溶解しマウス尾静脈より投与して急性毒性値を調べたところ、600 mg/kg で一時的な体重減少、運動抑制などがみられたが、死亡例がみられなかった。次に直接的な細胞毒性があるか否かを調べるために *in vitro* で培養している HeLa 細胞に 1,000 $\mu\text{g/ml}$ の濃度になるようにクロンAを加え3日間作用

させた後メタノールで固定しギムザ染色してその形態変化を観察したところ、なんら変化は認められなかった。

3. クロンAの IFN 誘起能

in vitro でウサギの脾細胞に種々の濃度のクロンAを作用させて培養液中に産生される IFN の力価を測定した。その結果 Table 2 に示すように 0.01 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でも IFN が誘起された。次に *in vivo* で IFN 誘起能があるか否かを調べるためにマウスに 100 mg/kg のクロンAを尾静脈より注射して経時的にマウスから採血して血清中の IFN の titer を測定した。その結果 Fig. 3 に示すように、投与 2.5 時間後に最高値に達し以後漸減し、10 時間後には IFN 活性は証明されなかった。

4. ウイルス感染抑制作用

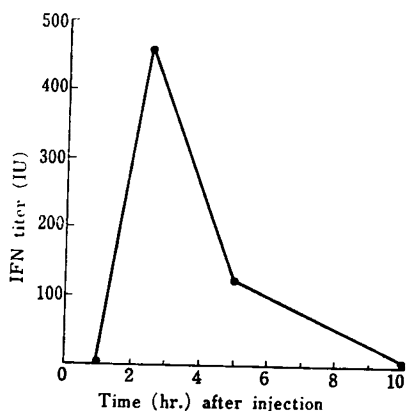
Table 2 Production of interferon with Chlon A in rabbit spleen cell cultures

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	IFN titer (IU)	
	Chlon A	Endotoxin*
100	250	230
10	190	240
1	190	200
0.1	78	210
0.01	23	100
0.001	<5	73
—		<5

* *E. coli* (Sigma)

Rabbit spleen cells were incubated with Chlon A for one day at 25°C, and IFN titer in the medium were determined as briefly described in the text.

Fig. 3 Production of circulation IFN with Chlon A in mice



At various times after i. v. injection with a 100 mg/kg of Chlon A, five mice from each group were bled and IFN titer in serum was determined.

Table 3 Effect of Chlon A on vaccinia virus infection in mice

Dose (mg/kg)	Treatment schedule(hr.)	Mean No. of pock (\pm S. D.)	Inhibition (%)
Saline	— 2.5	41.5 \pm 17.0	0
	— 2.5	41.5 \pm 17.0	0
25	— 24	4.0 \pm 2.6	91
	— 10	3.6 \pm 6.2	91
	— 5	4.4 \pm 5.9	89
	— 2.5	1.2 \pm 1.2	97
	0	5.2 \pm 5.1	88
	2.5	16.4 \pm 9.4	61
	2.5	16.4 \pm 9.4	61
6.3	— 24	7.0 \pm 5.9	83
	— 10	1.4 \pm 1.5	97
	— 5	1.0 \pm 0.6	99
	— 2.5	5.2 \pm 9.4	88
	0	14.4 \pm 10.7	65
	2.5	17.0 \pm 14.6	59
	2.5	17.0 \pm 14.6	59
1.6	— 24	5.2 \pm 2.7	88
	— 10	5.2 \pm 3.7	88
	— 5	1.6 \pm 0.8	96
	— 2.5	2.8 \pm 1.7	93
	0	11.2 \pm 15.5	73
	2.5	30.6 \pm 29.7	26
	2.5	30.6 \pm 29.7	26
0.39	— 24	10.6 \pm 9.3	75
	— 10	8.4 \pm 10.3	80
	— 5	3.8 \pm 1.8	91
	— 2.5	10.2 \pm 8.3	75
	0	11.2 \pm 9.2	73
	0	11.2 \pm 9.2	73

Female ddY mice were given a single i. v. injection of various doses of Chlon A on day 0. Before or after treatment, mice were challenged with vaccinia virus i. v. and number of pock appeared in the tail skin was counted at day 8 after the challenge.

Table 4 Effect of Chlon A on influenza virus infection in mice

Dose (mg/kg)	Treatment schedule (hr.)	Mean survival day (\pm S. D.)	S/T
—	—	9.5 \pm 2.20	0/11
25	-3	9.5 \pm 1.41	2/10
6.3	-3	9.3 \pm 0.83	1/9
25	-6	12.2 \pm 4.63	3/9
6.3	-6	9.3 \pm 1.28	2/9

S/T: No. of survivors/treated

Survivors were excluded from the calculation of mean survival day.

Mice were given with Chlon A i.v. at 3 or 6 hours before challenge with twenty LD₅₀ of influenza virus intranasally, and survival days of host were observed.

生体内でのウイルス感染抑制作用の有無を調べるためにワクシニアをマウス尾静脈より注射する前、同時あるいはあとにクロンAを尾静脈より投与して8日後にpock数を観察した。その結果、Table 3に示すように無治療群の平均pock数は41.5個であり、治療群では用いた薬量範囲(0.39~25 mg/kg)で著しいpock数出現抑制が認められた。特に25 mg/kg投与群では-24~0時間の処置で効果的で、投与量が少なくなると-5時間が最も効果ある傾向がみられた。

次にインフルエンザウイルスに対する作用を調べた。即ち、クロンAをマウス尾静脈より投与し3または6時間後に経鼻的にウイルスを感染させてマウスの生死を60日間観察した。その結果Table 4に示すように25 mg/kg投与し6時間にウイルスを感染させた群で延命効果が認められ、しかも9匹中3匹に、その他の群でも1~2匹に60日以上延命が認められた。

5. 制癌活性

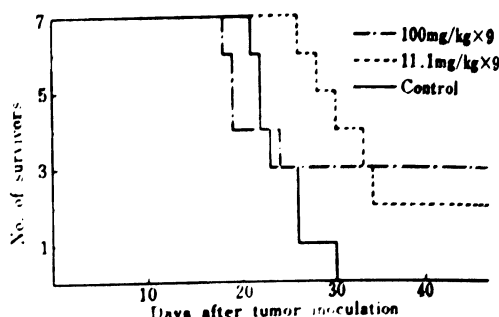
Fig. 4に示すように100または11.1 mg/kgを毎日9日間投与した場合、いずれの投与量でも宿主の延命効果がみられ、特に100 mg/kgでは7匹中3匹に著しい延命が認められた。

III. 考 察

クロレラビレノイドーサより酸性多糖を抽出、精製しその物理化学的および生物学的性質を調べた。

クロレラビレノイドーサの多糖類に関する研究は過去に種々報告されているが、われわれの得たクロンAと類似しているものとしてはWHITEらにより報告されているラムノース、アラビノース、キシロース、マンノース、ガラクトースおよびグルクロン酸から構成されているアルカリ可溶性の酸性多糖がある¹¹⁾。

Fig. 4 Antitumor effect of Chlon A on Ehrlich ascites carcinoma



Mice were inoculated i.p. with 1×10^6 Ehrlich cells, and were treated daily from days 0 to 8 with Chlon A.

構成糖で両者の特徴はグルクロン酸を含み、ラムノースの含有量が高いことであるが、クロンAはグルコースを含みキシロースは認められていない点異なる。

クロレラ多糖の生理活性について多数報告されているが特に生体防御に関するものとして猪野らによってX線照射に対する化学防護作用の促進、ネズミチフス菌に対する感染防御、adjuvant活性、などが認められている¹²⁾。この物質はその物理化学的分析からlipidおよびpeptide様物質を含んでおりクロンAとは異なっている¹³⁾。一方、クロレラの多糖類区分中に窒素化合物と結合しているβ-1,3グルカンが存在しこれが細網内皮系を賦活化することが報告されている^{14,15)}。細網内皮系の中核をなす細胞の一つにMφがあるが、MφがIFNの産生に重要な働きを示している¹⁶⁾。このグルカンの構成単糖は約90%がグルコースでありクロンAとは異なるが、クロンAがIFN誘起能を示すことからクロンAも網内系賦活化作用のあることが考えられる。

血中に誘起されたIFNは2.5時間前後のpeakであり、またデータに示していないが、*in vitro*で培養した繊維芽細胞にクロンAを加えても、IFNの産生がみられないことからIFN誘起能はendotoxinと似ている。データには示していないが、得られたIFNの酸性(pH 2.0, 24時間)および熱(56°C, 30分)に対する安定性は、対照として用いたendotoxin誘発のIFNとはほぼ同じで、比較的安定であることから少なくとも7型のIFNではないと考えられる。

*Chlorella pyrenoidosa*をC3Hマウスに投与した後同系の腹水腫瘍であるsarcoma BP8を移植すると腫瘍の増殖抑制がみられ¹⁰⁾、またこれを正常のC3Hに投与した場合抗体産生をmodulateすることが認められている¹⁷⁾。クロンAは*Chlorella pyrenoidosa*より分離された多糖であり、制癌活性の本体はクロンAであること

が考えられる。

制癌活性の作用機序は明らかではないが、本物質は直接的な殺細胞作用を示さず、IFN 誘起能を有すること、さらにある種の多糖体は宿主介入性の制癌活性を示すことなどからクロンAも同様の作用機序が考えられる。

以上示したように *Chlorella pyrenoidosa* より分離した酸性多糖は種々の生理活性を有することが判明し、現在宿主の免疫能に対する作用などを詳細に検討しているが、その結果は他に報告する。

<謝辞> 終りに臨み、本研究にご協力いただきました台湾行政院衛生省予防医学研究所陳豪勇博士、およびクロレラ原粉の提供をいただきました台湾緑藻工業股份有限公司に感謝致します。

文 献

- 1) 秦 藤樹：癌化学療法の進歩と問題点。代謝 17：245~254, 1980
- 2) 小宮山寛機：海藻の制癌作用。医薬ジャーナル 16：27~31, 1980
- 3) 海老名卓三郎：新インターフェロン誘起剤。蛋白質、核酸、酵素、別冊 25：81~96, 1981
- 4) 塚越 茂：多糖類の担癌動物に対する宿主効果、特にカワラタケ由来蛋白質、PS-K の作用について。癌と化学療法 1：251~257, 1974
- 5) 秋山由紀雄、羽室淳爾：多糖の抗腫瘍性発現の機序と免疫学的性状の特徴。蛋白質、核酸、酵素 26：208~224, 1981
- 6) 中野陽典、田口鉄男：抗腫瘍蛋白質多糖体 PS-K を使用した癌の免疫化学療法。癌と化学療法 2：13~20, 1975
- 7) YAMAMURA, Y.; I. AZUMA, T. TAMIYAMA, E. RIBI & B. ZBAR: Suppression of tumor growth and regression of established tumor with oil-attached mycobacterial fractions. Gann 65：179~182, 1974
- 8) KOJIMA, Y.; S. KONNO, N. SHIBUKAWA, S. TAMAMURA & T. HASHIMOTO: Interferon production and the antiviral and antitumor effects exerted by extract of *Perilla frutescens* in

rabbits and mice. Antiviral Res. 1：66, 1981

- 9) SHIBUKAWA, N.; H. HASGUNITI, A. SHIBUSAWA & Y. KOJIMA: Induction of interferon by stimulation with tuberculin in mice previously infected with *Mycobacterium tuberculosis* strain BCG. Kitasato Arch. Exp. Med. 50：23~29, 1977
- 10) HASHIMOTO, H.; N. SHIBUKAWA & Y. KOJIMA: The mode of production of endotoxin-induced interferon in rabbit cells. Microbial. Immunol. 22：673~681, 1978
- 11) WHITE, R. C. & G. A. BARBER: An acidic polysaccharide from the cell wall of *Chlorella pyrenoidosa*. Biochim. Biophys. Acta 264：117~128, 1972
- 12) 猪野 茂：クロレラ多糖体の生物学的意義に関する研究。I. 予報、福島県衛生研究所年報 16：1~4, 1968
- 13) 西山英太：クロレラ多糖体の生物学的意義に関する研究 IV. Crude polysaccharide の物理化学的諸性状について。ibid：26~30, 1968
- 14) 小島 瑞、矢戸教治、小林清三郎、土橋陸夫、猪野 茂：クロレラ抽出物の網内系食能におよぼす効果について。日本網内系学会誌 10：83~86, 1971
- 15) KOJIMA, M.; T. KASAJIMA, S. KOBAYASHI, M. DOBASHI & T. UMEDA: A new *Chlorella* polysaccharide and the accelerating effect on the phagocytic activity of the reticuloendothelial system. Rec. Adv. RES Res. 13：101~122, 1974
- 16) VERMELL, C. & O. MORIN: Role expérimental des algues unicellulaires prototheca et *Chlorella* (*Chlorellaceae*) dans l'immunogénèse anticancéreuse (sarcome murin BP 8). C. R. Soc. Biol. 170：646~649 1976
- 17) NEVEU, P. J.; O. MORIN, M. MIEGEVILLE, B. P. LEMEVEL & C. VERMEIL: Modulation of antibody synthesis by an antitumor alga. Experimentia 34：1644~1645, 1978

AN ACIDIC POLYSACCHARIDE, CHLON A, FROM
CHLORELLA PYRENOIDOSA

1. PHYSICOCHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES

IWAO UMEZAWA, KANKI KOMIYAMA, NOBUYUKI SHIBUKAWA, MIDORI MORI and YASUHIKO KOJIMA

The Kitasato Institute

An acidic polysaccharide, Chlon A, was purified from the hot water extract of *Chlorella pyrenoidosa* by ion-exchange chromatography and gel filtration. Ultracentrifugal analysis of the preparation indicated that it was homogeneous, and the following monosaccharides were released by complete acid hydrolysis: rhamnose, arabinose, glucose, galactose, and glucuronic acid. Chlon A acts as interferon inducer *in vitro* and *in vivo*. When mice were given Chlon A i.v. a relatively high titer of interferon was observed in the serum 2.5 hours after the injection. Interferon induced by Chlon A in mice was not γ -type since it was relatively stable at 56°C and pH 2.0. Chlon A suppressed the appearance of pocks in the tail skin of mice challenged with vaccinia virus. The protective activities of Chlon A were also observed against influenza virus infections in mice by an increase in the survival rate. Chlon A also showed antitumor activity against Ehrlich ascites carcinoma inoculated into ddY mice.