

炎症に対するキチンオリゴ糖および キトサンオリゴ糖の薬理的検討

高橋 顯仁

Study of Pharmacological Effects of Chitinoligosaccharide and Chitosanoligosaccharide on Acute Inflammation

Akihito TAKAHASHI

Chitinoligosaccharide and chitosanoligosaccharide which are polymers of several N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine, are water-soluble.

The aim of this study was to clarify the pharmacological effects of these oligosaccharides on acute inflammation.

The following results were obtained.

1. The inhibitory activity of vascular permeability of tested drugs to ICR-mice was estimated to be in the following order, calculated from 50% effective dose (ED_{50}).

Chitosanoligosaccharide > chitinoligosaccharide > aspirin

2. The inhibitory activity of tested drugs to both cyclooxygenase (COX)-1 and 2 was estimated to be in the following order, calculated from 50% inhibitory concentration (IC_{50}).

Chitosanoligosaccharide > aspirin > chitinoligosaccharide

3. The selectivity of COX-1 and 2 was estimated to be in the following order, judging from COX-1 (IC_{50})/COX-2 (IC_{50}) calculation.

Chitinoligosaccharide > chitosanoligosaccharide > aspirin

4. The analgesic activity for acute inflammatory pain was estimated to be in the following order, calculated from ED_{50} .

Chitinoligosaccharide > chitosanoligosaccharide > aspirin

5. It was seemed that anti-inflammatory effects of chitosanoligosaccharide on mice gingivae was more than aspirin.

Based on these pharmacological findings, it was clarified that chitinoligosaccharide had greater analgesic activity and fewer side effects, based on the inhibited COX-1, than the other tested drugs, and chitosanoligosaccharide had greater inhibitory activity of vascular permeability and greater inhibitory activity of COX-2, based on causing inflammation, than the other tested drugs.

Key words : chitinoligosaccharide, chitosanoligosaccharide, vascular permeability, inhibitory activity of cyclooxygenase, analgesic activity

受付：平成15年1月31日，受理：平成15年4月11日
奥羽大学歯学部歯科薬理学講座
(指導：五十嵐治義教授)

Department of Dental Pharmacology, Ohu University
School of Dentistry
(Director : Prof. Haruyoshi IGARASHI)

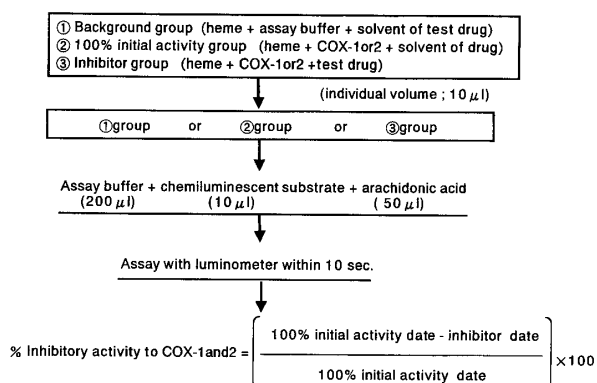


Fig. 1 Assay of inhibitory activity to cyclooxygenase-1 and 2.

3) 使用薬物

- (1) アスピリン(シグマ, 米国)
- (2) キチンオリゴ糖(焼津水産化学工業, 静岡)
- (3) キトサンオリゴ糖(焼津水産化学工業, 静岡)
- (4) 酢酸(和光純薬, 大阪), エバンスブルー(和光純薬, 大阪)

2. 実験方法

1) 毛細血管透過性に対する作用

Whittleの方法¹⁸⁾に準じて、体重24~26 gの5週齢のICR系雄性マウス(1群;n=9~27)を用いて行った。実験群の被検薬物のうち、キチンオリゴ糖とキトサンオリゴ糖は $2 \times 10^{-5}\%$ 、 $2 \times 10^{-4}\%$ および $2 \times 10^{-3}\%$ の各々を体重10 gあたり0.1ml(0.1ml/10 g)の割合で尾静脈内注射して30分後に、また対照被検薬のアスピリンは0.25%、0.5%および1.0%の各々を0.1ml/10 gの割合で背部皮下注射した。注射10分後に、1.0%エバンスブルー生理食塩液を0.05ml/10 gの割合で各動物に尾静脈内注射した。

さらにその10分後に0.6%酢酸水溶液0.1ml/10 gの割合で、腹腔内注射した。酢酸投与60分後に頸椎を脱臼して開腹後腹腔内を5 mlの蒸留水で洗浄し、4 mlを回収して、洗液に蒸留水を追加して、全量を10mlとした。なお対照群は実験群の被検薬物の代わりに生理食塩液を投与して、同条件下にて実験した。

次に、洗液を遠心分離機(KUBOTA KN-70, 東京)で、3000rpm、10分間の条件で分離後、上

清液を610nm条件下で比色計(4049 spectrophotometer, LKB Biochrom, USA)を用いて測定し、検量曲線で着色した血管透過血漿成分量を求めた。さらに、血管透過性抑制率は次式により算出した。

$$\text{血管透過性抑制率(\%)} = \frac{(\text{対照群値} - \text{実験群値})}{\text{対照群値}} \times 100$$

対照群値：生理食塩液投与群の血管透過血漿成分量

実験群値：被検薬物投与群の血管透過血漿成分量
 また、被検薬物の投与用量とそれらの血管透過抑制率より、50%血管透過抑制用量(ED₅₀)を求めた。

2) シクロオキシゲナーゼ(COX-1と2)に対する抑制作用

Forghaniらの方法¹⁹⁾に準じて、chemiluminescent COX(ovine)inhibitor screening assay kitを用いて、室温25°C, in vitroで(1群;n=3~4)行った。なお、対照の被検薬物はアスピリンを用い、COX-1および2の50%抑制濃度(IC₅₀)を求めるために、0.1%~10%の10種の溶液を作成した。また、実験群の被検薬物はキチンオリゴ糖のIC₅₀を求めるために $2 \times 10^{-2}\%$ ~12%の9種の溶液を、さらにキトサンオリゴ糖のIC₅₀を求めるために、 $2 \times 10^{-2}\%$ ~10%の11種の溶液を作成した。

さらに実験順序は図1に示したように、次の通り行った。

(1) Background群, 100% initial activity群, inhibitory群の各溶液を作製した。なお、各群の溶液作製に用いた試薬容量は各々10 μ lである。

(2) 各群にassay buffer 200 μ l, chemiluminescent substrate 10 μ lを加えた後に、arachidonic acid 50 μ lを加え、10秒以内でluminometer(TD-20/20, プロメガ, 東京)で測定した。

(3) 100% initial activity群とinhibitor(被検薬物)群のrelative luminescent unit(RLU)からbackground群のRLUを差し引いた値を用いて、図1の算出式よりCOXの抑制率(%)を算出した。

(4) 被検薬物の濃度とCOX抑制率より、各被検薬物のCOX-1と2に対する50%抑制濃度(IC₅₀)を求めた。

(5) COX-1, 2に対する選択性、すなわち

Table 3 Effects of aspirin, chitinoligosaccharide and chitosanoligosaccharide on increased vascular permeability induced by 0.6% acetic acid

Group	Dose	No. of mice	Permeability concentration ^{c)}	Inhibition (%)
Vehicle ^{a)}		24	185.6±33.3	
Aspirin ^{b)}	25mg/kg	9	113.6±25.0***	38.8
	50mg/kg	10	97.6±31.4***	46.8
	100mg/kg	27	53.1±22.3***	71.4
Chitinoligosaccharide ^{a)}	2μg/kg	11	132.3±20.1***	28.7
	20μg/kg	15	91.3±28.2**	50.8
	200μg/kg	24	52.2±18.5***	71.9
Chitosanoligosaccharide ^{a)}	2μg/kg	16	113.5±20.0***	38.8
	20μg/kg	23	63.5±22.1***	65.8
	200μg/kg	24	44.5±25.3***	76.0

Each value shows the mean ±SD.

P<0.01 ; *P<0.001 vs Vehicle (Fisher PLSD test).

a) : intravenous injection (i.v.).

b) : subcutaneous injection (s.c.).

c) : μg/deciliter.

COX-1の抑制による副作用の大小の判定値は、COX-1 (IC₅₀)/COX-2 (IC₅₀)から求めた。

3) 歯肉組織標本の作製

体重30~36gの6週齢、ICR系雄性マウス、1群3匹を用いて行った。対照群には生理食塩液0.1ml/10gを尾静脈内注射30分後に、また実験群の被検薬物として、キトサンオリゴ糖の100mg/kg (0.1ml/10g)を尾静脈内注射30分後に、対照の被検薬物として市販アスピリンの500mg/kg (0.1ml/10g)を腹腔内注射20分後に、10%ペントバルビタール溶液 (ネンブタール, 大日本, 大阪)を0.05ml腹腔内注射した。仮眠を確認後、起炎剤として2%酢酸0.01mlをマウス下顎門歯の歯肉溝内に注射し5時間後に賭殺した。各群のマウスから門歯を顎骨とともに摘出し、ブアン固定液で2日間固定し通法に従い、パラフィン包埋し、7~8μm厚の切片を作製した後、アザン染色を施し顕微鏡観察した。

4) 炎症性疼痛に対する鎮痛作用

Kosterらの方法²⁰⁾に準じて、体重24~28gの5週齢、ICR系雄性マウス、1群10匹を用いて行った。実験群の被検薬物としてキチンオリゴ糖とキ

Table 4 Effects of aspirin, chitinoligosaccharide and chitosanoligosaccharide on acetic acid-induced writhing in mice

Group	Dose	Number of writhing	Inhibition (%)
Control ^{a)}		46.6±9.1	
Aspirin ^{a)}	25mg/kg	40.3±8.4	13.5
	50mg/kg	33.7±6.3**	27.7
	100mg/kg	13.3±8.2***	71.5
Chitosanoligosaccharide ^{b)}	2μg/kg	36.4±9.8*	21.9
	20μg/kg	25.6±9.4***	45.1
	200μg/kg	20.4±8.6***	56.2
Chitinoligosaccharide ^{b)}	2μg/kg	27.7±9.2***	40.6
	20μg/kg	18.7±9.0***	59.9
	200μg/kg	15.8±7.2***	66.1

Each value represents the mean ± SD of 10 mice

*P<0.05 ; **P<0.01 ; ***P<0.001 vs control (Fisher PLSD test).

a) : subcutaneous injection (s.c).

b) : intravenous injection (i.v).

Table 5 Pharmacological activity of aspirin, chitinoligosaccharide and chitosanoligosaccharide

Tested drugs	Tested items	chitinoligosaccharide	chitosanoligosaccharide	aspirin
		Inhibitory activity of vascular permeability (ED ₅₀) ^(a)	19.1μg/kg	5.5μg/kg
Inhibitory activity to cyclooxygenase (IC ₅₀) ^(b)	COX-1	2.92%	0.1%	0.21%
	COX-2	6.53%	1.1%	2.37%
Selectivity of COX-1 and 2 (COX-1/COX-2)		0.45	0.09	0.08
Analgesic activity for acute inflammatory pain (ED ₅₀) ^(a)		7.3μg/kg	68μg/kg	56.3×10 ³ μg/kg

(a) ED₅₀=50% of effective dose.

(b) IC₅₀=50% inhibitory concentration.

トサンオリゴ糖は2μg/kg, 20μg/kg, 200μg/kgの各々を尾静脈内注射30分後に、また対照用の被検薬物として市販アスピリンは25mg/kg, 50mg/kg, 100mg/kgを背部皮下注射15分後に0.6%酢酸 (和光純薬, 大阪)を0.1mg/10gの割合で腹腔内注射した。酢酸投与から20分間のwrithingの回数を数え、生理食塩液投与の対照群のwrithingの回数であ

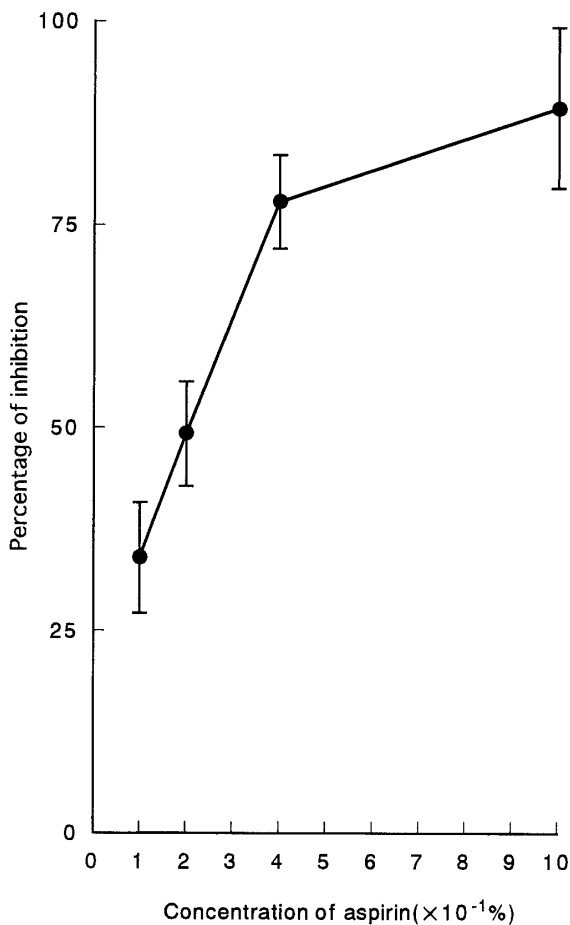


Fig. 2 Inhibition of ovine COX-1 by aspirin (n=3~4). Each value shows the mean \pm SD.

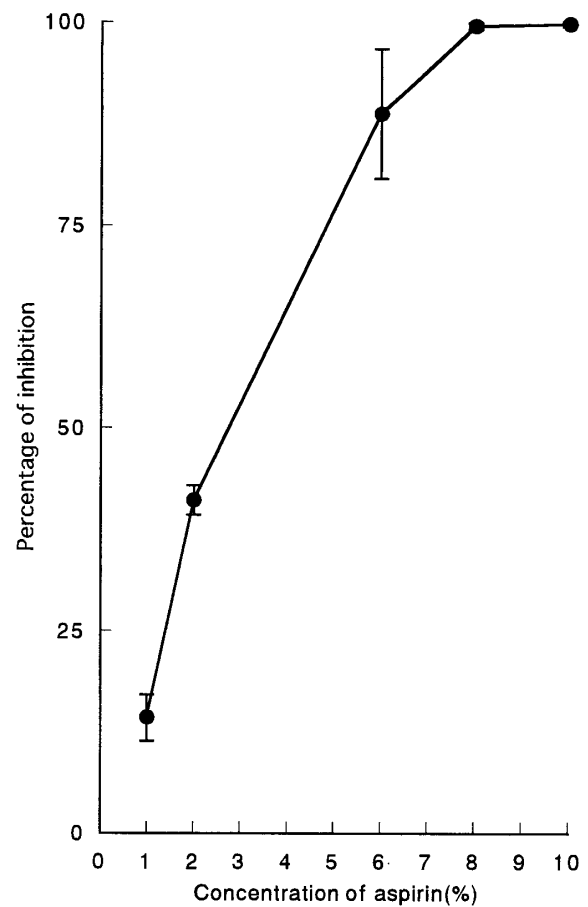


Fig. 3 Inhibition of ovine COX-2 by aspirin (n=3~4). Each value shows the mean \pm SD.

る対照値から、writhing抑制率，すなわち炎症性疼痛に対する鎮痛活性を測定した。

$$\text{writhing抑制率(\%)} = \frac{(\text{対照群値} - \text{実験群値})}{\text{対照群値}} \times 100$$

また、被検薬物の投与した用量とそれらのwrithing抑制率より、50%writhing抑制用量 (ED_{50})すなわち50%鎮痛活性を求めた。

5) 統計処理

本実験におけるすべての測定値は、一元配置分散分析で有意差を認めたものを、さらにFisherのPLSD法 (ソフトウェア, Stat View Ver. 4, Hulinlinks, 米国) で多重比較した。

3. 実験結果

1) 毛細血管透過性に対する作用

対照用被検薬物のアスピリンおよび実験群被検薬物キチンオリゴ糖とキトサンオリゴ糖についての結果は表3に示した。

(1) 対照用被検薬物アスピリン

マウス腹腔内への酢酸投与による毛細血管透過性の亢進は、アスピリン25mg/kg, 50mg/kg, 100mg/kgの背部皮下注射により、38.8%, 46.8%, 71.4%と用量依存的に抑制した。さらに、毛細血管透過性亢進を50%抑制するアスピリンの用量 (ED_{50})は、44.5mg/kg (表5)である。

(2) 実験群被検薬物キチンオリゴ糖

キチンオリゴ糖の2 μ g/kg, 20 μ g/kg, 200 μ g/kgを尾静脈内注射した後、酢酸投与による毛細血管透過性亢進に対する抑制率は28.7%, 50.8%, 71.9%と用量依存的に増加した。一方、毛細血管透過性を50%抑制するキチンオリゴ糖の用量 (ED_{50})は、19.1 μ g/kg (表5)である。

(3) 実験群被検薬物キトサンオリゴ糖

2 μ g/kg, 20 μ g/kg, 200 μ g/kgと増量しながら、キトサンオリゴ糖を尾静脈内注射すると、酢酸の

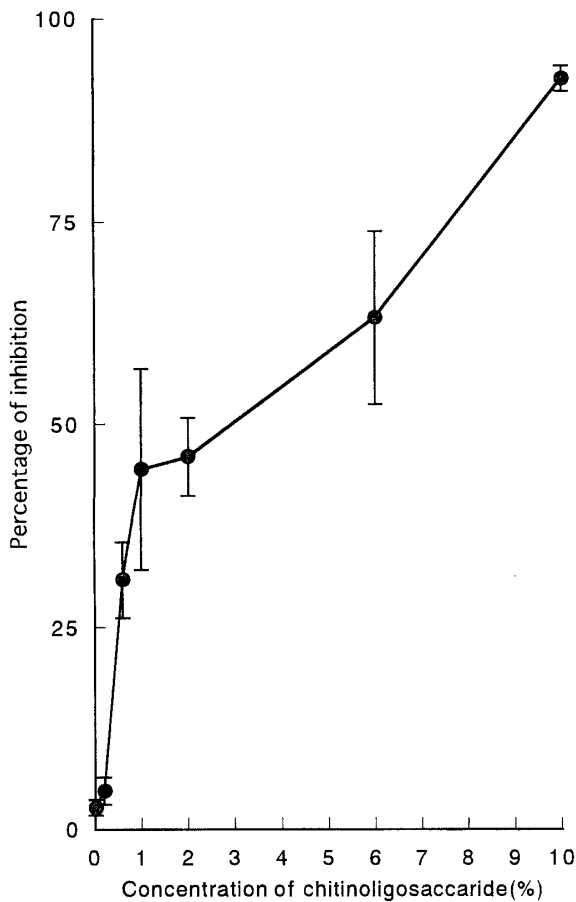


Fig. 4 Inhibition of ovine COX-1 by chitinoligosaccharide (n=3~4).
Each value shows the mean \pm SD.

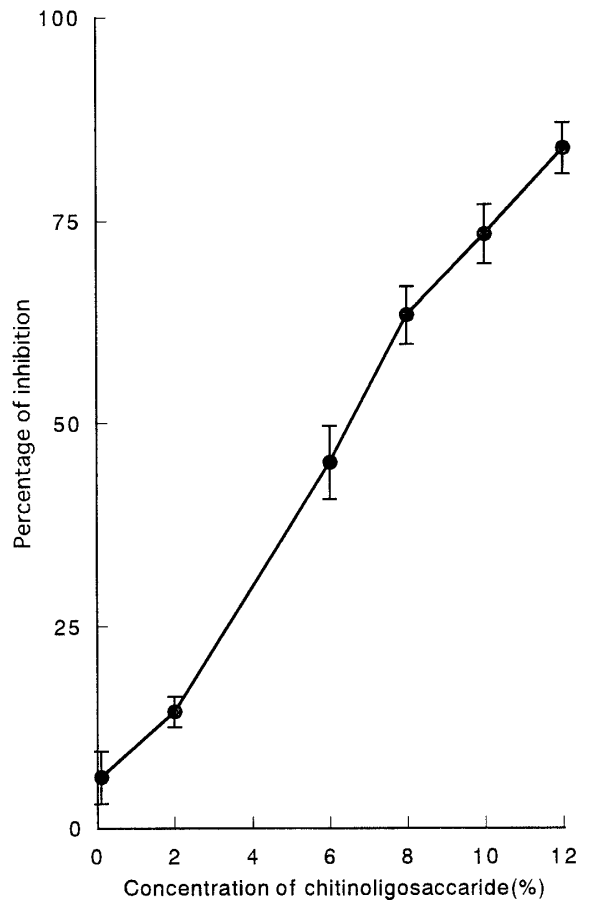


Fig. 5 Inhibition of ovine COX-2 by chitinoligosaccharide (n=3~4).
Each value shows the mean \pm SD.

腹腔内投与により毛細血管透過性亢進に対する抑制率は、38.8%、65.8%、76.0%と用量依存的に増加した。また、毛細血管透過性を50%抑制するキチンオリゴ糖の用量(ED_{50})は、5.5 μ g/kg (表5)である。

2) シクロオキシゲナーゼ(COX-1と2)に対する作用

(1) 対照用被検薬物アスピリンのCOXに対する抑制作用

アスピリンの実験結果は図2と3に示した。アスピリンのCOX-1に対する抑制作用(図2)については、0.1%アスピリンの抑制率は34%であり、アスピリンの濃度を0.4%と高くすると、抑制率は急勾配に増加して78%を示した。しかし、アスピリンを1.0%に増量しても抑制率は緩やかな勾配で増加して89%を示したに過ぎなかった。また、

COX-1に対するアスピリンの50%抑制率(IC_{50})は、0.21% (表5)を示した。

一方、図3でのCOX-2に対するアスピリンの抑制率では、1%アスピリンの場合、抑制率14%であるが、アスピリンの濃度を6%に高めると抑制率は89%と急激に増加し、8%アスピリンでは100%の抑制率を示した。また、COX-2に対するアスピリンの50%抑制率(IC_{50})は2.37% (表5)であった。

(2) 実験群被検薬物キチンオリゴ糖のCOXに対する抑制作用

キチンオリゴ糖の実験結果は図4と5に示した。図4でのキチンオリゴ糖のCOX-1に対する抑制作用では、0.02%キチンオリゴ糖の抑制率は3%であるが1.0%キチンオリゴ糖では45%の抑制率と急勾配に増加した。さらにキチンオリゴ糖の濃

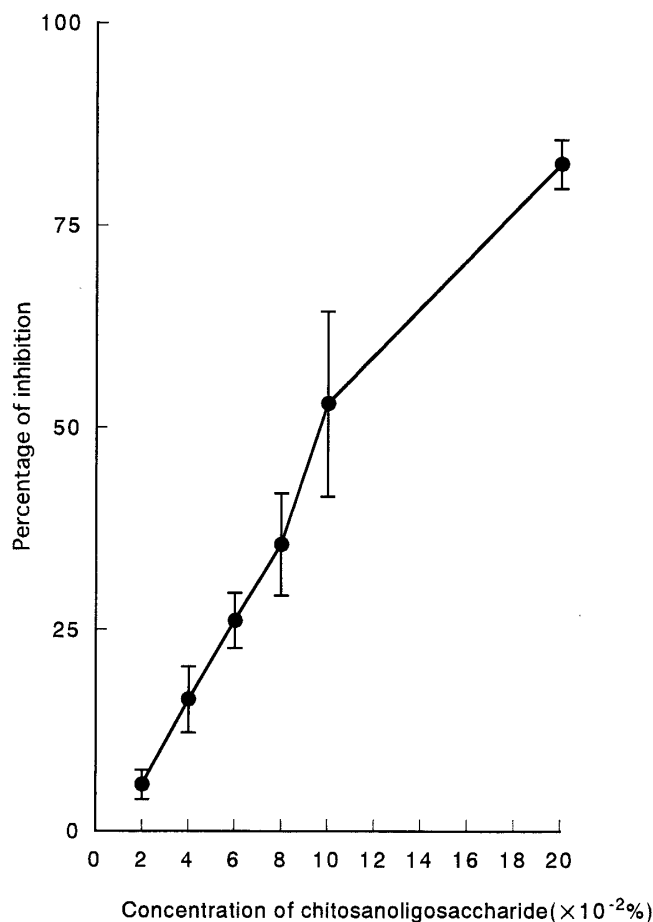


Fig. 6 Inhibition of ovine COX-1 by chitosan oligosaccharide (n=3~4).
Each value shows the mean \pm SD.

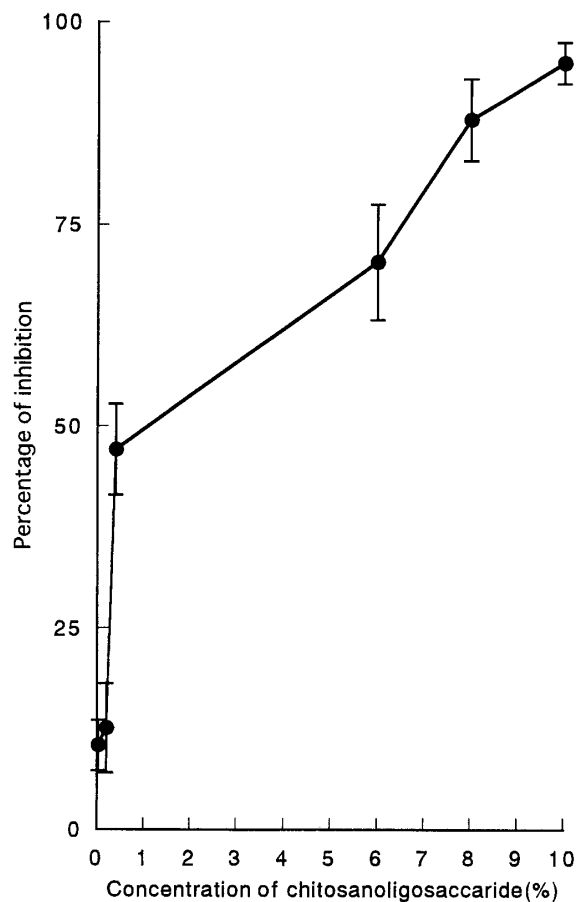


Fig. 7 Inhibition of ovine COX-2 by chitosan oligosaccharide (n=3~4).
Each value shows the mean \pm SD.

度を1%から10%へと高めると、COX-1に対する抑制率は濃度依存的に45%から93%へと増加した。また、COX-1に対するキチンオリゴ糖の50%抑制率(IC_{50})は2.92% (表5)を示した。

一方、図5でのCOX-2に対するキチンオリゴ糖の抑制率では、キチンオリゴ糖の濃度を $2 \times 10^{-2}\%$ 、2%、6%、8%、10%、12%とあげると、COX-2に対する抑制率も6.3%、14.4%、45.2%、63.4%、73.5%、84%と濃度依存的に抑制率の増強を示した。また、COX-2に対するキチンオリゴ糖の50%抑制率(IC_{50})は、6.53% (表5)であった。

(3) 実験群被検薬物キトサンオリゴ糖のCOXに対する抑制作用

キトサンオリゴ糖の実験結果は図6と7に示した。図6でのキトサンオリゴ糖のCOX-1に対す

る抑制作用では、キトサンオリゴ糖を $2 \times 10^{-2}\%$ 、 $4 \times 10^{-2}\%$ 、 $6 \times 10^{-2}\%$ 、 $8 \times 10^{-2}\%$ 、 $1 \times 10^{-1}\%$ 、 $2 \times 10^{-1}\%$ と濃度を高くすると、COX-1に対する抑制率も9.1%、16.3%、26.1%、36.9%、53%、82.7%とほぼ濃度依存的に抑制率の増強を示した。さらに、COX-1に対するキトサンオリゴ糖の50%抑制率(IC_{50})は、0.1% (表5)を示した。

一方、図7に示したキトサンオリゴ糖のCOX-2に対する抑制作用では、キトサンオリゴ糖の濃度を $3 \times 10^{-2}\%$ 、 $2 \times 10^{-1}\%$ 、 $4 \times 10^{-1}\%$ と増加させると、COX-2に対する抑制率は10.5%、12.5%、47.1%と急増した。しかし、キトサンオリゴ糖の濃度を $4 \times 10^{-1}\%$ 、6%、8%、10%と増加させると、COX-2に対する抑制率は、47.1%、70.3%、88%、95%とほぼ濃度依存的な増強を示

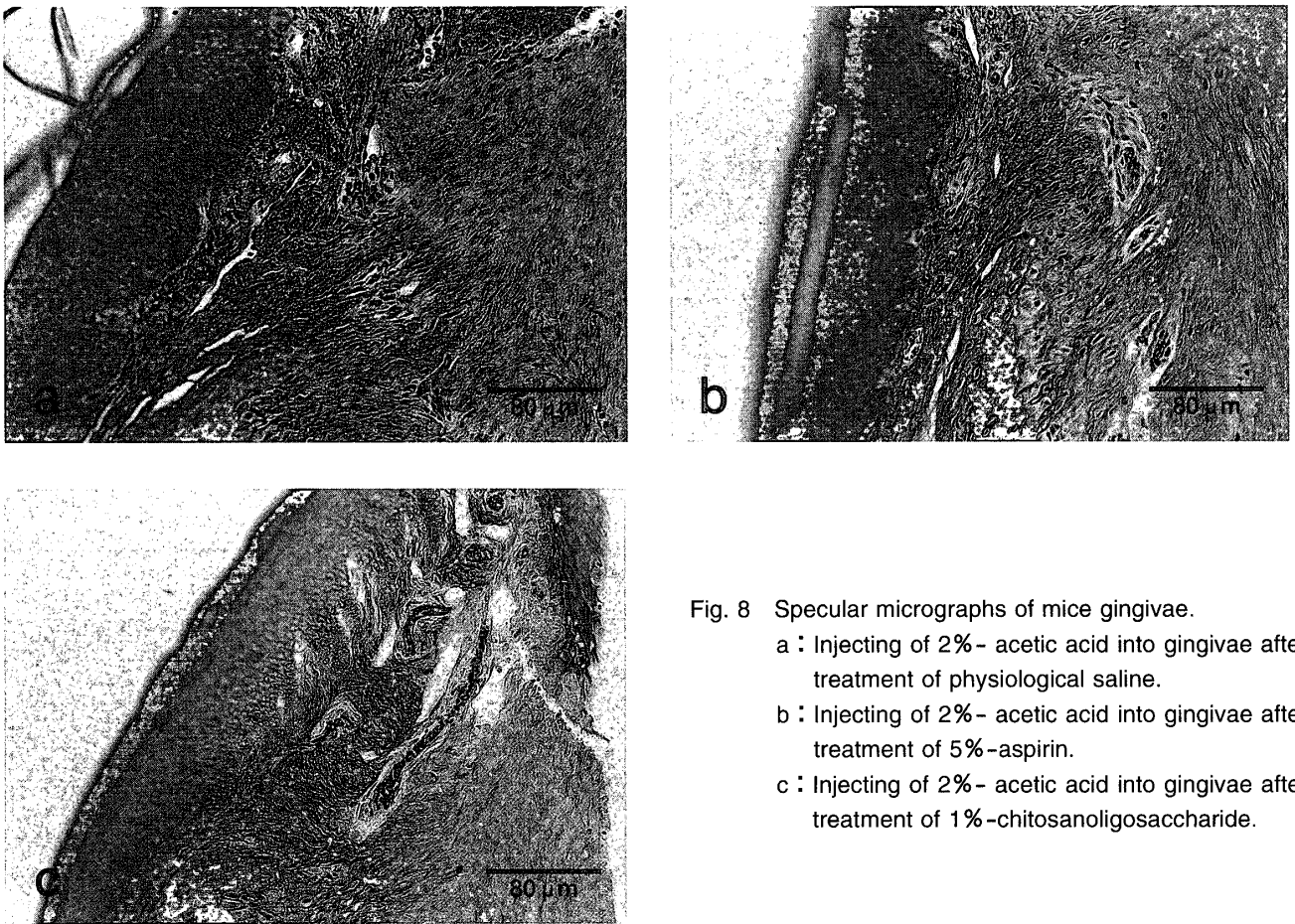


Fig. 8 Specular micrographs of mice gingivae.
 a : Injecting of 2%- acetic acid into gingivae after treatment of physiological saline.
 b : Injecting of 2%- acetic acid into gingivae after treatment of 5%-aspirin.
 c : Injecting of 2%- acetic acid into gingivae after treatment of 1%-chitosan oligosaccharide.

した。また、COX-2に対するキトサンオリゴ糖の50%抑制率(IC_{50})は、1.1% (表5)であった。

(4) COX-1とCOX-2の選択性

COX-1の阻害による副作用の大小を評価するCOX-1 (IC_{50})/COX-2 (IC_{50})の値(表5)はアスピリンが0.08, キトサンオリゴ糖が0.09, キチンオリゴ糖が0.45であった。

3) 形態学的観察

生理食塩液投与群(図8 a)では、アスピリン投与群(図8 b)とキトサンオリゴ糖投与群(図8 c)に比較して、炎症性細胞浸潤が多く、かつ線維芽細胞の分布状況も高かった。一方、膠原線維の分布状況では生理食塩液投与群が他の2群よりも粗であり、かつ上皮脚の消失は他群より著しかった。

次にアスピリン投与群では、炎症性細胞の浸潤や線維芽細胞の分布は他の2群に比較して中程度であった。さらに膠原線維の乱れや、血管壁の肥厚が観察された。

一方、キトサンオリゴ糖投与群では、炎症性細胞浸潤はほとんど観察されず、密な膠原線維束が

目立ち、うっ血や拡張した血管内に血液成分らしき構造物が認められた。また、上皮脚の消失は他群に比較して最も少なかった。

4) 炎症性疼痛に対する鎮痛作用

アスピリンの対照用被検薬物およびキチンオリゴ糖、キトサンオリゴ糖の実験群被検薬物についての結果は、表4に示した。

(1) 対照用被検薬物アスピリン

酢酸投与マウスに対するアスピリンのwrithing抑制率はアスピリンの用量を25mg/kg, 50mg/kg, 100mg/kgと増量させながら背部皮下注射をすると、13.5%, 27.7%, 71.5%と抑制率の増加を示した。また、アスピリンのwrithingの50%抑制用量(ED_{50})は、56.3mg/kg (表5)であった。

(2) 実験群被検薬物キチンオリゴ糖

酢酸によるマウスのwrithingの抑制率は、キチンオリゴ糖の用量を2 μ g/kg, 20 μ g/kg, 200 μ g/kgと増量すると、writhingの抑制率は40.6%, 59.9%, 66.1%と増加傾向を示した。さらに、キチンオリゴ糖のwrithing 50%抑制用量(ED_{50})は、7.3

$\mu\text{g}/\text{kg}$ (表5) を示した。

(3) 実験群被検薬物キトサンオリゴ糖

マウスの酢酸による writhing 抑制率は、キトサンオリゴ糖の用量を $2\mu\text{g}/\text{kg}$, $20\mu\text{g}/\text{kg}$, $200\mu\text{g}/\text{kg}$ と増量させると、抑制率では 21.9%, 45.1%, 56.2% と増加した。また、キトサンオリゴ糖の writhing 50% 抑制用量 (ED_{50}) は、 $68.0\mu\text{g}/\text{kg}$ (表5) を示した。

考 察

N-アセチル- β -D-グルコサミンの直鎖ムコ多糖類であるキチンおよびキトサンは、分子間および分子内の水素結合が強固であるために、水に不溶性である。最近、加水分解して水溶性にしたキチンオリゴ糖とキトサンオリゴ糖が登場したが、これらに関する研究報告は現状においては極めて少ない^{13,14,21)}。

そこで本研究では、従来の消炎鎮痛薬とは全く異なった化学構造式を有するキチンオリゴ糖、キトサンオリゴ糖を用いて、急性炎症を惹起させた血管透過性亢進に対するこれらオリゴ糖の抑制活性、アラキドン酸カスケードにおけるエイコサノイド生成酵素の COX-1, 2 の影響および急性炎症性疼痛に対する鎮痛活性を検索し、その作用を解明した。さらに、マウスの歯肉炎に対するこれらオリゴ糖などの形態学的検索も行った。

1. 血管透過性、COX および歯肉炎に対するオリゴ糖などの影響

炎症を特徴づける五大徴候の臨床所見では発赤、腫脹、疼痛、熱感および機能障害がある。また、病態生理学的には、炎症は静脈系と動脈系の間に介在する微小循環系を反応の場として、間葉系組織を総動員して起こる現象であり、傷害組織を修復へと誘導するための一連の生体反応として理解されている。しかし、薬理的には実験動物に対して、カラゲニン、酢酸、デキストラン、セロトニン、ホルマリンなどの起炎剤²²⁾を投与して急性炎症を惹起させると、傷害性刺激に続いて生じる炎症反応は、第一期(血管透過性期)、第二期(白血球遊走期)および第三期(修復また増殖)の一定の様式が認められ、これらの経過を経て組織修復が生じると理解されている。一般に、傷害性の刺

激により生体局所では細動脈が一過性に収縮し、次いで毛細血管系では全般にわたって持続性拡張が生じる。

そこで本研究では、まず炎症第一期の血管透過性亢進に対してキチンオリゴ糖とキトサンオリゴ糖およびアスピリンの影響を検索するために、これらをマウスに投与した。その後、起炎剤として 0.6% 酢酸を腹腔内に投与して傷害性刺激を与え、毛細血管の持続性拡張を起こし、細静脈部分で血管内皮細胞間隙から血漿蛋白質とともにその他の血漿成分を腹腔内に滲出させて定量した。その結果、生理食塩液投与の対照群値に対する実験群値から、血管透過性抑制活性を ED_{50} で比較すると、キトサンオリゴ糖、キチンオリゴ糖、アスピリンの順で活性低下を示した。これらの結果から、被検薬物のアスピリンやキチンオリゴ糖は他群より低い抑制活性を示すことが判明した。

次に、これら血管透過性亢進に対するオリゴ糖およびアスピリンの抑制活性のメカニズム解明実験を試みた。

血管透過性に関与する要素としては、エイコサノイドを始めとしてヒスタミン、セロトニン、ブラジキニンなどの多くのケミカルメディエーターがあることは衆知の事実である²²⁾。そこで今回は、アラキドン酸カスケードにおいて、エイコサノイドのうち PGE_1 , PGE_2 および PGI_2 などを生成する酵素の COX に対する影響を検索した。

COX 活性を 50% 抑制する被検薬物濃度 (IC_{50}) を比較した結果、COX-1 および COX-2 とともに、キトサンオリゴ糖、アスピリン、キチンオリゴ糖の順で抑制活性の低下をきたした。すなわち、キトサンオリゴ糖は血管透過性と COX の抑制活性が他より大きいことが示唆された。

COX の抑制活性について、Picot ら²³⁾ はアスピリンの COX 抑制では、COX の 530 番目のセリンがアスピリンによりアセチル化を受けて、化学構造の立体配位の変化により、COX の活性部位とアスピリンから脱アセチル化されたサリチル酸との親和性が弱くなり、COX 抑制活性がアセチル基を持たない他の酸性抗炎症薬よりも弱くなるものと推論している。そこで、今回使用したアセチル基を有するキチンオリゴ糖がキトサンオリゴ糖よ

りもCOX抑制活性が小さかったのは、アスピリンと同様な作用メカニズムであろうと推察した。さらに、アスピリンがキチンオリゴ糖よりも大きなCOX抑制活性を示した理由の一つとして、COXの活性部位に対する親和性が、低分子のアスピリンが高分子のキチンオリゴ糖よりも大きいためと考えられる²³⁾。

COXには、胃や腎臓など生理的機能の維持のために必要なエイコサノイドを生成する構成酵素としてCOX-1があり、このCOX-1の抑制により種々の副作用が誘発される。その指標として、COX-1とCOX-2の選択性²⁴⁾すなわちCOX-1(IC₅₀)/COX-2(IC₅₀)の値で評価され、この値が大きいほど副作用が小さいと言われている。今回使用した被検薬物では、キチンオリゴ糖(0.45)、キトサンオリゴ糖(0.09)、アスピリン(0.08)の順序で減少を示し、キチンオリゴ糖の副作用が他群より小さいことが解明され、さらに歯科領域で繁用されているインドメタシンよりも弱い副作用を示した²⁴⁾。

一方、急性炎症を惹起させたマウスの歯肉に対する被検薬物の影響では、キトサンオリゴ糖投与群(図8c)では、他群(図8aと8b)に比較して固有層内の細胞の乱れも少なく、また、うっ血や拡張した血管内に血液成分らしき構造物が観察されながらも、炎症性細胞は極めて少なかった。このことは、キトサンオリゴ糖投与群では起炎剤による血管拡張は生じるものの、キトサンオリゴ糖の血液中での挙動により血管透過性が抑制されることが示唆された。この点に対するメカニズムならびに意義については今後の詳細な検討が望まれる。いずれにしても、薬理的ならびに形態学的観察結果から、マウス歯肉の急性炎症に対する抗炎症効果は、キトサンオリゴ糖が他群に比較して高いことが判明した。

2. 急性炎症性疼痛に対する鎮痛活性

急性炎症を惹起させる目的で、起炎剤の酢酸を注射して傷害刺激を加えると、ヒスタミン、セロトニン、ブラジキニンなどのケミカルメディエーターが遊離する²²⁾。その結果、痛覚受容体の刺激や血管透過性亢進などにより、血漿成分が血管外に滲出し、それと同時に局所組織に保有されてい

る各種プロテアーゼが遊離して、血漿蛋白や局所組織中の蛋白に作用して、ブラジキニン、カリジン、メチオニルキニンなどの発痛性ペプチドなどを生成する^{25,26)}。ついでブラジキニンがB₂受容体に作用すると侵害受容線維の興奮を引き起こし疼痛を生じさせる²⁷⁾。

本研究で用いたキチンオリゴ糖、キトサンオリゴ糖およびアスピリンでは、酢酸による急性炎症性疼痛に対してはキチンオリゴ糖の鎮痛活性が最も高く、writhingの50%抑制率(ED₅₀)は7.3μg/kgであった。一方、キトサンオリゴ糖のED₅₀は68μg/kgであり、キチンオリゴ糖の鎮痛活性の約1/10であった。しかしながら、キトサンオリゴ糖の血管透過性の50%抑制率(ED₅₀)は5.5μg/kgであり、ED₅₀が19.1μg/kgのキチンオリゴ糖の約4倍の血管透過性抑制活性を有していた。キトサンオリゴ糖のCOX-2の50%抑制濃度(IC₅₀)は1.1%を示し、IC₅₀が6.53%のキチンオリゴ糖の約6倍のCOX-2抑制活性を示した。これらの事より、キチンオリゴ糖の急性炎症性疼痛に対する鎮痛抑制活性が高い要因として、血管透過による滲出物の挙動や、COX-2により生成されるプロスタグランジン類の影響や、今回検索しなかった各種プロテアーゼやサイトカインの挙動など、その他の要因が大きく鎮痛活性に影響しているものと思われる。

以上のことより、本研究では、ICR系雄性マウスに対しての血管透過性抑制活性(ED₅₀)と*in vitro*でのキットによる¹⁹⁾検定結果でのCOX抑制活性(IC₅₀)および形態学的観察から、キトサンオリゴ糖は他より抗炎症効果が優れており、また、急性炎症性疼痛に対する鎮痛活性(ED₅₀)と副作用〔COX-1(IC₅₀)/COX-2(IC₅₀)〕においては、キチンオリゴ糖が他より優れていることが示唆された。また、キトサンオリゴ糖の利点を考えると、今後、臨床において現在使用されている歯科治療薬に代わる有望な薬剤となり得る可能性が示唆された。

結 論

本研究では、急性炎症に対するこれらオリゴ糖の作用を薬理的観点からあきらかにし、また形

態学的観察より次の結論を得た。

1. マウスの急性炎症における血管透過性に対する抑制活性はED₅₀値よりキトサンオリゴ糖, キチンオリゴ糖, アスピリンの順序で活性低下をきたした。

2. キットを用いた*in vitro*の検定では, COX-1と2に対する抑制活性は, COX-1および2ともにIC₅₀値よりキトサンオリゴ糖, アスピリン, キチンオリゴ糖の順に活性の低下を示した。

3. COX-1とCOX-2に対する選択性は, COX-1(IC₅₀)/COX-2(IC₅₀)値より, キチンオリゴ糖, キトサンオリゴ糖, アスピリンの順に値の低下を示し, この値の大きいキチンオリゴ糖が, 他より副作用が少なかった。

4. 酢酸writhing法による, マウスに対する急性炎症性疼痛に対する鎮痛活性はED₅₀値より, キチンオリゴ糖, キトサンオリゴ糖, アスピリンの順序で活性低下をきたした。

5. 急性炎症を惹起させたマウスの歯肉炎に対してキトサンオリゴ糖は他よりも抗炎症効果の高いことが明らかとなった。

以上のことより, 本研究では, 血管透過性の抑制活性やCOX抑制活性が他よりも高いキトサンオリゴ糖は, 薬理的, 形態学的観察により抗炎症効果が他よりも高いことが判明した。また, キチンオリゴ糖は他よりも鎮痛活性が高く, 副作用の少ないことも明らかになった。

謝 辞

稿を終わるに臨み, 御指導, 御校閲を賜りました奥羽大学歯学部歯科薬理学講座 五十嵐治義教授に深謝致します。今回の研究に際して, 御協力を頂きました千葉有講師並びに田谷かほる助手, 松瀬志帆助手, 菅島正栄大学院生にお礼申し上げます。

本論文の要旨は第34回奥羽大学歯学会(平成14年11月9日 郡山)において発表した。

文 献

1) Muzzarelli, R. A. A. and Pariser, E. R. : Conf. chitin/chitosan (eds. Muzzarelli, R. A. A. and Pariser, E. R.) ; 1-280 M. I. T. Cambridge 1987.

2) Hirano, S. and Tokura, S. : Conf. chitin/chitosan. The Japanese Society of chitin and chitosan (eds. Hirano, S. and Tokura, S.) ; 1-650 Kodansha Tokyo 1982.

3) Zikakis, J. P. : Chitin, chitosan and related enzyme (ed. Zikakis, J. P.) ; 1-260 Academic press New York 1984.

4) 平野茂博: キチン, キトサンの潜在機能開発と有効利用. 化学と生物 **21** ; 635-636 1983.

5) 栗田恵輔: キチン, キトサンの化学とその応用. 化学の領域 **35** ; 929-937 1981.

6) 戸倉清一, 西 則雄: 天然多糖類の新しい利用法; 特にキチンおよびその誘導体を中心として. 化学と生物 **15** ; 766-774 1977.

7) Fukumoto, Y., Daimaru, H., Matsumoto, T., Ikebe, Y. *et al.* : Significance of clinical application of chitosan in zoo and wild animals. In chitin world. (eds. Karnicki, Z. S., Wojtasz-pajak, A., Brzeski, M. M. and Bykowski, P. J.) ; 402-407 Wirtschafsvverlag NW Germany 1995.

8) 戸倉清一, 西村紳一郎: 非哺乳類多糖の新しい展開; 新素材としての医学領域での利用を中心に. 蛋白・核酸・酵素 **31** ; 1621-1631 1986.

9) 外山章夫: Chitinとその誘導体の有効利用研究. 食品加工技術 **4** ; 215-222 1984.

10) 中東勝浩, 寺倉綾子, 寺本 彰, 阿部康次: ヒト歯根膜由来線維芽細胞の石灰化に対するキチン誘導体の影響. 信州医誌 **47** ; 95-96 1999.

11) 富永和宏, 富永尚宏, 徳久道生, 木船絃爾: 歯肉由来線維芽細胞様細胞及び骨芽細胞に及ぼすキチンの脱アセチル化度の違い. 日口外誌 **44** ; 941-950 1998.

12) 柳口嘉治郎, ヴィロリア・イルミナダ, 池田毅, 林 善彦: キチン・キトサンを使った直接覆髄後の創傷治癒過程. 日歯保存誌 **42** (秋季特別号) ; 69 1999.

13) Tokoro, A., Tatewaki, N., Suzuki, K. and Mikami, T. : Growth inhibitory effect of hexa-N-acetyl chitohexaose and chitohexase against Meth-A solid tumor. Chemical and Pharmaceutical Bulletin **36** ; 784-790 1988.

14) Tanigawa, T., Tanaka, Y. and Sashiwa, H. : Advances in chitin and chitosan. (eds. Brine, C. J., Sandford, P. A. and Zikakis, J. P.) ; 206-215 Elsevier Applied Science London and New York 1992.

15) 南 三郎, 岡本芳晴, 重政好弘: キチンおよびその誘導体の医学・獣医学応用. J. V. M. **50** ; 1033-1052 1997.

16) 吉田一郎: アスピリン中毒. 小児医学大系—小児医学の進歩(編者, 鴨下重彦, 鈴木義之, 早川浩) ; 263-271 中山書店 東京 1989.

17) 住友製薬: インテバン®sp. 医薬品インタビューフォーム(編者, 住友製薬株式会社医薬情報部) 改訂3版; 13-17 住友製薬 大阪 2001.

- 18) Whittle, B. A. : The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between nariotic acid nonnarcotic analgesics. *Br J Pharmacol* **22** ; 246-253 1964.
- 19) Forghani, F., Ouellet, M., Keen, S., Percival, M. D. *et al.* : Analysis of prostaglandinG/H synthase-2 inhibition using peroxidase-induced luminol luminescence. *Anal Biochem* **264** ; 216-221 1998.
- 20) Koster, R., Anderson, M. and de Beer, E. J. : Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc* **18** ; 412-417 1959.
- 21) 坂井和男：キチン，キトサンオリゴ糖の開発と現状．キチン，キトサンの開発と応用(平野茂博編) 初版；111-134 工業技術会 東京 1987.
- 22) 藤村 一：抗炎症薬．薬効の評価(1)薬理実験法(上)医薬品開発基礎講座V(津田恭介，野上 泰編)；239-282 地人書館 東京 1971.
- 23) Picot, D., Loll, P. J. and Garavito, R. M. : The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H₂ synthase-1. *Nature* **367** ; 243-249 1994.
- 24) Chan, C. C., Boyce, S., Brideau, C., Charleson, S. *et al.* : Rofecoxib [vioxx, MK-0966 ; 4-(4'-methyl sulfonyl phenyl)-3-phenyl-2-(5H)-furanone] : A potent and orally activity cyclooxygenase-2 inhibitor. *Pharmacological and biochemical profiles. J. Pharmco Exp Ther* **290** ; 551-560 1999.
- 25) 成宮 周：抗炎症薬およびその関連薬．ニュー薬理学(編者,田中千賀子,加藤隆一) 第4版；476-494 南江堂 東京 2002.
- 26) 河合 幹：炎症．新口腔外科学通論(編者, 高橋庄二郎, 河合 幹, 高井 宏) 初版；116-152 日本医事新報社出版局 東京 1982.
- 27) 佐藤公道：生理活性ペプチド．ニュー薬理学(田中千賀子, 加藤隆一編) 第4版；162-207 南江堂 東京 2002.

著者への連絡先：高橋顯仁，(〒963-8611)郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部歯科薬理学講座
 Reprint requests : Akihito TAKAHASHI, Department of Dental Pharmacology, Ohu University School of Dentistry
 31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan