

学 位 論 文 要 旨

氏名 澤田 陽子

題 目 : Evaluation of the efficacy of *Ajuga decumbens* extract supplement in a rabbit osteoarthritis model and in individuals with knee discomfort
(筋骨草エキスのウサギ軟骨損傷モデルと膝の不調を持つ人への有効性評価)

論文要旨 :

The dietary supplement glucosamine hydrochloride (GlcN) has been advocated as a safe and effective option for the management of symptoms of osteoarthritis (OA). Furthermore, the combination of GlcN with other supplements is expected to be more effective in relieving the OA symptoms. Therefore, to achieve a more effective therapy for OA, we investigated the substances having a beneficial effect on OA. *Ajuga decumbens* (AD), a natural herb, has been used long in Japan for pain relief. Recently, AD was reported to have potential for preventing osteoporosis (Ono et al., 2008); however, AD has not been investigated for its effects on damaged cartilage tissue.

In our previous report, we examined the effects of orally administered AD extract (ADE) alone or the combination with GlcN using rabbits with experimentally-induced cartilage injuries, and also compared with the effect of ecdysteroid β -ecdysone (BED), a component of ADE. We revealed that ADE enhanced the regeneration of subchondral bone in this model. Moreover, the combination of ADE with GlcN synergistically increased the regeneration of cartilaginous matrix and subchondral bone. Interestingly, BED exhibited the similar effects on the regeneration of damaged subchondral bone, suggesting that BED is an active component of ADE. Together these observations indicate that the combination of ADE with GlcN synergistically exhibits a therapeutic effect on OA due to the regeneration of the cartilaginous matrix and subchondral bone (Sawada et al., 2014).

In the present study, we concentrated the effective fraction of the extract to give extra ADE (EADE), which included 20-hydroxyecdysone, an active component of ADE. Firstly, we evaluated the effect of EADE on the acceleration of healing in experimental cartilage injury. A model of cartilage injury was surgically created by introduction of three holes, one in the articular cartilage of the medial trochlea and two in the trochlear sulcus of the distal femur. Rabbits used in the experiment were divided into four groups ($n = 3$), namely the control group, the ADE group, the low dosage of EADE (Low EADE) group, and the high dosage of EADE (High EADE) group. ADE and EADE were dissolved in tap water and each dosage was orally administered every day for 3 weeks. After the experimental period, the cartilage matrix was strongly regenerated in the Low and High EADE groups. The average number of

osteoclasts per 100 counts of osteoblast in subchondral bone decreased in the High EADE group to a greater extent compared to the control group. EADE also stimulated chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and induced in vitro proteoglycan production. Moreover, EADE significantly attenuated the stimulation of prostaglandin E2 production by interleukin-1 β in chondrocytes. Therefore, EADE might represent a remarkable improvement on the currently-used ADE.

Secondary, we evaluated the efficacy and safety of the oral administration of EADE supplement to individuals with knee discomfort associated with physical activity. A randomized, double-blind, placebo-controlled study was conducted using 48 subjects. The subjects were randomly allocated to an EADE diet group (oral administration of EADE-containing diet, n = 24) and a placebo group (n = 24), and the intervention was continued for 12 weeks. Finally, 22 subjects in the placebo group and 22 subjects in the EADE diet group assessed to be eligible for assessment of the efficacy of supplement. The knee function was assessed by changes in the scores of the Japanese Knee Osteoarthritis Measure (JKOM) questionnaire and the scores of the Japan Orthopedic Association (JOA) criteria as well as by analyzing the levels of type II collagen synthesis and degradation biomarkers (Procollagen II C-terminal propeptide, Degradation products of C-terminal telopeptide of type II collagen, C-terminus of the piece of type II collagen cleavage product and Matrix metalloproteinase -13). Outcomes were measured at the baseline and 4, 8, and 12 weeks from the start of administration. The subscale II (Joint flexion/stiffness) of the JOA criteria was substantially improved in the EADE diet group compared with the placebo group at 8 and 12 weeks during the intervention. Moreover, in the subgroup analyses using subjects with less knee discomfort, the subscale II (Pain/stiffness) and IV (General activities) scores of JKOM were significantly improved and Total score was substantially improved in the EADE diet group compared with the placebo group. Finally, no adverse effects were identified for the administration of EADE. These observations suggest that the administration of EADE-containing diet is safe and improves the joint function (flexion and stiffness) and general activities in the subjects with mild knee discomfort.

In conclusion, EADE could be a promising candidate as a functional food, which is useful for the joint health. The chondroprotective and anti-inflammatory actions EADE contribute to improve the knee joint function, and general activities and QOL in the subjects with mild knee discomfort.

学位論文審査の結果の要旨

氏名	澤田 陽子
審査委員	主査：鳥取大学 准教授 大崎 智弘
	副査：鳥取大学 教授 岡本 芳晴
	副査：鹿児島大学 教授 三角 一浩
	副査：鳥取大学 教授 今川 智敬
	副査：鳥取大学 准教授 杉山 晶彦
題目	Evaluation of the efficacy of <i>Ajuga decumbens</i> extract supplement in a rabbit osteoarthritis model and in individuals with knee discomfort (筋骨草エキスのウサギ軟骨損傷モデルと膝の不調を持つ人への有効性評価)
審査結果の要旨： グルコサミン塩酸塩 (GlcN) は、骨関節炎 (OA) の症状の管理のための安全かつ有効な選択肢として提唱されている。また、GlcN と他のサプリメントとの併用は、OA 症状の緩和においてより効果的であると予想されている。我々は、OA のより効果的な治療を達成するため、OA に有益な効果を有する物質を調査した。天然の生薬である <i>Ajuga decumbens</i> (AD) は、痛みを和らげるために日本で長く使われてきた。近年、AD は骨粗鬆症を予防する可能性があるとして報告されている (Ono <i>et al.</i> , 2008)。しかし、AD は、損傷した軟骨組織に対する効果については検証されていない。 我々の以前の報告では、軟骨損傷モデルウサギに対して AD エキス (ADE) 単独または GlcN との併用効果、および AD 成分である β -エクジソン (BED) の効果に対して検証した。その結果、ADE が軟骨損傷モデルに対して、軟骨下骨の再生を増強することが明らかとなった。さらに、ADE と GlcN を併用することによって、相乗的に軟骨基質および軟骨下骨の再生を増加させた。さらに、BED は損傷した軟骨下骨の再生に同様の効果を示し、BED は ADE の活性成分の 1 つであることが示唆された。以上のことから、ADE と GlcN との併用により、軟骨基質および軟骨下骨の再生のために相乗的に作用することが示された (Sawada <i>et al.</i> , 2014)。 さらに本研究では、ADE の活性成分である BED を含む抽出物の有効分画を濃縮し、より有効性が高いと考えられる濃縮 ADE (EADE) を開発し、軟骨損傷モデルウサギに対する治療効果を検証した。軟骨損傷モデルは、大腿骨内側顆、滑車溝の近位および遠位に各 1	

つずつ損傷孔を外科的に開けることで作製した。軟骨損傷モデルのウサギを、対照群、ADE 群、低用量の EADE (低 EADE) 群、高用量の EADE (高 EADE) 群の 4 群 (n=3) に分けた。被験物は水道水に溶解し、各投与量を 3 週間経口投与した。実験期間後、低および高 EADE 群において軟骨マトリックスが強く再生された。また、軟骨下骨の骨芽細胞 100 カウントあたりの破骨細胞の平均数は、高 EADE 群では対照群と比較して有意に減少した。また EADE は、間葉系幹細胞の軟骨分化を刺激し、プロテオグリカン産生を誘導した。さらに、EADE は、軟骨細胞におけるインターロイキン-1 β により誘導されるプロスタグランジン E2 産生の刺激を有意に低下させた。よって、EADE は、ADE よりも軟骨再生に対して有用であると考えられた。

次に膝の不調をもつ人に対する EADE サプリメントの有効性および安全性を評価した。試験デザインは無作為化二重盲検プラセボ対照試験で、48 人の被験者を用いて行った。被験者は、EADE 群 (n = 24) およびプラセボ群 (n = 24) にランダムに割り当て、12 週間経口で摂取した。脱落者等を除き、最終的にプラセボ群 22 人と EADE 群 22 人が有効性および安全性評価の対象となった。評価マーカーは、変形性膝関節症患者機能評価尺度 (JKOM) アンケートおよび日本整形外科学会 (JOA) 基準のスコアの変化ならびに II 型コラーゲン合成および分解バイオマーカーのレベルを分析することによって評価した。アウトカムは、ベースラインおよび投与開始から 4、8 および 12 週間で測定しました。JOA 基準のサブスケール II (関節屈曲/剛性) は、介入中の 8 および 12 週間でプラセボ群と比較して EADE 群において著しく改善された。さらに、膝の不調の少ない被験者を用いたサブグループ分析 (KLO-1、JOA75 点以上) では、EADE 群でプラセボ群と比較して JKOM のサブスケール II (膝の痛みやこわばり) および IV (ふだんの活動) スコアが著しく改善され、総合スコアが改善された。また、EADE 投与の副作用は確認されなかった。以上のことから、EADE 摂取は安全であり、軽度の膝の不調を有する被験者における関節機能 (屈曲および剛性) および一般的な活動が改善することが示唆された。

結論として、軟骨保護作用および抗炎症作用に EADE が寄与することで、関節の健康に対して EADE は機能性食品として有望な候補であると考えられた。以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位論文に相応しい価値があると認める。