

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-107660

(P2004-107660A)

(43) 公開日 平成16年4月8日(2004.4.8)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C08B 37/00	C08B 37/00	4B018
A23L 1/30	A23L 1/30	4C086
A61K 31/715	A61K 31/715	4C088
A61K 35/78	A61K 35/78	4C090
A61P 31/00	A61P 31/00	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-302500 (P2003-302500)	(71) 出願人	000001915
(22) 出願日	平成15年8月27日 (2003.8.27)		メルシャン株式会社
(31) 優先権主張番号	特願2002-248035 (P2002-248035)		東京都中央区京橋1丁目5番8号
(32) 優先日	平成14年8月28日 (2002.8.28)	(72) 発明者	高田 良二
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		神奈川県平塚市見附町1-28-1105
特許法第30条第1項適用申請有り		(72) 発明者	矢内 隆章
			神奈川県藤沢市本町3-10-28-403
		(72) 発明者	大久保 敏幸
			神奈川県平塚市河内53-77
		(72) 発明者	佐藤 充克
			神奈川県藤沢市本鶴沼1-1-8
		Fターム(参考)	4B018 MD52 ME07 MF01
			4C086 AA01 AA02 AA03 EA20 GA17
			MA01 MA52 NA14 ZB09 ZB13
			ZB26 ZB32 ZC41
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サイトカイン産生促進剤

(57) 【要約】

【課題】体内におけるTNF- α やある種のインターロイキン等のサイトカイン産生を促進させる物質を日常摂取されている食品中に見出し、該物質あるいは精製された抽出分を利用することで、安全性の高い免疫賦活剤や健康食品を提供することである。

【解決手段】ユキノシタ科スグリ属に属する植物であるカシスの果汁中に含まれる下記の多糖類Aと多糖類Bを含むサイトカイン産生促進剤。

(多糖類A) 平均分子量が約45,000であり、構成糖として、少なくともグルコース、ガラクトースおよびアラビノースを含み、それらの重量組成比が21:64:15である。

(多糖類B) 平均分子量が約430,000であり、構成糖として、少なくともグルコース、ガラクトースおよびアラビノースを含み、それらの重量組成比が41:50:9である。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

下記(1)～(5)の性質を有する多糖類 A。

- (1) 平均分子量が約 45,000 であり、
- (2) 構成糖として、少なくともグルコース、ガラクトースおよびアラビノースを含み、それらの重量組成比が 21:64:15 であり、
- (3) 水および約 35% (v/v) 以下のエタノール水溶液に易溶であり、
- (4) 70% (v/v) 以上のエタノール水溶液に不溶であり、
- (5) 65% 飽和以上の硫酸アンモニウム水溶液に不溶である。

【請求項 2】

カシス果汁から得られる請求項 1 記載の多糖類 A。

【請求項 3】

下記(1)～(5)の性質を有する多糖類 B。

- (1) 平均分子量が約 430,000 であり、
- (2) 構成糖として、少なくともグルコース、ガラクトースおよびアラビノースを含み、それらの重量組成比が 41:50:9 であり、
- (3) 水に易溶であり、
- (4) 約 35% (v/v) 以上のエタノール水溶液に不溶であり、
- (5) 65% 飽和以上の硫酸アンモニウム水溶液に不溶である。

【請求項 4】

カシス果汁から得られる請求項 3 記載の多糖類 B。

【請求項 5】

請求項 1 または 2 記載の多糖類 A および請求項 3 または 4 記載の多糖類 B を有効成分として含むサイトカイン産生促進剤。

【請求項 6】

請求項 1 または 2 記載の多糖類 A および請求項 3 または 4 記載の多糖類 B を有効成分として含む健康食品。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明はカシス果汁由来の新規な多糖類および該多糖類を有効成分とするサイトカイン産生促進剤および健康食品に関するものである。

【背景技術】**【0002】**

近年、消費者の健康に対する意識はますます高まりを見せている。一方で、不況下の現代社会には、不規則な生活習慣、食事の偏り、精神的ストレスなど、免疫機構にダメージを与える要因が氾濫している。逆に免疫力が賦活されると、発癌抑制、制癌作用、抗感染症、抗アレルギー作用、さらには体調リズムの回復・恒常性維持など様々な効果が期待できる。免疫機構には、多くの種類の細胞が関与しているが、特に白血球の役割は大きい。なかでもマクロファージは全動物に普遍的に存在しており、免疫応答の特に初期段階での働きを含め、あらゆる段階に関与している重要な白血球の一種である。近年、白血球の働きが物質レベルで解明されてきており、白血球の機能や細胞間相互作用は、白血球が分泌する微量タンパク質(サイトカイン)によって担われていることがわかってきた。

【0003】

サイトカインには多くの種類があり、なかでも腫瘍壊死因子(TNF)やインターロイキン(IL)類が注目されている。それらのなかで、TNF- α 、IL-1、IL-12p70などの炎症性サイトカインは、主にマクロファージから放出され、最終的には抗癌作用や抗感染症作用などを示すことが報告されている。これらのサイトカインを遺伝子工学的的手法により製造し薬剤として利用する方法も研究されているが、その一方で、自然界の素材やその抽出物を利用し、体内におけるある種のサイトカイン誘導量を高めることで宿主の免疫力や抵抗力

10

20

30

40

50

を高めるための素材探索や検討も広くなされている（非特許文献 1、2 参照）。しかしながら、従来の免疫賦活剤や健康食品に含まれる有効成分は、その殆どが細菌や真菌（きのこ）由来のものであった。しかも、一般には入手困難であったり価格が高かったり、あるいは食品で使用する場合は安全性の問題やイメージが悪くなかったりするものが少なくなかった。

【0004】

【非特許文献 1】An Immunomodulatory Polysaccharide-Rich Substance from the Fruit Juice of *Morinda citrifolia*(Noni) with Antitumour Activity(Phytotherapy Research 13,380-387(1999))

【非特許文献 2】Immunopharmacological activity of Echinacea preparations following simulated digestion on murine macrophages and human peripheral blood mononuclear cells(J. Leukocyte Biology 68(10),503-510(2000)) 10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、体内における TNF- α やある種のインターロイキン等のサイトカインの産生を促進させる物質を日常摂取されている食品中に見出し、該物質あるいは精製された抽出物を利用することで、安全性が高く優れた免疫賦活作用をもつ健康食品を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】 20

【0006】

本発明者らは、上記課題を解決するため、日常的に食用に供されている食物、特に果実類の中に免疫賦活物質を探索した。より具体的にはマウス腹腔マクロファージを用い、各種果実類の果汁、果皮抽出物のサイトカイン産生促進活性を測定したところ、ユキノシタ科スグリ属に属する植物であるカシス（別名ブラックカラント、クロフサスグリ）の果汁が他の果実類に比べ格段に優れたサイトカイン産生促進活性を有すること、さらにその活性物質が 2 種類の多糖類（多糖類 A と多糖類 B）であることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】

すなわち本発明は、カシス果汁由来の下記の新規な多糖類および該多糖類を有効成分とするサイトカイン産生促進剤および健康食品を提供するものである。 30

1. 下記(1)～(5)の性質を有する多糖類 A。

(1) 平均分子量が約 45,000 であり、

(2) 構成糖として、少なくともグルコース、ガラクトースおよびアラビノースを含み、それらの重量組成比が 21:64:15 であり、

(3) 水および約 35% (v/v) 以下のエタノール水溶液に易溶であり、

(4) 70% (v/v) 以上のエタノール水溶液に不溶であり、

(5) 65% 飽和以上の硫酸アンモニウム水溶液に不溶である。

2. カシス果汁から得られる前記 1 記載の多糖類 A。

【0008】 40

3. 下記(1)～(5)の性質を有する多糖類 B。

(1) 平均分子量が約 430,000 であり、

(2) 構成糖として、少なくともグルコース、ガラクトースおよびアラビノースを含み、それらの重量組成比が 41:50:9 であり、

(3) 水に易溶であり、

(4) 約 35% (v/v) 以上のエタノール水溶液に不溶であり、

(5) 65% 飽和以上の硫酸アンモニウム水溶液に不溶である。

4. カシス果汁から得られる前記 3 記載の多糖類 B。

5. 前記 1 または 2 記載の多糖類 A および前記 3 または 4 記載の多糖類 B を有効成分として含むサイトカイン産生促進剤。 50

6. 前記 1 または 2 記載の多糖類 A および前記 3 または 4 記載の多糖類 B を有効成分として含む健康食品。

【0009】

本発明の多糖類は例えば、以下のような方法で得ることができる。まず、カシス果実を破碎し果皮等の固形分を分離し果汁とした後、アンモニア水溶液、水酸化ナトリウム水溶液、水酸化カリウム水溶液等を用いて pH7.2~7.4 に調整し、生じる不溶物を遠心分離で除去し、上清を得る。原料となるカシスは、その産地、時期などに特に限定はなく、また市販されている果汁を pH 未調整のまま使用して以下の工程に適用してもよい。

【0010】

得られた上清からのさらなる有効成分の分離・精製は、通常の天然物からの多糖類の精製法に準じて行うことができる。まず、例えば、アンバーライト IR 120B H AG (オルガノ社製)、CM セファロース FF (ファルマシア社製)、AG 50W-X2 (バイオラッド社製) 等の陽イオン交換カラム、およびアンバーライト IRA 410 OH AG (オルガノ社製)、DEAE セファロース FF (ファルマシア社製)、AG 1-X2 (バイオラッド社製) 等の陰イオン交換カラムに順次通液することで各種のイオン性物質を除去する。なお、陽イオン交換処理と陰イオン交換処理はどちらを先に行ってもよく、樹脂は混床で使用しても良い。次いで、SEP-PAK(C18) (ウオータース社製) 等の逆相カラムに通液してポリフェノール類を除去し、抽出液を得る。さらに必要により、凍結乾燥、噴霧乾燥等の乾燥処理をおこない、本発明の 2 種の多糖類 A および B を含有する乾燥物を得ることができる。また本発明の 2 種の多糖類は、さらにこの乾燥物あるいは乾燥する前の抽出液を次のエタノール分画法により精製することによりそれぞれ得ることができる。

【0011】

本発明の 2 種の多糖類を含む抽出液に少量の塩化ナトリウムや塩化カリウム等の塩溶液を加えることにより極性を上げた状態で、約 35% (v/v) となるようエタノールを加え遠心分離を行うことで、沈殿画分に多糖類 B を得ることができる。上清画分からは、透析や限外濾過によって単糖、二糖、オリゴ糖などの低分子糖類を除去することで、多糖類 A を得ることができる。

【0012】

あるいは、極性を上げた状態で、まず、70% (v/v) 以上となるようエタノールを加え遠心分離することにより、多糖類 A と多糖類 B を共沈させ、生じた沈殿を適当な水溶液で懸濁した後に約 35% (v/v) となるようエタノールを加え遠心することにより、上清画分に多糖類 A を、沈殿画分に多糖類 B を得ることができる。なお、多糖類 A と多糖類 B を共沈させるには、65% 飽和以上となるよう硫酸アンモニウムを加えても良い。

【0013】

こうして得られた 2 種類の多糖類の物理化学的性質は以下のとおりである。

1. 多糖類 A の物理化学的性質

(1) 分子量

高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した平均分子量は約 45,000 である。

(2) 糖組成

塩酸加水分解後、高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した糖組成は、構成糖として、少なくともグルコース、ガラクトースおよびアラビノースを含み、それらの重量組成比が 21:64:15 である。

(3) 溶解性

水および約 35% (v/v) 以下のエタノール水溶液に易溶であり、70% (v/v) 以上のエタノール水溶液には不溶である。約 35% (v/v) ~ 70% (v/v) 付近までのエタノール水溶液には一部が不溶である。65% 飽和以上の硫酸アンモニウム水溶液には不溶である。

【0014】

(4) 各種クロマトグラフィーにおける吸着特性

多糖類 A の構成多糖類は陽イオン交換樹脂と陰イオン交換樹脂に結合せず、一部がコンカナバリン A - セファロース樹脂 (ファルマシア社製) に結合した。

10

20

30

40

50

(5) 赤外線吸収スペクトル

多糖類 A の赤外線吸収スペクトルを図 1 に示す。純水に溶解した多糖類 A は、 $950 \sim 1200 \text{ cm}^{-1}$ 付近で、まとめて高い吸収パターンが見られた。

(6) 紫外可視吸収スペクトル

多糖類 A の紫外可視吸収スペクトルを図 3 に示す。

(7) 比旋光度

多糖類 A の比旋光度は [] $D = +123$ (c 0.25, H₂O) である。

【0015】

(8) 熱安定性

多糖類 A と多糖類 B が共存する状態で、100℃, 10分間の加熱処理を行った結果、マクロファージに対するサイトカイン産生促進活性は失活しなかった。 10

(9) 呈色反応

フェノール - 硫酸法による呈色反応は陽性である。

(10) 物質の色

純水で透析した後、凍結乾燥したものは、薄い褐色である。

【0016】

(11) 酵素処理安定性

多糖類 A の構成多糖類のうち、コンカナバリン A - セファロースに結合する画分は、エンドタイプのガラクトシダーゼ活性を有する endo-β-Galactosidase (Escherichia freundii: 生化学工業社製) と β-Glucanase FBP (Bacillus subtilis: 日本バイオコン社製) を使用した酵素処理では分解されない。 20

(12) ¹³C-核磁気共鳴スペクトル (125MHz)

内部標準としてアセトンを使用し、重水中で測定した多糖類 A の ¹³C-核磁気共鳴スペクトルを図 5 に示す。

(13) ¹H-核磁気共鳴スペクトル (500MHz)

重水中で測定した多糖類 A の ¹H-核磁気共鳴スペクトルを図 6 に示す。

【0017】

2. 多糖類 B の物理化学的性質

(1) 分子量

高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した平均分子量は約 430,000 である。 30

(2) 糖組成

塩酸加水分解後、高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した糖組成は、構成糖として、少なくともグルコース、ガラクトースおよびアラビノースを含み、それらの重量組成比が 41:50:9 である。

(3) 溶解性

水に易溶であり、約 35% (v/v) 以上のエタノール水溶液には不溶である。10% (v/v) ~ 約 35% (v/v) 付近までのエタノール濃度では一部が不溶である。65% 飽和以上の硫酸アンモニウム水溶液には不溶である。

【0018】

(4) 各種クロマトグラフィーにおける吸着特性 40

多糖類 B の構成多糖類は陽イオン交換樹脂と陰イオン交換樹脂に結合せず、コンカナバリン A - セファロース樹脂にも結合しなかった。

(5) 赤外線吸収スペクトル

多糖類 B の赤外線吸収スペクトルを図 2 に示す。純水に溶解した多糖類 B は、 1040 cm^{-1} 付近で特に特異的に高い吸収パターンが見られた。

(6) 紫外可視吸収スペクトル

多糖類 B の紫外可視吸収スペクトルを図 4 に示す。

(7) 比旋光度

多糖類 B の比旋光度は [] $D = +177$ (c 0.25, H₂O) である。

【0019】

(8) 熱安定性

多糖類 A と多糖類 B が共存する状態で、100℃、10分間の加熱処理を行った結果、マクロファージに対するサイトカイン産生促進活性は失活しなかった。

(9) 呈色反応

フェノール - 硫酸法による呈色反応は陽性である。

(10) 物質の色

純水で透析した後、凍結乾燥したものは、薄い褐色である。

【0020】

こうして得られる多糖類 A および多糖類 B は、サイトカイン産生促進活性をもつので健康食品に利用可能である。多糖類 A および多糖類 B を健康食品に利用するには、どのような精製段階のものでも使用可能であり、例えば、各種精製段階のものを各種食品、例えば、清涼飲料、ジュース、茶、紅茶、アルコール飲料、あめ、各種加工食品等に添加することにより、サイトカインの産生を促進し免疫機構を活性化させる健康食品を得ることができる。

10

【発明の効果】

【0021】

本発明により得られる多糖類およびそれを含む抽出物は、サイトカイン産生促進剤、免疫賦活剤、もしくは前記物質または成分が添加された機能性食品および健康食品として有用なものであり、かつ、日常的に食されている果実からの抽出物であるため、毒性が極めて低く、長期の連用においても人体に何等の悪影響は与えないものである。

20

【0022】

次に実施例を記載して本発明を詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【実施例】

【0023】

実施例 1：各種果汁、果皮抽出物およびハーブ抽出物のサイトカイン産生促進効果

パッションフルーツ、シークワシャー、ピーチ、スイカ、プルーン、イチジク、キウイ、アプリコット、グアバ、パパイヤ、カシス(英名：ブラックカラント)、ラフランス、レッドラズベリー、レッドプラム、マンゴー、クランベリー、ライチ、ウメ、ビワ、オレンジ、グレープフルーツ、ユズ、レモン、アムラ、ナツミカン、ライム、ライム、ブルーベリー、アセロラ、パインアップル、ザクロ、ルビーグレープフルーツ、バナナ、リンゴ、ブラッドオレンジ、メロン、ブドウ(カベルネソービニヨン)およびブドウ(ソービニヨンブラン)の各種果汁、オレンジ果皮、バナナ果皮、レモン果皮、グレープフルーツ果皮およびユズ果皮の各種果皮抽出物、さらに、ハーブ(エキナケア)の抽出物について、マウス腹腔マクロファージの系を用いて、サイトカイン(TNF- α 、IL-1 β 、IL-12p70)産生促進効果について試験した。

30

【0024】

(試験サンプルの調製)

果汁については、脱イオン水で2倍に希釈後、1規定の水酸化ナトリウム水溶液でpH7.2~7.4に調整し、さらに脱イオン水を加え、最終的に4倍希釈液を調製した。これを遠心分離(15,000rpm×5分)し、得られた上清を試験サンプルとした。果皮については、等量の脱イオン水を加え、ミキサーで十分攪拌破碎した。pH7.2~7.4に調整後、さらに脱イオン水を加え、最終的に4倍希釈液を調製した。これを遠心分離(1,500rpm×5分)し、得られた上清を試験サンプルとした。

40

【0025】

ハーブについては、エキス末を生薬の重量に換算して4倍希釈となるように脱イオン水を加え、15分間スターラーで攪拌、次いで遠心分離(15,000rpm×5分)し、得られた上清を試験サンプルとした。

【0026】

(サイトカイン(TNF- α 、IL-1 β 、IL-12p70)産生能の測定)

50

マウス（ICR、8週令、雄）の腹腔内に2.98%チオグリコレート培地（ディフコ社製）2.7mlを注射した。4日後に腹腔内の細胞を採取した結果、約 1×10^7 cells/マウスのマクロファージが得られた。PBS⁻（リン酸緩衝生理食塩水（pH7.4）：ディフコ社製）で洗浄後、最終的にマクロファージ濃度が 1×10^6 cells/mlとなるように1%FCS - RPMI1640に懸濁した。これを96ウエル・プレートに200 μ lずつ分注し、CO₂インキュベータ内で37^oC、2時間静置した。ウエルをPBS⁻で2回洗浄した後、抗生物質（ペニシリン（100units/ml）、ストレプトマイシン（100 μ g/ml））を含む5%FCS - RPMI1640を各ウエルに180 μ lずつ添加した。これに試験サンプルまたはコントロールを20 μ l添加し、20時間培養した。なお、ポジティブ・コントロールには、LPS（*Escherichia coli* 0111：フナコシ社製）を脱イオン水で1 μ g/mlとなるように調製したものをを用いた。ネガティブ・コントロールには、PBS⁻を用いた。培養液を遠心（1000rpm、10分）し、得られた上清中のサイトカイン濃度をサイトカインELISA定量キット（Quantikine mouse TNF- α 、IL-1 β 、IL-12p70：R&Dシステムズ社製）により、添付されたマニュアルに従って測定した。

10

【0027】

結果を表1-1および表1-2に示す。

【表 1】

表1-1

	TNF- α (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	IL-12p70 (pg/ml)
パッションフルーツ	3570	54	2
シークワシャー	68	65	0
ピーチ	6425	94	10
スイカ	2658	23	2
ブルーン	143	14	1
イチジク	15361	247	103
キウイ	427	12	0
アプリコット	-67	11	-1
グアバ	6753	163	8
パパイヤ	8508	90	6
カシス	34854	5667	2
ラフランス	255	9	-1
レッドラズベリー	3075	14	0
レッドプラム	1770	23	0
マンゴー	3178	28	1
クランベリー	1497	16	1
ライチ	10430	200	23
ウメ	266	4	-1
ピワ	8334	194	15
オレンジ	81	4	-1
グレープフルーツ	94	10	-1
ユズ	45	3	-1
レモン	68	6	-1
アムラ	588	1	4
ナツミカン	89	7	-1
ライム	203	6	-1
ライム	133	5	-1
ブルーベリー	110	3	-1
アセロラ	5795	39	3
パインアップル	68	5	-1
ザクロ	102	5	-1
ルビーグレープフルーツ	115	5	-1
バナナ	99	6	-2
リンゴ	120	6	-1
ブラッドオレンジ	1764	43	-1
メロン	-5	-2	1
ブドウ(カベルネ)	4220	11	0
ブドウ(ノービニオン・ブラン)	138	3	0

10

20

30

【 0 0 2 8 】

【表 2】

表1-2

	TNF- α (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	IL-12p70 (pg/ml)
オレンジ果皮	45	2	0
バナナ果皮	312	3	0
レモン果皮	606	32	-1
グレープフルーツ果皮	156	7	-1
ユズ果皮	136	7	-1
リンゴ果皮	346	1	-1
ハーブ(エキナケア)	14802	527	34
LPS	5827	132	19
PBS ⁻	65	2	1

10

【0029】

表1-1および表1-2に示したとおり、果汁の中では、カシス、イチジク、ライチ、ピワなどが強いサイトカイン産生促進能を示した。中でもカシスのサイトカイン産生促進能、特にTNF- およびIL-1 の誘導活性は群を抜いており、免疫力を高めるハーブとして広く知られており、マウス・マクロファージを活性化するという報告もあるエキナケアよりも高い活性を示した。さらに、カシスの場合は、TNF- の誘導活性と比較してIL-1 の誘導活性が、他の果実に比べて相対的に極めて高かった。

20

【0030】

実施例2：カシスからのサイトカイン産生促進成分の分離(1)

カシス果実を破碎し、遠心(10,000rpm、10分間)することによって、固形分を分離した。1規定の水酸化ナトリウム水溶液でpH7.2~7.4に調整し、生じた不溶物を遠心(10,000rpm、10分間)除去し上清を回収した。陽イオン交換樹脂(アンバーライト IR 120B H A G:オルガノ社製)と陰イオン交換樹脂(アンバーライト IRA 410 OH AG:オルガノ社製)に流速SV4で通し、素通り画分を回収した。次いで、メタノールで活性化したSEP-PAK(C-18)カラム(ウオータース社製)に通し、素通り画分を回収した。

30

【0031】

実施例3：カシスからのサイトカイン産生促進成分の分離(2)

SEP-PAK(C-18)カラム工程によって得られた画分に終濃度0.1mole/lとなるよう塩化ナトリウムを添加した。これにエタノールを種々の濃度(v/v)となるよう添加した。遠心(15,000rpm、10分間)により上清画分と沈殿画分に分離し、沈殿画分には元の容量となるようPBS⁻を加え懸濁した。各エタノール濃度における上清画分と沈殿画分のTNF- 誘導活性について測定したところ、図7に示すとおり、エタノール濃度が30~40%(v/v)のところで明らかに2つの成分に分離した。

【0032】

次に、エタノール濃度が70%(v/v)となるよう添加した場合に得られた沈殿画分をPBS⁻に懸濁し、今度は35%(v/v)の濃度となるよう再度エタノールを添加した。これを遠心により上清画分と沈殿画分に分離し、上清画分と沈殿画分単独の場合と両者を混合した場合でのサイトカイン産生促進活性(TNF- 誘導活性)を調べると、図8に示すように2つの成分が共存しているときに限り、強いサイトカイン産生促進活性が現れた。

40

【0033】

実施例4：カシスからのサイトカイン産生促進成分の分離(3)

上記上清画分と沈殿画分を分画分子量10,000の限外濾過(ミリポア社製)により洗浄・濃縮することで単糖、二糖やオリゴ糖のような低分子物質を除去し、Protein Assay Kit(バイオラッド社製)とフェノール-硫酸法により、それぞれの画分のタンパク質含有量と多糖類含有量を測定した。分画操作前の即ちカシス果汁の状態での濃度に換算すると、

50

上清画分に含まれるタンパク質含有量と糖含有量は、それぞれ $3\mu\text{g/ml}$ と $360\mu\text{g/ml}$ であった。一方、沈殿画分に含まれるタンパク質含有量と糖含有量は、それぞれ $39\mu\text{g/ml}$ と $4400\mu\text{g/ml}$ であった。このように、両画分はいずれも多糖類がほぼ全てを占めていた。そして、上清画分と沈殿画分に含まれる多糖類をそれぞれ多糖類 A と多糖類 B とした。また、この場合において、多糖類 A の比旋光度は〔 〕 $D = +123 (c 0.25, H_2O)$ であり、多糖類 B の比旋光度は〔 〕 $D = +177 (c 0.25, H_2O)$ であった。

【0034】

次に、多糖類 A と多糖類 B の分子量を測定した。種々の重合度をもつデキストラン（ファルマシア社製）を分子量マーカーとして、ゲル濾過用カラム 0Hpak SB-805 HQ（昭和電工社製）を用いた高速液体クロマトグラフィーによって測定した。その結果、多糖類 A と多糖類 B の見かけ上の平均分子量はそれぞれ約 45,000 と約 430,000 であった。

10

【0035】

さらに、構成糖の組成比を調べた。終濃度が 0.7 規定となるよう塩酸を添加し、100、12 時間放置することで多糖類を加水分解した。遊離した単糖類を糖分析用カラム SUGAR SC 1011（昭和電工社製）を用いた高速液体クロマトグラフィーによってグルコース、ガラクトースおよびアラビノースの定量を行った。その結果、多糖類 A と多糖類 B の糖組成比は重量比でそれぞれ 21:64:15 と 41:50:9 であった。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図 1】精製された多糖類 A の赤外線吸収スペクトルのチャートを示す。縦軸は多糖類 A の水溶液とブランクである純水の各波数での吸収差を吸光度で示したものである。

20

【図 2】精製された多糖類 B の赤外線吸収スペクトルのチャートを示す。縦軸は多糖類 B の水溶液とブランクである純水の各波数での吸収差を吸光度で示したものである。

【図 3】精製された多糖類 A の紫外可視吸収スペクトルを示す。

【図 4】精製された多糖類 B の紫外可視吸収スペクトルを示す。

【0037】

【図 5】精製された多糖類 A の ^{13}C -核磁気共鳴スペクトル (125MHz) を示す。

【図 6】精製された多糖類 A の ^1H -核磁気共鳴スペクトル (500MHz) を示す。

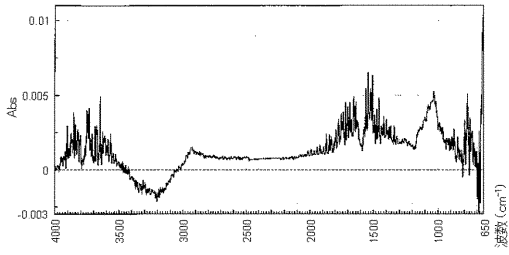
【図 7】カシス果汁中のサイトカイン産生促進成分（多糖類 A と多糖類 B）の各エタノール濃度画分における所在状況を示す。所在は TNF-誘導活性の強さで示す。

30

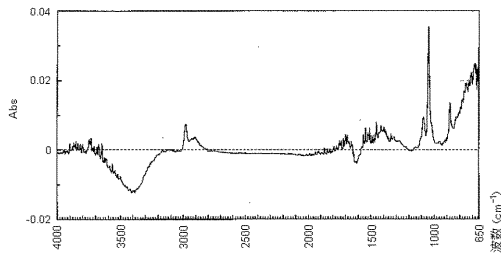
【図 8】カシス果汁の 35% エタノール濃度分画における上清画分（多糖類 A を含む）と沈殿画分（多糖類 B を含む）を併せることによる TNF-誘導活性の回復（相乗効果）を示す。

。

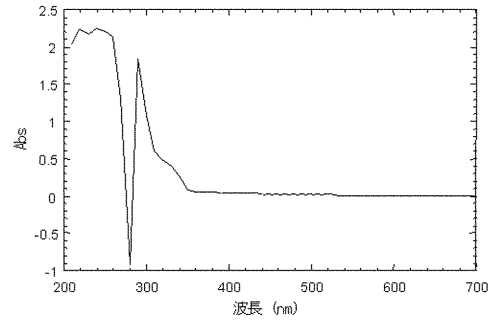
【 図 1 】



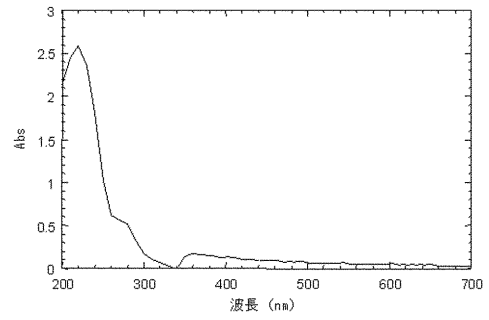
【 図 2 】



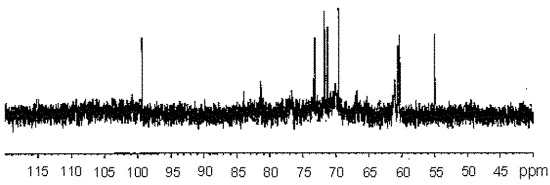
【 図 3 】



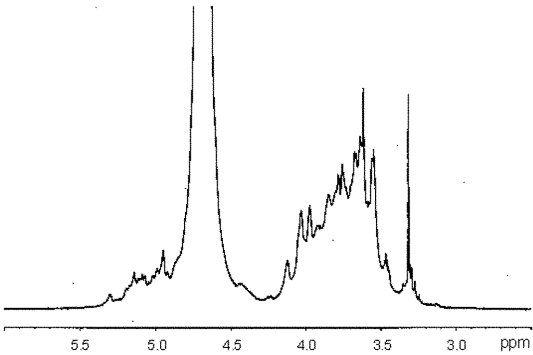
【 図 4 】



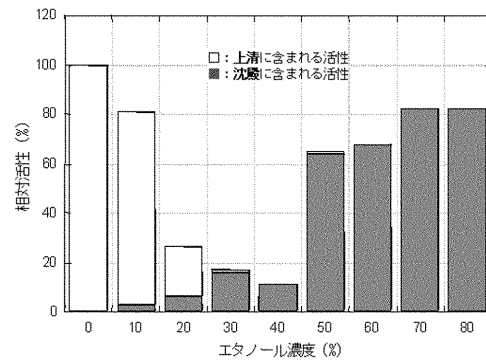
【 図 5 】



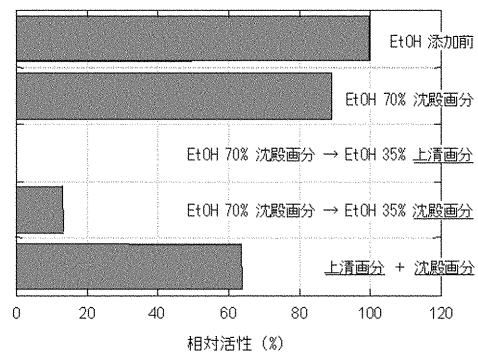
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/04	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1

Fターム(参考) 4C088 AB66 AC04 BA07 BA12 BA26 CA08 CA11 CA14 CA16 CA23
 MA01 MA52 NA14 ZB09 ZB13 ZB26 ZB32 ZC41
 4C090 AA01 AA09 BA91 BB09 BB12 BB13 BB27 BC12 BD02 BD15
 BD16 BD37 BD41 CA01 CA13 CA14 CA16 CA18 CA19 CA32
 DA09 DA23 DA27