(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3714426号
(P3714426)
(45)発行日　平成17年11月9日(2005.11.9)　(24)登録日　平成17年9月2日(2005.9.2)

(51)Int.Cl.[7]	F I	
A61K 31/702	A61K 31/702	
A61K 31/737	A61K 31/737	
A61P 35/04	A61P 35/04	
C07H 3/06	C07H 3/06	
C08B 37/00	C08B 37/00	H

請求項の数 1　(全 9 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平6-27589
(22)出願日　平成6年2月1日(1994.2.1)
(65)公開番号　特開平7-215990
(43)公開日　平成7年8月15日(1995.8.15)
審査請求日　平成13年1月25日(2001.1.25)

(73)特許権者　592195001
株式会社糖鎖工学研究所
青森県弘前市大字在府町８２番地４
(74)代理人　100078503
弁理士　中本　宏
(74)代理人　100087022
弁理士　井上　昭
(73)特許権者　302019245
タカラバイオ株式会社
滋賀県大津市瀬田三丁目４番１号
(74)代理人　100078503
弁理士　中本　宏
(74)代理人　100087022
弁理士　井上　昭

最終頁に続く

(54)【発明の名称】フコイダンオリゴ糖組成物含有癌転移抑制剤

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
下記の理化学的性質を有するフコイダンオリゴ糖組成物を含有することを特徴とする癌転移抑制剤。
（１）分子量分布：５×１０^3 以下〔セルロファインＧＣＬ－２５（生化学工業株式会社製）を用いたゲルろ過法による〕
（２）タンパク含量：検出されない
（３）抗凝血活性：５０００μｇ／ｍｌで抗凝血活性を示さない
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【産業上の利用分野】
本発明はフコイダンを酸性条件下で加水分解することにより得られるフコイダンオリゴ糖組成物を含有する癌転移抑制剤に関する。
【０００２】
【従来の技術】
フコイダンは褐藻類に含まれている硫酸化多糖の総称であり、硫酸化フコースを構成糖として含む物である。フコイダンは様々な褐藻類から分離され、癌増殖抑制活性、癌転移抑制活性、抗凝血活性、抗ウイルス感染活性等の生物活性が確認されている。これらの生物活性の検討に用いられた天然物由来のフコイダンは分子量分布が広く、かつ分子量は非常に大きな物である。

フコイダンの生物活性を検討する際、分子量分布が広いと、再現性に問題を生じ、また該巨大分子であるフコイダンは強い抗凝血活性を持つ。また巨大分子のフコイダンから夾雑するタンパク質分子を除去するのは極めて困難である。
フコイダンを低分子化し更に分子量分画により分子を比較的均一にする方法については、硫酸、酵素、ガンマ線、超音波等によりフコイダンを分解後、分子量分画する方法（特表平４－５０６０８９号）や、塩酸で加水分解後分子量分画する方法〔ジャーナル　オブ　アンドロロジー（Journal of Andrology）、第１３巻、第５１９～５２５頁（１９９２）〕などがある。しかしながら、前者は抗凝血活性の強いフコイダンオリゴ糖を得る方法であり、得られるオリゴ糖の分子量も５０００より大きい。また後者は、反応生成物として得られる微量のオリゴ糖を利用する方法に過ぎず、極めて収率が悪い。

【０００３】
【発明が解決しようとする課題】
フコイダンは種々の生理活性を有し、医薬としての開発が期待されている。しかしながら抗凝血活性が高いこと、分子量分布が広く、均一な製品の調製が困難なこと、巨大分子であり、夾雑するタンパク質の除去が困難であること等の問題点を有している。
本発明の目的は、フコイダンの生物活性を保持しながら、抗凝血活性が除去され、分子量分布的にも均一で、生物活性の再現性も良く、安全性の高い低分子化フコイダンを含有する癌転移抑制剤を提供することにある。

【０００４】
【課題を解決するための手段】
本発明を概説すれば、本発明は、下記の理化学的性質を有するフコイダンオリゴ糖組成物を含有することを特徴とする癌転移抑制剤に関する。
（１）分子量分布：5×10^{3} 以下〔セルロファインＧＣＬ－２５（生化学工業株式会社製）を用いたゲルろ過法による〕
（２）タンパク含量：検出されない
（３）抗凝血活性：５０００μｇ／ｍｌで抗凝血活性を示さない

【０００５】
本発明者らは、褐藻類由来のフコイダンが有機酸の存在下、加水分解処理により、極めて収率よく低分子化し、分子量分画により調製した本発明のフコイダンオリゴ糖組成物は医薬品として用いる際に問題となる抗凝血活性が実質的に除去され、かつ癌転移抑制活性は天然由来フコイダンと同等であり、更に、該組成物は抗真菌剤としても有用であるという新用途も見出し、本発明を完成した。

【０００６】
以下本発明に関して詳細に説明する。
本発明に使用されるフコイダンの種類は特に限定される物ではなく、例えばヒバマタ由来（シグマ社製）の物、マコンブ由来の物、その他すべての褐藻類由来の物を使用することができる。

【０００７】
フコイダンの有機酸による加水分解には、酢酸、ギ酸、プロピオン酸等の揮発性の有機酸、シュウ酸、クエン酸、コハク酸等の固体の有機酸等を使用することができる。
フコイダンの加水分解は、原料のフコイダン溶解液をこれらの有機酸でｐＨ調整し行う。フコイダンの溶解は通常の方法で行えば良く、溶解液中のフコイダン濃度はその最高溶解濃度でも良いが、通常はその粘性を考慮して決定すれば良い。フコイダン溶解液としては水、緩衝液等より目的に応じ選択すれば良い。溶解液のｐＨは通常ｐＨ５以下、好ましくはｐＨ１～４の範囲に選定し、前記の有機酸により調整する。加水分解は該ｐＨ調整液を６０℃～１２０℃、通常は１００℃で加温し、分子量5×10^{3} 以下の目的のフコイダンオリゴ糖組成物が調製できるまで行えば良い。また、加水分解して得られるフコイダンオリゴ糖の分子量は処理液のｐＨに依存し、例えば同じ酸を使用する場合ｐＨを３．５にするより２．５にした方が分子量の小さなフコイダンオリゴ糖が得られる。同じｐＨで処理する場合、酸の種類により低分子化の程度に差が生じる場合もあるが、生成物の分子量の

制御は加水分解時間の調整により容易である。

【０００８】

次に低分子化フコイダンは分子量分画することにより、更に均一な分子量分布のフコイダンオリゴ糖組成物を調製することができる。分子量分画には通常よく使用されている方法を適用することができ、例えばゲルろ過法や分子量分画膜を使用すれば良い。得られた組成物は、必要に応じて脱塩処理、無菌処理を行い、凍結乾燥をすることにより、本発明のフコイダンオリゴ糖組成物の乾燥品を得ることもできる。

【０００９】

（Ａ）本発明のフコイダンオリゴ糖組成物の分子量の測定方法は次のとおりである。

セルロファインＧＣＬ－２５（生化学工業社製）のカラム（４．１×９７ｃｍ）に分子量標準物質として重合度２～７までのマルトース及びプルラン（分子量約１，０００～１０，０００のもの）を流し分子量と溶出ボリュウムの関係をグラフに表し、フコイダンオリゴ糖組成物の溶出ボリュウムからその分子量を求める。

本発明のフコイダンオリゴ糖組成物は分子量5×10^{3}以下である。

【００１０】

（Ｂ）本発明のフコイダンオリゴ糖組成物のタンパク含量の測定方法は次のとおりである。

フコイダンオリゴ糖組成物を含有する試料溶液０．１ｍｌにプロテインアッセイキットＩ（バイオラッド社製）の染色液を５倍希釈した溶液５．０ｍｌを加え、かくはん後５分以上室温で放置した後、５９５ｎｍの吸光度を測定する。別に、牛血清アルブミン水溶液を用いて上記と同じ操作を行い、タンパク質の標準曲線を得、得られた標準曲線から試料溶液のタンパク含量を求める。

本発明のフコイダンオリゴ糖組成物はタンパクを含有しない。

【００１１】

（Ｃ）本発明のフコイダンオリゴ糖組成物の抗凝血活性の測定方法は次のとおりである。

抗凝血活性の測定方法（活性化部分トロンボプラスチン時間）

試薬は活性トロンボファックス、コントロール血漿としては、オーソ凝固コントロールＩ（共にオーソ・ダイアグノスティック・システムズ社製）を用い、方法はアグリカルチュラル　アンド　バイオロジカル　ケミストリー（Agricultural and Biological Chemistry)、第５５巻、第７９１～７９６頁（１９９１）記載の方法を参考に行う。

すなわち、１２×７５ｍｍの試験管に１００μｌのコントロール血漿、１０μｌのフコイダンオリゴ糖組成物の溶液（０．９％食塩水中）、及び１００μｌの活性トロンボファックスを加え混合し、３７℃の恒温槽中で３分間保持し、あらかじめ３７℃に保温しておいた２０ｍＭの塩化カルシウムを１００μｌを加えると同時にストップウォッチを始動させ激しく混和し３７℃で２０秒間保温する。次に試験管を恒温槽から取り出し、ゆっくりと前後に振りゲル塊の出現と同時にストップウォッチを止める。この時に要した時間を活性化部分トロンボプラスチン時間とする。

また結果の判定は、フコイダンオリゴ糖組成物を加えなかったときの活性化部分トロンボプラスチン時間と比較して有意に延長を認めないときに抗凝血活性がないと判定する。

【００１２】

フコイダン（シグマ社製）は５０μｇ／ｍｌで抗凝血活性を有するが、本発明のフコイダンオリゴ糖組成物は５０００μｇ／ｍｌで抗凝血活性を示さず、本発明のフコイダンオリゴ糖組成物は実質的に抗凝血活性を保有しない。

【００１３】

本発明によるフコイダンオリゴ糖組成物は、癌転移抑制剤、抗真菌剤として使用することができる。

従来、真菌感染症の治療剤としては、アンホテリシンＢ、フルシトシン、ミコナゾール、フルコナゾールのほか多数あるが、効力及び毒性若しくは耐性菌の点で問題がある。特に、近年増加傾向にある全身感染に有効な低毒性の薬剤は少ない。本発明のフコイダンオリゴ糖組成物は天然物由来で安全性も高く、新しいタイプの抗真菌剤である。

また親物質のフコイダンやヘパリンにも抗真菌作用が見出され、硫酸化多糖の新規用途が開発された。

【００１４】

本発明のフコイダンオリゴ糖組成物を有効成分とする癌転移抑制剤、抗真菌剤においては、該有効成分の含有率は対応する製剤の種類により異なるが、一般に有効成分として、０．１～１００％含有することが好ましい。該有効成分を用いての癌転移抑制剤、抗真菌剤は通常の製剤、例えば錠剤、カプセル剤、丸剤、注射剤、シロップ剤等に製剤化して経口及び非経口的に投与することができる。

このための手段として、医薬品を製造するために用いる慣用の賦形剤及び添加剤を用いることができる。慣用の賦形剤としては、例えば水、生理食塩水、アルコール、ポリエチレングリコール、グリセロールエステル、ゼラチン、炭水化物、ステアリン酸マグネシウム、タルク等が挙げられる。また、慣用の添加剤として、防腐剤、滅菌剤、潤滑剤、コーティング剤、湿潤剤、乳化剤、着色剤、マスキングフレーバー、及び芳香剤等が挙げられる。

【００１５】

本発明による癌転移抑制剤、抗真菌剤はそれぞれ、その薬剤の投与形態、投与回数、患者の状態、患者の体重、病気の軽重により変化するが、投与量は体重１ｋｇ当り０．１ｍｇから１５０ｍｇ、好ましくは０．５ｍｇから１００ｍｇを、１日に数回に分けて投与することが好ましい。

投与回数も薬剤の形態、投与回数、患者の状態、体重、病気の軽重により定められるが、１日当り１～３回の投与が好ましく、場合においては、連続静脈内滴注により投与することもできる。

【００１６】

本発明による癌転移抑制剤は癌転移の治療、予防に有効であり、抗真菌剤は真菌症の治療、予防に有効である。また本発明のフコイダンオリゴ糖組成物は、種々の食品にそれらの特性を変化させること無くして添加することもできる。この場合、例えば冷菓、パン、ゼリー等の固形状の食品ばかりでなく牛乳、果汁等の液状食品にも安定的に添加することが可能である。

【００１７】

また、本発明のフコイダンオリゴ糖組成物の１群６匹のマウス（Ｃ５７ＢＬ／６）における静脈内投与による急性毒性試験の結果では、後述する実施例記載の組成物は、いずれも５００ｍｇ／ｋｇの投与で全例共、全く毒性症状を示さなかった。したがって、本発明のフコイダンオリゴ糖組成物の静脈内投与によるLD_{50}（５０％致死量）は、いずれも５００ｍｇ／ｋｇ以上である。

【００１８】

【実施例】

以下に本発明を実施例をもって示すが、本発明が以下の実施例の範囲のみに限定されるものではない。

なお、下記実施例１～３は、本発明で使用するフコイダンオリゴ糖組成物の例についての製造例と理化学的性質を示す参考例である。

【００１９】

実施例１

フコイダン（シグマ社製）２ｇを１００ｍｌの水に溶解しそのｐＨを酢酸にてｐＨ３．０に調整後１００℃で３時間処理した。この加水分解物をセルロファインＧＣＬ－２５（生化学工業社製）によるゲルろ過で分子量分画し分子量５，０００以下の画分をマイクロアシライザーＧ３（旭化成社製）により脱塩後凍結乾燥を行い１．９８ｇの生成物を得た。本物質の抗凝血活性を測定したところ１０ｍｇ／ｍｌ以下では抗凝血活性を持たなかった。

【００２０】

実施例２

フコイダン（シグマ社製）２ｇを１００ｍｌの水に溶解し、そのｐＨをクエン酸にてｐＨ３．０に調整後１００℃で３時間処理した。この加水分解物をセルロファインＧＣＬ－２５によるゲルろ過で分子量分画し、分子量５，０００以下の画分を５分画（分子量５，０００～３，０００超、３，０００～２，０００超、２，０００～１，０００超、１，０００～５００超、５００以下）した。更にこれらの画分をマイクロアシライザーＧ３（旭化成社製）により脱塩後凍結乾燥を行い各画分それぞれ２９０、２４３、５１１、３２９，４３１ｍｇ得た。

これらの物質の抗凝血活性を測定したところ、分子量５，０００～３，０００超のもの、及び３，０００～２，０００超のものは５ｍｇ／ｍｌまで、その他の画分は１０ｍｇ／ｍｌ以下では抗凝血活性を持たなかった。

【００２１】

実施例３

フコイダン（シグマ社製）２ｇを１００ｍｌの水に溶解し、そのｐＨをギ酸にてｐＨ３．６に調整後１００℃で３時間処理した。この加水分解物をセルロファインＧＣＬ－２５によるゲルろ過で分子量分画し、分子量５，０００以下の画分を４分画（分子量５，０００～３，０００超、３，０００～２，０００超、２，０００～１，０００超、１，０００以下）した。更にこれらの画分をマイクロアシライザーＧ３（旭化成社製）により脱塩後凍結乾燥を行い各画分それぞれ４６６、１６２、５００、２４４ｍｇを得た。

これらの物質の抗凝血活性を測定したところ、分子量５，０００～３，０００超のもの、及び３，０００～２，０００超のものは５ｍｇ／ｍｌまで、その他の画分は１０ｍｇ／ｍｌ以下では抗凝血活性を持たなかった。

【００２２】

実施例４

カンジダ　アルビカンス（Candida albicans）ＴＩＭＭ　１７６８株を３７℃、１夜培養後、集菌、生理食塩水に2×10^{7}個／ｍｌとなるように懸濁した。フコイダン（シグマ社製）、実施例２で調製した分子量５，０００～３０００超のフコイダンオリゴ糖組成物、ヘパリン（和光純薬社製）をそれぞれ生理食塩水に、８ｍｇ／ｍｌの濃度に溶解した。この各種溶液と上記菌懸濁液を１：１の割合で混ぜ、その０．２ｍｌ（1×10^{6}個）をＩＣＲ系マウス（５週令、雌）の尾静脈より接種した。なお対照として、生理食塩水を用いた。

１４日間、マウスの生死を観察し、各サンプルの抗カンジダ活性を測定した。延命率は下記式（数１）により算出した。結果を表１に示す。

【００２３】

【表１】

表　１

サンプル	投与量 (mg/マウス)	平均生存日数 (平均±標準偏差)	延命率 (%)	生存マウス
生理食塩水	－	4.00±2.28	－	0／11
ヘパリン	0.8	9.00±2.45	225	0／5
フコイダン	0.8	8.00±5.29	>200	2／5
フコイダンオリゴ糖組成物	0.8	9.40±3.78	>235	1／5

【００２４】
【数１】
延命率＝〔｛（各サンプル＋カンジダ　アルビカンス）投与群の平均生存日数｝／｛（生理食塩水＋カンジダ　アルビカンス）投与群の平均生存日数｝〕×１００

【００２５】
表１に示すようにカンジダ　アルビカンスに対してはヘパリン、フコイダンとも明らかな延命効果がみられた。フコイダンの抗カンジダ作用はフコイダンオリゴ糖組成物においても保持され、フコイダンオリゴ糖組成物はフコイダンと同等の活性を示した。
【００２６】
実施例５
Ｂ１６メラノーマ細胞をＦＣＳ無添加のＲＰＭＩ－１６４０培地で十分に洗浄した後５×10^5個／ｍｌとなるように、同培地に懸濁した。
フコイダン（シグマ社製）、実施例３記載の分子量５，０００～３０００超のフコイダンオリゴ糖組成物、分子量２，０００～１，０００超のフコイダンオリゴ糖組成物を、それぞれ生理食塩水に８ｍｇ／ｍｌ、０．８ｍｇ／ｍｌ、０．０８ｍｇ／ｍｌとなるように溶解、希釈した。この各種フコイダン溶液と上記細胞懸濁液を１：１の割合で混ぜ、その０．２ｍｌ（５×10^4個）をＣ５７ＢＬ／６マウス（７週令、雌）の尾静脈より接種した。なお対照として生理食塩水を用いた。判定は細胞を接種してから１５日目に肺臓を摘出し、その表面に確認できるメラノーマの転移結節数をカウントし、下記式（数２）により癌転移抑制率を算出した。結果を表２に示す。
【００２７】
【数２】
癌転移抑制率＝〔１－｛（<各サンプル＋Ｂ１６メラノーマ細胞>投与群の肺転移結節数）／（<生理食塩水＋Ｂ１６メラノーマ細胞>投与群の肺転移結節数）｝〕×１００

【００２８】
【表２】

表　2

サンプル	投与量 (mg/マウス)	使用マウス (匹)	肺への転移結節数 (平均±標準偏差)	癌転移抑制率 (%)
生理食塩水	－	10	183.8±43.4	－
フコイダン	0.008	5	158.8±67.0	13.6
	0.08	5	124.0±22.5	32.5
	0.8	5	84.8±21.2	53.9
フコイダンオリゴ糖組成物 分子量5000～3000超				
	0.008	5	114.6±31.0	37.6
	0.08	4	105.3±45.8	42.7
	0.8	5	99.6±14.8	45.8
フコイダンオリゴ糖組成物 分子量2000～1000超				
	0.008	5	159.0±32.1	13.5
	0.08	5	120.0±40.2	34.7
	0.8	5	128.4±19.6	30.1

【００２９】
表２から明らかなように、本発明のフコイダンオリゴ糖組成物は明らかな癌転移抑制活性を示した。
【００３０】
実施例６
実施例１に記載の分子量５０００以下のフコイダンオリゴ糖組成物の凍結乾燥品２５ｍｇに、乳糖、でんぷん、ステアリン酸マグネシウムを加え、充分混合した後、カプセルに充てんし、カプセル剤を製造した（表３）。
【００３１】
【表３】

表　3

実施例１の凍結乾燥品	２５ｍｇ
乳　　糖	５０ｍｇ
でんぷん	２３ｍｇ
ステアリン酸マグネシウム	２ｍｇ

【００３２】
実施例２、３にそれぞれ記載されている各フコイダンオリゴ糖組成物についても同様にカプセル剤を製造した。
【００３３】
実施例７
実施例２に記載の分子量５０００～３０００超のフコイダンオリゴ糖組成物の凍結乾燥品５００ｍｇにオートクレーブにより殺菌した生理食塩水を加えて溶解し、全量を１０ｍｌに調製した後、乾熱滅菌したアンプル瓶に封入し、１０ｍｌの液剤を製造した。
実施例２に記載の他のフコイダンオリゴ糖組成物、実施例１、３にそれぞれ記載の各フコイダンオリゴ糖組成物についても同様に液剤を製造した。
【００３４】
実施例８
実施例３に記載の分子量５０００～３０００超のフコイダンオリゴ糖組成物の凍結乾燥品に、乳糖及びでんぷんを加えて混合した。１０％のでんぷんのりを混合物に加え、かくはんして顆粒を製造した。乾燥後、整粒し、これにタルク及びステアリン酸マグネシウムを混合し、常法により打錠して２００ｍｇ錠剤を製造した（表４）。
【００３５】
【表４】

表　４

分子量５０００～３０００超の凍結乾燥品	５０ｍｇ
乳　　糖	１１０ｍｇ
でんぷん	３０ｍｇ
タルク	７ｍｇ
ステアリン酸マグネシウム	３ｍｇ

【００３６】
実施例３に記載の他のフコイダンオリゴ糖組成物、実施例１、２にそれぞれ記載の各フコイダンオリゴ糖組成物についても同様に錠剤を製造した。
【００３７】
【発明の効果】
本発明により、抗凝血活性、また夾雑タンパクによる抗原性の除去されたフコイダンオリゴ糖組成物、及びその効率的な製造方法が提供される。該フコイダンオリゴ糖組成物は溶解性、生体への吸収性共に優れ、かつ、天然物由来で安全性も高く、癌転移抑制剤、抗真菌剤として有用であり、また食品への適用も可能な新規組成物である。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7] F I
// Ａ６１Ｋ 35/80 Ａ６１Ｋ 35/80 Ｚ

(72)発明者 酒井 武
青森県弘前市大字在府町８２番地４ 株式会社糖鎖工学研究所内
(72)発明者 中西 芳邦
青森県弘前市大字在府町８２番地４ 株式会社糖鎖工学研究所内
(72)発明者 加藤 郁之進
青森県弘前市大字在府町８２番地４ 株式会社糖鎖工学研究所内
(72)発明者 竹迫 一任
滋賀県大津市瀬田３丁目４番１号 寶酒造株式会社中央研究所内

審査官 關 政立

(56)参考文献 JOURNAL OF ANDROLOGY, １９９２年, VOL.13,NO.6, P519-525
ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, １９６７年, VOL.118, P172-177

(58)調査した分野(Int.Cl.[7], ＤＢ名)
A61K 31/702
A61K 31/737
C07H 3/06
C08B 37/00