



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |                                                                                                                                                                                                                              |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (51) 国際特許分類 5<br>C12N 1/14 // C12P 21/00<br>(C12N 1/14, C12R 1:645)<br>(C12P 21/00, C12R 1:645)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | A1 | (11) 国際公開番号 WO 92/10562<br><br>(43) 国際公開日 1992年6月25日 (25.06.1992)                                                                                                                                                            |
| (21) 国際出願番号 PCT/KR91/00032<br>(22) 国際出願日 1991年12月4日 (04. 12. 91)<br><br>(30) 優先権データ<br>特願平2/19877 1990年12月4日 (04. 12. 90) KR<br><br>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)<br>一洋薬品株式会社<br>(IL-YANG PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [KR/KR]<br>ソウル特別市城北區下月谷洞24-5 Seoul, (KR)<br>(72) 発明者; および<br>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)<br>李 權 衍 (LEE, Kwon Haeng) [KR/KR]<br>京畿道軍浦市今井洞699-10 Kyoungki, (KR)<br>鄭 勳 (CHUNG, Hoon) [KR/KR]<br>ソウル特別市松坡區梧琴洞165 Seoul, (KR)<br>李 準 雨 (LEE, Choon Woo) [KR/KR]<br>ソウル特別市松坡區馬川2洞84-6 Seoul, (KR)<br>鄭 天 熙 (CHUNG, Chun Hee) [KR/KR]<br>ソウル特別市九老區開峰洞249-6 Seoul, (KR)<br>(74) 代理人<br>弁理士 朴 似 龍 (PARK, Sa Ryong)<br>ソウル特別市江南區驛三洞823-5 Seoul, (KR)                                                                                                     |    | (81) 指定国<br>AT (欧州特許), AU, BE (欧州特許), CA, CH (欧州特許),<br>DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許),<br>GB (欧州特許), GR (欧州特許), IT (欧州特許), JP,<br>LU (欧州特許), MC (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許),<br>SU, +US.<br><br>添付公開書類 国際調査報告書 |
| (54) Title : GANODERMA LUCIDIUM IY009 WHICH PRODUCES PROTEOGLYCAN (G009) HAVING EFFECT OF ENHANCING ANTITUMOR IMMUNITY<br>(54) 発明の名称 抗腫瘍免疫増強効果のある蛋白多糖體(G 009)を生成するガノデルマルシダム (Ganoderma Lucidum) IY 009<br>(57) Abstract<br><br>A strain, <i>Ganoderma lucidium</i> , which produces a proteoglycan (G009) which has an effect of enhancing antitumor immunity and contains β-glucose, α-glucose, galactose, α-mannose and fructose as the sugar components and glycine, leucine, alanine, histidine, arginine, valine, aspartic acid, threonine, isoleucine, serylleucine, glutamic acid, tyrosine, proline, phenylalanine and methionine as the protein components, said proteoglycan being separated from the culture medium of <i>Genoderma lucidium</i> . |    |                                                                                                                                                                                                                              |

(57) 要約

本発明は、ガノデルマ ルシダムを培養して、これから分離された、糖成分で、 $\beta$ -グルコース、 $\alpha$ -グルコース、ガラクトース、 $\alpha$ -マンノース、フルクトースを含有し、蛋白成分としてグリシン、ロイシン、アラニン、ヒスチジン、アルギニン、バリン、アスパラギン酸、スレオニン、イソロイシン、セリンロイシン、グルタミン酸、チロシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニンを含有し、抗腫瘍免疫増強効果を持つ蛋白多糖体 (G 0 0 9) を精製する菌株、ガノデルマ ルシダム (Ganoder ma lucidum) IY009 に関するものである。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

|    |           |    |             |                 |         |
|----|-----------|----|-------------|-----------------|---------|
| AT | オーストリア    | ES | スペイン        | ML              | マリ      |
| AU | オーストラリア   | FI | フィンランド      | MN              | モンゴル    |
| BB | バルバドス     | FR | フランス        | MR              | モーリタニア  |
| BE | ベルギー      | GA | ガボン         | MW              | マラウイ    |
| BF | ブルキナ・ファソ  | GI | ギニア         | NL              | オランダ    |
| BG | ブルガリア     | GB | イギリス        | NO              | ノルウェー   |
| BJ | ベナン       | GR | ギリシャ        | PL              | ポーランド   |
| BR | ブラジル      | HU | ハンガリー       | RO              | ルーマニア   |
| CA | カナダ       | IT | イタリア        | SD              | スーダン    |
| CF | 中央アフリカ共和国 | JP | 日本          | SE              | スウェーデン  |
| CG | コンゴ       | KP | 朝鮮民主主義人民共和国 | SN              | セネガル    |
| CH | スイス       | KR | 大韓民国        | SU <sup>+</sup> | ソヴィエト連邦 |
| CI | コート・ジボアール | LI | リヒテンシュタイン   | TD              | チャード    |
| CM | カメルーン     | LK | スリランカ       | TG              | トーゴ     |
| CS | ナエコスロバキア  | LU | ルクセンブルグ     | US              | 米国      |
| DE | ドイツ       | MC | モナコ         |                 |         |
| DK | デンマーク     | MG | マダガスカル      |                 |         |

<sup>+</sup>SUの指定はロシア連邦の指定としての効力を有する。しかし、その指定が旧ソヴィエト連邦のロシア連邦以外の他の国で効力を有するかは不明である。

## 明 細 書

## 発明の名称

抗腫瘍免疫増強効果の有る蛋白多糖体 (G 009)を生成するガノ

デルマ ルシダム (Ganoderma lucidum) IY 009

## 5 図面の簡単な説明

第1図は本発明蛋白多糖類 G 009の糖類分析クロマトグラム、

第2図は本発明蛋白多糖類 G 009のアミノ酸クロマトグラム、

第3図は本発明蛋白多糖類 G 009 の I.R 分析、

第4図は本発明菌株 IY 009 菌糸体の顕微鏡写真であり、

10 第5図は本発明株菌 IY 009 の特異性比較図である。

## 発明の詳細な説明

本発明は抗腫瘍免疫増強効果のある蛋白多糖体を生成する菌株に

関するものである。本発明者等は新しい抗腫瘍、免疫増強効果のあ

る蛋白多糖体の探索を目的に多数の担子菌類を各地域別に採集して

15 その担子菌類が生成する蛋白多糖体の分離を試図した。その結果、

全羅南道海南郡頭倫山一帯で採集したガノデルマ (Ganoderma)属に

属する担子菌類を適当な培地で培養して、抗腫瘍及び免疫増強効果

SUBSTITUTE SHEET

のある蛋白多糖体を生成することを発見した。生成された蛋白多糖体を分離してその理化学的性質及び生物学的性質を検討したところ、これを抗腫瘍、免疫増強効果のある蛋白多糖体 G 009 と命名し、これを生成する菌株をガノデルマ ルシダム (*Ganoderma lucidum*) IY 009 と命名した。このガノデルマ ルシダム IY 009 菌株は社団法人韓国種菌協会に1990.11.22日付で寄託番号KFCC-10709号で寄託された。

本発明は G 009 を生成する株菌 IY 009 に関するものである。高等菌に属する担子菌類から薬効成分である抗菌成分、幻覚成分、毒成分、コレステロール降下成分等に関して研究して来たが最近に到り抗癌成分と免疫機能増強作用の研究が活発に進行されているので担子菌類の重要性が高くなっている。ここに本発明者等は抗癌成分及び免疫機能増強作用のある物質を分泌する菌株を分離、液内培養してその薬理効果を研究中、現在まで分離同定されたガノデルマ属の種 (species) より卓越した抗癌効果及び免疫増強作用を持つ変種の株菌を分離し菌糸体の液内培養方法を確立し、この培養された菌糸体から抽出した成分の抗癌効果及び免疫効果増強を確認した。これに対し本発明者等は次の実施例及び実験例で本発明を説明する。

実 施 例蛋白多糖体の分離

1) 菌株 : ガノデルマ ルシダム菌株は全羅南道海南郡の頭倫山一帯で採集して分離、同定した。

5 2) 保存培地 : ジャガイモ デキストロス 寒天 (Potato dextrose agar : PDA) 傾斜培地 ; ジャガイモ デキストロス 培地 (Difco, U.S.A) 39g を蒸留水に溶かして 1 ℓ にし、121℃ において 20 分間高圧滅菌の後傾斜培地に作った。

液内培養用培地 : 葡萄糖 50g, ペプトン 20g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.87g, 10  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g,  $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  10mg,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  7mg,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  10mg,  $\text{ZnCl}_2$  4mg に蒸留水を加えて 1 ℓ にした。

この pH を 5.5 に調整して 121℃、20 分間高圧蒸気で滅菌した。

3) 培養 : 保管中の菌株を PDA 傾斜培地に移植して  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  に 7 日間成長させた後、発育された菌糸を無菌的に分離して液内培養用培地 15 100ml の入った 500ml 三角フラスコに移し  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  において 180rpm で菌糸体が直径 3-5mm 程度の成熟した菌塊を成すまで 7-10 日間振盪培養した。得られた菌塊を微細粉碎機で 10 秒間粉碎した後、液内

培養用培地 100ml の入った 500ml三角フラスコに 5%(V/V)ずつ接種し、 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ の温度でオビタル振盪培養器（回転半径 1 吋ビジョ  
ン科学 Co.）で 170 回転/分で 7 日間振盪培養した。

#### 4) 蛋白多糖類の抽出及び分離

- 5 培養の終わった培養液全体を 6000rpm で 15分間遠心分離した後、  
菌糸体だけを取って 2 倍容量の 2.5N NaOH 溶液に浸潤させた後、  
室温で24時間放置して 6000rp で 15 分間遠心分離し、上澄液を取  
って氷醋酸で pH 7.4に中和させた後、ビスキング チューブ  
(Visking tube:Sigma,U.S.)を利用して 3 日透析させた。透析の  
10 終わった後濃縮して 3 倍のエタノールを加え  $4^{\circ}\text{C}$ で 24 時間放置  
した後 6000回転で 15 分間遠心分離して沈殿物を得た。この沈殿  
物を脱イオン水で溶解して 6000回転で 15 分間遠心分離して上澄  
液を濃縮し、凍結乾燥させて蛋白多糖体を分離した。

#### 5) 蛋白多糖類の精製

- 15 上記の試料を水に溶解して過量のエタノールを加えた後得られた沈  
殿物 12.5g (菌糸培養物 1300ml 中) を取って水に再び溶解せた。

この試料液をディイーエイイーセルロス (DEAE-Cellulose, Cl-form)

Column ( 3cm x 60cm ) に適用させた後、水で溶出して得られた溶出分割 200ml に同量のメタノールを加え遠心分離して沈殿物をエタノールで洗浄した後減圧乾燥して G1(2.1g) を得た。

- 上澄液 (400ml) はエタノール 100ml 加えて遠心分離した後、得られた沈殿物を減圧乾燥して G2(0.42g)を得、G2を除去して残った上澄液 800ml に再びエタノール 800ml を加えて得られた沈殿物を減圧乾燥して G3(1.1g)を得た。G1(2.1g)を水に溶解してセファデキス ジ -100(Sephadex G-100)に適用させて水で溶出した。チューブ No.25-33 の分割物を凍結乾燥して G4(1.5g) を得、チューブ No.34-44の分割物を合わせたG5(0.3g)を減圧乾燥して分離した。
- 10 G4 を水に再び溶解して 0.15M セタブロン (Cetavlon; Cethyl-trimethyl ammonium bromide) と 0.1M ボレート緩衝液(Borate buffer pH 8.0) が同量で混合された溶液を同量加えた後、0.5M NaOH で pH を 9.0に調整して沈殿物 (G7) と上澄液 (G6) を取っ
- 15 た。 G7に 2M の氷醋酸を加えて溶解した後、3 倍のメタノールを加えて沈殿物を得た。

ここで得られた沈殿物をメタノールとアセトンで洗浄した後

減圧乾燥させた (G8)。G8 を少量の水に溶解してセファロース  
シーエル-4B (Sephacrose CL-4B) に適用させた後水で溶出してチュー  
ーブ No.25-30 で G9 を得、チューブ No.31-46 で G10を得た。

#### 実験例 1

#### 5      抗 癌 実 験

上で得た分割物の肉種-180 に対する活性実験は下記の如く行っ  
た。 20-25g ICR 雄性マウスの腹腔内で 1 週間間隔に移植して継代  
した肉種-180(Sarcoma-180) の細胞を実験用の腫瘍細胞として使用  
した。 マウス腹腔で 7 日間培養された肉種-180 の細胞を腹水と  
10 共に取って氷冷、滅菌した食塩水を加えて 4000rpm で 5 分間遠心  
分離して細胞沈殿物を分離した。分離された細胞を生理食塩水で 3  
回洗浄した後  $1 \times 10^7$  細胞/ml になるよう希釈した。  
この細胞浮遊液 0.1ml をマウス 1 群を 10 匹にして左側鼠蹊部皮下  
移植した。腫瘍細胞移植後 72 時間経過後、連続して 10 日間精製  
15 された分割物である蛋白多糖類を投与した。  
対照群には生理食塩水を、処置群には生理食塩水に溶解させた蛋白  
多糖類を 20mg/kg の濃度で 0.1ml ずつ投与した。



腫瘍細胞を移植してから 30日目になる日マウスを致死させ、誘発さ

れた固形癌を摘出した後、その重量を測定して平均腫瘍重量を求め

下記式により腫瘍阻止百分率を計算した。

$$5 \quad \text{阻止百分率 (I.R.\%)} = \frac{C_w - T_w}{C_w} \times 100$$

I.R : Percent Inhibition Ratio

$C_w$  : 対照群の平均腫瘍重量

$T_w$  : 処置群の平均腫瘍重量

10 このような肉種-180 を利用した抗癌実験の結果は表 1 に表れた如く対照群に比して処置群において最も優秀な効果のある G9 を選択

して G 009 と称し、これに対する分析は下記の実験例で行った。

記の実験例で行った。

表 1.肉種-180 を移植したマウスに対する蛋白多糖類の抗癌効果

| 15 |     | 平均腫瘍重量 (g)<br>(Mean $\pm$ S.E) | 阻止率 (%) |
|----|-----|--------------------------------|---------|
|    | 対照群 | 4.66 $\pm$ 0.17                |         |
| 20 | G1  | 1.43 $\pm$ 0.25                | 69.3    |
|    | G2  | 3.54 $\pm$ 0.36                | 24.1    |
|    | G3  | 3.46 $\pm$ 0.39                | 25.7    |

8

|   |     |                 |      |
|---|-----|-----------------|------|
| 5 | G4  | 1.05 $\pm$ 0.17 | 77.4 |
|   | G5  | 1.83 $\pm$ 0.29 | 60.7 |
|   | G6  | 1.62 $\pm$ 0.10 | 65.2 |
|   | G7  | 0.64 $\pm$ 0.22 | 86.2 |
|   | G8  | 0.43 $\pm$ 0.21 | 90.7 |
|   | G9  | 0.17 $\pm$ 0.09 | 96.3 |
|   | G10 | 1.40 $\pm$ 0.17 | 69.9 |

G 009 の化学的分析のため総糖はアントロン発色法、蛋白質含量はローリー (Lowry) 等の方法で測定した後アミノ酸、構成糖類を分析し、結果を表 2.3.4 に表し、糖類分析クロマトグラムは第 1 図にアミノ酸クロマトグラムは第 2 図に、I.Rの分析は第 3 図に表した。

糖類分析の為の G.L.C.(Shimadzu GC 0A, Japan)使用の条件 :

Column 3% OV-17 (80-100) (Mesh shimalite)

15 3mm  $\phi$  x1 Boronsilicate glass column

Temperature Column 150-180°C Gradient, Detector 190°C

Flow rate N<sub>2</sub> : 50ml/min

H<sub>2</sub> : 60ml/min. (0.6kg/cm<sup>2</sup>)

Air: 60ml/min. (0.6kg/cm<sup>2</sup>)

|                  |
|------------------|
| SUBSTITUTE SHEET |
|------------------|

Attenuation  $10^2 \times 2^4$  a.f.s(ampere full scale)

表 2. G 009 の多糖類及び蛋白質総含量

|   |       |         |         |
|---|-------|---------|---------|
| 5 | 総含量   | 多糖類 (%) | 蛋白質 (%) |
|   | G 009 | 93      | 5       |

表 3. G 009 の多糖類部分中単糖類の含量

|    |            |         |
|----|------------|---------|
| 10 | 単糖類        | 相対比 (%) |
|    | アルファーグルコース | 45.84   |
|    | ベターグルコース   | 41.70   |
|    | カラクトース     | 8.03    |
| 15 | アルファーマンノース | 3.32    |
|    | フラクトース     | 1.11    |

アミノ酸自動分析器 (Beckman Sis.6300,U.S.A)使用の分析条件:

Column  $2.6 \times 200\text{mm}$

20 Ion exchange resin # 338076(Beckman)

Flow rate Buffer solution  $0.33\text{ml/min}$

Ninhydrin  $0.17\text{ml/min}$

Analysis cycle time 60 min

10

Column pressure 2100psi (147kg/cm<sup>2</sup>)Ninhydrin pressure 100psi ( 7kg/cm<sup>2</sup>)

Column temperature 50-70°C Gradient

N<sub>2</sub> gas pressure 40psi (2.8kg/cm<sup>2</sup>)

5 Reaction bath temperature 130 °C

Wave length 570nm, 440nm

表 4. G 009 の蛋白質部分中総アミノ酸含量

| 10 | アミノ酸               |       | アミノ酸               |        |
|----|--------------------|-------|--------------------|--------|
|    | $\mu\text{mol/ml}$ |       | $\mu\text{mol/ml}$ |        |
| 15 | Gly                | 8.070 | Ile                | 3.499  |
|    | Lys                | 4.133 | Ser                | 2.066  |
|    | Ala                | 7.072 | Leu                | 5.973  |
|    | His                | 1.469 | Glu                | 11.031 |
|    | Thr                | 3.191 | Tyr                | 1.638  |
|    | Arg                | 0.796 | Pro                | 6.446  |
|    | Val                | 5.800 | Phe                | 2.316  |
|    | Asp                | 9.435 | Met                | 0.938  |

## 20 実験例 2

G 009 の投与経路に伴う抗癌効果の変化

ICR 雄性マウス 20-25g の腹腔内で1週間間隔で移植して継代した

肉種 -180 細胞を実験用腫瘍細胞として使用した。マウス腹腔で 7

日間培養された肉種 -180 細胞を腹水と共に取って氷冷、滅菌した

食塩水を加えて 3000rpm で 5 分間遠心分離して細胞沈殿物を分離した。

分離された細胞を生理食塩水で 3 回洗浄した後  $1 \times 10^7$  細胞/ml

になるよう希釈した。この細胞懸濁液をマウス 1 群を 10 匹にして

5  $1 \times 10^6$  細胞/0.1mlをマウスの左側鼠蹊部に移植した後、隔日制

で10回筋肉、皮下及び腹腔注射は 20mg/kg を、静脈注射隔日制で

5回を10mg/kgで投与し対照群も同じ方法で生理食塩水 0.1mlずつ投

与して30日経過後固形癌の重量を測定して比較した。

表 5 に表れた如く、全ての投与方法において差異が殆ど無く固形

10 癌の成長を抑制させた。

表 5. G 009 の投与経路に依る抗癌効果の比較

| 投与経路 | マウス数 | 腫瘍重量(g)<br>処理群 / 対照群 | 抑制率<br>(%) |
|------|------|----------------------|------------|
| 筋肉注射 | 10   | 0.22/4.46            | 95.1       |
| 皮下注射 | 10   | 0.28/4.52            | 93.8       |
| 腹腔注射 | 10   | 0.18/4.72            | 96.1       |
| 静脈注射 | 10   | 0.21/4.45            | 95.2       |

実験例 3

SUBSTITUTE SHEET

G 009 の投与に依る寿命延長効果

マウスの生体内で G 009 の抗癌活性を測定するためエルリヒカシ

ノマ細胞 (Ehrlich ascite tumors : EAT) を使用した。EAT 細胞を

$1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^7$  細胞/ml をマウスに腹腔注射して移植し 24時

5 間経過後 G 009 を磷酸緩衝塩溶液に溶解して 100mg/kg の投与量

で 12 日間継続して腹腔、経口投与し 20 日、25 日、30 日、50日

の平均寿命を測定した。

対照群は生理食塩水を同量、同時に投与した。表 6 に現れた表れた

如く G 009 の腹腔投与と静脈投与がほぼ似た水準の抗癌効果を表

10 し対照群よりも顕著な寿命延長効果をもたらした。

表 6. G 009 の投与に依る寿命延長効果

| 15 | 細胞投与量<br>(細胞/ml) | マウス<br>数            | 癌細胞移植後の観察日<br>生存率 (%) |     |     |    |    |    |
|----|------------------|---------------------|-----------------------|-----|-----|----|----|----|
|    |                  |                     | 20                    | 25  | 30  | 40 | 50 |    |
| 20 | 対照群              | 1 x 10 <sup>6</sup> | 10                    | 100 | 40  | 10 | 0  | 0  |
|    | 腹腔投与             | 1 x 10 <sup>6</sup> | 10                    | 100 | 100 | 80 | 70 | 70 |
|    | 静脈投与             | 1 x 10 <sup>6</sup> | 10                    | 100 | 90  | 70 | 60 | 60 |
|    | 対照群              | 1 x 10 <sup>7</sup> | 10                    | 100 | 30  | 0  | 0  | 0  |
|    | 腹腔投与             | 1 x 10 <sup>7</sup> | 10                    | 100 | 60  | 30 | 20 | 20 |

## 実 験 例 4

トリパン ブルー (Trypan Blue) 処理したマウスでのG 009 の抗癌効果

- ICR 雄性マウス 20-25g の腹腔内で 1 週間間隔で移植して継代した肉種-180 細胞を実験用腫瘍細胞として使用した。
- マウス腹腔で 7 日間培養された肉種-180 細胞を腹水と共に取って氷冷、滅菌した食塩水を加えて 4000rpm で 5 分間遠心分離して細胞沈殿物を分離した。分離された細胞を生理食塩水で 3 回洗浄した後  $1 \times 10^7$  細胞/ml になるよう希釈して 0.1ml ずつマウス鼠蹊部に皮下注射した。
- 1 日経過後 4mg/mouse(0.4ml) の Trypan blue を腹腔投与した。
- 再び 1 日経過後 1 回に 1mg/mouse(0.1ml) で 3 日間隔で総 13mg/mouse となるようトリパン ブルーを皮下注射し、トリパン ブルーの投与直後 G 009 10mg/kg を静脈注射した。 対照群は G 009 投与の代わり生理食塩水で注射して処置群と対照群のマウス数は各々 10 匹にした。

腫瘍移植 30 日経過後マウスを致死させ腫瘍の重量を測定した。

G 009 に対するトリパン ブルー効果に対する上の実験結果は表 7 の通りであり、このような実験結果は大食細胞不活性化因子であるトリパン ブルーを処理することに依り本発明の抽出成分である G 009 が抗癌効果と関連のある大食細胞を活性化させていることを知る事が出来、又 G 009 が T- 淋巴球の抗癌活性と共に大食細胞の機能を活性化してやることに依り抗癌効果を現すものと見られる。

表 7. トリパン ブルー処理したマウスでの G 009の抗癌効果

| 10 |                          | 腫瘍の重量 (g) (Mean $\pm$ S.E ) |
|----|--------------------------|-----------------------------|
|    | 対照群                      | 4.54 $\pm$ 0.26             |
|    | G 009 処理群                | 0.14 $\pm$ 0.05             |
|    | トリパン ブルー処理群              | 4.81 $\pm$ 0.19             |
| 15 | トリパン ブルー処理と<br>G 009 処理群 | 2.69 $\pm$ 0.17             |

#### 実施例 5

#### 新生マウスの胸腺切除後 G 009投与と抗胸腺グロブリン効果

20 2 日令 ICR マウスの胸腺切除はスジョジン (Sjodin)の方法で施行し、胸腺切除の 6週後マウス鼠蹊部に肉種 - 180を  $1 \times 10^7$  細胞懸濁



液を 0.1ml ずつ移植した。移植 24 時間後隔日間隔で 10 回 20mg/kg の投与量で G 009 を筋肉注射した。胸腺切除されたマウスの感染防止のため実験期間中テトラサイクリン - HCl (Tetracycline-HCl) を含んだ給水をした。

5 抗胸腺血清の分離は Tadakuma 方法を使用したところ 2-3 週令のマウスから胸腺を切除して胸腺細胞を分離した後、磷酸塩緩衝溶液に希釈して細胞懸濁液に作った後  $1 \times 10^9$  細胞/ml の胸腺細胞を 3 週間隔で 3 家兎に静脈注射して免疫化させた。最終注射後 1 週間経過後抗胸腺血清を取って 56℃で 30 分間不活性化させた。

10 この不活性化された抗胸腺血清から IgG (免疫グロブリン G) 分割をアンモニウム スルフェートで沈殿させて分離した後  $1 \times 10^7$  細胞/ml の肉種 - 180 が接種されて 1 日経ったマウスに 10 日間 0.1ml の投与量で腹腔注射し、G 009 は肉種 - 180 移植 1 日後隔日間隔で 20mg/kg の投与量で 5 回筋肉注射した。

15 上の実験結果が表 8 に表れた如く G 009 の抗癌効果は T-細胞の機能と関連して胸腺切除されたマウスが対照群より抗癌効果が顕著に低く、抗胸腺グロブリン処理群でも正常の家兎グロブリンのシュ

ド(pseudo)-処理群である対照群より抗癌効果が減少されるのを見ることが出来る。それ故このような実験結果は G 009 が T-細胞の機能を活性化させることに依り抗癌効果を表すのと看做される。

表 8. 新生胸腺の切除されたマウス (実験 1)と抗胸腺グロ

ブリン処理 (実験 2)されたマウスに肉種-180 を移植

した後 G 009 の投与に依る抗癌効果の比較

|    | 種類別<br>処理 | マウス<br>数 | 投与量<br>(mg/kgx回) | 腫瘍重量(g)<br>(Mean±S.E) | 抑制率<br>(%) |
|----|-----------|----------|------------------|-----------------------|------------|
| 10 | N.M       | 10       | -                | 47.5±0.37             | -          |
|    | G 009     | 10       | 20 x 10          | 0.18±0.06             | 96         |
| 15 | T.M       | 10       | -                | 3.55±0.55             | 25         |
|    | G 009     | 10       | 20 x 10          | 2.70±0.07             | 43         |
| 20 | N.M       | 10       | -                | 5.40±0.31             | -          |
|    | G 009     | 10       | 20 x 5           | 0.25±0.04             | 95         |
|    | A.T.M     | 10       | -                | 3.78±0.59             | 30         |
|    | G 009     | 10       | 20 x 5           | 3.16±0.65             | 41         |
| 25 | N.R.G.M   | 10       | -                | 3.26±0.61             | 39         |
|    | G 009     | 10       | 20 x 5           | 1.20±0.10             | 77         |

N.M : 正常マウス

T.M : 胸腺切除マウス

A.T.M : 抗胸腺グロブリン処理マウス

N.R.G.M : 正常家兎グロブリン処理マウス

## 実 験 例 6

G 009 が補体系に及ぼす影響

補体はギニア ピグ (Guinea pig)血清と人間の新鮮な血清を使用

し、赤血球は緬羊赤血球を使用し抗体は抗緬羊溶血素 (Anti sheep-

5 hemolysin)を使用した。

補体系活性実験は下記の如く行った。

試験管に 150  $\mu$  l のゼラチン ペロナル緩衝液 ( $\text{GVB}^{2+}$ )と試料 50  $\mu$  l

を加えた後、これに 50  $\mu$  l の補体 (100 units/ml)を添加し、37℃

で 30 分間反応させた後、 $\text{GVB}^{2+}$  を加えて補体濃度を 1 units/ml

10 に調整した。これらの混合物を溶血素 (Hemolysin ; 2MHU/ml に

感作した緬羊赤血球細胞 ( $5 \times 10^8$  細胞/ml) 2ml ずつ添加し  $\text{GVB}^{2+}$  溶

液で調整された補体混合物を 1.0, 1.2, 1.6 unit を各々加えた後

$\text{GVB}^{2+}$  溶液で総量が 5ml になるように調整した。

37℃で 60 分間反応させた後 2500rpm で 5 分間遠心分離した上澄

15 液の吸光度を 541nm で測定した。

活性度は対照群と G 009 の補体消費量 (%)であり、表 9 に表れた

如く G 009 の濃度に比例して補体消費量が増加し、このような結

果は G 009 が免疫系の重要防御機能中の一つである補体系 G009が機能を活性化させてやることに依り免疫増強作用を表すものと考えることが出来る。

表 9. 補体系活性化に対する G 009 の効果

| 5<br><br>10 | G 009 | 濃度 ( $\mu$ g/ml) | 補体消費量 (%) (Mean $\pm$ S.D) |
|-------------|-------|------------------|----------------------------|
|             |       | 10               | 15.2 $\pm$ 0.59            |
|             |       | 50               | 27.9 $\pm$ 0.43            |
|             |       | 100              | 36.4 $\pm$ 0.10            |
|             |       | 200              | 45.5 $\pm$ 0.30            |
|             |       | 600              | 52.2 $\pm$ 0.70            |

#### 実験例 7

#### 15 免疫に関連した臓器重量に対する G 009 の効果

G 009 を10mg の投与量でマウスに静脈注射した後 5 日後肺、肝、脾臓を摘出して、これらの重量を測定し、ライゾザイム (Lysozyme) は磷酸塩緩衝溶液 (pH 6.2) で溶解したストレプトコカス リソデイクス (*Streptococcus lysodeikticus*) を基質にして反応させた後、その活性は 660nm で吸光度で測定した。

表 10 で表した通り G 009 の処理群において脾臓の重量とライソ

ザイムの活性度が増加した理由は G 009 が大食細胞を活性化させてライソザイムの活性値が増加したのであり、免疫機能に関連した脾臓の重量が増加したものと見られる。

表 10. G 009 投与による血清酵素活性値と器官重量に関する影響

5

る影響

|    |       | マウス<br>数 | 体 重<br>(g)     | 肝<br>(%)        | 脾臓<br>(%)       | 肺<br>(%)        | ライソザイム<br>( $\mu$ g/ml) |
|----|-------|----------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------------|
| 10 | None  | 10       | 24.8 $\pm$ 1.0 | 6.54 $\pm$ 0.12 | 0.37 $\pm$ 0.01 | 0.56 $\pm$ 0.02 | 8.75 $\pm$ 0.25         |
|    | G 009 | 10       | 24.5 $\pm$ 1.2 | 6.60 $\pm$ 0.21 | 0.42 $\pm$ 0.04 | 0.54 $\pm$ 0.07 | 10.01 $\pm$ 0.48        |

\* 各器官の重量は体重に対する相対値

15

### 実 験 例 8

#### マウスの溶血班形成細胞数に G 009 が及ぼす影響

1) 実験動物として 20-25g の雄性マウス 1 群を 5 匹として、試料を 20g/kg の濃度で連続して腹腔注射した。

最後の投与 7 日後、綿羊赤血球を  $1 \times 10^6$  細胞 /ml 濃度を腹腔

20 注射して免疫させた後、綿羊赤血球投与 4 日後脾臓を摘出した。

ブレンダー(blender)で氷冷の平衡塩溶液と共に粉碎して脾臓細胞を遊離させた。

これを 2000rpm で 5 分間遠心分離して、上澄液を除去し、赤血球を除去するため 0.83 % 塩化アンモニウム溶液に浮遊させて 37℃ で 3 分間放置した。

再び遠心分離して氷冷の平衡塩溶液に浮遊させた後、赤血球除去脾

5 臓細胞数を血球計で測定した。

2) アルセル溶液 [葡萄糖 20.5g, 塩化ナトリウム 4.2g, 枸橼酸ナトリウム 8.0g を 1L の蒸留水に溶解した後、ミリポア濾過器 (0.45  $\mu$ m) で濾過して使用] に懸濁された綿羊赤血球を平衡塩溶液で 2000rpm で 5 分間 4 回反復して洗浄し、最終濃度が 10% に

10 なるよう平衡塩溶液に浮遊させた。

3) 平板皿に 1.5% アガー (Noble agar, Difco.) 10ml を注いで基底層平板を作った。再び 0.7% アガー 2ml に 1) の脾臓細胞 100  $\mu$ l と 2) の綿羊赤血球 100  $\mu$ l を混合した後、平板皿に注ぎ均一に広がるようにした。

15 これを 37℃ で 60 分間感作化させた後、補体として吸収されたギニアピグ血清を平衡塩溶液に 10 倍希釈して 2.5ml ずつ加えて 37℃ で 30 分間培養した後、形成された溶血斑形成細胞数及び脾臓細胞

全体中の溶血班形成細胞は、(PFC/脾臓)を計算して表示した。

表 11 に表れた結果から見て G 009が全体脾臓細胞数及び溶血班形成細胞数の顕著なる増加原因を招来するので免疫増強作用に関連していることを知ることが出来る。

5 表 11. 緬羊赤血球で免疫された ICR マウス脾臓内の溶液

班形成細胞に及ぼす G 009 の効果

|        | マウス<br>数 | 脾臓細胞数<br>( $1 \times 10^7$ ) | PFC/ $10^6$ 脾臓細胞 |
|--------|----------|------------------------------|------------------|
| 10 対照群 | 5        | $38.6 \pm 2.1$               | $24.4 \pm 11.2$  |
| G 009  | 5        | $42.6 \pm 0.11$              | $51.0 \pm 14.5$  |

#### 実 施 例 9

#### 15 免疫刺激作用

毎グループ当 10 匹にして生後 6 週になった 20-25g の雄性 ICR

系マウスを使用した。G 009 を生理食塩水に溶解し各濃度別溶液

0.2ml をマウスに腹腔内投与する。投与 24 時間後 1ml のペリカ

ン ドローイング インク 17 ブラック (Perican Drawing Ink 17

20 Black, Gunther-Wagner Co., Ltd. 製造) と 3%(V/V) のゼラチン

を含有する生理食塩水 2ml を混合して製造した炭素懸濁液 0.2ml  
 をマウスの尾に静脈注射した後 1, 5, 10 及び 15 分にヘパリンで  
 被覆されたヘマトクリット毛細管を利用して眼窩で血液 0.02mlを採  
 採取して直ちに 0.1% (V/V)の炭酸ナトリウム水溶液 1.6ml に希釈  
 5 及び溶血させる。

この溶液を 675nm で比色させ食作用指数 (K値) をハルペルン等  
 (Halpern et al) の等式により測定する。

対照群はマウスに生理食塩水 0.2ml を投与する。

$$10 \quad K = \frac{\log C_0 - \log C}{t - t_0}$$

上記式で

$C_0$  =  $t_0$  時間での血液中の炭素粉末含量であり

$C$  =  $t$  時間で血液中の炭素粉末含量である。

15 上の試験に対する結果を表 12 に表し G 009 の濃度に比例して免  
 疫食作用指数 (K) が高く表れており、このような結果から見て G 009  
 が免疫反応に関与して免疫増強作用を表すものと見られる。

表 12. 免疫刺戟作用に対する G 009 の影響

SUBSTITUTE SHEET



|    |       | 投与量<br>(mg/kg) | マウス<br>数 | 食作用指数(K)<br>(Mean $\pm$ S.E) |
|----|-------|----------------|----------|------------------------------|
| 5  | 対照群   | 生理食塩水          | 10       | 0.0391 $\pm$ 0.003           |
| 10 | G 009 | 5              | 10       | 0.1109 $\pm$ 0.025           |
|    |       | 20             | 10       | 0.1453 $\pm$ 0.022           |
|    |       | 50             | 10       | 0.1643 $\pm$ 0.008           |
|    |       | 100            | 10       | 0.1845 $\pm$ 0.011           |

# 15 実験例 10

G 009に対する急性毒性試験はマウス、ラット、家兎に対し行い、

G 009 投与後 14 日目に測定した。

表11 に表れた如く投与経路や種 (species) に対しても致死は無か

ったので G 009は毒性が極めて低い安全な物質である。

20 表 13. G 009 に対する毒性試験結果

|    | 試験動物<br>種類 | 数  | 投与量<br>(mg/kg) | 投与<br>経路 | 致死 | 最大許容量<br>(mg/kg) |
|----|------------|----|----------------|----------|----|------------------|
| 25 | Mice       | 10 | 100 - 300      | i.v      | 0  | > 300            |
|    |            | 10 | 50 - 2000      | i.p      | 0  | > 2000           |
|    |            | 10 | 50 - 100       | i.m      | 0  | > 100            |
|    |            | 10 | 1000 - 2000    | s.c      | 0  | > 2000           |
| 30 | Rat        | 10 | 100 - 300      | i.v      | 0  | > 300            |
|    |            | 10 | 500 - 1000     | i.p      | 0  | > 1000           |
|    |            | 10 | 50 - 100       | i.m      | 0  | > 100            |
|    |            | 10 | 500 - 1000     | s.c      | 0  | > 1000           |
| 35 |            | 10 | 100 - 200      | i.v      | 0  | > 200            |

24

|        |    |           |     |   |       |
|--------|----|-----------|-----|---|-------|
| Rabbit | 10 | 100 - 200 | i.p | 0 | > 200 |
|        | 10 | 25 - 50   | i.m | 0 | > 50  |
|        | 10 | 50 - 100  | s.c | 0 | > 100 |

# 5 実験例 11

## 菌種間の特性比較

本発明者等は全国各地域で採取したガノデルマ ルシダム (Gano-  
derma lucidum) 菌株の抗癌効果を検索して見た結果、抗癌効果が  
優秀であると判断される 4 種と標準菌種 (農村振興庁 農業技術  
10 庁研究所 菌茸課保有) の系統間分類及び生理遺伝的差異を糾明  
するため次の如き実験を行った。

## 実験材料及び方法

### 使用菌株、培地及び培養

本実験に使用した菌株は国内で自生する靈芝 (Ganoder-  
15 lucidum) の内抗癌効果が優秀であると判断される 4 菌株を使  
用し、収集源は表 14 の通りである。

### 試料の抽出

液内培養した培養物を遠心分離して得られた菌糸体を磷酸塩緩衝塩  
液 (phosphate buffered saline : pH 7.5) に 3 回洗浄した後、菌

**SUBSTITUTE SHEET**

体を氷冷して 30 秒間超音波処理した。

これを 12000xg で遠心分離した後、上澄液を電気泳動試料に使用した。

#### 蛋白質定量

- 5 試料中の蛋白質は牛血清アルブミン (bovin serum albumin: BSA) を標準物質に使用して BCA 蛋白分析試薬 (protein assay reagent Pierce Co.) を使用して定量した。

#### 電気泳動

- 電気泳動は不連続緩衝系 (discontinuous buffer system) を利用した。分離ゲル (separating gel) は 240mM Tris-Cl 緩衝液 (pH 8.48) に 10% T, 10% C 濃度にし、スタックゲル (stacking gel) は Tris 緩衝溶液 (39.5mM Tris, 0.064N  $H_3PO_4$  に 3.125% T, 20% C 濃度) でゲルを調剤した。

Gel を固めるために TEMED と ammonium persulfate を使用した。

- 15 ランニング緩衝 (running buffer) で陽極には 40mM トリス グリシン緩衝液 (pH 8.8) を、陰極には 60mM トリス-Cl 緩衝液 (pH 7.47) を使用し、試料は 70  $\mu$ g ずつをゲルに装填 (loading)

して 4℃で 100V で 2 時間展開した。

### ゲルの染色

#### (1) エステラーゼ (E. C. 3, 1, 1, 1)

展開したゲルを 0.2M 燐酸塩緩衝液 (pH 6.5)に 30 分間沈漬させ  
5 た。沈漬される間、新しい緩衝液で 3 回交換してやった。沈漬の  
終わったゲルの酸度を調整した後、発色液 ( $\alpha$ -naphthylacetate  
20mg, ethylene glycolmonomethyl ether 2ml, fast blue RR salt  
20mg, 0.2M phosphate buffer 120ml) を加えて暗い場所で 35 °C  
で 30 分間徐々に振ってやりながら発色させた。

#### 10 (2) アシド ホスファターゼ (E. C. 3, 1, 3, 2)

ゲルを 0.1M 醋酸塩緩衝液 (pH 5.2) 沈漬してゲル内の酸度を調整  
した後、発色液 (10% MgCl<sub>2</sub> 溶液 6ml, fast garnet GBC salt 70mg,  
 $\alpha$ -naphthylphosphate 80mg,  $\beta$ -naphthylphosphate 40mg, 0.1M  
acetate buffer 100ml) を加え 37℃で 30 分間発色させた。

#### 15 (3) ロイシン アミノ ペプチダーゼ (E.C.3,1,3,2)

ゲルに発色液 [L-leucyl- $\beta$ -naphthylamide HCl 20mg, fast black  
K salt 20mg, distilled water 50mg, 0.2M Tris malate buffer

(pH 5.4) 120ml] を加えて暗い場所で 30 分間発色させた。

(4) ペロキシダーゼ (E.C.1,11,1,7)

ゲルを水洗した後、発色液 (Benzidine 1g, acetic acid 9ml, mixed solution of 1 part of benzidine solution mixed with 40ml of distilled water, 1 part of 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 4 parts of distilled water) を加えて暗い場所で発色させた。

このような実験結果を説明すれば下記の通りである。

エステラーゼの同位酵素パターン (pattern)

霊芝のエステラーゼ バンド (esterase band) は第 1 図におけると同じく総計 17 個が表れたが、5 と 15 番目のバンドは全ての菌株で殆ど共通的に見えた。標準菌株である Fr07004 と Fr 07008 及び菌株のエステラーゼ パターンは極めて類似していたが、IY 009 と IY 010 菌株のエステラーゼ パターンは他の菌株と多くの差異のあることを知ることが出来た。

15 アシド ホスファターゼの同位酵素パターン

第 5 図に表れたように標準菌株 Fr 07004, Fr 07008 及び IY 005 菌株のアシド ホスファターゼ のパターン間には w. 極めて類似し

た様相を表したが、IY 009 と IY 010 の場合は他の菌株とは相違したバンドのパターンを見せた。

#### ロイシン アミノ ペプチダーゼの同位酵素パターン

霊芝では全部 3 個のロイシン アミノ ペプチダーゼ バンドが現  
5 れ、このうち標準菌株である Fr 07004, Fr 07005 及び IY 005 は大  
大部分同様な様相を表したが、IY 009 はこれらとは全然異なる様相  
を表した (第 5 図)。

#### ペロキシダーゼの同位酵素パターン

霊芝菌株では 2 個のペロキシダーゼ バンドが表れたが標準菌株  
10 である Fr 07004, Fr 07008 及び IY 005 の間には由縁関係が多か  
った (第 5 図)。

#### 菌種間の由縁関係

表14に表れているように、霊芝の標準菌株である Fr 07008 と IY  
15 005 の間には 93.8%, Fr 07004 と IY 005 は 82.4% の高い由縁関  
係を見せているが、Fr 07004 と IY 010 及び Fr 07004 と IY 009  
は各々 30.4% と 31.8% の比較的低い由縁関係を見せた。

以上のような結果から同一種内の同位酵素パターンの差異は地理的

環境の差異に伴う遺伝的変異に依り生化学的変化を誘発することに依り表れることを知ることが出来、このような差異が菌株毎に抗癌活性が異なる蛋白多糖体を生成することと関連のあるものと見られる。

5 表 14. 本実験に使用された菌株の採取地域

|    | 種名                   | 菌株番号     | 採集地     | 備考   |
|----|----------------------|----------|---------|------|
| 10 | Ganoderma<br>lucidum | Fr 07004 | 農村振興庁保有 | 標準菌株 |
|    |                      | Fr 07008 | 農村振興庁保有 | 標準菌株 |
|    |                      | IY 005   | 京畿道光陵   |      |
|    |                      | IY 008   | 全羅南道頭倫山 |      |
|    |                      | IY 009   | 全羅南道頭倫山 |      |
|    |                      | IY 010   | 江原道雉岳山  |      |
| 15 |                      |          |         |      |

表 15. エステラーゼ、アシド ホスファターゼ、ロイシン、

アミノ ペプチダーゼ、ペロキシダーゼ パターン

に依る霊芝 (Ganoderma lucidum) 菌株間の類似性

比較

| 菌株番号 | 菌種名               | 類似性 (%)  |          |        |        |        |        |
|------|-------------------|----------|----------|--------|--------|--------|--------|
|      |                   | Fr 07004 | Fr 07008 | IY 005 | IY 008 | IY 010 | IY 009 |
| 25   | Ganoderma lucidum | Fr 07004 | *        | 77.8   | 82.4   | 62.5   | 30.4   |
|      |                   | Fr 07008 |          | *      | 93.8   | 45.0   | 32.8   |
|      |                   | IY 005   |          |        | *      | 45.0   | 31.8   |
|      |                   | IY 008   |          |        |        | *      | 27.3   |
|      |                   | IY 010   |          |        |        |        | *      |
|      |                   | IY 009   |          |        |        |        |        |
| 30   |                   |          |          |        |        |        |        |

SUBSTITUTE SHEET

## 4. 特許請求の範囲

- ガノデルマ ルシダムを培養し、これから分離された、糖成分としてベタ-グルコース、アルファ-グルコース、ガラクトース、アルファマンノース、フラクトースを含有し、蛋白成分としてグリシン、
- 5 ライシン、アラニン、ヒスチジン、バリン、アスパルチック アシド、トレオニン、イソロイシン、セリン、ロイシン、グルタミン酸、チロシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニンを含有し、抗腫瘍免疫増強効果を持つ蛋白多糖体 (G 009)を生成する菌株、ガノデルマ ルシダム (Ganoderma lucidum) IY 009.

SUBSTITUTE SHEET



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/KR91/00032

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                           |                                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| <b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                           |                                                     |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                           |                                                     |
| Int. Cl <sup>5</sup> C12N1/14//C12P21/00, (C12N1/14, C12R1:645),<br>(C12P21/00, C12R1:645)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                           |                                                     |
| <b>II. FIELDS SEARCHED</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                           |                                                     |
| Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                           |                                                     |
| Classification System                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Classification Symbols                                                                                                                                                                                                    |                                                     |
| IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | C12N1/14, C12P21/00                                                                                                                                                                                                       |                                                     |
| Documentation Searched other than Minimum Documentation<br>to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                           |                                                     |
| Biosis Database, Chemical Abstract Database<br>(CA, REG)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                           |                                                     |
| <b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <sup>9</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                           |                                                     |
| Category *                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>                                                                                                            | Relevant to Claim No. <sup>13</sup>                 |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | J, Chin. Agric. Chem. Soc., Vol. 26, No. 4, 1988, Hseu R-S. et al. "Identification of Ganoderma-lucidum and Ganoderma-tsugae by cultural studies and the incompatibility test" p. 588-596                                 | 1                                                   |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | J. Pharmaco bio-Dyn., Vol. 12, No. 2, 1989, Maruyama H. et al. "Antitumor activity of Sarcodon-aspratus berk. S. ito and Ganoder-malucidum Fr. Karst" p. 118-124                                                          | 1                                                   |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Nippon Nogeikagaku kaishi, Vol. 59, No. 11, 1985, Mizuno T. et al. "Fractionation chemical modification and antitumor activity of mater-insoluble polysaccharides of the fruiting-body of Ganoderma-Incidum" p. 1143-1152 | 1                                                   |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Nippon Nougai Kagaku Kaishi, Vol. 58, No. 9, 1984, Mizuno T. et al. "Fractionation Structural features and antitumor activity of water-soluble polysaccharide from reishi the fruitbody of Ganoderma-lucidum"             | 1                                                   |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div> |                                                                                                                                                                                                                           |                                                     |
| <b>IV. CERTIFICATION</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                           |                                                     |
| Date of the Actual Completion of the International Search                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                           | Date of Mailing of this International Search Report |
| March 12, 1992 (12. 03. 92)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                           | March 31, 1992 (31. 03. 92)                         |
| International Searching Authority                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                           | Signature of Authorized Officer                     |
| Japanese Patent Office                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                           |                                                     |

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

|   |                                                                                                                                                                                                                                                        |   |
|---|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| Y | <p>p. 871-880</p> <p>Chem. Pharm. Bull., Vol. 29, No. 12, 1981,<br/>Miyazaki T. et al. "Studies on fungal poly<br/>saccharides 27. structural examination of<br/>a water soluble anti tumor poly saccharido<br/>of Ganoderma-lucidum" p. 3611-3616</p> | 1 |
|---|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|

V. ☐ OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE <sup>1</sup>

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. ☐ Claim numbers , because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claim numbers , because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claim numbers , because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI. ☐ OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING <sup>2</sup>

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.

2. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:

3. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:

4. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

## Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# 国際調査報告

国際出願番号 PCT/KR 91 / 00032

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                         |             |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| I. 発明の属する分野の分類                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                         |             |
| 国際特許分類 (IPC) Int. Cl. <sup>8</sup> C12N1/14/C12P21/00,<br>(C12N1/14, C12R1:645), (C12P21/00, C12R1:645)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                         |             |
| II. 国際調査を行った分野                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                         |             |
| 調査を行った最小限資料                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                         |             |
| 分類体系                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 分類記号                                                                                                                                                                                                                    |             |
| IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | C12N1/14, C12P21/00                                                                                                                                                                                                     |             |
| 最小限資料以外の資料で調査を行ったもの                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                         |             |
| Biosis Database, Chemical Abstract Database<br>(CA, REG)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                         |             |
| III. 関連する技術に関する文献                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                         |             |
| 引用文献の※<br>カテゴリー                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 引用文献名及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                                        | 請求の範囲の番号    |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | J, Chin. Agric. Chem. Soc., 第26巻, 第4号,<br>1988, Hseu R-S. et al. 「Identification of<br>Ganoderma-lucidum and Ganoderma-tsugae by<br>cultural studies and the incompatibility<br>test」 p. 588-596                        | 1           |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | J, Pharmaco bio-Dyn., 第12巻, 第2号, 1989,<br>Maruyama H. et al. 「Antitumor activity of<br>Sarcodon-aspratus berk. S. ito and Ganoder-<br>malucidum Fr. Karst」 p. 118-124                                                   | 1           |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Nippon Nogeikagaku kaishi, 第59巻, 第11号,<br>1985, Mizuno T. et al. 「Fractionation chemi-<br>cal modification and antitumor activity of<br>mater-insoluble polysaccharides of the fru-<br>iting-body of Ganoderma-lucidum」 | 1           |
| <p>※引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&amp;」 同一パテントファミリーの文献</p> |                                                                                                                                                                                                                         |             |
| IV. 認 証                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                         |             |
| 国際調査を完了した日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 国際調査報告の発送日                                                                                                                                                                                                              |             |
| 12.03.92                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 31.03.92                                                                                                                                                                                                                |             |
| 国際調査機関                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 権限のある職員                                                                                                                                                                                                                 | 4 B 9 0 5 0 |
| 日本国特許庁 (ISA/JA)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 特許庁審査官 佐 伯 裕 子                                                                                                                                                                                                          | ®           |

第2ページから続く情報

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | <p>( 欄の続き )</p> <p>p. 1143-1152</p> <p>Y Nippon Nougeikagaku Kaishi, 第58巻, 第9号, 1984, Mizuno T. et al. [Fractionation Structural features and antitumor activity of water-soluble polysaccharide from reishi the fruitbody of Ganoderma-lucidum] p. 871-880</p> <p>Y Chem. Pharm. Bull., 第29巻, 第12号, 1981,</p> | <p>1</p> <p>1</p> |
| V. <input type="checkbox"/> 一部の請求の範囲について国際調査を行わないときの意見                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                   |
| <p>次の請求の範囲についてはPCT17条(2)(b)の規定によりこの国際調査報告を作成しない。その理由は、次のとおりである。</p> <p>1. <input type="checkbox"/> 請求の範囲_____は、国際調査をすることを要しない事項を内容とするものである。</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 請求の範囲_____は、有効な国際調査をすることができる程度にまで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 請求の範囲_____は、従属請求の範囲でありかつPCT規則6.4(a)第2文の規定に従って起草されていない。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                   |
| VI. <input type="checkbox"/> 発明の単一性の要件を満たしていないときの意見                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                   |
| <p>次に述べるようにこの国際出願には二以上の発明が含まれている。</p> <p>1. <input type="checkbox"/> 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されたので、この国際調査報告は、国際出願のすべての調査可能な請求の範囲について作成した。</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に一部分しか納付されなかった ので、この国際調査報告は、手数料の納付があった発明に係る次の請求の範囲について作成した。<br/>請求の範囲_____</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されなかった ので、この国際調査報告は、請求の範囲に最初に記載された発明に係る次の請求の範囲について作成した。<br/>請求の範囲_____</p> <p>4. <input type="checkbox"/> 追加して納付すべき手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加して納付すべき手数料の納付を命じなかった。</p> <p>追加手数料異議の申立てに関する注意</p> <p><input type="checkbox"/> 追加して納付すべき手数料の納付と同時に、追加手数料異議の申立てがなされた。</p> <p><input type="checkbox"/> 追加して納付すべき手数料の納付に際し、追加手数料異議の申立てがなされなかった。</p> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                   |

Ⅲ. 関連する技術に関する文献（第2ページからの続き）

| 引用文献の<br>カテゴリー※ | 引用文献名及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                          | 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
|                 | <p>Miyazaki T. et al. 「Studies on fungal poly saccharides 27. structural examination of a water soluble anti tumor poly saccharido of Ganoderma-lucidum」 P. 3611-3616</p> |          |