(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第3651697号

(P3651697)

(45)発行日　平成17年5月25日(2005.5.25)　(24)登録日　平成17年3月4日(2005.3.4)

(51)Int.Cl.[7]	F I		
C08B 37/00	C08B	37/00	P
A61K 31/715	A61K	31/715	
// A61P 37/04	A61P	37/04	
C12P 19/04	C12P	19/04	B
(C12P 19/04	C12P	19/04	

請求項の数 2　(全 7 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平7-90042
(22)出願日　平成7年3月24日(1995.3.24)
(65)公開番号　特開平8-259602
(43)公開日　平成8年10月8日(1996.10.8)
審査請求日　平成13年11月29日(2001.11.29)

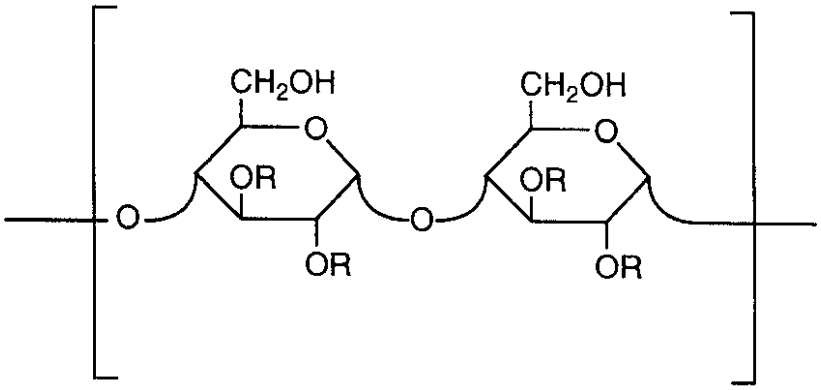
(73)特許権者　592196156
株式会社アミノアップ化学
北海道札幌市清田区真栄３６３番地３２号
ハイテクヒル真栄
(74)代理人　100081086
弁理士　大家　邦久
(72)発明者　小砂　憲一
北海道札幌市豊平区西岡５条１２丁目７番２２号

審査官　内藤　伸一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】新規多糖体物質

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
下記式
【化１】



（式中、Ｒは水素原子またはアセチル基を表わす。）で示されるα（１→４）結合Ｄ－グルコース単位からなり、その２，３位の水酸基の約３０％がアセチル化された構造を有し、下記の性質を有することを特徴とする新規多糖体物質；

（１）　性状：白色の無晶形粉末で無味無臭、
（２）　溶解性：アルコール、アセトン、ヘキサン、ベンゼン、酢酸エチル、四塩化炭素、クロロホルムおよびエーテルに不溶であり、水、ホルムアミドおよびジメチルスルホキシドに可溶、
（３）　水溶液のｐＨ：中性、
（４）　構成糖：グルコースのみ、
（５）　分子量：５００～ 10000、
（６）　比旋光度：［α］$_D$（２４℃）＝＋１１２°～＋１１６°
（７）　呈色反応：アンスロン硫酸反応、フェノール硫酸反応およびクロモトロープ硫酸反応が陽性であり、ビューレット反応、ローリー・フォーリン反応、エルソン・モンガン反応およびヨード反応がそれぞれ陰性である、
（８）　融点：明確な融点を示さない、
（９）　ＩＲ吸収スペクトル：アセチル基に特徴的吸収を示す、
（10）　^{13}ＣＮＭＲスペクトル：α－１，４グルカンおよびアセチル基に特徴的スペクトルを示す。
【請求項２】
植物組織原料の存在下でバシディオマイセテス（ Basidiomycetes ）を培養した液中から抽出、分離される請求項１に記載の多糖体物質。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【産業上の利用分野】
本発明は、新規多糖体物質、より詳しく言えば、植物組織を培地原料とし、バシディオマイセテス（ Basidiomycetes , 担子菌類）を液体培養した培養液および菌糸体混合物から抽出、分離精製される、α（１→４）結合Ｄ－グルコース単位で構成され、その２，３位の水酸基が約３０％アセチル化されている分子量５００～ 10000の新規多糖体に関する。
【０００２】
【従来の技術】
近年、癌免疫療法において生物応答修飾剤（biological response modifiers:ＢＲＭ）という概念が用いられている。これは、患者のもつ生体防御機構つまり免疫力を調節し、種々の病気に対する治療効果が期待される物質の総称である。この主なものとして、ＢＣＧ（ Bacillus Calmette-Guerin ）、ピシバニール（ Picibanil, OK-432）等の細菌由来物質、レンチナン、シゾフィラン等の真菌由来物質、ピランコポリマー、レバミゾール等の合成物質などが知られている。これらのＢＲＭの代表としてレンチナンがあげられるが、その理由として、この物質がよく精製、純化され、物理的、化学的に特徴づけられていることである。レンチナンはシイタケ（ Lentinus edodes）の子実体から抽出、精製したもので分子量４０～８０万、直鎖のβ（１→３）結合Ｄ－グルコース残基５個に対し２個のβ（１→６）結合Ｄ－グルコピラノシド側鎖をもつ構造を基本単位としたグルカンである。生物学的には生体防御に重要な細胞の成熟、分化、増殖を促進させることが知られている。つまり、癌や感染症などに対して、抵抗力をつけることになり、これらの病気に対して有効となる。
バシディオマイセテス（ Basidiomycetes ）からは、上記レンチナン、シゾフィラン及びグリホラン等多くの抗腫瘍、免疫増強物質が分離されているが、そのほとんどはβ－１，３グルカンで高分子の多糖体である。
【０００３】
【発明が解決しようとする課題】
本発明の目的は、原料品質の安定化、および収率向上の点から液体培養により製造したバシディオマイセテス（ Basidiomycetes ）培養物から抽出、分離精製を行い、免疫増強活性のより強い新規な多糖体を提供することにある。
【０００４】
【課題を解決するための手段】

本出願人は、植物組織原料を糸状菌の培養液中で資化する生理活性ヘミセルロースの製造法について既に特許出願しているが（特開平1-153701号）、生理活性物質の本質に関連した物質を単離すべく鋭意研究を続けた結果、今回植物組織原料の存在下でバシディオマイセテス（Basidiomycetes）を培養した液中から生理活性作用を有する多糖体物質（Active polysaccharide ；以下、ＡＰＳと略記することがある。）の単離精製することに成功し本発明に到達した。

本発明によるＡＰＳは、従来知られている、レンチナンやシゾフィラン等と異なり、専らα（１→４）結合Ｄ－グルコース単位から構成され、その２，３位の水酸基が約３０％アセチル化されている。この多糖体の分子量はゲルろ過カラムクロマトグラフィーで５００～ 10000、好ましくは、1000～7000であった。この多糖体は植物組織を培地原料とし、バシディオマイセテス（Basidiomycetes）を液体培養した培養液および菌糸体混合物から抽出、分離精製することができる。

【０００５】

以下に本発明を詳細に説明する。

本発明に用いるバシディオマイセテス（Basidiomycetes）としては、例として、レンチナス・エドデス（Lentinus edodes，シイタケ）、アガリクス・ビスポラス（Agaricus bisporus，マッシュルーム）、グリフォラ・フロンドサ（Grifola frondosa，マイタケ，）、フォリオタ・ナメコ（Pholiota nameko，ナメコ）、プリュロタス・オストレアタス（Pleurotus ostreatus，ヒラタケ）、フラムリナ・ヴェラチペス（Flammulina velutipes，エノキタケ）、カノデルマ・ルシダム（Canoderma lucidum，マンネンタケ）、アウリカラリア・アウリカラ（Auricularia auricula，キクラゲ）、ゴノデルマ・アパラナタム（Gonoderma applanatum，コフキサルノコシカケ）、コリオラス・ルシダム（Coriolus lucidum，カワラタケ）、グリフォラ・アンベラッタ（Grifola umbellata，チョレイマイタケ）、シゾフィラム・コミュネ（Schizophyllum commune，スエヒロタケ）、ヴォルヴァリエラ・ヴォルヴァセアエ（Volvariella volvaceae，フクロタケ）等があげられる。これらは単独でまたは数種類組み合わせて用いることができる。

【０００６】

バシディオマイセテス（Basidiomycetes）の培養方法は原則的には一般の微生物の培養方法に準ずればよいが、大量培養を可能にするため液体培地を用い、バシディオマイセテス（Basidiomycetes）が好気性菌であることから通気培養し、緩和な条件での撹拌培養が有利である。

培養用の培地原料としては、ふすま、稲わら、米ぬか、バガス、おがくず、大豆かす等の植物繊維、具体的には植物繊維を熱水で抽出した抽出液が用いられる。

炭素源としては、例えばブドウ糖、ショ糖、マルトース、サッカロース、上白糖、黒糖、糖密、廃密糖、マルツエキス等のいずれも利用することができる。窒素源としては、肉エキス、ペプトン、グルテンミール、大豆粉、乾燥酵母、酵母エキス、硫酸アンモニウム、酒石酸アンモニウム、尿素等が用いられる。その他、必要に応じてリン酸塩、食塩、マグネシウム塩、マンガン塩、カルシウム塩、鉄塩等の無機塩類や、イノシトール、ビタミンＢ1 塩酸塩、Ｌ－アスパラギン、ビオチン等のビタミン類などを適宜添加することができる。

培養条件は通常の中温菌の培養に準じればよく、ｐＨ２～６にて、１０～４５℃、好ましくは１５～３０℃の温度で、４～２０日間、好ましくは６～１２日間培養する。

【０００７】

以上の如くして得られた培養物および菌糸体の混合物にセルラーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼ、ペクチナーゼ、キチナーゼ等の酵素を加え、至適温度条件にて２～２０時間反応を行い菌体を破砕させ、その後加熱処理して酵素反応を失活させる。

該培養処理物から遠心分離等により菌糸体残渣を除去し、さらにヘキサン、エーテルまたはクロロホルム抽出、あるいはオクタデシルシラン系（ＯＤＳ（Ｃ18）等）、ポリスチレン系樹脂（ＭＣＩゲル CHP-20P(三菱化成社製）等）、ハイドロキシプロピルデキストラン樹脂（ Sephadex LH-20 （ファルマシア社製）等）などの逆相系担体を用いたカラムク

ロマトグラフィーを行い、水で溶出することにより、脂質類を除去させる。この水溶出画分を濃縮し、適当量の水に溶解させ、さらに、溶解させた水の３～５倍容のエタノール加えると白色沈澱ができる。遠心分離等で得たこの沈澱をイオン交換樹脂等の処理により塩類、タンパク質等を除去し、中性多糖画分を得る。この多糖画分をポリアクリルアミド樹脂（Bio-gel P-2 （バイオラド社）等）、デキストラン樹脂（Sephadex G-15 （ファルマシア社製）等）、セルロース系担体（Cellulofine （生化学工業社製）やToyopearl HW-40F（東洋曹達社製）等）によるゲルろ過クロマトグラフィーまたは限外ろ過膜等を用いることにより精製し、目的とする分子量５００～ 10000の多糖体が得られる。

【０００８】

本発明の多糖体は、生体応答修飾剤（ＢＲＭ）としての性質を示し、免疫増強剤または免疫賦活剤として用いることができる。

【０００９】

【実施例】

以下に実施例で本発明を詳しく説明する。

［製造例］

１）培養：

直径９０ｍｍのガラスシャーレを用い、固体培地（マルトース１％、ペプトン 0.2%、酒石酸アンモニウム 0.2%、寒天 1.5%）にて培養保存しておいたシイタケ（ Lentinus edodes）から菌を接種し、液体培地８リットル（米ぬか１５０ｇに８００ｍｌの水を加え１２０℃１５分間加熱した後、ろ過した抽出液にマルトース１０ｇ、ペプトン 2.5ｇ、酒石酸アンモニウム 2.0ｇを加え適当量の水を加える。ｐＨ 4.0）を入れた１０リットル培養瓶に植菌し、２０℃で７日間通気培養した。ついで、この培養液８リットルを同組成の液体培地３００リットルを入れた培養タンクに接種し２３℃で９日間通気下にて穏やかに撹拌し、培養を行った。

【００１０】

２）抽出、分離精製：

上記培養にて得られた培養液および菌糸体の混合物を９０℃に昇温し、アミラーゼ８ｇを加え3時間反応を行った後、６０℃まで冷却し、セルラーゼ１５ｇ、プロテアーゼ１５ｇを加え、５５℃で１０時間反応を行った。１２０℃、２０分間加熱して、酵素を失活させた。

該培養処理物から遠心分離により菌糸体残渣を除去し、減圧下で濃縮し、抽出物 7.5ｋｇを得た。この抽出物を、ＭＣＩゲルＣＨＰ－２０Ｐ（三菱化成社製）を担体としたカラムクロマトグラフィーにかけ、蒸留水で溶出される画分を濃縮した。この画分を蒸留水 1.5リットルに溶解させ、エタノール６リットルを添加することにより白色沈澱を得、遠心分離を行い上清液を除去した。同様に、この沈澱を蒸留水に溶解させ、４倍容のエタノールを加えた後、遠心分離を行い上清液を除去した。この操作を２回繰り返した。この沈澱物を陽イオン交換樹脂Dowex 50w x-8(H form) （ザ・ダウ・ケミカル・カンパニー社製）で処理し、吸着されずに水で溶出される部分を濃縮した。この分画をゲルろ過 Sephadex G-15（ファルマシア社製）を担体としたカラムクロマトグラフィーにかけ、ボイドボリュームで溶出される分画を集め、減圧下にて蒸発乾固させて、目的とする多糖体６００ｇを得た。

【００１１】

得られた物性は以下に示す通りであった。

（１）性状：白色の無晶形粉末で無味無臭、

（２）溶解性：アルコール、アセトン、ヘキサン、ベンゼン、酢酸エチル、四塩化炭素、クロロホルムおよびエーテルに不溶であり、水、ホルムアミドおよびジメチルスルホキシドに可溶、

（３）水溶液のｐＨ：中性、

（４）構成糖：本物質の１％水溶液に１Ｎ硫酸になるように硫酸を加え、１００℃で３時間加水分解を行ない、ついで炭酸バリウムを加えて中和した後の上清液の薄層クロマトグ

ラフィーを下記の４種類の展開溶媒で展開したところ、いずれもグルコース以外の糖スポットを検出しないので、本物質はグルコースのみを構成糖とする多糖であることが判明した。

（ｉ）　酢酸エチル：メタノール：酢酸：水＝６５：１５：１０：１０

(ii)　酢酸エチル：イソプロパノール：水＝６５：２３：１２

(iii)　ｎ－ブタノール：酢酸：水＝２：１：１

(iv)　ｎ－ブタノール：ピリジン：水＝６：４：３

（５）分子量：分子量既知のデキストランを標準物質として用い、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー（Sephadex G-25 およびSephadex G-50 、ファルマシア製）にかけた時の溶出曲線から５００～10000 と推定された。

（６）比旋光度：［α］$_D$（２４℃）＝＋１１２°～＋１１６°、

（７）呈色反応：本物質の硫酸による完全加水分解物は、アンスロン硫酸反応、フェノール硫酸反応およびクロモトロープ硫酸反応が陽性であり、ビューレット反応、ローリー・フォーリン反応、エルソン・モンガン反応およびヨード反応がそれぞれ陰性であった。

（８）融点：明確な融点を示さず。

（９）ＩＲ吸収スペクトル：1740ｃｍ-1付近にアセチル基に帰属される特徴的吸収を示す。

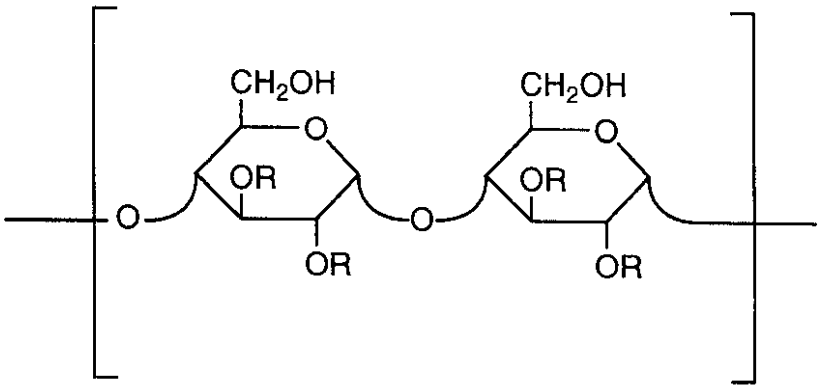
（10）^{13}ＣＮＭＲスペクトル：１７２、１００～１０４、７６～７８、７２～７４、７０、６８、６１、１８ｐｐｍ；

主シグナルとしてα－１，４グルカンおよびアセチル基に特徴的スペクトルを示す。また、Ｃ－１、Ｃ－３、Ｃ－４位のシグナルは、Ｃ－２、Ｃ－３位の一部（約３０％）アセチル化による化学シフトを示す。

これにより、得られた物質は下記式

【００１２】

【化２】



（式中、Ｒは水素原子またはアセチル基を表わす。）で示されるα（１→４）結合Ｄ－グルコース単位で構成され、その２，３位の水酸基が約３０％アセチル化されており、分子量が５００～ 10000である新規多糖体物質であることが確認された。

【００１３】

［試験例］

以下の試験により、新規多糖体物質が免疫増強剤（生体応答修飾剤（ＢＲＭ））としての性質を示すか調べた。

好中球集積作用：

好中球やマクロファージなどの食細胞は、生体の恒常性維持に重要な働きをしており、その機能は貪食をはじめ、抗癌・抗微生物作用、炎症や抗体産生など多彩である。これらの食細胞は異物の存在場所へ遊走し集積する性質がある。いいかえれば、異物性のあるもの

は食細胞を集積させることができる。免疫増強剤　（生体応答修飾剤（ＢＲＭ））はその典型であり、生体防御機構を支える食細胞を摂取局所に誘導、集積させることができる。この食細胞の量的増加は、生体防御機構の増強を引き起こす。すなわち、食細胞を局所に誘導する物質は免疫増強剤的（ＢＲＭ的）性状を有すると理解することができる。この現象を利用して、新規多糖体（ＡＰＳ）物質が生体防御機構を増強するか試験した。
マウスの腹腔に検体を接種し、６時間後の好中球集積反応を調べた。表１に示すように対照の生理食塩水を接種したマウスの腹腔細胞には好中球は数％以下と非常に少なかった。一方、制癌剤として臨床で用いられており、ＢＲＭの一種であるレンチナンの場合は、腹腔細胞に占める好中球の割合が６３％と浸潤を強く起こした。実施例により得られたＡＰＳ物質も強い好中球集積作用を有しており、既知のＢＲＭ以上の活性（７５％）を示した。

【００１４】
【表１】

表１

検　体	投与量	好中球集積率
生理食塩水	１ml／マウス	２％
レンチナン	１mg／マウス	６３％
APS物質	１mg／マウス	７５％

【００１５】
【発明の効果】
以上説明したように、植物組織を培地原料とし、バシディオマイセテス（Basidiomycetes）を液体培養した培養液および菌糸体混合物から抽出、分離精製することにより得られる本発明の新規多糖体物質はＢＲＭとしての性質を示し、免疫増強剤または免疫賦活剤として利用できる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7] FI
C12R 1:645) C12R 1:645

(58)調査した分野(Int.Cl.[7], DB名)
C08B 37/00
A61K 31/715
C12P 19/04
CA(STN)
BIOSIS(DIALOG)
REGISTRY(STN)