(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2006-320329
(P2006-320329A)
(43)公開日　平成18年11月30日(2006.11.30)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A23L 1/30	(2006.01)	A23L	1/30	Z	4B018
A61K 31/7012	(2006.01)	A61K	31/7012		4C086
A61K 31/688	(2006.01)	A61K	31/688		
A61P 43/00	(2006.01)	A61P	43/00	105	
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00		

審査請求 未請求　請求項の数 1　ＯＬ　（全 28 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2006-179404 (P2006-179404)
(22)出願日　平成18年6月29日 (2006.6.29)
(62)分割の表示　特願2006-28102 (P2006-28102)の分割
原出願日　平成17年2月21日 (2005.2.21)
(31)優先権主張番号　特願2004-43481 (P2004-43481)
(32)優先日　平成16年2月19日 (2004.2.19)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(71)出願人　000141510
株式会社紀文フードケミファ
東京都中央区入船２丁目１番１号
(71)出願人　504064836
熊沢　義雄
神奈川県川崎市中原区井田２－２５－４
(74)代理人　110000109
特許業務法人特許事務所サイクス
(72)発明者　熊沢　義雄
神奈川県川崎市中原区井田２－２５－４
(72)発明者　村田　克巳
東京都中央区入船２－１－１　株式会社紀文フードケミファ内

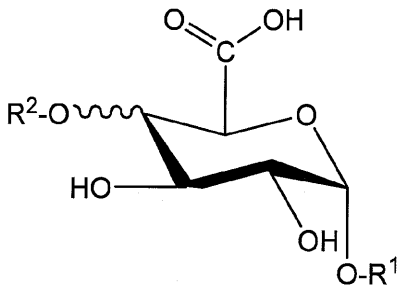
最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＮＫＴ細胞活性化用組成物、ＩＬ－４産生促進用組成物、ＩＦＮ－γ産生促進用組成物、樹状細胞活性化用組成物、ＩＬ－１２産生促進用組成物、ＩＬ－１０産生促進用組成物、ＮＫ細胞活性

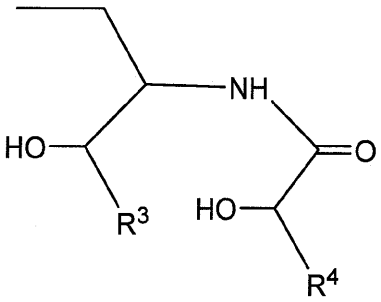
(57)【要約】
【課題】　スフィンゴ糖脂質とスフィンゴリン脂質を含むことを特徴とする食品を提供する。
【解決手段】
スフィンゴ糖脂質とスフィンゴリン脂質を含むことを特徴とする食品。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
スフィンゴ糖脂質とスフィンゴリン脂質を含むことを特徴とする食品。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本願発明は、特定の構造からなるスフィンゴ糖脂質を含むＮＫＴ細胞活性化用組成物、ＩＬ－４産生促進用組成物、ＩＦＮ－γ産生促進用組成物、樹状細胞活性化用組成物、ＩＬ－１２産生促進用組成物、ＩＬ－１０産生促進用組成物、ＮＫ細胞活性化用組成物、抗腫瘍作用組成物、抗アレルギー作用組成物、感染抵抗性増強用組成物、抗ウイルス作用組成物、ＩＬ－６産生促進用組成物、ＮＯ産出促進用組成物に関する。
【背景技術】
【０００２】
従来から、スフィンゴ糖脂質は動物細胞等の表層に存在している物質であり、認識機構に関与するものと考えられている。一方、グラム陰性細菌はその細胞表層に、リポ多糖、蛋白質及びリン酸よりなる外膜を持っており、これを介して外界とのやりとりを行っている。従って、外膜の主要成分であるリポ多糖は全てのグラム陰性菌に共通に存在し、必須なものであると考えられてきた。ところが、近年になって、好気性グラム陰性菌であって、以前シュードモナス パウシモビリス（Pseudomonas paucimobilis）と呼ばれていたスフィンゴモナス パウシモビリス（Sphingomonas paucimobilis）は、リポ多糖を全く保有しないこと及びこの菌は菌体脂質としてスフィンゴ糖脂質を含有していることが知られてきた。
そこで、本願出願人は、上記スフィンゴモナス パウシモビリスの菌体から糖脂質を単離し、さらに、その化学構造を解析し、同定することに成功している（特許文献１）。そして、本願出願人は、上記スフィンゴ糖脂質が優れた保湿効果と肌荒れ防止効果を有しているため化粧品として広く採用しうることを開示している（特許文献２）。加えて、本願出願人は、上記スフィンゴ糖脂質が優れた乳化作用を有することも明らかにしている（特許文献３）。
加えて、本願出願人は、他のスフィンゴモナス科の菌株から得られたスフィンゴ糖脂質についても化粧組成物及び医薬組成物として優れていることを開示している（特許文献４）。
【０００３】
一方、Ｔ細胞レセプター（ＴＣＲ）を発現するＮＫＴ細胞は、Ｌａｒｇｅ Ｇｒａｎｕｌａｒ Ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ（ＬＧＬ）様の形態を示すこと、ＩＬ－２Ｒ βを常時表出すること、パーフォリンを有する点などでは、ＮＫ細胞と類縁の細胞であるが、ＴＣＲを有するという点でＮＫ細胞とは決定的に異なる細胞群であることが報告されている（非特許文献１）。
かかる状況のもと、非特許文献２、非特許文献３には、マウスではＩＬ－１２により活性化されたＴ細胞の中でもＮＫ１．１を発現しているＮＫＴ細胞が、腫瘍の肝臓や肺への血行性転移抑制の重要なエフェクター細胞であることが報告されている。
以上のように、このＮＫＴ細胞は、近年、新しい細胞群として非常に注目を集めている細胞群である。
さらに特許文献５は、特定の構造を有するα－グリコシルセラミドがＮＫＴ細胞活性剤として有効であると述べている。しかしながら、より効果的なＮＫＴ細胞活性化剤が求められている。
【０００４】
【特許文献１】国際公開９２／１２９８６号公報
【特許文献２】特開平１１－４３４３７号公報
【特許文献３】特開２０００－５１６７６号公報
【特許文献４】特開２００２－０１０７９７号公報

【特許文献５】国際公開９８／４４９２８号公報
【非特許文献１】J. Immunol., 155, 2972 (1995)
【非特許文献２】J. Immunol., 154, 4333(1995)
【非特許文献３】J. Immunol., 88, 82(1996)
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【０００５】
本願発明の目的は、上記課題を解決することであって、より効果的なＮＫＴ細胞活性化用組成物を提供することを目的とする。さらに、スフィンゴ糖脂質を含むＩＬ－４産生促進用組成物、ＩＦＮ－γ産生促進用組成物、樹状細胞活性化用組成物、ＩＬ－１２産生促進用組成物、ＩＬ－１０産生促進用組成物、ＮＫ細胞活性化用組成物、抗腫瘍作用組成物、抗アレルギー作用組成物、感染抵抗性増強用組成物、抗ウイルス作用組成物、ＩＬ－６産生促進用組成物、ＮＯ産出促進用組成物を提供することを目的とする。
【課題を解決するための手段】
【０００６】
上記課題のもと、本願発明者は下記手段により上記課題を解決しうることを見出した。
（１）下記式（１）で表される構造を有するスフィンゴ糖脂質を含有することを特徴とするＮＫＴ細胞活性化用組成物。
式（１）
【化１】

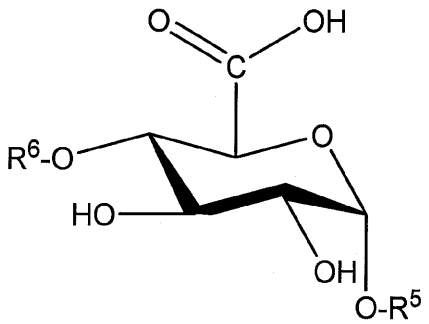


（式（１）中、R^1は、下記式（１－１）
式（１－１）
【化２】



（式（１－１）中、R^3は、アルキル基またはアルケニル基であり、R^4は、アルキル基である。）を表し、
R^2は、水素原子または、α－ガラクトース基、α－グルコース基、α－マンノース基、α－グルコサミン基若しくはβ－グルコサミン基またはこれらの組み合わせからなる基である。）
（２）前記式（１）は、下記式（３）で表される、（１）に記載のＮＫＴ細胞活性化用組成物。
式（３）

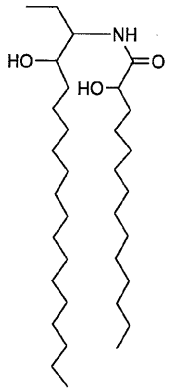
【化３】



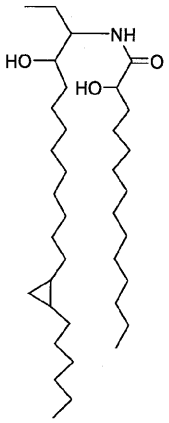
（式（３）中、R^5は、下記R^{51}、R^{52}、R^{53}、R^{54}、R^{55}、R^{56}、R^{57}、R^{58}、R^{59}、R^{70}、R^{71}、R^{72}、R^{73}、R^{74}、R^{75}、R^{76}、R^{77}又はR^{78}を表し、R^6は、水素原子、R^{62}、R^{63}、R^{64}又はR^{65}を表す。）

【化４】

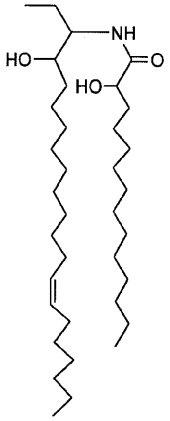
R^{51}：



R^{52}：

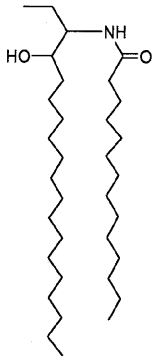


R^{53}：

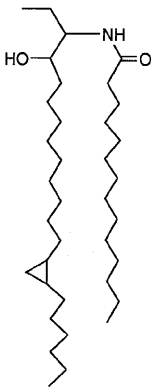


【化５】

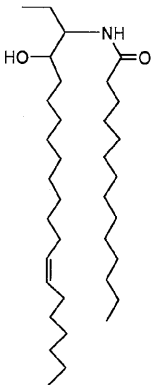
R^{54} :



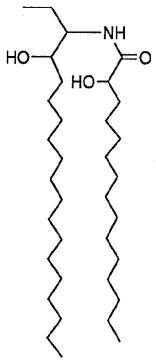
R^{55} :



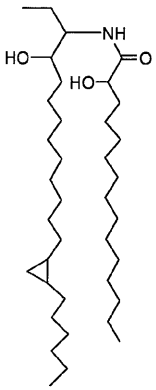
R^{56} :



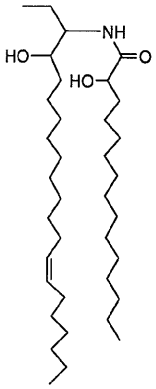
R^{57} :



R^{58} :

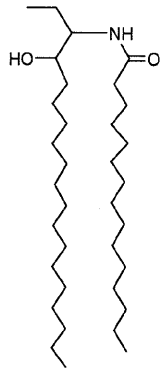


R^{59} :

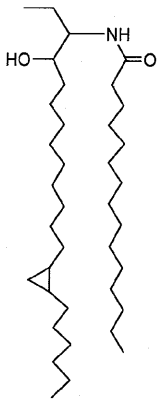


【化６】

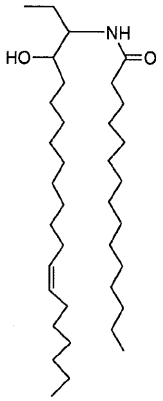
R^{70}：



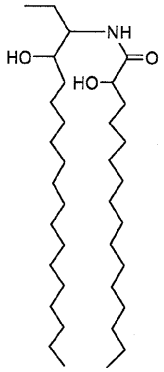
R^{71}：



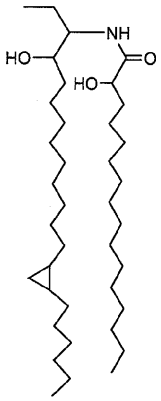
R^{72}：



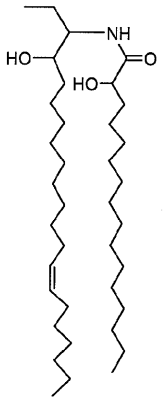
R^{73}：



R^{74}：

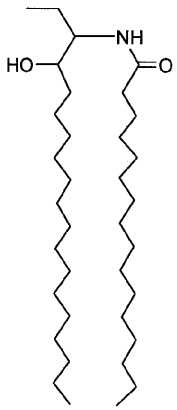


R^{75}：

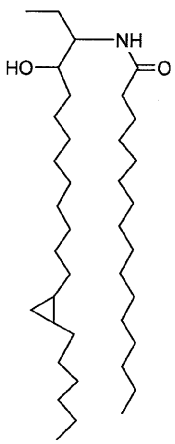


【化７】

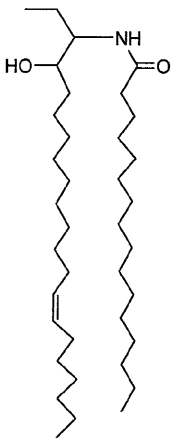
R^{76}：



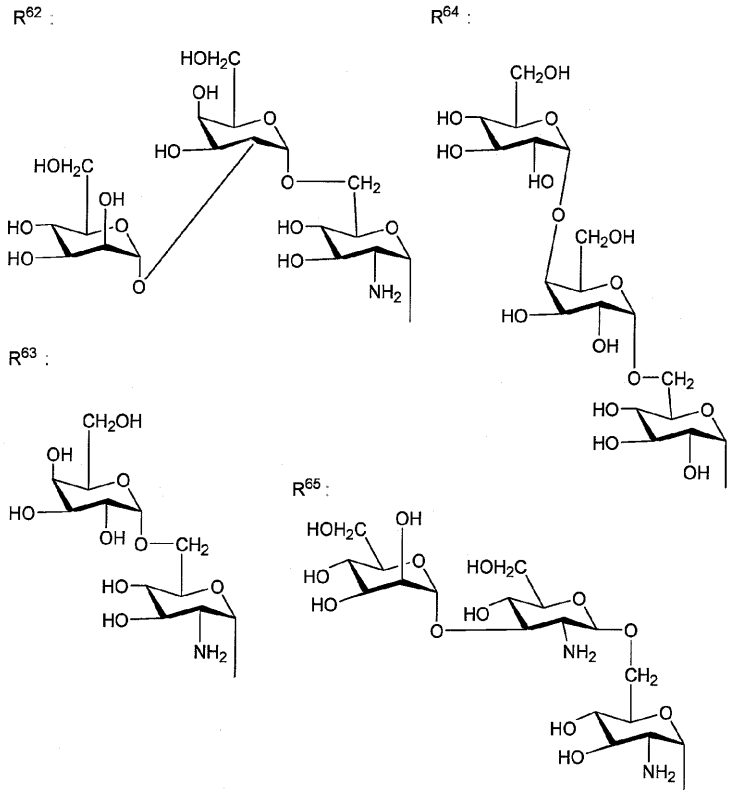
R^{77}：



R^{78}：



【化８】



【０００７】

（３）式（１）で表される構造を有するスフィンゴ糖脂質を含有することを特徴とするＩＬ－４産生促進用組成物。

（４）前記式（１）は、式（３）で表される、（３）に記載のＩＬ－４産生促進用組成物。

（５）式（１）で表される構造を有するスフィンゴ糖脂質を含有することを特徴とするＩＦＮ－γ産生促進用組成物。

（６）前記式（１）は、式（３）で表される、（５）に記載のＩＦＮ－γ産生促進用組成物。

（７）式（１）で表される構造を有するスフィンゴ糖脂質を含有することを特徴とする樹状細胞活性化用組成物。

（８）式（１）は、式（３）で表される、（７）に記載の樹状細胞活性化用組成物。

（９）式（１）で表される構造を有するスフィンゴ糖脂質を含有することを特徴とするＩＬ－１２産生促進用組成物。

（１０）式（１）は、式（３）で表される、（９）に記載のＩＬ－１２産生促進用組成物。

（１１）式（１）で表される構造を有するスフィンゴ糖脂質を含有することを特徴とするＩＬ－１０産生促進用組成物。

（１２）式（１）は、式（３）で表される、（１１）に記載のＩＬ－１０産生促進用組成物。

（１３）式（１）で表される構造を有するスフィンゴ糖脂質を含有することを特徴とするＮＫ細胞活性化用組成物。

（１４）式（１）は、式（３）で表される、（１３）に記載のＮＫ細胞活性化用組成物。

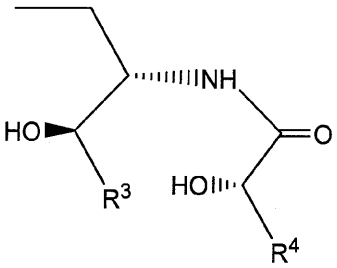
（１５）式（１）で表される構造を有するスフィンゴ糖脂質を含有することを特徴とする抗腫瘍作用組成物。

（１６）式（１）は、式（３）で表される、（１５）に記載の抗腫瘍作用組成物。

（１７）式（１）で表される構造を有するスフィンゴ糖脂質を含有することを特徴とする

抗アレルギー作用組成物。
（１８）式（１）は、式（３）で表される、（１７）に記載の抗アレルギー作用組成物。
（１９）式（１）で表される構造を有するスフィンゴ糖脂質を含有することを特徴とする感染抵抗性増強用組成物。
（２０）式（１）は、式（３）で表される、（１９）に記載の感染抵抗性増強用組成物。
（２１）式（１）で表される構造を有するスフィンゴ糖脂質を含有することを特徴とする抗ウイルス作用組成物。
（２２）式（１）は、式（３）で表される、（２１）に記載の抗ウイルス作用組成物。
（２３）式（１）で表される構造を有するスフィンゴ糖脂質を含有することを特徴とするＩＬ－６産生促進用組成物。
（２４）式（１）は、式（３）で表される、（２３）に記載のＩＬ－６産生促進用組成物。
（２５）式（１）で表される構造を有するスフィンゴ糖脂質を含有することを特徴とするＮＯ産出促進用組成物。
（２６）式（１）は、式（３）で表される、（２５）に記載のＮＯ産出促進用組成物。
【発明の効果】
【０００８】
本願発明の組成物を採用することにより、より効果的なＮＫＴ細胞活性化用組成物が得られた。また、ＩＬ－４産生促進用組成物、ＩＦＮ－γ産生促進用組成物、樹状細胞活性化用組成物、ＩＬ－１２産生促進用組成物、ＩＬ－１０産生促進用組成物、ＮＫ細胞活性化用組成物、抗腫瘍作用組成物、抗アレルギー作用組成物、感染抵抗性増強用組成物、抗ウイルス作用組成物、ＩＬ－６産生促進用組成物、ＮＯ産出促進用組成物が得られた。特に、これらを併せ持つという点でも本願発明の組成物は有意である。
さらに、本願発明の組成物は、毒性が低く、エンドトキシントレランスが誘導されないため、副作用が低いという観点からも有用である。
【発明を実施するための最良の形態】
【０００９】
以下において、本願発明の内容について詳細に説明する。尚、本願明細書において「～」とはその前後に記載される数値を下限値及び上限値として含む意味で使用される。また、本願明細書において、上記式（３）中、R^{51}、R^{52}、R^{53}、R^{54}、R^{55}、R^{56}、R^{57}、R^{58}、R^{59}、R^{70}、R^{71}、R^{72}、R^{73}、R^{74}、R^{75}、R^{76}、R^{77}、R^{78}を、「R^{51}～R^{78}」と示すことがある。
本願発明で採用するスフィンゴ糖脂質（以下、「ＧＳＬ」と呼ぶことがある）は、上記式（１）で表される構造を有するものである。ここで、式（１）のR^1に含まれるR^3のアルキル基は、シクロアルキル基を有していてもよく、該シクロアルキル基は、R^3のアルキル末端でもよいし、鎖の中に含まれていてもよい。好ましいシクロアルキル基としては、シクロプロパン基があげられる。R^3のアルキル基の炭素数としては、好ましくは１３～２３、より好ましくは１５、１６、１７、１８、１９、２０又は２１である。また、R^3のアルキル基及びアルケニル基は、好ましくは置換または無置換の直鎖のものである。また、アルケニル基に含まれる２重結合は、いずれの位置にあってもよい。
一方、R^4のアルキル基の炭素数は好ましくは１０～２０、より好ましくは１０、１１、１２、１３、１４、１５又は１６であり、さらに好ましくは、１０、１１、１２、１３、１４または１５である。さらに、R^4のアルキル基は、置換または無置換の直鎖アルキル基であることが好ましい。
【００１０】
さらに好ましくは、R^1が上記R^{51}～R^{78}のいずれかである。
また、式（１）のR^1は、下記式（１－２）の立体構造をとるものが好ましい。
式（１－２）

【化９】

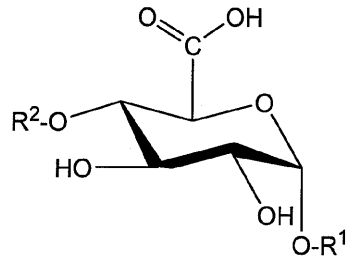


ここで、上記式（１－２）中のＲ[3]およびＲ[4]は、上記式（１－１）のＲ[3]およびＲ[4]と同義である。従って、上記Ｒ[51]～Ｒ[78]も上記立体構造をとるものがより好ましい。

また、上記式（１）は、好ましくは、式（２）、式（３）、式（４）又は式（５）で表されるものである。ここで、式（２）は、

式（２）

【化１０】



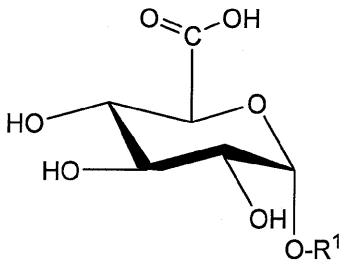
式（２）中、Ｒ[1]は及びＲ[2]は式（１）と同義であり、好ましい範囲も同義である。

また、式（３）において、好ましくは、Ｒ[5]が、Ｒ[51]～Ｒ[78]のいずれかであって、Ｒ[6]が水素原子の場合（以下、構造Ａということがある）、Ｒ[5]が、Ｒ[51]～Ｒ[78]のいずれかであって、Ｒ[6]がＲ[62]の場合（以下、構造Ｂということがある）、Ｒ[5]が、Ｒ[51]～Ｒ[78]のいずれかであって、Ｒ[6]がＲ[63]の場合（以下、構造Ｃということがある）、Ｒ[5]が、Ｒ[51]～Ｒ[78]のいずれかであって、Ｒ[6]がＲ[64]の場合（以下、構造Ｄということがある）、Ｒ[5]が、Ｒ[51]～Ｒ[78]のいずれかであって、Ｒ[6]がＲ[65]の場合（以下、構造Ｅということがある）である。さらにまた、構造Ａの中でも、Ｒ[5]が、Ｒ[51]、Ｒ[52]又はＲ[53]のものをより好ましく採用できる。

【００１１】

式（４）

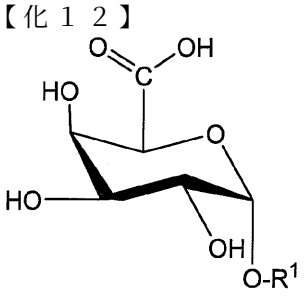
【化１１】



式（４）中、Ｒ[1]は、上記式（１）のＲ[1]と同義である。また、Ｒ[1]の好ましい範囲も上記とＲ[1]と同義である（式（４）で表される化合物の少なくとも一種を含むものを以下、構造ＡＡと呼ぶことがある）。

式（５）

【化１２】



式（５）中、R^1は、上記式（１）のR^1と同義である（以下、構造Ｆということがある）。また、R^1の好ましい範囲も上記R^1と同義である。

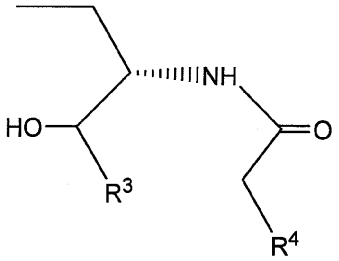
【００１２】

さらに、本願発明のスフィンゴ糖脂質は１種類のみを採用しても良いし、２種類以上を採用しても良い。２種以上を組み合わせて含有させる場合の各成分の比率は特に制限されない。例えば、上記構造Ａに該当する３種類の化合物のうち１種類以上を含むもの、上記構造Ｂに該当する３種類の化合物のうち１種類以上を含むもの、上記構造Ｆに該当する化合物を少なくとも１種以上含むもの等を挙げることができる。この中でも好ましくは、R^1が、R^{51}、R^{52}又はR^{53}のいずれかの場合である（以下、構造ＦＡと呼ぶことがある）。

本願発明で開示する組成物には、上記に加えて、上記式（１）において、式（１）中の式（１－１）が式（１－１－１）の立体構造で表されるものも含まれていてもよい。

式（１－１－１）

【化１３】

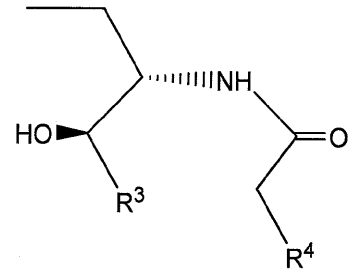


式（１－１－１）中、R^3及びR^4は、それぞれ、上記式（１－１）と同義であり、好ましい範囲も同義である。

式（１－１－１）は、さらに好ましくは、下記式（１－１－２）で表される立体構造のものである。

式（１－１－２）

【化１４】



式（１－１－２）中、R^3及びR^4は、それぞれ、上記式（１－１）と同義であり、好ましい範囲も同義である。

【００１３】

式（１）で表されるスフィンゴ糖脂質は、スフィンゴ糖脂質を有する菌体から抽出することによって得ることができる。例えば、国際公開ＷＯ９２／１２９８６号パンフレット

や特開２００２－１０７９７号公報に記載の方法を採用することができる。スフィンゴ糖脂質は、スフィンゴモナス科に属する菌体中に含まれていることから、スフィンゴモナス科に属する菌のいずれかを用いて抽出すれば式（１）で表されるスフィンゴ糖脂質を得ることができる。ここで、スフィンゴモナス科に属する菌とは、従来から一般的に「スフィンゴモナス属」（Sphingomonas）に属する菌と言われているものの他、該菌と実質的に同じ科に属するものとして分類される菌を含む趣旨である。本願発明で採用できる菌株としては、例えば、Microbiol. Immunol.,2000,44,563-575に示されるいずれの菌株も採用することができる。

【００１４】

式（１）で表されるスフィンゴ糖脂質は、アセトンに対して不溶性であることから、抽出操作を行なう前に菌体をアセトンで洗浄しておくのが好ましい。式（１）のスフィンゴ糖脂質の抽出に用いる溶媒は、メタノールなどのアルコール系溶媒またはアルコール系溶媒とクロロホルムなどの極性溶媒の混合溶媒にするのが収率の点で好ましい。ただし、スフィンゴ糖脂質溶解性の溶媒であれば、これらの以外の溶媒を用いても構わない。

スフィンゴ糖脂質の混合物が得られた場合は、本技術分野で周知の方法にしたがって各成分を分離することができる。たとえば、クロマトグラフィー法によって、スフィンゴ糖脂質は完全に分離することができる。溶出液としてクロロホルム／メタノール混合溶液を用いた場合は、構造Ａ、構造Ｆ、構造Ｃ、構造Ｂあるいは構造Ｄあるいは構造Ｅの順に各スフィンゴ糖脂質が溶出し、構造Ｂ、Ｄ、Ｅは、一般的に異なる菌株が産生するため、極めて簡便に分離することができる。充填剤、溶出液、溶出速度、圧力、温度などのクロマトグラフィーの分離条件については、適宜調節することができる。また、スフィンゴ糖脂質の混合物に含まれる特定の物質のみに選択的に反応する試薬を作用させて該物質の誘導体を調製し、その誘導体の化学的性質または物理的性質を利用して分離を行なうこともできる。菌として、スフィンゴモナスパウシモビリス（Sphingomonas paucimobilis）を用いた場合には、一般に構造Ａのスフィンゴ糖脂質と構造Ｂのスフィンゴ糖脂質が得られる。また、スフィンゴモナスカプスラータ（Sphingomonas capsulata）（新名：Novosphingobium capsulatum）を用いた場合には、一般に構造Ａのスフィンゴ糖脂質と構造Ｃのスフィンゴ糖脂質が得られる。さらに、スフィンゴモナスアドハエシバ(Sphingomonas adhaesiva)を用いた場合には、一般に構造Ａのスフィンゴ糖脂質と構造Ｄのスフィンゴ糖脂質が得られる。加えて、スフィンゴモナススピーシーズＭＫ３４６(Sphingomonas sp. MK346)を用いた場合には、一般に構造Ａのスフィンゴ糖脂質と構造Ｅのスフィンゴ糖脂質が得られる。また、スフィンゴモナスウィッティチアィ（Sphingomonas wittichii）、スフィンゴモナスマクロゴルタビダス（Sphingomonas macrogoltabidus）（新名：Sphingopyxis macrogoltabida）、スフィンゴモナステラエ（Sphingomonas terrae）又はスフィンゴモナスヤノイクヤエ（Sphingomonas yanoikuyae）(新名：Sphingobium yanoikuyae)を用いた場合には、一般に構造ＡＡ（例えば、構造Ａ）のスフィンゴ糖脂質と構造Ｆ（例えば、構造ＦＡ）のスフィンゴ糖脂質が得られる。したがって、これらの情報に基づいて菌を選択すれば、目的とするスフィンゴ糖脂質を効率よく得ることができる。

式（１）で表されるスフィンゴ糖脂質は、周知の合成法を組み合わせることによって合成することもできる。たとえば、糖とスフィンゴシン部分をあらかじめ合成するか、菌体から抽出しておき、アミド結合を形成することによって式（１）で表される各スフィンゴ糖脂質を調製することができる。

【００１５】

本願発明のＮＫＴ細胞とは、例えば、ヒトＶα２４$^{+}$ＮＫＴ細胞及びマウスＶα１４$^{+}$ＮＫＴ細胞を含む趣旨である。また、ＮＫＴ細胞活性化とは細胞傷害活性の増強、サイトカイン産生増強及びＮＫＴ細胞の増殖促進を含む意図である。さらに、本願発明のＮＫＴ細胞活性化用組成物は、結果として、ＩＬ－４の産生及びＩＦＮ－γの産生を促進する。従って、ＩＬ－４又はＩＦＮ－γによって促進される各種機能の促進用組成物としても使用することができる。ＮＫＴ細胞活性化用組成物としては、本願発明で採用するＧＳＬのうち、ガラクツロン酸型のスフィンゴ糖脂質な構造を有するものが特に好ましい。

ＩＬ－４によって促進されるものの例としては、Ｔｈ２の誘導、抗体のクラススイッチの誘導が挙げられ、ＩＦＮ－γによって促進されるものの例としては、ＩＦＮ－γによって促進されるＴｈ１の誘導、マクロファージ活性化作用が挙げられる。

ここで、サイトカインの増強として、上記のほか、各種ＩＬ、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－β、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）、リンホトキシン、造血因子のコロニー刺激因子（ＣＳＦ）、エリスロポエチン、造血因子の上皮増殖因子（ＥＧＦ）、繊維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）産生又は活性化促進作用組成物としても利用することができる。さらに、本願発明で開示した上記スフィンゴ糖脂質は、上記以外の免疫活性化組成物や、がん細胞のアポトーシス誘導化組成物、ＮＦ－ｋａｐｐａＢ活性化促進、ＩｋａｐｐａＢの分解、ｐ３８のリン酸化、Ａｋｔのリン酸化等を目的とした、産生又は活性化促進用組成物としても利用できる。

本願発明でいう、樹状細胞活性化とは、例えば、抗原提示能亢進を含む意図である。

本願発明のＧＳＬはＩＬ－１２の産生及びＩＬ－１０の産生を促進する。従って、ＩＬ－１２の産生及びＩＬ－１０の産生によって促進される各種機能の促進用組成物としても使用することができる。特に、本願発明のＩＬ－１２の産生及び／または
ＩＬ－１０の産生組成物としては、グルクロン酸型のスフィンゴ糖脂質を用いることが好ましい。

【００１６】

本願発明でいう、ＮＫ細胞活性化とは、例えば、感染細胞傷害を含む意図である。ＮＫ細胞活性化用組成物としては、本願発明で採用するＧＳＬのうち、単糖型のスフィンゴ糖脂質であるものが特に好ましい。

本願発明でいう、抗腫瘍作用とは、例えば、ヘルパーＴ細胞およびキラーＴ細胞活性化を含む意図である。抗腫瘍作用組成物としては、本願発明で採用するＧＳＬのうち、四糖型のスフィンゴ糖脂質であるものが特に好ましい。

本願発明でいう、抗アレルギー作用とは、例えば、好酸球浸潤抑制、肥満細胞抑制作用、ＩｇＥ産生抑制、化学伝達物質放出抑制を含む意図である。

さらに、本願発明の抗アレルギー作用組成物は、副作用が弱い傾向にあり、花粉症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎等への利用に特に有用である。

本願発明でいう、感染抵抗性増強作用とは、例えば、ヘルパーＴ細胞およびキラーＴ細胞活性化を含む意図である。本願発明の感染抵抗性増強作用組成物は、サルモネラ感染症、結核への利用に特に有用である。感染抵抗性増強作用組成物としては、本願発明で採用するＧＳＬのうち、四糖型のスフィンゴ糖脂質であるものが特に好ましい。

本願発明でいう、抗ウイルス作用とは、例えば、Ｉ型インターフェロン産生増強、ヘルパーＴ細胞およびキラーＴ細胞活性化を含む意図である。本願発明の抗ウイルス作用組成物は、サイトメガロウイルス感染症、ヘルペスウイルス感染症などヘルペスウイルス科感染症への利用に特に有用である。

【００１７】

また、本願発明の組成物を医薬品若しくは医薬部外品やその有効成分として利用する場合、好ましくは、当業者に周知の方法によって製造可能な医薬組成物として投与することができる。医薬用組成物としては、例えば、錠剤、カプセル剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、液剤、及びシロップ剤等をあげることができる。上記の医薬組成物は、薬理学的、製剤学的に許容し得る添加物を加えて製造することができる。薬理学的、製剤学的に許容し得る添加物の例としては、例えば、賦形剤、崩壊剤ないし崩壊補助剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、色素、希釈剤、基剤、溶解剤ないし崩壊補助剤、等張化剤、ｐＨ調節剤、安定化剤、噴射剤、及び粘着剤等をあげることができる。上記の医薬組成物には、本願発明の趣旨を逸脱しない範囲内で、他の効能を有する成分を１種又は２種以上配合してもよい。本願発明の医薬の投与量は特に限定されず、有効成分の種類などに応じて適宜選択することができ、さらに患者の体重や年齢、疾患の種類や症状、投与経路など通常考慮すべき種々の要因に応じて、適宜増減することができる。一般的には、成人一日あたり、０．００１～１００ｍｇ好ましくは０．０１～１０ｍｇの範囲で用いることができる。また、投

与方法も特に限定されず、注射剤、輸液剤等として、静脈注射により投与してもよいし、経口的に投与してもよい。

【実施例】

【００１８】

以下に実施例を挙げて本願発明をさらに具体的に説明する。以下の実施例に示す材料、使用量、割合、処理内容、処理手順等は、本願発明の趣旨を逸脱しない限り、適宜、変更することができる。従って、本願発明の範囲は以下に示す具体例に限定されるものではない。

【００１９】

本実施例においては、ＧＳＬとして、スフィンゴモナスパウシモビリスから産生された構造Ａのもの（ＧＳＬ－１）、スフィンゴモナスパウシモビリスから産生された構造Ｂのもの（ＧＳＬ－２）、スフィンゴモナスカプスラータから産生された構造Ｃのもの（ＧＳＬ－３）、スフィンゴモナスアドハエシバから産生された構造Ｄのもの（ＧＳＬ－４）、スフィンゴモナススピーシーズＭＫ３４６から産生された構造Ｅのもの（ＧＳＬ－５）、スフィンゴモナスヤノイクヤエから産生された構造ＡＡのもの（ＧＳＬ－６）、スフィンゴモナスヤノイクヤエから産生された構造Ｆのもの（ＧＳＬ－７）、スフィンゴモナスウィッティチアィから産生された構造ＡＡのもの（ＧＳＬ－８）、スフィンゴモナスウィッティチアィから産生された構造Ｆのもの（ＧＳＬ－９）、スフィンゴモナスマクロゴルタビダスから産生された構造ＡＡのもの（ＧＳＬ－１０）、スフィンゴモナスマクロゴルタビダスから産生された構造Ｆのもの（ＧＳＬ－１１）、スフィンゴモナステラエから産生された構造ＡＡのもの（ＧＳＬ－１２）、スフィンゴモナステラエから産生された構造Ｆのもの（ＧＳＬ－１３）を採用した。これらは、国際公開ＷＯ９２／１２９８６号公報、特開２００２－０１０７９７号公報に記載の方法に従って分離した。

【００２０】

実施例１　ＮＫＴ細胞活性化作用の測定

動物：

試験用マウスとして、Ｃ５７ＢＬ／１０ＳｃＳｎマウス（以下、正常マウスという。）及びＣ５７ＢＬ／１０ＳｃＣｒマウス（ＴＬＲ４欠損ＩＬ－１２Ｒβ２鎖変異マウス）（以下、ＴＬＲ４欠損マウスという。）（マックスプランク免疫生物学研究所、ドイツ、フライブルグ市）（７週齢、雌）を使用した。ＧＳＬ－１およびＧＳＬ－２はＴＬＲ４を介して正常マウスのマクロファージを活性化し、ＩＬ－１２産生を誘導する。ＴＬＲ４欠損マウスは、ＩＬ－１２受容体のβ鎖に変異があり、ＩＬ－１２が作用しないものである。ＩＬ－１２は免疫系を強力に活性化する物質であるが、本実施例のＴＬＲ４欠損マウスを用いると本願発明で採用するスフィンゴ糖脂質のＮＫＴ細胞に対する活性化促進をＩＬ－１２の作用を受けない状態で、より明確にすることができる。

サンプルの作成：

各ＧＳＬのいずれか１０μｇを、正常マウス及びＴＬＲ４欠損マウスに投与した。投与は、尾静脈内投与により行った。そして、対照として生理食塩水を投与したもの（コントロール）、投与後１日経過時（１日目）及び２日経過時（２日目）の血清及び肝臓を採取した。

【００２１】

肝臓内白血球の分離：

採取した肝臓を２枚のスライドガラスを用いてつぶした。細胞浮遊液を５００ｒｐｍ、１分間遠心した。得られた上清を１２００ｒｐｍ（３００ｇ）、５分間遠心した。その沈渣を３０％のパーコール（ファルマシア社製）に懸濁し、さらに、これを、６７．５％パーコールの上に重層して、２０℃、２０００ｒｐｍ（８００ｇ）、３０分間遠心し、３０％と６７．５％パーコールの境界に白血球を集積させ回収した。得られた細胞をハンクス液で３回洗浄して肝臓内白血球を得た。

【００２２】

フローサイトメトリー：

ＦｃＲを介した蛍光標識抗体の非特異的結合を防ぐため、抗ＦｃγＲ（２．４Ｇ２）を用いた。抗体は、ＰＥ標識抗ＮＫ１．１抗体（日本ベクトン・ディッキソン（株）製、ＰＫ１３６）及びビオチン標識抗ＴＣＲαβ抗体（日本ベクトン・ディッキソン（株）製、Ｈ５７－５９７）を用いた。細胞に各抗体を添加した後、４℃、暗所で３０分反応させた。尚、ビオチン標識抗体を用いた細胞は、Ｃｙ－ｃｈｒｏｍｅ結合ストレプトアビジン（日本ベクトン・ディッキソン株式会製、５５４０６２）を４℃、暗所で３０分反応させた。上記抗体、Ｃｙ－ｃｈｒｏｍｅ結合ストレプトアビジンの染色及び細胞の洗浄には０．１％NaN_3含有１％血清アルブミンを用いた。細胞は染色後、１％パラホルムアルデヒド含有ＰＢＳ（-）で固定した。測定は HYPERLINK "http://cent-scorpio.asahikawa-med.ac.jp/central/image/biochemistry/fcm.html" 自動細胞解析分離装置（ベックマンコールター（株）、COULTER EPICS ELITE ESP)で行った。また、ＰＥ標識抗ＮＫ１．１抗体を、ＦＩＴＣ標識抗ＣＤ１１ａ抗体（日本ベクトン・ディッキソン株式会社製、Ｍ１７／４）に代えて同様に行った。

上記ＰＥ標識抗ＮＫ１．１抗体（又はＣＤ１１ａ）を用いた方法によって得られたフローサイトメトリーの結果を図１～図６に示した。ここで、図１～図４は、それぞれ、正常マウスを用いた場合で、順に、ＧＳＬ－１、２、６、７を投与した場合を、図５及び図６は、それぞれ、ＴＬＲ４欠損マウスを用いた場合で、順に、ＧＳＬ－１、２を投与した場合を示した。

ここで、図中に示した数字は、ＮＫ１．１（又はＣＤ１１ａ）とＴＣＲαβの両方を発現した細胞の割合（％）を示している。尚、ＮＫ１．１（又はＣＤ１１ａ）とＴＣＲαβの両方を発現したものは、ＮＫＴ細胞である。

また、日を変えて、上記と同様に、ＰＥ標識抗ＮＫ１．１抗体を用いた方法によって得られた正常マウスのフローサイトメトリーの結果（ＮＫＴ細胞の割合）を図７に示す。ここで、図中に示した数字は両方を発現した細胞の割合（％）を示し、図中の米印は、ｔ検定により統計的にコントロールと有意な差が認められたものである。

【００２３】

ＩＦＮ－γの存在の確認：

ＧＳＬ－１又はＧＳＬ－２を添加した場合の血中のＩＦＮ－γ量について検討した。正常マウス及びＴＬＲ４欠損マウスに、ＧＳＬ－１又はＧＳＬ－２を上記と同様の方法により投与し、血清中に含まれるＩＦＮ－γを解析した。

ＩＦＮ－γは、捕捉抗体として精製抗ＩＦＮ－γ抗体（Ｒ４－６Ａ２）（日本ベクトン・ディッキソン株式会製）と、検出抗体としてビオチン結合抗ＩＦＮ－γ抗体（ＡＮ－１８）（日本ベクトン・ディッキソン株式会製）を用いたサンドイッチＥＬＩＳＡ法で行った。ビオチン結合抗体に続く反応でアルカリ性フォスファターゼ標識ストレプトアビジン（ＺＹＭＥＤ製、４３－４８２２）を結合させ、パラニトロフェニルリン酸塩（ＳＩＧＭＡ製、Ｎ－４６４５）を基質として発色させた。マイクロプレートリーダー（日本バイオラドラボラトリーズ株式会社、Ｍｏｄｅｌ５５０）で４０５ｎｍと対照として５４０ｎｍの波長の吸光度を観察した。この結果、正常マウスにおいて、図８に示すように、ＩＦＮ－γの産生が促進されていることが認められた。尚、ＴＬＲ４欠損マウスの場合、ＩＬ－１２に反応しないため、ＧＳＬ－１又はＧＳＬ－２を投与してもＩＦＮ－γは検出されなかった。

【００２４】

ＩＦＮ－γ産生ＮＫＴ細胞のフローサイトメトリー：

ＧＳＬ－１又はＧＳＬ－２を投与した場合の正常マウスについて、上記と同様の方法でフローサイトメトリーを行い、（ＰＥ標識抗ＮＫ１．１抗体、ビオチン標識抗ＴＣＲαβ抗体、ＦＩＴＣ標識抗ＩＦＮ－γ抗体（日本ベクトンディッキンソン株式会社製、５５４４１０）にて染色して、ＩＦＮ－γ産生ＮＫＴ細胞の割合を測定した。その結果を図９に示す。ここで、図中の数字は、ＮＫ１．１とＴＣＲαβの両方を発現した、ＩＦＮ－γ産生ＮＫＴ細胞の割合に相当する。

【００２５】

ＩＬ－４の量の測定：
ＧＳＬ－１又はＧＳＬ－２を添加した場合の血中のＩＬ－４の量が増加するかについて検討した。上記正常マウス及びＴＬＲ４欠損マウスに、ＧＳＬ－１又はＧＳＬ－２を上記と同様の方法により投与し、血清中に含まれるＩＬ－４を解析した。
ＩＬ－４の測定は、マウスＩＬ－４　ＢＤ　Ｏｐｔｉ　ＥＩＡ　ＥＬＩＳＡ　Ｓｅｔ（日本ベクトン・ディッキソン株式会社製、５５５２３２）を用いて該マニュアルに従って測定した。結果、いずれのマウスについても、ＩＬ－４の増加が認められた。特に、図１０に示すとおり、ＴＬＲ４欠損マウスにおいて、ＩＬ－４の顕著な産生促進が認められた。
ＧＳＬ－１又はＧＳＬ－２を添加した場合、上記フローサイトメトリーにおいて、ＮＫ１．１とＴＣＲαβの両方に発現したものの割合の増加が認められたこと、及び、これらの増加が大きいものについては、ＩＦＮ－γとＩＬ－４の両方が産生されていることが確認できたことから、ＧＳＬ－１又はＧＳＬ－２がＮＫＴ細胞の活性化に有効であることが認められた。
【００２６】
実施例２　ＩＦＮ－γ産生促進作用
試験用マウスとして、Ｃ５７ＢＬ／６マウスを用いた。各ＧＳＬは、各ＧＳＬは、２０％ ペンタジオールで最終濃度が１０ ｍｇ／ｍｌとなるように溶解した後、生理食塩水で希釈した溶液（以下、「Ｐ」と示すことがある。）、または、０．５％ペンタンジオール、０．５％Ｎ－ラウロイルサルコシン、９．８％ショ糖溶液で最終濃度が５ｍｇ／ｍｌとなるように溶解した後、生理食塩水で希釈した溶液（以下、「Ｐ＋Ｓ」と示すことがある。）を用いた。各ＧＳＬは、マウス尾静脈から投与した（投与量は１００μｇ）。対照として溶媒のみを投与した（コントロール）。投与１６時間後に摘出した肝臓から細胞浮遊液を調製し、４５％パーコールと６７．５％パーコールを用いた比重遠心法により肝臓内白血球を得た。白血球は、抗ＦｃγＲ抗体（２．４Ｇ２)で処理した後、ＦＩＴＣ標識抗ＩＦＮ－γ抗体、ＰＥ標識抗ＮＫ１．１抗体、ビオチン標識抗ＴＣＲαβ抗体を用いて処理した。白血球に抗体を添加した後、４℃、暗所で３０分間反応させた。ビオチン標識抗体を用いた白血球は、Ｃｙ－ｃｈｒｏｍｅ結合ストレプトアビジンを４ ℃、暗所で３０分反応させた。抗体およびＣＹ－ｃｈｒｏｍｅ結合ストレプトアビジンの染色および細胞の洗浄には、０．１％ NaN_3含有１％血清アルブミンを用いた。細胞は染色後、１％パラホルムアルデヒド含有リン酸緩衝生理食塩（ＰＢＳ（－））で固定した。測定は、上記に記載のＥＰＩＣＳ ＥＬＩＴＥ ＥＳＰで行った。その結果を、表１に示した。ここで、表１は、ＩＦＮ-γ産生ＮＫＴ細胞の割合（％）を示している。なお、本実験は、実験１、２、３の３回に分けて行なった。
【００２７】

【表１】

	試料	ＩＦＮ-γ産生ＮＫＴ細胞の割合（%）（平均値±標準偏差）
実験１	コントロール	2.0±0.2
	GSL-1	3.6±0.3
	GSL-2	2.6±0.3
	GSL-6	4.3±1.4
	GSL-7	14.0±1.4
実験２	コントロール	3.7±0.5
	GSL-3	4.6±0.6
	GSL-4	5.2±1.0
	GSL-5	4.2±0.3
実験３	コントロール	2.5±0.5
	GSL-8	4.7±0.8
	GSL-9	5.4±1.2
	GSL-10	3.8±0.4
	GSL-11	5.7±0.5
	GSL-12	3.2±0.2
	GSL-13	7.3±3.0

【００２８】
表１から明らかなとおり、ＩＦＮ-γ産生促進作用が認められた。特に、ＧＳＬ－１、２、４、６～１１および１３についてより効果的であり、ＧＳＬ－６～９、１１、１３についてさらに効果的であり、ＧＳＬ－７について顕著に効果的であった。
【００２９】
実施例３　樹状細胞活性化作用
樹状細胞活性化作用について確認した。マウスは、Ｃ５７ＢＬ／６マウス（７週令、メス）を用いた。各ＧＳＬは、上記実施例２と同様の方法で溶解した。各試料は、マウス尾静脈から投与した（投与量は１００μｇ）。投与１２時間後に摘出した脾臓から細胞浮遊液を調製した。白血球は、抗ＦｃγＲ抗体（２．４Ｇ２)で処理した後、ＰＥ標識抗ＣＤ１１ｃ抗体（日本ベクトンディッキンソン株式会社製）、ビオチン標識抗ＣＤ４０（日本ベクトンディッキンソン株式会社製）、ビオチン標識抗ＣＤ８０抗体（日本ベクトンディッキンソン株式会社製）、ビオチン標識抗ＣＤ８６抗体（日本ベクトンディッキンソン株式会社製）を用いた。細胞に抗体を添加した後、４℃、暗所で３０分間反応させた。ビオチン標識抗体を用いた細胞は、Ｃｙ－ｃｈｒｏｍｅ結合ストレプトアビジンを４℃、暗所で３０分反応させた。抗体またはＣｙ－ｃｈｒｏｍｅ結合ストレプトアビジンの染色および細胞の洗浄には０．１％ NaN_3含有１％血清アルブミンを用いた。細胞は染色後、１％パラホルムアルデヒド含有ＰＢＳ（－)で固定した。測定はＥＰＩＣＳ ＥＬＩＴＥ ＥＳＰで行った。ＣＤ１１ｃ陽性細胞中のＣＤ４０、ＣＤ８０およびＣＤ８６陽性細胞の割合（%）を表２に示した。
【００３０】

【表２】

試料	ＣＤ４０（%）（平均値±標準偏差）	ＣＤ８０（%）（平均値±標準偏差）	ＣＤ８６（%）（平均値±標準偏差）
コントロール	51.2±0.6	72.8±1.3	26.3±1.8
GSL-1	67.8±1.9	81.9±1.2	45.5±0.9
GSL-2	65.0±9.8	76.2±1.8	31.5±1.7
GSL-3	58.1±2.9	79.9±1.3	35.4±2.7
GSL-4	63.3±0.1	80.6±2.6	35.0±0.2
GSL-5	59.8±0.7	77.4±1.1	42.7±17.7
GSL-6	65.4±2.5	81.0±0.4	28.7±3.0
GSL-7	78.1±3.5	85.4±1.7	61.3±22.5
GSL-8	73.8±4.2	83.9±1.0	56.6±24.6
GSL-9	76.4±1.1	84.9±1.3	48.7±6.1
GSL-10	64.3±4.6	78.9±0.4	55.6±30.4
GSL-11	71.9±2.4	80.9±1.2	55.4±19.8
GSL-12	64.1±2.1	81.3±2.0	34.2±51.2
GSL-13	77.3±0.8	85.2±1.3	46.5±1.7

【００３１】

表２から明らかなとおり、樹状細胞活性化作用が認められた。特に、ＧＳＬ－１、２、４、６～１３についてより効果的であり、ＧＳＬ－７～９、１１、１３について顕著に効果的であった。

【００３２】

実施例４　ＩＬ－１２の誘導およびＩＬ－１０の誘導

実施例１で採用した正常マウスの骨髄細胞を、ＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－４存在下で８日間培養し、骨髄由来の樹状細胞を得た。下記表に示した各ＧＳＬは、エタノール：ドデカン（９８:２）で０．５ｍｇ／ｍｌで溶後し、９６穴プレートに２０μｌずつ分注し、溶媒を揮発させ各ＧＳＬをプレートに固相化した。対照群としてエタノール：ドデカン（９８:２）のみを分注し揮発させた。ＧＳＬを固相化したプレートに骨髄由来の樹状細胞を加え、２４時間後の培養上清を回収した。培養上清は、ＥＬＩＳＡ法によりＩＬ－１２ｐ７０の量およびＩＬ－１０の量をＢＤ ＯｐｔＥＩＡ Ｋｉｔを用いて測定した。ＩＬ－１２ｐ７０の量の測定結果を表３に、ＩＬ－１０の量の測定結果を表４に示した。

【００３３】

【表３】

試料	IL-12p70 (pg/ml)
対照群	検出限界以下
GSL-1	79.3
GSL-2	103.4
GSL-4	231.2
GSL-6	296.6
GSL-8	454.0
GSL-10	547.0
GSL-12	868.6

【表４】

試料	IL-10 (pg/ml)
対照群	129.0
GSL-4	147.4
GSL-10	431.1
GSL-12	583.2
GSL-13	155.9

【００３４】

上記表から明らかなとおり、ＩＬ－１２ｐ７０の誘導およびＩＬ－１０の誘導が認められた。特に、ＩＬ－１２ｐ７０の誘導については、ＧＳＬ－２、４、６、８、１０、１２についてさらに効果的であり、ＧＳＬ－６、８、１０、１２について顕著に効果的であった。また、ＩＬ－１０の誘導については、ＧＳＬ－１０および１２について顕著に効果的であった。

【００３５】

実施例５　ＮＫ細胞活性化作用

マウスは、Ｃ５７ＢＬ／６マウス（７週令、メス）を用いた。各ＧＳＬは上記実施例２と同様の方法で溶解した。各試料は、マウス尾静脈から投与した（投与量は１００μｇ）。対照として溶媒のみを投与した（コントロール）投与１６時間後に摘出した脾臓から細胞浮遊液を調製した。脾臓細胞と^{51}Ｃｒ標識ＹＡＣ－１細胞を５０:１の比率で混合し、４時間培養した。４時間後の培養上清中の^{51}Ｃｒ量を、γカウンター（ＷＡＬＬＡＣ製）を用いて測定した。結果を表５に示す。なお、本実験は、実験１、２、３の３回に分けて行なった。

【００３６】

【表５】

	試料	ＮＫ 活性（%） （平均値±標準偏差）
実験１	コントロール	26.1±5.1
	GSL-2	34.1±6.2
	GSL-3	33.2±8.2
	GSL-5	35.7±4.8
実験２	コントロール	17.7±2.0
	GSL-1	30.1±3.8
	GSL-6	27.3±4.5
	GSL-7	33.5±5.1
実験３	コントロール	8.3±3.6
	GSL-8	22.2±1.7
	GSL-9	14.8±2.1
	GSL-10	12.5±3.0
	GSL-12	11.2±3.4
	GSL-13	14.4±3.1

【００３７】

ここで、表５から明らかなとおり、ＧＳＬ－１、５、６～９及び１３についてより効果的であり、ＧＳＬ－１、７、８について顕著に効果的であった。

【００３８】

実施例６　抗腫瘍作用

マウスは、Ｃ５７ＢＬ／６マウス（７週令、メス）を用いた。腫瘍細胞Ｂ１６－Ｆ１０（北海道大学遺伝子病制御研究所）（２ｘ１０^{5}個）を尾静脈から移植した。各ＧＳＬは、上記実施例２と同様の方法で溶解した。ＧＳＬの投与量は、１００μｇとし、腫瘍細胞移植後１日、５日、９日目に腹腔内投与した。移植１４日目に解剖し、肺の転移巣数を測定した。結果を表６に示す。

【００３９】

【表６】

試料（溶媒）	転移巣数 （平均値±標準偏差）
コントロール	111.2±17.5
GSL-1 (P)	89.5±15.9
GSL-2 (P)	40.0±15.1
GSL-6 (P)	63.2±21.8
GSL-1 (P+S)	69.7±16.9
GSL-2 (P+S)	55.7±19.8
GSL-6 (P+S)	68.7±19.9
GSL-7 (P+S)	67.5±14.7

【００４０】

表６から明らかなとおり、上記いずれのＧＳＬにおいても効果的に肺の転移を抑制した。特に、ＧＳＬ－２はその効果が顕著であった。

【００４１】

実施例７　抗アレルギー作用

ＢＡＬＢ／ｃマウスに、それぞれ、卵白アルブミン（ＯＶＡ）１００μｇと水酸化アルミニウムゲル１．６ｍｇを混合した抗原を０日および７日に皮下接種した。１４、１５、１６日目にＯＶＡ１０μｇを生理食塩水に溶解し、点鼻接種３日後（初回接種から１８日目）に解剖した。各ＧＳＬは、０．５％ペンタンジオール、０．５％Ｎ－ラウロイルサルコシン、９．８％ショ糖溶液で最終濃度が５ｍｇ／ｍｌとなるように溶解した後、生理食塩水で希釈した。生理食塩水で希釈した各ＧＳＬ溶液は、１日、５日、９日、１３日目に腹腔内投与した。肺胞洗浄液中の全細胞数および好酸球数を計測した。全細胞数はチュルク液（和光純薬工業製）で、好酸球数はギムザ染色液（メルク株式会社製）で染色し計測した。抗ＯＶＡ抗体価（ＩｇＧ、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２ａ）はＯＶＡをコーティングした９６穴プレートに段階希釈した血清を添加した。検出抗体には、アルカリホスファターゼ標識した抗マウスＩｇＧ抗体（ＺＹＭＥＤ社製）、抗マウスＩｇＧ１抗体（ＩＣＮ社製）、抗マウスＩｇＧ２ａ抗体（ＺＹＭＥＤ社製）を用いた。パラニトロフェニルリン酸塩を基質として発色させ、３ＮのＮａＯＨで反応停止後、マイクロプレートレーダーで４０５ｎｍの吸光度を測定した。抗ＯＶＡ　ＩｇＥ抗体価は、抗マウスＩｇＥ抗体（日本ベクトンディッキンソン株式会社製）をコーティングした９６穴プレートに段階希釈した血清を添加した。次いで、各穴にビオチン標識したＯＶＡを添加後、パーオキシダーゼ標識ストレプトアジビンを用い、ＳｕｒｅＢｌｕｅ（フナコシ株式会社製）を基質として発色させた。２Ｎ　H_2PO_4で反応停止後、マイクロプレートレーダーで４５０ｎｍの吸光度を測定した。

また、コントロールは、ＢＡＬＢ／ｃマウスに、ＧＳＬを投与しないで同時に行ったものである。

白血球数に関する測定結果を表７に示す。好酸球数を表８に示す。

【００４２】

【表７】

	白血球数 1×10^5 細胞／ｍｌ （平均値±標準偏差）
正常マウス	32.7±9.9
コントロール	147.0±50.1
GSL-1	88.5±34.6

【表８】

	好酸球数 1×10^5 細胞／ｍｌ （平均値±標準偏差）
正常マウス	0
コントロール	27.7±24.1
GSL-1	4.9±4.2

【００４３】

表７および表８から明らかなとおり、肺胞洗浄液中の白血球数および好酸球数は顕著に減少した。

【００４４】

実施例８　感染抵抗性増強作用

マウスは、Ｃ５７ＢＬ／６マウス（７週令、メス）を用いた。各ＧＳＬは、実施例２の「Ｐ」と同様の方法で溶解した。溶解したものを、Salmonella typhimurium ΔＳＬ７２０７aroA株（スタンフォード大学医学部、米国）に感染させる１時間前に腹腔内投与接種

した。感染３日目に解剖し、腹腔内生菌数を測定した。腹腔内生菌数の結果を表９に示した。

内生菌数を測定した。腹腔内生菌数の結果を表９に示した。

【００４５】

【表９】

試料	腹腔内生菌数 $\times 10^6$ cfu （平均値±標準偏差）
コントロール	20.9±3.5
GSL-1	12.1±8.2
GSL-2	6.7±3.6

【００４６】

表９中、cfuは、コロニー形成単位の略で生菌数を意味する。表９から明らかなとおり、ＧＳＬの投与により、感染抵抗性の増強作用が認められた。

【００４７】

実施例９　抗ウイルス作用

マウスは、Ｃ５７ＢＬ／６マウス（７週令、メス）を用いた。各ＧＳＬは、実施例２と同様の方法で溶解した。溶解したものを、マウスに静脈投与した。投与１時間後に、マウスに、マウスサイトメガロウイルス（Ｓｍｉｔｈ株）1×10^4ｐｆｕ（ｐｆｕ：プラーク形成単位の略で生菌数を意味すである）を腹腔内接種した。感染３日目に解剖し、肝臓および脾臓内ウイルス価を測定した。その結果を、表１０に示した。また、脾臓の３日後のＮＫ活性および血清中ＩＦＮ－γを測定した。その結果を表１１（ＮＫ活性）および表１２（ＩＦＮ－γ）を示す。

【００４８】

【表１０】

試料	脾臓内ウイルス $\times 10^3$pfu （平均値±標準偏差）	肝臓内ウイルス $\times 10^3$pfu （平均値±標準偏差）
コントロール	2.4±0.5	63.0±19.5
GSL-1	0.2±0.1	7.5±4.1
GSL-2	0.2±0.1	3.3±1.9
GSL-6	0.2±0.1	2.7±1.2
GSL-7	0.2±0.1	4.8±1.9

【表１１】

試料	ＮＫ活性 （平均値±標準偏差）
コントロール	41.4±10.7
GSL-1	72.5±9.7
GSL-2	54.0±14.0
GSL-6	75.2±4.8
GSL-7	72.5±7.4

【００４９】

【表１２】

試料	血清 IFN-γ(ng/ml) （平均値±標準偏差）
コントロール	2.0±0.5
GSL-1	3.0±0.7
GSL-2	4.5±1.1
GSL-6	2.6±0.7
GSL-7	2.5±0.3

【００５０】

その結果、表１０に示すとおり、ＧＳＬを前投与することにより、感染抵抗性の増強作用が認められた。また、表１１に示すとおり、ＮＫ活性は顕著に増強し、ＩＦＮ－γレベルはコントロール群と比較して増強した。特に、ＧＳＬ－６についてその効果が顕著であることが認められた。

【００５１】

実施例１０　ＩＬ－６産生促進作用およびＮＯ産出促進

実施例１で用いた正常マウスに４％のチオグルコール酸３ｍｌを腹腔内投与し、４日後に腹腔滲出細胞を採取し実験に用いた。マクロファージ細胞株ＲＡＷ２６４細胞（理化学研究所）も実験に用いた。各ＧＳＬは、エタノール：ドデカン（９８：２）溶媒で濃度が０．５ｍｇ／ｍｌとなるように溶後し、９６穴プレートに２０μｌずつ分注し、溶媒を揮発させてＧＳＬをプレートに固相化した。ＧＳＬを固相化したプレートにマクロファージを加え、２４時間後の培養上清を回収した。この培養上清については、ＥＬＩＳＡ法によりＩＬ－６を、グリース試薬を用いて一酸化窒素（ＮＯ）も測定した。ＩＬ－６の測定結果を、表１３に、一酸化窒素の測定結果を、表１４に示した。

【００５２】

【表１３】

試料	IL-6（pg/ml）（平均値±標準偏差）
対照群	3491.0±492.1
GSL-1	3921.7±665.1
GSL-4	3453.0±252.5
GSL-5	4742.0±525.2
GSL-6	5389.7±1003.7
GSL-7	6948.0±457.1
GSL-8	6264.0±1075.0
GSL-9	6711.3±485.1
GSL-10	7474.0±920.3
GSL-11	10046.0±340.0
GSL-12	7303.3±640.2
GSL-13	7619.3±774.3

【表１４】

試料	NO（μM）（平均値±標準偏差）
対照群	0.7±0.2
GSL-2	6.8±0.7
GSL-3	3.5±0.2
GSL-4	3.8±0.5
GSL-5	5.2±0.5
GSL-6	4.4±0.8
GSL-7	3.9±0.3
GSL-8	4.2±1.1
GSL-9	9.0±0.5
GSL-10	8.4±0.8
GSL-11	11.3±1.0
GSL-12	7.7±0.5
GSL-13	7.1±0.1

【００５３】

表１３から明らかなとおり、ＩＬ－６誘導作用が認められた。特に、ＧＳＬ－５～１３についてより効果的であり、ＧＳＬ－６～１３についてさらに効果的であり、ＧＳＬ－７～１３について顕著に効果的であった。

また、表１４から明らかなとおり、ＮＯ産出促進作用が認められた。特に、ＧＳＬ－２、５、９～１３についてより効果的であり、ＧＳＬ－１１についてさらに効果的であった。

【００５４】

実施例１１

本願発明のＧＳＬ組成物についての毒性について確認した。マウスは、Ｃ５７ＢＬ／６マウス（７週令、メス）を用いた。２０ｍｇのガラクトサミンを腹腔内投与直後に、リポ

多糖（以下、「ＬＰＳ」と示すことがある）（Salmonella abortus equi由来、マックスプランク免疫生物学研究所、ドイツ、フライブルグ市）（溶媒は生理食塩水）、または、下記表１５に示したＧＳＬ（溶媒は「Ｐ＋Ｓ」）の下記表１５に示した量を、マウス尾静脈から投与した。投与２４時間後、マウスの生死を観察した。その結果を表１５に示した。

【００５５】

【表１５】

ＬＰＳまたはＧＳＬ	添加量	死亡数／実験数
ＧＳＬ－１	１００μｇ	０／３
ＧＳＬ－２	１００μｇ	０／３
ＧＳＬ－３	１００μｇ	０／３
ＧＳＬ－４	１００μｇ	０／３
ＧＳＬ－５	１００μｇ	０／３
ＧＳＬ－６	１００μｇ	０／３
ＧＳＬ－７	１００μｇ	０／３
ＧＳＬ－８	１００μｇ	０／３
ＧＳＬ－９	１００μｇ	０／３
ＧＳＬ－１０	１００μｇ	０／３
ＧＳＬ－１１	１００μｇ	０／３
ＧＳＬ－１２	１００μｇ	０／３
ＧＳＬ－１３	１００μｇ	０／３
ＬＰＳ	１００ｎｇ	３／３
ＬＰＳ	１０ｎｇ	３／３

【００５６】

ＬＰＳを添加した場合、１０ｎｇの添加でもすべてのマウスが死亡した。一方、ＧＳＬでは１００μｇ添加してもすべてのマウスが生存していた。このように本願発明の組成物はきわめて毒性が低いことが認められた。

【００５７】

実施例１０

エンドトキシントレランスが誘導されるか否かについて確認した。マウスは、Ｃ５７ＢＬ／６マウス（７週令、メス）を用いた。ＬＰＳ（溶媒は生理食塩水）または各ＧＳＬの下記表１６に示す量をマウス尾静脈から投与した。投与後２４時間に、ガラクトサミン（２０ｍｇ）およびＬＰＳ（１００ｎｇ、溶媒は生理食塩水）を腹腔内投与し、マウスの生死を観察した。その結果を、表１６に示す。

【００５８】

【表１６】

ＬＰＳまたはＧＳＬ	添加量	死亡数／実験数
ＧＳＬ－１	１００μｇ	３／３
ＧＳＬ－２	１００μｇ	３／３
ＧＳＬ－６	１００μｇ	３／３
ＧＳＬ－７	１００μｇ	３／３
ＬＰＳ	１００ｎｇ	０／３

【００５９】

表１６から明らかなとおり、ＧＳＬ－１、ＧＳＬ－２、ＧＳＬ－６およびＧＳＬ－７を

１００μｇ添加してもエンドトキシントレランスは誘導されず、すべてのマウスが死亡した。一方、ＬＰＳは１００ｎｇの添加でもエンドトキシントレランスが誘導された。

【図面の簡単な説明】

【００６０】

【図１】正常マウスにＧＳＬ－１を投与した場合のフローサイトメトリーによる解析結果を示す。

【図２】正常マウスにＧＳＬ－２を投与した場合のフローサイトメトリーによる解析結果を示す。

【図３】正常マウスにＧＳＬ－６を投与した場合のフローサイトメトリーによる解析結果を示す。

【図４】正常マウスにＧＳＬ－７を投与した場合のフローサイトメトリーによる解析結果を示す。

【図５】ＴＬＲ４欠損マウスにＧＳＬ－１を投与した場合のフローサイトメトリーによる解析結果を示す。

【図６】ＴＬＲ４欠損マウスにＧＳＬ－２を投与した場合のフローサイトメトリーによる解析結果を示す。

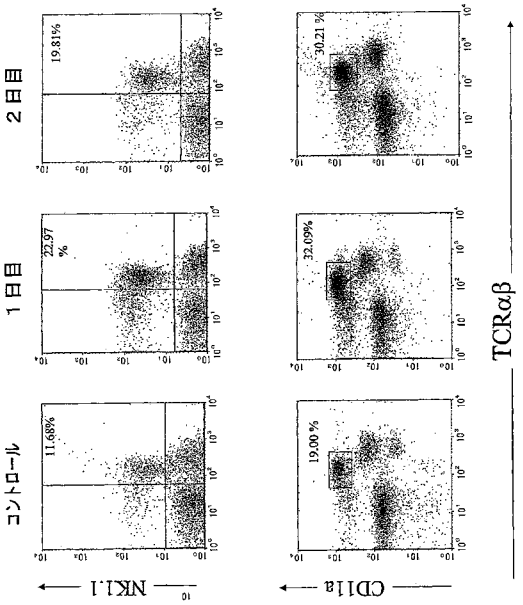
【図７】正常マウスに各種ＧＳＬ－１、２、６、７を投与した場合のＮＴＫ細胞の変化を示す。

【図８】正常マウスにおけるＧＳＬ－１又はＧＳＬ－２投与後のＩＦＮ－γの濃度を示す。

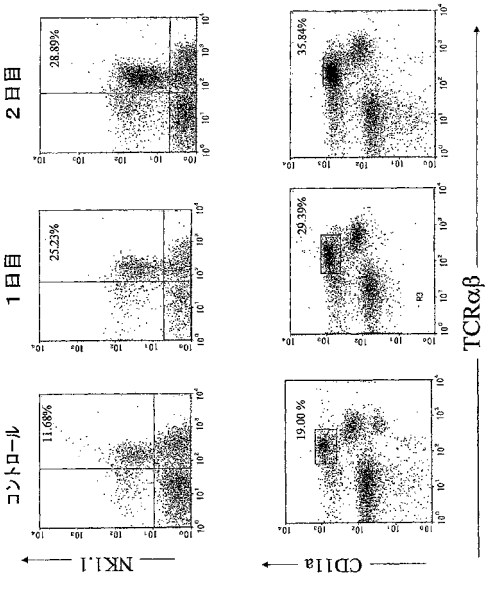
【図９】正常マウスにおけるＧＳＬ－１又はＧＳＬ－２を投与した場合のＩＮＦ－γ産生ＮＴＫ細胞の変化を示す。

【図１０】ＴＬＲ４欠損マウスにおけるＧＳＬ－１又はＧＳＬ－２投与後のＩＬ－４の濃度を示す。

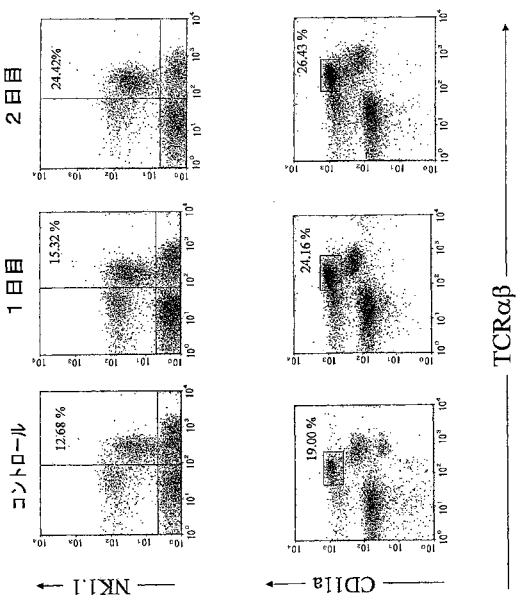
【図１】



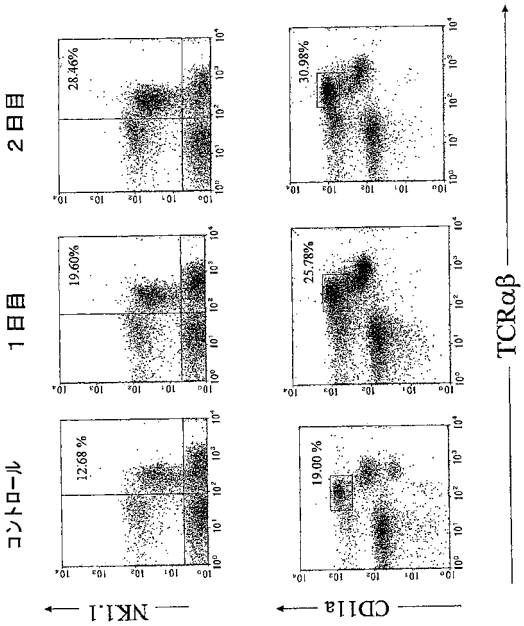
【図２】



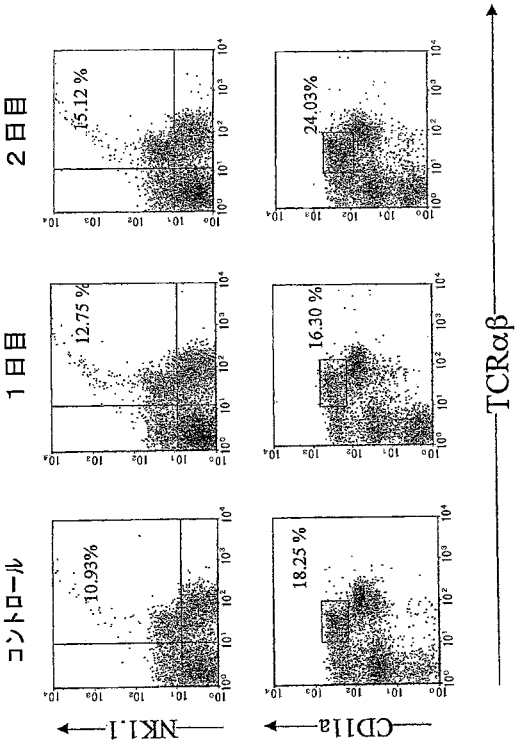
【図３】


２日目
１日目
コントロール
24.42%
15.32 %
12.68 %
26.43 %
24.16 %
19.00 %
NK1.1
CD11a
TCRαβ

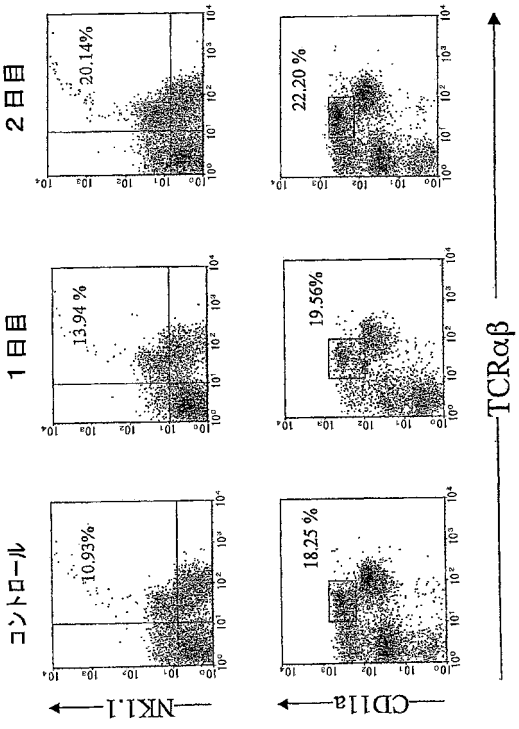
【図４】


２日目
１日目
コントロール
28.46%
19.60%
12.68 %
30.98%
25.78%
19.00 %
NK1.1
CD11a
TCRαβ

【図５】


２日目
１日目
コントロール
15.12 %
12.75 %
10.93%
24.03%
16.30 %
18.25 %
NK1.1
CD11a
TCRαβ

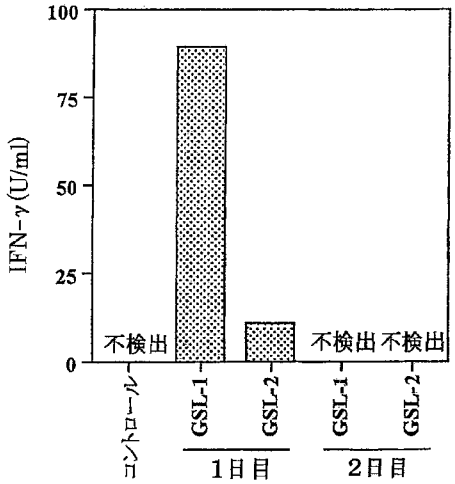
【図６】


２日目
１日目
コントロール
20.14%
13.94 %
10.93%
22.20 %
19.56%
18.25 %
NK1.1
CD11a
TCRαβ

【図７】

	1日目(%)	2日目(%)
コントロール	14.5	13.7
GSL-1	18.4	22.8＊
GSL-2	21.7＊	26.1＊
GSL-6	14.6	23.4＊
GSL-7	11.9	23.2＊

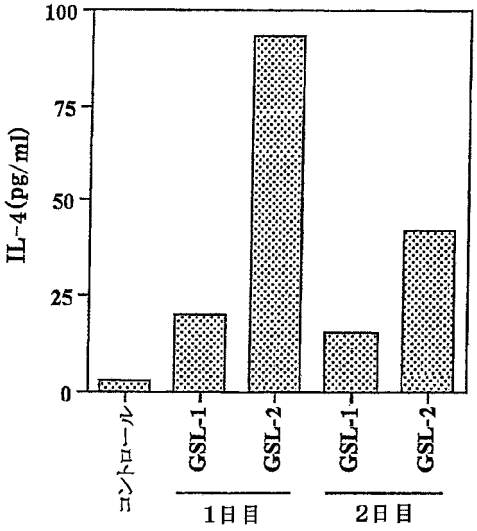
【図８】



【図９】

	1日目(%)	2日目(%)
コントロール	3.4	3.4
GSL-1	9.8	35.5
GSL-2	24.0	25.9

【図１０】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		ＦＩ		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ　37/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	37/00	
Ａ６１Ｐ　31/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	31/00	
Ａ６１Ｐ　31/12	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	31/12	

(72)発明者　川原　一芳
東京都北区東田端二丁目８番１５号　マンションニュー田端３１２
(72)発明者　滝本　博明
東京都町田市原町田４－９－８－１６０２

Ｆターム(参考) 4B018 MD27 MD45 ME07 ME08
4C086 AA02 DA42 EA06 MA02 MA04 NA14 ZB13 ZB26 ZB33 ZB35
ZC02

(54)【発明の名称】ＮＫＴ細胞活性化用組成物、ＩＬ－４産生促進用組成物、ＩＦＮ－γ産生促進用組成物、樹状細胞活性化用組成物、ＩＬ－１２産生促進用組成物、ＩＬ－１０産生促進用組成物、ＮＫ細胞活性化用組成物、抗腫瘍作用組成物、抗アレルギー作用組成物、感染抵抗性増強用組成物、抗ウイルス作用組成物、ＩＬ－６産生促進用組成物、ＮＯ産出促進用組成物