

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4763202号
(P4763202)

(45) 発行日 平成23年8月31日 (2011. 8. 31)

(24) 登録日 平成23年6月17日 (2011. 6. 17)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 P 17/06 (2006. 01)
 C 1 2 N 1/14 (2006. 01)
 A 6 1 K 36/07 (2006. 01)
 A 6 1 K 31/352 (2006. 01)
 A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

C 1 2 P 17/06
 C 1 2 N 1/14 F
 A 6 1 K 35/84 A
 A 6 1 K 31/352
 A 6 1 P 35/00

請求項の数 7 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-545565 (P2001-545565)
 (86) (22) 出願日 平成12年12月14日 (2000. 12. 14)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2000/008839
 (87) 国際公開番号 W02001/044488
 (87) 国際公開日 平成13年6月21日 (2001. 6. 21)
 審査請求日 平成19年6月22日 (2007. 6. 22)
 (31) 優先権主張番号 特願平11-356267
 (32) 優先日 平成11年12月15日 (1999. 12. 15)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)
 (31) 優先権主張番号 特願2000-234008 (P2000-234008)
 (32) 優先日 平成12年8月2日 (2000. 8. 2)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(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 3 6 3 番地 3 2 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
 北海道札幌市清田区真栄 3 6 3 番 3 2 号
 ハイテクヒル真栄 株式会社アミノアップ
 化学内
 (72) 発明者 袁 嵐
 北海道札幌市清田区真栄 3 6 3 番 3 2 号
 ハイテクヒル真栄 株式会社アミノアップ
 化学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 担子菌培養物由来の新規物質、その製造方法及び用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

イソフラボン類を含有する大豆種子または大豆種子由来の加工製品がイソフラボン換算濃度で 1. 2 ～ 4 % 存在する培地中で β -グルコシダーゼ活性を有する霊芝菌または椎茸菌を培養し、イソフラボン類のアグリコン及び霊芝菌または椎茸菌の培養生成物を含有する成分を取得することを特徴とする抗腫瘍作用を有する物質の製造方法。

【請求項 2】

予め霊芝菌または椎茸菌を培養し、 β -グルコシダーゼ活性を高めた後イソフラボン類を含有する大豆種子または大豆種子由来の加工製品を培地に投入して培養し、イソフラボン類のアグリコン及び霊芝菌または椎茸菌の培養生成物を含有する成分を取得する請求項 1 記載の製造方法。

【請求項 3】

イソフラボン類を含有する大豆種子または大豆種子由来の加工製品及び β -グルコシダーゼが存在し、前者の濃度がイソフラボン換算で 1. 2 ～ 4 % である培地中で、 β -グルコシダーゼ活性を有する霊芝菌または椎茸菌を培養し、イソフラボン類のアグリコン及び霊芝菌または椎茸菌の培養生成物を含有する成分を取得することを特徴とする抗腫瘍作用を有する物質の製造方法。

【請求項 4】

イソフラボン類のアグリコンがゲニステインである請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の製造方法。

10

20

【請求項 5】

抗腫瘍作用が腫瘍新生血管障害作用である請求項 1 または 3 記載の製造方法。

【請求項 6】

抗腫瘍作用が腫瘍細胞増殖抑制作用である請求項 1 または 3 記載の製造方法。

【請求項 7】

腫瘍細胞増殖抑制作用が腫瘍細胞のアポトーシス誘導作用である請求項 6 記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は抗腫瘍作用などの生理活性を有する物質に関する。さらに詳しく言えば、大豆などのイソフラボン類のアグリコンの生理活性及び担子菌培養物の生理活性が増強された新規な物質、その製造方法及びその物質の用途である健康食品組成物、動物用あるいは水産養殖用飼料組成物及び抗腫瘍剤に関する。

背景技術

大豆や大豆加工製品の摂取が発癌のリスクを軽減し、原発性あるいは化学物質等により誘導される癌の防御に関与していることが報告されている。この作用は大豆に含まれるイソフラボンによるものである。大豆イソフラボンは女性ホルモン様作用を有し、乳癌、大腸癌、前立腺癌等の癌、心血管疾患、脳機能、骨粗鬆症、アルコール依存症、更年期障害、高脂血症等に対して幅広く防御的に生理活性作用を示すことが明らかにされている。

大豆イソフラボンとしては、ゲニスチン (genistin)、ダイジン (daidzin)、グリシチン (glycitin) 等が知られている。これらは、それぞれゲニステイン (genistein)、ダイゼイン (daidzein)、グリシテイン (glycitein) をアグリコンとするグルコース配糖体であり、大豆イソフラボンは大豆種子中でグルコース配糖体、あるいはその誘導体の形で存在している。

大豆イソフラボンの生理活性作用は主にそのアグリコンに基く作用であって、グルコース配糖体の形では生理活性作用はそれほど強くはない。これは配糖体のままでは小腸から吸収しがたいためである。

大豆イソフラボン配糖体を分解して、そのアグリコンを得る方法はいくつか提案されている。例えば、大豆中のβ-グルコシダーゼの作用により、アグリコンへ変換する方法（特開平1-258669号）、醤油粕または醤油油中に生成されたイソフラボンアグリコンを抽出する方法（特開平5-170756号）、大豆蛋白に麹菌を作用させてアグリコンを含むイソフラボン化合物を得る方法（特開平8-214787号）、植物蛋白を抽出後、β-グルコシダーゼ又はエステラーゼによってアグリコン化する方法（特表平9-503781号、米国特許第5763389号）、大豆胚軸に微生物由来の酵素を作用させ、含まれるイソフラボン化合物をアグリコン化する方法（特開平11-89589号）がある。

アグリコンの中でも特にゲニステインは、チロシンキナーゼ阻害、DNAトポイソメラーゼ阻害、血管新生抑制等の生理活性作用を示す。但し、血管新生抑制効果などの生理活性効果を得るには、血漿中に高濃度のゲニステインが必要であり、腸管からの吸収が難しい配糖体のゲニスチン摂取のみでゲニステイン必要量を満たすことは困難であるため、十分な生理活性効果を得るにはアグリコンであるゲニステインの形で必要量を摂取しなければならない。

一方、担子菌、例えば椎茸菌やサルノコシカケ等の菌糸体やその培養物は、免疫賦活作用や抗腫瘍作用等の生理活性作用を有することが知られており、一部は抗癌剤等として使用されている。

これら抗癌剤は、近年は腫瘍新生血管障害作用を持つ物質と併用される場合が多い。これは同一の治療標的に対して作用機序の異なる物質を併用することにより高い治療効果が期待されるからである。

腫瘍新生血管障害作用を持つ物質としては、例えばムコ多糖類の混合物であるサメ（鮫）軟骨を原料とするものや、アンジオスタチン (angiotatin) 等が知られてお

10

20

30

40

50

り、その一部は実際に使用されている。

腫瘍新生血管障害作用とは、大きくなった腫瘍が自らの増殖に必要な栄養や酸素を供給するために、自ら血管新生促進物質を産生して血管を新しく生成して増殖しようとする働きを抑制・障害する作用を言う。

腫瘍新生血管障害物質は、このような腫瘍細胞の血管新生を防止してその肥大化を抑制・障害する物質であり、その投与によって腫瘍を消滅させることができるので、癌治療に有用である。

腫瘍新生血管障害物質は、経口摂取や静脈注射によってその効果を得ることができるが、現状では経口摂取できる物質は少ない。静脈注射は患者の負担が大きい欠点がある。

経口摂取に用いられる前記サメ軟骨は、腫瘍新生血管障害効果を得るには一日当たり約20グラム以上もの大量摂取が必要であるが、生臭く不快な味があるため摂取し難い欠点がある。この不快な臭いや味を抑え、かつ強酸性の胃内で溶解せずに腸内まで到達させて、そこで溶解・吸収される性質を付与する目的で、サメ軟骨を粉砕して微粉末状としたり、この微粉末を更に油脂類や糖類等でコーティングする等の複雑な処理が行われている。

また、アンジオスタチンは未だ実用化されておらず、従って、経口投与が可能で、しかも安全性の高い腫瘍新生血管障害物質が求められている。

発明の開示

本発明の課題は、前記従来技術の問題点を解消し、担子菌培養物の抗腫瘍作用等の生理活性作用を補強し得る、大豆などイソフラボン類のアグリコンの生理活性をも活用した新規な物質を提供することにある。

更に、本発明の課題は、前記新規な物質の製造方法及びその物質の用途である健康食品、動物用あるいは水産養殖用飼料及び抗腫瘍剤を提供することにある。

前記課題に鑑み鋭意検討した結果、本発明者らは大豆種子やその加工製品等のイソフラボン類を含有する材料（イソフラボン類含有材料）の存在下で担子菌を培養し、担子菌の産生するβ-グルコシダーゼの作用によってグルコース配糖体のイソフラボン（ゲニステイン等）をグルコースとアグリコン（ゲニステイン等）に分解し、担子菌の培養によって産生した物質と共にアグリコンを培養系中に蓄積させ、イソフラボン類のアグリコンの生理活性と、担子菌培養物の生理活性とを有し、かつそれらの生理活性が前記アグリコンと担子菌培養物各々単独の混合物の場合よりも増強された生理活性を有する新規物質が得られることを見出し本発明を完成した。

すなわち、本発明は以下の生理活性作用物質、その製造方法、およびその物質を利用する健康食品組成物、動物用あるいは水産養殖用飼料組成物および抗腫瘍剤に関する。

1) イソフラボン類を含有する材料が存在する培地中で、β-グルコシダーゼ活性を有する担子菌を培養して得られる、イソフラボン類のアグリコンと担子菌の培養生成物とを含む生理活性作用を有する物質。

2) イソフラボン類を含有する材料及びβ-グルコシダーゼが存在する培地中で、β-グルコシダーゼ活性を有する担子菌を培養して得られる、イソフラボン類のアグリコンと担子菌の培養生成物とを含む生理活性作用を有する物質。

3) イソフラボン類のアグリコンの生理活性及び担子菌の培養生成物の生理活性が相乗的に増加している前記1または2に記載の物質。

4) イソフラボン類のアグリコンがゲニステインである前記1乃至3のいずれかに記載の物質。

5) 生理活性作用が抗腫瘍作用である前記1乃至4のいずれかに記載の物質。

6) 抗腫瘍作用が腫瘍新生血管障害作用である前記5記載の物質。

7) 抗腫瘍作用が腫瘍細胞増殖抑制作用である前記5記載の物質。

8) 腫瘍細胞増殖抑制作用が腫瘍細胞のアポトーシス誘導作用である前記7記載の物質。

9) イソフラボン類を含有する材料が、大豆種子、大豆種子由来の加工製品またはクズの根である前記1乃至4のいずれかに記載の物質。

10) β-グルコシダーゼ活性を有する担子菌が霊芝菌または椎茸菌である前記1または2に記載の物質。

10

20

30

40

50

1 1) イソフラボン類を含有する材料が存在する培地中で β -グルコシダーゼ活性を有する担子菌を培養し、イソフラボン類のアグリコン及び担子菌の培養生成物を含有する成分を取得することを特徴とする生理活性作用を有する物質の製造方法。

1 2) 予め担子菌を培養し、 β -グルコシダーゼ活性を高めた後イソフラボン類を含有する材料を培地に投入して培養し、イソフラボン類のアグリコン及び担子菌の培養生成物を含有する成分を取得する前記 1 1 記載の生理活性作用を有する物質の製造方法。

1 3) イソフラボン類を含有する材料及び β -グルコシダーゼが存在する培地中で担子菌を培養し、イソフラボン類のアグリコン及び担子菌の培養生成物を含有する成分を取得することを特徴とする生理活性作用を有する物質の製造方法。

1 4) イソフラボン類のアグリコンがゲニステインである前記 1 1 乃至 1 3 のいずれかに記載の生理活性作用を有する物質製造方法。

1 5) 生理活性作用が抗腫瘍作用である前記 1 1 乃至 1 4 のいずれかに記載の製造方法。

1 6) 抗腫瘍作用が腫瘍新生血管障害作用である前記 1 5 記載の製造方法。

1 7) 抗腫瘍作用が腫瘍細胞増殖抑制作用である前記 1 5 記載の製造方法。

1 8) 腫瘍細胞増殖抑制作用が腫瘍細胞のアポトーシス誘導作用である前記 1 7 記載の製造方法。

1 9) イソフラボン類を含有する材料が、大豆種子、大豆種子由来の加工製品またはクズの根である前記 1 1 または 1 2 に記載の製造方法。

2 0) β -グルコシダーゼ活性を有する担子菌が霊芝菌または椎茸菌である前記 1 1 または 1 3 に記載の製造方法。

2 1) 前記 1 乃至 1 0 のいずれかに記載の生理活性作用を有する物質を含有する健康食品。

2 2) 前記 1 乃至 1 0 のいずれかに記載の生理活性作用を有する物質を有効成分とする飼料組成物。

2 3) 前記 1 乃至 1 0 のいずれかに記載の生理活性作用を有する物質を有効成分とする抗腫瘍剤。

発明の詳細な説明

[本発明化合物の製造方法]

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の生理活性作用を有する物質は、代表例として以下の方法で得ることができる。

すなわち、マルツエキス、酵母エキス、セルロース、酒石酸アンモニウム等の成分からなる培地に担子菌を植菌し、一定条件下で培養して β -グルコシダーゼを始めとする各種酵素を産生した酵素活性が高まった段階で、大豆種子やその加工品などのイソフラボン類含有材料を投入し、 β -グルコシダーゼ活性が高くなる温度、pH条件下で攪拌、通気培養を続けてイソフラボン配糖体の実質的に全てをアグリコンに変換させた後、培養系全体を加熱して系内の酵素を失活させて酵素反応を停止させ、更に必要により凍結乾燥等の手段により乾燥、粉末化して本発明の物質を得るものである。

本発明において使用するイソフラボン類含有材料としては、大豆種子、脱脂大豆、あるいはこれらの適宜の組織の一部（表皮、胚乳、胚軸等）をそのまま用いてもよく、これらを水、アルコール類ないしこれらの混合物による抽出物として用いてもよい。具体例としては豆乳をあげることができるが、大豆種子等から適宜の手段で分離したイソフラボン類そのものをも好適に使用できる。

なお、本発明において、「イソフラボン類」とは、グルコース配糖体としてのイソフラボンをはじめ、マロニルゲニスチン、アセチルゲニスチン等のグルコース配糖体誘導体、及びグルコース配糖体の構成成分であるアグリコンを含み、これらのいずれかを含有する材料が、「イソフラボン類含有材料」である。

本発明においては、イソフラボン類含有材料として、大豆、脱脂大豆等から製造された加工品、例えば味噌、醤油、納豆等の加工品等でも、そこにイソフラボン類が含まれる限りイソフラボン類含有材料として使用することができる。

さらに、イソフラボン類を含む大豆以外の植物、例えばクズ、レッドクローバー、アルフ

10

20

30

40

50

アルファ、エゾノレンリソウ、オランダヒユ、エニシダ等のマメ科植物類、あるいはこれらのイソフラボン類を含む植物組織を水、アルコール類等により抽出した抽出液等もイソフラボン類含有材料として使用することができる。特にゲニステインが豊富に含まれているクズの根が、好適に使用できる。

本発明に用いるβ-グルコシダーゼ活性を有する担子菌としては、例えば次のものを挙げることができる。

椎茸 (*Lentinus edodes*)、霊芝 (*Ganoderma lucidum*)、マイタケ (*Grifola frondosa*)、コフキサルノコシカケ (*Ganoderma applanatum*)、ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*)、エノキタケ (ナメタケ) (*Flammulina velutipes*)、ナメコ (*Pholiota nameko*)、カワラタケ (*Coriolus versicolor*)、キクラゲ (*Auricularia auricula*)、スエヒロタケ (*Schizophyllum commune*)、チョレイマイタケ (*Grifora umbellata*)、フクロタケ (*Volvariella volvacea*)、アガリクス (*Agaricus bisporus*)、ニンギョータケ (*Albatrellus confluens*)、ニオウシメジ (*Tricholoma giganteum*)。

本発明においては、上記の担子菌をイソフラボン類を含む材料の存在下において培養する。

培地には、上記イソフラボン類を含む材料の他に各種の炭素源あるいは窒素源を添加してもよい。炭素源の例としてはブドウ糖、ショ糖、マルトース、サッカロース、上白糖、黒糖、糖蜜、廃糖蜜、マルツエキス等が挙げられる。

窒素源の例としては、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塩、尿素等が挙げられる。

その他、必要に応じて、ナトリウム塩、マグネシウム塩、マンガン塩、鉄塩、カルシウム塩、リン酸塩等の無機塩類や、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を添加してもよい。

培養は、通常の中温菌の培養に準じればよく、pH 2～6、10～45℃、好ましくは15～30℃の温度で攪拌し、通気培養を行う。培養は、イソフラボン配糖体を実質的に全てアグリコンに変換するまで継続することが好ましい。培養時間は菌の量やイソフラボン類含有材料の形態にもよるが、通常4～20日間、好ましくは6～12日間程度である。培養終了後、培養系全体を加熱して系内の酵素を失活させて酵素反応を停止させる。本発明の生理活性を有する物質は、培養液と菌糸体との混合液を濃縮乾固した後粉碎することにより粉末状で得られる。凍結乾燥法を採用して乾燥した後微粉碎してもよい。

本発明においては、前記の担子菌と共にβ-グルコシダーゼ酵素剤を併用して、担子菌の酵素活性を増強することもできる。

この目的に使用する酵素剤としては、アスペルギルス属、バチルス属、リゾプス属等の微生物由来の酵素製剤、あるいは大豆、アーモンド等の植物を起源とする酵素製剤を挙げることができる。大豆、アーモンド等の場合は、これらの種子の粉碎物をそのまま使用してもよい。

イソフラボン類含有材料の担子菌培地に対する添加比率は、イソフラボン配糖体のアグリコンと糖への変換量 (ゲニステインのゲニステインへの変換量) に大きく影響する。

例えば、大豆イソフラボン製剤 (イソフラボン40%含有) を椎茸菌と共に、マルツエキス、酵母エキス等を含む培地にて培養する場合、ゲニステインへの大きな変換量が得られる大豆製剤の培地への適切な添加濃度は3～10%であり、5%以下が好ましい。

培養中に担子菌によって産生されるβ-グルコシダーゼ活性の変化は、アグリコン生成に大きく影響する。霊芝菌を用いて前項同様の培地で10～60℃で培養し、β-グルコシダーゼ活性の変化、培地のpH変化などを調べたところ、β-グルコシダーゼ活性は培地pH 2.0～6.0の間で最も高く、温度を40～70℃程度にすると、一層酵素活性が高まることが判明している。

10

20

30

40

50

〔薬理活性〕

本発明の生理活性物質は、既に抗腫瘍作用や免疫賦活作用を有することが知られている担子菌の培養によって産生される生理活性物質と、血管新生抑制作用等を有することが知られているイソフラボン類のアグリコン（ゲニステイン等）とが単に混在した状態にあるのではなく、両者が何らかの形で結合した状態にある一体の物質であるか、あるいは培養の結果生じる何らかの未知物質の存在が推定される。その理由は、担子菌のみの培養で得た物質とゲニステインとを単純に混合しただけでは、本発明の物質と同等の生理活性（腫瘍血管新生抑制効果）は得られないからである。

なお、担子菌のみの培養によって生成する物質は、抗腫瘍作用や免疫賦活作用を有するものの、腫瘍血管新生抑制作用はない。

乾燥・粉末化した本発明の物質は、独特の深い苦味やキナコに似た香ばしい香りを有する褐色の粉体である。その化学成分分析結果と生理学的性質を以下に示す（測定方法は後述の実施例の項参照）。

（１）本発明物質の化学成分

- １）水分： ３％以下
- ２）タンパク質： ７．０～１０．０％
- ３）脂質： ５．０～８．０％
- ４）糖質： ７５．０～８５．０％
- ５）食物繊維： ０．５～２．０％
- ６）灰分： ２．０～５．０％
- ７）イソフラボン類（凍結乾燥粉末１ｇ当たり）
 - ダイジン ０．００～０．６０ｍｇ
 - ダイゼイン ２８．００～３０．００ｍｇ
 - ゲニスチン ０．００～０．４０ｍｇ
 - ゲニステイン ５５．００～６５．００ｍｇ
 - グリシチン ０．００～０．５０ｍｇ
 - グリシテイン １２．００～１５．００ｍｇ

（２）生理学的性質

１）腫瘍細胞の増殖抑制作用：マウスメラノーマ細胞、マウス大腸癌、マウス肺癌細胞、マウス血管内皮細胞、ラット乳癌細胞、ヒト前立腺癌細胞、ヒト膀胱癌細胞などの増殖を抑制する。

２）腫瘍血管新生抑制作用：マウスの腫瘍血管新生を抑制する。

前記した本発明の物質の腫瘍血管新生抑制作用は、後述の実施例に示すようにマウス腫瘍細胞を用いたイン・ヴィトロ（*in vitro*）及びイン・ヴィボ（*in vivo*）試験、鶏卵膜を用いたエクス・オヴォ（*ex ovo*）試験（CAM法：*chorioallantoic membrane*）によって確認された。

産業上の利用可能性

〔医薬品への適用〕

本発明により、イソフラボンを含有する安価な材料を用いて、安全、かつ容易に経口投与ができ、優れた生理活性作用を有する物質を容易に製造することができる。

本発明の物質はイソフラボン類のアグリコンの有する生理活性作用及び担子菌の培養生成物の有する生理活性作用が相乗的に強化されており、実験により確認された効果に基づく癌の治療及び／または予防剤（抗腫瘍剤）のみでなく、骨粗鬆、更年期障害、心血管疾患、脳機能障害、アルコール依存症、高脂血症等の治療及び／または予防剤、あるいは免疫賦活剤、女性ホルモン様物質としての利用も考えられる。

さらに本発明の物質は、古来より長期間食用に供されてきた茸および大豆等を原料とするので、多量に摂取しても安全上の問題はなく、前記イソフラボン類のアグリコンの有する生理活性作用と担子菌の培養生成物の有する生理活性作用が増強された動物あるいは水産用養殖の飼料、及び健康食品等としても利用できる。

本発明の物質は、食品、医薬品等として主として経口で用いられるが、その摂取量は、年

10

20

30

40

50

齢、体重、症状、目的とする治療効果、投与方法等により異なり、通常、成人一人当たり、一回につき、100mg～5g程度（乾燥物換算）である。

本発明の物質を投与する際には、一般に錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤等として用いられる。造粒、錠剤化あるいはシロップ剤、塗布剤とする際に、必要により適宜の補助資材（澱粉類、デキストリン、甘味剤類、色素、香料等）を使用することもできる。

発明を実施するための最良の形態

以下本発明を実施例および比較例に基き説明するが、本発明はこれらの記載により何等限定されるものではない。

実施例1：イソフラボン類含有材料存在培地での担子菌の培養（1）

10

（1）原料

a. イソフラボン類含有材料

イソフラボン40%含有大豆製品（米国、AHD社製）。含有イソフラボン成分（製剤1gあたり）は以下の通り：

ダイジン	80.25mg
ダイゼイン	2.20mg
ゲニスチン	103.94mg
ゲニステイン	2.48mg
グリシチン	30.60mg
グリシテイン	3.67mg

20

b. 担子菌

（株）アミノアップ化学で、マルツエキス液体培地中に25℃で保管した霊芝菌（*Ganoderma lucidum*）。

（2）培養条件

a. 培地

マルツエキス（オリエンタル酵母（株）製）	10.00g
酵母エキス（味の素（株）製）	1.25g
水	1.0リットル（L）

b. 培養方法

培地はオートクレーブで滅菌した後、4℃で保管したものを用いた。この培地（pH5.5）に霊芝菌を植菌して25℃、130rpmで振とう培養した。この培養の間、2日ごとに培養液のβ-グルコシダーゼ活性を測定し、酵素活性が培養開始時よりも高くなった時点で粉末大豆製剤（イソフラボン類含有材料）を培地の2.5%の濃度で培地に添加し、更に培養を続けた。ゲニステイン及びゲニスチン含量を測定し、ゲニスチンが全てゲニステインに変換されたことが確認された時点で培養を終了した。培養終了後、培養液全体を121℃で30分間加熱処理することにより酵素反応の停止と殺菌処理を完了した。次いで凍結乾燥して乾燥粉末化した。

30

なお、培養液のβ-グルコシダーゼ活性は、β-グルコシダーゼ標品（オリエンタル酵母（株）製、酵母由来）を用い、p-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノジド（シグマ社製）と反応させ400nm吸光度を利用して測定した。

40

また、培養液中のイソフラボン生成量は、イソフラボン標品（ゲニスチン、ゲニステイン、シグマ社製）を使用し、Frankel, A. A.らの方法（J. Agric. Food Chem., 42:1905-1913, 1994）に準拠し、ODSカラム（TSK gel-80Tm, 4.5×150mm）により、溶離液としてアセトニトリル-水-酢酸（10/90/0.1→40/60/0.1）を用いて溶出し（0.8ml/min）、260nmの吸収により測定した。

以上により得られた本発明の物質（発明物質1）は褐色微粉末であり、下記の特性を有する。以下の分析において、水分は70℃減圧乾燥法、タンパク質はケルダール法、脂質は酸分解法、食物繊維は酵素-重量法、灰分は直接灰化法により測定し、糖質は差引き値より求めた。

50

a. 化学的性質

- 1) 水分 0.7 %
 2) タンパク質 8.8 %
 3) 脂質 6.2 %
 4) 糖質 80.6 %
 5) 食物繊維 1.0 %
 6) 灰分 2.7 %
 7) イソフラボン類 (凍結乾燥粉末 1 g あたり)
 ダイジン 痕跡
 ダイゼイン 28.47 mg
 ゲニスチン 痕跡
 ゲニステイン 59.11 mg
 グリシチン 痕跡
 グリシテイン 13.53 mg

10

b. 生理学的特性

i) 腫瘍細胞増殖抑制作用 (in vitro)

B16/BL6マウスメラノーマ細胞、Colon 26マウス大腸癌細胞、SST-2ラット乳癌細胞、T24ヒト膀胱癌細胞、及びDu145ヒト前立腺癌細胞を用いて腫瘍細胞増殖抑制試験を行った。実施例1の物質 (発明物質1) を蒸留水に懸濁して高圧蒸気滅菌処理し、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで、連続的な濃度で細胞に加えた。0.1 %エタノールに溶解したゲニステイン標準品 (シグマ社製) を陽性対照として用い、腫瘍細胞懸濁液を10 % FBSを含むDMEM培地で1~2 $\times 10^6$ wellに調整して37℃で24時間培養し、これに発明物質1あるいはゲニステイン標準品を加えて更に48時間培養した。MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrasodium bromide) 法によりマイクロプレートリーダーを用いて細胞増殖を調べた。発明物質1の各種培養癌細胞に対する増殖抑制効果を、未処理の対照群の腫瘍増殖に対する増殖抑制率として表1に示す。数値が高い程、癌細胞の増殖抑制効果が高いことを示している。

20

表1：発明物質1の各種培養癌細胞に対する増殖抑制率 (%)

30

発明物質1濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	B-16	Colon 26	SST-2	Du145	T-24
12.5	53.7	11.4	39.6	27.0	4.3
25.0	72.0	48.7	36.2	60.0	31.2
50.0	78.5	78.3	52.9	85.5	77.9
100.0	86.4	78.8	61.3	87.4	98.5

表1から、各種培養癌細胞において発明物質1は濃度依存的に癌細胞の増殖を抑制し、高い癌細胞増殖抑制効果を有することが分かる。

ii) 血管内皮細胞増殖抑制試験 (in vitro)

40

マウス脳血管内皮細胞LE-1細胞を1 %ゼラチンでコートした96穴マイクロプレートで24時間予備培養し、10~0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度にて発明物質1で処理した後、更に24時間培養した。細胞の増殖はMTT法により検出した。表2に示すように、発明物質1はマウス脳血管内皮細胞に対して、濃度依存的に高い増殖抑制効果を示した。このことから、発明物質1は血管内皮細胞増殖作用、すなわち血管新生抑制作用を有することが判明した。

表 2：発明物質 1 のマウス脳血管内皮細胞に対する増殖抑制率(%)

発明物質 1 濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	LE-1
12.5	52.4
25.0	63.5
50.0	67.6
100.0	76.9

i i i) 各種腫瘍細胞の 50% 増殖抑制濃度 (IC_{50}) (in vitro) : 発明物質 1、ゲニステイン標準品および担子菌培養物の比較 10

3LL マウス肺癌細胞、Colon 26 マウス大腸癌細胞、PC3 ヒト前立腺癌細胞、Du145 ヒト前立腺癌細胞および LNCaP ヒト前立腺癌細胞を使用し、これらに対する発明物質 1、ゲニステイン標準品 (Sigma 社製) および担子菌培養物 (実施例 1 と同一の条件で担子菌のみを培養して得た生産物) の 50% 増殖抑制濃度 (IC_{50}) を調べた。

すなわち、発明物質 1、ゲニステイン標準品または担子菌培養物を蒸留水に懸濁し高圧蒸気滅菌処理し、 $1000 \mu\text{g}/\text{ml}$ から $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ まで、連続的な濃度で細胞に加えた。腫瘍細胞懸濁液は 10% FBS を含む DMEM 培地で $1 \sim 2 \times 10^5$ well に調整し、 37°C で 24 時間培養し、発明物質 1 あるいはゲニステイン標準品を加えてさらに 48 時間培養し、MTT 法によりマイクロプレートリーダーを用いて細胞増殖を調べた。その結果を表 3 に示す。数値が低い程、低濃度で培養癌細胞増殖の 50% の抑制が可能であることを示している。 20

表 3：各種癌細胞に対する発明物質 1、ゲニステイン標準品、担子菌培養物の IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

	3LL	Colon 26	PC3	Du145	LNCaP
発明物質 1	11.03	1.44	26.09	19.60	23.52
ゲニステイン標準品	31.79	51.22	35.77	55.28	69.40
担子菌培養物	>1000	3.32	>1000	>1000	377.78

表 3 に示すとおり、発明物質 1 はどの培養癌細胞においても高い癌細胞増殖抑制効果を示した。発明物質 1 による各種培養癌細胞に対する増殖抑制の IC_{50} はゲニステイン標準品、担子菌培養物のいずれと比較しても有意に低いことが明らかである。この事実は、発明物質 1 がゲニステイン標準品、担子菌培養物のいずれとも全く異なる物質であることを窺わせるものである。

発明物質 1 の腫瘍細胞増殖抑制作用は、腫瘍細胞のアポトーシス (apoptosis) 誘導が考えられるため、T24 細胞をチャンバースライド内で細胞数を 50000 で 24 時間培養し、発明物質 1 を $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう培地に加えて更に 48 時間培養した後、スライド上の細胞を固定して TUNEL 染色キットで染色したところ、発明物質 1 の処理により癌細胞のアポトーシスが明瞭に認められた。 40

i v) 腫瘍細胞のアポトーシス誘導作用

発明物質 1 による腫瘍細胞のアポトーシス誘導作用を DNA レベルで確認するため、アポトーシスを起した細胞の遺伝子に特異的に見られる DNA ラダーを電気泳動法で検索した。

方法：SHR/NCrj ラット (雄, 6 週齢) の皮下に SST-2 (ヒト乳腺ガン) を接種し、腫瘍の形成が確認された後に発明物質 1 を 1% 含有する水を自由摂取により 2 週間投与し、更に 1 週間、発明物質 1 を 10% 含有する水を強制経口投与した。対照群には 0.05% NaHCO_3 水溶液を、3 週間自由摂取させた。その後腫瘍組織から DNA を抽 50

出して電気泳動を行い、DNAラダーを検索した結果、発明物質1を投与した群にはDNAラダーが明瞭に認められ、発明物質1はDNAレベルにおいてもアポトーシスを誘導していることが明らかとなった。

また、発明物質1を投与したラットの乳ガン細胞の成長、分裂及び分化の過程（細胞周期）における細胞数を核DNAの染色により分析するフローサイトメトリー法によって、発明物質1による腫瘍細胞のアポトーシス誘導作用を調べた。

細胞培養：10% FBS（ウシ胎児血清）含有DMEM培地中で培養したSST-2ラット乳ガン細胞（ $10 \times 10^6 / \text{ml}$ ）10mlを内径10cmの培養皿に入れて1時間培養した後、次のように試料を加えた。

対照：DMSO（10 μl ，最終濃度として0.1%以下）

発明物質1処理：発明物質1を100mg/mlの濃度でDMSOに溶解し、10 μl を10mlの細胞培養液中加入した。発明物質1の最終濃度は100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ とした。試料の添加後更に48時間培養し、培養終了後細胞を回収して細胞懸濁液を70%エタノールで24時間固定し、0.1%グルコース及びRNase（100U/ml）を含むPBS（リン酸緩衝生理食塩水）に室温で30分間、再懸濁した。細胞はフローサイトメトリーの直前にプロピジウムアイオダイド（propidium iodide）（PI：50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ ）を用いて10分間染色した。発明物質1で処理したSST-2細胞の細胞周期をフローサイトメトリーにより分析した。

その結果、発明物質1で処理したSST-2細胞は、細胞周期におけるDNA合成と細胞分裂の間のギャップ（G1期）とDNA合成期（S期）にかけての期間（G1S期）において停止しており、細胞がDNAを合成できなくなった状態を示した。G1S期のDNA含有量は全体の65.48%から55.91%に減少しており、発明物質1による処理でSST-2細胞のアポトーシスを起した細胞は1.94%から5.20%に増加した。この結果から、SST-2細胞はG1S期の停止によりアポトーシスを誘導していることが明らかである。

大豆イソフラボン類、ゲニステイン、担子菌抽出物等が細胞のアポトーシスを誘導することは、既に知られているが（例えばCancer Res. 58, 5231-38, 1998, Jpn. J. Cancer Res. 91, 164-173, 2000, Biochem. Biophys. Res. Commun., 194, 944-950, 1992, J. Nat. Prod. 1998, 61, 485-487等）、前述の通り、発明物質1は明らかにゲニステインや担子菌培養物とは全く異なる物質であり、発明物質1の癌細胞に対するアポトーシス誘導作用は、本発明者らが初めて発見したものである。

v) 腫瘍血管新生抑制試験（in vitro）

ダブルチャンバー法による血管新生抑制試験を行った。

本試験では、細胞培養プレートにマウス大腸癌細胞Colon 26を培養し、そのウェルの内側に直径8 μm の穴の開いたウェルを挿入して、内側ウェルに敷かれたコラーゲンゲル上でマウス脳血管内皮細胞LE-1を培養した。内側のウェルの底の穴から外側のウェル内の大腸癌細胞から産成される血管内皮細胞刺激因子による刺激を受けて新生血管が形成される。血管の新生が確認されたところで、発明物質1を外側のウェルに加え、更に3日間培養する。培養後コラーゲンゲル上の細胞を写真撮影し、コンピュータによる画像処理を経て画像解析ソフトNIHイメージ（NIH Image）を用いて形成された血管内皮細胞による管腔の長さの合計、及び内皮細胞数を計測し、正常細胞の管腔長に対する割合から血管新生抑制率を算出した。結果は表4に示すとおりであり、発明物質1で処理したものは新生血管が大きく消失していた。

表4：発明物質1の腫瘍血管新生抑制効果(in vitro)

	細胞数	管腔長	血管新生抑制率(%)
無処理細胞	22	1593	—
発明物質1	1	70	95.6

v i) 腫瘍血管新生抑制試験 (i n v i v o)

背部皮下法による i n v i v o の腫瘍血管新生抑制試験を行った。両面にポアサイズ 0.45 μ m のフィルター（ミリポア社製）を貼ったミリポアリングをマウス大腸癌 C o l o n 26 (1×10^7 c e l l) で満たし、B A L B / c マウス背皮下に移植した。発明物質 1 を 1 日あたり 1 g を強制経口投与し、チャンバー移植から 5 日目にチャンバーを摘出して血管の分布を写真に記録した。写真はコンピュータに取込み、画像解析ソフト N I H I m a g e を用いてグリーンフィルター処理し、分布血管を二値化処理した後、移植部位における血管の面積から面積率を計測した。結果を表 5 に示す。腫瘍細胞処理されたマウスでは C o l o n 26 誘導皮下血管の面積は正常マウスの約 2 倍であったのに対し、発明物質 1 摂取マウスでは正常マウスと変わらず、発明物質 1 の経口摂取により腫瘍血管新生が顕著に抑制されたことが明らかとなった。

10

表 5：発明物質 1 の腫瘍血管新生抑制効果 (i n v i v o)

	面積	面積率(%)
正常（無処理）	3854	12.8
腫瘍細胞処理	7200	26.9
発明物質 1 処理	3018	10.8

v i i) 血管新生抑制試験 (e x o v o)

20

鶏受精卵を用いた C A M 法 (c h o r i o a l l a n t o i c m e m b r a n e) による e x o v o 血管新生抑制試験を行った。卵黄膜上の血管の新生を観察する方法で、卵黄上に血管新生抑制物質を投与して、血管新生の抑制を卵殻を開いて直接観察できる。10 日齢の鶏卵を 37℃、湿度 60% で 3 日間培養した後卵殻に小さい穴を開け、注射針で 3 m l の卵白を吸出して穴を防水テープで塞ぎ、更にこの穴の反対側に 10 × 1.0 c m の窓を開け、胚に血管が形成されているのを確認してから窓を塞いで、更に 3 日間培養した。その後、発明物質 1 を滅菌したリン酸緩衝食塩水溶液として窓から卵内に加え、更に 4 日間培養した後卵殻を開いて卵黄膜上の血管の分布を写真に記録した。この写真をコンピュータに取込み、画像解析ソフト N I H I m a g e を用いてグリーンフィルター処理し、分布血管を二値化処理した後、移植部位における血管の面積から面積率を計測した。結果を表 6 に示す。発明物質 1 での処理によって卵黄膜上に分布する血管の面積は減少し、正常卵に対して抑制率は 86.4% という高い値を示し、血管新生抑制効果が明らかとなった。

30

表 6：発明物質 1 の血管新生抑制効果 (e x o v o)

	面積	面積率(%)	抑制率(%)
正常卵（無処理）	87167	38.3	—
発明物質 1 処理	11862	5.2	86.4

実施例 2：イソフラボン類含有材料存在培地での担子菌の培養 (2)

40

下記の原料を用い、実施例 1 と同様の条件で培養を行って本発明の物質（発明物質 2）を得た。

(1) 原料

a. イソフラボン類含有材料

北海道産全粒大豆（ゲニスチン 0.730 m g / g、ゲニステイン 0.041 m g / g 含有、いずれも無水物換算）を水道水に一晩浸漬して吸水させ、10 倍量の水を加えて約 100℃ で 30 分煮沸した後固形分を除去した豆乳。

イソフラボン含有量は以下の通り：

イソフラボン含有量 (μ g / m l)：

ダイジン 11.68

50

ダイゼイン 2. 5 1
 ゲニスチン 4 5. 2 2
 ゲニステイン 3. 5 1
 グリシチン 5. 6 2
 グリシテイン 1 1. 3 3

b. 担子菌

(株) アミノアップ化学でマルツエキス寒天培地に 2 5℃で保管した椎茸菌 (L e n t i n u s e d o d e s)。

(2) 得られた本発明の物質 (発明物質 2) は発明物質 1 同様の褐色の微粉末であり、下記の化学的、生理学的特性を有する (測定方法は実施例 1 に同じ)。

a) 化学的特性

1) 水分 0. 9 %
 2) タンパク質 1 2. 9 %
 3) 脂質 1. 3 %
 4) 糖質 7 3. 9 %
 5) 食物繊維 3. 1 %
 6) 灰分 7. 9 %
 7) イソフラボン類 (凍結乾燥粉末 1 g あたり)

ダイジン 痕跡

ダイゼイン 2 0. 5 0 m g

ゲニスチン 痕跡

ゲニステイン 3 7. 2 0 m g

グリシチン 痕跡

グリシテイン 8. 4 9 m g

b) 生理学的特性

実施例 1 記載の方法と同様の方法により、発明物質 2 について腫瘍細胞増殖抑制試験 (i n v i t r o)、血管内皮細胞増殖抑制試験 (i n v i t r o)、腫瘍血管新生抑制試験 (i n v i t r o)、腫瘍血管新生抑制試験 (i n v i v o)、血管新生抑制試験 (e x o v o) を行った。結果を表 7 ~ 1 1 に示す。

表 7 : 発明物質 2 の各種培養癌細胞に対する増殖抑制率 (%) (i n v i t r o)

発明物質 2 濃度 (μ g / m l)	B-16	Colon 26	SST-2	Du145	T-24
12. 5	23. 2	7. 9	20. 8	17. 1	0. 0
25. 0	52. 2	23. 9	58. 5	30. 0	9. 6
50. 0	75. 4	41. 8	65. 4	37. 1	28. 1
100. 0	86. 0	73. 3	84. 6	69. 8	54. 5

表 7 から明らかとなっており、発明物質 2 は各種培養癌細胞について高い抑制率を示し、癌細胞増殖抑制効果が高いことが明らかとなった。

表 8 : 発明物質 2 のマウス脳血管内皮細胞に対する増殖抑制率 (%)

発明物質 2 濃度 (μ g / m l)	L E - 1
12. 5	39. 6
25. 0	36. 2
50. 0	52. 9
100. 0	61. 3

表 8 から明らかとなっており、発明物質 2 では濃度依存的に高い脳内血管内皮細胞増殖抑制効

果が認められ、血管新生抑制作用を有することが明らかとなった。

表 9：発明物質 2 の腫瘍血管新生抑制効果(in vitro)

	細胞数	管腔長	新生血管抑制率(%)
正常細胞（無処理）	22	1593	—
発明物質 2 処理	16	1366	14.3

表 9 から明らかなとおり、発明物質 2 で処理されたものは新生血管が減少しており、14.3%の高い抑制率を示した。

表 10：発明物質 2 の腫瘍血管新生抑制効果(in vivo)

	面積	面積率(%)
正常（無処理）	3854	12.8
腫瘍細胞処理	7200	26.9
発明物質 2 処理	2494	10.6

表 10 から明らかなとおり、腫瘍細胞処理したマウスでは Colon 26 誘導皮下血管の面積は正常マウスの約 2 倍であるのに対し、発明物質 2 を投与したマウスでは正常マウスと変らなかった。従って、発明物質 2 の摂取により腫瘍血管新生が抑制されたことが明らかとなった。

表 11：血管新生抑制効果(ex ovo)

	面積	面積率(%)	抑制率(%)
正常細胞（無処理）	97167	38.3	—
発明物質 2 処理	34300	14.8	61.3

表 11 から明らかなとおり、発明物質 2 の処理により卵黄膜上に分布する血管の面積は減少し、正常卵に対して 61.3%の高い抑制率を示し血管新生抑制効果が認められた。

比較例：担子菌の単独培養物とゲニステインとの混合物の生理作用

担子菌として実施例 1 と同様の霊芝菌を用い、イソフラボン類含有材料の添加を省略した以外は実施例 1 と同様の条件で培養、凍結乾燥等を行って褐色の乾燥粉末（比較物質 1）を得た。比較物質 1 の化学的特性は以下のとおりである（分析法は実施例 1 と同じ）。

化学的性質

水分	1.6%
タンパク質	12.9%
脂質	1.6%
糖質	71.4%
食物繊維	3.8%
灰分	8.7%

次いで比較物質 1 の 94 g を 1 L の水に分散させて全体を 60℃に加温し、ゲニステイン（シグマ社製）6 g を加えて 30 分間攪拌を続けた後、全体を真空凍結乾燥して乾燥粉末（比較物質 2）を得た。

発明物質 1、発明物質 2、比較物質 1 及び比較物質 2 について ex ovo による血管新生抑制試験、及び担癌マウスを用いた in vivo 抗腫瘍試験を行った。ex ovo による血管新生抑制試験は実施例 1 と同様に行い、また担癌マウスによる in vivo の腫瘍増殖抑制試験は下記の方法で行った。

B-16メラノーマ細胞（ 1×10^5 cell）を C57/BL マウスに皮下移植し、発明物質 1、2 及び比較物質 1、2 をそれぞれ 5% の濃度で粉末飼料に混合し、腫瘍を移植すると同時に 21 日間自由摂取させた。21 日目に腫瘍を摘出し、質量を測定した。

これらの試験結果を表 1 2 及び表 1 3 に示す。

表 1 2 : 血管新生抑制効果の比較(ex ovo)

	面積率(%)	抑制率(%)
対照(無処理)	38.3	—
発明物質 1	5.2	86.4
発明物質 2	14.8	61.3
比較物質 1	27.0	29.5
比較物質 2	23.0	40.0

10

表 1 3 : 担癌マウスの腫瘍増殖抑制効果の比較(in vivo)

	腫瘍重量(平均値 g)	標準偏差
対照(無処理)	1.44	0.59
発明物質 1	0.28	0.32 対照に対し0.1%以下で有意
発明物質 2	0.68	0.34 対照に対し1%以下で有意
比較物質 1	1.35	0.56 対照と有意差なし
比較物質 2	0.83	0.59 同 上

20

表 1 2 及び表 1 3 から明らかなように、ex ovo による血管新生抑制効果及び担癌マウスによる腫瘍増殖抑制効果は比較物質 1 及び比較物質 2 では対照と変わらないのに対し、発明物質 1 及び発明物質 2 では高い抑制効果を示すことが確認された。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 R 1/645 (2006.01) C 1 2 P 17/06
C 1 2 R 1:645

(72)発明者 三浦 健人
北海道札幌市清田区真栄 3 6 3 番 3 2 号 ハイテクヒル真栄 株式会社アミノアップ化学内
(72)発明者 孫 歩祥
北海道札幌市清田区真栄 3 6 3 番 3 2 号 ハイテクヒル真栄 株式会社アミノアップ化学内

審査官 小川 明日香

(56)参考文献 特開昭 6 1 - 0 0 9 2 8 0 (J P , A)
特開昭 6 1 - 0 4 0 7 8 6 (J P , A)
特開平 1 0 - 0 7 5 7 3 9 (J P , A)
特開昭 5 6 - 0 6 8 3 6 4 (J P , A)
特開平 0 6 - 1 7 8 6 1 6 (J P , A)
特開平 1 1 - 0 8 9 5 8 9 (J P , A)
特表平 0 9 - 5 0 3 7 8 1 (J P , A)
特開平 0 8 - 2 1 4 7 8 7 (J P , A)
特開昭 5 9 - 0 4 1 3 0 2 (J P , A)
Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 1 9 9 4 年, Vol.41, pp.23-31
Biodegradation, 1 9 9 4 年, Vol.5, pp.13-19

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)
C12P 17/06
A61K 31/352
A61K 36/07
A61P 35/00
C12N 1/14
C12R 1/645
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)