

実験成績証明書

実験報告日：平成19年2月9日

実験報告者：鹿児島大学 農学部

生物資源化学科

藤井 信



1. 実験の目的

特願2000-52396の特許請求の範囲（以下、本願発明という）に記載した「ワカメの芽株を海水または塩水で洗浄する洗浄工程と、前記洗浄工程で洗浄された芽株を低温乾燥させる又は凍結乾燥させる乾燥工程と、前記乾燥工程で乾燥された芽株を低温下で粉砕する粉砕工程と、芽株粉体に水を加えて加熱攪拌し抽出する抽出工程と、前記抽出工程で得られた抽出液を濾過した後、抽出液を乾燥して粉末フコイダン様多糖体を得る工程と、を備えた製造方法」で得られた「フコイダン様多糖複合体（精製していないためフコイダン以外の水溶性成分を含有している本発明品）」、該抽出液を精製して得られた「精製フコイダン（比較例）」を、飼料に混ぜてマウスへ各々与え、腫瘍細胞増殖抑制効果を比較し、本願発明の効果を確認する。

本実験は、平成18年12月18日付け提出の実験成績証明書で示した実験とは異なり、「フコイダン様多糖複合体」と、その「フコイダン様多糖複合体」に含まれるフコイダンの量にほぼ相当する「精製フコイダン」と、をマウスへ与え、「フコイダン様多糖複合体」と「精製フコイダン」の腫瘍細胞増殖抑制効果を比較するものである。これにより、腫瘍細胞増殖抑制効果について、「フコイダン様多糖複合体」に含まれるミネラル類、褐藻色素とフコイダンとの相乗効果と、「精製フコイダン（フコイダン単体）」の効果とを比較し、本願発明の効果を確認する。

2. 実験方法及び実験結果

特願2000-52396の願書に最初に添付した明細書（以下、当初明細書という。）の実施例1（当初明細書の段落〔0024〕欄）に記載されているのと同様にして、実施例のフコイダン様多糖複合体を得た。また、実施例のフコイダン様多糖複合体の製造過程で得られた抽出液を精製して、比較例の精製フコイダンを得た。

以下、試料の製造方法を説明する。

（1）試料の製造方法

（実施例）

ワカメの芽株を採取して海水で洗浄した後、一昼夜天日で乾燥することによって低温乾燥した。次いで、乾燥された芽株を石臼で摩砕することによって低温粉砕し、芽株粉体を得た。粒径は35～170メッシュであった。

芽株粉体10kgに水150Lを加えて攪拌し、85～90℃まで加熱し

6時間抽出して抽出液を得た。次いで、フィルタ（目開き10 μ m）で濾過した後、フィルタを通過した抽出液を噴霧乾燥し40メッシュ以下のものを回収して、実施例のフコイダン様多糖複合体を得た。

（比較例）

実施例と同様にして得られた噴霧乾燥前の抽出液に、塩化カルシウム溶液を加えてアルギン酸を沈殿させ、沈殿を遠心分離によって除去した後、水透析した。次に、DEAEセルロース（C1型）のカラムをpH2の塩酸溶液で平衡化し、水透析液をカラムに供した。硫酸基をもたない糖はこの条件ではカラムに吸着せず、硫酸基をもつフコイダンはカラムに吸着される。次いで、カラムに塩化ナトリウム水溶液（濃度3M）を通ずることにより、カラムに吸着したフコイダンを溶出させた。溶出面分を透析し凍結乾燥することによって、比較例の精製フコイダンを得た。

（2）試料の分析

実施例のフコイダン様多糖複合体、比較例の精製フコイダンの成分分析を行った。その結果を表1に示す。

表1 分析試験結果

分析項目	実施例	比較例	分析方法
水分	5.9 g/100 g	3.5 g/100 g	常圧加熱乾燥法
タンパク質	5.4 g/100 g	検出せず	ケルダール法 ※1
脂質	0.3 g/100 g	検出せず	ソックスレー抽出法
灰分	38.5 g/100 g	0.5 g/100 g	直接灰化法
食物繊維	22.4 g/100 g	1.5 g/100 g	酵素—重量法
ナトリウム	5.91 g/100 g	検出せず	原子吸光光度法
不溶性固形分	2%	0%	※2
リン	257mg/100 g	3mg/100 g	バナドモリブデン酸吸光光度法
鉄	6.59mg/100 g	0.5mg/100 g	オーフェナントロリン吸光光度法
カルシウム	549mg/100 g	8mg/100 g	過マンガン酸カリウム容量法
マグネシウム	733mg/100 g	9mg/100 g	原子吸光光度法
ナイアシン	27.6mg/100 g	検出せず	微生物定量法
亜鉛	291 μ g/100 g	検出せず	原子吸光光度法
フコイダン	26.7 g/100 g	92 g/100 g	※3

※1 窒素・タンパク質換算係数：6.25

※2 検体1gに60℃の水100gを加えて15分間攪拌し、15000rpmで30分間遠心分離して試験した。

※3 0.5mol/L 硫酸で沸騰浴中 2.5 時間加水分解して Gibbons 法により測定したフコース量 (0.9 を乗じて加水分解前の量に補正した値) を基に、フコイダン中に占めるフコースの割合を 15% としてフコイタン量に換算した。

表 1 から、実施例のフコイタン様多糖複合体は、比較例の精製フコイタンと比較して、100 g 当たりのフコイタンの含有量は約 1/3 であるが、リン、鉄、カルシウム、マグネシウム、亜鉛のミネラル含有量と、ナイアシン (ビタミン) の含有量が多いことが確認された。

実施例のフコイタン様多糖複合体は、クロマトグラフィ等の精製処理を行っていないことから褐藻色素 (上記の分析対象外) も含まれている。そのため、フコイタン様多糖複合体は、フコイタン、ミネラル類、褐藻色素との相乗効果によって、精製フコイタンと同等以上の免疫賦活効果が期待される。

(3) 腫瘍細胞増殖の抑制効果の比較検討

(a) 飼料の調製及びマウスの飼育

市販標準飼料 (日本MRストック) 1~2 g に、実施例のフコイタン様多糖複合体を 11.5 mg 添加し、充分量の水を加えて練り、団子状の実施例 1 の飼料 (Spoidan 11.5mg と表記) を得た。

市販標準飼料 1~2 g に実施例のフコイタン様多糖複合体を 1.15 mg 添加するとともに、フコイタン様多糖複合体 11.5 mg 添加時と繊維、タンパク質、ナトリウムが同量になるようにセルロース (繊維)、ガゼイン (タンパク質)、食塩を添加し、充分量の水を加えて練り、団子状の実施例 2 の飼料 (Spoidan 1.15mg と表記) を得た。

市販標準飼料 1~2 g に比較例の精製フコイタンを 3 mg 添加するとともに、フコイタン様多糖複合体 11.5 mg 添加時と繊維、タンパク質、ナトリウムが同量になるようにセルロース (繊維)、ガゼイン (タンパク質)、食塩を添加し、充分量の水を加えて練り、団子状の比較例 1 の飼料 (Fucoidan 3mg と表記) を得た。なお、比較例の精製フコイタン 3 mg は、実施例のフコイタン様多糖複合体 11.5 mg に含まれるフコイタンの量にほぼ相当する。

市販標準飼料 1~2 g に比較例の精製フコイタンを 0.3 mg 添加するとともに、フコイタン様多糖複合体 11.5 mg 添加時と繊維、タンパク質、ナトリウムが同量になるようにセルロース (繊維)、ガゼイン (タンパク質)、食塩を添加し、充分量の水を加えて練り、団子状の比較例 2 の飼料 (Fucoidan 0.3mg と表記) を得た。なお、比較例の精製フコイタン 0.3 mg は、実施例のフコイタン様多糖複合体 1.15 mg に含まれるフコイタンの量にほぼ相当する。

市販標準飼料 1~2 g に、フコイタン様多糖複合体 11.5 mg 添加時と繊維、タンパク質、ナトリウムが同量になるようにセルロース (繊維)、ガゼイン (タンパク質)、食塩を添加し、充分量の水を加えて練り、団子状の飼料 (Control と表記) を得た。

マウスのがん細胞サルコーマ180 (2×10^5 個/0.1 mL)を皮下移植したB a l b / cマウス1匹ずつに、実施例1、2、比較例1、2及びコントロールの団子状の飼料を1日1個ずつ与え、14日間飼育した。なお、団子状の飼料以外の市販標準飼料は、マウスが自由に食することができるようにした。

本実験の実施例2でマウスに与えた「フコイダン様多糖複合体」の重量は、平成18年12月18日付け提出の実験成績証明書で示した実施例2でマウスに与えた「フコイダン様多糖複合体」の約1/5であったが、以上のように、フコイダン様多糖複合体や精製フコイダンを練り込んだ団子状の飼料をマウス1匹ずつに与えることにより、全ての検体マウスに微量のフコイダン様多糖複合体等を確実に与えることができた。

(b) 腫瘍の重量測定結果及び評価

14日間の実験飼育期間終了の翌日にマウスを解体し、サルコーマ180により生じた腫瘍組織の重量を測定した。

図1は各飼料と腫瘍重量の平均値との関係を示す図である。

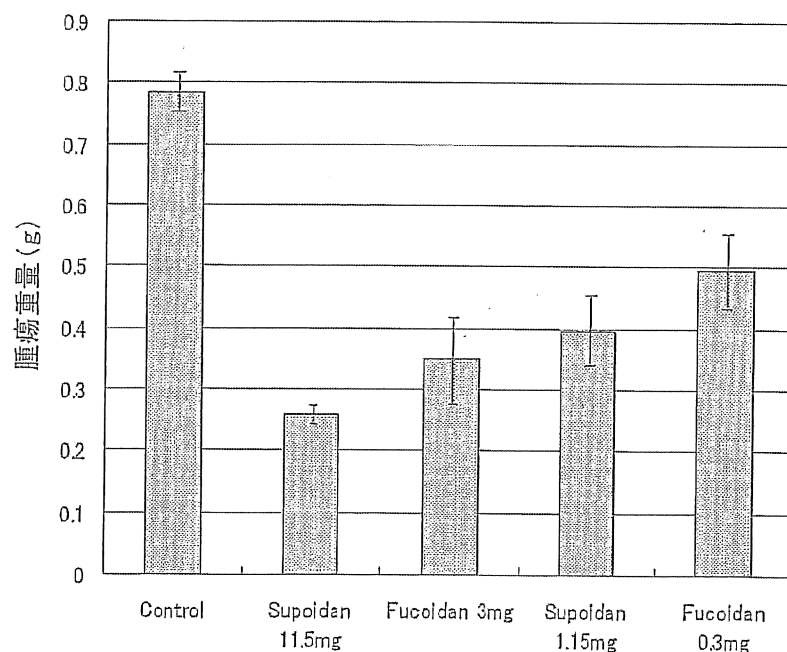


図1 各飼料と腫瘍重量の平均値との関係を示す図

図1から、実施例1 (Spoidan 11.5mg)、比較例1 (Fucoidan 3mg)の飼料で飼育したマウスの腫瘍重量を比較すると、実施例1 (Spoidan 11.5mg)の腫瘍重量は、比較例1 (Fucoidan 3mg)の腫瘍重量より小さいことが明らかである。また、実施例2 (Spoidan 1.15mg)、比較例2 (Fucoidan 0.3mg)の飼料で飼育したマウスの腫瘍重量を比較すると、実施例2 (Spoidan 1.15mg)の腫瘍重量

は、比較例 2 (Fucoidan 0.3mg) の腫瘍重量より小さいことが明らかである。

以上のことから、フコイダン様多糖複合体を添加した飼料で飼育したマウスの腫瘍重量は、フコイダン様多糖複合体に含まれるフコイダンの量にほぼ相当する精製フコイダンを添加した飼料で飼育したマウスの腫瘍重量より小さいことが明らかである。

3. 考察

本願発明の実施例のフコイダン様多糖複合体を添加した実施例 1, 2 の飼料でマウスを飼育することによって、実施例のフコイダン様多糖複合体に含まれるフコイダンの量にほぼ相当する精製フコイダンを添加した比較例 1, 2 の飼料でマウスを飼育した場合と比較して、腫瘍の重量増加を抑制することができた。これは、フコイダン様多糖複合体に豊富に含まれるミネラル類、褐藻色素とフコイダンとの相乗効果によって、フコイダンの含有量がほぼ同じ精製フコイダンよりも免疫賦活効果が高く、顕著な腫瘍増殖抑制効果が得られたのではないかと推察している。

以上の結果から、フコイダンの含有量がほぼ同じ精製フコイダンよりも免疫賦活効果が高く、顕著な腫瘍細胞増殖抑制効果が得られるフコイダン様多糖複合体を、煩雑な精製操作を行わずに低原価で量産できることが確認された。

4. 結論

以上のように、本願発明の「ワカメの芽株を海水または塩水で洗浄する洗浄工程と、前記洗浄工程で洗浄された芽株を低温乾燥させる又は凍結乾燥させる乾燥工程と、前記乾燥工程で乾燥された芽株を低温下で粉砕する粉砕工程と、芽株粉体に水を加えて加熱攪拌し抽出する抽出工程と、前記抽出工程で得られた抽出液を濾過した後、抽出液を乾燥して粉末フコイダン様多糖体を得る工程と、を備えた製造方法」で得られた実施例のフコイダン様多糖複合体は、引例 1～5 に係る比較例の「精製フコイダン」とフコイダンの含有量がほぼ同じ場合、精製フコイダンよりも免疫賦活効果が高く、顕著な腫瘍増殖抑制効果を実現できることが確認された。このため、精製フコイダンの腫瘍細胞増殖抑制効果と同等以上の効果が得られるフコイダン様多糖複合体を、煩雑な精製操作を行わずに低原価で量産できることが確認された。

以上