

クロレラの糖質に関する研究(8)

| | |
|-------|--|
| 誌名 | 静岡大学農学部研究報告 = Reports of the Faculty of Agriculture, Shizuoka University |
| ISSN | 05598850 |
| 著者 | 水野, 卓 佐藤, 昭夫 左向, 崇 |
| 巻/号 | 37号 |
| 掲載ページ | p. 37-46 |
| 発行年月 | 1988年3月 |

クロレラの糖質に関する研究 (第8報) クロレラエキスの抗腫瘍効果について

水野 卓*¹・佐藤昭夫*¹・左向 崇*²・西土井 睦*²

(昭和62年10月30日受理)

Studies on the Carbohydrates of *Chlorella*. Part VIII. Host-mediated Antitumor Activity of *Chlorella* Extracts.

Takashi MIZUNO*¹, Akio SATOH*¹, Takashi SAKOH*² and Mutsumi NISHIDOI*²

SUMMARY

1. The methods on fractional preparation and chromatographic purification of the biologically active biopolymers from hot water extract of *Chlorella vulgaris* BEYERINCK cell were investigated (Figures 1 and 2).
2. A numerous fractions, i.e., neutral glycans, acidic glycans, glycoproteins, peptidoglycans and nucleic acid protein complexes etc., were isolated by the various fractionation procedures from *Chlorella* extract, and then the antitumor screening test carried out according to Sarcoma 180/mice, i.p. or p.o. methods (Tables I to V).
3. Then, we selected the following antitumor active fractions from *Chlorella* extract (Tables III to V).
Water soluble neutral glycans: FI₀, FI₀-1, FI₀-2 and FI₀-3.
Water soluble acidic glycans: FA-1a, FA-1c, FA-2 and FA-3.
4. Two active fractions, the peptidoglycan FA-1c and the ribonucleic acid protein complex FA-3, showed the lower motarity in mice (Table V).

緒 言

クロレラの生物活性に関与している成分として葉緑素, ビタミン, ミネラル, アミノ酸, リン脂質, ヌクレオシドやヌクレオチドなど低分子成分の他に, 高分子物質として蛋白, 核酸, 中性多糖, 酸性多糖, 糖蛋白, 蛋白多糖, 繊維質などが指摘されているが,

特に後者については化学構造と活性相関まで明確になった有効成分は現在のところ見当たらない。

我々は, クロレラの生物活性研究を進めるに当り, クロレラが生産する高分子物質で, 他の生物(動物, 植物, 微生物)に対して生物学的反応を賦活あるいは改善させる効果のある物質を活性高分子物質(BABP, Biologically Active Bio-polymer of *Chlorella*)と定義している。BABPの作用は比較的温和(緩慢)であるが, 副作用は殆んど認められないのが特徴である。

我々は, 今日までに, クロレラの熱水抽出物(ExあるいはCVE, *Chlorella vulgaris* BEYERINCK Extract)から各種クロマト法を駆使してBABPの分別と細分画を試みて来た。得られた幾つかの高分子画分の理化学性

前報 文献 7)

*¹ 静岡大学農学部 生物化学研究室

Laboratory of Biochemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University

*² クロレラ工業株式会社

Chlorella Industry Co., Ltd.

を明らかにするとともに、それらの抗腫瘍活性、網内系食能亢進活性、血圧降下活性、変異抑制効果、阻害酵素能回復活性、血糖降下活性、魚類に対する生育効果や摂餌効果を試験し報告して来た。¹⁻⁹⁾

一方では、我々は、サルノコシカケなどきのこ類の制癌性多糖の構造と活性相関、利用について研究を進展させている。この制癌性スクリーニング系

(Sarcoma 180/mice, i.p. or p.o. 投与方法¹⁰⁾) を使って、ここ10年来、数回にわたって動物試験したところ、クロレラから得られた幾つかの高分子画分に確かな抗腫瘍活性を認めた。なお、かつ、腫瘍増殖抑制率は低くとも担癌状態のまま動物の延命効果が大きることが認められた。クロレラエキスと抗腫瘍効果について報告する。

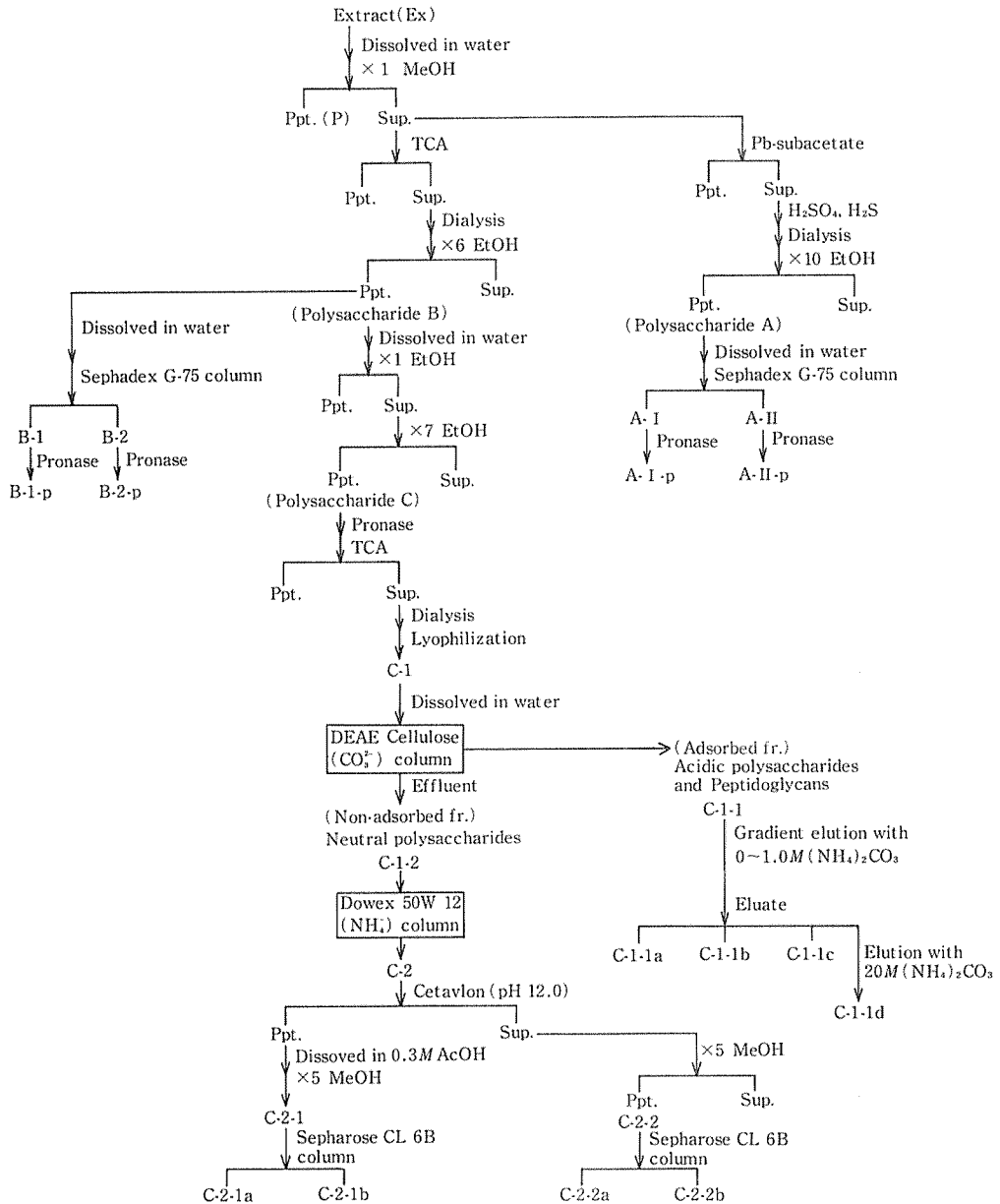


Fig. 1. Fractionation Procedure of Chlorella Extract (CVE).

実験方法

1. クロレラエキスの分別と細分画

既報¹⁻⁴⁾に準じ、Fig.1とFig.2のように改良した。クロレラの熱水抽出エキスをアルコール沈澱、トリクロロ酢酸処理、Pronase 処理、DEAE-Cellulose

カラム、Dowex 50 W 12カラム、Sephadex CL-6Bカラム、Sephadex 50, 75, 100, 150の各カラム、Con A-Sephadex CL-4B アフィニティカラムなどの適宜組合せ法によって分別・細分画し、最後に凍結乾燥粉末とした。

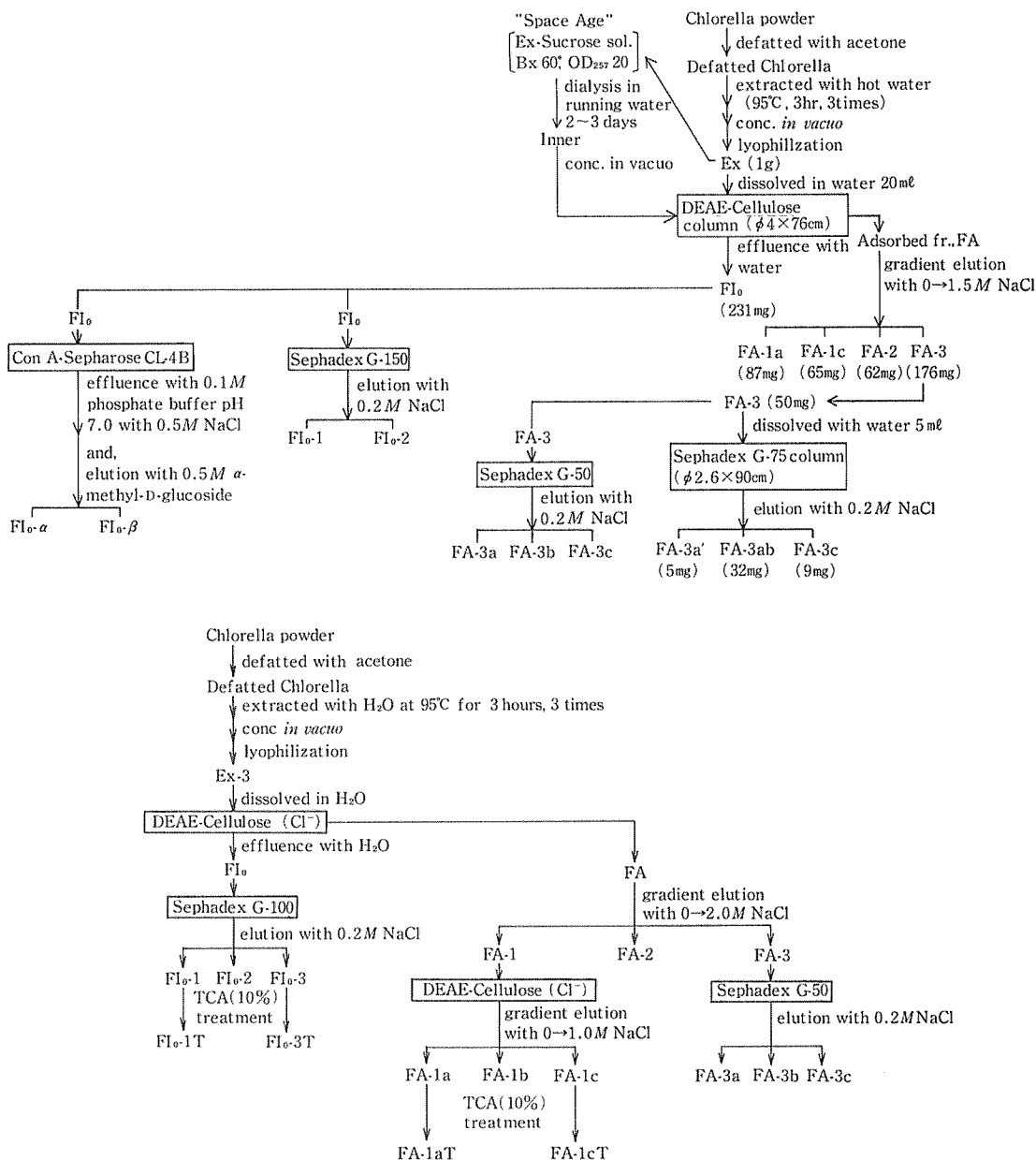


Fig. 2. Fractional Preparation of Some Biopolymers from Chlorella Cells.

2. 抗腫瘍試験

既報¹⁰⁾に従ってSarcoma 180/mice, i.p. or p.o.法を実施し、対照(生理的食塩水)と比較した。腫瘍移植後25日目の腫瘍増殖抑制率(%), 45日目の腫瘍完全消失頭数などを測定した。

3. 活性画分の理化学的検定

既報¹⁴⁾に準じて、平均分子量(ゲル濾過法), IR-スペクトル(Fig. 3), PMRスペクトル, 比旋光度, 構成糖組成, 構成塩基, アミノ酸分析などを実施した。

結果および考察

Fig. 1およびFig. 2の分画法によって得た数多く

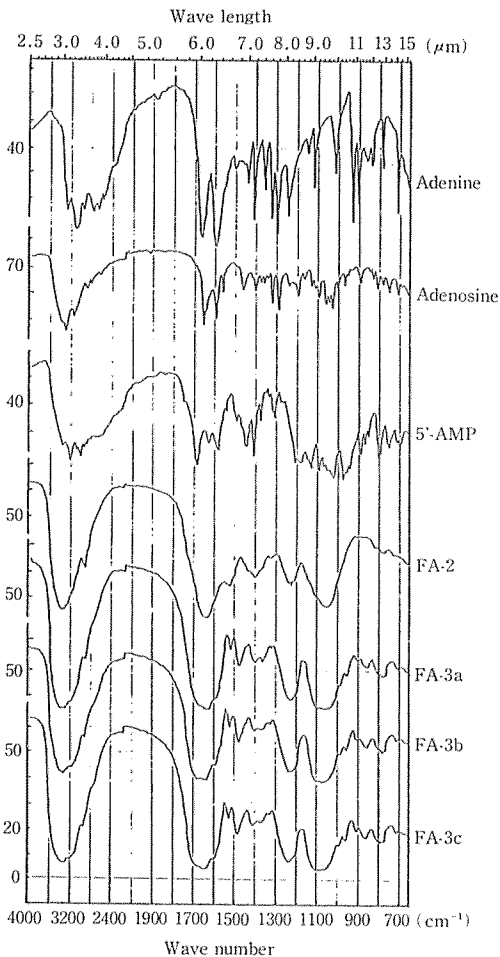


Fig. 3. IR-Spectra of FA-2, FA-3a, FA-3b, FA-3c from Chlorella Extract.

の画分について1980~1986年にかけて抗腫瘍試験を実施した。結果をTable I~Vに纏めた。

1. 1980年度の試験成績

クロレラエキスには弱いながら抗腫瘍活性(i.p.投与による腫瘍増殖抑制率40%)が認められた(Table I)。Fig. 1の分別法によって得た画分のうちB-2の腫瘍抑制率33%, C-2では24%, その他には活性は認められなかった。また、経口投与(p.o.)によっても活性の発現や増大は見られなかった(Table II)。

2. 1984年度の試験成績

クロレラエキスの分画法をFig. 1からFig. 2に改良した。得られた画分の抗腫瘍効果をTable IIIに示した。

Exを分画することによって腫瘍抑制率(16%)が増大し、中性多糖(FI₀ 37%, FI₀-1 39%), 酸性多糖(FA-2 21%), 核酸画分(FA-3 25%)に集中する傾向が見られた。

3. 1985年度の試験成績

Exの分画法は前項と同じであるが、試験画分の違いと投与量の工夫によって、FA-1aの腫瘍抑制率86%と高い活性が観察された。この他FI₀-2 16%, FI₀-3 39%の中性多糖画分とFA-1a 86%に次いでFA-2 24%など酸性多糖画分に抗腫瘍活性が確認された(Table IV)。

比較的強い抗腫瘍活性を示したFA-1aは、平均分子量100万, $[\alpha]_D^{25} -11.6'$ (水), 蛋白:多糖 = 30:70%から成り、多糖部の糖組成はGal, Man, Glc, Rha, Xyl, Ara, Fuc = 42:15:11:8:7:6:5(モル比), 蛋白部分のアミノ酸組成(%)はAsp10.9, Thr 6.8, Ser 5.6, Glu 13.7, Gly 6.5, Ala 9.7, Val 6.1, CySH 0.2, Met 1.8, Ileu 3.7, Leu 9.6, Tyr 2.8, Phe 4.4, Lys 6.5, His 1.6, Arg 5.0, Pro 5.1である(Table VII)。即ち、FA-1aは蛋白ヘテロ多糖(Peptidoheteroglycan)の一種と考えられる。

4. 1986年度の試験成績

Table Vに示したように、マウス7頭を一試験群とし、検体20mg/kgを10回i.p.投与後、14日、21日、28日目の腫瘍増殖抑制率を測定した。FI₀, FA-1a, FA-1c, FA-3など中性多糖, 蛋白多糖, 核酸複合体画分に腫瘍抑制率20~50%の活性が認められた。

その上、注目すべきは、対照群(無投与の担癌マウス)では腫瘍移植後5週目には全部死亡するのと対照的に、Exから得たFA-1c(蛋白多糖体), FA-3(核酸複合体)をi.p.投与した試験区においては、担癌状態にありながら(腫瘍抑制率は45~47%), マウスの死亡率0/7(0%)を示し、カワラタケ菌糸体から得られたβ-グルカン蛋白複合体(PS-K, Krestin, 免疫賦活制癌剤)と同価の延命効果が認められた。このことは特記すべき結果であり、その理由、機作

などについては今後の詳しい研究に期待したい。

腫瘍抑制率は45~47%と余り高くないが、マウスの死亡率の非常に低い、即ち延命効果が顕著であったFA-1a(3項参照)とFA-1c(C36.81%, H5.90%, H5.90%, N3.95%, [α]_D-17.0°, 蛋白:多糖=15:31%)は蛋白多糖体である。もう一方、同効果を示したFA-3は核酸複合体である。FA-3はゲル濾過によってFA-3a, -3b, -3cの3つの画分に分別される(Fig. 2)。いずれも分子量1~2万のRNA複

Table I. Antitumor Activity of Polysaccharide Fraction from *Chlorella* against Sarcoma 180 in Mice.

| Fraction | Dose, Rout mg/kg/day ×1* | | Tumor (mm) Treat./Cont. | Inhibition (%) | Judge** | Complete regression | Body Wt. (g) change |
|----------|--------------------------------|----|----------------------------|-------------------|---------|------------------------|------------------------|
| Ex | 100 | ip | 7.3/12.1 | 40 | ± | 1/5 | +1.0 |
| | 10 | ip | 11.1/12.1 | 8 | — | 0/5 | +1.4 |
| P | 100 | ip | 11.7/12.1 | 3 | — | 0/5 | +1.0 |
| | 10 | ip | 14.2/12.1 | -17 | — | 0/5 | +0.8 |
| A-1 | 100 | ip | 12.0/12.1 | 1 | — | 0/5 | +1.1 |
| | 10 | ip | 11.8/12.1 | 2 | — | 0/5 | +1.0 |
| A-1-P | 100 | ip | 14.0/12.1 | -16 | — | 0/5 | +1.2 |
| | 10 | ip | 13.0/12.1 | -7 | — | 0/5 | +1.0 |
| B-2 | 100 | ip | 8.1/12.1 | 33 | ± | 1/5 | +1.2 |
| | 10 | ip | 12.2/12.1 | -1 | — | 0/5 | +1.5 |
| B-2-P | 100 | ip | 10.6/10.3 | -3 | — | 0/6 | +0.8 |
| | 10 | ip | 10.1/10.3 | 2 | — | 0/6 | +1.3 |
| C | 100 | ip | 10.3/10.3 | 0 | — | 0/6 | +1.5 |
| | 10 | ip | 10.5/10.3 | -2 | — | 0/6 | +1.7 |
| C-1 | 100 | ip | 11.3/10.3 | -10 | — | 0/6 | +1.9 |
| | 10 | ip | 11.0/10.3 | -7 | — | 0/6 | +1.8 |
| C-2 | 100 | ip | 7.8/10.3 | 24 | — | 1/6 | +1.0 |
| | 10 | ip | 9.4/10.3 | 9 | — | 0/6 | +1.6 |
| C-1-1a | 100 | ip | 9.0/10.3 | 13 | — | 0/6 | +1.0 |
| | 10 | ip | 9.8/10.3 | 5 | — | 0/6 | +1.2 |
| C-1-1b | 100 | ip | 9.8/10.3 | 5 | — | 0/6 | +1.0 |
| | 10 | ip | 10.3/10.3 | 0 | — | 0/6 | +1.5 |
| C-1-1c | 100 | ip | 10.7/10.3 | -4 | — | 0/6 | +0.8 |
| | 10 | ip | 10.3/10.3 | 0 | — | 0/6 | +1.5 |
| C-1-1d | 100 | ip | 8.9/10.3 | 14 | — | 1/6 | +1.1 |
| | 10 | ip | 10.1/10.3 | 2 | — | 0/6 | +1.7 |
| Control | Saline | ip | — | — | — | 0/11 | +1.9 |

*1 Injection of Sarcoma 180 cells (2×10^6) was carried out intraperitoneally on day 3.

*2 Criterion for evaluating tumor inhibition are as follows: When the inhibition ratio was 0~25%, the antitumor activity was judged as not-effective (-), 26~50% as slightly effective (±), 51~75% as effective (+), 76~95% as considerably effective (++) and 96~100% as remarkably effective (+++).

Table II. Antitumor Effect of Chlorella Polysaccharide Fraction by Oral Route.

| Fraction | Dose, Route | | Tumor (mm) Treat./Cont. | Inhibition (%) | Judge | Complete regression | Body Wt. (g) change |
|----------|-------------------------------|----|----------------------------|-------------------|-------|------------------------|------------------------|
| | mg/kg/day ×1 ^{*1} | | | | | | |
| Ex | 100 | po | 14.9/16.8 | 11 | — | 0/5 | -0.9 |
| | 10 | po | 15.5/16.8 | 8 | — | 0/5 | +0.3 |
| B-2 | 100 | po | 13.6/16.8 | 19 | — | 0/5 | +0.8 |
| | 10 | po | 15.5/16.8 | 8 | — | 0/5 | +1.4 |
| C-1-1 | 100 | po | 12.6/16.8 | 25 | — | 0/5 | +0.4 |
| | 10 | po | 16.2/16.8 | 4 | — | 0/5 | +1.1 |
| C-1-1d | 100 | po | 13.9/16.8 | 17 | — | 0/5 | +1.0 |
| | 10 | po | 16.5/16.8 | 2 | — | 0/5 | +0.8 |
| Control | Saline | po | — | — | — | 0/5 | +1.5 |

*¹ Administration were carried out orally to a total of 10 doses (Day 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13 and 14).

Table III. Antitumor Activity of Polysaccharides from Chlorella Against Sarcoma 180 in Mice

| Fraction | Dose,* ip (mg/kg/day) ×1 | Average tumor diameter on day 25 (mm) | | Result | Complete regression on day 45 | Body Wt. change (Day 3-6) |
|---------------------|--------------------------------|--|----------------|--------|-------------------------------------|---------------------------------|
| | | Treated/Cont. | Inhibition (%) | | | |
| Ex | 10 | 21.5/22.2 | 3 | — | 0/5 | +0.1 |
| | 100 | 18.6/22.2 | 16 | — | 0/5 | -0.1 |
| F-I ₀ | 10 | 19.5/22.2 | 12 | — | 0/5 | +1.1 |
| | 100 | 14.0/22.2 | 37 | ± | 0/5 | +0.4 |
| F-I ₀ -1 | 4 | 13.5/22.2 | 39 | ± | 1/5 | +0.7 |
| | 40 | 18.5/22.2 | 17 | — | 0/5 | +0.6 |
| F-I ₀ -2 | 10 | 15.0/14.5 | -3 | — | 0/5 | +0.4 |
| | 100 | 18.2/14.5 | -26 | — | 0/5 | -0.4 |
| FA | 8 | 17.8/14.5 | -23 | — | 0/5 | +1.0 |
| | 80 | 14.8/14.5 | -2 | — | 0/5 | +0.6 |
| FA-1 | 4 | 14.4/14.5 | 1 | — | 0/5 | +1.0 |
| | 40 | 13.4/14.5 | 8 | — | 0/5 | +0.1 |
| FA-2 | 5 | 11.4/14.5 | 21 | — | 1/5 | +0.1 |
| | 50 | 16.1/14.5 | -11 | — | 0/5 | -1.0 |
| FA-3 | | 21.7/22.2 | 2 | — | 0/5 | +0.7 |
| | | 16.6/22.2 | 25 | — | 0/5 | +0.9 |

Sarcoma 180 cells (2×10^6) were inoculated subcutaneously into the breast region of female ICR/ JCL mice

* Injection was carried out intraperitoneally on day 3.

Table IV. Antitumor Activity of the Polysaccharide and Nucleotide Fractions from *Chlorella* Extract.

| Fraction | Dose, ip (mg/kg/day)×1 | Average tumor diameter on day 25 (mm) | | Complete regression | Result |
|--------------------|---------------------------|--|-------------------|------------------------|----------|
| | | T/C | Inhibition (%) | | |
| FI ₀ -2 | 7.5 | 14.6/17.0 | 14 | 1/5 | — |
| | 75.0 | 14.2/17.0 | 16 | 1/5 | — |
| FI ₀ -3 | 5 | 16.6/17.0 | 2 | — | — |
| | 50 | 10.3/17.0 | 39 | 2/5 | ± |
| FA-1a | 7.5 | 14.2/17.0 | 16 | — | — |
| | 75.0 | 2.4/17.0 | 86 | 3/4* | ++ |
| FA-1c | 7.5 | 15.7/17.0 | 8 | — | — |
| | 75.0 | | | | toxic** |
| FA-2 | 5 | 13.0/17.0 | 24 | — | — |
| | 50 | 13.7/17.0 | 19 | 1/5 | — |
| FA-3a | 5 | 18.7/17.0 | -10 | — | — |
| | 50 | 17.5/17.0 | -3 | — | — |
| FA-3b | 7.5 | 16.9/17.0 | 1 | — | — |
| | 75.0 | 18.2/17.0 | -7 | — | — |
| FA-3c | 4 | 17.3/17.0 | -2 | — | — |
| | 40 | 15.7/17.0 | 8 | — | — |
| FI ₀ -α | 10 | 16.3/17.0 | 4 | — | — |
| | 100 | 17.1/17.0 | -1 | — | — |
| FI ₀ -β | 7.5 | 16.2/17.0 | 5 | — | — |
| | 75.0 | | | | toxic*** |

* 1/5 died on day 6 ** 4/5 died on day 6 *** 2/5 died on day 6

Table V. Antitumor Effect of Preparations from *Chlorella* Ex against Sarcoma 180

| Expt. group | No. of mice | Dose, ip (mg/kg×day) | Average tumor size (cm ³) Inhibition (%) | | | Complete regression | Mortality at 35 days |
|-----------------|-------------|-------------------------|---|--------------|--------------|---------------------|----------------------|
| | | | 14 days | 21 days | 28 days | | |
| Control | 7 | — | 14.16 (0) | 27.14 (0) | 32.40 (0) | 0/7 | 7/7 |
| FI ₀ | 7 | 20 × 10 | 11.06(21.9) | 20.01(26.28) | 23.21(28.37) | 0/7 | 1/7 |
| FA-1a | 7 | 20 × 10 | 15.42(-8.89) | 24.26(10.62) | 27.15(16.21) | 0/7 | 2/7 |
| FA-1c | 7 | 20 × 10 | 8.95(36.80) | 18.13(33.20) | 17.10(47.23) | 2/7 | 0/7 |
| FA-3 | 7 | 20 × 10 | 12.50(11.73) | 18.09(33.35) | 17.99(44.48) | 2/7 | 0/7 |
| ATSO | 7 | 10 × 10 | 8.59(39.34) | 14.39(46.98) | 8.43(73.99) | 3/7 | 0/7 |

Animal : ICR/SLC female mice.

The preparations were given i.p. once a day for 10 days starting 24 hours tumor implantation.

Average tumor size and inhibition ratio (%) were determined at the end of 14, 21 and 28 days after tumor implantation.

Complete regression of tumors and mortality were compared with those of the control mice at the end of 5 weeks after tumor implantation.

ATSO (Active control) : β-Glucan-protein complex, a kind of PS-K, isolated from the mycelium of *Coriolus versicolor* Iwade strain.

合体と思考される (Table VI)。 $[\alpha]_D + 61^\circ \sim + 83^\circ$, 構成塩基として A, Ap, Gp, Cp, Up の他に数種の修飾ヌクレオチドを含み, 構成糖は大部分が Rib であるが, 少量の Glc, Man, Ara, Xyl, Rha が検出される。りん酸, 灰分も含まれる。FA-3ab には, 別に, 顕著なチャ花粉管生長促進活性を確認している⁷⁾。

5. 他の研究者による試験成績

(1) 松枝らの研究 (1982)¹³⁾

クロレラエキスから DEAE-Cellulose によって分離した "A-2" には Sarcoma 180/mice や白血病 P-388 に対して腫瘍増殖抑制率 70~90% を示すことを報告した。A-2 は平均分子量 70,000, 蛋白:糖 = 1 : 1, 構成糖は Glc を主成分とし, 他に Gal, Man,

Table VI. Chemical Analysis of Some Active-Fractions from Chlorella Extract.

| Fraction | Total N(%) ^{*1} | Protein (%) ^{*2} | Total sugar(%) ^{*3} | Base ^{*4} | Molar % of component sugar ^{*5} | | | | | | | $[\alpha]_D$ | MW ^{*6} |
|----------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------------|--------------------|--|------|------|-----|------|-----|------|--------------|------------------|
| | | | | | Rha | Rib | Ara | Xyl | Man | Gal | Glc | | |
| Fl ₀ - α | 3.10 | 1.4 | 5.5 | none | 10.2 | 3.2 | 11.5 | 8.5 | 11.6 | 7.3 | 40.7 | +3.0° | 400,000 |
| Fl ₀ - β | 7.40 | 6.8 | 58.6 | none | 2.9 | — | 39.4 | — | 12.5 | 7.0 | 34.6 | +14.7° | 400,000 |
| FA-2 | 5.89 | 15.5 | 11.2 | | | | | | | | | +23.2° | |
| FA-3a | 5.25 | 4.5 | 28.2 | A, G, C, U | 3.8 | 78.5 | — | 2.1 | 2.5 | 3.0 | 3.4 | +61.3° | 15,000 |
| FA-3b | 10.29 | 5.8 | 21.7 | A, G, C, U | 1.4 | 93.0 | — | — | 1.6 | 1.8 | 0.6 | +83.0° | 10,000 |
| FA-3c | 3.95 | 5.5 | 15.5 | A, G, C, U | 3.1 | 62.9 | 17.5 | 2.8 | 6.7 | 1.8 | 0.9 | +75.4° | 8,000 |

^{*1} Elemental analysis ^{*2} Lowry method ^{*3} Calculated as glucose by phenol-sulfuric acid method

^{*4} HPLC, PPC and UV methods

^{*5} Calculated as alditol acetates by GLC method ^{*6} Gel filtration method

Table VII. Amino Acid Composition of Fl₀, FA-1a, FA-1c, FA-2 and FA-3 from Chlorella Extract.

| Amino acid (MW) | Fl ₀ | | FA-1a | | FA-1c | | FA-2 | | FA-3 | |
|-----------------|-----------------|-------|---------------|-------|---------------|-------|---------------|-------|---------------|-------|
| | μ moles/g | % | μ moles/g | % | μ moles/g | % | μ moles/g | % | μ moles/g | % |
| Asp (133) | 113.4 | 6.8 | 145.8 | 10.9 | 252.3 | 12.4 | 157.9 | 12.5 | 20.4 | 9.1 |
| Thr (119) | 87.4 | 4.7 | 101.5 | 6.8 | 148.7 | 6.6 | 97.5 | 6.9 | 15.0 | 6.0 |
| Ser (105) | 91.0 | 4.3 | 94.9 | 5.6 | 145.0 | 5.6 | 91.6 | 5.7 | 13.8 | 4.9 |
| Glu (147) | 183.4 | 12.2 | 165.6 | 13.7 | 337.1 | 8.6 | 194.9 | 6.7 | 38.7 | 7.6 |
| Gly (75) | 200.0 | 6.8 | 152.9 | 6.5 | 268.9 | 7.5 | 171.2 | 7.6 | 77.7 | 19.6 |
| Ala (89) | 424.3 | 17.1 | 196.8 | 9.7 | 355.0 | 11.7 | 180.8 | 9.6 | 29.7 | 8.9 |
| Val (117) | 86.5 | 4.6 | 93.1 | 6.1 | 133.3 | 5.8 | 88.5 | 6.2 | 10.9 | 4.3 |
| Cys (121) | 4.0 | 0.2 | 3.3 | 0.2 | 13.7 | 0.6 | 9.4 | 0.7 | 3.0 | 1.2 |
| Met (149) | 25.1 | 1.7 | 21.6 | 1.8 | 37.2 | 2.1 | 24.2 | 2.1 | 3.7 | 1.8 |
| Ileu (131) | 34.2 | 2.0 | 50.8 | 3.7 | 67.2 | 3.3 | 43.5 | 3.4 | 7.1 | 3.1 |
| Leu (131) | 99.3 | 6.0 | 129.5 | 9.6 | 178.1 | 8.7 | 115.8 | 9.0 | 15.8 | 6.9 |
| Tyr (181) | 24.2 | 2.0 | 27.5 | 2.8 | 44.4 | 3.0 | 30.2 | 3.3 | 6.2 | 3.8 |
| Phe (165) | 49.2 | 3.7 | 47.1 | 4.4 | 71.7 | 4.4 | 48.6 | 4.8 | 6.9 | 3.8 |
| Orn (132) | 9.0 | 0.5 | — | — | — | — | — | — | 1.0 | 0.4 |
| Lys (148) | 157.4 | 10.6 | 77.8 | 6.5 | 116.0 | 6.4 | 87.8 | 7.7 | 12.6 | 6.2 |
| His (155) | 20.4 | 1.4 | 18.5 | 1.6 | 32.4 | 1.9 | 33.5 | 3.1 | 4.8 | 2.5 |
| Arg (174) | 70.0 | 5.5 | 50.8 | 5.0 | 73.6 | 4.7 | 54.3 | 5.6 | 6.7 | 3.9 |
| Pro (115) | 191.0 | 9.9 | 78.0 | 5.1 | 158.2 | 6.7 | 74.9 | 5.1 | 15.4 | 6.0 |
| Total | 1869.8 | 100.0 | 1455.5 | 100.0 | 2432.8 | 100.0 | 1504.6 | 100.0 | 289.4 | 100.0 |

Apparatus: HITACHI amino acid autoanalyzer Type 835.

Rha, Xyl)を含む Glycoproteinであることを示した。

(2) 梅沢らの研究 (1982)¹⁴⁾

クロレラ由来の水溶性の酸性多糖を分離し“クロンA”と命名した。 $[\alpha]_D^{25}$ (水), 窒素 3.9%, 構成糖は Rha, Ara, Glc, Gal 及び GlcUA から成り, 超遠心像は単一ピーク (6.15 S) を示す酸性ヘテロ多糖であり, *in vitro* でウサギ脾臓細胞へ作用させたところ, 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 投与することによってインターフェロン (INF) 誘起能を惹起することを認めている。また, ワクシニアウイルスとインフルエンザウイルスの感染阻止作用が認められるのは INF 誘起能が大きく関与しているためであると説明している。

(3) 小島らの研究 (1970)¹⁵⁾

クロレラエキスから, ネズミの網内系食能の亢進に関与する β -(1 \rightarrow 3)-D-グルカン単離し“クロレラン”と命名した。窒素成分を含む分子量 1,400~2,000 の多糖体であり, 高い Carbon Clearance (C C) 活性を示すことを報告した。

我々 (1980)¹⁾ も, 追試したが“クロレラン”なる β -(1 \rightarrow 3)-D-グルカンは単離できなかった。分別・単離されたのは A-II-a あるいは B-2-a なる α -D-グルカンの画分で, 平均重合度 10 の低分子アミロペクチン様構造を持つ α -(1 \rightarrow 6) 分岐した α -(1 \rightarrow 4)-D-グルカンであった。この α -グルカンの CC 活性 (5 mg/100 g マウス, 注射) を調べたところ, 確かに網内系食能亢進効果が認められた。

多糖体の示す宿主仲介性の抗腫瘍効果¹⁶⁾ あるいは BRM (Biological Response Modifier)¹⁷⁾ の一つとしても興味ある成分である。

6. 考 察

クロレラエキスには弱いながら宿主仲介性の抗腫瘍効果が観察された。活性本体を追究するために, Ex の系統的な分別と細分画を試み, 多数の高分子画分を調製した。得られた画分の抗腫瘍活性を Sarcoma 180/mice 法によってスクリーニングした。活性画分の理化学性を明らかにして来た。

我々は, もう一方ではキノコ類の多糖体と抗腫瘍活性について研究を進めてきた¹⁰⁻¹²⁾ この結果と Ex から得られた活性画分について比較しながら考察して見たい。

キノコ類から得られた顕著な活性を示す水溶性多糖類は殆どが β -(1 \rightarrow 6) 分岐した β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan であるが, クロレラエキスには β -(1 \rightarrow 3)-D-Glucans の存在は証明出来ない。我々はクロレラの生物活性研究の初期に CC 活性 (マクロファージなど網内系食能亢進効果, 細胞免疫賦活) を示す低分子 α -D-グルカンを単離した^(1,3)。また, Sarcoma 180/mice, i.p. 法によって選抜されたクロレラの抗腫瘍活性画分は中性多糖 (FI₀-2, FI₀-3) と酸性多糖 (FA-1a, FA-1c, FA-2, FA-3) に大別された。これらが示す腫瘍増殖抑制率はそんなに高くはないが, 宿主が担癌状態にあってもなお良好な延命効果が認められたことに注目したい。免疫機能賦活に基く効果と考えられる。

クロレラエキスの活性多糖体は主に α -グルカン, 糖蛋白, 蛋白多糖, 核酸複合体であることから, これら異質の高分子成分を同じスクリーニング系を使って試験すること自体に無理があり, 良い結果が得られないものと思われる。今後, 癌の種類, 試験動物, 検体投与量, 投与方法, 投与スケジュールなどを検討し改善したい。

要 約

1. クロレラの熱水抽出物 (CVE) から, 活性高分子物質 (BABP) を分別・細分画・精製する方法を検討した。(Figs. 1, 2)

2. 得られた数多くの高分子画分の抗腫瘍活性を Sarcoma 180/mice, i.p. or p.o. 法によってスクリーニングした。(Tables I~V)

3. 抗腫瘍効果を示す中性多糖 FI₀, FI₀-1, FI₀-2, FI₀-3 および酸性多糖 FA-1a, FA-1c, FA-2, FA-3 を選抜した。

4. 抗腫瘍活性とともに良好な延命効果を示す蛋白多糖体 FA-1c と核酸複合体 FA-3 を分離した。

謝 辞

発表に当り, 卒業論文実験の一環として, クロレラエキスのクロマト分画に熱心に協力された金光健宅, 牛山正志, 藤田茂樹, 松下勝也, 松尾隆宏の諸君に深く感謝します。

また, 長年にわたって抗腫瘍試験をお願いした三

共(株)中央研究所(現在は生物研究所)の新海健吉, 清水雅子, 荒川順生, 田牧秀男の研究員各位並びに三重大学医学部の伊藤 均, 志村圭志郎両助教授に, 併せて厚く御礼申し上げます。

終りに, 我々のクロレラの生物活性研究をご援助戴いているクロレラ工業(株)学術部関係各位に深謝致します。

文 献

- 1) 水野 卓, 金光健宅, 碓氷泰市, 白石広行, 長谷川 節, 新保国弘: クロレラ工業研究年報, **3**, 9 (1980).
- 2) 水野 卓, 牛山正志, 碓氷泰市, 長谷川 節, 新保国弘: クロレラ工業研究年報, **3**, 23 (1980).
- 3) 水野 卓, 碓氷泰市, 金光健宅, 牛山正志, 松枝 澄, 新保国弘, 長谷川 節, 小林精三郎, 新海健吉, 荒川順生: 静岡大農研報, **30**, 51 (1980).
- 4) 水野 卓, 小西茂毅, 藤田茂樹, 篠瀬里美, 安藤洋太郎, 左向 崇, 西土井 睦: クロレラ工業研究年報, **4**, 11 (1984).
- 5) 水野 卓, 藤田茂樹, 佐野昭仁, 伊奈和夫, 左向 崇, 西土井 睦: クロレラ工業研究年報, **4**, 28 (1984).
- 6) 水野 卓, 佐藤昭夫, 松下勝也, 八木昭二, 伊奈和夫, 南条文雄, 田中恭二, 左向 崇, 西土井 睦: クロレラ工業研究年報, **5**, 13 (1987).
- 7) 水野 卓, 小西茂毅, 河岸洋和, 佐藤昭夫, 松下勝也, 松尾隆宏, 田村直亮, 左向 崇, 西土井 睦: クロレラ工業研究年報, **5**, 20 (1987).
- 8) 水野 卓: クロレラ工業研究年報, **5**, 145 (1987).
- 9) 水野 卓, 河岸洋和, 西土井 睦, 左向 崇: 特許出願, 昭和61-207300 (1986).
- 10) T. Mizuno, K. Ohsawa, N. Hagiwara and R. Kuboyama: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1679 (1986).
- 11) 水野 卓, 加藤尚美, 戸塚篤史, 竹中一秀, 新海健吉, 清水雅子: 農化, **58**, 871 (1984).
- 12) 水野 卓, 鈴木絵理, 牧 浩司, 田牧秀男: 農化, **59**, 1143 (1985).
- 13) 松枝 登ら: 薬誌, **102**, 447 (1982); **107**, 694 (1987); *Sci. Hiroasaki Univ.*, **30**, 127 (1983); *みどり*, **149**, 3 (1987).
- 14) 梅沢 巖ら: *Chemotherapy*, **30**, 1041 (1982); *USA Patent No. 4*, 533,548 (Aug., 6, 1985).
- 15) 小島 瑞ら: 日本網内系誌, **10**, 83 (1970); **12**, 73 (1972); 農化, **46**, 373 (1972); *Rec. Adv. RES Res.*, **13**, 101 (1973); *J. Reticuloendothelial Soc.*, **14**, 192 (1973).
- 16) 水野 卓: 化学と生物, **21**, 473 (1983); **23**, 797 (1985); *ドージンニュース*, **34**, 1 (1985); 食の科学, **110**, 44 (1987); *The Chemical Times.*, **125**, 64 (1987); **126**, 87 (1987); *ACTIVE 技術年報・東海UPU*, p. 126 (1987).
- 17) 漆崎一郎, 塚越 茂編: 癌とBRM, p. 145, p. 155, サイエンスフォーラム (1982); 山村雄一編: 免疫の研究, p. 418, 同文書院 (1986).