

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3829107号  
(P3829107)

(45) 発行日 平成18年10月4日(2006.10.4)

(24) 登録日 平成18年7月14日(2006.7.14)

(51) Int. Cl.	F I	
A 6 1 K 31/722 (2006.01)	A 6 1 K 31/722	
A 2 3 L 1/30 (2006.01)	A 2 3 L 1/30	A
A 6 1 K 9/19 (2006.01)	A 6 1 K 9/19	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	V
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/12	

請求項の数 7 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-200452 (P2002-200452)	(73) 特許権者	502171301
(22) 出願日	平成14年7月9日(2002.7.9)		ジャクワン カンパニー リミテッド
(65) 公開番号	特開2003-48839 (P2003-48839A)		JAKWANG CO., LTD.
(43) 公開日	平成15年2月21日(2003.2.21)		大韓民国 456-380 キョンギ
審査請求日	平成14年7月9日(2002.7.9)		ンソン シンソヒュンードン 138
(31) 優先権主張番号	2001-040955	(74) 代理人	100072051
(32) 優先日	平成13年7月9日(2001.7.9)		弁理士 杉村 興作
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)	(72) 発明者	ユ ヒョンジャ
			大韓民国 456-310 キョンギ
			ンソン クムサンードン 11-5 3/1
		(72) 発明者	スー サンボン
			大韓民国 456-310 キョンギ
			ンソン クムサンードン 11-5 3/1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫反応性NO合成を誘導する iNOS 酵素を刺激する組成剤およびその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

1) 水溶性キチン/キトサンを塩(NaCl) 10~40%溶液中でpH4.5~8.5に調整した後、該溶液を超音波分解処理する段階；  
 2) 前記段階1)の溶液をリゾチーム(Lysozyme)で分解し、イオン交換処理して高純度で集積させる段階；  
 3) 前記段階2)の濾液をさらにイオン交換処理して水溶性 - グルコサミン繊維素を製造する段階；および  
 4) 前記段階3)の繊維素に免疫タンパク質0.1~15%でナノ結合およびコーティングして冷凍乾燥する段階  
 を含むことを特徴とする、免疫反応性NO合成を誘導する iNOS 酵素を刺激する組成剤の製造方法。

【請求項2】

前記段階1)の超音波分解処理が1~14時間、10~80、波長10~80KHzで行われることを特徴とする、請求項1記載の免疫反応性NO合成を誘導する iNOS 酵素を刺激する組成剤の製造方法。

【請求項3】

前記段階2)のイオン交換処理が陽イオンと陰イオンの交差処理であり、高純度集積は分散集積効率が1.1~1.9であることを特徴とする、請求項1記載の免疫反応性NO合成を誘導する iNOS 酵素を刺激する組成剤の製造方法。

## 【請求項 4】

前記段階 4) の免疫タンパク質のナノ結合およびコーティングの際、コラーゲンおよびコリン酸を中間触媒として用いることを特徴とする、請求項 1 記載の免疫反応性 NO 合成を誘導する i NOS 酵素を刺激する組成剤の製造方法。

## 【請求項 5】

請求項 1 記載の製造方法によって製造された組成剤であって、分子量が 10 万 ~ 100 万であることを特徴とする、免疫反応性 NO 合成を誘導する i NOS 酵素を刺激する組成剤。

## 【請求項 6】

請求項 1 記載の製造方法で得られた組成剤を含有することを特徴とする薬剤組成物。

10

## 【請求項 7】

請求項 1 記載の組成剤を含有することを特徴とする食品添加剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、免疫反応性 NO 合成を誘導する i NOS 酵素を刺激する組成剤およびその製造方法に関し、さらに詳細には、天然生体高分子素材であるキチン/キトサンを塩 (NaCl) 溶液中で超音波分解処理、リゾチーム (Lysozyme) で分解処理、エタノール洗浄、イオン交換処理することによって調製される水溶性 - グルコサミンと、免疫蛋白質とをナノコーティングおよび結合することにより調製され、それによって既存のキトサン概念と差別化される機能的要素を含有する、免疫反応性 NO 合成酵素を誘導する i NOS 酵素を刺激する組成剤に関する。

20

## 【0002】

## 【従来の技術】

繊維素および天然生体素材は、本質的に同一な食品成分の異種混合物で、植物や動物から得られる天然材料が主成分である、構成分子量が 10 万以上の高分子物質であり、哺乳動物の消化系酵素によって加水分解されない成分であって、動植物細胞群の残余物をいう。繊維素は、不溶性と水溶性に大別され、不溶性に比べて水溶性はさらに大きな価値を有するがその数が少ないためさらなる重要性がある。

## 【0003】

繊維素のうち食物繊維の役割は、消化管で糞の滞留時間を短縮させ、量を増加させ、腸の活動を円滑にし、薬理的には免疫力強化、コレステロール低下、心臓疾患予防、栄養分の体内吸収阻止作用がありダイエット食などにも積極利用され、脂肪の吸収阻害、ブドウ糖の吸収を遅延して糖尿病にも効果があると知られているが、天然素材としてバイオ構成体の特性を有する機能性が備えられるときさらに価値を発することができる。大部分の食物繊維は植物性であるが、グルコサミン繊維素は動物性で、その構造はセルロースと若干の違いを有する。不溶性食物繊維素が水溶性化処理されたものとしては、ペクチン (pectin)、コラーゲン、一部の变性物の他はまだないと知られている。しかし、食品産業や医薬産業において素材の貧困を解決し、幅広い利用性を確保するために、また合成物質が大部分を占める現代社会において特に、天然素材として精製と集積度によって薬物伝達体などのような本発明における標的細胞に透過性を付与した i NOS 酵素を刺激する組成剤は親水性 - グルコサミン食物繊維基質として高単位で分離、製造することができるので、すべての産業への応用の点から歓迎すべきことであると言わざるを得ない。

30

40

## 【0004】

特に、キチンはカニ、エビなどの甲殻類およびキノコの菌体など天然から産出されるもので、1,4 - D グルカン混合結合体であり、植物のセルロースと類似する構造を有する分子量 100 万以上の動物性食物繊維である。

## 【0005】

キトサンは、化学酵素処理を通じてキチンから脱アセチル化されたもので、天然に存在する最も豊富な高分子多糖類であり、抗癌作用、抗菌作用、コレステロール調節作用、免疫

50

活性増強作用、血圧上昇抑制作用、血糖調節作用などのような様々な生理機能性を有しているバイオマス (biomass) であるが、溶解性と活性度の問題によって様々な用途に用いられず、誘導体化などの使用と制限的な用途にのみ用いられてきた。本発明による免疫発現伝達体は自然素材、高分子素材に乏しいバイオ産業および未来への活用価値力をさらに大きく増加させ得る長所を有しており、特に天然素材であるキチン/キトサンは機能的特性を明らかにしてよく活用すれば無限資源、相生の材料として親環境的要素を有しているが、反応性がほとんどなく、技術的活用および水準が非常に低い状態で部分的に利用されているだけである。

#### 【0006】

これまでは、キチン/キトサン由来の免疫活性化キャリアは開発されておらず、キトサン誘導体として塩酸塩形態のキトオリゴ糖の水溶性キトサン化低分子物を低級の水準で何ら特徴なしに一部使用しているが、高級精密製品への活用および応用技術がほとんどなく、誘導体や分解産物の形態でわずかに利用されているだけで、効用価値の発見および活用の面で難しさが多い。

10

#### 【0007】

食物繊維の欠乏は、多くの疾病の原因となり、特に現代人は免疫的欠乏および環境の変化によって免疫力自体に多くの問題を有している。したがって、効率性に優れ、かつ自体免疫発現性を有する食物繊維を用いると、疾病の予防および治療に役立てると考えられる。また、天然素材はその自体が有している特性の発揮において、構造と分子量の変化なしに能力を発揮できるように作用するので、副作用および毒性なしに人類の健康にさらに大きな価値を提供する。

20

#### 【0008】

##### 【発明が解決しようとする課題】

そこで、本発明者らは、前記のような点に鑑みてキトサンを研究した結果、免疫反応性NO合成を誘導するiNOS酵素を刺激する組成剤であって、天然生体高分子素材であるキチン/キトサンを塩(NaCl)溶液中で超音波分解処理、リゾチーム(Lysozyme)で分解処理、エタノール洗浄、イオン交換処理することによって調製される水溶性 - グルコサミンと、免疫蛋白質とをナノコーティングおよび結合することにより調製され、それによって既存のキトサン概念と差別化される機能的要素を含有する上記組成剤を製造できることを発見し本発明を完成するに至った。

30

#### 【0009】

したがって、本発明は、キチン/キトサンの固有特性を有し、かつ免疫反応性NO合成を誘導するiNOS酵素を刺激する組成剤およびその製造方法を提供することにその目的がある。

#### 【0010】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明は、免疫反応性NO合成を誘導するiNOS酵素を刺激する組成剤およびその製造方法をその特徴とする。

#### 【0011】

##### 【発明の実施の形態】

以下、本発明をさらに詳細に説明する。

本発明は、キチンの固有性質と特性を優秀に発現させて真価を発揮する利点を有する基礎材料であって、マクロファージのNO合成酵素を誘導するiNOS刺激組成剤に関し、天然素材として食品および医薬材料の無限可能性を発見し、素材貧困による産業発展の遅延を解決し、人類健康に至大な貢献を果せると考えられる。

40

#### 【0012】

免疫反応性NO合成を誘導するiNOS酵素を刺激する組成剤は、小腸、大腸へ移動しながら補修性、イオン交換能力、ゲル形成力、吸着性、感染部位および体内の傷などの問題発生部分に進行、吸収、結合するなど、一般の物理的特性と一部グルコサミンが有する特性を基本的に発揮する。日常で好ましくない生活習慣および食餌習慣は慢性的組織および

50

血管の広範囲な炎症性細胞部位の潜在と漸次的組織の破壊をもたらす。この際、特に小腸の組織破壊は疾病の感染において非常に重要とされる。一般的に、小腸ではごく小さい分子量の栄養素のみを能動的に吸収するようになっているが、破壊された小腸の粘膜組織を通る病原性菌、微生物、有害性物質と、内臓器異常などによる大腸にとどまる細菌および有害性物質の逆流によって有害性微生物、病原菌、分子量が非常に大きな高分子物質の浸透および吸収可能性が非常に高くなる。小腸を通じてこのような経路で流入された物質は大部分正常な肝臓で100%に近い解毒および感染予防作用をする。しかし、好ましくない生活習慣と食餌習慣およびストレス、環境汚染などの各種肝機能低下要因によって機能低下した肝臓はこのような完璧な栄養代謝、解毒および感染予防機能ができず、疾病の発生可能性が非常に高くなる。

10

**【0013】**

本免疫活性組成剤は高分子水溶性ムコ多糖体構成で、免疫感染経路と密接な関連性を有する。

**【0014】**

第一に、消火器系統を通る感染経路である胃腸、小腸、大腸でムコ多糖類特有の保湿保水性官能基活性化状態の粘液質膜を形成し、有害微生物または病原菌の接着と有害微生物または病原菌の細胞膜破壊および細胞内容物の溶出を誘導する作用をし、1次感染性微生物および病原菌破壊の有害微生物および病原菌に対する予防効果を有する。

**【0015】**

第二に、病原菌および有害性物質の感染吸収経路を独占的に先占するようになり、感染経路を掌握し、これを通じて体内に吸収されて血管および各組織の免疫細胞、特に免疫機構の最前方で非常に重要な免疫作用をするマクロファージを活性化して病原菌および有害要素の制御に大きな機能を果たす。

20

**【0016】**

したがって、健全な生活と体の状態を保持する健康人の疾患予防と、疾病および疾患を患っている人の自然免疫力強化作用と2次感染予防および疾患治癒の補助的役割が優れた代替医薬の必須素材としての価値を有する。

**【0017】**

特に、細胞間にシグナルを誘導する生物学的作用に關与するので、白血球でのNO生成力が優れ、健康に係る種々の特異機能を確実に発揮するなどの長所をさらに高められる。

30

**【0018】**

主な用途としては、代替医薬材料、生体材料、バイオ材料、ダイエット食、機能性飲料、特殊栄養食および機能性補助食品、食品添加剤、医薬原料および添加剤、徐放剤および治療剤、動物薬剤および生活用品、化学工業、化粧品工業、医薬産業、その他産業全般にわたって非常に広範囲に活用でき、既存の食物繊維に不足する機能的特性を満たすことができる。特に、化学的処理によってのみ可能であった部分を塩水(NaCl)、超音波、物理的処理とともに行って分画、イオン処理の順に純潔度と結晶度を高め、免疫発現の伝達性まで備えた本発明は人体にも非常に有効に作用するものであって、製造後の毒性処理および環境問題を克服することにより、生命科学およびバイオ産業化素材として重要な天然高分子繊維素資源となる。天然抗癌剤など薬物伝達体系においても高分子薬物は毛細血管の透過性に優れていれば物理的性質と血管の構造および組合せで材料の体内分布を調節できる。本発明による免疫発現伝達体は分子量(10万~100万)が大きく、かつ微粒子として刺激、拡散、浸透、認知など体内転換率が優れ、持続性、細胞調節機能、生体的合成と親和性、細胞安定性、細胞目標性まで備えた優れた新素材であって、今後多くの素材と結合して使用することにより実質的な価値を与えることができる。

40

**【0019】**

本発明は、このような価値を証明するために次の分析および評価を行い、蛋白性の効率維持と製剤の安定化のために凍結乾燥し、循環血液の滞留性を改善するための粒子のサイズと電荷を調整することにより、徐放性作用と体内吸収および透過率を高めた材料であって、細胞安定性および細胞親和性を有する。本材料の生体透過および浸透の過程は親和力と

50

反発力を適切に応用し、セルを認識することにより、mRNAを活性化してNO生成酵素であるiNOSを発現、促進し、活性基が体内の水分と相互作用してNH<sub>3</sub>で水素結合機能の活性という役割が増大し、薬剤では高分子運搬体と目標細胞伝達の効率性を精製と集積、+、-の電荷サイズを調節することにより相互作用の調整が可能である。

#### 【0020】

iNOS刺激組成剤は、炭水化物構造において活性基の機能を差別化させるものであって、炭水化物機能は成長、付着、飲細胞作用(pinocytosis)、抗原、受精、分化に密接な関連があり、特に本発明の免疫発現伝達体であるβ-グルコサミン由来親水性繊維素は糖アミンアルコールの高分子量としてアミノ基(NH<sub>2</sub>)を80%以上有しているので、タンパク質の糖化に翻訳後修飾(post-translation modification)の一つとして細胞内小器官でタンパク質の最終構造と機能を決定して生物学的役割を果たせるようにする細胞活動性および機能の違いがその他食物繊維に比べて優れ、糖化進行においても高分子水溶性材料は反応進行余力が遥かに多く、相互作用が大きくて強いいため、低分子材料よりもその機能性の発現が実験結果非常に優れていると知られている。次第に増加する環境汚染、抗生剤などの薬の濫用によって人類の健康を脅かすおそれが大きくなり、出きる限り天然材料への転換と天然素材の開発がさらに重要度が高くなるはずであり、本発明の免疫発現体高分子親水性繊維素は天然素材として機能が長けており、食物繊維としてはもちろん、医薬およびバイオ産業と生命科学産業に貢献できるので、食品および添加素材、代替医薬素材、バイオ素材、医薬添加剤の優れた原料として必然的に使用できる。

10

#### 【0021】

本発明によるiNOS酵素刺激組成剤の製造方法は次の通りである。  
本発明は、水溶性キトサンを塩(NaCl)10~45%溶液中でpHを4.5~8.5の範囲に調整した後、1~14時間、10~80kHzで波長10~80kHz超音波分解処理し、リゾチーム(Lysozyme)で分解し、十分にエタノールで洗浄した後、陽イオン交換処理し、分画分離によって必要な分子量の分散集積効率が1.1~1.9になるように高純度集積させる。その後、透過濾液をさらに1回以上イオン交換処理し、活性基を導入して水溶性β-グルコサミン構成を有する繊維素に製造する。次いで、これにコリン酸0.01~2%製造溶液にコラーゲン0.001~15%を中間触媒として用いて免疫タンパク質0.01~15%をナノ結合およびコーティングし、前記水溶液を冷凍乾燥して製造する。これを屈折計(RI detector)および食物繊維素含量を分析(β-glucosamin、タンパク質)、評価し、最終製品化する。本発明によるiNOS増殖は糖アミンアルコールの基本体で構成され、アミノ酸構成体が機能的作用を導き、糖構造は吸収を手助ける作用とアミノ酸増殖の基礎役割を果たして免疫増進にも大きな寄与をすると研究結果明らかになった。

20

30

#### 【0022】

また、本発明によるiNOS酵素刺激組成剤は固体および液状、ゲル、加工剤として薬学的に許容可能な担体または賦形剤を用いて錠剤、散剤、顆粒、カプセル剤、懸濁液、乳化液または非経口投与用の単位投与型または数回投与型製剤に剤形化して使用でき、天然バイオ剤として薬物吸収促進剤と未来疾病の予防次元の機能的食品、代替医薬、注射剤、治療剤、細胞浄化・調節剤、薬物伝達体、薬物担体、製薬の薬効上昇および増強剤などに積極利用する道を開けたという意味が大きいと考えられる。

40

#### 【0023】

前記組成剤の有効投与量は患者の年齢、身体的条件、体重などによって変化するが、一般に1~300mg/kg(体重)/1日範囲内で投与し、致死量は3,000mg/kgである。そして、1日有効投入量の範囲内で一日一回または数回にわたって投与する。

#### 【0024】

##### 【実施例】

以下、本発明を下記実施例によってさらに詳細に説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない。

#### 【0025】

50

実施例：免疫反応性NO合成を誘導するiNOS酵素を刺激する組成剤の製造米国特許第5,730,876号に基づいて製造した水溶性キトサン(平均分子量10万~50万)1000gを塩(NaCl)30%溶液中でpHを6~7の範囲に調整した後3時間45で、波長50KHzで超音波分解処理した後リゾチームで分解し、NH<sub>2</sub>還の変化および変形の阻止および最小安定化のために80で2時間持続した後イオン交換処理した。この際、陽イオン樹脂はDIAION PK228(三養社、韓国)を分当り1,500cc透過するように使用し、陰イオン樹脂はDu Pont社(USA)のもので分当り500cc透過するように使用し、酵素反応時の未反応物質と不純物、残余イオンの除去にカーボンフィルタを用いて充実に分画分離によって必要な分子量の分散集積効率が1.1~1.9になるように純粋度と集積度を高めた。水溶液上で陰イオンと陽イオンのイオンを確認してみた結果、解離イオンがないことが分かった。

10

## 【0026】

分離工程によって分散を集積させ、酵素処理後の残余酵素除去および高分子の分画を行うために分画分子量が100万、60万、30万、20万、10万を逐次分画併行および反復し、濾過装置と濾過膜(横×縦:200mm×300mmの平膜)は自体製作して使用し、目的収率(yield)は95%(±10%)の70~99%の純粋集積物を得た。

## 【0027】

透過る液をさらに1回以上イオン交換処理によって陽イオン(NH<sub>2</sub>)電荷の浄化と陰イオン(Cl<sup>-</sup>)の導入を行い、基本水溶性-グルコサミン繊維素化に遊離させ、これにコリン酸1%製造溶液にコラーゲン10%を中間触媒として用いて免疫グロブリン10%をナノ結合およびコーティングし、この水溶液を常温蒸留、予冷を経て冷凍乾燥して免疫反応性NO合成を誘導するiNOS酵素を刺激する組成剤を製造した(図1)。

20

## 【0028】

iNOS増殖組成剤の屈折計はJASCOモデルLC-1500[RI-1530/PU-1580, Japan]で各分子量のデキストラン(dextrane)標準物質対比で分析して標準値と類似するときの分画条件で反応を停止した。

## 【0029】

## 実験例1

本発明に用いられた基本構成材料であるキチンは1650cm<sup>-1</sup>で、キトサンはcm<sup>-1</sup>でのピーク(peak)で確認が可能であり、前記実施例で得られた組成剤はアセチル基(CH<sub>3</sub>C=O)とアミド基(NH<sub>2</sub>)結合の相互反発作用を用いて不安定反応基が蒸留水(H<sub>2</sub>O)との水素結合で水酸基(OH<sup>-</sup>)とアミド基(NH<sub>2</sub>)のH<sup>+</sup>基が結合する水溶性化を確認した(図2)。

30

## 【0030】

## 実験例2

前記実施例で得られた組成剤中の水溶性食物繊維含有比率測定実験を次のように行った。まず、検体を乾燥(凍結または減圧乾燥)して酵素(-amylase, -glucanase, protease, amyloglucosidase)で処理した後エタノールで沈殿させてセラライト(celite)を含量させた濾過器で濾過してタンパク質と灰分の含量を測定した後、その値を引いて総食物繊維の量を定量する方法[保健福祉部、食品工典1997; AOAC official method, 16th, 1995; ユリム分化社、食品分析法、1994]で次の数式1と数式2を用いて食物繊維の含量を計算した。

40

## 【0031】

## 【数1】

$$\text{供試験値 (B, mg)} = \text{供試験平均残滓重さ (mg)} \times \text{PB} \times \text{AB} \times 100$$

## 【0032】

前記式で、PBは供試験タンパク質量(mg)を示し、ABは供試験灰分量(mg)を示す。

50

【 0 0 3 3 】

【 数 2 】

$$\text{食物繊維含量 (\%)} = \frac{\text{検体の平均残滓の重さ (mg)}}{\text{検体の平均重さ (mg)}} \times P \times A \times B \times 100$$

【 0 0 3 4 】

前記式で、Pはタンパク質量(mg)を示し、Aは灰分量(mg)を示し、Bは供試験値(mg)を示す。

【 0 0 3 5 】

前記食物繊維含量の計算結果、総食物繊維含量が90～99.6%以上、水溶性食物繊維含量が80～90%以上の結果を得、再結晶によって純度を99%以上上げることができた。

【 0 0 3 6 】

また、キトサンの脱アセチル化度をPVS K (Potassium polyvinylsulfate solution) 滴定法[Maeda, M., H. Murakami, H. Ohta, and M. Tajima(1992) Biosci. Biotech. Biochem., 56, 427-431]で測定した結果、脱アセチル化度は80%以上を示した。

【 0 0 3 7 】

実験例 3

前記実施例で得られた組成剤によるNO生成を調査するために次のような実験を行った。マクロファージRAW264.7[ATCC]はRPMI-1640培地[RPMI-1640(Gibco BRL 23400-021) 1.62%、炭酸水素ナトリウム0.2%、ペニシリンおよびストレプトマイシン混合抗生剤1%]にウシ胎児血清(fetal bovine serum, Gibco BRL 26140-079、以下FBS)を10%添加した培養液を用いて二酸化炭素培養器(5%二酸化炭素、95%相対湿度、37℃、以下CO<sub>2</sub>培養器)内で培養した。

【 0 0 3 8 】

細胞培養において酸化窒素の生成はマイクロプレート分析法(microplate assay)で測定し、マクロファージRAW264.7を対象にNOの安定な酸化生成物である硝酸イオン(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)の生成を測定した。ダルベッコ変法イーグル培地[Dulbecco's Modified Eagle's medium, Gibco BRL, USA, 100 U/mlペニシリン、100 μg/mlストレプトマイシン、10% FBS、6 g/l HEPES、3.7 g/l 炭酸水素ナトリウム]で培養したマクロファージRAW264.7(3 × 10<sup>5</sup> cells/ml)に種々の対照群を定めて様々な刺激を与えた。培地自体、rIFN-γ + 本発明の組成剤、rIFN-γ + 本発明の組成剤 + LPSをとともに刺激して時間による硝酸イオン(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)の量を測定した。マクロファージにインターフェロンガンマを10 U/ml処理して6時間培養した後本発明の組成剤(1 μg/ml)、LPS(10 μg/ml)、本発明の組成剤(1 μg/ml) + LPS(10 μg/ml)を各々処理して48時間培養してNO<sub>3</sub><sup>-</sup>生成を誘導した。

【 0 0 3 9 】

その後、培地を遠心分離(1000 rpm、10分)して得られた上澄液100 μlにグリース試薬[Griess reagent: 37.5 mMスルファニル酸(sulphanilic acid)、12.5 mM N-(1-ナフチル)エチレンジアミンジヒドロクロリド[N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride]、6.5 mM塩酸]100 μlを加えて常温で10分間反応させた後分光光度計を用いて540 nmで吸光度を測定した。この際、0～50 μmの濃度別に製造した硝酸塩を用いてNO<sub>3</sub><sup>-</sup>濃度-吸光度相関係数を作成した後マクロファージRAW264.7で生成されたNO<sub>3</sub><sup>-</sup>濃度を計算した。NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の生成量を次の表1に示す。

【 0 0 4 0 】

【 表 1 】

10

20

30

40

Rinfn- $\gamma$	LPS(耐毒素)	組成剤 (1 $\mu$ g/ml)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ( $\mu$ m)
-	-	+0h	<5.0
+	-	+12h	43.6 $\pm$ 4.2
+	-	+24h	51.7 $\pm$ 3.4
+	-	+48h	50.9 $\pm$ 1.5
+	+	+24h	55.1 $\pm$ 3.2

註) - : 無添加    + : 添加

【0041】

10

【表2】

#### TAXOL の酸化窒素生成量

RINFN- $\gamma$	LPS(耐毒素)	TAXOL (10 $\mu$ g/ml)	NO ( $\mu$ m)
+	-	+0h	<4.0
+	-	+12h	30.5 $\pm$ 3.2
+	-	+24h	40.7 $\pm$ 2.4
+	-	+48h	40.8 $\pm$ 3.5
+	+	+24h	45.1 $\pm$ 1.2

註) - : 無添加    + : 添加

20

【0042】

前記表1および2に示したように、前記実施例で得られた組成剤1  $\mu$ g/mlでNO 56  $\mu$ g/mlが生成し、対照群として用いた抗癌剤であるTAXOL 10  $\mu$ g/mlでNO 46  $\mu$ g/mlが生成し、10倍以上の大差を示した。

【0043】

前記実施例で得られた組成剤の観察実験と動物投与実験結果、免疫体系においてiNOSを生成させ、窮極的にマクロファージにおいて酸化窒素(NO)を生成させることを確認した。さらに、自然治癒細胞(NK cell)を増殖させ、TNF- $\alpha$ 細胞(腫瘍壊死因子)の活性を増加させることが明らかになり、分子量が20万以上多くなるほど、濃度が10  $\mu$ g/mlまでは高くなるほどNOの生成が多くなり、また病原性バクテリア、ウイルスなども制御し、自己ではない癌細胞などを壊死させる腫瘍壊死因子の生成も促進させ、NOの生成による末梢血管の拡張効果、酸化窒素による血管の平滑筋が弛緩されることにより、心臓に伝達される血液量を増加させて狭心症、心筋梗塞などに効果があるため幹細胞が死滅しないことを確認した(参考までに、NOの生成量はiNOS酵素の生成量で測定した)。

30

【0044】

また、グルカン材料は体内のCl<sup>-</sup>イオンのみを吸収、調節すると知られているが、本発明の実験によって本発明の素材として用いられた材料の場合はNaClを調節することが経口投与後薬物伝達体系分析を通じて確認された。

40

【0045】

前記実施例で得られた組成剤は人体免疫1次反応を担うマクロファージを活性化して多量のNOを発生させた。NOは反応性が高い分子であって、病原菌のLPS(耐毒素)による刺激で自然発生する。抗癌、抗ウイルス、抗バクテリア活性に優れ、マクロファージが活性化されたときNO合成酵素であるiNOSによってアルギニン経路で生成される。

【0046】

マクロファージRAW264.7においてL-アルギニンに依存する経路を伴う本発明の組成剤によって誘導される酸化窒素の信号メカニズムを糾明するために、rIFN- $\gamma$ とN<sup>G</sup>MMAの存在下で6時間培養した。N<sup>G</sup>MMAは酸化窒素生成基質であるアルギニンのアナログ体である。rIFN- $\gamma$ と前記実施例で得られた組成剤によって生成されるNOはN<sup>G</sup>MMAが

50



増加するにつれて次第に阻害された(図3)。図4においてiNOSの合成は携帯密度計を用いて対照群の値を基準とした。

【0047】

anti-iNOS抗体を用いてウエスタンブロット分析を行った。図4はマクロファージRAW264.7のiNOS発現タンパク質においてrIFN- と前記実施例で得られた組成剤の処理効果を示す。前記組成剤はデータからはみられないが、その自体だけでもiNOS発現に部分的に関与し、本発明はrIFN- またはLPSとrIFN- の相乗効果によってマクロファージRAW264.7においてiNOS発現が増加した。前記組成剤で誘導され発現されたiNOSはN<sup>G</sup>MMA(10mm)によって減少した。

【0048】

実験例4

前記実施例で得られた組成剤によるTNF- 発現を調査するために次のような実験を行った。

マクロファージRAW264.7(3 × 10<sup>5</sup> cells/well)をRPMI-1640培地自体、rIFN- 、本発明の組成剤、rIFN- + LPS、rIFN- + 本発明の組成剤を各々対照群として28時間培養した。前記細胞においてTNF- の分泌量はELISA法で405nm波長で分析して測定した。分析前にTween-20を0.05%含むPBS(phosphate-buffered saline)を数滴落として洗浄した。分析に用いられるすべての試料は37 で2時間培養した。組換えmurine TNF- は希釈し、これを基準とする。分析板(assay plate)をABTS(Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)基質水溶液[biotylate murine TNF

【0049】

【表3】

RIFN- $\gamma$	LPS(耐毒素)	組成剤 (1 $\mu$ g/ml)	TNF- $\alpha$ (ng/ml)
-	-	+	0.81 $\pm$ 0.02
+	-	-	0.76 $\pm$ 0.02
+	-	+	1.34 $\pm$ 0.09
+	+	-	2.80 $\pm$ 0.20
+	+	+	2.92 $\pm$ 0.11

註) - : 無添加 + : 添加

【0050】

図5と前記表3から分かるように、マクロファージRAW264.7をRPMI-1640培地で組成剤自体だけで28時間培養すれば少量のTNF- が発現され、rIFN- と前記組成剤とともに処理すれば多量のTNF- が発現されることを確認した。

【0051】

実験例5

前記実施例で得られた組成剤によるNF-kB活性を調査するために次のような実験を行った。

マクロファージRAW264.7(5 × 10<sup>6</sup> cell/well)はrIFN- と6時間培養した後12時間前記組成剤とLPSで刺激した。すべての細胞溶出液(lysate)はマクロファージRAW264.7をサンプル緩衝溶液[62.5mM Tris-CL, pH 6.8, 2% ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、20%グリセロール、10% 2-メルカプトエタノール]で湧かした。細胞から溶出されたタンパク質は10% SDS-PAGEによって分離し、ニトロセルロース紙に移した。この膜は10%の脱脂油を含むPBS-tween-20で室温で1時間ブロッキング(blocking)した。その後、anti-iNOS、TNF- とNF-kB(核因子カッパ-B)抗体とともに培養した。

【0052】

NF-kB活性はウエスタンブロットによって測定した。図6のA)から、rIFN- で処理した後LPSで刺激したマクロファージにおいてNF-kB(p65, p50)合成タンパク質が増

10

20

30

40

50

加することが分かる。前記実施例で得られた組成剤はその自体だけでNF-kB合成タンパク質の生成に部分的に関与するが、組換えrIFN- $\gamma$ とともに刺激したときNF-kB活性が上昇することが分かる。また、マクロファージRAW264.7においてrIFN- $\gamma$ によって誘導されるNF-kB活性において前記組成剤の効果はEMSA (Electrophoretic mobility shift assay) で確認し、マクロファージRAW264.7を各々培地自体、rIFN- $\gamma$  + LPS、rIFN- $\gamma$  + 本発明の組成剤で処理して培養し、各々から核抽出を行い、NF-kB結合部位を含む<sup>32</sup>Pで標識されたオリゴヌクレオチドとともに培養した。特異的なNF-kB結合力はlaneで検出することができ、rIFN- $\gamma$ と組成剤をとともに処理すればDNA結合力は増加した(図6のB)。

【0053】

10

実験例6

前記実施例で得られた組成剤に対する抗酸化剤としての有用性を確保するために代表的抗酸化剤であるビタミンCを対照群として酸化防止力をUV遮断値に換算して次の表4のように示す。UV吸光機(Cary, UV-visible Spectrometer) [Virian Co., USA]を用いて528nmの常温で測定した。

【0054】

【表4】

区分	前記で得られた組成剤の%別溶液			
	0.1%	0.5%	1%	2%
ビタミンC	21.23%	28.51%	47.83%	58.28%
組成剤	16.24%	24.25%	32.51%	54.45%

20

【0055】

前記表4に示したように、ビタミンCのUV値は代表的な酸化防止力の基準値として用いられるが、前記組成剤もまたビタミンCと類似するUV遮断力を有する抗酸化力を備えた結果を示すことから、前記組成剤は抗酸化剤として有用性を有することが分かる。

【0056】

実験例7

前記実施例で得られた組成剤を分子量300,000、500,000、750,000および1,000,000の4種とし、細胞毒性、粘膜および血管系毒性、皮膚1次刺激性を観察した。

30

【0057】

(1) 前記組成剤の細胞毒性(cytotoxicity)を通常多く用いられるMTT分析とニュートラルレッドアップテイク(Neutral Red uptake assay)で試験した結果、分子量に関わらず皮膚繊維芽細胞(fibroblast)と角質形成細胞(keratinocyte)においてすべて高い細胞生存率(cell viability)を示し、細胞に対する毒性がほとんどなかった。

【0058】

(2) 前記組成剤の粘膜および血管系毒性に対するHET-CAM分析結果、分子量に関わらず1.0%水溶液まで出血、細胞溶解、凝固などの毒性反応が全く観察されなかった。

【0059】

40

(3) 皮膚1次刺激性を24時間パッチテスト(patch test)で調査した結果、キトサン1.0%水溶液において分子量に関わらず平均皮膚反応度(mean score)が0.63~1.25と刺激がないと明らかになった。平均皮膚反応度は一例であって、既存の化粧品に主に用いられる有機合成防腐剤(P-M, Germal)を使用した製品と、前記組成剤を用いた場合を20名の20代女性を対象に実際皮膚接触させて相対的比較百分率の数値を比較するもので、前記組成剤は実際平均皮膚反応度が40~50%程少なく、これは自然構成材として皮膚刺激に問題が少ないことを示すものである。前記組成剤の粉末をそのまま適用した部位では刺激反応が全く観察されなかった。

【0060】

(4) 前記組成剤の抗微生物活性と抗酸化活性を濾紙円盤(paper disk)法で実験した結

50

果、化粧品部分利用における天然材として保存力が非常に優れている。

【 0 0 6 1 】

実験例 8

前記実施例で得られた組成剤 0.001 ~ 0.1% の溶液とパウダーで雌と雄を区別せずに体重が 50 ~ 55 g のマウスを 20 匹ずつ、大韓薬典を基準に急性毒性試験、皮内反応試験、発熱性試験、溶血性試験、組織移植試験を 3 回繰り返して試験した。その結果、定めた規格基準に適合し、注射液に製造し、生理食塩水をコントロールとして注射後発熱、即死などを確認した結果異常がなく、細胞毒性試験においても何ら異常を示さない無毒な材料であることを確認し、ヒトの血液に前記試験液を添加して確認したところ、白血球数と形態に変形がなく、白血球の異物侵入の凝集相が観察されず、血小板、赤血球数の増減現象がないため血液適合性に優れていると判断された。試験機器としては Cell dyn 900 (登録商標) [Du Pont社、USA] とノイバウエアチャンバー (Neubauer Chamber) および光学顕微鏡を使用して測定した。

10

【 0 0 6 2 】

実験例 9

前記実施例で得られた組成剤の分子量による生物化学的活性特性を調査した。元素分析、バイルシュタイン試験 (Beilstein test)、ESCA などの無機分析と  $^{13}\text{C}$  NMR、 $^1\text{H}$  NMR、FT-IR などの有機物分析で確認し、農薬への生物学的活性を検索するために国内外的に深刻な問題を有する三つの病原菌であるジャガイモ疫病菌 (*Phytophthora infestans*)、コムギ赤さび病菌 (*Puccinia recondita*)、オオムギうどんこ病菌 (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) に対して前記組成剤 1000、250、50、10、2 ppm の濃度で *in vivo* でスクリーニングした結果濃度が高いほど抗菌活性が増加し、コムギ赤さび病に選択的に高い活性を示した。

20

【 0 0 6 3 】

実際トマトハウス栽培で発生したうどんこ病 (*Erysiphe cichoracearum*, *leveillula taurica*, Powdery mildew) に 0.001 ~ 3% までの水溶液を製造し、根っこ周りの土に約 10 cc を 48 時間間隔で 3 ~ 7 回ずつ与えて本実験を行った結果、3 回以上からはこの病状がなくなることを確認した。

【 0 0 6 4 】

実験例 10

本発明の組成剤	0.1 g
ラクトース	0.7 g
結晶性セルロース	0.15 g
ステアリン酸マグネシウム	0.05 g
総量	1 g

30

【 0 0 6 5 】

前記に並べた成分を細かく粉碎して混合した後直打法 (direct tableting method) によって錠剤を製造した。各錠剤の総量は 100 mg であり、そのうち有効成分の含量は 1 mg である。

【 0 0 6 6 】

実験例 11

本発明の組成剤	0.1 g
トウモロコシ澱粉	0.5 g
カルボキシセルロース	0.4 g
総量	1 g

40

【 0 0 6 7 】

前記に並べた成分を細かく粉碎し、混合して粉末を製造した。硬質カプセルに粉末 100 mg を入れてカプセル剤を製造した。

【 0 0 6 8 】

実験例 12

50

前記実験例 10 および 11 で製造した組成剤の錠剤、カプセルを動物実験に適用した結果、Sprague-Dawley ラットを用いて 1 週間標準飼料で適応させた後対照群は高脂肪食餌を給与し、実験群は本発明の組成剤を 5% 混合して対照群と実験群に分けて 4 週間自由給食方式で飼育した後断頭し、血液を採取して調査した。体重が 300 ~ 320 g の前記ラット 20 匹、投与回数 1 日 1 回、投与量 1 日 2.5 mg、投与期間 28 日後から測定したところ、総コレステロールの含量は 15 ~ 30%、血糖は 15 ~ 25% 減少し、排便量は 25 ~ 30% 増加し、低分子物に比べて 5 倍程大きいことを確認した。本発明は肥満と便秘予防、コレステロール除去など成人病予防効果が徐放性による持続的分解に差異を示し、薬物吸収を助ける作用が大きく、アルコール分解能力が低分子型であるオリゴ糖に比べて 5% 以上優れた。したがって、未来の疾病の予防次元の天然材料として確実な免疫、医学、

10

【0069】

## 実験例 13

本発明による組成剤は基本組成物であるグルコサミンの生体親和性および細胞無毒性によって細胞に適用したとき効果が高い。そこで、本発明の組成剤のマクロファーシ活性機能の他に細胞再生力を調査するために創傷治癒力を実験した。

【0070】

前記組成剤を凍結乾燥してディスクの形に製作し、ラットに創傷モデルを誘導した。前記組成剤自体の創傷治癒力および細胞再生効果のための実験群と細胞癒着タンパク質として創傷治癒が高いフィブロネクチン (Fibronectin) およびこれを変形した組換えタンパク質とともに処理した。実験結果、組成剤を創傷部位に塗布したとき徐々に溶けながら薄膜に形成し、粘性だけでも創傷治癒および速い再生効果と細胞再生性を示した。創傷治癒剤とともに用いた場合には毎日取り換える必要なく 3 日に一度取り換えても遥かに優れた効果を示し、その自体のディスク形態のみを直接使用したときにも効果が優れ、複合使用した場合にも創傷治癒剤の量を著しく減らすことができた。図 7 から分かるように、前記組成剤とその構成材料は細胞親和性を有する細胞再生剤として利用可能であり、他の薬物とともに使用する場合徐放性効果も有しているため優れた相昇効果を発揮できる細胞親和性材料として活用できることを確認した (図 7)。

20

【0071】

## 実験例 14

前記実施例で得られた組成剤の 1% 水溶液で細菌 (bacteria)、真菌 (fungi) に接種して菌数の増殖を観察し、細菌  $3.77 \times 10^6$  cfu/g、真菌  $1.2 \times 10^5$  cfu/g を接種してコントロール (無接種) と比較した。接種後 7 日から 28 日までその数の増加がなく、病原性菌は 0 cfu/g と検出されなかったため、自体防腐力と衛生力も備えていることを確認した。

30

【0072】

## 実験例 15

摂取した食品中の栄養素がどれくらい消化、吸収されるかの数値を消化吸収率または体内転移率で示す。これは、既に広く知られている出納実験で、糞便に対する窒素 (タンパク質)、炭水化物、脂肪質、灰分、無機質などを分析する方法や経口によって本試料を投与したところ、血漿中で母体は検出されなかったが、これを完全な吸収とみなし難い理由は、体内の酵素によって切取られた後転移、転化、吸収されるか、または胃に行く前に脂質と結合して排泄されるからであると考えられる。

40

【0073】

消化吸収率は動物によって食品分析で得た各栄養素がいかに有用性よく利用されるかを測定するものであるため、栄養素の消化吸収率は飲食物の配合比率や調理法などの要素によって変わるが、これを摂取する測定体の健康状態、労働量、飲食物の摂取量にも影響を受ける。消化吸収率は次の数式 3 および 4 で計算した。

【0074】

【数 3】

50

$$\begin{aligned} \text{見掛け消化吸収率} &= \frac{\text{吸収成分量}}{\text{摂取食品中の成分量}} \times 100 \\ &= \frac{\text{摂取食品中の成分量} - \text{糞便中の排泄成分量}}{\text{摂取食品中の成分量}} \times 100 \end{aligned}$$

【 0 0 7 5 】

【 数 4 】

10

$$\text{真の消化吸収率} = \frac{\text{摂取食品中の成分量} - (\text{糞便中の排泄量} - \text{耐溶性損失量})}{\text{摂取食品中の成分量}} \times 100$$

【 0 0 7 6 】

その結果、前記組成剤の消化吸収率は一般の水溶性食物繊維と同じような程度である20～40%以上であり、前記組成剤の転移率を調査するために約200g程度の正常なラットを24時間絶食させた後尻尾静脈を通じて2.5mg/mlの蛍光物(FITC, Fluorescein isothiocyanate) - 組成剤の結合物を注射し、各々1時間、8時間、24時間となる時点で動物を麻酔し、血液と組織を採取して検出量を測定した結果、血管転移度が98.1%を示した(図8)。

20

【 0 0 7 7 】

実験例16

徐放性は効力の持続性を示すものであって、分子量20,000以下の低分子物をはじめ分子量1,000,000までの前記実施例で得られた組成剤を7日間隔で動物(ニワトリとマウス各20匹3回)の生産能力、免疫力などの活性を1日0.1%飼料に添加した実験群と既存の飼料のみを摂取させたコントロールと同一条件で比較して次の表5に示す。実際ニワトリ飼育農場(韓国京畿道平澤市に所在する江南農場)における飼育飼養管理者らは換羽鶏においても活力が生じることが一般の比較観察から分かり、前記材料で構成された材料を補助材料として用いても実際の飼養費が節減され、また得られた鶏卵において卵白の硬固と卵黄の色度が一般の飼養から得られたものが6～7°であるのに対し、着色剤を用いなくても12～14°と明らかであることを発見した。

30

【 0 0 7 8 】

【 表 5 】

区分	対照群	AMW 20,000 以下	AMW 100,000 以下	AMW 200,000 以下	AMW 300,000 以下	AMW 600,000 以下	AMW 1,000,000 以下
ニワトリ(成鶏)の活力	0	発見されなかった	2～4日	3～5日	4～5日	4～5日	5～6日
マウスの活力	0	観察されなかった	6～7日	7日	7～8日	8～10日	8～10日

40

【 0 0 7 9 】

さらに、実際口蹄疫(Picornaviridae Aphthovirus. Food and mouth disease)発生地域

50

の養豚飼育農家（韓国京畿道龍仁の兄弟農場）で経口投与実験を行ったが、前記組成剤 200 mg 錠剤を製造してまだ感染症状を示さない 70 kg の中ブタ 20 匹の豚舎に 1 日 3 回投与し、3% 以下の水溶液を製造して随時飲料水と飼料に投与したブタ群においてはその疾患の特徴的要素が発現、進行されなかった。これから、免疫体系の基本完成とアポトーシス（Apoptosis）およびウイルス制御率、遺伝子変形防止、代謝障害防止にも関与していることを間接的に確認した。

#### 【0080】

実施例 17：iNOS 刺激組成剤含有飲料組成物

精製水 75.5 g を 60 に加温し、前記実施例で得られた組成剤 2 g、蜂蜜 3 g、L-タイシン塩酸塩 0.001 g、ビタミン B1 0.002 g、ビタミン B2 0.01 g、ニコチン酸アミド 0.01 g、クエン酸 0.2 g、果糖 15 g、パントテン酸カルシウム 0.01 g、ビタミン B6 0.003 g、貝殻抽出物 2.4 g を添加し、攪拌して溶液した。250、500、1000 ml 単位で瓶に充填した後 90 以下で 20 分間殺菌した。

10

#### 【0081】

##### 【発明の効果】

以上、述べたように、本発明による免疫反応性 NO 合成を誘導する iNOS 酵素を刺激する組成剤は、腸機能改善はもちろん肥満やコレステロール除去に優れた機能を発揮でき、既存の繊維素とは異なり微白色であるため食品への添加に選択の幅を広めることができ、漢方材料としての諸機能および輸送伝達の役割を十分果たすることができる。また、本発明は、現代社会の高脂肪食と動物性食事による高蛋白食事および変異食品、農薬、環境ホルモン、各種汚染物、各種人為的合成化学物質の多量使用から来る遺伝子変異性疾患、および内分泌系の情報混乱から来る疾病の対処方を提示することができる。未来疾病の予防次元の素材となることのできる。

20

##### 【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明による iNOS 増殖組成剤を示す。

【図 2】 水溶性キトサンと非水溶性キトサンの FT-IR グラフを比較したものである。

【図 3】  $N^G$  MMA による NO の生成を示すグラフである。

【図 4】 iNOS 発現量をウエスタンブロット (western blot) で分析した結果である。

30

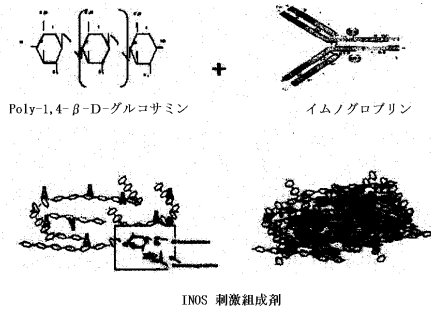
【図 5】 TNF- $\alpha$  発現量をウエスタンブロット (western blot) で分析した結果である。

【図 6】 マクロファージにおいて本発明による組成剤によって誘導された核因子  $\kappa B$  の活性度を示す。

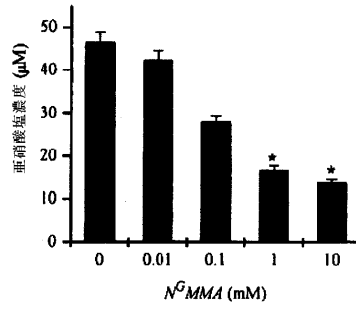
【図 7】 本発明による組成剤の細胞再活性および親和性による創傷治癒効果を示す。

【図 8】 本発明による組成剤の各組織に対する転移率を示すグラフである。

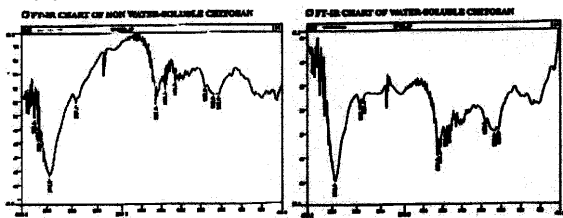
【 図 1 】



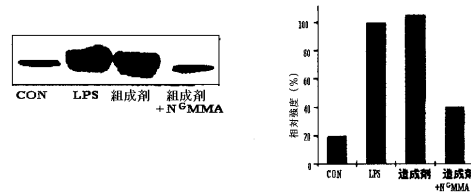
【 図 3 】



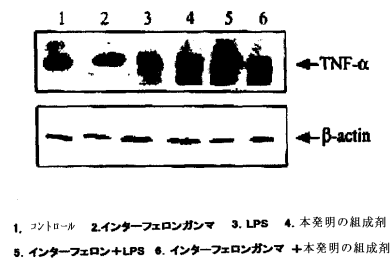
【 図 2 】



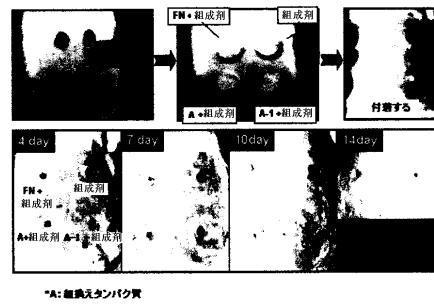
【 図 4 】



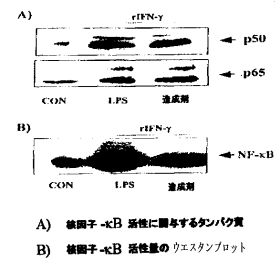
【 図 5 】



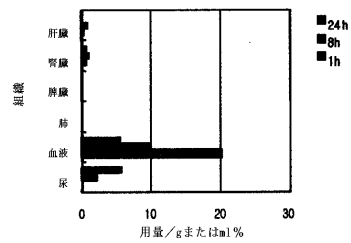
【 図 7 】



【 図 6 】



【 図 8 】



## フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I  
**A 6 1 P 31/04 (2006.01)** A 6 1 P 31/04  
**A 6 1 P 35/00 (2006.01)** A 6 1 P 35/00  
**A 6 1 P 37/04 (2006.01)** A 6 1 P 37/04

(72) 発明者 スー チャンスク  
大韓民国 4 5 6 - 7 0 5 キョンギ アンソン ダンワン - ドン 5 3 4 テーウー アパート  
メント 1 0 4 - 4 0 1

審査官 八原 由美子

(56) 参考文献 Won-Gil Seo et al. , Cancer Letters , 2 0 0 0 年 , Vol.159 , p.189-195  
Hyun-Ja Jeong et al. , International Journal of Immunopharmacology , 2 0 0 0 年 , Vol.22  
, p.923-933  
Yong-Woo Cho et al. , Biomaterials , 1 9 9 9 年 , Vol.20 , p.2139-2145

(58) 調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K 31/722

A61K 39/395

CA(STN)

MEDLINE(STN)