

抗腫瘍性カルボキシメチル化(1→3)- $\alpha$ -D-グルカン類のカルボキシメチル基の分布並びに

それらカルボキシメチル化多糖類の免疫調節作用について

鵜飼茂夫<sup>a)</sup>, 吉田 勲<sup>b)</sup>, 木方 正<sup>a)</sup>

**要約:** ヤナギマツタケ *Agrocybe cylindracea* 及びベニテングタケ *Amanita muscaria* から得た直鎖状(1→3)- $\alpha$ -D-グルカン(AG-AL及びAM-APP)のカルボキシメチル化誘導体(AG-AL-CMS, AG-AL-CMI及びAM-APP-CM)中のカルボキシメチル基の分布,並びにそれらカルボキシメチル化多糖類の免疫調節作用について紹介する。

$\alpha$ -D-グルカン(AG-AL及びAM-APP)はマウスにおけるSarcoma 180固型腫瘍に対し殆んど抗腫瘍作用を示さないが,そのカルボキシメチル化誘導体(水溶性のAG-AL-CMS及びAM-APP-CM,ゼラチン様のAG-AL-CMI)は顕著な抗腫瘍活性が認められた。

カルボキシメチル化誘導体(AG-AL-CMS, AG-AL-CMI及びAM-APP-CM)中のカルボキシメチル基の置換度と置換位置は我々が開発した方法によって決定された。その方法はこれらカルボキシメチル基のヒドロキシエチル基への還元によって生成するヒドロキシエチル化多糖の加水分解,及びその加水分解物の還元アセチル化によって得られるアルジトールアセテート並びに1,2-ethylene-D-glucose誘導体のGC-MS分析によって行われる。これらの置換基はカルボキシメチル化(1→3)- $\alpha$ -D-グルカンと(1→3)- $\beta$ -D-グルカンとの間で特徴的な分布パターンを示した。

これらカルボキシメチル化グルカン類(AG-AL-CMS, AG-AL-CMI及びAM-APP-CM)の免疫調節作用は腫瘍免疫に重要な役割を演ずるマウス腹腔マクロファージを用いて評価された。

腹腔滲出細胞中のマクロファージの割合はカルボキシメチル化(1→3)- $\alpha$ -D-グルカン投与後50%以上の増加が認められた。カルボキシメチル化(1→3)- $\alpha$ -D-グルカン類はスーパーオキシドアニオン,一酸化窒素,腫瘍壊死因子等の産生能,グルコース消費能及び酸性ホスファターゼ活性能等においてカルボキシメチル化直鎖状(1→3)- $\beta$ -D-グルカン(CMPS)よりもマクロファージに対する高い活性を示した。これらカルボキシメチル化 $\alpha$ -D-グルカン類はマウス血清中において腫瘍退縮因子の誘導が見出されるが,この因子の誘導活性はカルボキシメチル化 $\beta$ -D-グルカンの場合よりも弱いものである。AG-AL-CMS, AG-AL-CMI及びAM-APP-CMの網内系貪食能はCMPSのそれと同等の値が認められた。

我々が既に報告したCMPSとマイトマイシンC結合体の抗腫瘍活性に関する研究を基にして,これらカルボキシメチル化(1→3)- $\alpha$ -D-グルカン類は薬物送達システムにおける高分子担体としての有用性が期待される。

**索引用語:** 多糖, (1→3)- $\alpha$ -D-グルカン, カルボキシメチル基, 抗腫瘍作用, マクロファージ, 免疫調節剤

a) 岐阜薬科大学衛生化学教室  
岐阜市三田洞東5丁目6-1

a) Laboratory of Hygienic Chemistry,  
Gifu Pharmaceutical University,  
6-1, Mitahora-higashi 5-chome, Gifu 502, Japan

b) 岐阜県保健環境研究所  
岐阜市野一色4丁目6-3

b) Gifu Prefectural Health and Environment Research Center  
6-3, Noishiki 4-chome, Gifu 500, Japan

## Distribution of Carboxymethyl Groups in Carboxymethylated (1→3)- $\alpha$ -D-Glucans and Immunomodulating Activities of Their Carboxymethylated Polysaccharides

SHIGEO UKAI<sup>a)</sup>, ISAO YOSHIDA<sup>b)</sup>, TADASHI KIHNO<sup>a)</sup>

**Abstract** : This review deals with the distribution of carboxymethyl groups in the carboxymethylated derivatives(AG-AL-CMS, AG-AL-CMI and AM-APP-CM) of linear (1→3)- $\alpha$ -D-glucans(AG-AL and AM-APP) from *Agrocybe cylindracea* and *Amanita muscaria*, and also the immunomodulating activities of their carboxymethylated polysaccharides.

These carboxymethylated derivatives(water-soluble AG-AL-CMS and AM-APP-CM, gelatinous AG-AL-CMI) possessed potent antitumor activity against the solid form of Sarcoma 180 in mice, although the native D-glucans(AG-AL and AM-APP) had little effect on the tumor.

The degree and location of the substitution of the carboxymethyl groups in the carboxymethylated derivatives(AG-AL-CMS, AG-AL-CMI and AM-APP-CM) were determined by our previously developed method. The procedure involves the reduction of the carboxymethyl groups to hydroxyethyl groups, hydrolysis of the resulting hydroxyethyl polysaccharide and GC-MS analysis of the hydrolysate as the alditol acetates and 1,2-ethylene-D-glucose derivatives. These substituents exhibited a characteristic distribution pattern between carboxymethylated (1→3)- $\alpha$ -D-glucan and (1→3)- $\beta$ -D-glucan.

Immunomodulating activities of the carboxymethylated glucans(AG-AL-CMS, AG-AL-CMI and AM-APP-CM) were evaluated with murine peritoneal macrophages playing an important role in tumor immunity. The ratio of macrophages in peritoneal exudate cells increased more than 50% after the administration of the carboxymethylated (1→3)- $\alpha$ -D-glucans. The carboxymethylated (1→3)- $\alpha$ -D-glucans indicated higher potentiating activities for macrophages than carboxymethylated linear (1→3)- $\beta$ -D-glucan(CMPS) in the potency of products of superoxide anion, nitric oxide, tumor necrosis factor, the amount of glucose consumption, and the activation of acid phosphatase. The carboxymethylated  $\alpha$ -D-glucans are found to induce the tumor regressing factor in mouse serum, although the ability of the induction of this factor is weaker than that of the carboxymethylated  $\beta$ -D-glucan. The reticuloendothelial system-potentiating activation of AG-AL-CMS, AG-AL-CMI and AM-APP-CM was similar to that of CMPS.

We suggest from our work on the antitumor activity of the conjugate of mitomycin C with CMPS that the carboxymethylated (1→3)- $\alpha$ -D-glucans could also be a useful polymer for a carrier in a drug delivery system.

**Keyphrases** : polysaccharide, (1→3)- $\alpha$ -D-glucan, carboxymethyl group, antitumor effect, macrophage, immunomodulator

近年、癌に効くと言われているキノコ類から種々の多糖類が単離され、その抗腫瘍成分の本体が $\beta$ (1→6)分岐(1→3)- $\beta$ -D-グルカンであることが明らかにされた<sup>1)</sup>。これら $\beta$ -D-グルカン類の抗腫瘍作用は従来の制癌剤とは異なり、腫瘍細胞に対する直接細胞傷害性はなく宿主の免疫機能賦活に基づくものであることを示す幾多の報告がなされている<sup>2)</sup>。即ち、 $\beta$ -D-グルカン類の抗腫瘍作用発現機構は、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞、キラー細胞

胞といった腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を有する細胞群の賦活に基づく生体防御機構の活性化によるものとされている<sup>2)</sup>。

現在臨床において実施されている癌治療は、主として手術療法、放射線療法、化学療法等である。しかし、いずれも癌細胞に対する効果は強いが、生体に対する副作用も多く癌治療における大きな問題点となっている。そこで生体本来の防御機構の調節をはかる癌治療法が一つの柱として提唱されている。過剰な防御によりアレルギーが惹き起こされたり、防御機能の低下により癌化することはよく知られており、これらの制御法の一つとして1980年に米国立癌研究所において生み出されたimmunomodulatorあるいはbiological response modifier(BRM)という概念の基に医薬品が開発されている。現在わが国ではレンチナン<sup>3)</sup> やシゾフィラン<sup>4)</sup> といったキノコ由来の $\beta$ (1→6)分岐(1→3)- $\beta$ -D-グルカンがBRMとして開発され、胃癌や子宮頸癌の治療の際に他の抗癌剤や放射線療法と併用して利用されている。

また、分岐(1→3)- $\beta$ -D-グルカン類の作用をさらに増強するために、置換基(カルボキシメチル基<sup>5a)</sup>、ヒドロキシエチル基<sup>5b)</sup>、硫酸基<sup>5c)</sup>など)の導入<sup>5)</sup>や、過ヨウ素酸酸化後の還元処理によるポリアルコール化<sup>6)</sup>、糖残基の導入<sup>7)</sup>、抗癌性抗生物質(例えばマイトマイシンC)の導入<sup>8)</sup>など試みられている。

一般に直鎖状(1→3)- $\beta$ -D-グルカン類は水に難溶性であり、カルボキシメチル基の導入<sup>5a)</sup>は可溶化のために有用な方法である。例えば*Alcaligenes faecalis*の産生する直鎖状(1→3)- $\beta$ -D-グルカンの水溶性O-カルボキシメチル(以下、O-カルボキシメチルをカルボキシメチルと略す)化誘導体(CMPS:武田薬品工業(株))はSarcoma 180に対する抗腫瘍効果増強を示し<sup>5a)</sup>、その作用は免疫機能賦活よりもむしろ腫瘍退縮因子<sup>9)</sup>(Tumor regressing factor:TRF)によることが報告されている。アルカリ条件下でのカルボキシメチル化では、カルボキシメチル基は基本的には遊離の水酸基に導入可能であり、特定の位置に置換基を導入することは困難である。しかし、反応条件を変えることによって置換度が異なるカルボキシメチル化誘導体を調製し、それらの抗腫瘍活性についての報告がなされており<sup>5a)</sup>、置換度と抗腫瘍効果との間には関連があると考えられている。従来、カルボキシメチル基の分析法として化学滴定法、分光光度法、電気滴定法<sup>10)</sup>などが挙げられるが、これらの方法では置換度しか測定できず、置換位置の情報は得られない。しかし、構造-活性相関という点から、カルボキシメチル化誘導体の詳細な構造の解明は必要かつ重要である。一方、これまでにキノコ類から単離された(1→3)- $\alpha$ -D-グルカン類には(1→4)などの他の結合様式を含むもの<sup>11)</sup>や、グルコース以外の単糖を含むもの<sup>11)</sup>が殆んどであり(1→3)結合のみからなる高重合かつ直鎖状(1→3)- $\alpha$ -D-グルカンの存在は見当たらず、さらに抗腫瘍作用に関する研究はなされていない。

本稿では、筆者らの研究を中心にヤナギマツタケ及びベニテングタケより得られた直鎖状(1→3)- $\alpha$ -D-グルカンAG-AL及びAM-APPのマウスにおけるSarcoma 180に対する抗腫瘍効果並びに化学修飾カルボキシメチル誘導体化による抗腫瘍効果の増強発現<sup>12)</sup>並びに免疫細胞、特にマクロファージに対する免疫調節作用に及ぼす影響<sup>13)</sup>について述べる。また、筆者らが開発した化学修飾カルボキシメチル化多糖のカルボキシメチル基の分布と置換度の決定法<sup>14)</sup>を紹介する。

## 1. ヤナギマツタケ子実体より得られた直鎖状(1→3)- $\alpha$ -D-グルカンAG-AL及びそのカルボキシメチル化誘導体の抗腫瘍効果について

ヤナギマツタケ(*Agrocybe cylindracea* (Fr.) Maire)は、担子菌類、同担子菌亜綱、オキナタケ科(Bolbitiaceae)に属する食用キノコで、香りは少ないが調理時の型くずれが少なく食感的にも優れたキノコであり、嗜好食品として消費が期待できると考えられている。また、キノコ類には食物繊維が多く含まれていることから機能性食品としても注目

されている。一方、真菌類などに含まれる多糖体が抗腫瘍作用、抗高脂血症作用、血糖降下作用などの生理活性を示すことが報告されている<sup>15)</sup>。現在、わが国ではレンチナン<sup>3)</sup> やシゾフィラン<sup>4)</sup> といったキノコ由来の $\beta(1\rightarrow6)$ 分岐(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカンがBRMとして開発され、他の抗癌剤及び放射線療法と併用し胃癌や子宮頸癌の治療に供されている。

ヤナギマツタケ子実体の多糖類に関する研究は、これまでに著者らは熱水抽出画分より得られた(1 $\rightarrow$ 4)及び(1 $\rightarrow$ 6)結合を含んだ(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカンAG-HN1及び(1 $\rightarrow$ 6)結合グルコース残基、ガラクトース残基を多く含んだ(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -結合のグルコース、フコース、ガラクトースから成るヘテロ多糖AG-AL-HN2が血糖降下作用を示すことを報告してきた<sup>16)</sup>。しかし、アルカリ抽出画分に関する研究は行われていない。

そこで、人工栽培品ヤナギマツタケ子実体の熱水及び5%炭酸ナトリウム水溶液抽出処理後の残渣のアルカリ抽出画分から得られた中性多糖AG-ALの物理化学的諸性質と化学構造並びに抗腫瘍作用<sup>12a)</sup>について述べる。また、可溶化と抗腫瘍活性の改善をめざし本多糖AG-ALをカルボキシメチル化した場合の効果について付記する。

愛知県農業試験場で人工栽培されたヤナギマツタケ (*Agrocybe cylindracea* (Fr.) Maire)子実体をホモジナイズし、0.9%塩化ナトリウム、熱水及び5%炭酸ナトリウムにて順次抽出、その残渣を窒素気流下で水素化ホウ素ナトリウム存在下、1M水酸化ナトリウム水溶液を用いて抽出し、その抽出液の水不溶性画分より中性多糖としてグルカン(AG-AL)を0.37%の収率で得た。AG-ALは窒素を含まず、その凍結乾燥品は水に不溶であり、1M程度の水酸化アルカリに可溶である。

ゲルろ過法(TOYOPEARL HW-65, 溶離液: 1M NaOH)において均一性を確認し、重量平均分子量は約560,000と推定された。AG-ALの化学構造は、メチル化分析の結果より、多量の1 $\rightarrow$ 3結合したグルコピラノース及び微量の非還元末端のグルコピラノースの存在が示され、1 $\rightarrow$ 3結合したグルコピラノース残基から成る直鎖状グルカンであった。AG-ALのアノマー配向は比旋光度 ( $[\alpha]_D^{+195}$  (c=0.50, 1M NaOH))が正の高い値であり、IRスペクトルから925 $\text{cm}^{-1}$ にtype 1の、850 $\text{cm}^{-1}$ にtype 2の吸収が認められ $\alpha$ 体であることが示された。また、<sup>13</sup>C-NMRスペクトル(1M NaOD)からAG-ALのアノマー領域のシグナル103.90ppmは直鎖状 $\beta$ -グルカンcurdlanの106.19ppmに比べて高磁場側に見られ、INEPT法により求めたAG-ALのC<sub>1</sub>-H<sub>1</sub>カップリング定数が167.3 HzであったことよりAG-ALのグルコース残基は $\alpha$ 配向であることが支持された。今までに菌類などから単離された(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルカン類は、1 $\rightarrow$ 4結合を含んでいるもの<sup>11)</sup>や、分子量の小さい(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルカン(少量のマンノース、キシロースを含む)<sup>11)</sup>が単離されているが、AG-ALのように1 $\rightarrow$ 3結合だけから成る重合度の大きい $\alpha$ -グルカンの例は見当たらず、興味深い知見である。

AG-ALはddY系雄性マウスに皮下移植したSarcoma 180固型腫瘍に対する抗腫瘍試験(腫瘍移植24時間後から1日1回10日間腹腔内投与)において、有効性は認められなかったが、AG-ALの部分カルボキシメチル化誘導体AG-AL-CMS及びAG-AL-CMI投与群では対照群と比較して、腫瘍増殖抑制率が約60%以上で有意な差が認められ、抗腫瘍効果の発現が示された(Table 1)。このことは置換基が導入されることにより、分子間あるいは分子内の水素結合が阻害され、分子がAG-ALよりもランダムな高次構造を取り、水溶性が増したためであると推察される。これはカルボキシメチル基が側鎖様の働きを持ち、水溶性の改善及び高次構造の改変によるものであると考えられる。尚、(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルカンのカルボキシメチル化は本多糖が初めての試みである。

Table 1. Antitumor Activity of AG-AL, AG-AL-CMS, and AG-AL-CMI against Sarcoma 180

Sample	Dose (mg/kg/d x 10)	Mean tumor wt. ± S.D. (g)	Inhibition ratio (%)	Complete regression
Exp-1				
AG-AL	1	4.99 ± 2.13	6.0	0/6
	10	3.66 ± 0.21	31.1	0/6
	20	6.25 ± 4.04	-17.7	0/6
PS <sup>a)</sup>	10	1.11 ± 1.26 <sup>b)</sup>	79.1	2/6
Control	-	5.31 ± 3.55	-	0/6
Exp-2				
AG-AL-CMS	1	1.98 ± 1.73 <sup>c)</sup>	78.3	0/6
	10	2.38 ± 2.95 <sup>c)</sup>	74.0	0/6
	20	1.08 ± 1.05 <sup>d)</sup>	88.2	0/6
Control	-	9.14 ± 4.39	-	0/6
Exp-3				
AG-AL-CMI	1	1.49 ± 1.35 <sup>b)</sup>	62.8	1/6
	10	1.29 ± 0.99 <sup>b)</sup>	67.8	1/6
	20	0.95 ± 0.11 <sup>b)</sup>	76.3	0/6
CMPS <sup>e)</sup>	10	0.33 ± 0.50 <sup>c)</sup>	91.8	4/6
Control	-	4.00 ± 2.36	-	0/6

a) Curdian type (1→3)- $\beta$ -D-glucan from *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* IFO 13140. b) Significant difference from the control,  $p < 0.05$ , c)  $p < 0.01$ , d)  $p < 0.005$ . e) Carboxymethylation product of PS.

## 2. ベニテングタケ子実体より得られた直鎖状(1→3)- $\alpha$ -D-グルカンAM-APP及びそのカルボキシメチル化誘導体の抗腫瘍効果について

ベニテングタケ (*Amanita muscaria* (Fr.) Hooker) は、テングタケ科 (Amanitaceae) に属するキノコであり、北海道の一方では長期間塩漬にし、あく抜きをしてから食用にされている。ベニテングタケ子実体の多糖類に関する研究は、これまでに著者らがアルカリ抽出画分からの抗腫瘍作用を有する水溶性  $\beta$ -(1→6)分岐(1→3)- $\beta$ -D-グルカンAM-ASNについて報告されているにすぎない<sup>17)</sup>。そこで、ベニテングタケ子実体のアルカリ抽出画分より水溶性のAM-ASNを分離除去した画分から得た水不溶性多糖AM-APPに着目し、その化学構造と物理化学的諸性質並びに、部分カルボキシメチル化多糖AM-APP-CMの抗腫瘍効果<sup>12b)</sup>について述べる。

北海道石狩郡月形町のシラカバ林にて採取したベニテングタケ (*Amanita muscaria* (Fr.) Hooker) 子実体を細切し、脱脂した後、0.9% 塩化ナトリウム水溶液、熱水及び5% 炭酸ナトリウム水溶液にて順次抽出、その残渣を窒素気流下で水素化ホウ素ナトリウム存在下、1 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて抽出、中和後、水溶性画分AM-ANSを除去し、水不溶性画分の0.5M 水酸化ナトリウム抽出によりグルカン (AM-APP) を0.08%の収率で得た。その凍結乾燥品は水に不溶であり、0.4M程度の水酸化アルカリに可溶である。

ゲルろ過法 (TOYOPEARL HW-65, 溶離液: 0.5M NaOH) において均一性を確認し、重量平均分子量は約42,000であった。AM-APPの化学構造は、メチル化分析の結果より、多量の1→3結合したグルコピラノース及び微量の非還元末端のグルコピラノースの存在が示唆され、1→3結合したグルコピラノース残基から成る直鎖状グルカンであるこ

とが示された。AM-APPのアノマー配向は、比旋光度 ( $[\alpha]_D^{+160}$  ( $c=0.11$ ,  $0.4M$  NaOH))が正の高い値であり、IRスペクトルから $922-933\text{cm}^{-1}$ にtype 1の、 $845\text{cm}^{-1}$ にtype 2aの $\alpha$ 結合に基づく吸収が認められ、 $\alpha$ 結合であることが示された。また、 $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトル(DMSO- $d_6$ )からアノマー領域のシグナルが $99.62\text{ppm}$ に見られ、また、INEPT法により求めた $\text{C}_1\text{-H}_1$ カップリング定数が $168.4$  HzであったことよりAM-APPのglucopyranose残基は $\alpha$ 配向であることが支持された。即ち、AM-APPはヤナギマツタケ由来のAG-ALと同様、直鎖状(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルカンであり、AG-AL(分子量:560,000)よりも低分子量(42,000)の多糖である。

AG-ALと同様にAM-APPのSarcoma 180に対する抗腫瘍作用は認められなかったが、AM-APPの部分カルボキシメチル化誘導体AM-APP-CMはddY系雄性マウスのSarcoma 180に対する抗腫瘍試験の結果、腫瘍増殖抑制率が約60%以上で有意な差が認められ、前章1. AG-AL-CMS及びAG-AL-CMIの場合と同様に抗腫瘍効果の発現が観察された(Table 2)。

Table 2. Antitumor Activity of AM-APP and AM-APP-CM against Sarcoma 180

Sample (n=7)	Dose (mg/kg/d x 10)	Mean tumor wt. $\pm$ S.D. (g)	Inhibition ratio (%)
Exp-1			
AM-APP <sup>a)</sup>	1	7.95 $\pm$ 2.33	41
	10	10.74 $\pm$ 4.73	20
Control	-	13.47 $\pm$ 5.13	-
Exp-2			
AM-APP-CM <sup>b)</sup>	1	2.38 $\pm$ 1.86 <sup>d)</sup>	58
	10	1.07 $\pm$ 0.60 <sup>e)</sup>	81
CMPS <sup>c)</sup>	10	0.59 $\pm$ 0.61 <sup>e)</sup>	90
Control	-	5.60 $\pm$ 0.61	-

a) Water-insoluble polysaccharide of the alkaline extract from *Amanita muscaria*.

b) Carboxymethylated product of AM-APP. c) Carboxymethylated (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan.

Significantly different from the control, d)  $p < 0.01$ , e)  $p < 0.001$ .

### 3. 化学修飾カルボキシメチル化誘導体のカルボキシメチル基の分布と置換度について

ヤナギマツタケ及びベニテングタケより単離した直鎖状(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルカンAG-AL及びAM-APPの水酸基に部分的にカルボキシメチル基を導入することにより抗腫瘍効果が発現することが明らかとなり、カルボキシメチル基の導入と抗腫瘍効果との関連性が示唆される。それ故、カルボキシメチル基の置換位置と分布、並びに置換度の解明は、抗腫瘍性グルカンの構造-活性相関という観点からも重要な課題である。

これまで、カルボキシメチル基の検索法として、化学滴定法、分光光度法、電気滴定法<sup>10)</sup>等による置換度の測定法があるのみで、置換基の分布位置に関する報告はない。

筆者らが開発した分析法<sup>14)</sup>による直鎖状(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルカンのカルボキシメチル化誘導体AG-AL-CMS, AG-AL-CMI及びAM-APP-CMのカルボキシメチル基の置換位置と分布及び置換度<sup>14a)</sup>について述べる。

カルボキシメチル化多糖AG-AL-CMS, AG-AL-CMI及びAM-APP-CM中のカルボキシメチル基と水溶性カルボジイミド(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride)を反応させ、続いて4M HClにてpH 7.0を維持しな

がらNaBH<sub>4</sub>で還元し、ヒドロキエチル(HE)基に誘導した。そのヒドロキエチル化多糖を加水分解して得られた単糖を常法に従い還元アセチル化を行い、アセテート誘導体として同定を行った。その概要をChart 1に示す。

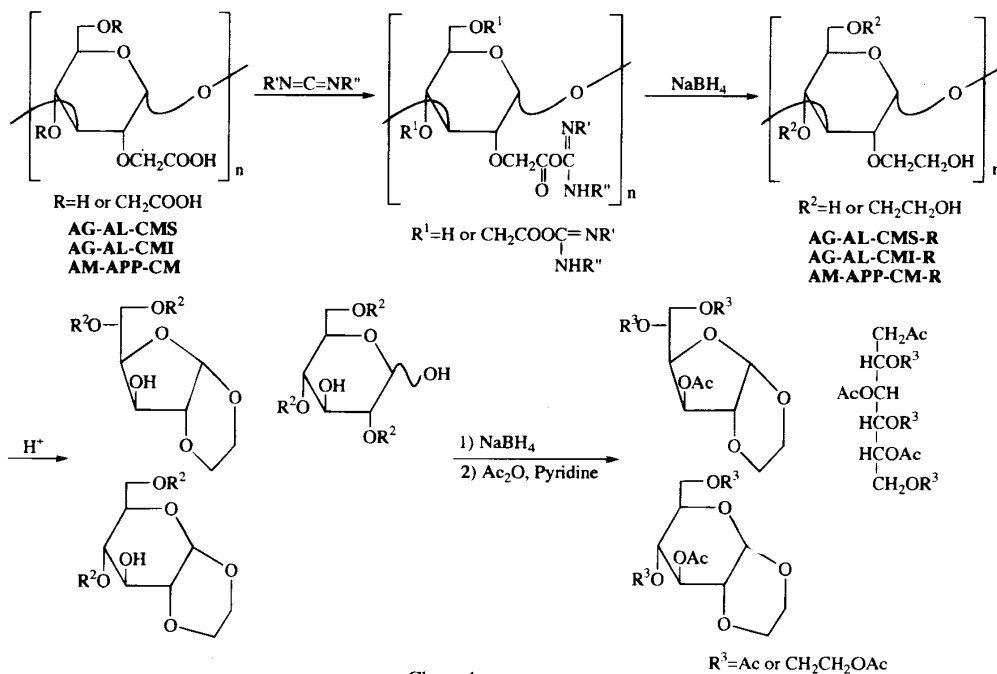


Chart 1

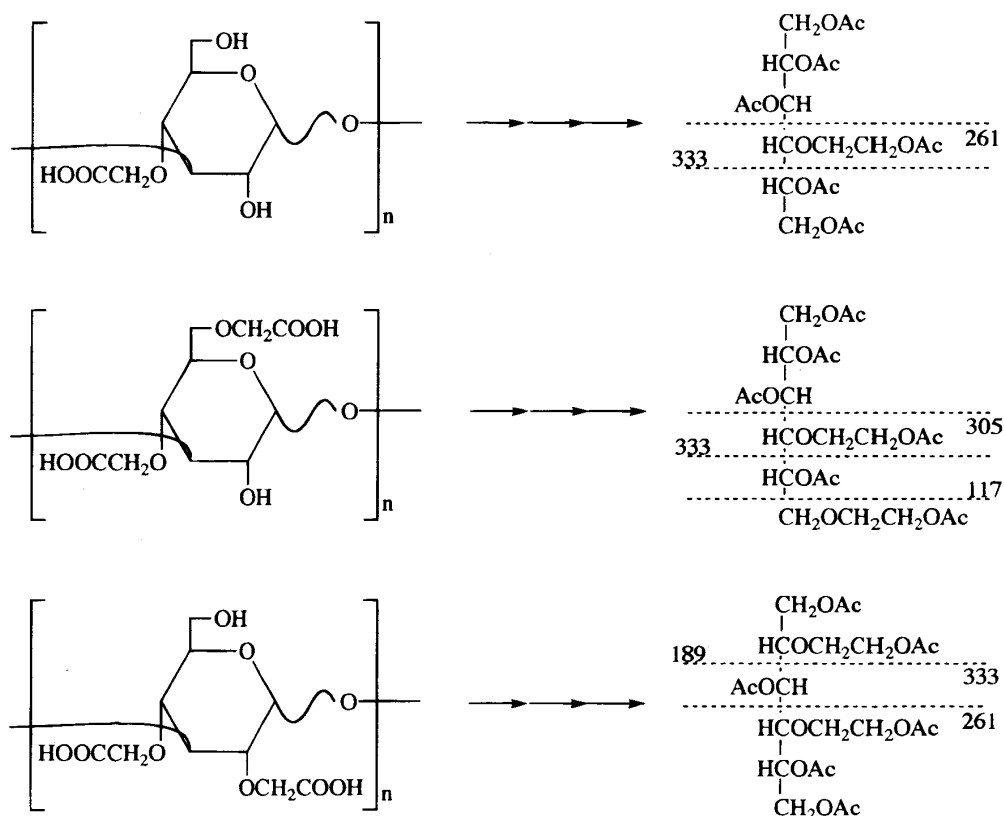


Chart 2

(1→3)結合したグルカンのグルコース残基の2位の水酸基がカルボキシメチル化されているものからは、2種類の開環誘導体及び1種類の開環誘導体を得られた。その開環誘導体のマスペクトルでは特徴的な開裂フラグメント  $m/z$  261, 333が認められた。また、2, 4位及び4, 6位由来の開環誘導体ではそれぞれ  $m/z$  189, 261, 333及び117, 305, 333のフラグメントピークが認められた(Chart 2)。(1→3)- $\alpha$ -グルカンでは、そのエーテル度に相違はあるものの、2, 4, 6位水酸基がそれぞれカルボキシメチル化されていたが、(1→3)- $\beta$ -グルカンでは、2位水酸基に置換されたものは存在しなかった。このことは、(1→3)- $\beta$ -グルカンのグルコース残基の2位水酸基は高次構造であるヘリックスの内側に位置しており<sup>18)</sup>、カルボキシメチル化の際、置換基が導入されにくいのではないかと推察した。一方、(1→3)- $\alpha$ -グルカンはリボン様の構造をとっているとの報告<sup>19)</sup>があり、何れの水酸基にも置換され得たと考えられる。

それぞれのカルボキシメチル基の分布と置換度を検討した結果より、AG-AL-CMS, AG-AL-CMI及びAM-APP-CMの6位置換体のしめる割合が34%, 29%, 49%と差異がみられ、両多糖の水溶性の相違の要因の一つと推定した。6位がアセチル基により置換された(1→3)- $\alpha$ -マンナンは水によく溶け、脱アセチル化体は水に難溶性であることが報告されている<sup>20)</sup>ことから、6位水酸基に置換基が導入されることにより分子間あるいは分子内の水素結合が阻害され、分子が元のグルカンよりもランダムな高次構造を取り、水溶性が増したためであると推察した。これはカルボキシメチル基が側鎖様の働きを持ち、水溶性の改善及び高次構造の改変によるものであると考えられる。

AG-ALからはAG-AL-CMS及びAG-AL-CMIの2種類の誘導体を得られたのに対して、AM-APPからはAM-APP-CMのみが得られたのは、AM-APPがAG-ALに比べて低分子量であり、またAM-APP-CMの一置換体では6位に多く置換されており、4, 6位置換体も認められたことにより、AM-APPはカルボキシメチル基が置換されやすく、その結果水溶性のもののみが得られたのではないかと考えられる(Table 3, Table 4)。

Table 3. GC and GC-MS of D-Glucose Derivatives from the Hydrolysate of Reduced O-(Carboxymethyl)-D-Glucans

Sugar derivatives <sup>a)</sup> (as acetate)	Prominent fragment ( $m/z$ )	Percentage of total			
		CMPS	AG-AL-CMS	AG-AL-CMI	AM-APP-CM
1 1,2-O-etn- $\alpha$ -D-Gf	43 73 127 170 187 273		1.4	0.9	0.5
2 1,2-O-etn- $\alpha$ -D-Gp	43 73 86 157 170 199 230 272		7.3	5.0	3.1
3 D-G-ol	43 73 145 217 289 361 375	44.2	39.1	41.6	33.8
4 1,2-O-etn- $\beta$ -D-Gp	43 73 86 157 170 199 230 272		1.2	1.8	3.8
5 1,2-O-etn-6-O-he- $\alpha$ -D-Gf	43 73 87 127 187		1.4	2.6	8.9
6 1,2-O-etn-6-O-he-D-Gp	43 73 86 157 170 199 259 316		2.9	2.0	5.2
7 6-O-he-G-ol	43 87 117 170 375	29.5	14.8	9.3	20.4
8 2-O-he-G-ol	43 73 87 189 375 405		9.8	7.6	7.7
9 4-O-he-G-ol	43 87 145 261 333 375	12.7	7.3	9.7	2.5
10 1,2-O-etn-4-O-he-D-Gp	43 73 115 145 173 245 275 317			4.7	
11 1,2-O-etn-6-O-he-D-Gp	43 73 86 157 170 199 259 316		5.5	10.1	3.9
12 4,6-O-dihe-G	43 73 87 117 305 333 419	13.6			2.7
13 2,4-O-dihe-G	43 73 87 189 261 333 375		9.6 <sup>b)</sup>	4.6 <sup>b)</sup>	7.7 <sup>b)</sup>
DS (Degree of substitution)			0.80	0.82	0.95

a) etn=ethylene, he=hydroxyethyl, dihe=dihydroethyl, Gf=glucofuranose, Gp=glucopyranose, G-ol=glucitol.

b) Overlapping peak with 2,6-O-dihe-D-G-ol



Table 4. Location of Carboxymethyl Groups on a Glucose Unit

	Glc.	2-CM-G <sup>a)</sup>	4-CM-G	6-CM-G	4,6-diCM-G	2,4-diCM-G	2,6-diCM-G	DS <sup>b)</sup>
CMPS	44.2	--	12.7	29.5	13.6	--	--	0.68
AG-AL-CMS	39.1	19.7	7.3	14.8	--	--, 9.6 <sup>c)</sup>	9.8	0.80
AG-AL-CMI	41.6	15.4	9.7	9.3	--	4.7, 4.6 <sup>c)</sup>	14.8	0.82
AM-APP-CM	33.6	15.1	2.5	20.4	2.7	--, 7.7 <sup>c)</sup>	18.0	0.95

a) CM=carboxymethyl, diCM=dicarboxymethyl, G=glucose

b) Degree of substitution per glucose

c) Mixture of 2,4-diCM-G and 2,6-diCM-G

#### 4. カルボキシメチル化直鎖状(1→3)- $\alpha$ -D-グルカンの免疫調節作用について

現在, わが国ではレンチナン<sup>31)</sup> やシゾフィラン<sup>41)</sup> といった $\beta$ -(1→6)分岐(1→3)- $\beta$ -D-グルカンが胃癌や子宮頸癌に臨床応用されている。これら抗腫瘍作用を持つ分岐(1→3)- $\beta$ -D-グルカン類は腫瘍細胞に対して直接細胞傷害性を示さず<sup>21)</sup>, 抗腫瘍作用の発現には三重らせん構造の関与が示唆されている<sup>21)</sup>。また, これらの分岐(1→3)- $\beta$ -D-グルカン類には免疫学的監視機構の調節と, 癌細胞に対する宿主の抵抗性を上げる作用が報告されている<sup>22)</sup>。マクロファージは免疫系において重要な細胞であり, (1→3)- $\beta$ -D-グルカン類によって, インターロイキン-1や腫瘍壊死因子のようなサイトカインを誘導する<sup>23)</sup>。しかし, (1→3)- $\alpha$ -D-グルカンの化学修飾体の免疫調節活性については未だ報告されていない。

これまでに, ヤナギマツタケ及びベニテングタケからそれぞれ直鎖状(1→3)- $\alpha$ -D-グルカンAG-AL, AM-APPを単離し, そのカルボキシメチル化誘導体(AG-AL-CMS, AG-AL-CMI及びAM-APP-CM)に抗腫瘍効果<sup>12)</sup>が発現することを提示すると共に, それらのカルボキシメチル基の分布と置換度<sup>14a)</sup>についても明らかにしたので, これら抗腫瘍性カルボキシメチル化(1→3)- $\alpha$ -D-グルカン類の免疫調節作用<sup>13)</sup>について述べる。

#### 4-1. 物理化学的諸性質

##### 4-1-1 重量平均分子量

ゲルろ過法(TOYOPEARL HW-65)において0.1M NaClを溶出液として用いた場合, AG-AL-CMS, AG-AL-CMI, AM-APP-CMの分子量はそれぞれ390,000, 730,000, 84,000と算出された。一方, 1 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いた場合は, 各々155,000, 320,000, 100,000と算出された。AG-AL (Mw=560,000) 由来のカルボキシメチル化多糖は各々2倍以上の分子量の違いが生じた。AM-APP(Mw=42,000)の場合は, いずれの場合もほぼ一定の値が得られた。このことは詳細については不明であるが, AG-AL由来の誘導体は何らかの立体構造(高次構造)を形成しているものと推察される。

##### 4-1-2 アニリンブルーによる相対蛍光強度

AG-AL-CMSとAG-AL-CMIは高次構造を有する(1→3)- $\beta$ -D-グルカン(PS)の蛍光光度100に対して, 相対蛍光強度が約70, AM-APPとAM-APP-CMは約20であったことからAG-AL-CMSとAG-AL-CMIは分子の一部が高次構造を有していることが示唆される。一方, AM-APP-CMは元の多糖AM-APPとほぼ同様に相対蛍光強度が低いことから高次構造は有していないものと思われる。また, CMPSの相対蛍光強度は98であり, 高次構造を保持しているものと思われる。

AG-AL-CMSとAG-AL-CMIは中性-アルカリ性において分子量の変化が観察され, アニリンブルーによる相対蛍

光強度は70を示し、このことから、AG-AL-CMS, AG-AL-CMIの分子の一部はPS及びCMPSのような高次構造を有していることが示唆された。AM-APP-CMについては、分子量及び相対蛍光強度の変化はみられず、PS及びCMPSに比べて相対蛍光強度が低いことから高次構造を有していないものと思われる。

#### 4-2. 腫瘍退縮因子(TRF)の誘導

近年、担癌マウスに、ある種の抗腫瘍多糖体を投与すると、直ちに生腫瘍細胞が急激に減少するという現象が見いだされた<sup>9)</sup>。このことは、従来の免疫細胞の活性化という考え方では説明し難いものであったが、國元ら<sup>9)</sup>は、この現象を血清中の腫瘍退縮因子(Tumor regressing factor:TRF)によるものと示唆し、抗腫瘍多糖体による作用発現の重要なファーストステップであると報告している。

ヤナギマツタケ由来のAG-AL及びベニテングタケ由来のAM-APPのカルボキシメチル化によって得られた抗腫瘍性カルボキシメチル化多糖のTRF誘導効果を國元らの方法<sup>9)</sup>に従い検討し、その結果を腫瘍重量当りの細胞構成として示した(Fig.1)。CMPSは正の対照群として用いた。その結果、AG-AL-CMS, AG-AL-CMI, AM-APP-CMの場合は対照群と比較して、腫瘍細胞はそれぞれ40%, 39%, 64%に減少し、CMPS投与群と比較して2-3倍程度であった。また、好中球は対照群と比較して、2倍以上に増加し、CMPS投与群の2倍よりも好中球の増加が認められた。これらの事実は、CMPSのTRF誘導活性よりは高くないが、AG-AL-CMS, AG-AL-CMI, AM-APP-CMがTRF誘導活性を有していることを示している。

#### 4-3. カーボンクリアランス試験

対照群のカーボンクリアランス値15.34minに対して、AG-AL-CMSの場合は11.94min, AG-AL-CMIは10.59min, AM-APP-CMは10.99minでありそれぞれ有意なカーボンクリアランス値が得られ、その値はCMPSの値とほぼ同程度であった(Fig.2)。

即ち、カルボキシメチル誘導体は、Zymosanほどではないが、網内系機能の亢進が認められた。

#### 4-4. 腹腔滲出細胞(Peritoneal exudate cells:PEC)に及ぼす影響

カルボキシメチル化多糖の腹腔内投与によるPEC及びM $\phi$ の数に及ぼす影響について検討した。多糖投与後、3日目には、M $\phi$ 及びPECの数は対照群と比べ増大し、6日目、10日目にも増大を示した(Fig.3)。

このように、カルボキシメチル化多糖投与によりPECは増大し、M $\phi$ のPECに対する割合が増加することが明らかとなった。

#### 4-5. グルコース消費能

M $\phi$ が活性化されると、貪食のためのエネルギーATPや、ペントースリン酸回路における活性酸素生成に必要なNADPHの産生のために、グルコースが大量に消費される<sup>24)</sup>。そこで、常在M $\phi$ に対するグルコース消費能について検討した。

常在M $\phi$ をカルボキシメチル化多糖を含む培養液中で培養し、24, 72時間後に培養液中のグルコース濃度を測定した。その結果、AG-AL-CMS添加群, AG-AL-CMI添加群, AM-APP-CM添加群のグルコース消費能は、すべて対照群に比べて高い値を示した(Fig.4)。

この結果から、カルボキシメチル化 $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)グルカンがM $\phi$ を直接活性化していることが示唆された。

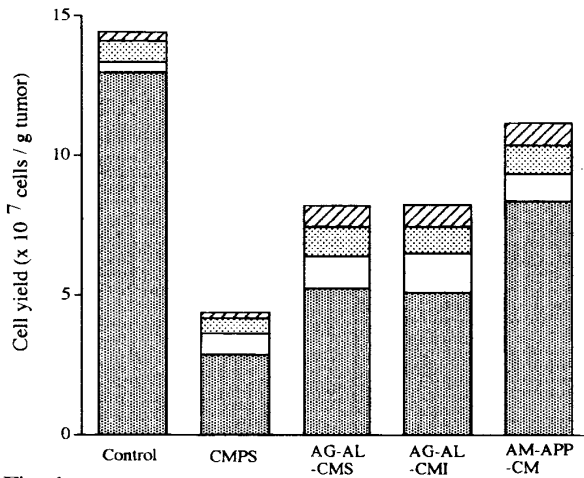


Fig. 1. Changes in Cellular Composition of Solid Sarcoma 180 Tumors Induced by Sera of Mice Bearing Sarcoma 180 with Injection of Carboxymethylated Glucans

■ S-180 □ PMN ▨ Macrophage ▩ Lymphocyte

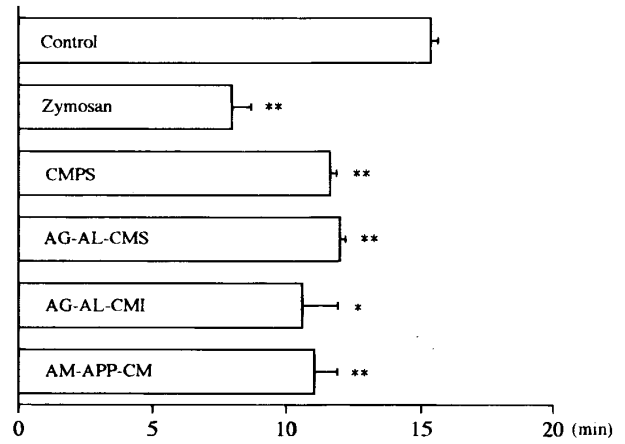


Fig. 2. Clearance Rate of Carbon ( $t_{1/2}$ , min)

Polysaccharide (50 mg/kg) was injected i.p. 48 h before the i.v. injection of carbon solution. The value expresses the mean  $\pm$  S.E. from four samples. Significant difference from the control, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ .

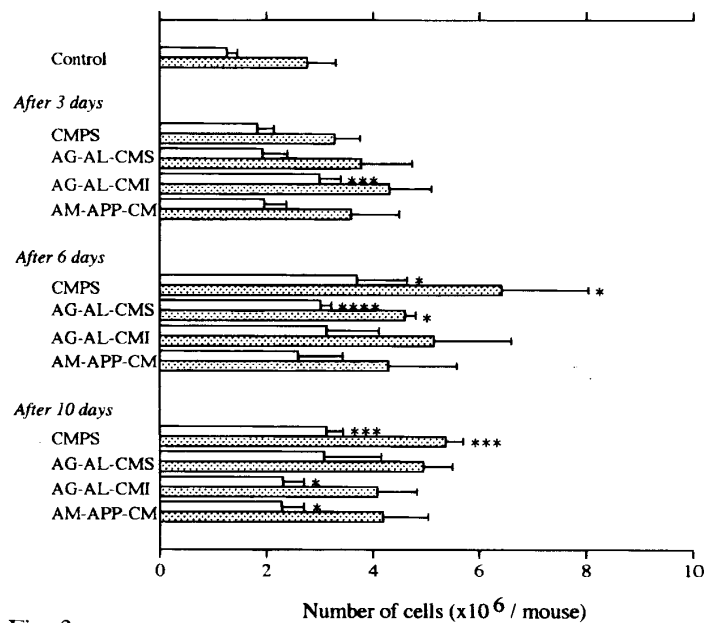


Fig. 3. Changes in the Numbers of Peritoneal Exudate Cells and Macrophages from Mice Treated with Carboxymethylated Glucans Administration

□ macrophages ▨ peritoneal exudate cells

Significant from the control, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*\*  $p < 0.001$

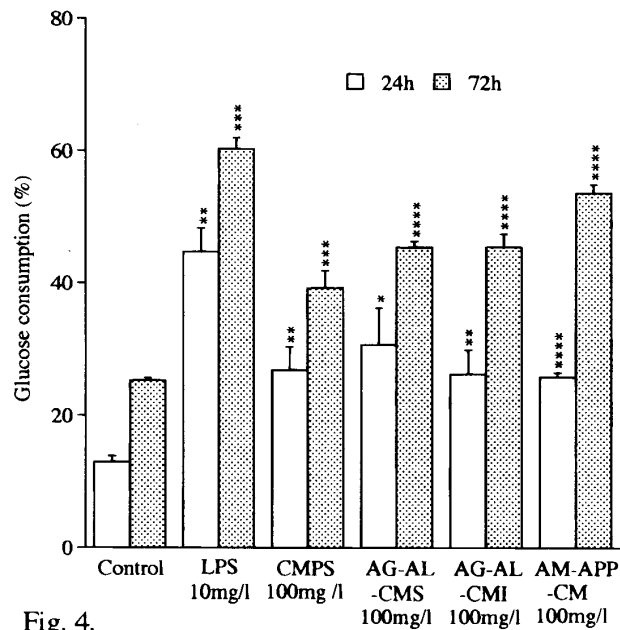


Fig. 4. Effect of Carboxymethylated Glucans on Glucose Consumption by Resident Macrophages

Significant difference from the control, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4-6. 酸性フォスファターゼ活性

多糖投与により得られたM $\phi$ の、ライソゾーム酵素の一つである酸性フォスファターゼ活性を測定した(Fig.5)。

CMPS投与群は、対照群とほぼ同等のフォスファターゼ活性を示したが、カルボキシメチル化 $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-グルカン投与群は3-5倍の活性を示した。

#### 4-7. 一酸化窒素(NO)産生能及びスーパーオキシドアニオン(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)産生能

NOは、腫瘍細胞のミトコンドリア呼吸系、特にその電子伝達系のcomplex IやII、及びクエン酸回路の酵素であるaconitaseに作用してその活性を阻害する<sup>25)</sup>。また、ribonucleotide reductaseを不活性化し、DNA合成を阻害する<sup>26)</sup>。多糖投与により得られたM $\phi$ からのNO産生能を、グリース反応を用いて測定した(Fig.6)。

LPS存在下では、全てのカルボキシメチル化誘導体投与群にNOの産生が認められた。

O<sub>2</sub><sup>-</sup>産生能をNBT還元法を用いて測定した(Fig.7)。Phorbol myristate acetate(PMA)の有無にかかわらず、カルボキシメチル化 $\alpha$ -グルカン誘導体投与群はニトロブルーテトラゾリウム(NBT)還元能を有し、O<sub>2</sub><sup>-</sup>産生能を増大することが示された。CMPS投与群は対照群に比べ、NBT還元能を有し、O<sub>2</sub><sup>-</sup>産生が示された。

カルボキシメチル化 $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)グルカン投与群はCMPSとほぼ同等か、それ以上のNBT還元能があり、O<sub>2</sub><sup>-</sup>産生能の発現が示された。

#### 4-8. 腫瘍壊死因子(TNF)様物質の誘導試験

活性化されたM $\phi$ の腫瘍細胞に対する傷害性について検討した(Fig.8)。

AG-AL-CMS及びAG-AL-CMI投与群では、LPS存在下で、CMPS投与群のほぼ2倍の活性を示した。一方、LPSの非存在下では、活性は認められなかった。AM-APP-CM投与群ではLPSの有無にかかわらず活性は認められなかった。

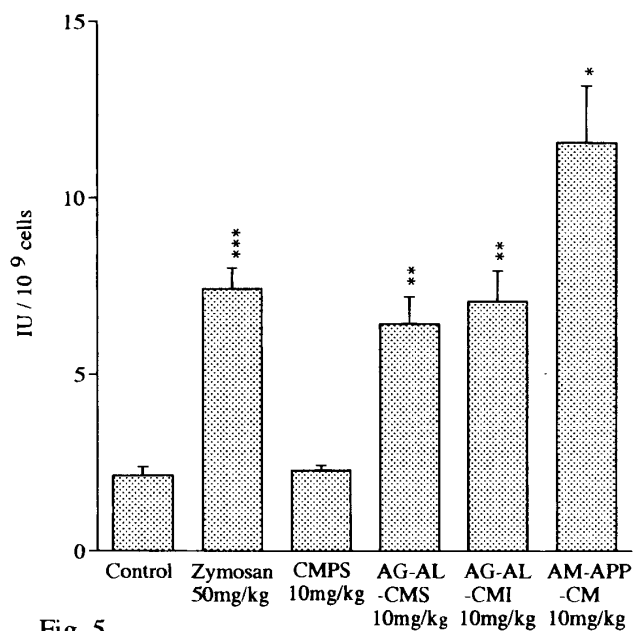


Fig. 5. Effect of Carboxymethylated Glucans on Lysosomal Acid Phosphatase Activity in Macrophages

Significant difference from the control, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$

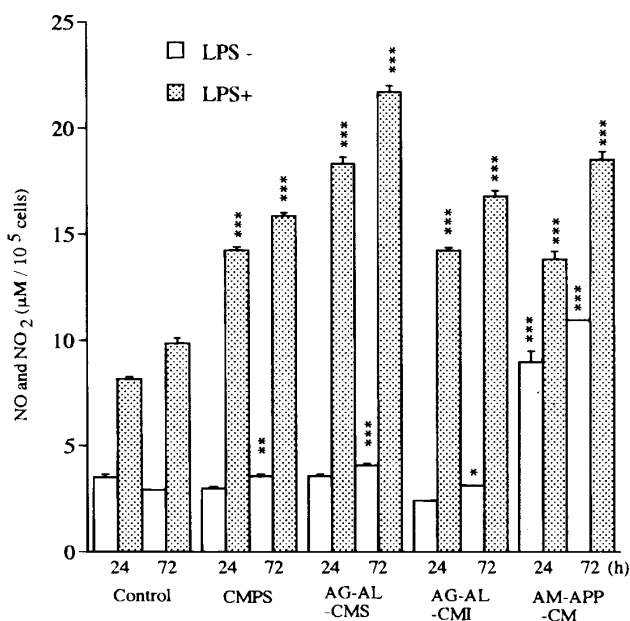


Fig. 6. Effect of Nitric Oxide Production in Macrophages from Mice Treated with Carboxymethylated Glucans

Each sample (10 mg/kg) was administered to 5 mice. Macrophages were incubated in the presence or absence of LPS. The concentration of nitric oxide in the supernatant of the culture medium was estimated by the absorbance at 570 nm with NaNO<sub>2</sub> as a standard.

The value expresses the mean  $\pm$  S.E. from five samples.

Significant difference from the control, \*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

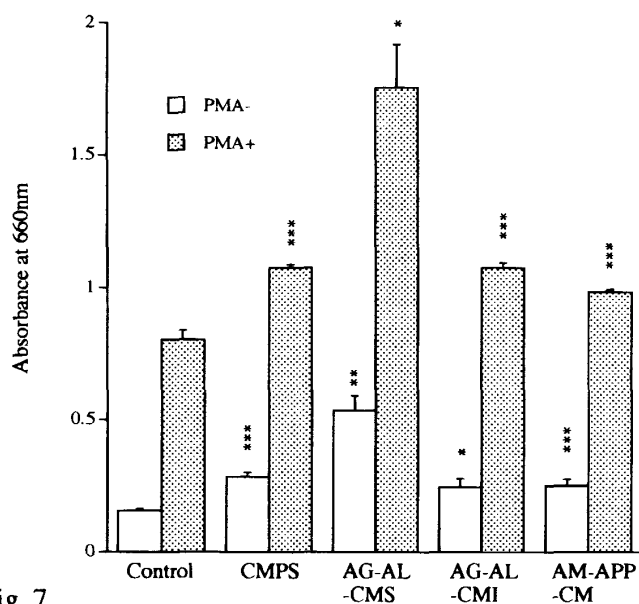


Fig. 7. Effect of NBT Reduction in Macrophages Treated with Carboxymethylated Glucans

Each sample was administered i.p. injection into 3 to 5 mice. Macrophages were incubated with NBT in the presence or absence of PMA. Formazan produced by reduction of NBT was dissolved in dimethyl sulfoxide containing 1 M KOH and the absorbance was measured at 660 nm. The value represents the mean  $\pm$  S.E. from 3 to 5 samples. Significant difference from the control, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

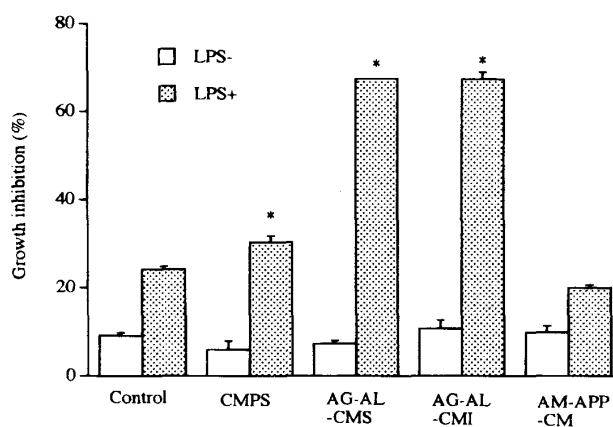


Fig. 8. *In Vitro* Cytotoxicity against L929 of Medium Prepared by Cultivating Macrophages Treated with Carboxymethylated Glucans

Macrophages from mice administered *Corynebacterium parvum* and each sample were incubated in the presence or absence of LPS for 24 h. The cytotoxic activity of the supernatant from the culture medium was assayed using L929 cells. Results were represented as the percentage of the proliferation of cell growth inhibited. The value expressed the mean  $\pm$  S.E. from four samples. Significant difference from the control, \*  $p < 0.001$ .

#### 4-9. 小括

分子量測定実験の結果から、AG-AL (Mw=560,000) 由来のカルボキシメチル化多糖は0.1M NaCl中では1 M 水酸化ナトリウム水溶液中より各々2倍以上の分子量の違いが生じた。AM-APP (Mw=42,000) の場合は、いずれの場合もほぼ一定の値が得られた。このことは、詳細については不明であるが、AG-AL由来の誘導体は何らかの立体構造(高次構造)を形成しているものと推察される。

アニリンブルーによる蛍光強度測定実験の結果から、AG-AL-CMSとAG-AL-CMIは分子の一部が高次構造を有していることが示唆された。AM-APP-CMは元の多糖AM-APPとほとんど変化しないこと、及び蛍光強度が低いことから高次構造は有していないものと思われる。

TRF誘導試験の結果より、AG-AL-CMS, AG-AL-CMI, AM-APP-CMは、対照群と比較して腫瘍細胞が約40-60%に減少し、CMPS投与群と比較してその効果は2-3倍程度であった。一方、好中球は対照群と比較して約2.5-4倍に増加し、CMPS投与群における割合よりも好中球の増加が認められた。このことは、CMPSのTRF誘導活性ほど高くないが、AG-AL-CMS, AG-AL-CMI, AM-APP-CMはTRF誘導活性を有していることが示された。

カーボンクリアランス試験の結果から、カルボキシメチル化誘導体の場合は、Zymosanほどではないが、網内系機能の亢進が認められた。

カルボキシメチル化多糖を腹腔内投与することで、PECは増大し、M $\phi$ のPECに対する割合の増加作用が示された。

カーボンクリアランス試験、グルコース消費能、ライソゾーム酵素活性、NO産生能、O<sub>2</sub>産生能、L929に対する細胞傷害性試験において、カルボキシメチル化 $\alpha$ -(1→3)グルカンの活性は、カルボキシメチル化 $\beta$ -(1→3)グルカンよりも高かった。一方、TRF誘導能は低かった。このことから、カルボキシメチル化 $\alpha$ -(1→3)グルカンは、カルボキシメチル化 $\beta$ -(1→3)グルカンよりもM $\phi$ をより活性化していると思われる。この3種のカルボキシメチル化 $\alpha$ -(1→3)グルカン(AG-AL-CMS, AG-AL-CMI, 及びAM-APP-CM)の抗腫瘍作用発現は、多糖投与によりM $\phi$ が活性化され癌に対する宿主仲介性の防御システムや自己防御システムの活性化によるものであると考えられる。一方、AG-AL由来のカルボキシメチル化誘導体とAM-APP由来のカルボキシメチル化誘導体の相違も観察された。即ち、TRF誘導活性やグルコース消費能、O<sub>2</sub>産生能、L929に対する細胞傷害性試験におけるM $\phi$ 活性は、AG-AL由来の誘導体の方が高く、ライソゾーム酵素活性及びNO産生能については、AM-APP由来の誘導体の方が高い結果が得られた。

以上、ヤナギマツタケ及びベニテングタケから直鎖状(1→3)- $\alpha$ -D-グルカンをそれぞれ単離し、(1→3)- $\alpha$ -D-グルカン中の遊離の水酸基へのカルボキシメチル基の導入により得られた部分カルボキシメチル化多糖に抗腫瘍作用の発現が認められ、さらに、そのカルボキシメチル基の位置は $\alpha$ -(1→3)体と $\beta$ -(1→3)体との間では導入位置に相違があること等を紹介すると共に、カルボキシメチル化(1→3)- $\alpha$ -D-グルカン類の抗腫瘍作用は宿主仲介性の免疫調節機能増強によるものであることを概説した。

これまでに見出された著しい抗腫瘍作用を示す多糖類は殆んど $\beta$ -(1→6)分岐(1→3)- $\beta$ -D-グルカンや(1→3)- $\beta$ -D-グルカン類であったが、(1→3)- $\alpha$ -D-グルカン類のカルボキシメチル化によって免疫調節効果に基因する顕著な抗腫瘍活性が認められたことは、今後、さらに優れた抗腫瘍性多糖類出現の可能性を示唆するものであり、この分野における研究の一層の進展が望まれる。また、既に我々が報告したシロキクラゲのglucuronoxylomannan<sup>27)</sup>、CMPS<sup>8a)</sup>、カルボキシメチル化シゾフィラン<sup>8b)</sup>とマイトマイシンC結合体の抗腫瘍活性に関する研究との関連において、これらカルボキシメチル化(1→3)- $\alpha$ -D-グルカン類は薬物送達システムにおける高分子担体としての有用性が期待される。

## 引用文献

- 1) G. Chihara, Y.Y. Maeda, J. Hamuro, T. Sasaki, F. Fukuoka, *Nature*, **222**, 687-688 (1969).
- 2) 秋山由紀雄, 羽室淳爾, 蛋白質核酸酵素, **26**, 208-224 (1981); Y.Y. Maeda, G. Chihara, *Int. J. Cancer*, **11**, 153-161 (1973); I. Suzuki, T. Itani, N. Ohno, S. Oikawa, K. Sato, T. Miyazaki, T. Yadomae, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **8**, 217-226 (1985).
- 3) 古江 尚, 伊藤一二, 木村 正, 近藤達平, 服部孝雄, 小川暢也, 田口鐵男, 癌と化学療法, **8**, 944-966 (1981); 田口鐵男, 古江 尚, 木村 正, 近藤達平, 服部孝雄, (故)伊藤一二, 小川暢也, *ibid.*, **12**, 366-378 (1985).
- 4) K. Okamura, M. Suzuki, T. Chihara, A. Fujikawa, T. Fukuda, S. Goto, K. Ichinohe, S. Jimi, T. Kasamatsu, N. Kawai, K. Mizoguchi, S. Mori, H. Nakano, K. Noda, K. Sekiba, K. Suzuki, T. Suzuki, K. Takahashi, K. Takeuchi, S. Takeuchi, A. Yajima, N. Ogawa, *Cancer*, **58**, 865-872 (1986); K. Okamura, M. Suzuki, T. Chihara, A. Fujikawa, T. Fukuda, S. Goto, K. Ichinohe, S. Jimi, T. Kasamatsu, N. Kawai, K. Mizoguchi, T. Mori, H. Nakano, K. Noda, K. Sekiba, K. Suzuki, T. Suzuki, K. Takahashi, K. Takeuchi, S. Takeuchi, A. Yajima, N. Ogawa, *Biotherapy*, **1**, 103-107 (1989).
- 5a) T. Sasaki, N. Abiko, K. Nitta, N. Takasuka, Y. Sugino, *Eur. J. Cancer*, **15**, 211-215 (1979); J. Hamuro, Y. Yamashita, Y. Ohsaka, Y.Y. Maeda, G. Chihara, *Nature*, **233**, 486-487 (1971); N. Ohno, K. Kurachi, T. Yadomae, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1016-1025 (1988); T. Kiho, M. Ito, I. Yoshida, K. Nagai, T. Hara, S. Ukai, *ibid.*, **37**, 2770-2772 (1989).
- b) J. Hamuro, M. Rollinghoff, H. Wagner, *Cancer Res.*, **38**, 3080-3085 (1978).
- c) T. Kojima, K. Tabata, A. Hirata, I. Sugawara, *Agr. Biol. Chem.*, **50**, 1635-1636 (1986); A.F. Cirelli, J.A. Covian, N. Ohno, Y. Adachi, T. Yadomae, *Carbohydr. Res.*, **190**, 329-337 (1989).
- 6) G. Chihara, J. Hamuro, Y.Y. Maeda, Y. Arai, F. Fukuoka, *Nature*, **225**, 943-944 (1970); K. Ito, N. Ohno, I. Suzuki, K. Sato, S. Oikawa, T. Yadomae, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 4950-4956 (1985); Y. Adachi, N. Ohno, M. Ohsawa, K. Sato, S. Oikawa, T. Yadomae, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1838-1843 (1989).
- 7) K. Matsuzaki, I. Yamamoto, T. Sato, R. Oshima, *Macromol. Chem.*, **187**, 317-324 (1986).
- 8a) K. Nagai, J. Tanaka, T. Kiho, S. Ukai, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 986-989 (1992).
- b) S. Usui, K. Murashima, M. Sakai, T. Kiho, S. Ukai, *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 1165-1170 (1994).
- 9) T. Kunimoto, H. Baba, K. Nitta, *J. Biol. Resp. Mod.*, **5**, 160-167 (1986); H. Baba, T. Kunimoto, *Int. J. Immunopharmac.*, **8**, 569-572 (1986); T. Kunimoto, H. Baba, K. Nitta, *J. Biol. Resp. Mod.*, **5**, 225-235 (1986); 國元武彦, 馬場弘靖, 新田和男, *Biotherapy*, **2**, 292-298 (1988); 國元武彦, 馬場弘靖, 新田和男, *Human Cell*, **3**, 124-130 (1990); 國元武彦, 馬場弘靖, 新田和男: 腫瘍退縮因子. 新しいサイトカイン (今西二郎編). 金芳堂, 京都, pp.65-82 (1990).
- 10) R.W. Eyler, E.D. Klug, F. Diephuis, *Anal. Chem.*, **19**, 24-27 (1947); I. Sakurada, *J. Soc. Chem. Jpn.*, **31**, 19 (1938); A.Z. Conner, R.W. Eyler, *Anal. Chem.*, **22**, 1129-1132 (1950); C.V. Francis, *ibid.*, **25**, 941-943 (1953); S. Mukhopadhyay, B.Ch. Mitra, S.R. Palit, *ibid.*, **45**, 1775-1776 (1973); H.C. Black Jr., *ibid.*, **23**, 1792-1795 (1951).



- 11) S.A. Barker, T.R. Carrington, *J. Chem. Soc.*, 3588-3593 (1953); A.W. Dox, R.E. Niedig, *J. Biol. Chem.*, **235**, 19 (1914); F. Fukuoka, M. Nakanishi, S. Shibata, Y. Nishikawa, T. Takeda, M. Tanaka, *Gann*, **59**, 421-432 (1968); R.B. Duff, *J. Chem. Soc.*, **3**, 2592-2594 (1952); K. Imai, T. Kikuta, M. Kobayashi, K. Matsuda, *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 1339-1346 (1977); B.J. Ralph, V.J. Bender, *Chem. Ind.*, pp.1181 (1965); J.G.H. Wessels, D.R. Kreger, R. Marchant, B.A. Regensburg, O.M.H. De Vries, *Biochim. Biophys. Acta*, **273**, 346-358 (1972).
- 12a) T. Kiho, I. Yoshida, K. Nagai, S. Ukai, C. Hara, *Carbohydr. Res.*, **189**, 273-279 (1989).
- b) T. Kiho, I. Yoshida, M. Katsuragawa, M. Sakushima, S. Ukai, *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 1460-1462 (1994).
- 13) I. Yoshida, T. Kiho, S. Usui, M. Sakushima, S. Ukai, *ibid.*, **19**, 114-121 (1996).
- 14a) S. Ukai, I. Yoshida, A. Honda, K. Nagai, T. Kiho, *Carbohydr. Res.*, **224**, 201-208 (1992).
- b) S. Ukai, A. Honda, K. Nagai, T. Kiho, *J. Chromatogr.*, **513**, 338-343 (1990).
- 15) 宮崎利夫編, “多糖の構造と生理活性”, 朝倉書店, (1990); 水野 卓, 川合正允編, “キノコの化学生化学”, 学会出版センター, (1992).
- 16) T. Kiho, S. Sobue, S. Ukai, *Carbohydr. Res.*, **251**, 81-87 (1994).
- 17) T. Kiho, M. Katsuragawa, K. Nagai, S. Ukai, *Carbohydr. Res.*, **224**, 237-243 (1992).
- 18) T.L. Bluhm, A. Sarco, *Can. J. Chem.*, **55**, 293-299 (1977).
- 19) D.A. Rees, W.E. Scott, *J. Chem. Soc.(B)*, 469-479 (1971).
- 20) S. Ukai, T. Kiho, C. Hara, I. Kuruma, Y. Tanaka, *J. Pharmaco-Dyn.*, **6**, 983-990 (1983); S. Ukai, C. Hara, T. Kiho, K. Hirose, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 2647-2653 (1980).
- 21) T. Sasaki, N. Takasuka, G. Chihara, Y.Y. Maeda, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **67**, 191-195 (1976); H. Saito, T. Ohki, N. Takasuka, T. Sasaki, *Carbohydr. Res.*, **58**, 293-305 (1977).
- 22) M.A. Chirigos, A. Bartocci, E. Read, “Progress in Cancer Research and Therapy. Vol 19 : Mediation of Cellular Immunity in Cancer by Immune Modifiers.” eds. M.A. Chirigos, M. Mitchell, M.J. Mastrangelo, Ravan Press, 1981, pp.77-81.
- 23) 千原呉郎, 薬誌, **108**, 171-186 (1988).
- 24) F. Rossi, D. Remeo, P. Patriarca, *J. Reticuloendothel. Soc.*, **12**, 127-149 (1972); F. Rossi, P. Bellavite, G. Berton, P. Dri, G. Zabucchi, “Biochemistry and Function of Phagocytes” eds. F. Rossi and P. Patriarca, Plenum Press, New York, 1982, pp.283-322.
- 25) J. Stadler, R.D. Curran, J.B. Ochoa, B.G. Harbrecht, R.A. Hoffman, R.L. Simmons, T.R. Biller, *Arch. Surg.*, **126**, 186-191 (1991); J. Preilschifter, *Eur. J. Pharmacol.*, **195**, 179 (1991); C. Nathan, *FASEB J.*, **6**, 3051-3064 (1992).
- 26) N.S. Kwon, D.J. Stuehr, C.F. Nathan, *J. Exp. Med.*, **174**, 761-767 (1991).
- 27) 鶴飼茂夫, 桐木英之, 永井勝幸, 木方 正, 薬誌, **112**, 663-668 (1992).