

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2014年4月10日(10.04.2014)



(10) 国際公開番号  
WO 2014/054421 A1

- (51) 国際特許分類:  
A61K 31/716 (2006.01) A61P 33/06 (2006.01)  
A23K 1/16 (2006.01) A61P 37/04 (2006.01)  
A23L 1/30 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)  
A61K 36/899 (2006.01) C08B 30/04 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/075152
- (22) 国際出願日: 2013年9月18日(18.09.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2012-220341 2012年10月2日(02.10.2012) JP
- (71) 出願人: 三井製糖株式会社(MITSUI SUGAR CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1038423 東京都中央区日本橋箱崎町3番2号 Tokyo (JP). 学校法人北里研究所 (THE KITASATO INSTITUTE) [JP/JP]; 〒1088641 東京都港区白金5丁目9番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 山田 陽城(YAMADA Haruki); 〒1088641 東京都港区白金5丁目9番1号 学校法人北里研究所内 Tokyo (JP). 清原 寛章(KIYOHARA Hiroaki); 〒1088641 東京都港区白金5丁目9番1

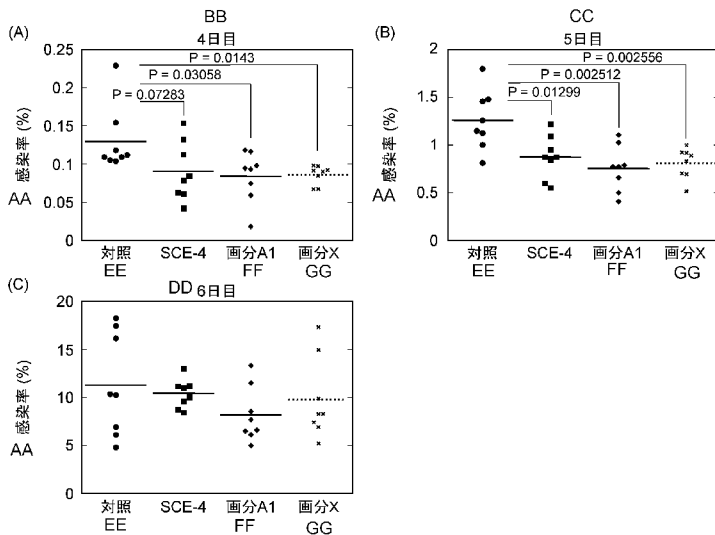
号 学校法人北里研究所内 Tokyo (JP). 乙黒 一彦(OTOGURO Kazuhiko); 〒1088641 東京都港区白金5丁目9番1号 学校法人北里研究所内 Tokyo (JP). 石山 亜紀(ISHIYAMA Aki); 〒1088641 東京都港区白金5丁目9番1号 学校法人北里研究所内 Tokyo (JP). 岩月 正人(IWATSUKI Masato); 〒1088641 東京都港区白金5丁目9番1号 学校法人北里研究所内 Tokyo (JP). 大村 智(OMURA Satoshi); 〒1088641 東京都港区白金5丁目9番1号 学校法人北里研究所内 Tokyo (JP). 水 雅美(MIZU Masami); 〒1030015 東京都中央区日本橋箱崎町3番1号 三井製糖株式会社内 Tokyo (JP). 河合 俊和(KAWAI Toshikazu); 〒1038423 東京都中央区日本橋箱崎町3番2号 三井製糖株式会社内 Tokyo (JP). 樫村 淳(KASHIMURA Jun); 〒6530023 兵庫県神戸市長田区東尻池新町1番2号 三井製糖株式会社内 Hyogo (JP). 古家 健二(KOGE Kenji); 〒1038423 東京都中央区日本橋箱崎町3番2号 三井製糖株式会社内 Tokyo (JP).

- (74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外(HASEGAWA Yoshiki et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目1番1号丸の内 MY PLAZA (明治安田生命

[続葉有]

(54) Title: PEYER'S PATCH ACTIVATOR

(54) 発明の名称: パイエル板活性化剤



AA Rate of infection  
BB 4th day  
CC 5th day  
DD 6th day  
EE Control  
FF Fraction A1  
GG Fraction X

(57) Abstract: The present invention provides a Peyer's patch activator containing polysaccharides obtained from sugar cane as active components. The polysaccharides mainly comprise  $\alpha$ -glucans, and have a peak molecular weight in the range of 720,000-1,080,000. The ratio of glucose, relative to the total constituent saccharides, is equal to or greater than 80%. The ratio of non-reducing terminal glucose is 20-30%, and the ratio of  $\alpha$ -1,6-bonded glucose is 15-25%.

(57) 要約: 本発明は、甘蔗から得られる多糖を有効成分として含有し、該多糖が、 $\alpha$ -グルカンを主成分とし、ピーク分子量が720,000~1,080,000の範囲内にあり、全構成糖に占めるグルコースの割合が80%以上であり、かつ非還元末端グルコースの割合が20~30%、及び $\alpha$ -1-6結合グルコースの割合が15~25%である、パイエル板活性化剤を提供する。

WO 2014/054421 A1



ビル) 9階 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).

- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

## 明 細 書

発明の名称：パイエル板活性剤

### 技術分野

[0001] 本発明は、パイエル板活性剤に関する。

### 背景技術

[0002] パイエル板は上部腸管に存在する高度に機能化されたリンパ濾胞組織であり、抗原特異的な分泌型 I g A 産生及び免疫寛容発現のための重要な出発点である誘導組織の 1 つとなっている。パイエル板は、腸管免疫と呼ばれる生体防御に関わる免疫機構において重要な働きを担っていることが知られている。例えば、パイエル板のリンパ球は常時ホーミング現象により他の局所粘膜免疫系及び全身免疫系付属組織にリクルートされ、免疫情報を伝搬させる機能を有する。

[0003] パイエル板免疫機能調節活性の一つとして、骨髄細胞増殖促進因子（例えば、サイトカイン）のパイエル板での産生が挙げられる。このような骨髄細胞増殖促進因子として、例えば、パイエル板で産生されるサイトカインである I L - 6 が知られている（非特許文献 1）。

[0004] 一方、これまでに、キク科ホソバオケラ（*Atractylodes lancea* DC.）の根茎から得られた多糖、及びマメ科ナイモウオウギ（*Astragalus mongholicus* Bunge.）の地上部から得られた多糖にパイエル板免疫機能調節活性があることが報告されている（非特許文献 2）。

[0005] また、イネ科植物である甘蔗由来のエキスを有効成分とする感染予防治療剤、ワクチンアジュバント剤及びコクシジウムによって引き起こされるヒト又は動物の病気に対する予防治療剤が知られている（例えば、特許文献 1 及び 2）。

### 先行技術文献

### 特許文献

[0006] 特許文献1：特開2000-297046号公報

特許文献2：特開2003-63975号公報

### 非特許文献

[0007] 非特許文献1：T. Hong, T. Matsumoto, H. Kiyohara and H. Yamada: Enhanced production of hematopoietic growth factors through T cell activation in Peyer's patches by oral administration of Kampo (Japanese herbal) medicines, 'Juzen-taiho-to', Phytomedicine, 5巻, 353~360頁 (1998年)

非特許文献2：Hiroaki Kiyohara, Toshiaki Matsuzaki, Tsukasa Matsumoto, Takayuki Nagai, Haruki Yamada: Yakugaku Zasshi, 128巻, 5号, 709~719頁 (2008年)

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

[0008] パイエル板免疫機能調節を人為的に可能とすれば、腸管免疫を通じて生体防御に関わる免疫機構の調節が可能となり有益である。非特許文献2に開示されているように、パイエル板免疫機能調節活性を有する物質がこれまでにいくつか知られている。しかしながら、需要者の多様なニーズに応えるためには未だ十分なレパートリーがあるとは言えない。

[0009] また、イネ科植物に由来する機能性成分はこれまでにいくつか知られているものの、パイエル板免疫機能調節活性を有する成分、例えば、骨髄細胞増殖促進活性を有するサイトカインのパイエル板での産生の亢進作用（以下、本作用を「パイエル板活性作用」ともいう。）を有する成分、はこれまで知られていない。

[0010] 本発明は、上記事情に鑑み、骨髄細胞増殖促進活性を有するサイトカイン

のパイエル板での産生の亢進作用を有する新規なパイエル板活性剤を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

- [0011] 本発明者らは、サトウキビ（甘蔗）脱蔗糖エキスから精製された後述する $\alpha$ -グルカン画分及びヘテログリカン画分が、骨髓細胞増殖促進活性を有するサイトカインのパイエル板での産生の亢進作用を有することを見出し、本発明を完成させた。
- [0012] すなわち、本発明は、甘蔗から得られる多糖を有効成分として含有するパイエル板活性剤を提供する。
- [0013] 本発明のパイエル板活性剤は、パイエル板での骨髓細胞増殖促進活性を有するサイトカイン（例えば、IL-6）産生の亢進作用を少なくとも有する。したがって、少なくともパイエル板での上記サイトカイン産生の調節により、パイエル板免疫機能調節活性を発揮することができる。また、甘蔗は古来より食品として使用されているものの一つであるため、より安全性の高いパイエル板活性剤の提供が可能となる。
- [0014] 上記多糖は、 $\alpha$ -グルカンを主成分とし、ピーク分子量が720,000～1,080,000の範囲内にあり、全構成糖に占めるグルコースの割合が80%以上であり、かつ非還元末端グルコースの割合が20～30%、及び $\alpha$ 1-6結合グルコースの割合が15～25%であるもの（以下、「 $\alpha$ -グルカン画分」ともいう。）であってもよい。これにより、より優れたパイエル板活性作用を奏することができる。なお、本明細書において、「 $\alpha$ 1-6結合グルコース」は、1位と6位の水酸基で他の構成単位と結合している $\alpha$ -グルコース単位を意味し、「 $\alpha$ -6結合グルコース」ともいう。
- [0015] 本明細書において「分子量分布曲線」とは、被験試料（ $\alpha$ -グルカン画分及びヘテログリカン画分）の分子量を、高速ゲルろ過クロマトグラフィー（HPSEC）で分析したときに得られる分布曲線を意味する。分子量は、例えば、標準多糖（pullulan P-800, 400, 200, 100, 50, 20, 10及び5, 昭和電工）のHPSECでの保持時間より分子

量対保持時間係数 (Kav) の検量線を作成し、被験試料の保持時間から算出する。また、HPSECの条件は、例えば、以下のように設定することができる。

カラム; Asahi-pak GS710及びAsahi-pak GS620 (各0.76 i. d. × 60 cm) (昭和電工) の連結カラム

送液装置; JASCO PV-980 (日本分光)

検出器; Shodex RI SE-62 (昭和電工) (感度: ×2)

溶出液; 0.2M NaCl (1.0 mL/min)

[0016] 本明細書において「ピーク分子量」とは、上述の「分子量分布曲線」におけるピークのピークトップに対応する分子量を意味する。

[0017] また、上記 $\alpha$ -グルカン画分は、甘蔗抽出物又は甘蔗由来の糖蜜から選ばれる原料を、エタノール沈殿し、得られた沈殿から透析又は膜処理により低分子量の物質を除去して得られる画分（「エタノール沈殿画分」ともいう。）から得られるものであることが好ましい。

[0018] エタノール沈殿画分は、甘蔗抽出物又は甘蔗由来の糖蜜をそのまま用いて得られるものであってもよい。また、甘蔗抽出物又は甘蔗由来の糖蜜を、担体として陽イオン交換樹脂を充填したカラムに通液し、水を溶離液としたときの上記陽イオン交換樹脂と各成分との親和力の差により分画し、得た多数の画分のうち蔗糖、ブドウ糖及び果糖が除かれた、波長420 nmの光を吸収する画分（「甘蔗由来のエキス」ともいう。）を用いて得られるものが好ましい。甘蔗由来のエキスを用いることにより、エタノール沈殿画分をより効率的に得ることができる。

[0019] 上記 $\alpha$ -グルカン画分は、上記エタノール沈殿画分を、担体として陰イオン交換樹脂を充填したカラムに通液し、上記陰イオン交換樹脂に吸着された成分を低イオン強度の溶出溶媒で溶出して得られる溶出画分を、更にゲルろ過して得られる画分であることが好ましい。

[0020] 上記 $\alpha$ -グルカン画分は、上記エタノール沈殿画分を、担体として水で平衡化した陰イオン交換樹脂を充填したカラムに通液し、上記陰イオン交換樹

脂に吸着された成分を100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ で溶出して得られる溶出画分を、更に分画分子量 $2 \times 10^3 \sim 4 \times 10^5 \text{Da}$ のゲルろ過カラムに通液し、最初に流出する空隙容積に相当する量の画分であることが好ましい。

[0021] 上記多糖は、ヘテログリカンを主成分とし、ピーク分子量が38,400～57,600の範囲内、及び664,000～996,000の範囲内にあり、全構成糖に占めるグルコースの割合が30%～50%、及びアラビノースの割合が20～30%であり、かつ非還元末端アラビノースの割合が20～30%であるもの（以下、「ヘテログリカン画分」ともいう。）であってもよい。これにより、より優れたパイエル板活性作用を奏することができる。

[0022] 上記ヘテログリカン画分は、上記エタノール沈殿画分から得られるものであることが好ましい。この場合、上記エタノール沈殿画分は、上記甘蔗由来のエキスを用いて得られるものが好ましい。

[0023] 上記ヘテログリカン画分は、上記エタノール沈殿画分を、担体として陰イオン交換樹脂を充填したカラムに通液し、上記陰イオン交換樹脂に吸着された成分を高イオン強度の溶出溶媒で溶出して得られる画分であることが好ましい。

[0024] 上記ヘテログリカン画分は、

上記エタノール沈殿画分を、担体として水で平衡化した陰イオン交換樹脂を充填したカラムに通液し、上記陰イオン交換樹脂に吸着された成分を、100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ で溶出した後に、300mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ で溶出して得られる溶出画分を、更に分画分子量 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6 \text{Da}$ のゲルろ過カラムに通液し、最初に流出する空隙容積に相当する量の画分以外の画分と、

上記エタノール沈殿画分を、担体として水で平衡化した陰イオン交換樹脂を充填したカラムに通液し、上記陰イオン交換樹脂に吸着された成分を、300mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ で溶出した後に、1.8M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ で溶出して得られる溶出画分を、更に分画分子量 $2 \times 10^3 \sim 4 \times 10^5 \text{Da}$ のゲルろ

過カラムに通液し、最初に流出する空隙容積に相当する量の画分と、からなることが好ましい。

[0025] 上記多糖は、甘蔗抽出物又は甘蔗由来の糖蜜から選ばれる原料を、エタノール沈殿し、得られた沈殿から透析又は膜処理により低分子量の物質を除去して得られるもの（「エタノール沈殿画分」に相当する）であってもよい。

[0026] 本発明のパイエル板活性剤は、パイエル板活性作用を有することから、腸管免疫亢進剤として使用することもできる。また、腸管免疫亢進作用を通じて、例えば、マラリア原虫感染予防治療剤として使用することもできる。

[0027] 本発明のパイエル板活性剤は、食品、食品添加物、飼料、医薬品、医薬品添加物等に含ませて使用することもできる。

[0028] 本発明はまた、本発明のパイエル板活性剤を含む、マラリア原虫感染予防又は治療用医薬を提供する。

[0029] 上記マラリア原虫感染予防又は治療用医薬は、キニーネ、メフロキン、スルファドキシム、ピリメタミン、クロロキン、プリマキン、アルテスネート、アルテメーター及びルメファントリンからなる群より選択される1種又は2種以上の抗マラリア薬と併用されるように用いられてもよい。上記抗マラリア薬は、アルテスネートであることが好ましい。

[0030] 本発明は、上述した多糖のパイエル板を活性化するための使用（又は応用）ということもできる。本発明はまた、上述した多糖を対象に投与するステップを含む、パイエル板の活性化方法ということもできる。

### 発明の効果

[0031] 本発明によれば、新規なパイエル板活性剤が提供される。本発明によれば、甘蔗から得られる多糖を有効成分として含有する剤を動物に投与（例えば、経口投与）することにより、例えば、パイエル板でのサイトカイン（例えば、骨髄細胞増殖促進因子としてのIL-6）産生の亢進作用を奏することができる。これにより、例えば、腸管免疫亢進を通じて、生体防御に関わる免疫機構を亢進させることが可能である。

[0032] また、本発明のパイエル板活性剤は、古来よりヒトが食してきた甘蔗に由



来するものであるため、ヒト又はヒトが食用とする家畜若しくは家禽などの産業動物の健康を害することもなく、安全である。

### 図面の簡単な説明

- [0033] [図1]試験例1におけるパイエル板活性作用試験の結果を示すグラフである。
- [図2]製造例1における多糖画分の分離工程を示すスキームである。
- [図3]実施例1におけるパイエル板活性作用試験の結果を示すグラフである。
- [図4]実施例2におけるIL-6産生誘導試験の結果を示すグラフである。
- [図5]実施例3におけるネズミマラリア原虫（クロロキン感受性株）感染モデルでの多糖画分の経口投与試験の結果を示すグラフである。
- [図6]製造例1で行ったカラムクロマトグラフィーにおける溶出パターンを示すグラフである。
- [図7]試験例2における $\alpha$ -グルカン画分の分子量分布を示すHPSECチャートである。
- [図8]試験例2におけるヘテログリカン画分の分子量分布を示すHPSECチャートである。
- [図9]実施例4におけるネズミマラリア原虫（クロロキン耐性株）感染モデルでの多糖画分の経口投与試験の結果を示すグラフである。
- [図10]実施例5におけるネズミマラリア原虫（クロロキン耐性株）感染モデルでの多糖画分と抗マラリア薬の併用経口投与試験の結果を示すグラフである。

### 発明を実施するための形態

- [0034] 以下、本発明の実施形態についてより詳細に説明する。
- [0035] 本発明のパイエル板活性剤は、甘蔗から得られる多糖を有効成分として含有する。
- [0036] [多糖]

甘蔗から得られる多糖としては、

- (i)  $\alpha$ -グルカンを主成分とし、ピーク分子量が720,000~1,080,000の範囲内にあり、全構成糖に占めるグルコースの割合が80%

以上であり、かつ非還元末端グルコースの割合が20～30%、及び $\alpha$ 1-6結合グルコースの割合が15～25%であるもの（ $\alpha$ -グルカン画分）、  
（i i）ヘテログリカンを主成分とし、ピーク分子量が38,400～57,600の範囲内、及び664,000～996,000の範囲内にあり、全構成糖に占めるグルコースの割合が30%～50%、及びアラビノースの割合が20～30%であり、かつ非還元末端アラビノースの割合が20～30%であるもの（ヘテログリカン画分）、又は

（i i i）甘蔗抽出物又は甘蔗由来の糖蜜から選ばれる原料を、エタノール沈殿し、得られた沈殿から透析又は膜処理により低分子量の物質を除去して得られるもの（エタノール沈殿画分）、とすることができる。

[0037]  $\alpha$ -グルカン画分は更に、Glc換算での糖含有量が80質量%～90質量%であることが好ましい。また、GalA換算でのウロン酸含有量が5質量%以下であることが好ましい。ウシ免疫グロブリン換算でのタンパク質含有量が10質量%以下であることが好ましい。さらに、 $\alpha$ -グルカン画分の全構成糖に占めるグルコースの割合は75%～90%であることが好ましい。

[0038]  $\alpha$ -グルカン画分は、ピーク分子量が720,000～1,080,000の範囲内であればよいが、810,000～990,000の範囲内にあることが好ましく、855,000～945,000の範囲内にあることがより好ましい。 $\alpha$ -グルカン画分は、分子量分布曲線における分子量の分布範囲が、16,000～（Vo容積に相当する分子量）であることが好ましく、16,000～1,660,000であることがより好ましい。

[0039] ヘテログリカン画分は更に、Glc換算での糖含有量が45質量%～55質量%であることが好ましい。また、GalA換算でのウロン酸含有量が5質量%～10質量%であることが好ましい。ウシ免疫グロブリン換算でのタンパク質含有量が7.5質量%以下であることが好ましい。さらに、ヘテログリカン画分の全構成糖に占めるグルコースの割合は30%～40%であることが好ましく、アラビノースの割合が22.5%～27.5%であること

が好ましい。

[0040] ヘテログリカン画分は、ピーク分子量が38,400~57,600の範囲内、及び664,000~996,000の範囲内の2ヶ所に存在する。分子量の小さい方のピーク分子量は、43,200~52,800の範囲内にあることが好ましく、45,600~50,400の範囲内にあることがより好ましい。分子量の大きい方のピーク分子量は747,000~913,000の範囲内にあることが好ましく、788,500~871,500の範囲内にあることがより好ましい。ヘテログリカン画分は分子量分布曲線において、少なくとも2つのピークを有する。ヘテログリカン画分の分子量分布曲線における分子量の分布範囲は、10,000~(V<sub>0</sub>容積に相当する分子量)であることが好ましく、10,000~1,660,000であることがより好ましい。

[0041] [多糖の製造方法]

<エタノール沈殿画分>

エタノール沈殿画分は、甘蔗抽出物又は甘蔗由来の糖蜜から選ばれる原料を、エタノール沈殿し、得られた沈殿から透析又は膜処理により低分子量の物質を除去することにより得ることができる。エタノール沈殿に用いる原料として、甘蔗抽出物又は甘蔗由来の糖蜜をそのまま用いてもよく、エタノール沈殿画分を効率的に得るために、甘蔗由来のエキスをを用いることが好ましい。甘蔗由来のエキスは、甘蔗抽出物又は甘蔗由来の糖蜜より選ばれる原料を、担体として陽イオン交換樹脂を充填したカラムに通液し、溶離液として水を用い、陽イオン交換樹脂と原料に含まれる各成分との親和力の差により(溶出速度の差により)分離された多数の画分のうち蔗糖、ブドウ糖及び果糖等の低分子の糖類を除いた、波長420nmの光を吸収する画分である。透析には、一般に脱塩に用いられる透析膜を用いることができる。また、膜処理には、脱塩及び単糖類除去などに用いられるUF膜を用いることができる。

[0042] エタノール沈殿画分の収率は、例えばエキスをを用いた場合、エキスに含ま

れる固形分を基準として通常約5質量%程度である。エタノール沈殿画分には、多糖に加え、ポリフェノール、塩類などの成分が含まれる。

[0043] <エキス>

以下、甘蔗由来のエキスの製造方法について説明する。

[0044] 甘蔗汁、甘蔗の溶媒抽出液等の抽出物、又は甘蔗由来の糖蜜（以下、単に原料ということがある。）を、固定担体を充填したカラムに通液する。上記原料は、そのまま、又は水で任意の濃度に調整して、用いることができる。なお異物除去のために、カラムで処理する前に、原料をろ過することが望ましい。ろ過の手法は特に限定されず、食品工業で広く使用されているスクリーンろ過、ケイソウ土ろ過、精密ろ過、限外ろ過等の手段を好ましく使用できる。

[0045] 固定担体としてイオン交換樹脂を用いる方法の好ましい態様は、以下の通りである。

[0046] イオン交換樹脂は、イオン交換の性質の観点から、陽イオン交換樹脂と陰イオン交換樹脂とに分類されるが、本発明では好ましくは陽イオン交換樹脂が使用できる。さらに好ましくは強酸性型、ナトリウムイオン型又はカリウムイオン型の陽イオン交換樹脂が使用できる。またイオン交換樹脂は、樹脂の形態の観点からは、ゲル型樹脂と、ポーラス型、マイクロポーラス型、ハイポーラス型などの多孔性樹脂とに分類されるが、本発明では好ましくはゲル型のイオン交換樹脂が使用できる。さらに好ましくは、強酸性型、ナトリウムイオン型又はカリウムイオン型であるゲル型の陽イオン交換樹脂が使用できる。そのようなイオン交換樹脂は市販されており、例えばダイヤイオン（商標）系としてSK1B、SK104、SK110、SK112、SK116（いずれも商品名、三菱化学株式会社）、UBK530、UBK550（クロマト分離用、いずれも商品名、三菱化学株式会社）、アンバーライト（商標）系として、アンバーライトIR120B、IR120BN、IR124、XT1006、IR118、アンバーリスト31、クロマトグラフ用アンバーライトCG120、CG6000（いずれも商品名、オルガノ株式

会社)、ダウエックス(商標)系として、HCR-S、HCR-W2、HGR-W2、モノスフィア-650C、マラソンC600、50W×2、50W×4、50W×8(いずれも商品名、ダウ・ケミカル日本株式会社)、ムロマック50WX(商品名、室町化学工業株式会社)、ピュロライト(商標)系として、C-100E、C-100、C-100×10、C-120E、PCR433、PCR563K、PCR822、PCR833、PCR866、PCR883、PCR892、PCR945(いずれも商品名、エイエムピー・アイオネクス株式会社)等が挙げられる。中でも、UBKシリーズが特に好ましい。

[0047] 固定担体の量は、カラムの大きさ、固定担体の種類などによって変化する。原料の固形分に対して、好ましくは2~10,000倍、より好ましくは5~500倍湿潤体積量である。

[0048] 原料を上記カラムに通し、次に溶離液として水を用いてクロマトグラフィー処理し、得た多数の画分のうち波長420nmの光を吸収する画分を分取して目的とするエキスを得ることができる。この方法をイオンクロマト分離とすることがある。イオンクロマト分離では、原料に含まれる各成分とイオン交換樹脂との親和力の差によるカラムの通過速度の違いにより、各成分を分離する。

[0049] 通液条件は、原料の組成及び固定担体の種類などによって変化する。溶離液として脱気処理した水を用い、単塔式回分分離法の場合、流速は $SV=0.3\sim 1.0\text{ hr}^{-1}$ 、サンプルの供与量は樹脂の1~20%、温度は40~70℃が好ましい。この分離法により得た画分の夫々について、波長420nmでの吸収、電気伝導度(塩分の量の尺度)、蔗糖、ブドウ糖及び果糖の濃度を分析し、時系列的にグラフに表すと、波長420nmでの光吸収のピーク、電気伝導度のピーク、蔗糖及び還元糖のピークの順にピークが現れる。

[0050] <α-グルカン画分>

次にα-グルカン画分の製造方法について説明する。

- [0051]  $\alpha$ -グルカン画分の精製（製造）には、上記エタノール沈殿画分を用いることが好ましい。以下、エタノール沈殿画分を用いる場合を例にとり、 $\alpha$ -グルカン画分の精製方法を説明する。
- [0052] まず、エタノール沈殿画分を、担体として陰イオン交換樹脂を充填したカラムに通液し、成分を吸着させる。陰イオン交換樹脂としては強イオン交換樹脂が好ましい。例えば、Q（四級アンモニウム）基、又はQAE基を有する樹脂を用いることができる。このような担体を備えるカラムの具体例としては、Q-Sepharose Fast Flow（FF）、QAE-Sepharose FF等を挙げることができる。これらの樹脂担体は、水で平衡化しておくことが好ましい。例えば、QAE-Sepharose FFの場合、2Mの炭酸水素アンモニウムに浸漬することによりQAE基を活性化させ（Sepharoseに共有結合させた4級アンモニウム基にカウンターイオンの炭酸水素イオンを結合させる、すなわち $\text{HCO}_3^-$ 型にする）、次いで水で洗浄することにより残存する炭酸水素アンモニウムを除去した後、水での懸濁状態（水で平衡化）にする。
- [0053] 次に、上記担体に吸着された成分を段階的にイオン強度が高くなるように溶出溶媒を通液し、溶出する。溶出溶媒としては、 $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 、 $\text{HCOONH}_4$ 又は $\text{NaCl}$ など、陰イオンの塩を溶解した水溶液を用いることが好ましい。
- [0054]  $\alpha$ -グルカン画分は、低イオン強度の溶出溶媒で溶出して得られる溶出画分（画分A）から得ることができる。低イオン強度の溶出溶媒としては、例えば、陰イオンとして $\text{HCO}_3^-$ を用いた場合、当該陰イオン濃度が50～150mMである溶出溶媒を用いることができ、好ましくは75～125mM、より好ましくは90～110mM、特に好ましくは100mMである。
- [0055] 得られた溶出画分（画分A）は、透析膜（例えば、Visking tube, MWCO12, 000～14, 000）を用いて透析した後、透析内液を凍結乾燥してから次の工程に用いてもよい。
- [0056] 次に、上記溶出画分（画分A）をゲルろ過カラムを用いて分子量により分

画する。 $\alpha$ -グルカン画分は、例えば、分画分子量  $2 \times 10^3 \sim 4 \times 10^5$  Da のゲルろ過カラムを用いた場合、最初に流出する空隙容積に相当する量の画分 (V<sub>0</sub>画分) (画分 A1) から得ることができる。おおよその分画分子量が  $2 \times 10^3 \sim 4 \times 10^5$  Da 程度のゲルろ過カラムとしては、例えば、Sephacryl S-300、Superose 12等を用いることができる。 $\alpha$ -グルカン画分は、ゲルろ過の際の溶出画分について、糖、ウロン酸及び280nmでのUV吸収に基づいて溶出パターンを作成し、上記V<sub>0</sub>画分に相当する画分 (画分 A1) を回収してもよい。得られた画分 (画分 A1) は更に常法に従い透析した後、凍結乾燥してもよい。

[0057] <ヘテログリカン画分>

次にヘテログリカン画分の製造方法について説明する。

[0058] ヘテログリカン画分の精製 (製造) には、上記エタノール沈殿画分を用いることが好ましい。以下、エタノール沈殿画分を用いる場合を例にとり、ヘテログリカン画分の精製方法を説明する。

[0059] まず、エタノール沈殿画分を、担体として陰イオン交換樹脂を充填したカラムに通液し、成分を吸着させる。陰イオン交換樹脂としては強イオン交換樹脂が好ましい。例えば、Q (四級アンモニウム) 基又はQAE基を有する樹脂を用いることができる。このような担体を備えるカラムの具体例としては、Q-Sepharose Fast Flow (FF)、QAE-Sepharose FF等を挙げることができる。これらの樹脂担体は、水で平衡化しておくことが好ましい。例えば、QAE-Sepharose FFの場合、2Mの炭酸水素アンモニウムに浸漬することによりQAE基を活性化させ (Sepharoseに共有結合させた4級アンモニウム基にカウンターイオンの炭酸水素イオンを結合させる、すなわちHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>型にする)、次いで水で洗浄することにより残存する炭酸水素アンモニウムを除去した後、水での懸濁状態に (水で平衡化) する。

[0060] 次に、上記担体に吸着された成分を段階的にイオン強度が高くなるように溶出溶媒を通液し、溶出する。溶出溶媒としては、NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>、HCOO

$\text{NH}_4$ 又は $\text{NaCl}$ など、陰イオンの塩を溶解した溶液を用いることが好ましい。

- [0061] ヘテログリカン画分は、高イオン強度の溶出溶媒で溶出して得られる溶出画分から得ることができる。高イオン強度の溶出溶媒としては、例えば、陰イオンとして $\text{HCO}_3^-$ を用いた場合、当該陰イオンの濃度が200~2000mMである溶出溶媒を用いることができる。ヘテログリカン画分は、250~350mMの溶出溶媒で溶出して得られる溶出画分（画分B）と、1600~2000mMの溶出溶媒で溶出して得られる溶出画分（画分C）と、に分けて精製した後、これらを組み合わせることが好ましい。
- [0062] 得られた溶出画分（画分B及び画分C）は、それぞれ透析膜（例えば、Visking tube, MWCO12, 000~14, 000）を用いて透析した後、透析内液を凍結乾燥してから次の工程に用いてもよい。
- [0063] 次に、上記溶出画分をゲルろ過カラムを用いて分子量により分画する。画分Bは、例えば、分画分子量 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6 \text{ Da}$ のゲルろ過カラムを用いた場合、最初に流出する空隙容積に相当する量の画分（V<sub>0</sub>画分）以外の画分（画分B<sub>2</sub>）を回収する。画分Cは、例えば、分画分子量 $2 \times 10^3 \sim 4 \times 10^5 \text{ Da}$ のゲルろ過カラムを用いた場合、最初に流出する空隙容積に相当する量の画分（V<sub>0</sub>画分）（画分C<sub>1</sub>）を回収する。ゲルろ過の際の溶出画分について、糖、ウロン酸及び280nmでのUV吸収に基づいて溶出パターンを作成し、上記画分BのV<sub>0</sub>画分以外の画分（画分B<sub>2</sub>）及び上記画分CのV<sub>0</sub>画分に相当する画分（画分C<sub>1</sub>）を回収してもよい。
- [0064] おおよその分画分子量 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6 \text{ Da}$ のゲルろ過カラムとしては、例えば、Sephacryl CL-6B、Superose 6等を用いることができる。また、おおよその分画分子量 $2 \times 10^3 \sim 4 \times 10^5 \text{ Da}$ のゲルろ過カラムとしては、例えば、Sephacryl S-300、Superose 12等を用いることができる。
- [0065] 画分B及び画分Cからゲルろ過することによりそれぞれ得られた画分（画分B<sub>2</sub>及び画分C<sub>1</sub>）を組み合わせることでヘテログリカン画分を得ること



ができる。得られたヘテログリカン画分は更に常法に従い透析した後、凍結乾燥してもよい。

[0066] [パイエル板活性剤]

本発明のパイエル板活性剤の形状は特に限定されないが、液状又は粉末状でもよく、又は通常用いられる製剤用担体を使用し固形製剤若しくは液体製剤としてもよい。これらの製剤化の方法は公知である。このようにして得られたパイエル板活性剤は、液状又は粉末状で保存することができる。保存は、特に液状の場合、冷蔵保存が好ましい。

[0067] 本発明のパイエル板活性剤を固形製剤とする場合、例えば有効成分である上記多糖にデキストリン、コーンスターチ又は脱脂米糠を混和し調製してもよい。これらの製剤化の方法は公知である。

[0068] 本発明のパイエル板活性剤の投与時期は、特に限定されない。本発明のパイエル板活性剤の投与量は、製剤形態、対象とするヒトや非ヒト動物の種類、健康状態、年齢や成長の度合いなどにより異なるため、特に限定されない。例えば、有効成分である上記多糖に換算して体重1kg当たり1日に1～1,000mgを投与すればよい。

[0069] 本発明のパイエル板活性剤の投与形態は特に限定されないが、例えば経口、経腸及び経鼻の方法で投与することができる。また、口腔内に貯留しやすい形状（チューインガムなども含む）にて投与することもできる。

[0070] 本発明のパイエル板活性剤は、パイエル板活性作用を有することから、例えば、腸管免疫亢進剤、腸管免疫調節剤、腸管感染症改善剤、炎症改善剤、ウイルス感染症改善剤、細菌感染症改善剤等として使用することもできる。特に、腸管免疫亢進作用を通じて、例えば、マラリア原虫感染予防治療剤として使用することもできる。

[0071] [マラリア原虫感染予防又は治療用医薬]

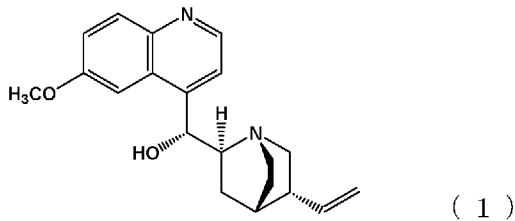
本発明のパイエル板活性剤は、腸管免疫亢進作用を通じて、マラリア原虫感染予防又は治療が可能である。したがって、本発明は、上記パイエル板活性剤を有効成分として含む、マラリア原虫感染予防又は治療用医薬を提供で

きる。

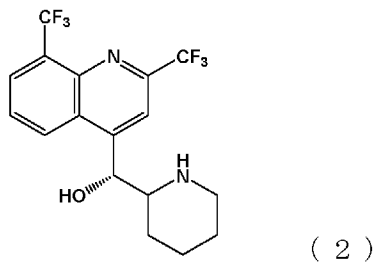
[0072] 上記マラリア原虫感染予防又は治療用医薬は、既存の抗マラリア薬と併用することで併用効果が得られる。したがって、既存の抗マラリア薬と併用されるように用いられてもよい。

[0073] 抗マラリア薬としては、例えば、キニーネ（下記式（1）で表される化合物）、メフロキン（下記式（2）で表される化合物）、スルファドキシン（下記式（3）で表される化合物）、ピリメタミン（下記式（4）で表される化合物）、クロロキン（下記式（5）で表される化合物）、プリマキン（下記式（6）で表される化合物）、アルテスネート（下記式（7）で表される化合物）、アルテメーター（下記式（8）で表される化合物）及びルメファントリン（下記式（9）で表される化合物）が挙げられる。これらは、1種単独で、又は2種以上を組み合わせ用いることができる。

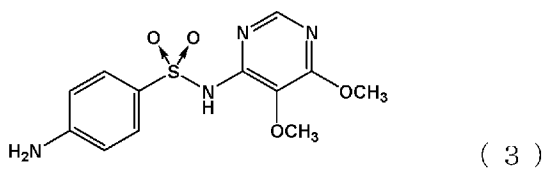
[0074] [化1]



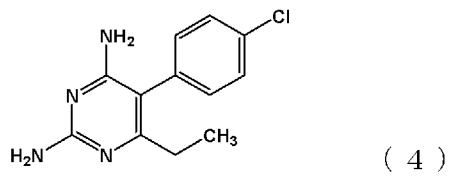
[化2]



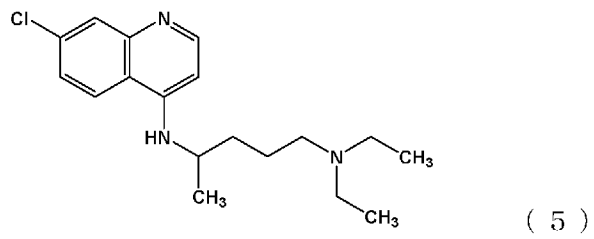
[化3]



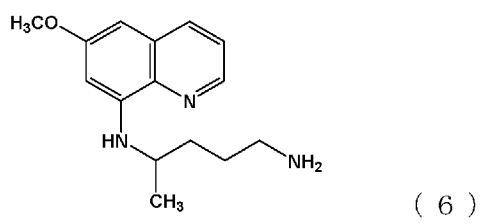
[化4]



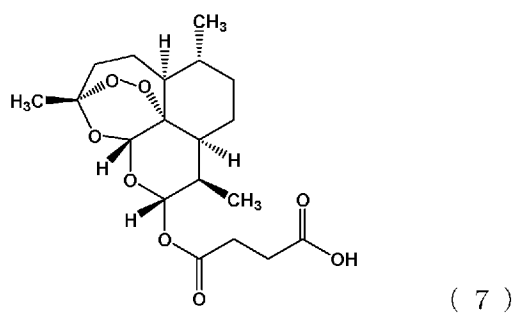
[化5]



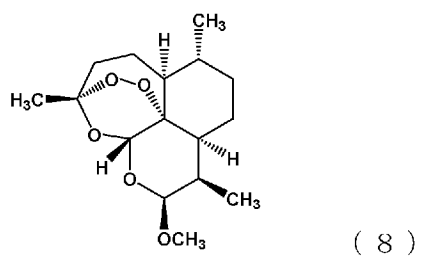
[化6]



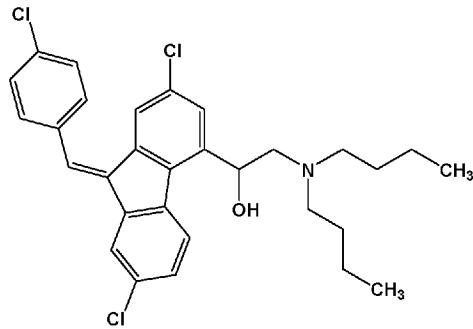
[化7]



[化8]



[化9]



( 9 )

[0075] 抗マラリア薬としては、本発明のマラリア原虫感染予防又は治療用医薬との併用効果が高いことから、アルテスネートを含むことが好ましい。また、本発明のマラリア原虫感染予防又は治療用医薬は、アルテスネートと併用されるように用いられることがより好ましい。

### 実施例

[0076] 以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明する。ただし、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0077] [試験例1：甘蔗由来のエキスのエタノール沈殿画分によるパイエル板活性化作用試験]

#### <甘蔗由来のエキスの製造>

(イオン交換樹脂を用いた単塔式回分分離による2番蜜の分画)

原糖工場で得られた2番蜜処理液を原料として、FPLCシステム（ファルマシア株式会社製）を用いた単塔式回分分離法によるイオン交換カラムクロマトグラフィーによる分画分離を行った。原料として使用した2番蜜処理液は、2番蜜を希釈後、炭酸ソーダによる清浄処理、ケイソウ土ろ過を行ったものである。この原料液の分析値は、ブリックス（Bx）47.4、糖度（Pol.）23.2、純糖率（Purity）48.9、還元糖分3.2%であった。

[0078] カラムにゲル型の強酸性陽イオン交換樹脂（商品名：UBK530、ナトリウムイオン型、三菱化学株式会社）500mlを充填した。カラムは内径26mm、高さ1000mmで、フローアダプター付きであった。通液条件

は、溶出液として脱気した蒸留水を用い、流速  $SV = 0.5 \text{ hr}^{-1}$  (4.17 ml/分)、温度  $60^\circ\text{C}$  にて行った。

[0079] 約 25 ml の原料を上記イオン交換カラムに供与した。分画条件は、原料供与 30 分後から溶出液の回収を開始し、試験管 1 本当たり 3.6 分間回収し (約 15 ml/本)、全部で 30 本回収した。

[0080] 得られた 30 画分 (画分 1~30) について、波長 420 nm の吸光度、電気伝導度、及び糖 (Sucrose、Glc、Fru) 含量 (各画分の固形分質量の合計を基準とした質量%) を測定し、図 6 に示した。ここで、吸光度測定は、0.5 mM リン酸バッファー (pH 7.5) 2 ml に各画分 0.1 ml を加えたものを測定試料とした。電気伝導度測定は、各画分を蒸留水で 0.5% に希釈したものを測定試料とした。糖含量は HPLC を用いた常法により測定した。

[0081] 得られた 30 画分を以下のようにまとめてサンプル 1~8 を得た。

サンプル 1 : 画分 3 及び 4。

サンプル 2 : 画分 5 及び 6。

サンプル 3 : 画分 7 及び 8。

サンプル 4 : 画分 9 及び 10。

サンプル 5 : 画分 11 及び 12。

サンプル 6 : 画分 13 及び 14。

サンプル 7 : 画分 15 及び 16。

サンプル 8 : 画分 17~30。

なお、画分 1 及び 2 は溶出される成分がほとんどなかったため、廃棄した。

[0082] 各サンプルを 1 晩凍結乾燥して、粉末とした。得られた凍結乾燥粉末 0.25 g を 0.5 mM リン酸バッファー (pH 7.5) に溶解して、100 ml とし、波長 420 nm での吸光度を測定し、下記表 1 に示した。サンプル 8 の吸光度は 0.86 と比較的高かったが、これはテーリングした成分を集めたものだからである。他のサンプルは 2 画分ずつを一緒にしたものである

のに対し、サンプル8は14画分を合わせたものである。したがって、420nmの吸光度は高いが、この画分を回収するのは効率が悪い。

[0083] 各サンプルの分析結果を以下の表1に示した。表1中の電導度灰分は、電気伝導度と既知の硫酸灰分の関係の検量線から係数を求め、算出したものである。表1中、凍結乾燥固形分の分配比率は、全サンプルの固形分質量の合計に対する各サンプルの固形分質量の比(%)である。電導度灰分及び各糖(Sucrose、Glc、Fru)の含量は、各サンプルの固形分質量に対する比(質量%)である。各糖(Sucrose、Glc、Fru)の含量から、サンプル1～3が非糖分画分に相当し、サンプル4～8が糖分画分に相当することが判る。ここでいう糖分とは、単糖及び蔗糖を指す。

[0084] [表1]

イオン交換樹脂による2番蜜分画サンプルの分析値

	凍結乾燥固形分の分配比率(%)	電導度灰分(%)	Sucrose 含量(%)	Glc 含量(%)	Fru 含量(%)	吸光度
サンプル1	3.1	32.9	0	0	0	2.72
サンプル2	7.2	39.7	0	0	0	2.01
サンプル3	10.7	51.4	10.4	0	0	0.83
サンプル4	21.9	32.6	45.6	1.4	0.7	0.33
サンプル5	25.9	18.8	64.2	2.9	1.3	0.16
サンプル6	19.6	10	73.5	4.7	2.3	0.11
サンプル7	8.4	3.5	74	6.2	3.2	0.14
サンプル8	3.1	3.3	29.8	4.5	4.4	0.86
イオンクロマト分離液	—	43.7	5.9	0.9	1.4	1.04

[0085] (イオン交換樹脂を用いた擬似移動床式カラムクロマトグラフィーによる分離)

原糖工場において、結晶缶にて2回蔗糖結晶を回収し、遠心分離により結晶を除いた振蜜である2番蜜を原料として、陽イオン交換樹脂を充填した分離塔を用いた擬似移動床式連続分離法により、イオン交換カラムクロマト分離を行った。

[0086] 原料の調製からイオン交換クロマト分離までの工程は連続的に行われるため、各工程の液の固形分濃度や組成は時間と共に若干変動するが、以下の濃

度や組成は定常運転における測定値である。

[0087] 2番蜜はブリックス (B x.) が約 85 であった。この濃度はカラムクロマト処理を行うには高いため、ブリックス約 50 に希釈した。これに、消石灰、炭酸ソーダを添加し不純物を凝集させ、ケイソウ土ろ過を行った。得られたろ液は、ブリックス 47.3、糖度 (P o l.) 23.6、純糖率 (P u r i t y) 49.9、還元糖分 2.5% であった。濾液をイオン交換クロマトグラフィーの原料として用いた。

[0088] 陽イオン交換樹脂として U B K 5 3 0 (三菱化学株式会社) を用いた擬似移動床式連続分離法によるイオン交換クロマトグラフィーを行った。樹脂を充填した分離塔は 8 分割されており、1 塔当たりの樹脂量は  $6.5 \text{ m}^3$  である。原料液と溶離液 (水) の供給、及び蔗糖画分と非蔗糖画分の抜き出し位置を一定時間毎に切り替えることにより、連続的に供給、抜き出しを行った。定常時の既定値は、供給流量  $3 \text{ m}^3/\text{時間}$ 、溶離水流量  $13.5 \text{ m}^3/\text{時間}$ 、非蔗糖画分抜き出し流量  $12.13 \text{ m}^3/\text{時間}$ 、蔗糖画分抜き出し流量  $4.37 \text{ m}^3/\text{時間}$ 、切り替え時間 267 秒であった。このクロマトグラフィー処理により、蔗糖画分と非蔗糖画分が分離された。これらはそれぞれ、図 6 における画分 10~17 (蔗糖画分)、及び画分 1~9 と画分 18~30 (非蔗糖画分) とを合わせたものに相当する。蔗糖画分は蔗糖が固形分当たり約 87% (H P L C 分析による) でブリックスは約 35 であり、この画分は清浄汁と混合して本工程に戻され、再び蔗糖を回収する操作を行った。また、得られた非蔗糖画分は、蔗糖分が約 0.3% (H P L C 分析による) でブリックスが約 8 であった。この非蔗糖画分を濃縮缶により濃縮し、ブリックス 40.0、糖度 (P o l.) 2.3、純糖率 (P u r i t y) 5.8、還元糖分 5.4% とした。この非蔗糖画分を甘蔗由来のエキスとした。甘蔗由来のエキスは、後の試験に用いるため一晩、凍結乾燥処理に付した。得られた凍結乾燥粉末 0.25 g を 0.5 mM リン酸バッファー (p H 7.5) で 100 ml 溶液にし、波長 420 nm での吸光度を測定した。吸光度は、1.11 であった。

## [0089] &lt;エタノール沈殿画分の調製&gt;

甘蔗由来のエキス（凍結乾燥重量；418.57974 g）に精製水を加えて総量500 mLとし、4倍量のエタノールを攪拌しながら加え、室温にて一晩攪拌した。遠心分離（6,000 rpm, 4°C, 30分間）し、得られた沈殿を流水及び精製水にて透析し（7日間）、非透析性画分を凍結乾燥することによりエタノール沈殿画分（「SCE-4」ともいう。）（収量：20.11 g, 収率：4.8%）を得た。

## [0090] &lt;糖鎖分解SCE-4の調製&gt;

エタノール沈殿画分（SCE-4）（50.45 mg）を50 mMアセテートバッファー（pH 4.5, 30 mL）に溶解後、100 mM  $\text{NaIO}_4$ を含む50 mMアセテートバッファー（10 mL）を加え4°C、暗所で96時間攪拌し過ヨウ素酸酸化を行った。反応溶液にエチレングリコール（1 mL）を加えて室温で1時間攪拌し、過剰の $\text{NaIO}_4$ を分解させた。次いで、反応混合物について精製水を用いて2日間透析し、透析内液を減圧濃縮した。さらに、 $\text{NaBH}_4$ （180 mg）を加えて室温で12時間攪拌し、酢酸を滴下することで中和した。さらに精製水を用いて本反応液を3日間透析後、透析内液を凍結乾燥することにより過ヨウ素酸酸化物（糖鎖分解SCE-4）を得た（収量：31.99 mg、収率：62.76%）。

## [0091] &lt;脱リグニン化SCE-4の調製&gt;

エタノール沈殿画分（SCE-4）（50.59 mg）を4%酢酸水溶液（50 mL）に溶解後、 $\text{NaClO}_2$ （250 mg）を加えて、70°Cの水浴中で40分間攪拌した。反応液を氷冷下3M  $\text{NaOH}$ を用いて中和した。反応液を一晩流水にて透析後、精製水を用いて4日間透析し、透析内液を凍結乾燥することにより脱リグニン多糖画分（脱リグニン化SCE-4）を得た（収量：22.39 mg、収率：44.14%）。

## [0092] &lt;マウスパイエル板細胞の調製及び培養&gt;

C3H/HeJマウスをイソフルラン（エスカイン吸入麻酔薬、マイラン製薬）を用いて安楽死後、眼科用ハサミを用いて小腸よりパイエル板を切り



出した。このパイエル板を氷冷した5%ウシ胎児血清（FBS）含有RPMI 1640培地（2 mL）を加えた滅菌シャーレにとり、ステンレスメッシュ（200 mesh）上で5 mLのディスポーサブル注射器の内筒のゴムラバー部を用いて圧碎することでパイエル板細胞を遊離させた。本細胞懸濁液を50 mLファルコンチューブに移し、ボルテックスミキサーで短時間攪拌した。本細胞懸濁液をステンレスメッシュ（150 mesh）によりろ過後、遠心分離（1,500 rpm、4℃、7分間）し、培地をデカンテーションすることによりパイエル板細胞を得た。本細胞についてFBS含有RPMI 1640培地（10 mL）を用いて計4回同様の操作を繰り返すことにより細胞を洗浄後、ステンレスメッシュ（200 mesh）によりろ過した。この細胞懸濁液（20  $\mu$ L）を用いてセルカウンターで細胞数を計数後、FBS含有RPMI 1640培地を用いて $1\sim 2\times 10^6$  cells/mLのパイエル板細胞懸濁液を調製した。

[0093] 96穴培養プレート（3072, FALCON）にパイエル板細胞懸濁液（180  $\mu$ L/well）及び多糖試料溶液（20  $\mu$ L/well, 多糖終濃度：100  $\mu$ g/mL, 50  $\mu$ g/mL及び10  $\mu$ g/mL）を添加し、5%CO<sub>2</sub>-95%空気下、37℃で2～6日間培養した。培養上清を別の96穴培養プレートに移し、-20℃にて使用まで保存した。多糖溶液の代わりに注射用水（20  $\mu$ L/well）を加えて培養して得た培養上清を対照として用いた。

[0094] <マウス骨髄細胞の調製>

C3H/HeJマウス（7週齢、雌）はイソフルランを用いて安楽死後、大腿骨を摘出し、23G注射針を装着した5 mL注射器を用いてFBS含有RPMI 1640培地（5 mL）により骨髄細胞を大腿骨から押し出すことにより採取した。本骨髄細胞をボルテックスミキサーにより分散後、ステンレスメッシュ（200 mesh）でろ過、次いで遠心分離（1,200 rpm、4℃、7分間）を行うことにより骨髄細胞を回収した。同様の操作を3回繰り返し細胞を洗浄後、骨髄細胞をFBS含有RPMI 1640培地（1

0 mL) に懸濁し、セルカウンターで細胞数を計数後、FBS含有RPMI 1640培地を用いて骨髓細胞懸濁液 ( $5 \times 10^5$  cells/mL) を調製した。

[0095] <パイエル板活性作用試験>

96穴培養プレートにパイエル板細胞培養上清 ( $50 \mu\text{L}/\text{well}$ )、骨髓細胞懸濁液 ( $5 \times 10^5$  cells/mL,  $100 \mu\text{L}/\text{well}$ ) 及びFBS含有RPMI 1640培地 ( $50 \mu\text{L}/\text{well}$ ) を加えて、5%CO<sub>2</sub>-95%空気下、37℃にて6日間培養した。培養した骨髓細胞培養懸濁液にAlamer Blue ( $20 \mu\text{L}/\text{well}$ , Biosource) を添加し、5%CO<sub>2</sub>-95%空気下、37℃で6~24時間培養後、生じた蛍光物質量を蛍光プレートリーダー (Infinite M200, Tecan, 励起波長; 544 nm, 測定波長; 590 nm) にて測定し、得られた相対蛍光強度としての増殖骨髓細胞数を骨髓細胞増殖促進因子量とした。

[0096] <統計学的検定>

実施例における全ての結果は平均値±S. D. で示した。対照及び被験試料間の統計学的有意差は、ANOVAの検定後、FisherのPLSDにより検定した。

[0097] <結果>

図1に、パイエル板活性作用試験結果を示す。骨髓細胞増殖促進因子量をパイエル板活性作用として示した。エタノール沈殿画分 (SCE-4) には、パイエル板活性作用が認められた。一方、SCE-4の糖鎖を分解したものの (糖鎖分解SCE-4) では対照と有意差がないレベルにまで活性が激減した。また、SCE-4を脱リグニン化したもの (脱リグニン化SCE-4) では活性が認められた。この結果、甘蔗由来エキス中のエタノール沈殿画分 (SCE-4) の多糖含有成分にパイエル板活性作用を示す物質が含まれることが示唆された。

[0098] [製造例1: α-グルカン画分及びヘテログリカン画分の調製]

<エタノール沈殿画分の調製>

試験例1と同様にして甘蔗由来のエキスを得た。甘蔗由来のエキス（凍結乾燥重量；418.57974g）に精製水を加えて総量500mLとし、4倍量のエタノールを攪拌しながら加え、室温にて一晩攪拌した。遠心分離（6,000rpm, 4℃, 30分間）し、得られた沈殿を流水及び精製水にて透析し（7日間）、非透析性画分を凍結乾燥することにより、茶褐色のエタノール沈殿画分（SCE-4）（収量：20.11g, 収率：4.8%）を得た。

[0099] <α-グルカン画分及びヘテログリカン画分の調製>

エタノール沈殿画分（SCE-4）から図2に示すスキームに従ってα-グルカン画分（図2中「画分A1」）及びヘテログリカン画分（図2中「画分X」）を調製した。

[0100] SCE-4（5.0g）をQAE-Sephacryl FF（5.5i.d. × 26cm）に添加し通液した後、吸着した成分を順次100mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>（6L）、300mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>（10L）及び1.8M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>（10L）を用いて段階的に溶出させた。分画画分を透析膜（Visking tube, MWCO12,000~14,000）を用いて透析後、透析内液を凍結乾燥し、分画画分（画分A、画分B及び画分C）を得た。

[0101] 画分A（100mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>溶出画分）：0.86g, 17.2%。  
画分B（300mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>溶出画分）：0.66g, 13.2%。  
画分C（1.8M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>溶出画分）：1.04g, 20.8%。

[0102] (α-グルカン画分)

画分Aを0.2M NaCl溶液で平衡化したSephacryl S-300（2.6i.d. × 90cm）に添加した後、0.2M NaClを用いて溶出させた。溶出画分について、常法により測定した相対糖含量、相対ウロン酸含量、280nmのUV吸収に基づき作成した溶出パターンに従い、分画画分を回収した。V<sub>0</sub>溶出画分をα-グルカン画分（図2中「画分A1」）として、白色の凍結乾燥粉末を得た（収量：0.2166g, 収率

: 4.3%)。

[0103] (ヘテログリカン画分)

画分Bを0.2M NaCl溶液で平衡化したSephacryl CL-6B (2.6 i. d. × 90 cm) により分画し、intermediate画分 (図2中「画分B2」) (収量: 0.02141 g, 収率: 0.41%) を得た。

一方、画分Cを0.2M NaClで平衡化したSephacryl S-300 (2.6 i. d. × 90 cm) にて分画し、Vo溶出画分 (図2中「画分C1」) (収量: 0.16395 g, 収率: 3.28%) を得た。

画分B2及び画分C1を合わせてヘテログリカン画分として、白色の凍結乾燥粉末を得た (図2中「画分X」) (収量: 0.1842 g, 収率: 3.68%)。

[0104] [試験例2: α-グルカン画分及びヘテログリカン画分の分析]

<分子量分布の測定>

被験試料 (α-グルカン画分及びヘテログリカン画分) の分子量分布を、Asahipak GS710及びAsahipak GS620 (各0.76 i. d. × 60 cm) (昭和電工) の連結カラムを用いた高速ゲルろ過クロマトグラフィー (HPSEC) により分析した。分子量は、標準多糖 (pullulan P-800, 400, 200, 100, 50, 20, 10及び5, 昭和電工) のHPSECでの保持時間より分子量対保持時間係数 (Kav) の検量線を作成し、被験試料の保持時間から算出した。

HPSECの条件は以下の通りである。

送液装置; JASCO PV-980 (日本分光)

検出器; Shodex RI SE-62 (昭和電工) (感度: ×2)

溶出液; 0.2M NaCl (1.0 mL/min)

[0105] <比色定量>

全糖量はフェノール-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>法、ウロン酸量はm-ヒドロキシビフェニル法、タンパク質量はブラッドフォード法を用いて測定した。標品としては

、フェノール-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>法にはGlcを、m-ヒドロキシビフェニル法にはGalAを、ブラッドフォード法はウシガンマグロブリン (Bio-Rad) を用いた。

[0106] <構成糖分析>

構成糖分析は、TMSメチルグリコシド法により行った。

単糖の標準品混合物 (Glc, Gal, GlcA, GalA, Ara, Fuc, Xyl, Man, Rha、各5 μg) 及び被験試料 (各50~100 μg) を13mmネジ口試験管に分取し、さらにmyo-イノシトール溶液 (内部標準: 20 μL, 1 mg/mL) を加えた後、溶媒を完全に減圧留去した。各試験管に1M HCl-MeOH溶液 (100~300 μL, 和光純薬) を加え、密封下メタノリシス (80°C、15時間) を行った。反応溶液にtert-BuOH (5 μL) を加え窒素気流下 (40°C) で溶媒を留去した後、Tri-Sil試薬 (100 μL, Pierce) を加えて密封下反応 (80°C、20分間) させた。試薬を窒素気流下 (40°C) で留去した後、反応生成物にヘキサン (2 mL) を加え数秒間超音波処理することによりTMS誘導体を抽出した。抽出物中の不溶物を遠心分離 (2,000 rpm、4°C、5分間) により除去後、溶媒を窒素気流下 (40°C) で留去し、得られたTMS誘導体のヘキサン溶液をガスクロマトグラフィー (GLC) により分析した。各単糖誘導体の同定は標準品の誘導体の保持時間との比較から行い、含有率比 (mol. %) はピーク面積と各実験毎に得られる各単糖誘導体のFID検出器に対する応答係数から算出した。

GLCの条件は以下の通りである。

機器; HP5890 Series II gas chromatograph (Hewlett Packard)

カラム; DB-1 capillary column (0.25mm i. d. ×30m、液膜厚0.25 μm、J&W Scientific Inc.)

キャリアガス; He (総流量; 80 mL/min、カラム入口圧; 21 ps

i、ガス純度；99.9999%)

注入口温度；250℃

検出器温度；280℃

オープン温度プログラム；60℃（1分間），60℃→170℃（30℃/min），170℃→190℃（1℃/min），190℃→300℃（30℃/min）、300℃（5分間）

[0107] <メチル化分析>

糖結合様式解析のためのメチル化分析は以下に示すように箱守法とW a e g h e等の方法を改変した方法に従って行った。

[0108]（メチルスルフィニルカルバニオンナトリウムを用いる多糖のメチル化）

被験試料（500μg）をネジ口試験管（15 i. d. ×100mm）にとり、一晚デシケーター中で減圧乾燥させた後、無水ジメチルスルホキシド（dry DMSO, Sigma）を加え、窒素気流下密封条件で15分間超音波処理し、試料が完全に溶解するまで（数時間～一昼夜）50～60℃で加温した。試料溶液にメチルスルフィニルカルバニオンナトリウム（500μL）を加え、窒素気流下1時間超音波処理を行った後、3時間室温で反応させた。反応後、少量の反応液（5～10μL）を用い、トリフェニルメタン試薬（和光純薬）により、過剰のメチルスルフィニルカルバニオンナトリウムの残存を確認した。メチルスルフィニルカルバニオンナトリウムが不十分の場合、さらにメチルスルフィニルカルバニオンナトリウムを追加し、上記操作をメチルスルフィニルカルバニオンナトリウムの過剰量が残存するまで繰り返した。反応混合液を凍結後に、CH<sub>3</sub>I（ヨードメタン、柳島製薬株式会社、特級、1mL）を加え、窒素気流下で密封条件にて15分間超音波処理を行い、室温で4時間以上反応させた。反応終了後、反応液中のCH<sub>3</sub>Iを減圧留去し、氷冷下凍結させ、使用したDMSO及びメチルスルフィニルカルバニオンの総量と等量の精製水を加え、残存するメチルスルフィニルカルバニオンを分解し、反応を停止させた。さらに、反応液にその黄色が消えるまで飽和Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>（約250μL～）を加えた。

## [0109] (完全メチル化多糖の回収)

Sep-pak C18カートリッジ (1 mL, Waters Associate Inc.) を蒸留エタノール (10 mL × 4)、次いで水 (2 mL × 3) を用いて洗浄後、上記メチル化反応混合液を本カートリッジへ通過させ、メチル化多糖をカートリッジに吸着させた。カートリッジを50% DMSO (2 mL × 5)、次いで水 (2 mL × 5) により洗浄後、蒸留エタノール (2 mL × 3) を用いてメチル化多糖を溶出後、減圧乾固することにより完全メチル化多糖を得た。

## [0110] (メチル化多糖中のウロン酸のカルボキシル基の還元)

完全メチル化多糖中のウロン酸残基のカルボキシル基は以下に示した方法により、重水素化一級アルコールに還元した。すなわち、完全メチル化多糖試料を95%エタノール (0.21 mL) 及びテトラヒドロフラン (THF, 0.51 mL) で溶解後、重水素化ホウ素ナトリウム (NaBD<sub>4</sub>, 1.8 mg) を加えて混和した後18時間以上室温で反応させ、さらに70°Cで1時間加温させることによりカルボキシメチル基を還元した。反応液を酢酸を用いて中和し、さらに7~8滴の酢酸を加えて反応を停止させた。反応溶液を減圧乾固後、生成したホウ酸を除去するため、反応生成物に蒸留メタノール (1 mL) を加えて減圧乾固する操作を少なくとも4回繰り返した。本反応混合物の50%DMSO溶液について、(完全メチル化多糖の回収)欄に記載した方法と同様にしてカルボキシル還元完全メチル化多糖を回収した。

## [0111] (完全メチル化多糖から部分メチル化アルジトールアセテート体への誘導体化と分析)

得られたカルボキシル還元完全メチル化多糖をネジ口試験管 (15 i. d. × 100 mm) 中、2M トリフルオロ酢酸 (TFA, 1 mL) を用いて密封下121°Cで1時間加熱することにより加水分解を行った。反応終了後、室温に冷却した反応溶液を減圧乾固し、さらにデシケーターで30分間減圧乾燥することにより残存するTFAを除去した。得られた加水分解物を9

5%エタノール（蒸留、1 mL）に溶解させ、25%アンモニア水を7~8滴添加しアンモニアアルカリ性にした後、過剰の水素化ホウ素ナトリウム（ $\text{NaBH}_4$ ）を加え室温で4時間以上反応させた。反応液に酢酸溶液を滴加し、残存する $\text{NaBH}_4$ を分解した後、さらに7~8滴加え、溶媒を減圧乾固により留去した。反応生成物にメタノール（1 mL）を加え、減圧乾固する操作を4回繰り返すことにより生成したホウ酸を除去した。反応生成物をデシケーター中1時間減圧下乾燥後、無水酢酸を加え、密封下121°C、3時間加熱反応させることによりアセチル化を行った。反応溶液を室温になるまで放置した後、トルエン（1 mL）を加えて混和し、40°Cで空気気流下、無水酢酸を除去した。反応生成物に水（1 mL）及び $\text{CHCl}_3$ （2 mL）を加え液-液分配し、遠心分離（4°C、2,500 rpm、5分）した後、上層の水層を吸引除去した。さらに $\text{CHCl}_3$ 層は水（1 mL）を用いて4~5回程洗浄後、 $\text{CHCl}_3$ を減圧留去し、部分メチル化アルジトールアセテート誘導体を得た。本誘導体は以下に示す条件によりガスクロマトグラフィー（GLC）及びガスクロマトグラフィー/質量分析（GLC-MS）を用いて分析した。メチル化アルジトールアセテートの同定は標品のフラグメントイオンとの比較及び2, 3, 4, 6-tetra-OMe-1, 5-di-OAc-galactitolに対する相対保持時間との比較により行った。メチル化糖の構成モル比（mol.%）はピーク面積とFIDに対する応答係数により求めた。

[0112] GLC :

装置 ; HP5890 Series II gas chromatograph (Hewlett Packard)

キャピラリカラム ; SP-2380 capillary column (0.25 mm i. d. × 30 m, 液膜厚 0.25 μm, SPELCO/ALDRICH)

キャリアガス ; He (総流量 ; 80 mL/min, カラム入口圧 ; 10 psi, ガス純度 ; 99.9999%)



注入口温度 ; 250°C

検出器 ; 250°C

オープン温度 ; 60°C (1 min) , 60°C→150°C (30°C/min)  
 , 150°C→250°C (1.5°C/min) , 250°C (1 min)

[0113] MS :

Mass spectrometer ; HP5970B Mass Selective Detector (70eV, 280°C)

[0114] <結果>

$\alpha$ -グルカン画分及びヘテログリカン画分の分析結果を表2及び表3に示す。また、 $\alpha$ -グルカン画分及びヘテログリカン画分の分子量分布の測定結果を図7及び図8に示す。

[表2]

表 2.

	エタノール沈殿画分(SCE4)	$\alpha$ -グルカン画分	ヘテログリカン画分
ピーク分子量	Not determined	90 万	4.8 万及び 83 万
Carbohydrate (%) as Glc	78.1	84.8	52.2
Uronic acid (%) as GalA	3.5	3.2	7.2
Protein (%) as bovine gamma globulin	35.2	5.0	5.9
構成糖の含有率比 (mol. %)			
Ara	20.8	2.2	24.7
Rha	1.8	1.4	3.3
Fuc	0.6	1.6	1.8
Xyl	10.0	1.5	9.9
GlcA	3.0	2.4	6.0
GalA	0.7	—	1.4
Man	4.0	3.4	11.3
Gal	14.1	3.6	9.5
Glc	45.0	83.9	32.1

[表3]

表 3.  $\alpha$ -グルカン画分及びヘテログリカン画分の糖結合様式

糖残基	結合様式	Mol. %	
		$\alpha$ -グルカン画分	ヘテログリカン画分
Arabinose	非還元末端(furanose)	—	21.9
	非還元末端(pyranose)	—	7.2
	4 or 5 結合	—	7.5
	2 結合(furanose)	—	3.5
Xylose	4 or 5 結合	—	3.0
	3 結合 (pyranose)	—	2.5
Fucose	非還元末端	—	3.1
Mannose	非還元末端	3.8	3.3
	2 結合	4.3	—
	3 結合	3.7	1.6
	4 結合	—	1.4
	4,6 分岐	—	0.3
Galactose	非還元末端	5.3	7.3
	3 結合	3.4	3.4
	4 結合	—	0.9
	6 結合	3.2	4.8
	2,6 分岐	2.1	1.3
	3,6 分岐	3.0	9.3
	4,6 分岐	—	0.6
	3,4,6 分岐	—	1.9
Glucose	非還元末端	25.2	3.6
	3 結合	6.2	2.2
	4 結合	5.8	3.0
	6 結合	19.8	4.1
	2,6 分岐	6.4	0.6
	4,6 分岐	5.1	0.3
	3,4,6 分岐	2.7	—
Galacturonic acid	2 結合	—	0.7
Glucuronic acid	4 結合	—	0.7

[0115] 表 2 及び図 7 に示すように、 $\alpha$ -グルカン画分は、ピーク分子量が 90 万であり、分子量が 16,000~V<sub>0</sub>容積に相当する分子量（約 1,660,000）の範囲に分布していた。 $\alpha$ -グルカン画分は、構成糖に占めるグルコースの割合は約 84%であった。表 2 及び図 8 に示すように、ヘテログリカン画分は、ピーク分子量が 2 つあり、それぞれ 4.8 万、及び 83 万で

あった。分子量は、10,000~V<sub>0</sub>容積に相当する分子量（約1,660,000）の範囲に分布していた。ヘテログリカン画分は、構成糖に占めるグルコースの割合は約32%、アラビノースは約25%であった。 $\alpha$ -グルカン画分及びヘテログリカン画分のいずれも糖を主成分として含有する多糖画分であった。

[0116] 表3に示すように、 $\alpha$ -グルカン画分は、非還元末端のグルコースを約25%、 $\alpha$ -6結合グルコース（6結合）を約20%と多く含むという特徴があった。ヘテログリカン画分は、非還元末端のアラビノースを約22%含むという特徴があった。

[0117] [実施例1：パイエル板活性作用試験]

試験例2で調製した $\alpha$ -グルカン画分（画分A1）及びヘテログリカン画分（画分X）、並びに試験例1で調製した脱リグニン化SCE-4及びエタノール沈殿画分（SCE-4）を用い、試験例1と同様にパイエル板活性作用試験を行った。

[0118] 図3に、パイエル板活性作用試験結果を示す。骨髓細胞増殖促進因子量をパイエル板活性作用として示した。 $\alpha$ -グルカン画分（画分A1）及びヘテログリカン画分（画分X）はいずれの添加量（25 $\mu$ g/mL, 50 $\mu$ g/mL, 100 $\mu$ g/mL）においても脱リグニン化SCE-4よりも有意にパイエル板活性作用が高く、エタノール沈殿画分（SCE-4）に匹敵するパイエル板活性作用を示した。

[0119] 原料である甘蔗由来のエキスは、塩類を多く含み、エタノール沈殿画分（SCE-4）の収率は約5%である。また、エタノール沈殿画分（SCE-4）は各種多糖が混合している画分であり、リグニン成分も含まれている。そのため、茶褐色であり、粉末化しにくいため、加工特性が悪く、渋味を有する。一方、本実施例により得られた $\alpha$ -グルカン画分及びヘテログリカン画分は白色の無味の粉末であるため、加工しやすい。

[0120] [実施例2：パイエル板活性作用への $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-グルカン構造の関与]

<α-グルカン画分及びヘテログリカン画分の酵素消化>

α-グルカン画分 (1.5 mg) 又はヘテログリカン画分 (1.5 mg) の 25 mM アセテートバッファー (pH 4.5, 1 mg/mL) 溶液に *exo-α-L-arabinofuranosidase* (20 μL), *exo-β-D-(1→3)-galactanase* (20 μL) 及び *endo-β-D-(1→4)-galactanase* (5 μL) を加え、37°C, 2日間の条件で酵素反応を行った。得られた消化物は、沸騰水浴中 30 秒間加熱処理し、酵素を失活させた。この酵素反応液 (図 4 中、「1, 3/1, 4-ガラクタナーゼ」と表示) の半量についてはさらに *dextranase* (0.25 unit) を加えて 2日間 37°C にてインキュベーション後、上記と同様の条件で酵素を失活させ、酵素反応液を得た (図 4 中、「デキストラナーゼ」と表示)。これらの反応液は使用まで -20°C にて保存した。

[0121] <IL-6 産生量の測定>

マウスパリエル板細胞の調製及び培養は試験例 1 と同様に行った。

[0122] (酵素免疫測定法 (ELISA))

ELISA 用プレート (Immuno-Maxisorp, Nunc) に 50 mM carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) で 1 μg/mL に希釈した抗マウス IL-6 一次抗体 (100 μL/well) を分注し、4°C で一昼夜インキュベーションした。本プレートを 0.05% Tween 20 含有リン酸緩衝化生理食塩水 (PBST) (300 μL/well) で 3 回洗浄後、1% スキムミルク (SM) 含有 PBST (SM-PBST) (100 μL/well) を用いて 37°C で 1 時間インキュベーションした。プレートを PBST (300 μL/well) で 4 回洗浄後、1% SM-PBST (50 μL/well) を加えて 10 分間室温にてプレインキュベーションし、次いで、パリエル板培養上清 (50 μL/well) を加え、4°C で 1 晩インキュベーションした。プレートを PBST (300 μL/well) で 3 回洗浄し、1% SM-PBST (

100  $\mu$ L/well) を用いて10分間室温にてプレインキュベーションした。さらにプレートに1%SM-PBSTで希釈したbiotin標識抗IL-6二次抗体(1:1000, 50  $\mu$ L/well)を加え37°Cで1時間インキュベーション後、PBST(300  $\mu$ L/well)で3回洗浄した。プレートを1%SM-PBST(100  $\mu$ L/well)を用いて10分間室温にてプレインキュベーション後、1%SM-PBSTで希釈したalkaline phosphatase標識streptavidin(1:1000, 100  $\mu$ L/well)を加え37°Cで1時間インキュベーションした。プレートをPBST(300  $\mu$ L/well)で5回洗浄後、substrate solution [disodium p-nitrophenyl phosphateの10%diethanolamine buffer (pH9.8) 溶液(1mg/mL, 150  $\mu$ L/well)を加え、室温でインキュベーションした。発色した黄色をマイクロプレートリーダー(Multiskan JX, Thermo Electron Corp.)を用いて測定した(測定波長; 405 nm、空白波長; 492 nm)。

[0123] <結果>

パリエル板活性作用としての骨髄細胞増殖促進因子の一つとして、IL-6が関係することが明らかとなっている。図4に、IL-6産生誘導試験結果を示す。脱リグニン化SCE-4では、対照と比較して有意にIL-6産生量が増加していた(図4中、「脱リグニン化SCE-4」)。 $\alpha$ -グルカン画分(図4中、画分A1)及びヘテログリカン画分(図4中、画分X)にもIL-6産生亢進能が認められた(図4中、 $\alpha$ -グルカン画分及びヘテログリカン画分の「未処理」)。また、1, 3/1, 4ガラクターナーゼ処理によっても、 $\alpha$ -グルカン画分及びヘテログリカン画分のIL-6産生亢進活性は低下しなかった。これは、活性発現に必要な構造がこれらのガラクトンではないことを示している。一方、ガラクターナーゼ処理をした後デキストラナーゼ処理を行なったところ、 $\alpha$ -グルカン画分において、対照と同程度ま

で活性が低下した。また、ヘテログリカン画分においても $50\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で活性が低下した。デキストラナーゼは、 $\alpha-1,6$ -結合の三糖以上のグルカン構造を認識して切断する活性を有する。したがって、このような糖鎖構造を持つ多糖が、 $\alpha$ -グルカン画分及びヘテログリカン画分に含まれており、IL-6産生亢進活性に寄与していることが示唆された。なお、デキストランを単独で添加して試験した場合、IL-6産生量に変化は認められなかった（データは示さず）。

[0124] [実施例3：ネズミマラリア原虫（クロロキン感受性株）感染モデルでの多糖画分の経口投与試験]

製造例1で調製した $\alpha$ -グルカン画分及びヘテログリカン画分、並びにエタノール沈殿画分（SCE-4）を多糖画分として用い、ネズミマラリア原虫感染モデルでの多糖画分の経口投与試験を行った。

[0125] <Plasmodium berghei N（クロロキン感受性株）感染モデル>

ネズミマラリア原虫による感染実験は北里大学・北里生命科学研究所・熱帯病評価センター・実験動物センター分室にて行った。動物実験は、当該法律ならびに関係省庁からの通達などに従って規定された（学）北里研究所が定める実験動物取り扱い安全衛生管理規定に準じて行った。

[0126] ICRマウス（20g前半）は日本チャールズ・リバー社（株）より購入し、室温 $23\pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55\pm 10\%$ 、照明時間9時間/日の一定条件下で1週間の予備飼育の後、実験に供した。

[0127] ネズミマラリア原虫の維持は凍結ネズミマラリア原虫Plasmodium berghei N（クロロキン感受性株）をICRマウスへ腹腔内投与（ $200\mu\text{L}/\text{マウス}$ ）により感染させ、感染数日後に心臓採血、別マウス（4～5匹）への尾静脈投与（ $200\mu\text{L}/\text{マウス}$ ）による感染を繰り返すことで行った。

[0128] 原虫感染赤血球の調製は以下のように行った。すなわち、感染効率の良いマウスを選び、ネブタール麻酔下で心臓採血を行い、血液塗抹標本を作製

した。塗抹標本をQuick III染色キット (astradiagnosics) もしくはヘマカラー (Merck) を用いた簡易ギムザ染色法により染色し、感染率 (Parasitemia%) を算出した。採取した血液は注射用生理食塩水で希釈し、赤血球数を血球計算盤で数え、感染率を乗じて感染赤血球数を算出した。感染赤血球懸濁液として  $1 \times 10^5$  又は  $1 \times 10^7$  cells/mL となるように生理食塩水にて希釈後  $200 \mu\text{L}/\text{mouse}$  で尾静脈投与した。

[0129] マウスへのネズミマラリア原虫の感染実験は雄性ICRマウスに  $2 \times 10^4$  cellsのP. berghei N感染赤血球を尾静脈から静注 ( $0.2 \text{ mL}/\text{mouse}$ ) することにより行った。

[0130] <感染モデルマウスへの多糖の経口投与>

ICRマウスへの $\alpha$ -グルカン画分 (図5中、画分A1) 及びヘテログリカン画分 (図5中、画分X)、並びにSCE-4の連日経口投与は経口ゾンデを用いて  $500 \mu\text{L}/\text{mouse}$  の用量で行った。エタノール沈殿画分 (SCE-4) の投与量は  $600 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$  にて、また、 $\alpha$ -グルカン画分及びヘテログリカン画分は各々  $28 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$  及び  $22 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$  とした。 $\alpha$ -グルカン画分及びヘテログリカン画分の投与量は、それぞれ収率から計算したSCE-4の  $600 \text{ mg}/\text{kg}/\text{day}$  に相当する量である。また、対照として水のみを経口投与した。投与は原虫感染7日前より開始し、マラリア原虫感染後も投与を継続させた。

[0131] <ネズミマラリア原虫の感染率の算出>

感染3日後よりマウスの尾から血液を採取し血液塗抹標本の作製を行った。塗抹標本の染色はQuick III染色キット (astradiagnosics) 又はヘマカラー (Merck) を用いた簡易ギムザ染色により行った。塗抹標本は油浸オイルを滴下し、顕微鏡 (ORIMPUS BX40) 下で、表4に示す基準で観察した。

[表4]

表 4.

感染率	数える視野数
20%超	3 視野
10%超 20%以下	5 視野
2%超 10%以下	10 視野
0.05%超 2%以下	20 視野
0.05%以下	50 視野

また、赤血球の感染率 (Parasitemia) は以下に示す式にあてはめて産出した。

[数1]

$$\frac{\text{感染赤血球細胞数}}{\text{総赤血球細胞数}} \times 100 = \text{感染率 (Parasitemia)}$$

[0132] &lt;結果&gt;

図5に、ネズミマラリア原虫感染モデルでの多糖画分の経口投与試験結果を示す。エタノール沈殿画分 (SCE-4) を投与したマウスでは、4日目及び5日目に感染率が対照と比較して有意に低下していた。また、SCE-4よりも約1/20と明らかに投与量が少ないにも関わらず、 $\alpha$ -グルカン画分 (図5中、画分A1) 及びヘテログリカン画分 (図5中、画分X) を投与したマウスでは、4日目及び5日目の感染率が対照と比較して有意に低下していた (図5には、FisherのLSD検定におけるp値を示してある)。さらに $\alpha$ -グルカン画分を投与した8匹中5匹のマウスでは6日目でも効果が継続していた。以上のことから、エタノール沈殿画分 (SCE-4) の示すマラリア感染に対する防御作用は、含有される $\alpha$ -グルカン及びヘテログリカンにより発現されていることが確認された。また、本実施例における結果は、 $\alpha$ -グルカン画分及びヘテログリカン画分は、投与量がSCE-4よりも少ない (約1/20) にも関わらず、SCE-4とほぼ同程度かやや上回る程度のマラリア感染に対する防御作用を有することを示している。したがって、 $\alpha$ -グルカン画分及びヘテログリカン画分の投与量を増やすこ



とにより、SCE-4よりも顕著に高い当該防御作用を発現することができる。

[0133] [実施例4：ネズミマラリア原虫（クロロキン耐性株）感染モデルでの多糖画分の経口投与試験2]

製造例1で調製したエタノール沈殿画分（SCE-4）を多糖画分として用い、ネズミマラリア原虫感染モデルでの多糖画分の経口投与試験を行った。

[0134] <Plasmodium yoelii NS感染モデル>

ネズミマラリア原虫はPlasmodium yoelii NS（クロロキン耐性株）を用い、尾静脈投与による原虫感染後すぐにクロロキン（Chloroquine diphosphate salt水溶液）を60 mg/kg/mouseの用量でマウスに皮下投与し、耐性原虫を維持した。尾静脈から静注する感染赤血球数は $2 \times 10^6$  cellsとした。その他は実施例3の<Plasmodium berghei N感染モデル>と同様にして行った。

[0135] <感染モデルマウスへの多糖の経口投与>

ICRマウスへのSCE-4の連日経口投与は経口ゾンデを用いて500  $\mu$ L/mouseの用量で行った。SCE-4の投与量は600 mg/kg/dayとした。対照として水のみを経口投与した。投与は原虫感染7日前より開始し、マラリア原虫感染後も投与を継続させた。

[0136] <ネズミマラリア原虫の感染率の算出>

実施例3と同様にして行った。

[0137] <結果>

図9に、経口投与試験結果を示す。エタノール沈殿画分（SCE-4）を投与したマウスでは、4日目及び7日目に感染率が対照と比較して有意に低下していた（FisherのLSD検定におけるp値は、いずれも $p < 0.001$ ）。

[0138] [実施例5：ネズミマラリア原虫（クロロキン耐性株）感染モデルでの多糖

画分と抗マラリア薬の併用経口投与試験]

製造例1で調製したエタノール沈殿画分(SCE-4)を多糖画分として用い、抗マラリア薬アルテスネート(Artensnate, ANと略記する。)との併用効果を、ネズミマラリア原虫感染モデルでの経口投与試験により試験した。

[0139] <Plasmodium yoelii NS感染モデル>

尾静脈から静注するP. yoelii NS感染赤血球数を $2 \times 10^6$  cellsから $2 \times 10^4$  cellsに代えたこと以外は実施例4と同様にして行った。

[0140] <感染モデルマウスへの多糖及びANの経口投与>

ICRマウスへのSCE-4及びANの連日経口投与は経口ゾンデを用いて $500 \mu\text{L}/\text{mouse}$ の用量で行った。SCE-4の投与量は $600 \text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ 、ANは0.5% Tween 80含有10% dimethylsulfoxide (DMSO)水溶液で溶解、投与し、その投与量は $3 \text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ とした。SCE-4の投与は原虫感染7日前より開始し、マラリア原虫感染後も投与を継続させた。ANの投与は原虫感染2時間後から開始し、マラリア原虫感染後3日目まで(計4回)投与を継続させた。また、SCE-4はAN投与後、少なくとも3時間以上時間をおいて投与した。

[0141] 対照群は水及び0.5% Tween 80含有10%DMSO水溶液の経口投与、AN3群は水及びANの0.5% Tween 80含有10%DMSO水溶液の経口投与、SCE-4+AN3群はSCE-4水溶液の経口投与とANの0.5% Tween 80含有10%DMSO水溶液の経口投与を行った。

[0142] <ネズミマラリア原虫の感染率の算出>

実施例3と同様にして行った。

[0143] <結果>

図10に、経口投与試験結果を示す。ANを投与したAN3群は、4日目

及び5日目に感染率が対照群と比較して有意に低下していた（Dunnett検定におけるp値は、それぞれ $p < 0.001$ 及び $p = 0.0024$ ）。SCE-4とANを併用したSCE-4+AN3群は、4日目及び5日目に感染率が対照群と比較して有意に低下しており（Dunnett検定におけるp値は、それぞれ $p < 0.001$ 及び $p = 0.0002$ ）、また6日目においてもその効果が持続していた（Dunnett検定におけるp値は、 $p = 0.0047$ ）。この結果から明らかな通り、SCE-4とANとを併用することでマラリア感染に対する防御作用が増強された。このことは、SCE-4による作用が既存の抗マラリア薬（AN）による作用と競合しないことを示している。したがって、SCE-4は耐性株が出現した抗マラリア薬の代替薬として用いること、又は既存の抗マラリア薬と併用して用いることができる。

## 請求の範囲

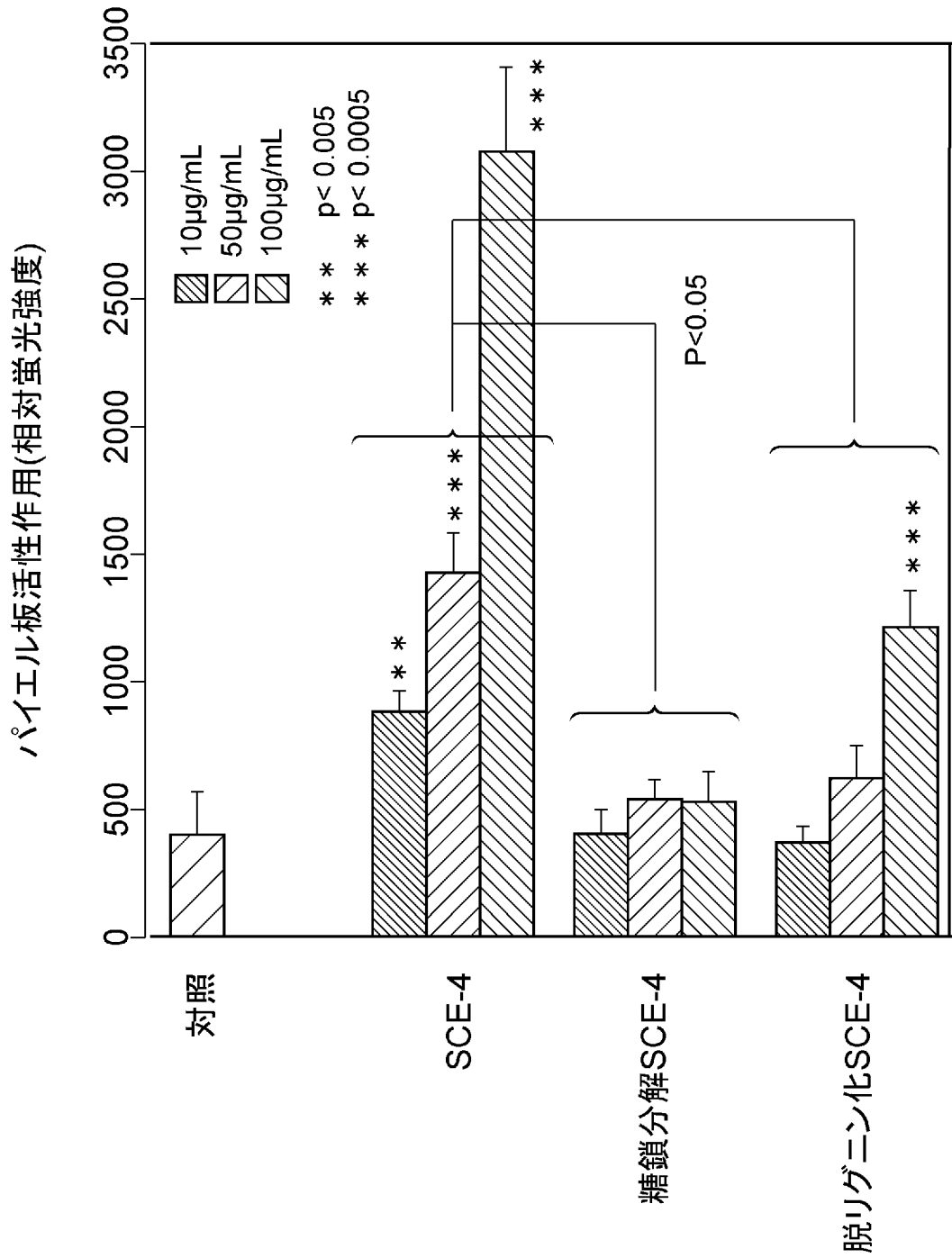
- [請求項1] 甘蔗から得られる多糖を有効成分として含有し、  
前記多糖が、 $\alpha$ -グルカンを主成分とし、ピーク分子量が720,000~1,080,000の範囲内にあり、全構成糖に占めるグルコースの割合が80%以上であり、かつ非還元末端グルコースの割合が20~30%、及び $\alpha$ 1-6結合グルコースの割合が15~25%である、パイエル板活性剤。
- [請求項2] 前記多糖が、甘蔗抽出物又は甘蔗由来の糖蜜から選ばれる原料を、エタノール沈殿し、得られた沈殿から透析又は膜処理により低分子量の物質を除去して得られるエタノール沈殿画分から得られるものである、請求項1に記載のパイエル板活性剤。
- [請求項3] 前記原料が、甘蔗由来のエキスであり、  
前記エキスが、甘蔗抽出物又は甘蔗由来の糖蜜を、担体として陽イオン交換樹脂を充填したカラムに通液し、水を溶離液としたときの前記陽イオン交換樹脂と各成分との親和力の差により分画し、得た多数の画分のうち蔗糖、ブドウ糖及び果糖が除かれた、波長420nmの光を吸収する画分である、請求項2に記載のパイエル板活性剤。
- [請求項4] 前記多糖が、前記エタノール沈殿画分を、担体として陰イオン交換樹脂を充填したカラムに通液し、前記陰イオン交換樹脂に吸着された成分を低イオン強度の溶出溶媒で溶出して得られる溶出画分を、更にゲルろ過して得られる画分である、請求項2又は3に記載のパイエル板活性剤。
- [請求項5] 前記多糖が、前記エタノール沈殿画分を、担体として水で平衡化した陰イオン交換樹脂を充填したカラムに通液し、前記陰イオン交換樹脂に吸着された成分を100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ で溶出して得られる溶出画分を、更に分画分子量 $2 \times 10^3 \sim 4 \times 10^5$ Daのゲルろ過カラムに通液し、最初に流出する空隙容積に相当する量の画分である、請求項2~4のいずれか一項に記載のパイエル板活性剤。

- [請求項6] 甘蔗から得られる多糖を有効成分として含有し、  
前記多糖が、ヘテログリカンを主成分とし、ピーク分子量が38,400~57,600の範囲内、及び664,000~996,000の範囲内にあり、全構成糖に占めるグルコースの割合が30%~50%、及びアラビノースの割合が20~30%であり、かつ非還元末端アラビノースの割合が20~30%である、パイエル板活性剤。
- [請求項7] 前記多糖が、甘蔗抽出物又は甘蔗由来の糖蜜から選ばれる原料を、エタノール沈殿し、得られた沈殿から透析又は膜処理により低分子量の物質を除去して得られるエタノール沈殿画分から得られるものである、請求項6に記載のパイエル板活性剤。
- [請求項8] 前記原料が、甘蔗由来のエキスであり、  
前記エキスが、甘蔗抽出物又は甘蔗由来の糖蜜を、担体として陽イオン交換樹脂を充填したカラムに通液し、水を溶離液としたときの前記陽イオン交換樹脂と各成分との親和力の差により分画し、得た多数の画分のうち蔗糖、ブドウ糖及び果糖が除かれた、波長420nmの光を吸収する画分である、請求項7に記載のパイエル板活性剤。
- [請求項9] 前記多糖が、前記エタノール沈殿画分を、担体として陰イオン交換樹脂を充填したカラムに通液し、前記陰イオン交換樹脂に吸着された成分を高イオン強度の溶出溶媒で溶出して得られる画分である、請求項7又は8に記載のパイエル板活性剤。
- [請求項10] 前記多糖が、  
前記エタノール沈殿画分を、担体として水で平衡化した陰イオン交換樹脂を充填したカラムに通液し、前記陰イオン交換樹脂に吸着された成分を、100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ で溶出した後に、300mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ で溶出して得られる溶出画分を、更に分画分子量  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6 \text{ Da}$  のゲルろ過カラムに通液し、最初に流出する空隙容積に相当する量の画分以外の画分と、  
前記エタノール沈殿画分を、担体として水で平衡化した陰イオン交

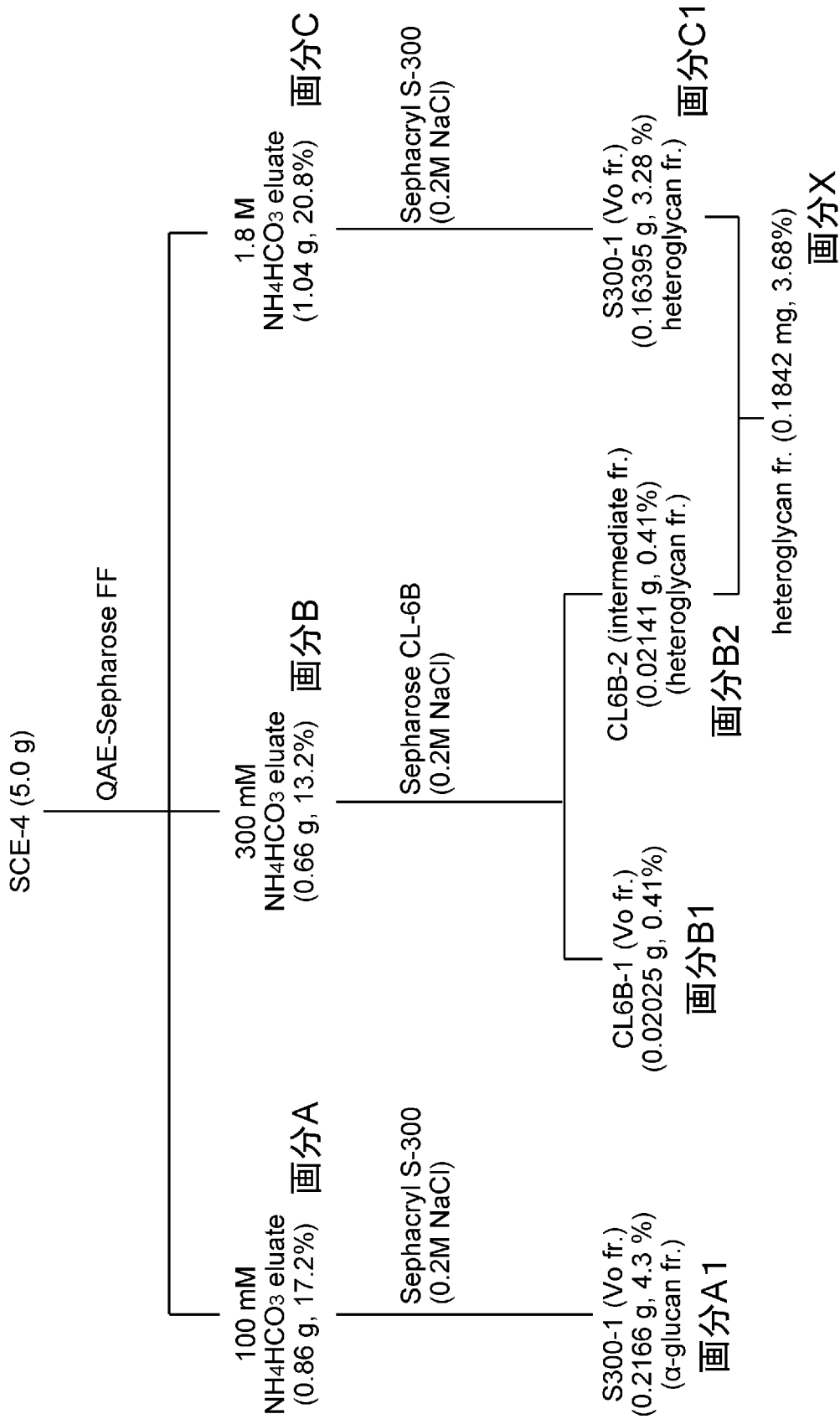
換樹脂を充填したカラムに通液し、前記陰イオン交換樹脂に吸着された成分を、300 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ で溶出した後に、1.8 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ で溶出して得られる溶出画分を、更に分画分子量  $2 \times 10^3 \sim 4 \times 10^5 \text{ Da}$  のゲルろ過カラムに通液し、最初に流出する空隙容積に相当する量の画分と、からなる、請求項7～9のいずれか一項に記載のパイエル板活性剤。

- [請求項11] 甘蔗から得られる多糖を有効成分として含有し、  
前記多糖が、甘蔗抽出物又は甘蔗由来の糖蜜から選ばれる原料を、エタノール沈殿し、得られた沈殿から透析又は膜処理により低分子量の物質を除去して得られるものである、パイエル板活性剤。
- [請求項12] 腸管免疫亢進剤である、請求項1～11のいずれか一項に記載のパイエル板活性剤。
- [請求項13] マラリア原虫感染予防治療剤である、請求項1～12のいずれか一項に記載のパイエル板活性剤。
- [請求項14] 請求項1～13のいずれか一項に記載のパイエル板活性剤を含む食品。
- [請求項15] 請求項1～13のいずれか一項に記載のパイエル板活性剤を含む飼料。
- [請求項16] 請求項1～13のいずれか一項に記載のパイエル板活性剤を含む、マラリア原虫感染予防又は治療用医薬。
- [請求項17] キニーネ、メフロキン、スルファドキシム、ピリメタミン、クロロキン、プリマキン、アルテスネート、アルテメーター及びビルメファントリンからなる群より選択される1種又は2種以上の抗マラリア薬と併用されるように用いられる、請求項16に記載のマラリア原虫感染予防又は治療用医薬。
- [請求項18] 前記抗マラリア薬が、アルテスネートである、請求項17に記載のマラリア原虫感染予防又は治療用医薬。

[図1]

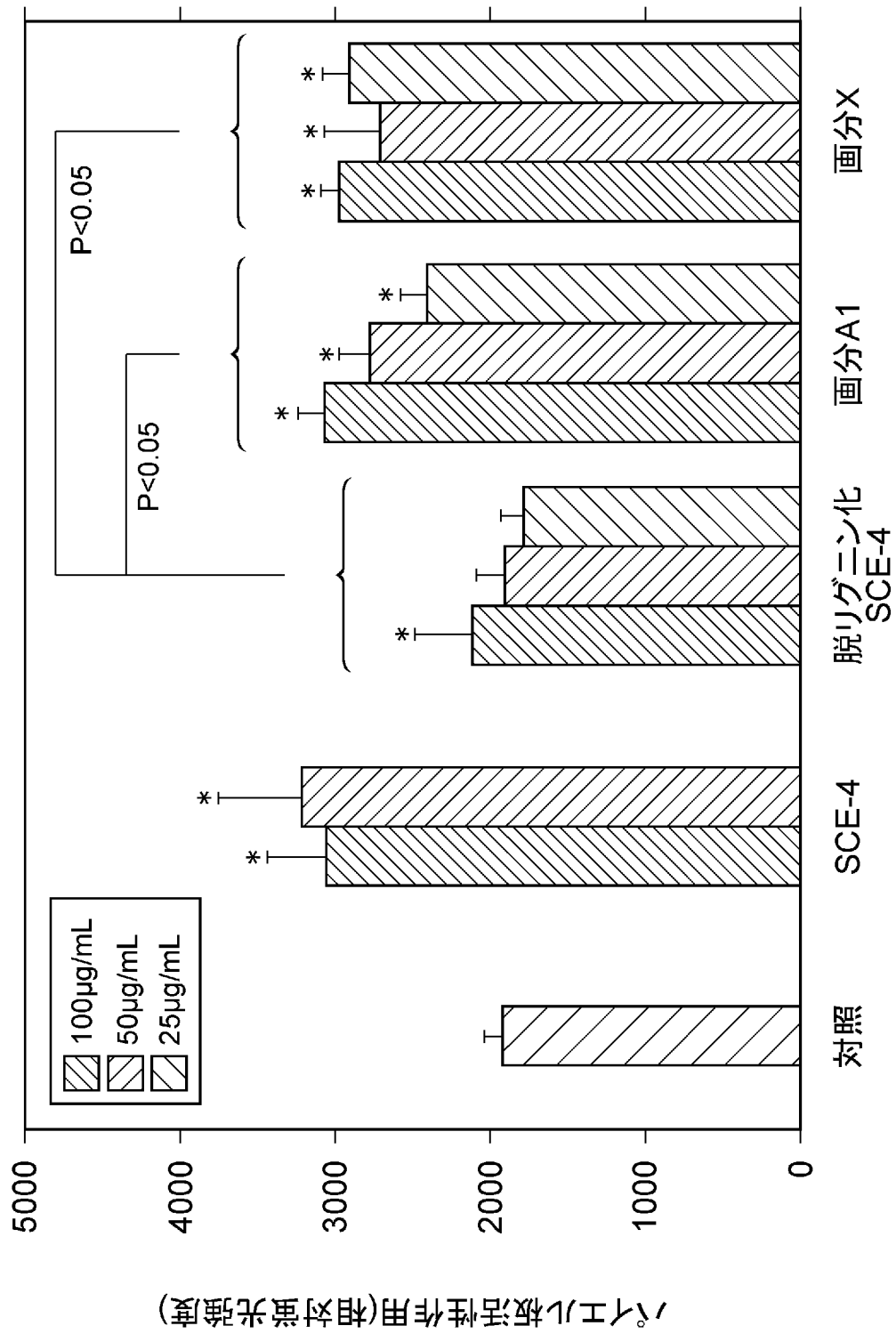


[図2]

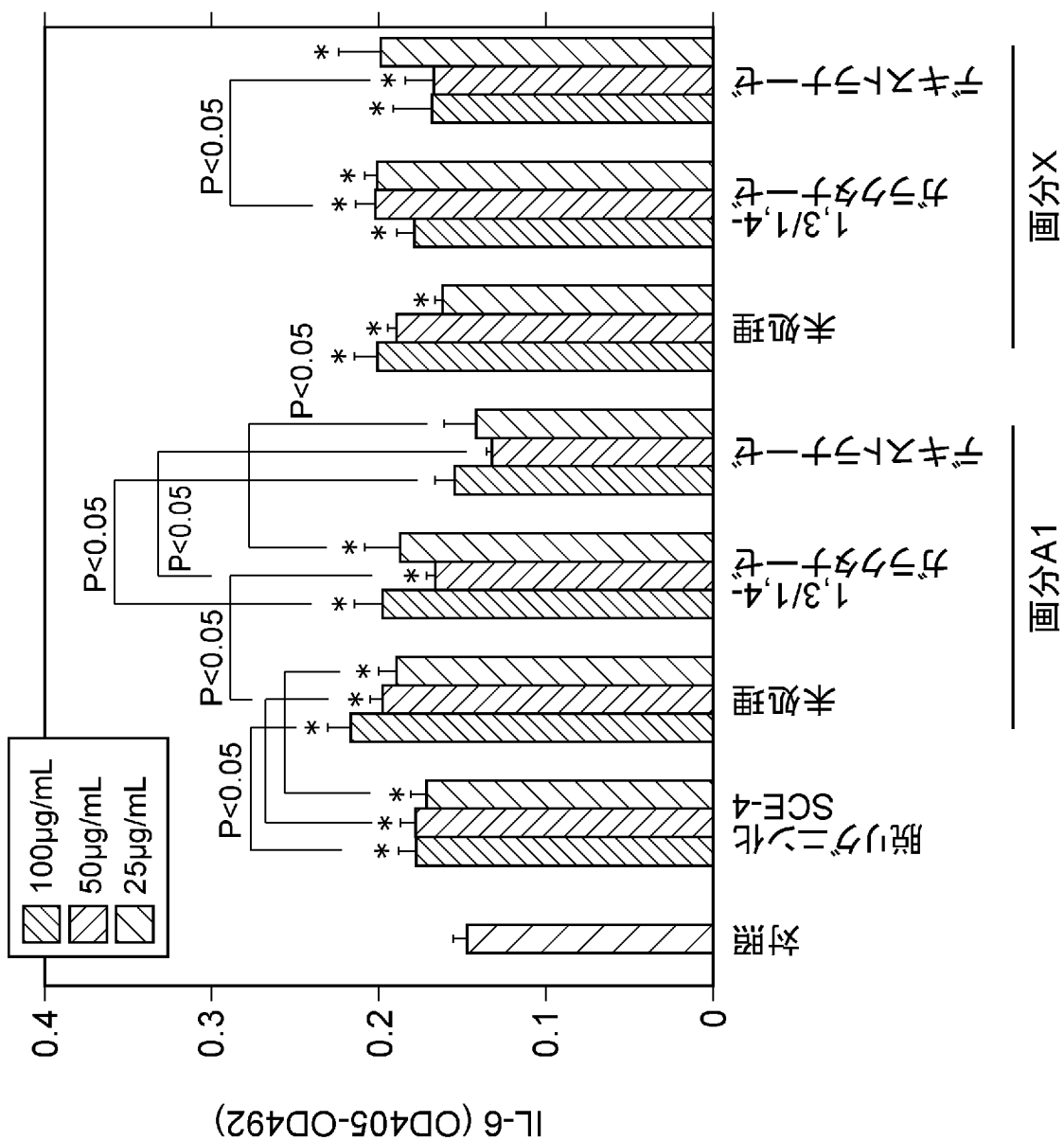




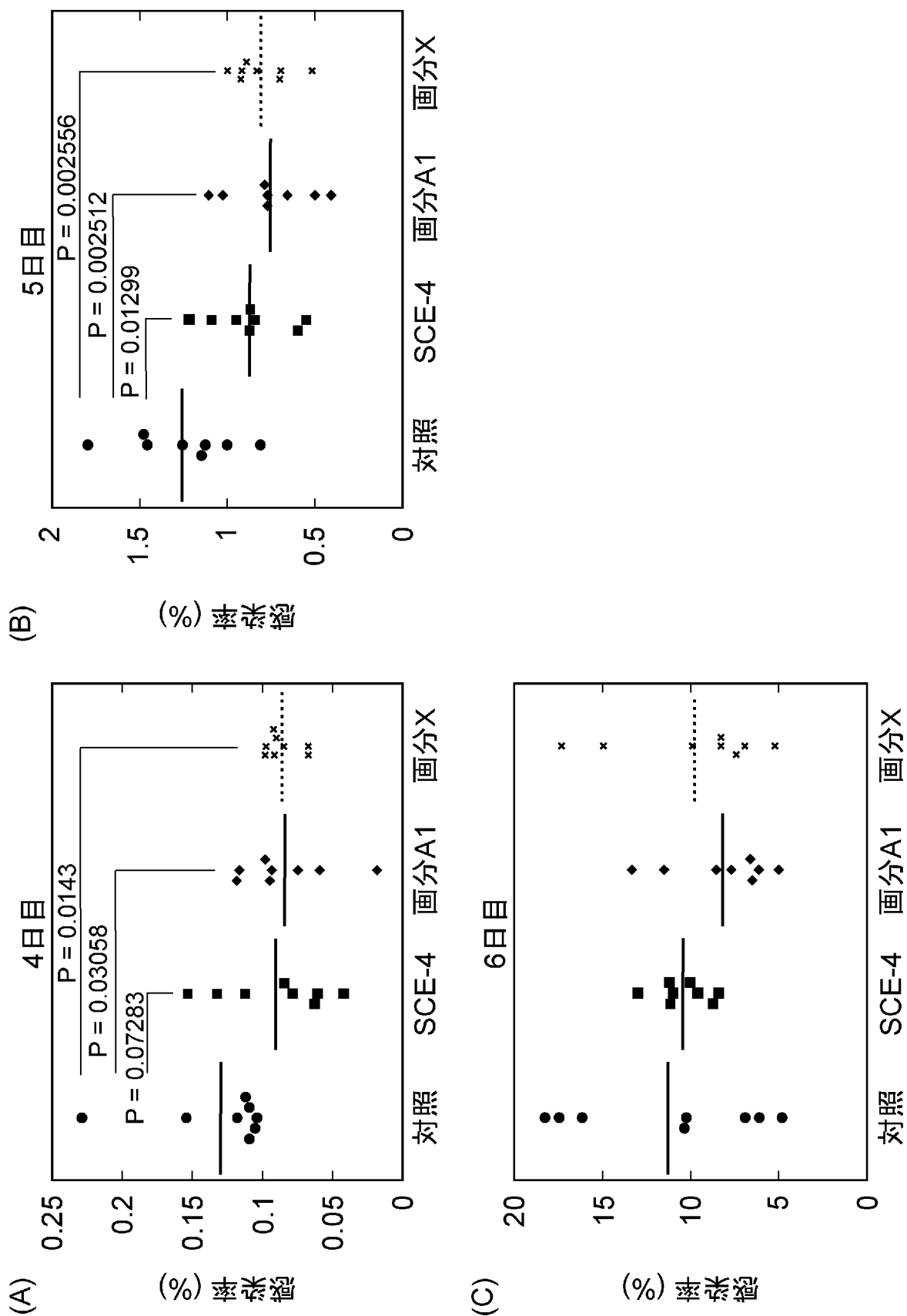
[図3]



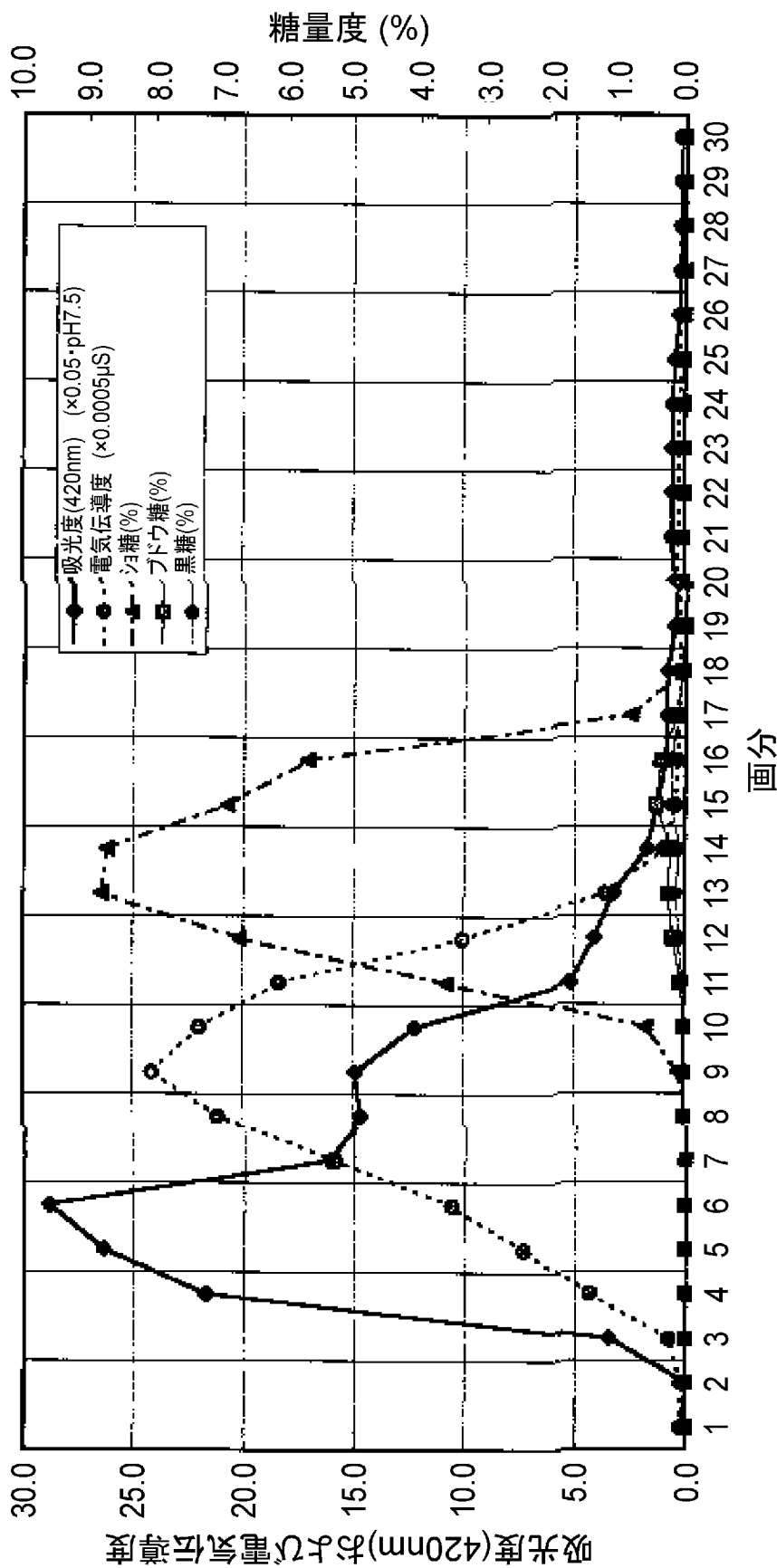
[図4]



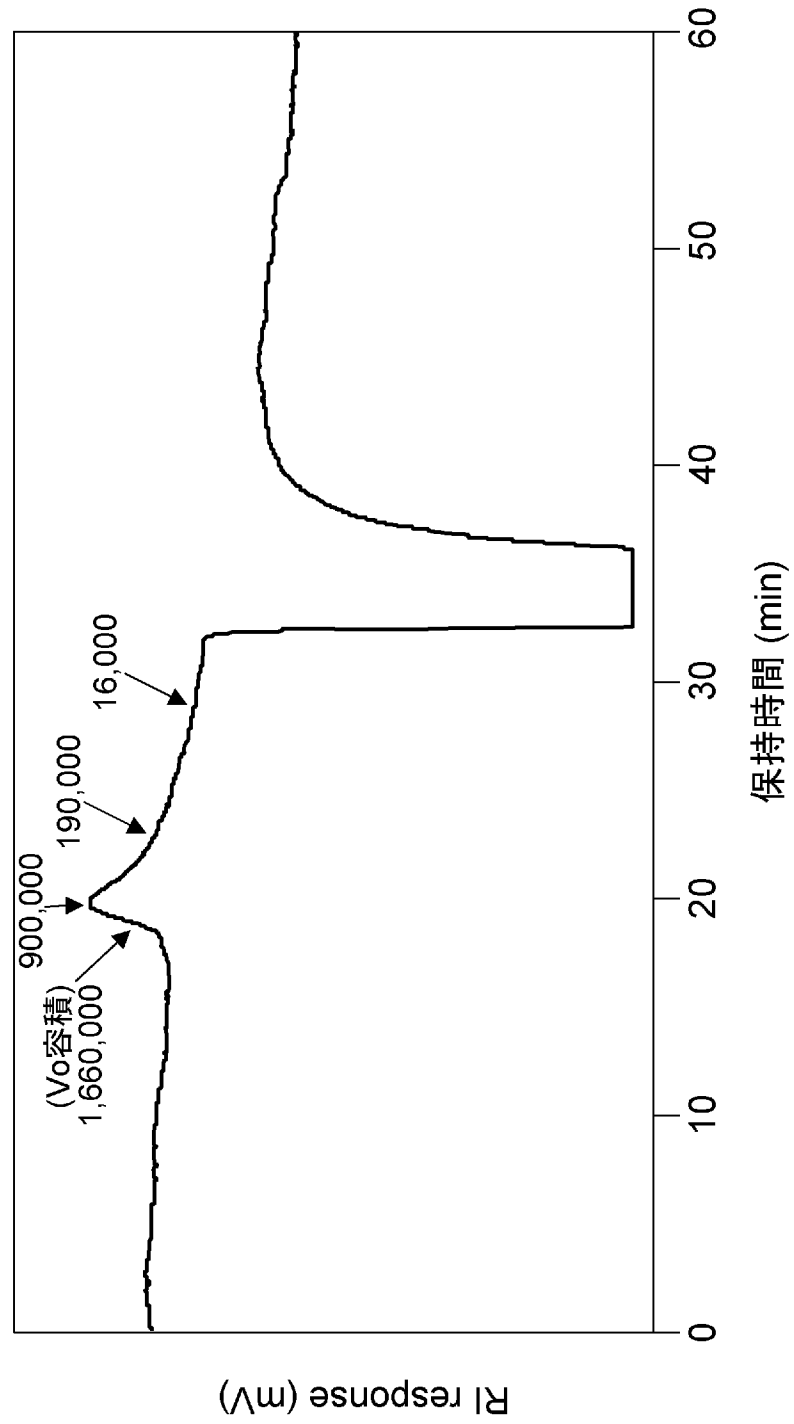
[図5]



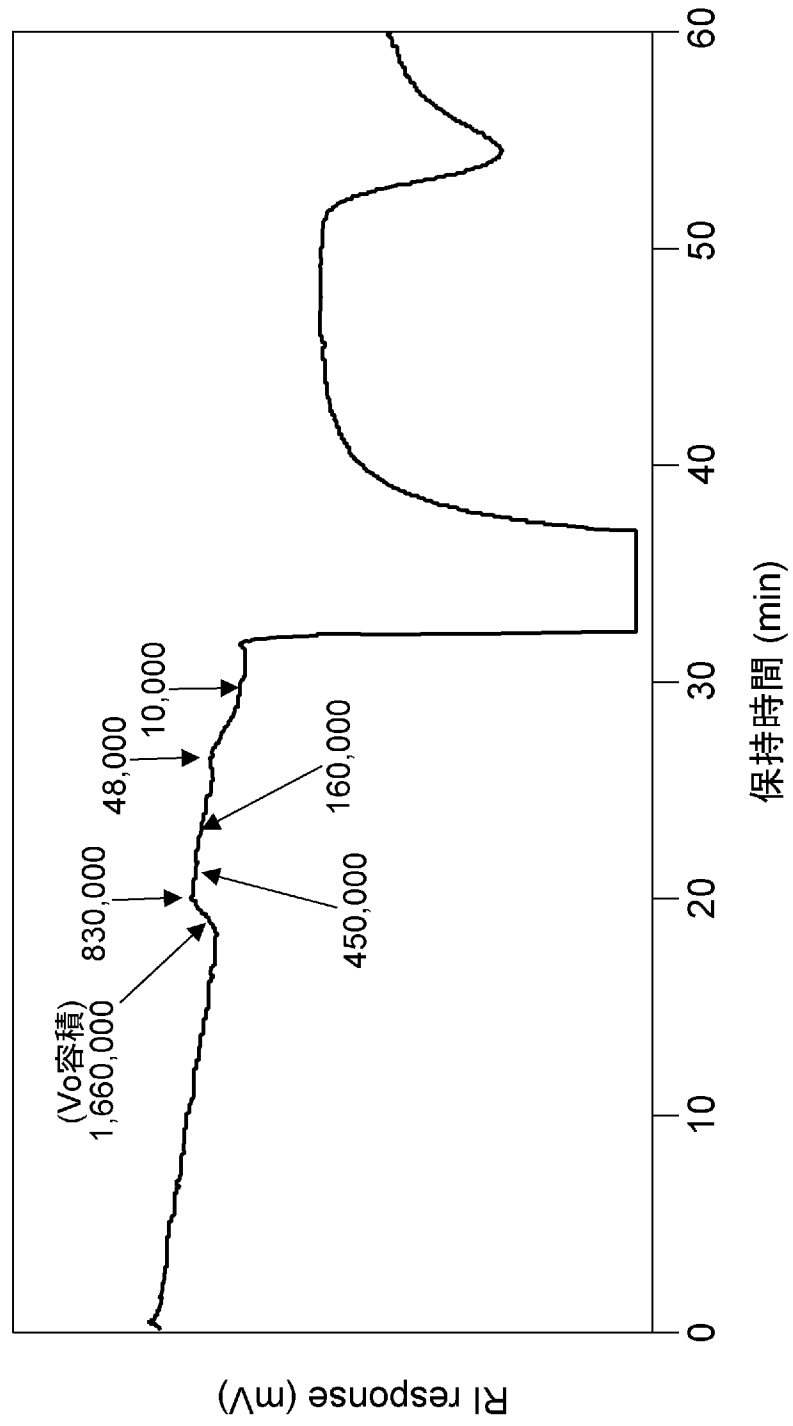
[図6]



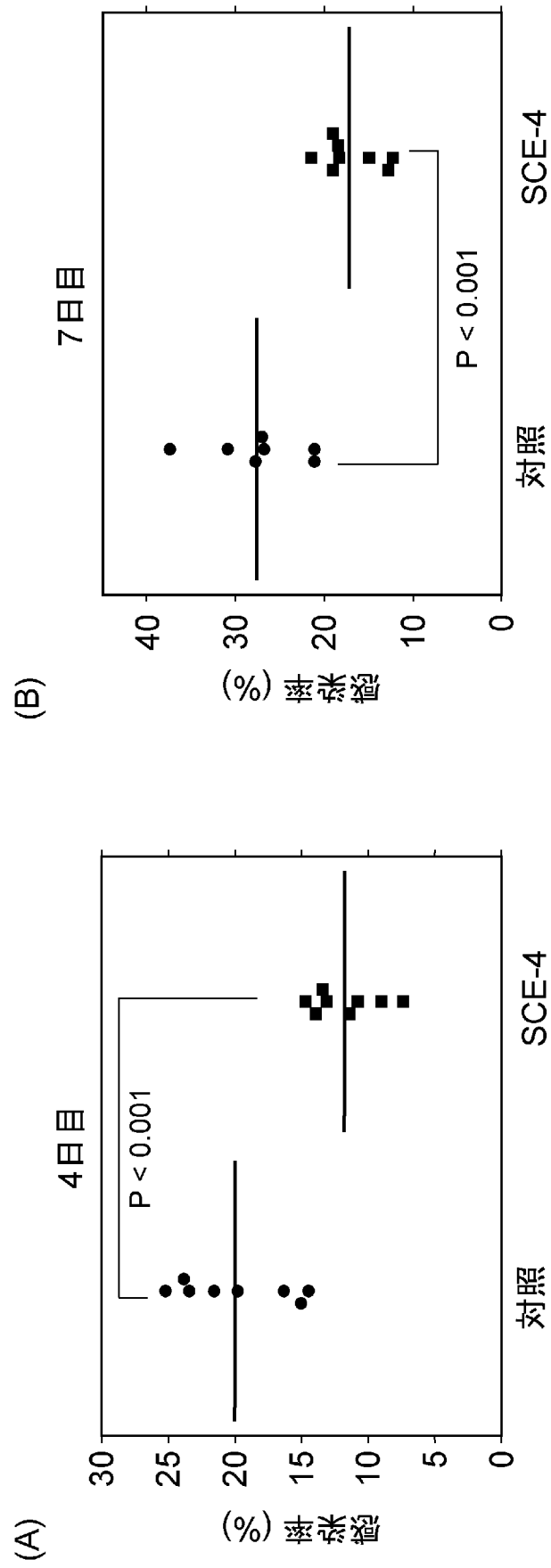
[図7]



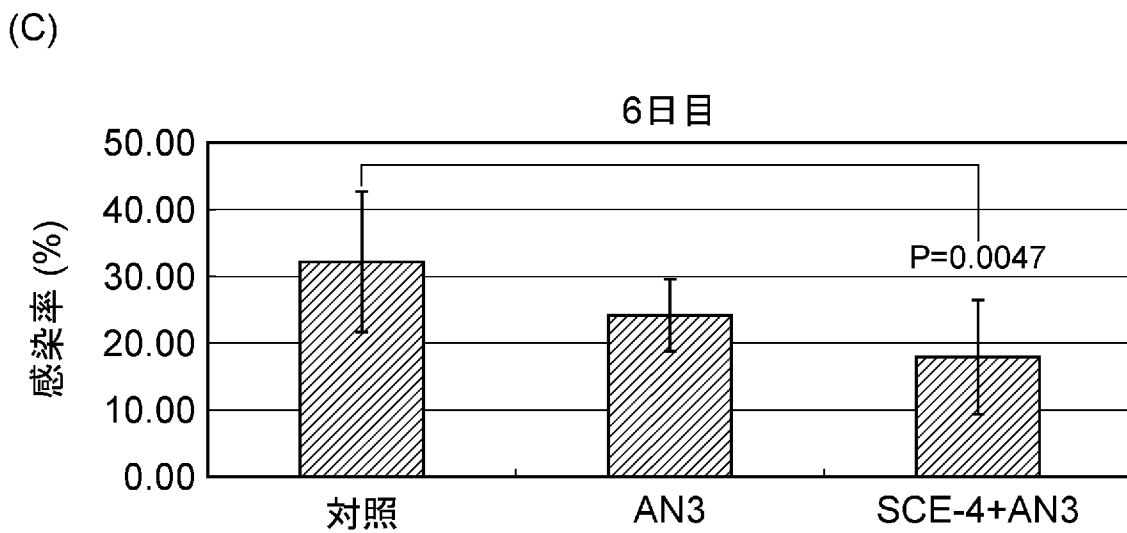
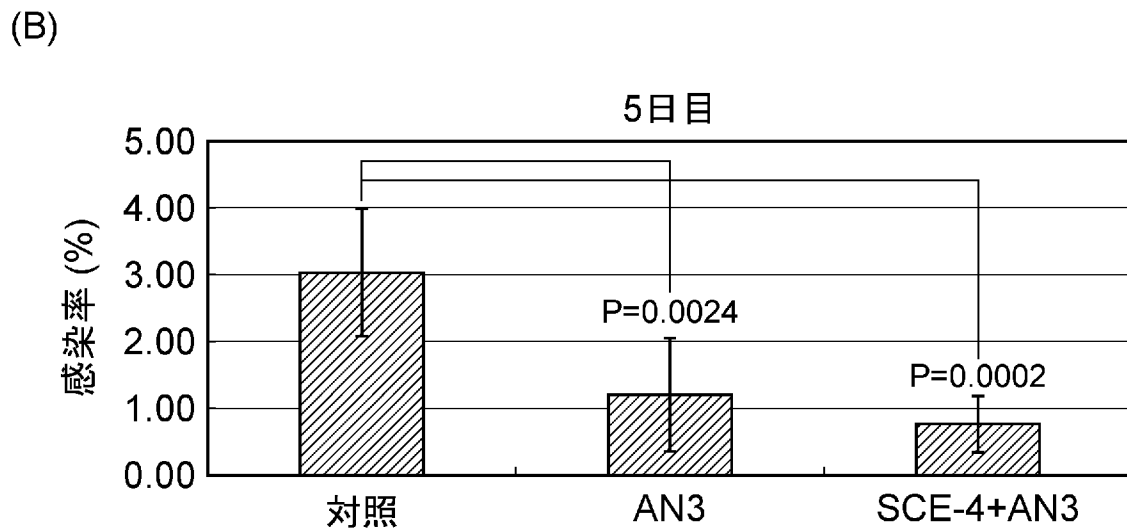
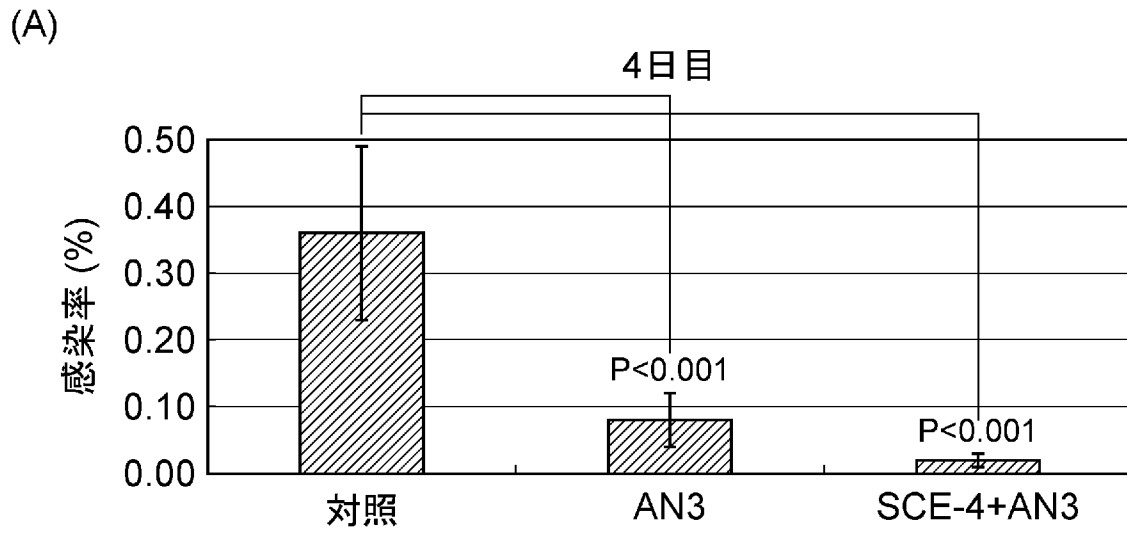
[図8]



[図9]



[図10]





**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2013/075152

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 A61K31/716(2006.01)i, A23K1/16(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, A61K36/899  
 (2006.01)i, A61P33/06(2006.01)i, A61P37/04(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i,  
 C08B30/04(2006.01)n  
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**  
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 A61K31/716, A23K1/16, A23L1/30, A61K36/899, A61P33/06, A61P37/04,  
 A61P43/00, C08B30/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
 Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2013  
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPLUS(JDREAMIII),  
 JMEDPLUS(JDREAMIII), JST7580(JDREAMIII)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2000-297046 A (Mitsui Sugar Co., Ltd.), 24 October 2000 (24.10.2000),	1-3, 6-8, 11-15
Y	entire text; particularly, claims; examples	16-18
A	& US 2003/0147978 A1 & US 2007/0128206 A1 & US 2007/0059389 A1 & EP 1120118 A1 & WO 2000/021546 A1	4, 5, 9, 10
X	Moshira EL-ABASY et al, Immunostimulating and Growth-Promoting Effects of Sugar Cane Extract	1-3, 6-8, 11-15
Y	(SCE) in Chickens, Journal of Veterinary	16-18
A	Medical Science, 2002, Vol.64, No.11, p.1061- 1063, entire text, particularly, abstract	4, 5, 9, 10

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 08 November, 2013 (08.11.13)	Date of mailing of the international search report 19 November, 2013 (19.11.13)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/075152

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Moshira EL-ABASY et al, Protective Effects of Sugar Cane Extracts (SCE) on Eimeria tenella	1-3, 6-8, 11-15
Y	Infection in Chickens, Journal of Veterinary Medical Science, 2003, Vol.65, No.8, p.865-871,	16-18
A	entire text, particularly, abstract	4, 5, 9, 10
Y	ASKLING H H et al, Management of imported malaria in Europe, Malar J, 2012.09.17, Vol.11, Article 328, entire text, particularly, abstract	16-18
A		1-15
A	Shuichi KAMINOGAWA et al., "Research on the evaluation of the effects of so-called health food - establishment of evaluation methods for the immunoregulatory and allergy prevention functions of food", Research on the evaluation of the effects of so-called health food Heisei 17 Nendo Sokatsu Buntan Kenkyu Hokokusho, 2006, pages 11 to 20, entire text	1-18
A	LI X et al, Activation of the classical complement pathway by a polysaccharide from sugar cane, Immunopharmacology, 1982, Vol.5, No.1, p.31-8(abstract) Medline [online] ; United States National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA. [retrieved on 05 Nov. 2013] Retrieved from: STN, Medline Accession No. 1983030185	1-18
A	Yoko NAKASONE, "Water soluble polysaccharides in cane juice obtained by the diffusion system", The Science Bulletin of the College of Agriculture, University of the Ryukyus, 1980, no.27, pages 175 to 181, entire text	1-18

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K31/716(2006.01)i, A23K1/16(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, A61K36/899(2006.01)i, A61P33/06(2006.01)i, A61P37/04(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C08B30/04(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K31/716, A23K1/16, A23L1/30, A61K36/899, A61P33/06, A61P37/04, A61P43/00, C08B30/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2013年
日本国実用新案登録公報	1996-2013年
日本国登録実用新案公報	1994-2013年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus(JDreamIII), JMEDPlus(JDreamIII), JST7580(JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2000-297046 A(三井製糖株式会社) 2000.10.24, 全文, 特に請求項, 実施例	1-3, 6-8, 11-15
Y	& US 2003/0147978 A1 & US 2007/0128206 A1 & US 2007/0059389 A1	16-18
A	& EP 1120118 A1 & WO 2000/021546 A1	4, 5, 9, 10
X	Moshira EL-ABASY et al, Immunostimulating and Growth-Promoting Effects of Sugar Cane Extract (SCE) in Chickens, Journal of	1-3, 6-8, 11-15
Y	Veterinary Medical Science, 2002, Vol.64, No.11, p.1061-1063	16-18
A	全文, 特に Absrtact	4, 5, 9, 10

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.11.2013

国際調査報告の発送日

19.11.2013

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
 郵便番号100-8915  
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小堀 麻子

4C

2938

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	Moshira EL-ABASY et al, Protective Effects of Sugar Cane Extracts (SCE) on Eimeria tenella Infection in Chickens, Journal of	1-3, 6-8, 11-15
Y	Veterinary Medical Science, 2003, Vol.65, No.8, p.865-871, 全	16-18
A	文, 特に Absrtact	4, 5, 9, 10
Y	ASKLING H H et al, Management of imported malaria in Europe, Malar	16-18
A	J, 2012.09.17, Vol.11, Article 328, 全文, 特に Absrtact	1-15
A	上野川修一他, いわゆる健康食品の有効性の評価に関する研究—食 品のもつ免疫調節機能, アレルギー予防機能の評価方法の確立— (Research on the evaluation of the effects of so-called health food - establishment of evaluation methods for the immunoregulatory and allergy prevention functions of food), い わゆる健康食品の有効性の評価に関する研究 平成17年度 総括・分 担研究報告書, 2006, p.11-20, 全文	1-18
A	LI X et al, Activation of the classical complement pathway by a polysaccharide from sugar cane, Immunopharmacology, 1982, Vol.5, No.1, p.31-8(abstract) Medline [online] ; United States National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA. [retrieved on 05 Nov. 2013] Retrieved from: STN, Medline Accession No. 1983030185	1-18
A	仲宗根洋子, 浸出法による甘しょ汁の水溶性多糖類, 琉球大学農学 部学術報告, 1980, No.27, p.175-181, 全文	1-18