

## 樹木多糖類の抗腫瘍活性及び抗補体活性

土 師 美恵子<sup>(1)</sup>

HASHI, Mieko: Antitumor Effects and Anti-complementary  
Effects of Tree Polysaccharides

**要 旨:** セルロース、ヘミセルロースなどの多糖類は、森林植物成分の大部分を占めているにもかかわらずセルロース以外はほとんど利用されていない。そこで、ヘミセルロースその他の多糖類に付加価値の高い利用法を見い出すことを目的として、樹葉多糖類及びヘミセルロース関連物質について、マウス皮下移植腫瘍増殖抑制効果並びに補体活性抑制効果を検討し、以下の結果を得た。

樹葉 36 種類の粗多糖類について、ICR マウスに皮下移植した Ehrlich carcinoma の増殖抑制効果を試験した結果、ダンコウバイ、ホソバタブ、ネズミモチ、スタジイ、アオモリトドマツ、ミカン、アセビ、アオトウヒ、ミヤマシキミ、シロモジ、シロダモ、フサアカシアの 12 樹種が 70% 以上の抑制効果を示した。この中でネズミモチ粗多糖は、Ehrlich carcinoma 及び、L<sub>1210</sub> leukemic cell の皮下移植腫瘍ように対して高い抗腫瘍活性を示した。すなわち、Ehrlich 腫瘍ように対しては 15 mg/kg の投与量で 90% 以上の腫瘍阻止率を示し、分画精製の結果、アラビノース、ガラクトースを主体とするマイナス旋光度、分子量 25 000 の中性多糖が最も高い活性を示すことが分かった。増殖速度の極めて早い L<sub>1210</sub> 腫瘍ように対しても、ネズミモチ粗多糖は、L<sub>1210</sub> を皮下移植した BDF<sub>1</sub> マウスの生存日数を 14% 延命することができた。この粗多糖体はマウスの細胞性免疫を増強し、細胞毒性も示さないことから、宿主介在性の抗腫瘍活性を持つことが確認された。

また、木材ヘミセルロースと木材分解性酵素の複合体 (HE-Complex) に著しい抗腫瘍活性のあることを明らかにした。

一方、樹葉 40 種類から抗補体活性多糖を検索した結果、5 種類が 20% 以上の補体抑制活性を示し、その中ではクスノキ樹葉に著しい活性が見られた。分画精製の結果、活性多糖はラムノースを含むアラビノガラクトタンで、その糖比率はラムノース：アラビノース：ガラクトース=1:1.9:3.2、分子量約 52 000 の中性多糖であった。この多糖の抗補体活性を、5×10<sup>8</sup>/ml 感作赤血球に対する 50% 溶血法で測定した結果、補体活性を 67.4% 抑制できた。

さらに、この多糖体は抗原抗体反応の補体側にのみ作用して、抗体側には全く損傷を与えないことも確認できた。

### 目 次

1 緒 言 .....	122
2 材料と方法 .....	124
2.1 多糖類の分離 .....	124
2.1.1 樹葉多糖類の分離調製 .....	124
2.1.2 木材ヘミセルロース・酵素複合体の調製 .....	124
2.2 多糖類の化学的性質の測定 .....	124
2.3 腫瘍細胞と抗腫瘍活性試験方法 .....	125
2.3.1 Ehrlich carcinoma .....	125

2.3.2	L <sub>1210</sub> leukemic cell .....	125
2.3.3	試料の投与及び腫瘍細胞の移植方法 .....	125
2.3.4	細胞毒性試験 .....	126
2.3.5	<sup>3</sup> H-チミジンのひ臓細胞への取り込み試験 .....	126
2.4	抗補体活性試験方法 .....	126
2.4.1	寒冷飽和補体血清の調製 .....	126
2.4.2	感作赤血球の調製 .....	126
2.4.3	補体活性抑制率（抗補体活性）の測定 .....	126
3	結果と考察 .....	127
3.1	樹葉多糖類の抗腫瘍活性及び化学的性質 .....	127
3.2	ネズミモチ樹葉多糖の抗腫瘍活性 .....	127
3.3	ヘミセルロース酵素複合体（HE-Complex）の抗腫瘍活性とその化学的性質 .....	132
3.4	樹葉多糖類の抗補体活性 .....	138
3.5	クスノキ樹葉多糖の抗補体活性 .....	138
4	ま と め .....	143
	謝 辞 .....	144
	引用文献 .....	144
	Summary .....	148

## 1 緒 言

森林資源が化石資源の代替として注目され、その総合的利用システムも、多くの研究者の努力によって着実に確立されつつあるが、ここで常に問題になるのが利用技術にかかわるコストである。従って、森林植物の主要成分はともかく、未利用部分の利用を可能にするには、特に付加価値の高い物質の発見、ないしはそれへの変換によって総合的にコスト面の埋め合わせが必要となり、必然的に医薬品等への利用開発が期待されることになる。

樹木主成分の一つであるヘミセルロース類でも、その化学構造が多様であることから、その化学的性質の研究に比べて生化学的挙動についての研究は少なく、これらを積極的に利用する試みもあまり見当たらない。まして、樹葉の化学的性質は千差万別であり、その成分である多糖類を利用しようとする試みはこれまでのところ見られない。

一般に、生物活性物質として脚光を浴びる物質は核酸、タンパク質等に多く、植物細胞の主成分である糖質類が注目されることは少なかった。しかし、近年多糖類、少糖類の生物活性に関する研究の進展は目覚ましく、抗腫瘍活性多糖類、生体構成物質としての複合多糖類の機能特性、そして、オリゴサッカリンのようなファイトアレキシンのエリシターとしての機能等、目を見張るものがある（ALBERSHEIM, 1985）。

一方、森林植物に含まれる精油成分等の生物活性物質は民間伝承薬として経験的に昔から広く利用さ

れており、その様々な薬効が知られている。これらは大部分が煎じ薬、すなわち、熱水抽出成分混合物として用いられている。従って、この中には多糖類も多く含まれ、単独またはほかの物質との相乗作用によってその薬理効果を発揮しているものと思われる。これらの観点から筆者は、森林植物中に量的には多く含まれながら、その生化学的利用面では人々の関心の少ない多糖類の生物活性研究をかねてから進めていたが (HASHI, 1973, 1975, 1978a, b), 今回は未利用資源を対象として、それらの中に含まれる多糖類の抗腫瘍活性及び抗補体活性についてスクリーニングした。

多糖類の抗腫瘍活性研究については 19 世紀末に Coly, W.B. が細菌成分を患者に投与して、腫瘍の増殖を抑制したのに始まり、1960 年代には多くの研究結果が活発に発表され、酵母、ササ、地衣類、担子菌類その他の多糖類の抗腫瘍活性が明らかにされている。特に担子菌類の抗腫瘍活性 (千原, 1969, 1976) については多くの報告が見られる。そして、これら多糖類の抗腫瘍効果は、腫瘍細胞を直接攻撃する化学療法と異なり、多糖類を投与した宿主 (実験マウス等) の免疫増強作用による宿主介在性の抗腫瘍効果であることが中原ら (NAKAHARA, 1964) によって明らかにされた。従って、多糖類を用いる治療法は免疫療法と呼ばれている。この免疫療法は免疫学の進歩とともに免疫担当細胞間の情報伝達の仕組みなどが解明されるようになって (浜岡, 1979, 生田, 1986) さらに進展し、次第に人々の関心を集めて今日では一般にも広く知られるようになった。そして、現在なお新しい抗腫瘍活性多糖類の研究報告及びその抗腫瘍活性発現にかかわる糖類の化学構造が注目を集めている。

がん治療法としては外科手術、放射線療法及び化学抗がん剤が治療手段の主流であるが、これらの治療手段は今日それぞれに格段の進歩が見られるにもかかわらず早期発見の外科手術を除いて、なおその完全治癒への道は程遠いのが現状である。その最大の理由は、放射線、化学抗腫瘍剤のいずれもが正常細胞に対する毒性を否定出来ないからである。すなわち、前者はいうに及ばず、代謝拮抗剤以外の化学抗腫瘍剤は、そのほとんどが DNA 合成阻害剤などであり (実吉, 1980 a, 1980 b), 腫瘍細胞の増殖阻止と同時に、常に外敵の侵入を監視している正常リンパ球の生育をも阻止して免疫監視体制の崩壊を招くのである。

これに対して多糖類による抗腫瘍活性は、腫瘍細胞に対する直接の細胞毒性はなく、多糖類の投与により、向上する宿主の免疫ネットワーク活動によって腫瘍細胞を消滅させるもので、宿主自身の免疫力の増強効果に由来する療法である。従って、その仕組みから化学薬物による制がん作用のような速効性は期待できないが、細胞毒性がないことから長期投与が可能となり、手術後の患者等に臨床的に用いられている (橋本, 1980)。

次に、多糖類の免疫系に関与する生物活性研究の一つとして、最近、山田は漢方薬中の多糖類に抗補体活性を見出ししている (山田, 1986 a)。ここで、補体とは新鮮な動物の正常血清中であって、抗体を助けて細胞抗原を溶解させる作用を持つ物質である (松橋, 1981 a)。これは抗原抗体複合物、補体活性化酵素等により活性化されて一連の連鎖反応を起こす九つの成分とその関連物質から成る酵素系であり (Fig. 1), 活性化された各成分は様々な生物学的活性を持ち、生体に病理学的な変化を与える。このように、補体は元来生体を守るための物質であるが、自己の細胞や組織に対する抗体ができた場合は、補体の存在下にこれらの組織、細胞を自ら傷害し、自己抗体による溶血性貧血や血漿板減少など生

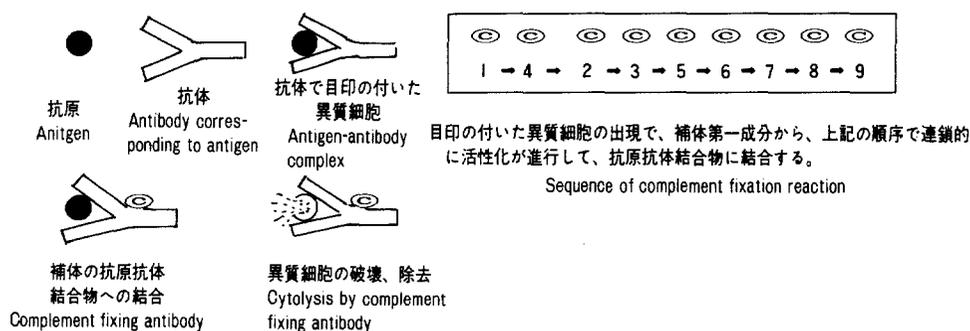


Fig. 1. 補体の活性化システムと抗原除去にかかわる補体の働き  
The role of complementary system in host defence.

体にとって好ましくない自己免疫疾患状態を作る場合がある (矢田, 1981)。最近では臓器移植に伴い必然的にこのような現象が生じている。このような場合にも補体活性を調節できる抗補体活性物質の利用が期待されると思われる。

抗補体活性物質に関する従来の研究では、生薬の一種である「大和当帰, *Angelica acutiloba* KITAGAWA」の熱水抽出多糖分画の抗補体活性についての Yamada らの詳細な報告がある (YAMADA, 1984 a, b, 1985 a, b, 1986 b, 1987; 山田, 1984 c, 1986 a, c, d)。

そこで、この研究では、未利用林産物として広葉樹、針葉樹の樹葉類と、木材ヘミセルロース関連物質を対象にして行った抗腫瘍活性と抗補体活性についてスクリーニングした結果を報告する。

## 2 材料と方法

### 2.1 多糖類の分離

#### 2.1.1 樹葉多糖の分離調製

広葉樹 35 種類、針葉樹 5 種類の生葉 1 kg 前後から、熱水蒸留により精油成分を留去したあと、熱水抽出液をろ過、濃縮して 4 倍量のエタノールを加えた。生じた沈殿を遠心分離により集めて、80% エタノールで 2 回洗浄したものを純水で透析し、凍結乾燥して粗樹葉多糖とした (Fig. 2)。

#### 2.1.2 木材ヘミセルロース・酵素複合体の調製

カラマツ、トウヒ、ヒノキ、ツガ、ブナ、の各木粉より常法に従ってホロセルロースを調製後、β-グルコシダーゼを除いたオオウズラタケ菌体外粗酵素 (石原, 1983) とともに 0.1 M (pH 4.0) 酢酸緩衝液中 (ホロセルロース: 酵素: 緩衝液 = 10 g : 100mg : 250 ml) 40°C, 24 時間作用させた。反応終了後、未分解のホロセルロースをろ別し、ろ液は分解産物である少糖類を限外ろ過 (MW=5000) によって繰り返し除去した後、濃縮してさらに透析、凍結乾燥することにより基質ヘミセルロースと酵素の結合した物質 (以下 HE-Complex) を得た。

### 2.2 多糖類の化学的性質の測定

糖組成は、常法に従い多糖体を 2 M トリフルオロ酢酸で 120°C, 1 時間加水分解し、酸を除いた後、

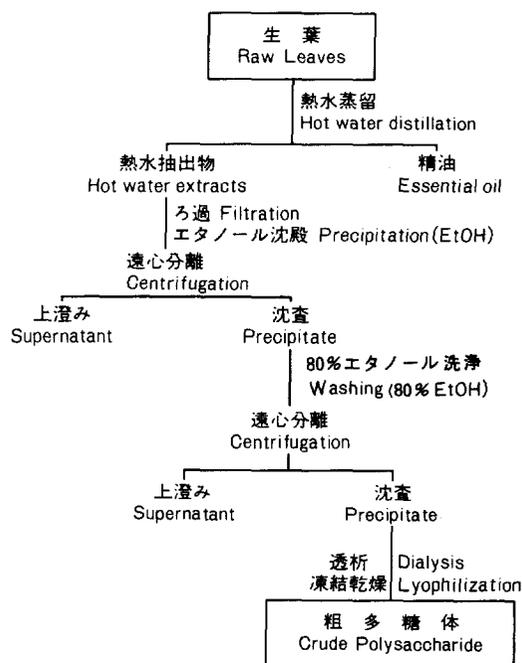


Fig. 2. 樹葉より粗多糖体の分離

Fractional extraction of polysaccharide from various leaves.

液体クロマトグラフ（島津 LC 3 A カラム：Shimpack ISA-07, 溶出液：アルギニン-ホウ酸緩衝液）で測定した。ウロン酸は、カルバゾール硫酸法で定量した。比旋光度は水溶液中、1% 濃度で日本分光 DIP-140 で測定した。分子量は、液体クロマトグラフ（東洋ソーダ CP8000, カラム：SW 3000）で分子量マーカーとして Pullulan (12 000; 23 700; 48 000; 100 000) 標品を用いて測定した。

### 2.3 腫瘍細胞と抗腫瘍活性試験方法

#### 2.3.1 Ehrlich carcinoma (Ehrlich)

国立がんセンター研究所より分与された細胞を ICR マウス（日本エスエルシーより購入）腹こう内で既報のように（HASHI, 1978 a）継代培養した腹水型細胞を使用した。

#### 2.3.2 L<sub>1210</sub> leukemic cell (L<sub>1210</sub>)

国立がんセンター研究所より分与された細胞を BDF<sub>1</sub> マウス（日本エスエルシー）で同様に継代培養した腹水型細胞を使用した。

#### 2.3.3 試料の投与及び腫瘍細胞の移植方法

1 群 5~6 匹のマウス（7~8 週齢）を用いて、生理食塩水に溶解した各多糖をミリポアろ過滅菌し、腫瘍移植の前後に 0.4~3 mg/mouse を腹こう内投与（ip）, または、皮下投与（sc）した。

腫瘍細胞は、 $1 \times 10^4 \sim 10^5$  cells/mouse をマウスの背中に sc 移植し、無処置対照群と生存率、または、3 週間後の腫瘍重量の比較から腫瘍阻止率、または、増殖率を下記のようにして算出した。

$$\text{腫よう阻止率 (\%)} = [(A - B)/A] \times 100$$

$$\text{腫よう増殖率 (\%)} = [(B - A)/A] \times 100$$

A = 対照群の平均腫よう重量

B = 試験群の平均腫よう重量

### 2.3.4 細胞毒性試験

担がんマウス腹水中の各種よう細胞 ( $2 \times 10^6$  cells) を、10% の牛胎児血清を含む RPMI-1640 完全組織培養液中で多糖類 2.5 mg または 10 mg とともに 5% 炭酸ガス培養器で 37°C, 24 時間培養後、多糖を含まない対照と生存腫よう細胞数をトリパンブルー染色によって計数比較試験した。

### 2.3.5 [ $^3\text{H}$ ] チミジン ( $^3\text{H}$ -TdR) のひ臓細胞への取り込み試験

試料多糖で前処置 (3 回) したマウス群及び無処置マウス群を抗原細胞 (コバルト 60 を 2000 rad 照射した腫よう死細胞) で免疫し、11 日後、各マウスよりひ臓を摘出した。ひ臓細胞は常法により (松橋, 1981 b) 採取後生存ひ臓細胞数を  $5 \times 10^6$  cell/ml に調整した。マイクロプレート (24 穴) に完全培養液 (5% 牛胎児血清, ペニシリン 100 U, ストレプトマイシン 100 mg/ml を含む RPMI-1640) を満たし、この中で同じ細胞数の抗原細胞 (標的細胞) と 72 時間炭酸ガス培養器内で培養した。培養を終了する 8 時間前に、 $^3\text{H}$ -TdR (0.25  $\mu\text{Ci}/5 \mu\text{l}$ ) を加えた。培養終了後、細胞をセルハーベスターによって洗浄ろ過し、この細胞中に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定し、多糖試料処置マウスと無処置マウスの放射活性を比較した。

## 2.4 抗補体活性試験方法

### 2.4.1 寒冷飽和補体血清の調製

モルモット (Hartley 種, 生後 6 週齢, 400 g, 日本エスエルシー) から全採血によって新鮮血清 (以下補体血清という) を採取して、抗原赤血球 (日本生物材料センターより購入した綿羊保存血) で補体血清が普通持っている異種抗体を取り除いた。すなわち、氷冷した補体血清に、同じく氷冷した補体血清の 1/5 容の抗原赤血球沈査を加え、30 分後遠心して上澄みを分離する。このとき赤血球は 500  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MgCl}_2$  と 150  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CaCl}_2$  を含むゼラチンペロナル緩衝液—生理食塩水 (pH 7.2) (以下 GVB $^{++}$ ) (松橋, 1981 b) で 3 回洗浄したものをを用いた。寒冷飽和した補体血清は 1~2 ml ずつマイクロチューブに入れて、マイナス 80°C に凍結保存し、使用時に融解して用いた。

### 2.4.2 感作赤血球の調製

抗羊赤血球抗体 (溶血素) はカッセル社製のものを用い、この最適感作量を常法によって求めた。次に、羊赤血球を GVB $^{++}$  で 3 回洗浄して、GVB $^{++}$  中  $1 \times 10^9$  cells/ml の赤血球浮遊液を調製し、最適感作濃度の溶血素 GVB $^{++}$  を等量加えて時々かくはんしながら室温に 30 分放置し、感作赤血球液 ( $5 \times 10^8$ /ml) を調製した。

### 2.4.3 補体活性抑制率 (抗補体活性) の測定

0.01 M リン酸緩衝液—生理食塩水 (pH 7.4) (以下 PBS) に試料の多糖体を 1 mg/ml に溶解したもの 100  $\mu\text{l}$ , 補体血清 100  $\mu\text{l}$  及び GVB $^{++}$  100  $\mu\text{l}$  とを混合して 37°C で 30 分間反応させた。この反応液を 0°C に冷却して、その残存溶血活性 (TCH $_{50}$ ) を上記感作赤血球を用いて常法に従って (松橋,

1981) 測定した。多糖体溶液の代わりに PBS 100  $\mu$ l と反応させた場合の TCH<sub>50</sub> を対照とし, TCH<sub>50</sub> (%) の阻止率として下記の方法で抗補体活性を算出した。

$$\frac{\text{TCH}_{50}(\text{Control}) - \text{TCH}_{50}(\text{Sample})}{\text{TCH}_{50}(\text{Control})} \times 100$$

### 3 結果と考察

#### 3.1 樹葉多糖類の抗腫瘍活性及び化学的性質

樹葉多糖 36 種の収率, 糖組成, ウロン酸含量, 比旋光度と Ehrlich 腫瘍細胞に対する阻止率ないしは増殖率を Table 1 に示した。生葉重量に対する粗多糖の収率は 0.14~0.87% で, 平均 0.5% であった。各多糖は, 全般にアラビノース, ガラクトースを多く含んでいるが, そのほかの糖の組成は樹種によって異なっていた。

マウスに皮下移植した Ehrlich 腫瘍細胞に対して, 70% 以上の阻止効果を示した樹種は, ダンコウバイ, ホソバタブ, ネズミモチ, スダジイ, アオモリトドマツ, ミカン, アセビ, アオトウヒ, ミヤマシキミ, フサアカシア, シロダモ, シロモジの 12 種類であった。一方, 逆に無処置対照群よりも移植腫瘍が増大した樹種もあり, 30% 以上の増大が見られたものは 7 種類に及んだ。

抗腫瘍活性は, クスノキ科とミカン科の樹種に多い傾向があった。

これまでに担子菌類《シイタケ (CHIHARA, 1969, 1970 a, b; MAEDA, 1971, 1973 a, b; ARAI, 1971; TOKUZEN, 1976; SASAKI, 1976 a, b; SUGA, 1985), キクラゲ (SONE, 1978; MISAKI, 1981), コフキサノコシカケ (水野, 1984), キヌガサタケ (HARA, 1983), ペスタロタン (MISAKI, 1984), マンネンタケ (水野, 1984; SONE, 1985), マイタケ (MIZUNO, 1986), フクロタケ (MISAKI, 1986), スエヒロタケ (KOMATSU, 1969), ヒラタケ (YOSHIOKA, 1972, 1975)》などに見出されている大部分の抗腫瘍活性多糖類は  $\beta$ -1,3 グルカンである。これに対して, 樹葉多糖類の中で 50% 以上グルコースを含有するものはわずか 3 種類で, ほかにアラビノースとガラクトースを主成分としていたが, 樹葉多糖類ではグルカン含有量の多いものが抗腫瘍活性も高いという傾向は認められなかった。比旋光度と抗腫瘍活性の関係を Fig. 3 に示した。例外はあるものの, ゼロまたはマイナス旋光度に近い多糖に抗腫瘍活性の高いものが多かった。

これらの中で, 抗腫瘍活性多糖として従来から報告されているグルカンでなく, アラビノース, ガラクトースを主成分とするにもかかわらず, 高い抗腫瘍活性を示し, かつ収率もよいネズミモチの葉の多糖について分画精製して, その抗腫瘍活性本体を追究した。

#### 3.2 ネズミモチ樹葉多糖の抗腫瘍活性

粗ネズミモチ樹葉多糖を Ehrlich 腫瘍移植前に 3 回, 移植後に 4 回マウスに投与し, 3 週間後の腫瘍阻止率を比較した結果, Table 2 のように 15 mg/kg の投与量でも非常に高い活性を示したが, 多糖の投与量と活性の間には相関が認められなかった。一般に, 免疫増強効果による抗腫瘍活性には最適投与量が存在し, 濃度依存性でないことが知られているので, この抗腫瘍効果は細胞毒性によるものではなく, 免疫増強効果によることが示唆された。

Table 1. 樹葉多糖類の糖組成及び抗腫瘍活性  
Antitumor activity and sugar composition of polysaccharides from various leaves

樹種 Species	学名 Scientific name	収率*1 Yield (%)	糖組成		
			Rha.	Rib.	Man.
ダンコウバイ	: <i>Lindera obtusiloba</i>	0.24	2.51	1.58	2.24
ホソバタブ	: <i>Machilus japonica</i>	0.46	5.15	—	5.27
ネズミモチ	: <i>Ligustrum japonicum</i>	0.82	5.88	—	—
スダジイ	: <i>Castanopsis sieboldii</i>	0.17	16.23	—	1.86
アオモリトドマツ	: <i>Abies mariesii</i>	0.74	7.47	—	11.89
ミカン	: <i>Citrus unshiu</i>	0.48	17.50	—	5.23
アセビ	: <i>Pieris japonica</i>	0.30	5.49	—	3.53
アオトウヒ	: <i>Picea pungens</i>	0.87	2.54	—	20.45
ミヤマシキミ	: <i>Skimmia japonica</i>	0.40	7.69	—	5.21
フサアカシア	: <i>Acacia dealbata</i>	0.72	16.22	—	3.13
シロダモ	: <i>Neolitsea sericea</i>	0.35	6.29	—	12.41
シロモジ	: <i>Lindera triloba</i>	0.28	7.90	0.84	8.37
ノリウツギ	: <i>Hydrangea paniculata</i>	0.37	19.45	—	—
タブノキ	: <i>Machilus thunbergii</i>	0.14	0.40	—	0.73
クワ	: <i>Morus bombycis</i>	0.57	10.34	—	6.80
エゾユズリハ	: <i>Daphniphyllum macropodum</i> var. <i>humile</i>	0.57	5.13	—	2.04
カクレミノ	: <i>Dendropanax trifidus</i>	0.53	2.97	—	—
トベラ	: <i>Pittosporum tobira</i>	0.75	12.05	—	2.64
コアマチャ	: <i>Hydrangea serrata f. thunbergii</i>	0.26	5.13	—	2.04
トウヒ	: <i>Picea jezoensis var. hondoensis</i>	0.50	4.06	—	13.46
シラカシ	: <i>Quercus myrsinaefolia</i>	0.53	12.48	—	9.64
ヤマモモ	: <i>Myrica rubra</i>	0.36	10.56	—	3.31
クスノキ	: <i>Cinnamomum camphora</i>	0.54	4.64	—	7.51
クロマツ	: <i>Pinus thunbergii</i>	0.48	6.40	—	16.93
クヌギ	: <i>Quercus acutissima</i>	0.45	9.77	—	9.43
トチノキ	: <i>Aesculus turbinata</i>	0.87	8.39	—	6.54
コナラ	: <i>Quercus serrata</i>	0.67	19.93	—	11.56
ミズナラ	: <i>Quercus crispula</i>	0.38	17.64	—	3.48
ヤブニッケイ	: <i>Cinnamomum japonicum</i>	0.27	3.40	—	5.20
コブシ	: <i>Magnolia pracocissima (M. kobus)</i>	0.34	8.37	—	7.87
マユミ	: <i>Euonymus sieboldianus</i>	0.59	3.96	—	1.63
アジサイ	: <i>Hydrangea macrophylla</i>	0.60	8.98	—	—
シキミ	: <i>Illicium anisatum (I. religiosum)</i>	0.43	7.59	—	5.19
ツバキ	: <i>Camellia japonica</i>	0.74	20.99	—	0.63
クサギ	: <i>Clerodendron trichotomum</i>	0.23	12.66	—	19.31
ウラジロモミ	: <i>Abies homolepis</i>	0.40	3.93	—	7.67

\*1 Yield for raw leaves.

\*2 Inhibition ratio for Ehrlich carcinoma.  
Minus inhibition ratio = breeding ratio

糖組成 Sugar composition (%)				ウロン酸 Uronic acid (%)	比旋光度 Specific rotation [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	抗腫瘍活性*2 阻止率 Inhibition ratio (%)
Ara.	Gal.	Xyl.	Glc.			
41.31	9.95	35.80	6.60		2.51	98.0
17.32	24.29	11.63	36.10	58.6	-0.31	97.8
47.45	32.90	—	13.72	56.7	95.80	97.4
21.23	22.85	6.38	31.44			96.4
25.76	20.55	4.89	29.22	41.9	7.7	95.0
21.09	44.18	1.83	10.16	25.4	-21.0	92.3
16.05	43.98	7.91	23.04	58.3	-0.3	85.0
13.90	7.99	1.69	53.57	38.5	108.8	83.2
41.95	35.62	1.61	7.91	57.0	7.69	81.6
27.96	30.25	14.50	7.93	23.9	-0.31	79.5
21.92	21.07	10.56	27.73		10.59	71.6
36.87	19.47	8.21	18.34	41.2	7.90	71.6
26.90	43.71	1.82	8.12	46.9	0.1	66.4
52.99	3.04	23.15	19.68	48.8	0.03	64.0
26.72	24.42	3.40	28.04	57.4	10.34	60.4
48.02	21.87	1.43	21.49	70.6	3.8	58.3
27.09	69.85	—	3.05	60.9		53.5
34.81	30.89	7.27	12.34	60.3	12.05	50.0
48.02	21.87	1.43	21.49	70.6	3.8	49.8
13.34	14.37	3.90	50.88	49.6	63.8	37.7
27.27	25.37	3.66	21.58	32.2	-16.4	32.9
24.79	23.52	29.75	8.05	51.5	10.56	30.2
30.24	30.60	4.78	22.23	71.8	-20.6	16.8
34.28	21.20	6.80	12.39	34.2		0
23.92	29.34	2.12	25.42	40.4	-16.4	-16.7
18.20	35.13	5.17	26.55	37.9	1.9	-18.2
22.18	21.79	3.96	20.56	42.3	255.0	-20.1
31.56	26.06	3.67	17.59	49.3	81.1	-26.0
38.66	12.68	23.10	16.94	38.3	87.7	-26.9
16.56	18.21	2.14	46.84	59.1	-0.3	-30.0
24.52	9.55	6.57	53.01	33.7	3.96	-36.0
19.05	21.22	24.11	26.64	66.0	78.9	-38.2
16.77	24.96	12.20	33.30	59.2	89.5	-46.8
37.39	33.75	3.26	3.97	45.0	71.1	-67.2
24.72	23.33	3.42	16.57			-72.7
27.59	10.99	7.95	41.87	51.1	17.9	-130.0

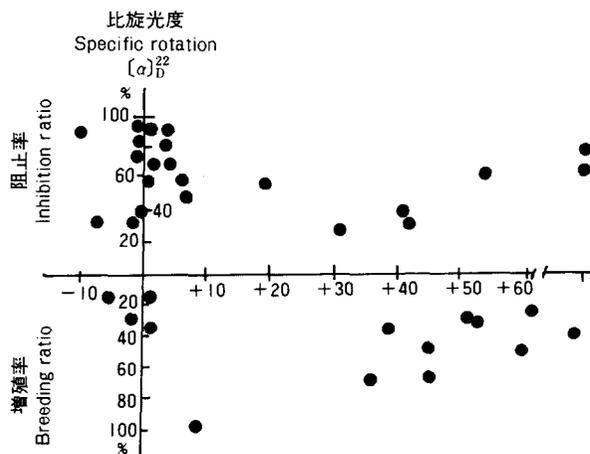


Fig. 3. 樹葉多糖類の抗腫瘍活性と比旋光度

Correlation of antitumor activity and specific rotation of polysaccharides from leaves.

Table 2. ネズミモチ粗多糖体の投与量と Ehrlich 腫瘍に対する阻止活性

Antitumor effect of various dosage of polysaccharide from leaves of Nezumimochi (*Ligustrum japonicum*) on Ehrlich carcinoma in mice.

マウス数 No. of mice	投与量 Dose (mg/kg)	処置* Treatment*		腫瘍阻止率 Inhibition ratio (%)
		前 pre-	後 post-	
5	160	3	4	97.5
6	160	3	3	99.0
6	60	3	4	97.2
6	30	3	4	96.2
6	15	3	4	99.0

\* 試料による前処置は腫瘍移植の 11 日前から、後処置は腫瘍移植 24 時間後より行った。

\* Pre-treatment was started 11th day before the inoculation ( $1 \times 10^5$  cells) and post-treatment was started 24hr after tumor implanted.

つぎに、試料を DEAE-Sepharose CL-6B カラムを用いて中性糖 (Fraction 1 = Fr. 1) と酸性糖 (Fr. 2, 3) に分画して (Fig. 4) その糖組成、比旋光度、分子量、及び Ehrlich 皮下移植腫瘍阻止率を調べた (Table 3)。中性糖部分は、主にアラビノース (65%), ガラクトース (18.5%) からなり、少量のグルコース、キシロース、マンノース、及びラムノースをそれぞれ 7.45%, 4.19%, 3.65%, 1.19% 含んでいた。分子量は低く、比旋光度はマイナスであった。多糖の抗腫瘍活性には

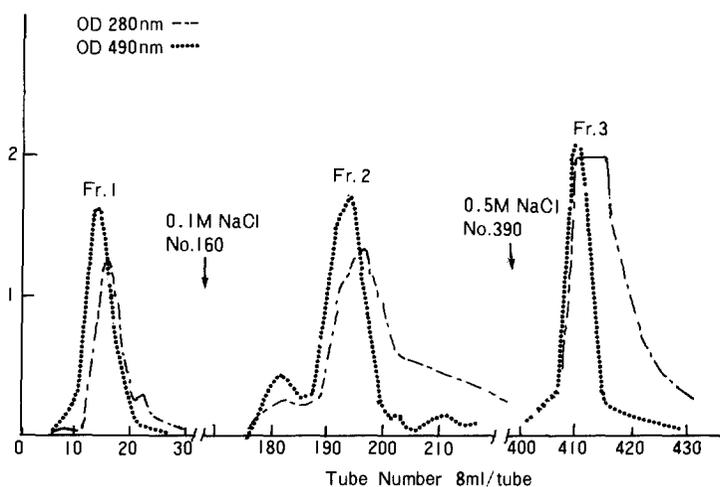


Fig. 4. ネズミモチ多糖体の DEAE-Sephacrose CL-6B カラムによる分画図  
Chromatography on DEAE-Sephacrose CL-6B of the crude polysaccharide obtained from Nezumimochi (*Ligustrum japonicum*) leaves.

Table 3. ネズミモチ樹葉粗多糖体の DEAE-Sephacrose カラムによる分画とその化学的性質及び Ehrlich 皮下移植に対する腫瘍阻止活性.

Chemical properties and antitumor effects of each fraction obtained by DEAE-Sephacrose column fractionation from polysaccharide of Nezumimochi (*Ligustrum japonicum*) leaves.

分画 Fraction	収率 Yield (%)	糖組成 Sugar composition (%)						比旋光度 Specific rotation [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	分子量 MW	腫瘍阻止率 Inhibition ratio (Ehrlich)
		Rha.	Man.	Ara.	Gal.	Xyl.	Glc.			
未分画 Original	—	5.88	trace	47.75	9.95	trace	13.72	95.8	—	96.2
分画 1 Fraction 1	12.7	1.19	3.65	65.04	18.47	4.19	7.45	-67.7	26 000	99.3
分画 2 Fraction 2	33.5	6.43	—	45.59	32.48	5.67	9.82	125.9	46 000	97.1
分画 3 Fraction 3	22.5	22.23	—	50.63	16.60	1.49	5.18	75.7	74 000	80.7

分子量の大きさが関与することはシイタケ、ヒラタケ多糖体の研究その他で報告されている (SASAKI, 1976; YOSHIOKA, 1975)。しかし、この Fr. 1, 2, 3 の Ehrlich 腫瘍阻止活性は中性糖である Fr. 1 が最も高かったが、分子量が 2 倍の Fr. 2 と大きな差は認められなかった。Fr. 3 については、分子量が Fr. 1 よりも大きいにもかかわらず、かなり低い活性しか得られなかった。

さらに、これらの分画多糖について増殖速度の極めて早い L<sub>1210</sub> 腫瘍細胞 ( $2 \times 10^4$  cells/mouse) を BDF<sub>1</sub> マウスの背中に皮下移植し、その増殖抑制効果を生存日数で比較した結果、Table 4 に示し

Table 4. ネズミモチ多糖体の L<sub>1210</sub> マウス白血病細胞に対する延命効果

Antitumor effect of the pre- and post-treatment with polysaccharides from Nezumimochi (*Ligustrum japonicum*) on the survival of subcutaneously implanted L<sub>1210</sub> leukemic cells in BDF<sub>1</sub> mice.

実験 No Experiment No.	試料 Samples	マウス数 No. of mice	試料投与量 Sample dose (mg/kg)	移植細胞数 Cell dose (ells/ mouse)	処 置 Treatment		平均生存日数 Av. survival days	
					前 pre-	後 post-	対照 Control	試料 Sample
I	未分画 Original	5	40	5×10 <sup>4</sup>	4	4	9.5	10.0
	未分画 Original	5	20	2×10 <sup>4</sup>	4	4	10.6	12.1
II	未分画 Original	6	30	1.25×10 <sup>4</sup>	3	4	10.2	12.0
	分画 2 Fr. 2	6	30	1.25×10 <sup>4</sup>	3	4	10.2	12.1
	分画 3 Fr. 3	6	30	1.25×10 <sup>4</sup>	3	4	10.2	10.8
III	未分画 Original	5	30	3×10 <sup>4</sup>	3	4	10.3	11.4
	分画 1 Fr. 1	5	30	3×10 <sup>4</sup>	3	4	10.3	11.3
	分画 2 Fr. 2	5	30	3×10 <sup>4</sup>	3	4	10.3	11.0
	分画 3 Fr. 3	5	30	3×10 <sup>4</sup>	3	4	10.3	10.3

たように未分画多糖を腫瘍移植の前後に 20 mg/kg 投与することにより 2 日間 (14%) の延命効果が得られた (実験 I)。これは、カワラタケ由来の多糖体である PSK (塚越, 1974) の延命効果よりも高い活性であった。これに対して実験 II, III では、Fr. 1, 2 よりも未分画多糖体の方がむしろ高い活性を示し、Fr. 3 は明らかに無効であった。以上のように、ネズミモチ樹葉の粗多糖体の分画・精製によって L<sub>1210</sub> に対するより高い多糖分画を得ることはできなかった。

この多糖体の細胞性免疫に及ぼす影響を、<sup>3</sup>H-チミジンのマウスひ臓細胞への取り込み量によって調べた。ネズミモチ樹葉粗多糖体の投与によりマウスのひ臓細胞は活性化され、DNA 合成に不可欠なチミジンの取り込み量が対照群、及び活性のないヤブニッケイ粗多糖体投与群に比べて著しく高く (Fig. 5)、この多糖体がマウスの細胞性免疫を亢進させていることが明らかであった。

また、腫瘍細胞をネズミモチ粗多糖体とともに培養した結果、Table 5 に示したように Ehrlich 及び L<sub>1210</sub> 腫瘍細胞のいずれに対しても成長阻害を示さなかったことから細胞毒性はないものと判断される。

### 3.3 ヘミセルロース酵素複合体 (HE-Complex) の抗腫瘍活性とその化学的性質

森林総合研究所木材化工部でオオウズラタケ菌体外酵素について精査中に得られたヘミセルラーゼと基質多糖の結合物は一種の複合多糖類と考えられるため、その抗腫瘍活性を検定した。

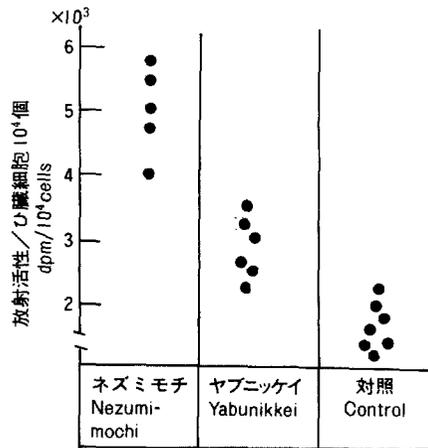


Fig. 5. ネズミモチ多糖体の投与がマウスの細胞性免疫に及ぼす影響

Comparison of  $^3\text{H}$ -Thymidine incorporation of splenic cell in mice among three groups treated with polysaccharides from Nezumimochi (*Ligustrum japonicum*) or Yabunikkei (*Cinnamomum japonicum*) and without polysaccharide.

Table 5. ネズミモチ多糖体の Ehrlich carcinoma, L<sub>1210</sub> leukemic cell に対する細胞毒性  
Viability of Ehrlich carcinoma or L<sub>1210</sub> leukemic cells in a culture medium (RPMI-1640) containing crude polysaccharide of Nezumimochi (*Ligustrum japonicum*).

試料 または対照 Sample or Control	培養液中の 試料量 Dose medium (mg/ml)	培養皿数 Number of dish	腫瘍細胞の平均生存 数 (Ehrlich) Av. viability of Ehrlich cells (%)	腫瘍細胞の平均生存 数 (L <sub>1210</sub> ) Av. viability of L <sub>1210</sub> cells
対 照 Control	—	6	83.7	90.3
試料多糖 Sample	2.5	6	84.0	91.0
試料多糖 Sample	25.0	6	80.0	87.8

トウヒ、ヒノキ、カラマツ、ツガ、ブナの5種類のホロセルロースから、Fig. 6 に示した手順に従ってヘミセルロース・酵素複合体 (HE-Complex) を調製した。それらは Table 6 に示したように Ehrlich 腫瘍に対していずれも高い抗腫瘍活性を示し、その糖組成は当然のことながらそれぞれの樹種のホロセルロースの糖組成とかなり異なっていた。この中でカラマツホロセルロースを基質とした場合の HE-Complex について検討した。

カラマツホロセルロースより得られた HE-Complex は、Table 7 に示したように、未処理ホロセルロースの糖組成に比べて、グルコース含量は著しく低く相対的に、ガラクトース、キシロース、アラビノースが大幅に増加し、ホロセルロース中では見られなかったラムノースも検出された。酵素タンパ

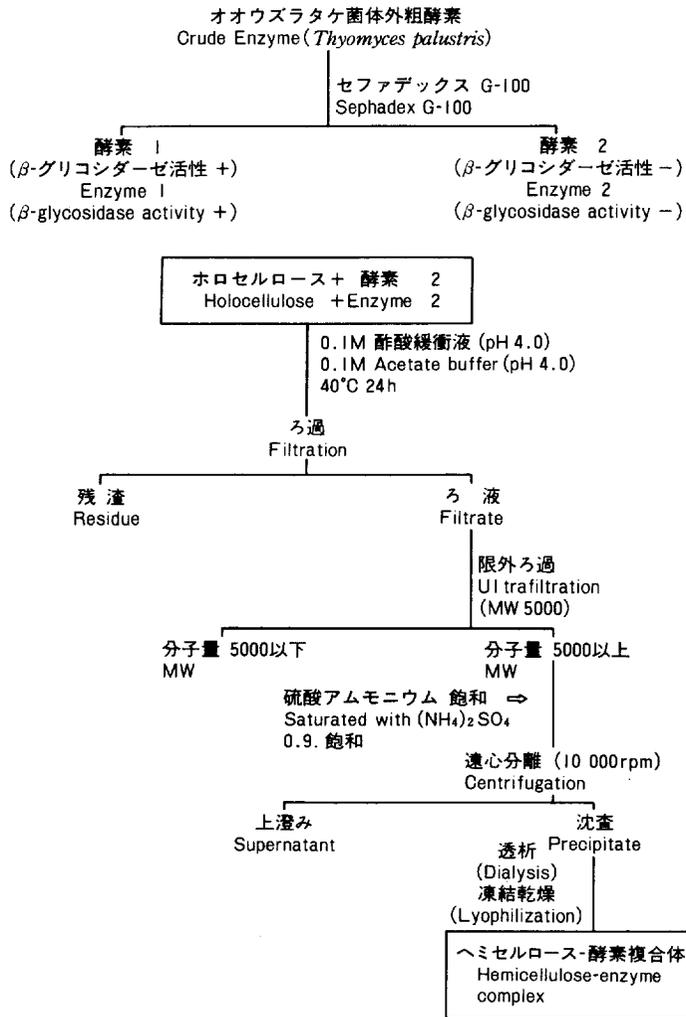


Fig. 6. ヘミセルロース酵素複体の調製  
Preparation of enzyme combined hemicellulose (HE-Complex).

Table 6. ヘミセルロース-酵素結合物の化学的性質と抗腫瘍 (Ehrlich) 活性

Chemical properties and antitumor effects of hemicellulose-enzyme complex from various wood holocelluloses and crude extracellular enzyme from *Thyromyces palustris* on implanted Ehrlich carcinoma cell in mice.

ヘミセルロースの樹種と学名 Species of wood hemicellulose and the scientific name	ヘミセルロース-酵素複合体の糖組成 Sugar composition (%) of the H,E-complex						腫瘍阻止率 Tumor Inhibition ratio (%)
	Rha.	Man.	Ara.	Gal.	Xyl.	Glc.	
トウヒ Touhi ( <i>Picea hondoensis</i> )	12.86	17.37	19.98	34.79	9.08	5.83	98.1
カラマツ Karamatsu ( <i>Larix kaempferi</i> )	1.95	24.56	12.86	27.87	26.02	6.74	98.0
ヒノキ Hinoki ( <i>Chamaecyparis obtusa</i> )	1.81	29.91	8.96	1.91	33.23	6.96	99.5
ツガ Tsuga ( <i>Tsuga sieboldii</i> )	13.10	24.47	10.93	32.34	8.50	10.66	99.0
ブナ Buna ( <i>Fagus crenata</i> )	16.38	14.07	13.45	56.11	—	—	87.0

Table 7. 粗酵素処理によるカラマツホロセルロースの化学的性質の変化

Changes in chemical components of Karamatsu (*Larix kaempferi*) holocellulose by the treatment with crude enzyme from *Thyromyces palustris*.

試料 Samples	糖組成 Sugar composition (%)						クラソンリグニン Klason lignin (%)
	Rha.	Man.	Ara.	Gal.	Xyl.	Glc.	
未処理ホロセルロース Original holocellulose	—	17.86	1.01	1.93	6.67	72.52	2.47
ヘミセルロース-酵素複合体 Enzyme combined hemicellulose	1.95	24.56	12.86	27.87	26.02	6.74	—
緩衝液処理 ホロセルロース Treatment with buffer only		14.92	1.17	1.55	5.27	77.08	2.43
ホロセルロースの 酵素糖化産物 Products by digestion		53.25	4.58	8.64	15.57	17.96	—
残渣ホロセルロース Residual holocellulose		12.90	1.01	1.14	3.48	83.50	1.32

ク質の存在を示す窒素 (N) 含量は 2.14%, 分子量は, 分子篩いクロマトグラフィー (GPC) 及び SDS 電気泳動で 41 000~44 000 であった。

この HE-Complex をセファデックス G-100 で分画すると, Fig. 7 に示すような分画パターンが得られ, その糖及びタンパク質の溶出曲線並びに N 分析の結果 (Table 8) から, Fr. 2 に基質であるヘミセルロースと酵素タンパク質の結合部分が多く含まれていることが推測された。

そこで Con-A Sepharose カラムを用いて, 0.5 M NaCl, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 及び 1 mM CaCl<sub>2</sub> を含む 0.02 M トリス buffer (pH 7.4) 開始 buffer として, マンナン系 HE-Complex とそれ以外の HE-Complex に分画した結果, その大部分は Con-A 非結合分画 (非マンナン系) であった。0.2 M Me-Mannoside を含む 0.02 M トリス buffer により初めて溶出する Con-A 結合分画は, 窒素 (N) 含量が高く, 酵素タンパク質を多く含む HE-Complex 部分であると思われるので, 透析, 限外ろ過による濃縮後, 凍結乾燥して単離した。各分画の糖組成, 収率, N 分析の結果を同じ Table 8 に示した。

Con-A 結合分画は, 糖組成, SDS 電気泳動並びに GPC の結果から, 分子量約 44 000 のグルコマンナン系の HE-Complex であった。

多糖分子にタンパク質を結合している PSK (*Coriolus versicolor* QUEL 菌糸体熱水抽出物) (塚越, 1974, 中野, 1974, 1975) が純粋の多糖体であるシイタケのレンチナンと異なり, 経口投与でも活

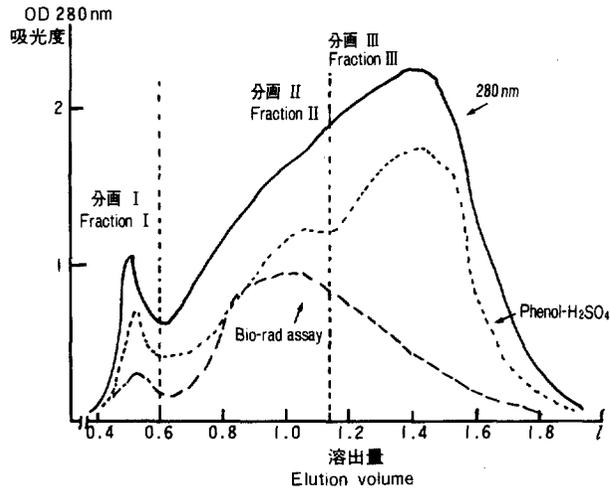


Fig. 7. カラマツヘミセルロース・酵素複体の Sephadex G-100 による分画図  
Gel filtration of complex of Karamatsu (*Larix kaempferi*) hemicellulose and enzyme on Sephadex G-100 column (50 × 750 mm).

実線=紫外吸収曲線 (280 nm) 点線=糖質溶出曲線 (フェノール硫酸法, 490 nm)

破線=タンパク質溶出曲線 (バイオラッド法, 595 nm)

The Sephadex G-100 was equilibrated with 0.1 M Acetate buffer (pH 5.0) and elution was performed with same buffer. Carbohydrate was analyzed by phenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> method (490 nm) and protein was analyzed by Bio-rad assay (595 nm).

性を失わないことが報告されているので、この酵素タンパク質含有率の高い HE-Complex の L<sub>1210</sub> 皮下移植腫瘍に対する効果を測定した。しかしながら、G-100-Fr. 2 を投与したマウスの平均生存日数は対照群と同じであり、この分画には抗腫瘍活性が認められなかった。一方、未分画、Con-A 非結合分画、Con-A 結合分画及び対照群の比較では Fig. 8 に示したように分画精製試料よりも、未分

Table 8. カラムツヘミセルローズ-酵素複合体 (HE-Complex) の分画とその化学的性質  
Comparison of the chemical properties of each fraction obtained by fractionation of enzyme combined hemicellulose (HE-Complex) from Karamatsu (*Larix kaempferi*)

分画 Fraction	糖組成 Sugar composition (%)						窒素 N (%)	収率 Yield (%)
	Rha.	Man.	Ara.	Gal.	Xyl.	Glc.		
ヘミセルローズ-酵素複合体 HE-Complex	1.95	24.56	12.86	27.87	26.02	6.74	2.14	—
セファデックス G-100 Sephadex G-100								
分画 1 Fr. 1	16.13	9.55	20.67	39.41	7.24	6.79	1.57	1.80
分画 2 Fr. 2	13.05	34.36	10.77	31.68	7.69	2.45	5.26	22.80
分画 3 Fr. 3	7.57	30.11	6.89	27.22	21.26	6.94	2.57	36.00
Con-A-セファロース 非結合分画 Con-A-Sepharose Unbound Fr.	8.99	19.26	8.35	31.24	26.15	6.00	1.47	9.90
結合分画 Bound Fr.	3.27	52.78	6.50	11.58	5.85	20.00	7.61	1.36

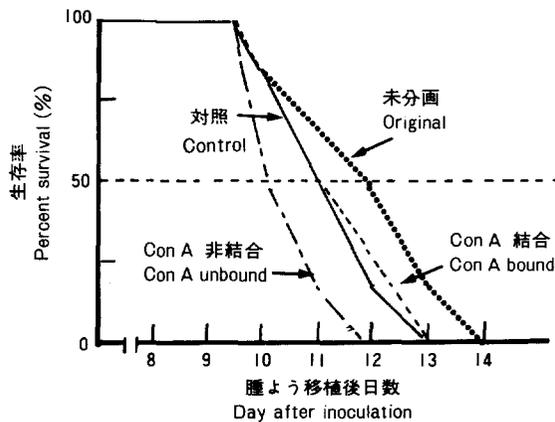


Fig. 8. ヘミセルローズ・酵素複合体の各分画多糖体が L<sub>1210</sub> マウス白血病皮下移植腫瘍に及ぼす延命効果

Effects of each fraction from HE-complex on the survival of subcutaneously implanted L<sub>1210</sub> leukemic cell ( $1 \times 10^4$  cells/mouse).

画試料の方がよい結果が得られた。そこで、HE-Complex 中の酵素タンパク質の影響を確認するために、粗酵素の L<sub>1210</sub> に対する抗腫瘍効果を試験したところ、ほとんど効果がなく、平均生存日数が対照群 10.8 に対して 11.4 であった。この結果から、L<sub>1210</sub> における HE-Complex の抗腫瘍活性は、酵素タンパク質によるものではないことが明らかとなった。さらに、酵素タンパク質に主に活性が存在するならば、N% の最も高い Con-A 結合分画が最も高い活性を示すはずであるが、そのような結果が得られなかったことから、この HE-complex の抗腫瘍活性は、酵素タンパク質に活性源があるのではなく多糖体部分に存在するか、もしくは Complex の形成が活性を発現しているものと思われる。

### 3.4 樹葉多糖の抗補体活性

広葉樹 35 種類、針葉樹 5 種類、計 40 種の樹葉多糖の抗補体活性を Table 9 に示した。40 種のうち、ほとんど活性の見られなかったものは 3 種、比較的高い活性（阻止率 20% 以上）を示した樹種は、クスノキ、ヤブニッケイ、クサギ、ミヤマシキミ、クワの 5 種であった。このうち、クスノキ粗多糖の分画を行い、活性多糖分画を濃縮、精製するとともに、その化学的性質と活性の関係について検討した。

### 3.5 クスノキ樹葉多糖の抗補体活性

5 月上旬にクスノキ若葉 470 g を採集して細片とし、Fig. 9 に示した方法で精油分を留去後、熱水抽出液を濃縮冷却して沈殿するデンプン分画（生葉の 0.47%）を遠心分離によって除き、上澄みを濃縮して粗多糖を得た。これは、Table 10 に示したように、グルコース、ガラクトース、アラビノースをそれぞれ 40%、34.8%、13.5% と、少量のラムノース、マンノース、及び微量のキシロースからなる混合多糖で、生葉に対して 1.03% の収率であった。

この多糖は、セファデックス G-100 による分子量分画によって、Fraction 1, 2, 3 に分画した。それらの収率は、それぞれ未分画多糖体の 15.60%、20.00%、39.31% で、Table 10 のような糖組成と分子量であった。これらの分子量と抗補体活性は、分子量の大きいほど活性が高く、分子量に比例していた。また、糖組成を見ると、アラビノース、ガラクトースが各分画にほぼ均一に分布しているのに対し、マンノース、キシロースは Fr. 3 に多かったが、糖組成と抗補体活性との間に、はっきりとした関係を見出すことはできなかった。

つぎに、DEAE-Sepharose を用いて上記の G-100-Fr. 1 を分画して中性多糖と酸性多糖に分けたところ、Table 10 に示されているように、カラムに吸着しない中性多糖と吸着する酸性多糖では、収率は後者が多く前者は少ないが、その活性は中性多糖の方がはるかに高かった。

これら多糖の抗補体活性は、多糖の量が増えるほど直線的に増加しており（Fig. 10）、その活性が多糖の濃度に依存していることが明らかであった。分子量は中性糖が 52 900 に対して、酸性糖は 13 000 で、この場合も分子量と活性とは相関していた。分子量がやや低い G-100-Fr. 2 について、G-100 Fr. 1 同様に DEAE カラムで分画した場合も、その活性は中性多糖分画の方が高かったが、G-100 Fr. 1 からの中性多糖よりは低かった（Table 10）。

中性多糖分画にはグルコースが多く、酸性多糖分画はマンノース、ガラクトースが多く含まれていた。

この中性多糖分画について、糖組成と抗補体活性との関係を明らかにするため、Con A-sepharose

Table 9. 各種樹葉多糖類の抗補体活性 (TCH<sub>50</sub>)

Anti-complementary activity of various polysaccharides from leaves.

樹種 Species	学名 Scientific name	補体活性阻止率 (TCH <sub>50</sub> ) TCH <sub>50</sub> (%)
クスノキ	: <i>Cinnamomum camphora</i>	36.70
ヤブニッケイ	: <i>Cinnamomum japonicum</i>	33.30
クサギ	: <i>Clerodendron trichotomum</i>	22.85
ミヤマシキミ	: <i>Skimmia japonica</i>	22.11
クワ	: <i>Morus bombycis</i>	22.01
タブノキ	: <i>Machilus thunbergii</i>	19.85
コブシ	: <i>Magnolia praecocissima</i> (M. kobus)	18.95
シラカシ	: <i>Quercus myrsinaefolia</i>	18.75
ミカン	: <i>Citrus unshiu</i>	18.71
クロマツ	: <i>Pinus thunbergii</i>	18.64
サンショウ	: <i>Zanthoxylum piperitum</i>	17.10
トベラ	: <i>Pittosporum tobira</i>	16.70
ニオイヒバ	: <i>Thuja occidentaris</i>	14.63
クヌギ	: <i>Quercus acutissima</i>	14.29
ノリウツギ	: <i>Hydrangea paniculata</i>	13.84
イチイ	: <i>Taxus cuspidata</i>	12.73
ダンコウバイ	: <i>Lindera obtusiloba</i>	11.74
スダジイ	: <i>Castanopsis sieboldii</i>	11.42
シロモジ	: <i>Lindera triloba</i>	10.39
アオトウヒ	: <i>Picea pungens</i>	10.00
コナラ	: <i>Quercus serrata</i>	9.52
ミズキ	: <i>Cornus controversa</i>	9.47
アジサイ	: <i>Hydrangea macrophylla</i>	9.17
トウヒ	: <i>Picea jezoensis</i> var. <i>hondoensis</i>	9.10
エゾユズリハ	: <i>Daphniphyllum macropodum</i> var. <i>humile</i>	9.09
シキミ	: <i>Illicium anisatum</i> (I. religiosum)	8.31
ウラジロモミ	: <i>Abies homolepis</i>	7.69
ツバキ	: <i>Camellia japonica</i>	7.00
ヤマモモ	: <i>Myrica rubra</i>	7.00
トチノキ	: <i>Aesculus turbinata</i>	7.00
マユミ	: <i>Euonymus sieboldianus</i>	6.90
コアマチャ	: <i>Hydrangea serrata</i> f. <i>thunbergii</i>	6.59
カシワ	: <i>Quercus dentata</i>	6.39
カクレミノ	: <i>Dendropanax trifidus</i>	6.23
アセビ	: <i>Pieris japonica</i>	5.56
アオモリトドマツ	: <i>Abies mariesii</i>	5.02
ホソバタブ	: <i>Machilus japonica</i>	1.37
フサアカシア	: <i>Acacia dealbata</i>	0.56
シロダモ	: <i>Neolitsea sericea</i>	0.56
ネズミモチ	: <i>Ligustrum japonicum</i>	0.00

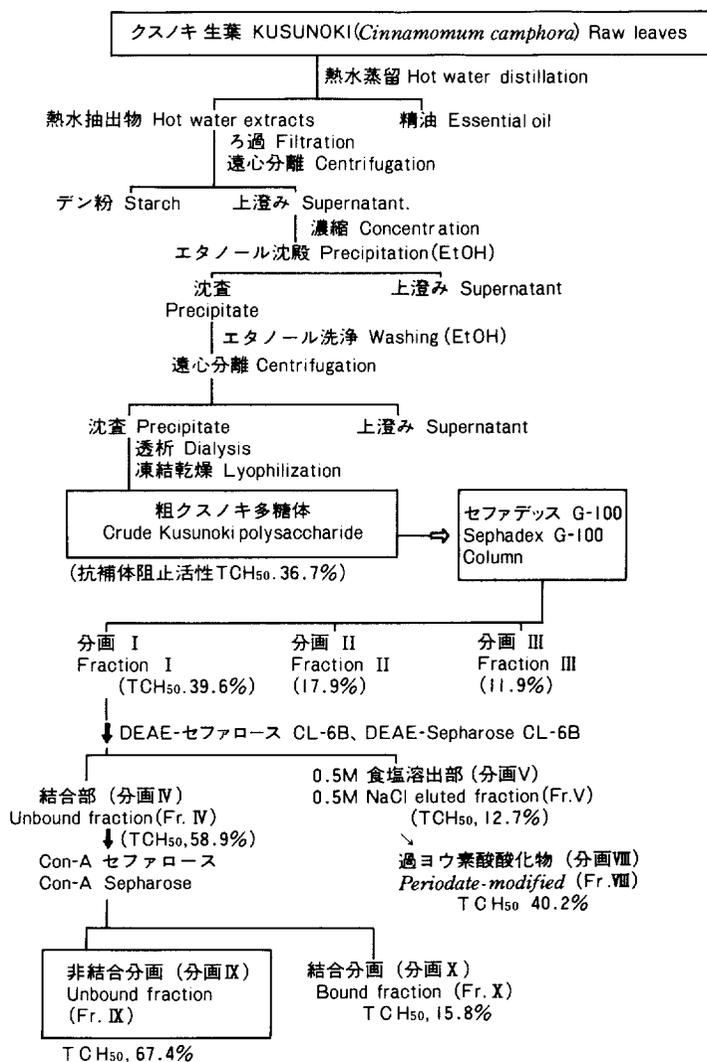


Fig. 9. クスノキ樹葉多糖体の分離分画と抗補体活性  
 Extraction and fractionation of polysaccharide from Kusunoki (*Cinnamomum camphora*) leaves.  
 TCH<sub>50</sub> = Inhibition ratio (50% 溶血率阻止活性)

Table 10. クスノキ樹葉多糖体の分画, 精製及び化学修飾による抗補体活性の変化と糖組成

Anti-complementary activities, sugar composition and molecular weight of various fractions from polysaccharide of Kusunoki (*Cinnamomum camphora*) leaves.

多糖類の種類 Polysaccharides	収率 Yield (%)	溶血阻止率 Inhibition of TCH <sub>50</sub> (%)	分子量 MW	糖組成 Sugar composition (%)					
				Rha.	Man.	Ara.	Gal.	Xyl.	Glc.
未分画多糖体 Original polysaccharide		36.7		4.9	4.7	13.5	34.8	1.6	40.4
セファデックス G-100 分画 Sephadex G-100									
Fr. 1	15.6	39.6	78 000	4.1	1.5	15.4	41.7	0.3	37.0
Fr. 2	20.0	17.9	37 000	5.5	3.1	17.4	42.0	1.2	30.8
Fr. 3	39.3	11.9	15 000	7.6	6.5	12.6	39.6	3.2	28.4
DEAE-セファロース CL-6B による Fr. 1 の分画 DEAE-Sepharose CL-6B (from Fr. 1)									
非結合部 Unbound fraction (Fr. 4)	4.5	58.9	52 900	0.3	4.1	3.8	27.3	—	64.5
結合部 Bound fraction (Fr. 5)	5.6	12.7	13 000	—	10.7	6.5	48.7	0.9	33.1
同カラムによる Fr. 2 の分画 By same column (from Fr. 2)									
非結合部 Unbound fraction (Fr. 6)		37.2							
結合部 Bound fraction (Fr. 7)		6.4							
Fr. 5 の過ヨウ素酸化生成物 Periodate-modified Fr. 5 (Fr. 8)		40.2							
コンカナバリン A-セファロース による Fr. 4 の分画 Con-A Sepharose (from Fr. 4)									
非結合部 Unbound fraction (Fr. 9)	1.8	67.4		16.2	—	30.9	52.9	—	—
結合部 Bound fraction (Fr. 10)	1.4	15.8		—	—	—	23.3	—	76.7

樹木多糖類の抗腫瘍活性及び抗補体活性 (土師)

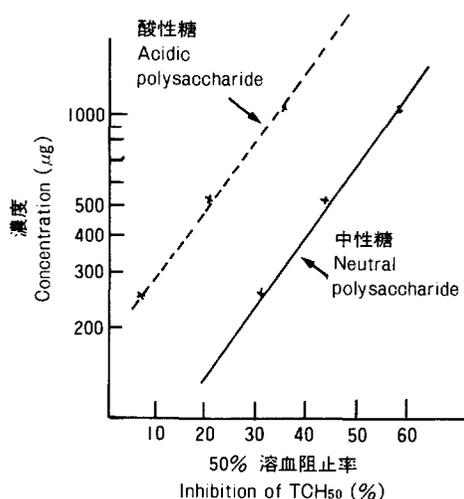


Fig. 10. クスノキ多糖の DEAE-Sepharose カラムにより分画した中性糖と酸性糖の抗補体活性と多糖量との関係  
Correlation of anti-complementary activity and amounts of neutral and acidic polysaccharide from Kusunoki (*Cinnamomum camphora*) leaves.

カラムによって、Con A 親和性（結合部）と非親和性（非結合部）に分画したところ、ラムノース、アラビノース、ガラクトースからなる非結合部と、ガラクトース、グルコースからなる結合部に分画できた。この2分画の抗補体活性は、非結合部の活性が極めて高く、クスノキ樹葉多糖体の抗補体活性本体は、ラムノースを含むアラビノガラクタンであることが確認された（Table 10）。

また、多糖の化学構造の変化に伴う抗補体活性の変化を検討する目的で、抗補体活性の低い酸性多糖（DEAE-sepharose 結合）をメタ過ヨウ素酸で酸化後、水素化ほう素ナトリウムで還元することにより、ポリオール化合物とし、その抗補体活性を試験した結果、12.7% から 40.2% に上昇した。

多糖類の生物活性と化学構造との相関関係については、グリコシド結合配位 (SUZUKI, 1969, SAKAI, 1968, etc.), 部分構造の変化, 分枝構造 (西川1969, CHIHARA, 1970 a, SINGH, 1974, MISAKI, 1984, SONE, 1985, etc.), 分子量 (HOFFMAN, 1971, SASAKI, 1976 a 1976 b, 水野, 1984), 分子会合 (KIYOHARA, 1986, 山田, 1986 d, CIRELLI, 1989, 千原, 1977) 等について多くの報告が見られる。過ヨウ素酸酸化による化学構造の変化（分枝切断等）では、抗腫瘍活性の増加が多く報告されているが、大和当帰多糖の抗補体活性に関して、山田らは、多糖の微細構造が活性に密接に関与しており、活性部位ばかりでなく活性の妨害部位も存在することを指摘している（山田, 1986 a, 1986 c, 1986 d, KIYOHARA, 1987, 1988）。大和当帰の場合は、アラビノフラノースを酵素分解で切断すると活性が上昇し、過ヨウ素酸酸化では低下すると述べている。そして、当帰の抗補体活性多糖であるアラビノガラクタンは、水溶液中で分子会合となり、この会合の低下に伴い活性が低下することを推測している。

クスノキ多糖の酸性分画が、過ヨウ素酸酸化によって抗補体活性が上昇した上記の事実は、山田の結果とは矛盾するが、クスノキ多糖の化学構造が現在不明のために、理由は明らかでない。

つぎに、クスノキ多糖の抗補体活性が、補体そのものの作用発現メカニズムに抑制的に働いているのか、それとも、抗原抗体複合体側の補体結合部に作用しているのかを確認する目的で、下記の実験を行った。

まず、クスノキ多糖体と補体血清を 37°C で 30 分培養した補体血清は、クスノキ多糖体の補体抑制活性によって、感作羊赤血球の通常の溶血が抑制されるが、この溶血を阻止された感作羊赤血球を PBS で洗浄後、PBS と 37°C、30 分培養した補体血清を加えると通常の溶血状態を生じた。この結果により、クスノキ多糖体の抗補体活性が抗体側には影響を及ぼしていないことが確認できた。

つぎに、クスノキ多糖体と感作羊赤血球をあらかじめ 37°C 30 分培養後補体血清を加えた場合は、補体抑制活性は、極めて弱いことから、この多糖体の補体抑制作用は、抗原抗体側には影響を及ぼさず、補体側にのみ作用していることが明らかとなった。

#### 4 ま と め

未利用資源の中から、広葉樹及び針葉樹樹葉の多糖類及び木材ヘミセルロース関連物質の抗腫瘍活性と抗補体活性についてスクリーニングした。その結果、つぎのことが明らかとなった。

① 樹葉多糖体は、生葉重量に対して平均 0.5% の収率で得られた。その糖組成を調べた結果、樹葉多糖類の多くはアラビノース、ガラクトース、ウロン酸等を主成分としていた。これら樹葉粗多糖類 36 種類中 12 種類に、Ehrlich 皮下移植腫瘍の増殖を 70% 以上抑制する抗腫瘍活性が見い出された。一方、樹種によって腫瘍増殖促進性のものもあり、7 種類の樹葉多糖で 30% 以上の腫瘍増大が見られた。

② アラビノース、ガラクトースを主成分としながら、抗腫瘍活性の高いネズミモチ樹葉多糖について調べた結果、Ehrlich 皮下移植腫瘍に対しては、分子量およそ 25 000 のアラビノース、ガラクトースを主体とするマイナス旋光度の中性糖分画が最も高い活性（15 mg/kg の投与量で阻止率 90%）を示した。これに対して、 $L_{1210}$  皮下移植腫瘍の増殖阻止活性では、未分画のネズミモチ粗多糖と分画精製した多糖との間に差が見られなかったが、14% の延命効果が得られた。

ネズミモチ粗多糖の抗腫瘍活性は多糖自体に殺細胞性のないこと、及び、多糖投与マウスの免疫担当細胞への  $^3\text{H}$ -チミジンの取り込み量が対照群に比べて著しく高いことから、この多糖の抗腫瘍効果は宿主介在性による効果であることが確認された。

③ 酵素と基質（カラマツヘミセルロース）の結合した複合体である HE-Complex の抗腫瘍活性は、未分画の場合、Ehrlich 皮下移植腫瘍の増殖を 2 mg/mouse の投与で 87% 阻止でき、 $L_{1210}$  皮下移植腫瘍マウスの生存日数を 2 日延命できた。しかし、Sephadex G-100 及び Con A-Sephadex カラムによる分画精製の結果得た N% の高い、すなわち、酵素結合量の多い多糖が、未分画 HE-Complex より活性が低かったことと酵素自体に  $L_{1210}$  に対する活性のないことから、カラマツ HE-Complex の抗腫瘍効果は基質ヘミセルロース部分にあり、その活性が宿主介在性の抗腫瘍効果であると推定された。同時に、未分画多糖と Con A-Sephadex 結合分画との比較で、未分画多糖がやや高い活性を示したことは、このタンパク結合多糖の高次構造に由来する相違であろうと推定した。

④ 補体活性に関する実験では、樹葉多糖類 40 種類中、20% 以上の補体阻止活性を示したものは 4 種類であった。この中で最も活性の高かったクスノキ樹葉多糖は、中性多糖部分に活性が高く、その中でも Con A-Sepharose カラムに結合しない分子量およそ 52 900, ラムノース, アラビノース, ガラクトースからなる分画の活性が最も高く  $TCH_{50}$  67.4% の抗補体活性を示した。抗補体活性の作用機構を調べた結果は、この多糖体が補体側にのみ働いて、抗体側には損傷を与えていないことも明らかにした。

## 謝 辞

本研究に終始有益なご指導、ご助言を賜った竹下隆裕医学博士に深謝致します。また、種々の実験腫瘍をいただいた国立ガンセンター研究所、薬効部長星昭夫博士、アイソトープ実験に便宜を与えて頂いた安馬喜昭氏、並びに各種樹葉、オオウズラタケ菌体外粗酵素等の試料をいただいた本研究所谷田貝光克博士、石原光朗博士その他の諸氏に謝意を表します。本報告の作成、公表に当たり、便宜とご助言をいただいた本研究所、森林化学科長広居忠量博士に謝意を表します。

## 引用文献

- ALBERSHEIM, P. and DARVILL, A.G. (秋山幸雄, 大西昭男訳): オリゴサッカリン, サイエンス, **15** (11), 32~40 (1985)
- ARAI, Y. *et al.*: Effect of immunosuppressive agents on antitumor action of lentinan, GANN, **62**, 131-134 (1971)
- CIRELLI, A.F. *et al.*: Effect of sulfation on the biological activity of  $\beta$ -(1-3)-glucans from the tree fungus *Cyttaria harioti* Fischer, Carbohydr. Res., **190**, 329-337 (1989)
- CHIHARA, G. *et al.*: Antitumor polysaccharide derived chemically from natural glucan (pachyman), Nature, **225**, 943-944 (1970 a)
- CHIHARA, G. *et al.*: Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom), Cancer Res., **30**, 2776-2781 (1971 b)
- CHIHARA, G. *et al.*: Inhibition of mouse Sarcoma-180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing., Nature, **222**, 697-698 (1969)
- 千原呉郎: 担子菌類の抗腫瘍作用—その生理活性の特長と限界—, 発酵と工業, **34** (12), 942~951 (1976)
- 千原呉郎: サルノコシカケ, シイタケその他担子菌類の抗腫瘍活性, 日本臨床, **27** (6), 179~183 (1969)
- 千原呉郎: 多糖の薬理活性—とくにその抗腫瘍活性を中心として—, 高分子, **26** (2), 117~123 (1977)
- 浜岡利之: 免疫応答の細胞間相互作用, 現代化学, **104**, 24~31 (1979)
- HARA, C. *et al.*: A blanched (1-3)- $\beta$ -D-glucan from a sodium carbonate extract of *Dictyophora indusiata* Fisher, Carbohydr. Res., **117**, 201-213 (1983)
- HASHI, M. and TAKESHITA, T.: Hypocholesterolemic effect of wood hemicelluloses on

- cholesterol fed rats, *Mokuzai Gakkaishi*, **19** (2), 101-103 (1973)
- HASHI, M. and TAKESHITA, T.: Hypocholesterolemic effect of Beech (*Fagus crenata* Blume) xylan on cholesterol fed rats, *Agric. Biol. Chem.*, **39** (3), 579-583 (1975)
- HASHI, M. and TAKESHITA, T.: Antitumor effect of 4-0-methylglucuronoxylan on solid tumor in mice, *Agric. Biol. Chem.*, **43** (5), 951-959 (1978 a)
- HASHI, M. and TAKESHITA, T.: Host mediated antitumor effect of 4-0-methylglucuronoxylan, *Agric. Biol. Chem.*, **39** (5), 961-967 (1978 b)
- 橋本嘉幸: がんと免疫, 現代化学, 116, 63~65 (1980)
- HOFFMANN, G.C. *et al.*: Structure and molecular size of pachyman, *Carbohydr. Res.*, **20**, 185-188 (1971)
- 生田宏一, 本庶 佑: 免疫応答の多様性を支える仕組み—T 細胞抗原受容体の多様性発現機構—, 化学と生物, **24** (1), 51~57 (1986)
- ISHIHARA, M. and SHIMIZU, K.: Hemicellulose of the brown rotting fungus, *Tyromyces palustris*, Purification and some properties of an extracellular  $\beta$ -D-xylosidase and  $\beta$ -D-glucosidase complex, *Mokuzai Gakkaishi*, **29** (4), 315-323 (1983)
- KIYOHARA, H. *et al.*: Unit structure of the anti-complementary arabinogalactan from *Angelica acutiloba* Kitagawa, *Carbohydr. Res.*, **167**, 221-237 (1987)
- KIYOHARA, H. *et al.*: Structure and anti-complementary activity of pectic polysaccharides isolated from the root of *Angelica acutiloba* Kitagawa, *Carbohydr. Res.*, **82**, 259-273 (1988)
- KIYOHARA, H. *et al.*: Studies on polysaccharides from *Angelica acutiloba*. V. Molecular aggregation and anti-complementary activity of arabinogalactan from *Angelica acutiloba*, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **9**, 339-346 (1986)
- KOMATSU, N. *et al.*: Host mediated antitumor action of Shizophyllan, A glucan produced by *Shizophyllum commune*, *GANN*, **60**, 137-144 (1969)
- MAEDA, Y.Y. *et al.*: The mechanism of action antitumor polysaccharides. I. The effects of antilymphocyte serum on the antitumor activity of Lentinan, *Int. J. Cancer*, **8**, 41-46 (1971)
- MAEDA, Y.Y. and CHIHARA, G.: The effects of neonatal thymectomy on the antitumor activity of Lentinan, carboxymethylpachyman and zymosan, and their effects on various immune responses, *Int. J. Cancer*, **11**, 153-161 (1973 a)
- MAEDA, Y.Y. and CHIHARA, G.: Periodical consideration on the establishment of antitumor action in host and activation of peritoneal exudate cells by Lentinan, *GANN*, **64**, 351-357 (1973 b)
- 松橋 直ほか: 生物化学実験法 15 免疫学入門, 学会出版センター, p. 6; p. 171, (1981 a, b)
- MISAKI, A. *et al.*: Studies on interrelation of structure and antitumor effects of polysaccharides: Antitumor action of periodate modified, branched (1-3)- $\beta$ -D-glucan of *Auricularia auridula-judae*, and other polysaccharides containing (1-3)-glycosidic linkages, *Carbohydr. Res.*, **92**, 115-129 (1981)
- MISAKI, A. *et al.*: Structure of pestalotan, a highly branched (1-3)- $\beta$ -glucan elaborated by *Pestalotia sp.* 815, and the enhancement of its antitumor activity by polyol modification of the side chains, *Carbohydr. Res.*, **129**, 209-227 (1984)
- MISAKI, A. *et al.*: Comparison of structure and antitumor activity of polysaccharides

- isolated from Fukurotake, the fruiting body of *Volvariella volvacea*, Agric. Biol. Chem., **50** (9), 2127-2183 (1986)
- 水野 卓ほか：制癌性多糖類に関する研究（第 3 報）コフキサノコシカケの水溶性グルカンの分別と化学構造，抗腫瘍活性について，静岡大学農学部研究報告，**31**，49～64（1981）
- 水野 卓ほか：マンネンタケ（零芝）の水溶性多糖類の分画，構造，抗腫瘍活性について，農化，**58** (9)，871～880（1984）
- MIZUNO, T. *et al.* : Fractionation and characterization of antitumor polysaccharides from Maitake, *Grifola frondosa*, Agric. Biol. Chem., **50** (7), 1679-1986 (1986)
- NAKAHARA, W. *et al.* : The host mediated antitumor effect of some plant polysaccharides, GANN **55**, 283-288 (1964)
- 中野陽典ほか：担癌マウスの遅延型皮膚反応に及ぼす蛋白多糖体（PSK）の影響，癌と化学療法，**1** (2)，285～290（1974）
- 中野陽典，田中鉄男：抗腫瘍蛋白多糖体を使用した癌の免疫療法，癌と化学療法，**2** (1)，13～20（1975）
- 西川嘉広：地衣類の抗腫瘍性多糖類の研究，日本臨床，**27** (6)，1744～1748（1969）
- ROSE, W.C. *et al.* : Immunotherapy of Madison 109 lung carcinoma and other murine tumors using Lentinan, Cancer Res., **44**, 1368-1373 (1984)
- SAKAI, S. *et al.* : Antitumor action of some glucan; especially on its correlation to other chemical structure, GANN, **59**, 507-512 (1968)
- 実吉峯郎：ガン研究のための化学の役割，化学工業，**30** (7)，714～719（1981）
- 実吉峯郎：がん化学療法の展望，現代化学，**116**，49～57（1980）
- SASAKI, T. and TAKASUKA, N. : Further study of the structure of Lentinan, an antitumor polysaccharide from *Laentinus edodes*, Carbohydr. Res., **47**, 99-104 (1976 a)
- SASAKI, T. *et al.* : Antitumor activity of degraded products of Lentinan : Its correlation with molecular weight, Gann, **67**, 191-195 (1976 b)
- SINGH, P.P. *et al.* : Scleroglucan, an antitumor polysaccharide from *Sclerium glucanicum*, Carbohydr. Res., **37**, 245-247 (1974)
- SONE, Y. *et al.* : Structure and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*, Agric. Biol. Chem., **49**, 2641-2653 (1985)
- SONE, Y. *et al.* : Isolation and characterization of polysaccharides of "Kikurage" fruit body of *Auricularia auricula-judae*, Agric. Biol. Chem., **42**, 417-725 (1978)
- SUGA, T. *et al.* : Antitumor activity of Lentinan in murine syngeneic and autochthonous hosts and its suppressive effect on 3-methylcholanthrene-induced carcinogenesis, Cancer Res., **44**, 5132-5137 (1984)
- SUZUKI, S. *et al.* : Antitumor activity of polysaccharides. II. Growth-inhibitory activity of mannan fractions isolated from several species of yeast against sarcoma-180 solid tumor, GANN, **60**, 65-69 (1969)
- TOKUZEN, R. *et al.* : Combined effect of cycloctidine and Lentinan on spontaneous mammary tumors in mice, Gann, **67**, 327-329 (1976)
- 塚越 茂：多糖類の担癌動物に対する宿主効果，特にカワラタケ由来蛋白糖，PSK，の作用について，癌と化学療法，**1** (2)，251～257（1974）
- 矢田純一：免疫応答の調節機構とその異常による疾患，化学と生物，**19** (7)，414～421（1981）

- YAMADA, H. *et al.* : Studies on polysaccharide from *Angelica acutiloba*. Part 1. Fractionation and biological properties of polysaccharides, *Planta Medica*, **50**, 163-167 (1984 a)
- YAMADA, H. *et al.* : Characterization of a watersoluble glucan from *Angelica acutiloba*, *Phytochemistry*, **23** (3), 587-590 (1984 b)
- 山田陽城ほか : 当帰の多糖の研究 (Ⅲ) 産地の異なる当帰期由来の多糖成分の化学的性状と生物活性, *生薬誌*, **38** (1), 111~117 (1984 c)
- YAMADA, H. *et al.* : Studies on polysaccharides from *Angelica acutiloba*-IV. Characterization of an anti-complementary arabinogalactan from the *Angelica acutiloba* Kitagawa, *Molecular Immunology*, **22** (3), 295-304 (1985 a)
- YAMADA, H. *et al.* : Relationship between chemical structure and anti-complementary activity of plant polysaccharide, *Carbohydr. Res.*, **144**, 101-111 (1985 b)
- 山田陽城 : 漢方薬中の免疫賦活アラビノガラクトン, *現代東洋医学*, **7** (1), 89~95 (1986 a)
- YAMADA, H. *et al.* : Structural characterization of anti-complementary polysaccharides from the leaves of *Artemisia princeps*, *Planta Medica*, **4**, 247-342 (1986 b)
- 山田陽城ほか : 生薬の抗補体多糖の構造と作用機作, 天然薬物の開発と応用シンポジウム講演要旨, 86~88 (1986 c)
- 山田陽城 : 漢方薬中に見いだされた抗補体多糖, *化学と生物*, **24** (11), 701~702 (1986 d)
- YAMADA, H. *et al.* : Structural characterization of an anti-complementary arabinogalactan from the roots of *Angelica acutiloba* Kitagawa, *Carbohydr. Res.*, **159**, 275-291 (1987)
- YOSHIOKA, Y. *et al.* : Studies on antitumor activity of some fractions from *Basidiomyces*. I. An antitumor acidic polysaccharide fraction of *P. ostreatus* (Fr.) Quel., *Chem. Pharm. Bull.*, **20** (6), 1175-1180 (1972)
- YOSHIOKA, Y. *et al.* : Isolation, purification, and structure of components from acidic polysaccharides of *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Quel., *Carbohydr. Res.*, **43**, 305-320 (1975)

## Antitumor Effects and Anti-complementary Effects of Tree Polysaccharides

HASHI, Mieko<sup>(1)</sup>

### Summary

The present studies were undertaken to evaluate antitumor activities and anti-complementary activities of polysaccharides from unutilized forest products.

1. Antitumor activities of crude polysaccharides isolated from leaves of 36 tree species were investigated. Among them, the polysaccharides from Nezumimochi (*Ligustrum japonicum*), Hosobatabu (*Machilus japonica*), Shiromoji (*Lindera triloba*), Shirodamo (*Neolitsea sericea*), Aomoritodomatsu (*Abies mariesii*), Blue spruce (*Picea pungens*), Mikan (*Citrus unshiu*), Miyamashikimi (*Skimmia japonica*), Dankoubai (*Lindera triloba*), Fusaakashia (*Acacia dealbata*), Asebi (*Pieris japonica*), Sudajii (*Castanopsis sieboldii*), exhibited inhibitory activity against implanted (Ehrlich carcinoma) solid tumor in mice. Although the crude polysaccharide from Nezumimochi was mainly composed of arabinose and galactose, the most significant antitumor effects were found at the dosage of 15 mg/kg. The inhibitory effect of this polysaccharide is not considered to be due to its cytocydal action but to be host-mediated action on the tumor cells.

2. Complex (HE-Complex) of hemicellulose from Karamatsu (*Larix kaempferi*) and a small amount of crude enzyme (extracellular enzyme from *Thyromyces palustris*) showed a prolongation of life span (2 days) by intraperitoneal injection (dosage of 2 mg/mouse) against subcutaneously implanted L<sub>1210</sub> leukemic cells in BDF<sub>1</sub> mice. However, concentration of antitumor activity by fractionation and purification failed.

3. Anti-complementary activities of crude polysaccharides isolated from 40 species of tree leaves were examined. Five kinds of these polysaccharides showed anti-complementary activities: Kusunoki (*Cinnamomum camphora*), Yabunikkei (*Cinnamomum japonicum*), Kusagi (*Clerodendron trichotomum*), Miyamashikimi (*Skimmia japonica*) and Kuwa (*Morus bombycis*).

The polysaccharide fraction obtained from the hot water extracts from leaves of Kusunoki exhibited the highest anti-complementary activity. By means of fractionation, the most active Con A-Sepharose unbound fraction was isolated. The crude polysaccharide contained significant amounts of uronic acid, but the active principle proved to be neutral polysaccharide rhamnoarabinogalactan. (MW = 52 900, TCH<sub>50</sub> = 67.4%)

The rhamnoarabinogalactan influenced only the complement side, but did not cause any change to the antibody side. It was observed that the lower active acidic fraction followed by chemical modification with periodate oxidation and borohydride reduction could be increased in higher anti-complementary activity.

---

Received March 30, 1990

(1) Bio-resources Technology Division