

明 細 書

発明の名称： リポ多糖、リポ多糖製造方法及びリポ多糖配合物

技術分野

[0001] 本発明は、ヒトを含む動物及び植物に対する医薬品、医薬部外品、化粧品、食品、機能性食品、飼料、肥料及び浴用剤などに添加しても安全な免疫賦活物質であるリポ多糖、そのリポ多糖を製造する方法、及び、そのリポ多糖が配合されているリポ多糖配合物に関する。

背景技術

[0002] リポ多糖（lipopolysaccharide。以下LPSと記載することがある）は、グラム陰性細菌細胞壁のペプチドグリカンを含む外膜に存在している脂質及び糖からなる複合化合物である。基本構造としては、特異な脂質を有するリポD A、それに共有結合したコア多糖と呼ばれるオリゴ糖、さらに細菌によって多様な構造を持つO抗原多糖の3成分よりなっている。O抗原多糖は一般的にいくつかの糖が一定の構造を作り、それがユニットとして繰り返つながっているが繰り返し数には多様性があり、そのために分子量が不均一である（非特許文献1）。

[0003] LPSは、多様な薬理作用を有している。例えば、糖尿病の発症予防効果、脂質異常症の抑制効果、アトピー性皮膚炎に対する抑制効果、ワクチンの効果を高めるアジュバント効果などがある（非特許文献2）。

我々は小麦より単離したパントエア・アグロメランスのLPS（LPSp）は、経口投与した場合に高い効果があることを見いだした（非特許文献1）。

[0004] LPSpを解析したところ、低分子量型（LMM）と高分子量型（HMM）が存在することを見出した。そこで、デオキシコール酸を用いたゲルろ過法を導入し、LPSpをLMM-LPSpとHMM-LPSpに分離することに成功した。このLMM-LPSpは元のLPSに比べて静脈内投与で免疫活性化の指標である腫瘍壊死因子（TNF）誘導活性がほぼ10倍高いことが確認された（特許文献1、非特許文献3）。

[0005] しかしながら、これまでデオキシコール酸を用いたゲルろ過法は実験室ス

ケールで実施できても工業化が困難であり、非常にコストがかかるため実用的でない。この問題を解決するために、LMM-LPSpがHMM-LPSpよりも多く含む培養法（特許文献2）を開発した。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特許第4 0 4 3 5 3 3号公報

特許文献2：特開2 0 2 2 － 1 6 0 9 3 8号公報

特許文献3：特許第5 5 1 1 1 1 2号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：I. Lerouge et al., “O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions”, FE MS Microbiology Reviews, 2002.03, 26(1), p.17-47

非特許文献2：C. Kohchi et al., “Applications of lipopolysaccharide derived from Pantoea agglomerans (IP-PA1) for health care based on macrophage network theory”, Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006.12, 102(6), p.485-496

非特許文献3：T. Kadowaki et al., “Induction of nitric oxide production in RAW264.7 cells under serum-free conditions by O-antigen polysaccharide of lipopolysaccharide”, ANTICANCER RESEARCH, 2013.07, 33(7), p.2875-9

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] しかしながら、この特許文献2の培養法によっても、なお少なくないHMM-LPSpが含まれるものであった。そこで、高純度のLMM-LPSpを産生する細菌が存在すれば、高純度のLMM-LPSpを簡易に産生することが可能となり、理想的なLPSを低コストで製造することができる。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明のリポ多糖は、受託番号N I T E B P - 0 3 5 6 2である細菌から得られることを特徴とする。

[0010] また、本発明のリポ多糖製造方法は、受託番号N I T E B P - 0 3 5 6 2である細菌からリポ多糖を得ることを特徴とする。

[0011] また、本発明のリポ多糖配合物は、前記リポ多糖が配合されていることを特徴とする。

[0012] 前記リポ多糖配合物は、医薬品、動物用医薬品、医薬部外品、化粧品、食品、機能性食品、飼料、肥料、又は浴用剤であることが好ましい。

発明の効果

[0013] 本発明のリポ多糖は、従来のパントエア・アグロメランスの遺伝情報に変化をひき起こして得られた細菌（寄託菌）から得られることによって、特別なゲルろ過法などを用いることなく、理想的な低分子量のものが得られる。また、本発明のリポ多糖の生物活性は、従来のリポ多糖よりも高いものであった。本発明のリポ多糖は、従来のリポ多糖と分子量と糖鎖組成が異なる新規リポ多糖であった。さらに、寄託菌からは加熱により本発明リポ多糖が遊離することから、これまで用いられていた精製過程を省いた家畜用飼料原料、食品原料、化粧品原料の調整法を用いることができるため、低コストで調整することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]本発明リポ多糖の分子量を示す電気泳動像を示す図である。

[図2]本発明リポ多糖のNO産生活性を示す図である。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明の好適な実施の形態について詳細に説明する。

実施例 1

[0016] 1. パントエア・アグロメランスIG1-47株の作成

(1-1) パントエア・アグロメランスの変異原処理による変異株の取得
パントエア・アグロメランス (IG1株) のコロニーの一部を掻き取りLB (

ルリアーベルターニ) 寒天培地に播き、35℃の恒温そう内で一晩培養した。そのコロニー一つを滅菌済みLB培地(バッフルフラスコで50mLスケール)で16時間(35℃、170rpm)培養した。その後、その培養液を遠心分離(3000rpm×5min)して菌を集菌し、50mMリン酸カリウム溶液(pH6.0)で懸濁した。菌数を1×10⁷個/mLに調製し、その1mLを1.5mLチューブに分注した。このチューブに変異原としてN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(MNNG)溶液を終濃度100μg/mLになるように加え、ゆるやかに混和した。その後、0.5、1、1.5、2、3及び4時間、37℃で保温した。各時間の後、遠心分離して、菌を回収し、これに50mMリン酸カリウム溶液(pH6.0)で洗浄操作(懸濁後に遠心分離して上清を捨て、再懸濁する操作)を2回行った。細胞懸濁液を、LB寒天培地にプレーティングし、37℃で一晩インキュベーションを行い、翌日コロニー数をカウントした(表1)。

[0017] 99.9%死滅していた3時間と4時間のMNNG処理のコロニーから、目視でコロニーの形状を評価した。無処理より大型のコロニー、白色のコロニー、艶が少ないコロニーを形成する菌株を優先的に選択した。その結果、候補変異菌株として、(1)大型、白色、艶が少ないコロニーを108個。(2)黄色、スムーズのコロニーを61個、(3)黄色-ラフのコロニーを3個、(4)淡黄色-スムーズのコロニーを6個、(5)乳白色-スムーズのコロニーを36個、(6)乳白色-ラフのコロニーを2個、を得た。

[0018] [表1]

表1. 変異原処理

処理	処理時間	菌数	死滅率	備考
	(hr)	(/mL)	(%)	
無処理		7,050,000	0.0	
MNNG 100 μg/mL	0.5	412,000	94.16	
	1	309,000	95.62	
	1.5	222,500	96.84	
	2	142,000	97.99	
	3	8,000	99.89	コロニー選択
	4	5,000	99.93	コロニー選択

[0019] (1-2) 分離菌株からのLPS高含量菌株のスクリーニング

108個の菌株(No.1~No.108)をLBプレート上で培養し菌体を回収した。湿菌体重量測定し、10mg/mLの水懸濁液を1mL調製して、90℃、20分間の加熱処理後に遠心分離して上清を熱水抽出液とした。この溶液に含まれるLPS量をトキシノメーター(富士フイルム和光純薬)でリムラス値(リムラステストによって得られる値、コントロールスタンダードエンドトキシン大腸菌UKT-B製のLPSの換算値)として測定した。LPS含量が高い5菌株(No.11、25、32、41、47)を候補菌株として選択した。

[0020] 無処理(親菌株)と候補菌株5種をLB培地(バッフルフラスコで50mLスケール)で16時間(35℃、170rpm)培養した(n=3)。培養後、集菌し、湿菌体重量測定し、10mg/mLの水懸濁液を調整し、その熱水抽出液を得た。熱水抽出液に含まれるLPS量をリムラス値で求めた。

[0021] その結果、候補菌株No.11及びNo.47の、湿菌体重量に対するLPS含量は、親菌株の平均 11.72 ± 1.28 mg/gに対して20mg/g以上であり、候補菌株No.11及びNo.47はともにLPS産生に優れた株であることがわかった。

[0022] LPSを調整する方法として菌体破砕物がある(特許文献3)。これは発酵培養液(菌体と培養液の両方にLPSが入っている)を材料に用いるので、培養液あたりのLPS産生量を評価することが望ましい。そこで、親菌株と候補菌株No.11とNo.47を培養し、42.5mLの培養液に対するLPS産生量を比較したところ、No.47は、菌体のLPS産生量が最も高く、菌体と培養上清を合わせた総量のLPS産生量も最も高かった(表2)。

[0023] [表2]

表2. 菌体、上清及び総量のLPS産生量

菌株	LPS産生量(mg/42.5mL培養液)		
	菌体	上清	総量
親菌株	4.08	5.90	9.98
No.11	3.67	8.82	12.49
No.47	5.97	6.89	12.86

[0024] (1-3) 候補株のNO産生活性誘導能

LPSの生物活性を、マクロファージの細胞情報伝達物質であり、抗ウイルス、抗菌物質でもある一酸化窒素(NO)の誘導活性で評価した。

[0025] 末梢血単球系培養細胞のRAW264.7 細胞 (1.6×10^5 cells/well)に2倍濃度の検体を含む培養液を添加して24時間培養した。NO産生量はその代謝産物である亜硝酸濃度をグリース試薬で測定した。パントエア・アグロメランス由来のLPS(LPSp: フナコシ、mac0001)濃度は乾燥重量で表し、検体のLPS濃度はリムラス測定によって比較した。

結果: No. 47菌株のNO産生はNo. 11菌株と親菌株よりも高いことが認められた(表3)。

[0026] [表3]

表3. NO産生量

LPSp濃度 (ng/mL)	亜硝酸濃度 (μ M)		
	親菌株 (平均 $\pm$ SD)	No. 11 (平均 $\pm$ SD)	No. 47 (平均 $\pm$ SD)
0	0.28 $\pm$ 0.1	0.28 $\pm$ 0.17	0.28 $\pm$ 0.17
0.01	0.22 $\pm$ 0.12	0.22 $\pm$ 0.13	0.29 $\pm$ 0.22
0.1	0.28 $\pm$ 0.12	0.29 $\pm$ 0.13	0.36 $\pm$ 0.19
1	6.61 $\pm$ 0.81	5.90 $\pm$ 0.46	8.66 $\pm$ 0.84 *

*: 親菌株とNo. 11に比べてTukeyの多重比較で有意に高い(n=4, P<0.001)

[0027] スクリーニングの結果LPS回収量とNO産生活性に基づいてLPS高含量株の候補としてNo. 47菌株を選択し、IG1-47と命名し、菌寄託した(生物材料寄託機関: 独立行政法人 製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター、あて名: 〒292-0818日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室、受託番号NITE BP-03562、受託の日付: 2021年11月25日)。

[0028] 2. パントエア・アグロメランスIG1-47株のLPS(IG1-47 LPSp)の性質評価

(2-1) パントエア・アグロメランスIG1-47株の培養

親菌株のパントエア・アグロメランス(IG1株)とIG1-47株をLB培地によりバッフルフラスコを用いて50mLスケールで16時間(35°C、170rpm)培養した。培養後、培養液を遠心分離により集菌(3.5krpm、30分間)した。上清

は別の容器に回収した。集菌した菌の湿菌体重量を測定した。IG1-47株の湿菌体回収量は3例の平均値と標準偏差が $273.4\text{mg} \pm 3.6\text{mg}$ であった。この湿菌体から 10mg/mL の水懸濁液を調製した。懸濁液の 0.5mL を 90°C で30分間加熱処理を行った。加熱処理後に超音波処理（10分間）とボルテックスミキサーを用いて攪拌した。懸濁液を水で希釈してトキシノメーター（富士フィルム和光純薬）を用いたリムラス値を測定した。

[0029] （２－２） パントエア・アグロメランスIG1-47株の菌体からのリポ多糖の精製

IG1-47株のコロニーの一部を掻き取りLB寒天培地に播き、 35°C の恒温そう内で一晚培養した。コロニー一つを滅菌済みLB培地 10mL に加え 35°C で 170rpm の振盪条件で前培養を行った。50mL入った250mLのバッフルフラスコに、前培養液を 0.05mL 入れ、 35°C にて一晚振盪培養した。培養後、50mL遠心チューブに培養液を移し、 3500rpm で遠心分離（KUBOTA モデル5220卓上遠心機）を行い、湿菌体 276.1mg を回収した。IG1-47株の湿菌体からのリポ多糖の精製はWestphalらの方法に従って行った。すなわち、湿菌体 276.1mg に蒸留水を加えて湿菌体 100mg/mL とした。菌を懸濁して、この液に同容量の90%フェノールを加え、 65°C から 70°C で15分間攪拌した。その後、 4°C まで液を冷却し、 3500rpm で遠心分離を行った。上層の水層 1mL を別の容器に回収し、残りのフェノール層と中間層に回収した水層と同量の蒸留水を加え、再度 65°C から 70°C で10分間攪拌し、リポ多糖を再抽出した。その後、 4°C まで液を冷却し、遠心分離を行った。2回目の水層 2mL を一回目の水層と合わせ、蒸留水を加えて10倍希釈し分画分子量1万の遠心式限外ろ過フィルタを用いてフェノールを含む低分子物質を除去した。この限外ろ過内液 3mL をさらに核酸分解酵素（ベンゾナーゼ）（ 20U/mL ）で処理した。限外ろ過により分解した核酸を除去した。内液をタンパク分解酵素（プロティナーゼK）（ $200\mu\text{g/mL}$ ）処理後、フェノール抽出を行い、その後、水層を分画分子量1万の遠心式限外ろ過フィルタを用いてフェノールを除去した。内液 4mL を回収した。本濃縮液をIG1-47株のパントエア・アグロメランスの精製リポ多糖

(IG1-47 LPSp) 溶液とした。本溶液を凍結乾燥して乾燥重量を測定した。精製リポ多糖の乾燥重量は2.0mgであった。

[0030] (2-3) リポ多糖IG1-47 LPSpの分子量の測定

トリシンを用いたドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(濃度20%のゲル、SDS-PAGE)により、IG1-47 LPSp (0.1 μ g/レーン)とクロマト精製LMM-LPSp (0.1 μ g/レーン)の分子量を解析した。泳動後、リポ多糖の分子を可視化させる目的で銀染色キット(Cat291-50301、銀染色Iキット 富士フイルム和光純薬)により銀染色を行った。糖脂質であるLPSは通常用いられているタンパク質分子量マーカとは挙動が異なるので、分子量サイズが知られている糖脂質を分子量マーカとして(サルモネラ・ミネソタRb2 LPS (分子量: 3878Da) (0.3 μ g/レーン)、サルモネラ・ミネソタRd2 LPS (分子量: 2777Da) (0.3 μ g/レーン))を用いた。

[0031] 結果を図1に示した。レーン(3)のIG1-47 LPSpは1本のバンドを示した。レーン(4)の親菌株LPSのクロマト精製LMM-LPSpは2本のバンドが確認できた。

[0032] IG1-47 LPSpのバンド位置はクロマト精製したLMM-LPSpの2本のバンドの低分子側のバンドより若干低い位置を示した。正確な分子量は不明であるが、4000Da程度と推測された。

[0033] (2-4) リポ多糖IG1-47 LPSpの組成の測定

精製IG1-47 LPSp 10mgを電子天秤で秤量し15mL容のコニカルチューブに加えた。注射用蒸留水を加えて2.0mg/mLのIG1-47 LPSp水溶液を調製した。

[0034] (2-4-1) 核酸含量測定

核酸濃度測定用に2.0mg/mLのIG1-47 LPSp水溶液50 μ Lを蒸留水950 μ Lに加え100 μ L/mLとしてプレートリーダーにより200nm~340nmの範囲でスペクトルを測定した。260nmの吸光度値から320nmの吸光度値を除いた値に50 μ g/mLを乗じて核酸含量を測定した。260nmの吸収波長ではピークは認められなかった。260nmの吸光度値から320nmの吸光度値を除いた値からの推定核酸含量は5.6%であった。260nmにピークが認められないことから核酸は計算値より少な

く、IG1-47 LPSpの濁度による吸光度が含まれる為、推定核酸含量は5.6%以下と推定された(表4)。

[0035] (2-4-2) タンパク質含量測定

タンパク質含量をローリー法で測定した。

牛血清アルブミンをタンパク質の標準品として測定し、牛血清アルブミン換算値でIG1-47 LPSpに含まれるタンパク質含量は0.75%と測定された(表4)

。

[0036] (2-4-3) 中性糖含量測定(フェノール硫酸法)

中性糖含量はフェノール硫酸法を用いて、グルコースを標準品として測定した。

測定値は40.6%であった。同時に測定したクロマト精製LMM-LPSpは34.0%であった(表4)。

[0037] [表4]

表4. IG1-47 LPSpとクロマト精製LMM-LPSpの核酸、タンパク及び中性糖含量

LPS	核酸(%)	タンパク(%)	中性糖(%)
No. 47 LPS Lot. 2101011	<5.6	0.75	40.6
クロマト精製LMM-LPSp Lot. 160708	<0.22	0.24	34.0

[0038] (2-4-4) 単糖組成分析(加熱分解法)

単糖組成の分析を行った。加水分解後にABE誘導体としてHPLCで解析した。

その結果、IG1-47 LPSpは5種の糖が測定された(表5)。LMM-LPSpも5種の糖が測定された(表5)。

[0039] IG1-47 LPSpとLMM-LPSpとの各糖の比率(GlcNAcを2とした場合)を比較するとIG1-47 LPSpがグルコース(Glc)とラムノース(Rha)が約1ずつ多かった。

この結果よりIG1-47 LPSpとLMM-LPSpでは単糖組成の比率に違いがあることがわかった。

[0040]

[表5]

表 5. IG1-47 LPSpの単糖解析

構成糖	IG1-47 LPSp	LMM-LPSp
GalA	3. 7 9	4. 2 5
Gal	1. 3 4	1. 2 2
Glc	3. 1 9	1. 9 9
GlcNAc *	2. 0 0	2. 0 0
Rha	1. 2 4	0. 1 9

* : GlcNAcを2とした場合の相対比率を表示

[0041] (2-4-5) 免疫賦活作用の測定1 (RAW264.7細胞からのNO産生)

マウスのマクロファージ系培養細胞株であるRAW264.7に、LPSを添加した後の、細胞からの一酸化窒素(NO)産生をNO代謝物の亜硝酸の培養液中の濃度を指標として測定した。RAW264.7はATCC (No. TIB-71) より購入した。対照としてLPSp(親菌株のLPS、mac0001)を用いた。RAW264.7細胞は培養フラスコからピペティングにより回収し、培養液(10%牛胎児血清含有、ペニシリン100U/ml、ストレプトマイシン100μg/ml含有RPMI1640培地)により細胞濃度を 1.6×10^6 個/mlに調整した。細胞懸濁液100μl(1.6×10^5 個/100μl)を96穴平底プレートの各穴に移し、3時間後に試験に用いた。IG1-47 LPSpを2000ng/mlになるように調整した。さらに10倍ずつ5段階の段階希釈を行い細胞の入ったウェルへの添加用標品とした。同時に、LPSp、クロマト精製LMM-LPSpも試験した。各標品を予め細胞を添加してある96穴平底プレートの各穴に100μlずつ添加した。24時間37℃、5%炭酸ガス培養器内で培養し、培養終了後、上清100μlを別の96穴プレートに回収した。常法に従いグリエス試薬を用いて培養液中の一酸化窒素の代謝物である亜硝酸量を測定した。

[0042] [測定結果]

IG1-47 LPSpは、クロマト精製LMM-LPSp及びLPSpと比べて有意に高いNO産生活性が認められた。(図2)。

[0043] (2-4-6) 免疫賦活作用の測定2 (THP-1細胞でのTNFα産生)

ヒト単球性白血病細胞の培養細胞株であるTHP-1にLPSを添加した後のTNF α 産生をELISAにより測定した。THP-1 (JCRB0112.1) はJCRB細胞バンクより購入した。対照としてLPSp (親菌株のLPS、mac0001)、クロマト精製LMM-LPSpを用いた。

[0044] THP-1細胞は培養フラスコからピペティングにより回収し、培養液 (10%牛胎児血清含有、ペニシリン100U/ml、ストレプトマイシン100 μ g/ml含有RPMI1640培地) により細胞濃度を 8×10^5 個/mlに調整した。細胞懸濁液100 μ l (8×10^4 個/100 μ l) を96穴平底プレートの各穴に移した。IG1-47 LPSpを2000ng/mlになるように調整した。さらに10倍ずつ5段階の段階希釈を行い細胞の入ったウェルへの添加用標品とした。同時に、LPSp、クロマト精製LMM-LPSpも試験した。各標品を予め細胞を添加してある96穴平底プレートの各穴に100 μ lずつ添加した。24時間37 $^{\circ}$ C、5%炭酸ガス培養器内で培養し、培養終了後、上清をプラスチックチューブに回収した。TNF α のキットの測定方法に従い培養液中のTNF α 濃度を測定した。

[0045] [測定結果]

IG1-47 LPSpは、クロマト精製LMM-LPSpと比べて0.1ng/mLの用量で5倍にも及ぶ有意に高いTNF α 産生を示した (表6)。

[0046] [表6]

表6. 各LPS (0.1ng/ml) のTNF α 産生量

Sample	TNF α (pg/ml $\pm$ SD)
LPSp	0.1 $\pm$ 0.0
LMM-LPSp	2.0 $\pm$ 2.1
IG1-47 LPSp *	10.1 $\pm$ 2.6

* : IG1-47 LPSpのTNF α 産生量は、LMM-LPSpとLPSpとの間に有意差あり ($P < 0.05$)

[0047] 以上、IG1-47 LPSpは従来のLMM-LPSpと構造が異なり、高い自然免疫活性化能を持ち、低コストで製造可能であることを明らかにした。

得られたリポ多糖は、医薬品、動物用医薬品、医薬部外品、化粧品、食品

、機能性食品、飼料、肥料、及び浴用剤などに配合して有益である。

[0048] 明細書、特許請求の範囲及び図面を含む2023年4月24日出願の日本特許出願特願2023-071020の開示は、そのまま参考として、ここにとり入れるものとする。

本明細書で引用したすべての刊行物、特許及び特許出願は、そのまま参考として、ここにとり入れるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] 受託番号N I T E B P - 0 3 5 6 2である細菌から得られることを特徴とするリポ多糖。
- [請求項2] 受託番号N I T E B P - 0 3 5 6 2である細菌からリポ多糖を得ることを特徴とするリポ多糖製造方法。
- [請求項3] 請求項1記載のリポ多糖が配合されていることを特徴とするリポ多糖配合物。
- [請求項4] 前記リポ多糖配合物が、医薬品、動物用医薬品、医薬部外品、化粧品、食品、機能性食品、飼料、肥料、又は浴用剤であることを特徴とする請求項3記載のリポ多糖配合物。