報 文

[Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol. 66, No. 11, pp. 1633~1640, 1992]

シゾフィランの γ 線照射による低分子化田畑 礪吾, 伊藤 渡, 平田昭夫, 小島健正
(台糖株式会社研究所)

平成 4 年 4 月 17 日 受 理

Depolymerization of Schizophyllan by Gamma-ray Irradiation

Kengo TABATA, Wataru ITO, Akio HIRATA, and Takemasa KOJIMA
Research Laboratory, Taito Co., Ltd., 1-26, Higashishiraiike-shinmachi Nagataku,
Kobe 653, Japan

Schizophyllan, an antitumor (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan that takes on a triple helical structure in aqueous solution, was irradiated with gamma-ray at doses of 0.058 to 8.4 Mrad. The molecular weight of the polysaccharide decreased as the dose of radiation increased, and the number of reducing group increased. Methylation analysis by enzymic hydrolysis with exo- β -1,3-glucanase and antitumor tests showed that the polysaccharide after irradiation at 0.058 or 0.26 Mrad had essentially the same chemical structure and antitumor activity as native schizophyllan. Treatment at 2 or 8.4 Mrad caused changes in the chemical structure and antitumor activity. The depolymerization mechanism seemed to be different from that caused by ultrasonic treatment or hydrodynamic shearing, because irradiation most readily caused changes in the chemical structure and antitumor activity.

(Received April 17, 1992)

緒 言

シゾフィランはスエヒロタケ (*Schizophyllum commune* Fries) によって産生される水溶性の β -1,3-D-グルカンで, 主鎖のグルコース残基 3 個に 1 個の割合で単一のグルコースが β -1,6 結合を介して分岐した構造を有している⁽¹⁾. 抗腫瘍性活性を示す β -1,3-グルカンは数多く報告されているが, シゾフィランも種々の実験腫瘍に対して優れた抗腫瘍効果を示すことが報告されており⁽²⁾, 現在では分子量 45 万のシゾフィランが子宮頸癌の治療薬として放射線療法と併用されている⁽³⁾.

シゾフィランは水溶液中で剛直な三重らせん構造を有していることが則末らにより報告されているが⁽⁴⁾, そのためにその水溶液は多糖濃度の割に高粘性かつチクソトロピックな流動特性を示す. 著者らはシゾフィラン水溶液の低粘度化に対し種々検討を加え, シゾフィラン水溶液を超音波照射, あるいは細管から高速で噴射 (高速噴

射法) させることによりその薬理活性や分子構造を変えことなくシゾフィラン分子が低分子化されることを報告してきた^(5,6). しかし, これらの方法では分子量が小さくなるに従い低分子化の効率が悪く, 分子量数万のシゾフィランを得るには長時間の処理を必要とすることから, 本研究では澱粉やセルロース等の低粘度化法として古くより数多くの報告がみられる⁽⁷⁻⁹⁾ γ 線照射をシゾフィラン水溶液に適用したときのシゾフィランの低分子化について検討したので報告する.

実 験 方 法

1. γ 線照射試料 菊本らの方法により⁽¹⁰⁾ *Schizophyllum commune* Fries を培養して得た培養液から菌体を濾別し, 得られた濾液を活性炭処理した後, 純水に対し透析した. 透析内液に同容量のアセトンを添加し生成した沈殿を遠心分離で回収し, 真空乾燥して得たシゾフィラン (N-SPG) を γ 線照射試料とした.

Table I. Total Dose of γ -ray Used in This Experiment

Sample	Distance from γ -ray source (cm)	Total dose of γ -ray (Mrad)
No. 1	10.5	8.4
No. 2	30	2
No. 3	50	0.8
No. 4	100	0.26
No. 5	200	0.058

2. γ 線照射条件 N-SPG の 1% 水溶液をバイレックス製ガラスアンプル (厚さ 0.1 cm, 3.2×15 cm) 5 個に約 60 ml ずつ注入し減圧密封した。おのおののアンプルを ^{60}Co γ 線発生源よりそれぞれ 10.5 cm (試料 No. 1), 30 cm (試料 No. 2), 50 cm (試料 No. 3), 100 cm (試料 No. 4), および 150 cm (試料 No. 5) の距離に同心円上に配置し, 室温で 20 時間 γ 線を照射した。おのおのの試料の γ 線照射線量を Table I に示した。

3. γ 線照射液中の還元力, 遊離グルコースの測定およびオリゴ糖の検索 γ 線照射液中の還元力の測定は Somogyi-Nelson 法⁽¹¹⁾により, 遊離グルコースの測定は glucostat 試薬 (Worthington Biochemical Co.) を用いた酵素法⁽¹²⁾により行い, オリゴ糖の検索についてはペーパークロマトグラフィー (PPC) および薄層クロマトグラフィー (TLC) を行った。

(1) PPC: γ 線照射液 10 μl を東洋濾紙 No. 50 に塗布した後, 1-ブタノール・ピリジン・水 (6:4:3, v/v/v) で展開した。風乾後, 硝酸銀試薬⁽¹³⁾により発色させた。

(2) TLC: シリカゲル 60 (Merck 社製) を 0.25 mm 厚にコーティングした薄層板に γ 線照射液 10 μl を塗布した後, イソプロパノール・水・1-ブタノール (12:4:3, v/v/v) で展開した。薄層板を風乾後, 5% フェノール溶液次いで 50% 硫酸を噴霧し, さらに 110°C で 30 分間加熱し発色させた。

4. γ 線照射試料の物性および構造解析 各アンプルの γ 線照射液の凍結乾燥粉末 (試料) につき以下の解析に供した。

(1) 分子量の測定: 試料の一部をとりその一定量を水に溶解し, ウペローゼ型粘度計により 25°C で極限粘度を測定した。則末らにより得られた極限粘度の分子量の関係⁽⁴⁾を用いておのおのの試料の重量平均分子量を求めた。

(2) ゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量分布

の測定: 試料および N-SPG を 50 mM 酢酸ナトリウムに溶かし, 0.1% 溶液としその 1 ml を Sephacryl S-500 (Pharmacia 社製) を充填したカラム ($1.5 \text{ cm} \times 40 \text{ cm}$) に注入した後, 50 mM 酢酸ナトリウム (6.7 ml/hr) で溶出させた。溶出液を 2 ml ずつ分取し, おのおのの分取液はフェノール・硫酸法⁽¹⁴⁾により発色させた。

(3) 構成糖分析: 試料および N-SPG それぞれ 10 mg を 1 M-硫酸 2 ml に溶かし, 120°C で 1 時間加水分解した。加水分解液を炭酸バリウムで除去し, 上清を IR-120 (H^+ 型) イオン交換樹脂で脱塩した。脱塩液に少量の水素化ホウ素ナトリウムを加え分解物を還元した後, 過剰の水素化ホウ素ナトリウムを分解除去した。その後, 無水酢酸・ピリジン (1:1) を 1 ml 加え, 100°C, 2 時間反応し, 得られたアルジトールアセテイトをガスクロマトグラフィー分析に供した。ガスクロマトグラフィーは水素炎イオン化検出器を連結した柳本製作所製 YANACO G-80 を用い, カラムは 3% ECNSS-M をコーティングした Gaschrom Q ($0.33 \times 225 \text{ cm}$) を用い, カラム温度 190°C で行った。

(4) メチル化分析: 試料および N-SPG それぞれ約 5 mg を秤量し, 箱守法⁽¹⁵⁾によりメチル化を行った。メチル化を 3 回繰り返すことによって完全メチル化物を得た。なお, メチル化の完了は赤外吸収による水酸基の吸収の消失により確認した。完全メチル化物は 90% ギ酸で 100°C, 12 時間加水分解した後, ギ酸を留去し, さらに 2N-トリフルオロ酢酸で 100°C, 7 時間加水分解を行った。加水分解物はトリフルオロ酢酸を留去した後, 前述の構成糖分析と同様にアルジトールアセテイトとしガスクロマトグラフィー分析に供した。

(5) 酵素分析: 試料および N-SPG それぞれ 50 mg に pH 4.0 の McIlvaine 緩衝液 2 ml を加え, 溶解または懸濁させた後, Basidiomycetes QM-806 を Reese らの方法⁽¹⁶⁾により培養して得た $\text{exo-}\beta$ -1, 3-グルカナーゼ溶液 100 ml (約 50 単位) を加え 40°C の恒温槽中で 5 時間反応させた。反応 1 時間, 3 時間および 5 時間後に反応液を採取し, 煮沸して酵素を失させた後, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC), Somogyi-Nelson 法⁽¹¹⁾および Glucostat 法⁽¹²⁾に供した。

(6) HPLC 分析: 粒径 2.5 μm ハイパー Lichrosorb NH_2 (関東化学社製) を充填した内径 4 mm, 長さ 250 mm のカラムを連結したウォーターズ社製 Model 6000 A を用いた。溶離液として 65% アセトニトリル水溶液

を 1 ml/min の割合で流下させた。

5. 抗腫瘍性試験 N-SPG および試料を生理食塩水 2 ml に溶かして 0.5% 溶液とした後、以下の抗腫瘍試験に供した。

体重 20~25 g の栄養状態のよい健康な JCL-ICR マウスを試験群、対照群それぞれ 10 匹ずつ同数用いる。JCL-ICR マウスで継代した Sarcoma-180 の細胞(1週間後の腹水)約 2×10^6 個をリン酸塩等張緩衝液で希釈し 0.1 ml とした液を試験群および対照群のマウスの鼠蹊部皮下に移植する。試験群は腫瘍移植後 24 時間に、マウスの体重 1 kg につき、試料重量で 10 mg になるように、上記生理食塩水溶液 0.05 ml を大脳部に筋肉注射する。

腫瘍移植後 31 日目に腫瘍を摘出して重量を量り、各群の平均重量を求め、次の式によって抑制率を計算する。

$$\text{抑制率(\%)} = \left(1 - \frac{\text{試験群の平均腫瘍重量 (g)}}{\text{対照群の平均腫瘍重量 (g)}}\right) \times 100$$

実験結果

1. 還元末端基数および遊離グルコース量の変化

γ 線照射線量(rad)と還元末端基数(グルコースとして換算, $\mu\text{mol/ml}$)および遊離グルコース量($\mu\text{mol/ml}$)の変化を両対数グラフ(Fig.1)に示した。 γ 線照射線量の対数と還元末端基数の対数はほぼ直線関係になり、 γ 線照射線量の増加に伴い還元末端基数は大きく増加していくことが認められた。一方、遊離グルコースは γ 線照射線量が増加してもほとんど変化がなかった。

2. PPC および TLC

γ 線照射線量が比較的低い試料(No.3, 4, 5)では

Fig. 1. Increase in Reducing End Group (●) and Free Glucose (○) during γ -ray Irradiation.

PPC および TLC 上で原点以外のスポットは観察されなかったが、 γ 線照射線量が高い試料(No.1, 2)では原点からラミナリトリオースの R_f 値付近までわずかながらあるがテーリング状の呈色が認められたことより、わずかながらオリゴ糖の生成が示唆された。

3. 分子量の変化およびゲルクロマトグラフィー

γ 線照射による分子量の変化を Fig.2 に示した。 γ 線照射線量の増加に伴い SPG の分子量は低下していくが、分子量が小さくなるにつれ、分子量の低下割合は照射線量が増加していくにもかかわらず減少していくことが認められた。 γ 線無照射試料(N-SPG, 分子量: 600 万)と γ 線 0.8 Mrad 照射試料(No.3, 分子量: 23 万)および 2.0 Mrad 照射試料(No.2, 分子量: 11 万)についてのゲルクロマトグラフィーの結果を Fig.3 に示した。それぞれのゲルクロマトグラムは N-SPG, No.3, No.2 の順に低分子側に溶出されていくことが示された。このことは、SPG の γ 線照射による低分子化は主として SPG の主鎖の切断に基づくものと推察される。No.3 のクロマトグラムでは2つのピークがみられたが、N-SPG の溶出位置に相当する高分子側のピークは No.2 のクロマトグラムでは完全に消失していることから、未分解の N-SPG と思われる。

4. γ 線照射試料の化学構造

1) 構成糖分析 試料を 1 M-硫酸で加水分解した後アルジトールアセテイトとしてガスクロマトグラフィーに供した結果、いずれの試料も単糖としてグルコース

Fig. 2. Change in Molecular Weight of Schizophyllan during γ -ray Irradiation.

Fig. 3. Gel-filtration Patterns of Irradiated Schizophyllans on a Sephacryl S-500.
 ▲, Native schizophyllan; ●, schizophyllan preparation after 0.8 Mrad
 irradiation; ×, schizophyllan preparation after 2 Mrad irradiation.

Table II. Methylation Analysis of N-SPG and γ -ray Irradiated Samples

O-Methyl-D-glucose	Linkage indicated	Molar ratios					
		N-SPG	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
2, 3, 4, 6-Tetra	Glc (1→	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2, 4, 6-Tri	→3) Glc (1→	1.91	3.82	3.27	2.80	2.01	1.96
2, 4-Di	→3) Glc (1→ ↑	1.01	1.53	1.64	1.85	1.09	0.92

しか検出されなかった。

2) メチル化分析 試料をメチル化後加水分解し、構成糖分析と同様アルジトールアセタイトとしガスクロマトグラフィーに供した結果を Table II に示した。N-SPG, No. 5 および No. 4 では 2, 3, 4, 6-テトラ-D-メチル-グルコース (2, 3, 4, 6-Me-G), 2, 4, 6-トリ-D-メチル-グルコース (2, 4, 6-Me-G) および 2, 4-ジ-D-メチル-グルコース (2, 4-Me-G) の存在が確認され、それらのモル比はそれぞれ 1.00 : 0.91 : 1.01, 1.00 : 1.96 : 0.92 および 1.00 : 2.01 : 1.09 という値が得られた。このことは低照射線量の試料 No. 5 および No. 4 は N-SPG とほぼ同様の化学構造を維持していることを示している。一方、高照射線量の試料 No. 3, No. 2 および No. 1 では 2, 3, 4, 6-Me-G, 2, 4, 6-Me-G, および 2, 4-Me-G のモル比は 1.00 : 2.80 : 1.85, 1.00 : 3.27 : 1.64 および 1.00 : 3.82 : 1.53 と N-SPG と比べ著しく異なった値となった。このことは No. 3, No. 2 および No. 1 は N-SPG と異なった化学構造に変化したことを

示している。とくに No. 2 および No. 1 と γ 線照射量が多くなるにつれて化学構造の変化は大きくなることが示唆された。

3) 酵素分析 Somogyi-Nelson 法⁽¹¹⁾および Glucostat 法⁽¹²⁾による分解率の経時変化をそれぞれ Fig. 4 a および Fig. 4 b に示した。分解率は Somogyi-Nelson 法の場合は酵素分解液中の還元糖をグルコース換算した値 ($\mu\text{g/ml}$) を、また、Glucostat 法の場合は酵素分解液中のグルコース濃度 ($\mu\text{g/ml}$) をそれぞれ酵素反応開始時の試料濃度 ($\mu\text{g/ml}$) で除して算出した。したがって β -1, 3 結合をした主鎖のグルコース残基 3 個に対し、 β -1, 6 結合をした側鎖のグルコース残基が 1 個の割合で規則的に繰り返した構造を有している N-SPG の場合、分解率の理論値としては Somogyi-Nelson 法では 75%, Glucostat 法では 50% となる。Fig. 4 a および b に示したように各試料の分解率は Somogyi-Nelson 法と Glucostat 法ではほとんど同様の経時変化を示した。No. 5 および No. 4 は N-SPG とほぼ同様の分解率および分解率

(a)

(b)

Fig. 4. Time Course of Enzymatic Degradation of Irradiated Schizophyllans by Exo- β -1,3-glucanase. The hydrolysis (%) is expressed as the ratio of glucose content to total carbohydrate content in the hydrate. (a), The glucose content was determined by Somogyi-Nelson method; (b), The glucose content was determined by Glucostat method. $\circ$, Native schizophyllan; $\square$, schizophyllan preparation after 0.058 Mrad irradiation; $\bullet$, schizophyllan preparation after 0.26 Mrad irradiation; $\blacksquare$, schizophyllan preparation after 0.8 Mrad irradiation; $\triangle$, schizophyllan preparation after 2 Mrad irradiation; $\blacktriangle$, schizophyllan preparation after 8.4 Mrad irradiation.

の経時変化が得られ、反応開始2～3時間ではほぼ理論値の75%に近い値に達したが、No. 3, No. 2およびNo. 1の分解率およびその経時変化はN-SPGとは明らかに異なっていた。とくにNo. 2およびNo. 1でその差は

Table III. Molar Ratios (R) of Gentiobiose and Glucose Liberated from Irradiated Samples with Exo- β -1,3-glucanase

Sample	R 値		
	Reaction time 1 hr	Reaction time 2 hr	Reaction time 3 hr
N-SPG	1.06	1.01	1.07
No. 1	0.51	0.54	0.45
No. 2	0.68	0.66	0.76
No. 3	1.03	0.96	0.99
No. 4	1.01	1.06	1.05
No. 5	1.09	1.17	1.05

顕著であり、No. 2およびNo. 1の分解率はSomogyi-Nelson法でそれぞれ約50%および約20%、またGlucostat法でそれぞれ約30%および10%程度と理論値に比べ極端に低い値しか得られなかった。これらのことは、No. 5およびNo. 4はN-SPGとその化学構造がほとんど同じであるがNo. 2およびNo. 1では大きく異なっていることを示唆するものであり、メチル化分析の結果を支持するものである。

高速液体クロマトグラフィーにより求めた酵素分解液中のグルコースとゲンチオビオースの比(R)をTable IIIに示した。ここで R は下記式により定義した。

$$R = \frac{\text{標準溶液のグルコースのピーク面積}}{\text{標準溶液のゲンチオビオースのピーク面積}} \times \frac{\text{酵素分解液のゲンチオビオースのピーク面積}}{\text{酵素分解液のグルコースのピーク面積}}$$

酵素分解液中のグルコースとゲンチオビオースの定量は屈折率により求めたので、クロマトグラム上のピーク面積はゲンチオビオース1モルがグルコース2モルに相当することになる。N-SPGではexo- β -1,3-グルカナーゼにより理論的にはゲンチオビオース1モルとグルコース2モルが生成されることになり、したがって R の理論値は1となる。No. 5, No. 4およびNo. 3では酵素分解時間に関係なくN-SPGと同様、 R はほぼ1となったが、No. 2およびNo. 1では R はそれぞれ0.45～0.54および0.66～0.76となり、1よりも小さい値が得られた。このことはNo. 5, No. 4およびNo. 3ではN-SPGと同様酵素分解によりゲンチオビオースが1対2のモル比で生成されるが、No. 2およびNo. 1ではゲンチオビオースとグルコースのモル比が1対2よりも小さくなることを意味しており、No. 2およびNo. 1では β -1,6-グリコシド結合の存在割合がN-SPGに比べ減少していることが示唆された。

Table IV. Antitumor Activities of N-SPG and γ -ray Irradiated Samples

Sample	Dose (mg/kg)	Tumor weight(g) Mean $\pm$ S. E.	Inhibition ratio (%)
N-SPG	10 $\times$ 1	0.38 $\pm$ 0.330	90.3
No. 1	10 $\times$ 1	4.63 $\pm$ 3.468	-18.4
No. 2	10 $\times$ 1	3.61 $\pm$ 2.920	7.7
No. 3	10 $\times$ 1	0.84 $\pm$ 0.562	78.5
No. 4	10 $\times$ 1	0.39 $\pm$ 0.697	90.0
No. 5	10 $\times$ 1	0.48 $\pm$ 0.613	87.7
Control	10 $\times$ 1	3.91 $\pm$ 2.858	—

5. 抗腫瘍性試験結果

Table IV に Sarcoma-180/JCL: ICR マウス系での N-SPG および γ 線照射試料の抗腫瘍性試験結果を示した。

比較的高分子量の No. 5 (分子量: 75.2 万), No. 4 (分子量: 38 万) および No. 3 (分子量: 23 万) ではその腫瘍抑制率 (I. R.) はそれぞれ 87.7%, 90.0%, および 78.5% と N-SPG の I. R. 90.3% とほぼ同等の高い結果が得られた。一方, 比較的低分子量の No. 2 (分子量: 11 万) および No. 1 (分子量: 2.6 万) ではその I. R. はそれぞれ 7.7% および -18.4% とほとんど抗腫瘍活性はみられなかった。超音波照射法によって得た低分子 SPG と同様⁽¹⁷⁾ γ 線照射によって得た低分子 SPG は分子量の低下に伴い急激にその抗腫瘍活性を消失することが示された。

考 察

食品に対する γ 線照射の研究は古くからみられ, 主として食品の殺菌⁽¹⁸⁾, 加工⁽¹⁹⁾等に関連して行われてきた。多糖類の分解に対する γ 線照射の効果も, デンプン^(7,8), セルロース⁽⁹⁾, ヒアルロン酸⁽²⁰⁾等種々の多糖に研究例がみられる。 γ 線照射による糖の分解は水の存在下放射線によって生成される OH ラジカル ($\cdot$ OH) に基づくものといわれており⁽²¹⁾, $\cdot$ OH はフェントン試薬 ($\text{H}_2\text{O} + \text{Fe}^{2+}$) によっても生成され, 同試薬を用いた分解⁽²²⁾も各種の多糖で報告されている。

しかし, 本研究に用いたシゾフィランのような β -1, 3-グリコシド結合を主鎖とする β -1, 3-グルカン類については, 放射線やフェントン試薬による分解は報告されていない。著者らは超音波照射や高速噴射処理といった機械的分解方法によりシゾフィランがその基本構造や抗腫瘍活性を変えることなく低分子化されることを報告し

てきたが, 本研究では γ 線照射によっても超音波照射法や高速噴射法と同様な低分子化が可能か否か, また, 数万程度の分子量のものが効率的に得られるかどうかについて検討を行った。1% のシゾフィラン水溶液に γ 線を 0.058 Mrad から 8.4 Mrad の範囲で照射したとき, 照射線量の増加に伴いシゾフィランは低分子化されていくことが分子量の測定 (Fig. 2), ゲル濾過クロマトグラフィー (Fig. 3) の結果から示された。しかし, メチル化分析 (Table II), *exo*- β -1, 3-グルカナーゼによる分解率 (Fig. 4a, b) および同酵素により生成されるゲンチオビオースとグルコースのモル比 (Table III) 等の結果から, 0.058 Mrad および 0.26 Mrad の低照射線量で得られた低分子化シゾフィラン (No. 5 および No. 4) は非照射の N-SPG とまったく同様の基本構造を示したが, 0.8 Mrad, 2 Mrad および 8.4 Mrad と高照射線量で得られた低分子化シゾフィラン (No. 3, No. 2 および No. 1) は N-SPG と大きく異なった基本構造を示した。また, マウス Sarcoma-180 に対する抗腫瘍性試験の結果は, No. 5 および No. 4 では N-SPG と同様約 90% の高い腫瘍抑制率 (I. R.) を示したが, No. 3, No. 2 および No. 1 では急激に I. R. は低下し No. 2 および No. 1 ではそれぞれ 7.7%, -18.4% とまったく I. R. が消失してしまうことが示された。著者らは超音波照射法によって得た種々の低分子シゾフィランについて分子量と I. R. の関係を検討し, 分子量が約 10 万までは 90% 以上の高い I. R. が維持されることを明らかにしてきた⁽²³⁾ が, 今回 γ 線照射によって得た低分子試料 No. 2 は約 11 万の分子量であるにもかかわらず I. R. は 7.7% とまったく消失していた。この原因としては前述したように N-SPG と比べ基本構造が大きく変わったことが主要な原因と考えられるが, シゾフィランの抗腫瘍活性がその三重らせん構造に依存していることを考えると三重らせん構造の一本鎖ランダムコイルへの融解も否定できない。今後の研究課題である。

鬼頭ら⁽²⁴⁾はフルクトース, グルコース, スクロースの 20 mM 水溶液に 1 Mrad の γ 線を照射したとき, 10~30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のレダクトン様物質が生成されることを報告している。

本研究でも 8.4 Mrad の照射液が褐色に着色したが, 鬼頭らのいうレダクトン様物質の生成が着色に関係しているものと考えられる。Fig. 1 に γ 線照射線量と還元末端基数および遊離グルコース量の関係を示した。還元末

端基数は照射線量の増加に伴い増えているが遊離のグルコースは不変であった。前述の構造解析の結果、および鬼頭らの報告から考えると、高照射線量ではシゾフィラン分子からグルコースが生成するものの、生成したグルコースの大部分はすぐに再びシゾフィラン分子とランダムに結合するか、あるいはレダクトン様物質に変化し、結果的に遊離のグルコースとして検出されてこなかったものと推察される。超音波照射によるシゾフィランの低分子化では分子量が約5千付近までその基本構造は N-SPG とまったく変わらない⁽¹⁷⁾が、 γ 線照射法では 0.8 Mrad で得た No.3 (分子量: 23 万) ですでに N-SPG と基本構造の違いが示されたことから、 γ 線照射によるシゾフィランの低分子化は超音波照射法に比べ構造の変換が起こりやすいことを示している。しかし、シゾフィランの化学構造や抗腫瘍活性に影響がみられなかった分子量 40 万付近までの低分子化には超音波照射法や高速噴射法と同様 γ 線照射法も十分利用可能であるし、照射条件とくに線量率を変えることによって、低分子化の範囲は広がるものと思われる。

要 約

0.058 Mrad から 8.4 Mrad の範囲でシゾフィランの 1% 水溶液に γ 線を照射したときのシゾフィランの低分子化について検討を加え、以下の結果を得た。

(1) 照射液中の還元末端基数、ゲル濾過クロマトグラフィーおよび分子量の測定結果から、シゾフィランは γ 線照射により主として主鎖の分解による低分子化が起き、照射線量に比例して分子量が低下していくことが明らかとなった。

(2) 0.058 Mrad および 0.26 Mrad の比較的低照射線量で得たシゾフィランの分子量はそれぞれ 75.2 万および 38 万であったが、それらの基本構造はメチル化分析、exo- β -1,3-グルカナーゼによる検討により非照射のシゾフィランの基本構造とまったく同一であった。一方、0.8 Mrad, 2 Mrad および 8.4 Mrad の高照射線量で得たシゾフィランの分子量はそれぞれ 23 万, 11 万, および 2.6 万であったがそれらの基本構造は非照射のシゾフィランと比べ大きく変化し、その変化の度合いは照射線量が高くなるほど大きくなった。

(3) マウス Sarcoma-180 腫瘍に対する抗腫瘍性試験の結果から、分子量 75.2 万および 38 万の低分子シゾフィランは N-SPG と同様約 90% の腫瘍抑制率を示

したが、基本構造の変化が著しかった分子量 11 万および 2.6 万のシゾフィランはまったく抗腫瘍活性がみられなかった。

以上の結果から、 γ 線照射法によっても超音波照射法と同様、シゾフィランの基本構造や抗腫瘍活性を変えることなく約 30 万の分子量まで低分子化が可能であることが示された。

- (1) 菊本昭一, 宮島 徹, 木村恵太郎, 大久保幸枝, 小松信彦: 農化, **45**, 162—168 (1971).
- (2) N. Komatsu, S. Okubo, S. Kikumoto, and S. Sakai: *GANN*, **60**, 137—144 (1969).
- (3) K. Okamura, M. Suzuki, T. Chihara, A. Fujiwara, T. Fukuda, S. Goto, K. Ichinohe, S. Jimi, T. Kasamatsu, N. Kawai, K. Mizuguchi, S. Mori, H. Nakano, K. Noda, K. Sekiba, K. Suzuki, T. Suzuki, K. Takahashi, J. Takeuchi, S. Takeuchi, A. Yajima, and N. Ogawa: *Cancer*, **58**, 865—872 (1986).
- (4) K. Norisuye, T. Yanaki, and H. Fujita: *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.*, **18**, 547—558 (1980).
- (5) K. Tabata, W. Ito, T. Kojima, S. Kawabata, and A. Misaki: *Carbohydr. Res.*, **89**, 121—135 (1981).
- (6) T. Kojima, K. Tabata, T. Ikumoto, and T. Yanaki: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 915—921 (1984).
- (7) B. T. Hofreiter and C. R. Russell: *Stärke*, **26**, 18—23 (1974).
- (8) Raouf, M. A. El Saadany, Abd El Fatah, A. El Safti, and Farag, M. El Saadany: *Stärke*, **26**, 190—192 (1974).
- (9) J. C. Arthur, in "Energetics and Mechanisms in Radiation Biology," Academic, 1968, p. 153.
- (10) 菊本昭一, 宮島 徹, 吉積智司, 藤本紫郎, 木村恵太郎: 農化, **44**, 337—342 (1970).
- (11) M. Somogyi: *J. Biol. Chem.*, **195**, 19—23 (1952); N. Nelson: *J. Biol. Chem.*, **153**, 375—380 (1944).
- (12) R. Spiro: *Methods Enzymol.*, **8**, 10 (1966).
- (13) W. E. Trevelyan, D. P. Procter, and J. S. Harrison: *Nature*, **165**, 444 (1950).
- (14) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith: *Anal. Chem.*, **28**, 350—356 (1956).
- (15) S. I. Hakomori: *J. Biochem.*, **55**, 205—207 (1964).
- (16) E. T. Reese and M. Mandels: *Can. J. Microbiol.*, **5**, 173—185 (1959).
- (17) T. Yanaki, W. Ito, K. Tabata, T. Kojima, T. Norisuye, N. Takano, and H. Fujita:

- Biophys. Chem.*, **17**, 337—342 (1983).
- (18) M. L. Juri, H. Ito, H. Watanabe, and N. Tamura : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 347—355 (1986).
- (19) 金子信忠, 伊藤 均, 石垣 功 : 日食工誌, **38**, 1025—1032 (1991).
- (20) G. Matsumura, A. Herp and W. Pigman : *Radiation Res.*, **28**, 735 (1966).
- (21) 原田篤也, 小泉岳夫編 : 「総合多糖類科学」, 講談社サイエンティフィク, 1973, pp.174—186.
- (22) K. Uchida and S. Kawakishi : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2579—2583 (1986).
- (23) T. Kojima, K. Tabata, W. Itoh, and T. Yanaki : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 231—232 (1986).
- (24) 鬼頭幸男, 川岸舜朗, 並木満夫 : 農化, **55**, 583—589 (1981).
-