

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6629021号

(P6629021)

(45) 発行日 令和2年1月15日(2020.1.15)

(24) 登録日 令和1年12月13日(2019.12.13)

(51) Int. Cl.	F I	
A 6 1 K 31/702 (2006.01)	A 6 1 K 31/702	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
C 0 7 H 3/06 (2006.01)	C 0 7 H 3/06	

請求項の数 12 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-184634 (P2015-184634)	(73) 特許権者	504145283
(22) 出願日	平成27年9月18日(2015.9.18)		国立大学法人 和歌山大学
(65) 公開番号	特開2017-57174 (P2017-57174A)		和歌山県和歌山市栄谷930番地
(43) 公開日	平成29年3月23日(2017.3.23)	(74) 代理人	110000796
審査請求日	平成30年9月14日(2018.9.14)		特許業務法人三枝国際特許事務所
(出願人による申告) 平成27年度、国立研究開発法人		(72) 発明者	山口 真範
科学技術振興機構、研究成果展開事業、大学発新産業創			和歌山県和歌山市栄谷930番地 国立大
出プログラム委託事業、産業技術力強化法第19条の適			学法人和歌山大学内
用を受ける特許出願		審査官	鳥居 福代

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫グロブリンA分泌促進剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ガラクトシルラクチュロース、ガラクトシルラクチュロース、ガラクトシルメリピオース、及びガラクトシルメリピオースからなる群より選択される少なくとも1種のガラクトシルオリゴ糖を含有する、免疫グロブリンA分泌促進剤。

【請求項2】

ビフィズス菌非介在性免疫グロブリンA分泌促進剤である、請求項1に記載の剤。

【請求項3】

前記ガラクトシルオリゴ糖の含有量が、前記免疫グロブリンA産生促進剤が含有するオリゴ糖100質量%に対して80質量%以上である、請求項1又は2に記載の剤。

【請求項4】

前記ガラクトシルオリゴ糖が、ガラクトシルラクチュロース、ガラクトシルメリピオース、及びガラクトシルメリピオースからなる群より選択される少なくとも1種である、請求項1～3のいずれかに記載の剤。

【請求項5】

経口製剤形態である、請求項1～4のいずれかに記載の剤。

【請求項6】

ガラクトシルラクチュロース、ガラクトシルラクチュロース、ガラクトシルメリピオース、及びガラクトシルメリピオースからなる群より選択される少なくとも1種のガラクトシルオリゴ糖を含有する、粘膜免疫賦活剤。

10

20

【請求項 7】

前記粘膜が腸粘膜である、請求項 6 に記載の剤。

【請求項 8】

ガラクトシルラクチュロース、ガラクトシルラクチュロース、ガラクトシルメリピオース、及びガラクトシルメリピオースからなる群より選択されるガラクトシルオリゴ糖の製造方法であって、

メリピオース及びラクチュロースからなる群より選択される糖受容体と、

ガラクトース供与体とを

ガラクトシダーゼの存在下で反応させる工程を含み、

製造対象である前記ガラクトシルオリゴ糖がガラクトシルラクチュロースである場合は、前記ガラクトース供与体がラクチュロースであり、且つ反応液中の前記糖受容体及び前記ガラクトース供与体の合計含有量が、反応溶媒 100 質量%に対して 50 ~ 70 質量%であり、

製造対象である前記ガラクトシルオリゴ糖がガラクトシルメリピオースである場合は、前記ガラクトシダーゼがアスペルギルス属に属する生物に由来するガラクトシダーゼである、

製造方法。

【請求項 9】

前記反応時の温度が 20 以上 40 未満である、請求項 8 に記載の製造方法。

【請求項 10】

製造対象である前記ガラクトシルオリゴ糖がガラクトシルラクチュロース、ガラクトシルメリピオース、又はガラクトシルメリピオースであり、反応液中の前記糖受容体及び前記ガラクトース供与体の合計含有量が、反応溶媒 100 質量%に対して 20 ~ 80 質量%である、請求項 8 又は 9 に記載の製造方法。

【請求項 11】

製造対象である前記ガラクトシルオリゴ糖が、ガラクトシルラクチュロース、ガラクトシルメリピオース、及びガラクトシルメリピオースからなる群より選択されるガラクトシルオリゴ糖である、請求項 8 ~ 10 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 12】

前記ガラクトシダーゼがアスペルギルス属に属する生物に由来する、請求項 8 ~ 11 のいずれかに記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫グロブリン A 分泌促進剤、及び該剤に含有されるガラクトシルオリゴ糖の効率的な製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

生体において、粘膜は、細菌やウイルス等の微生物、各種抗原、毒素等にさらされているので、これらに対する防御機構が存在する。その一つとして、腸管免疫等の粘膜免疫機構が知られている。例えば、腸粘膜においては、パイエル板の免疫細胞によって免疫グロブリン A が分泌され、これにより、微生物の腸粘膜からの侵入阻止、毒素の中和、アレレルゲンの侵入阻止、腸内共生菌の制御が行われている。したがって、免疫グロブリン A の分泌を促進すれば、粘膜免疫が活性化され、病原体感染やその毒素による中毒等に対してより抵抗力が高まると考えられている。

【0003】

一方、ガラクトシルラクトース等のガラクトシルオリゴ糖はヒト母乳に含まれる成分であり、その安全性は高いといわれている。特定のガラクトシルオリゴ糖は、ビフィズス菌増殖促進活性を有することが知られており（特許文献 1）、また、ビフィズス菌は免疫グロブリン A の分泌を促進するともいわれている。しかし、ガラクトシルオリゴ糖について

は、免疫を抑制することも報告されていることから（特許文献2及び3）、ガラクトシルオリゴ糖が免疫機構に対してどのような作用を有するかは、予測できないのが現状である。また、仮にガラクトシルオリゴ糖が免疫グロブリンAの分泌を促進できるとしても、ビフィズス菌増殖を介する場合であれば、ビフィズス菌が少ない（或いは全くない）粘膜に対して、又はビフィズス菌の保持量が少ない（或いは全くない）高齢者や抗生物質服用者に対しては、その効果を見込むことはできない。

【0004】

ガラクトシルオリゴ糖は、効率性等の観点からは酵素反応により製造することが望ましい。しかし、酵素反応では、目的の糖と分子量に近い副産物も生成され易く、この場合はカラムクロマトグラフィー等で目的の糖を高純度で精製することが困難である。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開平5-140178号公報

【特許文献2】特開2003-040779号公報

【特許文献3】特表2000-516591号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、安全性が高いといわれているガラクトシルオリゴ糖を有効成分とし、且つビフィズス菌等の細菌を介さずとも免疫グロブリンAの分泌を促進できる剤を提供することを課題とする。さらには、該ガラクトシルオリゴ糖を、効率的に、且つ副産物（特に、目的の糖と分子量の近い糖）の生成を抑えて製造する方法を提供することを課題とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者は鋭意研究を進めた結果、特定のガラクトシルオリゴ糖（ガラクトシルラクチュロース、ガラクトシルラクチュロース、ガラクトシルメリピオース、又はガラクトシルメリピオース）がビフィズス菌の非存在下であっても、免疫細胞に直接作用することにより免疫グロブリンA（本明細書において、「IgA」と示すこともある。）の分泌を促進できることを見出した。さらに、特定の糖受容体とガラクトース供与体とをガラクトシダーゼの存在下で反応させることにより、これらのガラクトシルオリゴ糖を効率的に、且つ副産物の生成を抑えて製造できることを見出した。本発明は、これらの知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、完成されたものである。即ち、本発明は、下記の態様を包含する。

30

【0008】

即ち、本発明は、下記の態様を包含する。

【0009】

項1．ガラクトシルラクチュロース、ガラクトシルラクチュロース、ガラクトシルメリピオース、及びガラクトシルメリピオースからなる群より選択される少なくとも1種のガラクトシルオリゴ糖を含有する、免疫グロブリンA分泌促進剤。

40

項2．ビフィズス菌非介在性免疫グロブリンA分泌促進剤である、項1に記載の剤。

項3．前記ガラクトシルオリゴ糖の含有量が、前記免疫グロブリンA産生促進剤が含有するオリゴ糖100質量%に対して80質量%以上である、項1又は2に記載の剤。

項4．前記ガラクトシルオリゴ糖が、ガラクトシルラクチュロース、ガラクトシルメリピオース、及びガラクトシルメリピオースからなる群より選択される少なくとも1種である、項1～3のいずれかに記載の剤。

項5．経口製剤形態である、項1～4のいずれかに記載の剤。

項6．ガラクトシルラクチュロース、ガラクトシルラクチュロース、ガラクトシルメリピオース、及びガラクトシルメリピオースからなる群より選択される少なくとも1種のガラクトシルオリゴ糖を含有する、粘膜免疫賦活剤。

50

項 7 . 前記粘膜が腸粘膜である、項 6 に記載の剤 .

項 8 . メリビオース及びラクチュロースからなる群より選択される糖受容体と、ガラクトース供与体とを

ガラクトシダーゼの存在下で反応させる工程を含む、

ガラクトシルラクチュロース、ガラクトシルラクチュロース、ガラクトシルメリビオース、及びガラクトシルメリビオースからなる群より選択されるガラクトシルオリゴ糖の製造方法 .

項 9 . 前記反応時の温度が 20 以上 40 未満である、項 8 に記載の製造方法 .

項 10 . 反応液中の前記糖受容体及び前記ガラクトース供与体の合計含有量が、反応溶媒 100 質量%に対して 20 ~ 80 質量%である、項 8 又は 9 に記載の製造方法 .

項 11 . 製造対象である前記ガラクトシルオリゴ糖が、ガラクトシルラクチュロース、ガラクトシルメリビオース、及びガラクトシルメリビオースからなる群より選択されるガラクトシルオリゴ糖である、項 8 ~ 10 のいずれかに記載の製造方法 .

項 12 . 前記ガラクトシダーゼがアスペルギルス属に属する生物に由来する、項 8 ~ 11 のいずれかに記載の製造方法 .

【発明の効果】

【0010】

本発明によれば、ビフィズス菌等の細菌を介さずとも免疫グロブリン A の分泌を促進できる、免疫グロブリン A 分泌促進剤を提供することができる。本発明の免疫グロブリン A 分泌促進剤は、ガラクトシルオリゴ糖を有効成分として含有するので、安全性が高いと考えられる。また、有効成分であるガラクトシルオリゴ糖は口腔内の pH 低下を引き起こし難いことから、本発明の免疫グロブリン A 分泌促進剤は経口摂取してもう触を引き起こし難い。さらに、有効成分であるガラクトシルオリゴ糖はビフィズス菌増殖活性をも有するので、本発明の免疫グロブリン A 分泌促進剤は、粘膜免疫賦活による効果（抵抗力向上等）のみならず、腸内フローラ改善による効果（消化吸収促進、便通の改善、老化防止等）をも発揮することができる。

【0011】

本発明によれば、有効成分であるガラクトシルオリゴ糖を、効率的に、且つ副産物（特に、目的の糖と分子量の近い糖）の生成を抑えて製造することが可能となる。これにより、免疫グロブリン A 分泌促進活性が高い、有効成分であるガラクトシルオリゴ糖を、高純度で含有する免疫グロブリン A 分泌促進剤を提供することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図 1】パイエル板細胞培養上清の IgA レベルの測定結果を示す（実施例 5）。縦軸は、測定された IgA 濃度（ng / mL）を示す。ネガティブコントロールに対する P 値が 0.01 以下を「**」で示す。

【図 2】ビフィズス菌培養液の濁度の測定結果を示す（実施例 6）。縦軸は、濁度 (OD₆₀₀) を示す。横軸は培養開始からの経過時間（単位：時間）を示す。

【図 3】ビフィズス菌培養液の濁度の測定結果を示す（実施例 6）。縦軸は、濁度 (OD₆₀₀) を示す。横軸は培養開始からの経過時間（単位：時間）を示す。

【図 4】ビフィズス菌培養液の濁度の測定結果を示す（実施例 6）。縦軸は、濁度 (OD₆₀₀) を示す。横軸は培養開始からの経過時間（単位：時間）を示す。

【図 5】唾液及び糖の混合液の pH 測定結果を示す（実施例 7）。縦軸は、測定された pH を示す。

【発明を実施するための形態】

【0013】

1. 免疫グロブリン A 分泌促進剤

本発明は、ガラクトシルラクチュロース、ガラクトシルラクチュロース、ガラクトシルメリビオース、及びガラクトシルメリビオースからなる群より選択される少なくとも 1 種のガラクトシルオリゴ糖を含有する、免疫グロブリン A 分泌促進剤（本明細書に

において、「本発明の剤」と示すこともある)に関する。以下、これについて説明する。

【0014】

ガラクトシルラクチュロースは、ガラクトースのアノマー炭素上の水酸基とラクチュロースの非還元末端の水酸基とがグリコシド結合してなるガラクトシルオリゴ糖であり、この限りにおいて特に限定されない。

【0015】

ガラクトシルラクチュロースは、ガラクトースのアノマー炭素上の水酸基とラクチュロースの非還元末端の水酸基とがグリコシド結合してなるガラクトシルオリゴ糖であり、この限りにおいて特に限定されない。

【0016】

ガラクトシルメリビオースは、ガラクトースのアノマー炭素上の水酸基とメリビオースの非還元末端の水酸基とがグリコシド結合してなるガラクトシルオリゴ糖であり、この限りにおいて特に限定されない。

【0017】

ガラクトシルメリビオースは、ガラクトースのアノマー炭素上の水酸基とメリビオースの非還元末端の水酸基とがグリコシド結合してなるガラクトシルオリゴ糖であり、この限りにおいて特に限定されない。

【0018】

有効成分であるガラクトシルオリゴ糖は、好ましくはガラクトシルラクチュロース、ガラクトシルメリビオース、及びガラクトシルメリビオースからなる群より選択される少なくとも1種である。ガラクトシルオリゴ糖は、より高い免疫グロブリンA分泌作用を有するという観点からは、好ましくはガラクトシルラクチュロース、ガラクトシルラクチュロース、及びガラクトシルメリビオースからなる群より選択される少なくとも1種であり、より好ましくはガラクトシルラクチュロース、及びガラクトシルメリビオースからなる群より選択される少なくとも1種であり、さらに好ましくはガラクトシルラクチュロースである。ガラクトシルオリゴ糖は、う触原性が低いという観点から、好ましくはガラクトシルラクチュロース、ガラクトシルラクチュロースからなる群より選択される少なくとも1種である。

【0019】

ガラクトシルオリゴ糖は、1種単独で用いてもよいし、2種以上を組み合わせ用いてもよい。

【0020】

本発明の剤の用途は、本発明の効果を奏すれば特に限定されない。本発明の剤は、例えば医薬品、健康増進剤、栄養補助剤(サプリメント等)、食品添加剤等に利用できる。また、本発明の剤は、腸管免疫療法、サプリメント療法等に好適に使用することができる。

【0021】

本発明の剤の製剤形態は、特に限定されず、本発明の剤の用途に応じて、各用途において通常使用される製剤形態をとることができる。製剤形態としては、用途が医薬品、健康増進剤、栄養補助剤(サプリメント等)等である場合は、例えば錠剤(口腔内側崩壊錠、咀嚼可能錠、発泡錠、トローチ剤、ゼリー状ドロップ剤を含む)、丸剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、硬カプセル剤、軟カプセル剤、ドライシロップ剤、液剤(ドリンク剤、懸濁剤、シロップ剤を含む)、ゼリー剤などの経口摂取に適した製剤形態(経口製剤形態)、注射剤、貼付剤、ローション剤、クリーム剤などの非経口摂取に適した製剤形態(非経口製剤形態)が挙げられ、好ましくは経口製剤形態が挙げられる。また、用途が食品添加剤等である場合は、製剤形態として、例えば液剤、顆粒剤、散剤等が挙げられる。

【0022】

本発明の剤は、有効成分であるガラクトシルオリゴ糖のみからなるものであってもよいし、この他に、用途あるいは製剤形態に応じて、他の成分が適宜配合されていてもよい。他の成分としては、特に制限されないが、例えば、アミノ酸類、アルコール類、多価アルコール類、糖類、ガム質、多糖類などの高分子化合物、界面活性剤、防腐・抗菌・殺菌剤

10

20

30

40

50

、pH調整剤、キレート剤、抗酸化剤、酵素成分、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動化剤、清涼化剤の他、ミネラル類、細胞賦活剤、滋養強壯剤、賦形剤、増粘剤、安定化剤、保存剤、等張化剤、分散剤、吸着剤、崩壊補助剤、湿潤剤または湿潤調節剤、防湿剤、着色料、着香剤または香料、芳香剤、還元剤、可溶化剤、溶解補助剤、発泡剤、粘稠剤または粘稠化剤、溶剤、基剤、乳化剤、可塑剤、緩衝剤、光沢化剤などを挙げることができる。

【0023】

本発明の剤が有効成分であるガラクトシルオリゴ糖以外の他の成分を含有する場合、ガラクトシルオリゴ糖の含有量は、本発明の剤の用途や製剤形態に応じて、その効果を発揮できる含有量である限り特に限定されない。含有量は、本発明の剤100質量%に対して、例えば0.1~90質量%である。

10

【0024】

後述の本発明の製造方法によって、有効成分であるガラクトシルオリゴ糖を、副産物（特に、目的の糖と分子量の近い糖）の生成を抑えて製造することができる。したがって、この方法を利用することにより、本発明の剤には、免疫グロブリンA分泌促進作用が高い有効成分であるガラクトシルオリゴ糖を、この作用が比較的低いと思われるその他のオリゴ糖の混入をより低減しつつも、より多く配合することが可能となる。この観点から、有効成分であるガラクトシルオリゴ糖の含有量は、本発明の剤が含有するオリゴ糖100質量%に対して、例えば80質量%以上、好ましくは90質量%以上、より好ましくは95質量%以上、さらに好ましくは97質量%以上、よりさらに好ましくは99質量%以上、特に好ましくは100質量%である。

20

【0025】

本発明の剤を、医薬品、健康増進剤、栄養補助剤（サプリメント等）等として摂取させる場合、その摂取量は、症状、被摂取者の年齢、体重、製剤形態等に応じて適宜設定することができる。摂取量は、例えば、成人1日あたり、有効成分であるガラクトシルオリゴ糖の摂取量が0.01g~100gとなるような量が挙げられる。また、摂取は、1日1回でもよいが、複数回（例えば2~4回）に分けて行ってもよい。

【0026】

本発明の剤を、食品添加剤等として使用する場合、その添加量は、食品の種類等に応じて適宜設定することができる。添加量は、例えば、成人が1日に摂取する量の食品中の有効成分であるガラクトシルオリゴ糖が例えば0.01g~100gとなるような量が挙げられる。本発明の剤を食品に配合する方法は、食品の種類等に応じて適宜設定することができる。例えば、食品中に本発明の剤を混合してもよく、食品を、本発明の剤を含有する水溶液中に浸漬してもよく、または食品に本発明の剤を噴霧してもよい。噴霧する場合は、エタノールなどの揮発性溶媒に本発明の剤を混合して噴霧することができる。さらに本発明の剤は、例えば、食品を加熱して加工する場合、加熱の前後いずれの食品素材に対しても処理が行われてもよい。

30

【0027】

本発明の剤は、粘膜（例えば、頬側粘膜、胃粘膜、腸粘膜、嗅上皮、口腔粘膜、子宮内膜等、好ましくは腸粘膜）上への免疫グロブリンAの分泌を促進することができる。これにより、粘膜免疫が活性化され、病原体感染やその毒素による中毒等に対してより抵抗力が高まる。この観点から、本発明の剤の有効成分は、粘膜（例えば、頬側粘膜、胃粘膜、腸粘膜、嗅上皮、口腔粘膜、子宮内膜等、好ましくは腸粘膜）免疫賦活剤の有効成分としても有用である。また、本発明の剤の有効成分は、ビフィズス菌増殖活性をも有するので、ビフィズス菌増殖促進剤、腸内フローラ改善剤、消化吸収促進剤、便秘改善剤、老化防止剤等の有効成分としても有用である。

40

【0028】

本発明の剤の有効成分であるガラクトシルオリゴ糖は、ビフィズス菌等の細菌の非存在下であっても、免疫グロブリンA分泌促進作用を発揮することができる。このため、本発明の剤は、より好適には、細菌（好ましくはビフィズス菌）非存在性免疫グロブリンA分泌促進剤として用いることができる。ビフィズス菌非存在性免疫グロブリンA分泌促進剤

50

として用いる場合、ピフィズス菌の保持量が少ない（或いは全くない）粘膜或いは検体（高齢者や抗生物質服用者）に対しても、効果的に免疫グロブリンAの分泌を促進することができる。

【0029】

2. ガラクトシルオリゴ糖の製造方法

本発明は、メリビオース及びラクチュロースからなる群より選択される糖受容体と、ガラクトース供与体とをガラクトシダーゼの存在下で反応させる工程を含む、ガラクトシルラクチュロース、ガラクトシルラクチュロース、ガラクトシルメリビオース、及びガラクトシルメリビオースからなる群より選択されるガラクトシルオリゴ糖の製造方法（本明細書において、「本発明の製造方法」と示すこともある）に関する。以下、これについて説明する。 10

【0030】

糖受容体は、製造対象のガラクトシルオリゴ糖に応じて適宜選択される。製造対象がガラクトシルラクチュロース又はガラクトシルラクチュロースである場合は、糖受容体としてラクチュロースが選択され、製造対象がガラクトシルメリビオース又はガラクトシルメリビオースである場合は、糖受容体としてメリビオースが選択される。

【0031】

ガラクトシダーゼは、製造対象のガラクトシルオリゴ糖に応じて適宜選択される。製造対象がガラクトシルラクチュロース又はガラクトシルメリビオースである場合は、ガラクトシダーゼとしてガラクトシダーゼが選択され、製造対象がガラクトシルラクチュロース又はガラクトシルメリビオースである場合は、ガラクトシダーゼとしてガラクトシダーゼが選択される。 20

【0032】

ガラクトシダーゼは、EC番号EC 3.2.1.22に分類される酵素であり、その限りにおいて特に限定されない。ガラクトシダーゼとしては、種々の生物由来のものを使用することができる。例えば、アスペルギルス属生物（好ましくはアスペルギルス ニガー）、コーヒー豆、Xanthomonas属生物（好ましくはXanthomonas manihotis）等に由来するガラクトシダーゼが挙げられる。これらの中でも、製造対象であるガラクトシルオリゴ糖を、効率的に、且つ副産物（特に、目的の糖と分子量の近い糖）の生成を抑えて製造できるという観点から、好ましくはアスペルギルス属生物由来、より好ましくはアスペルギルス ニガー由来のガラクトシダーゼが挙げられる。ガラクトシダーゼとしては1種単独を用いてもよいし、2種以上の組み合わせを用いてもよい。 30

【0033】

ガラクトシダーゼは、EC番号EC 3.2.1.23に分類される酵素であり、その限りにおいて特に限定されない。ガラクトシダーゼとしては、種々の生物由来のものを使用することができる。例えば、アスペルギルス属生物（好ましくはアスペルギルス オリゼ）、ウシ（精巢、肝臓等）、大腸菌、Xanthomonas manihotis、Bacteroides fragilis、Jack bean、Streptococcus pneumonia、Kluyveromyces lactis、Xanthomonas sp等に由来するガラクトシダーゼが挙げられる。これらの中でも、製造対象であるガラクトシルオリゴ糖を、効率的に、且つ副産物（特に、目的の糖と分子量の近い糖）の生成を抑えて製造できるという観点から、好ましくはアスペルギルス属生物由来、より好ましくはアスペルギルス オリゼ由来のガラクトシダーゼが挙げられる。ガラクトシダーゼとしては1種単独を用いてもよいし、2種以上の組み合わせを用いてもよい。 40

【0034】

ガラクトシダーゼは、担体に固定化されたガラクトシダーゼであってもよい。ガラクトシダーゼを担体に固定化する方法は、公知の方法を採用することができる。担体は、ガラクトシダーゼを固定化できる限りにおいて特に限定されず、例えばガラクトシダーゼに含まれるアミノ基とアミド結合できるカルボキシル基を有する担体が挙げられる。具体例としては、カルボキシル基をN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）でエステル化したセファロース（担体）の活性化エステル基と、ガラクトシダーゼのアミノ基とをアミド結合 50

させることにより、担体にガラクトシダーゼを固定化することができる。また、他の具体例としては、担体を臭化シアンで活性化して、ガラクトシダーゼのアミノ基とアミド結合させる固定化方法等が挙げられる。

【0035】

ガラクトース供与体は、ガラクトースを供与できる糖である限り特に限定されないが、例えばガラクトース、又は構成単糖としてガラクトースを含むオリゴ糖（好ましくは2糖）が挙げられる。このようなオリゴ糖は、本発明の製造方法で用いるガラクトシダーゼによって分解されてガラクトースを生じ得るオリゴ糖である限り特に限定されず、例えばガラクトースのアノマー炭素上の水酸基と単糖又はオリゴ糖の水酸基とがグリコシド結合してなるオリゴ糖が挙げられる。

10

【0036】

本発明の製造方法で用いるガラクトシダーゼがガラクトシダーゼである場合、ガラクトース供与体として用い得るオリゴ糖としては、例えばメリビオース、メリビウロース、ガラクトスクロース、(12)ガラビオース、(13)ガラビオース、(16)ガラビオース、(14)ガラビオース、メリビオサミン、N-アセチルメリビオサミン、-PNPガラクトース等が挙げられ、本発明の製造方法で用いるガラクトシダーゼがガラクトシダーゼである場合、ガラクトース供与体として用い得るオリゴ糖としては、例えばラクチュロース、ラクトース、ネオラクトース、-PNPガラクトース、アロラクトース、N-アセチルラクトサミン、N-アセチルアロラクトサミン等が挙げられる。

【0037】

これらの中でも、製造対象のガラクトシルオリゴ糖を、効率的に、且つ副産物（特に、目的の糖と分子量の近い糖）の生成を抑えて製造できるという観点から好ましいガラクトース供与体としては、製造対象がガラクトシルラクチュロースの場合はガラクトースが挙げられ、製造対象がガラクトシルラクチュロースの場合はラクチュロースが挙げられ（この場合、ラクチュロースはガラクトース供与体及び糖受容体の両方として機能する）、製造対象がガラクトシルメリビオースの場合はメリビオースが挙げられ（この場合、メリビオースはガラクトース供与体及び糖受容体の両方として機能する）、製造対象がガラクトシルメリビオースの場合はラクトースが挙げられる。

20

【0038】

ガラクトース供与体としては1種単独を用いてもよいし、2種以上の組み合わせを用いてもよい。

30

【0039】

反応は、適当な溶媒中で行う。溶媒としては、糖受容体及びガラクトース供与体を溶解させることができ、且つガラクトシダーゼが失活しない溶媒であれば特に限定されない。このような溶媒としては、例えば、水、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、酒石酸緩衝液、トリス緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水等が挙げられ、好ましくは水、酢酸緩衝液等が挙げられる。また、溶媒には、少量の有機溶媒が混入していてもよい。

【0040】

反応温度は、ガラクトシダーゼが失活しない温度であれば特に限定されないが、製造対象のガラクトシルオリゴ糖を、効率的に、且つ副産物（特に、目的の糖と分子量の近い糖）の生成を抑えて製造できるという観点からは、ガラクトシダーゼの至適温度より低温であることが好ましい。より具体的には、反応温度としては、ガラクトシダーゼの至適温度よりも、例えば10～40、好ましくは15～35、より好ましくは20～35、さらに好ましくは23～32低い温度が挙げられる。同様の観点から、ガラクトシダーゼの至適温度が55～60である場合、反応温度としては、例えば、15～50、好ましくは20～45、より好ましくは20～40、さらに好ましくは25～40、よりさらに好ましくは25～35が挙げられる。

40

【0041】

反応時間は、ガラクトシダーゼの酵素活性が十分に発揮できる限り特に限定されない。

50

反応時間は、例えば1～200時間、好ましくは5～200時間、より好ましくは10～170時間である。製造対象のガラクトシルオリゴ糖を、効率的に、且つ副産物（特に、目的の糖と分子量の近い糖）の生成を抑えて製造できるという観点から好ましい反応時間は、製造対象がガラクトシルラクチュロースの場合は100～200時間（より好ましくは130～200時間、さらに好ましくは150～190時間）、製造対象がガラクトシルラクチュロースの場合は5～50時間（より好ましくは12～36時間、さらに好ましくは18～30時間）、製造対象がガラクトシルメリビオースの場合は40～150時間（より好ましくは60～130時間、さらに好ましくは80～120時間）、製造対象がガラクトシルメリビオースの場合は1～24時間（より好ましくは4～18時間、さらに好ましくは8～16時間）である。

10

【0042】

反応pHは、ガラクトシダーゼの酵素活性が十分に発揮される限り特に限定されない。反応pHは、例えばpH3～10、好ましくはpH4～6である。

【0043】

ガラクトース供与体と糖受容体とが互いに異なる場合、反応における、ガラクトース供与体及び糖受容体のモル比は、ガラクトシダーゼによる酵素反応が起こる限り特に限定されない。該モル比は、製造対象のガラクトシルオリゴ糖を、効率的に、且つ副産物（特に、目的の糖と分子量の近い糖）の生成を抑えて製造できるという観点からは、例えば、ガラクトース供与体1モルに対して、糖受容体が、例えば0.5～1.5モル、好ましくは1～10モル、より好ましくは2～8モル、さらに好ましくは3～7モルである。

20

【0044】

製造対象のガラクトシルオリゴ糖を、効率的に、且つ副産物（特に、目的の糖と分子量の近い糖）の生成を抑えて製造できるという観点から、反応液中の糖受容体及びガラクトース受容体の濃度が高いことが望ましい。より具体的には、反応液中の糖受容体及びガラクトース供与体の合計含有量は、反応溶媒100質量%に対して、例えば20～80質量%、好ましくは25～75質量%、より好ましくは30～70質量%である。該含有量は、特に、製造対象がガラクトシルラクチュロースの場合は反応溶媒100質量%に対して好ましくは30～50質量%（より好ましくは35～45質量%）、製造対象がガラクトシルラクチュロースの場合は反応溶媒100質量%に対して好ましくは50～70質量%（より好ましくは55～65質量%）、製造対象がガラクトシルメリビオースの場合は反応溶媒100質量%に対して好ましくは25～45質量%（より好ましくは30～40質量%）、製造対象がガラクトシルメリビオースの場合は反応溶媒100質量%に対して好ましくは30～50質量%（より好ましくは35～45質量%）である。

30

【0045】

上記反応後、反応によって得られた製造対象のガラクトシルオリゴ糖を含む溶液を、さらに精製工程に供してもよい。精製手段は、公知の方法（分液、蒸留、クロマトグラフィー、再結晶等）を採用できる。本発明の製造方法によれば、製造対象のガラクトシルオリゴ糖を、副産物（特に、目的の糖と分子量の近い糖）の生成を抑えて製造することができるので、簡便な精製によって、目的の糖を高純度で得ることが可能である。

【実施例】

40

【0046】

以下に、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【0047】

実施例1：ガラクトシルラクチュロースの合成

ガラクトース（350 mg, 1.94 mmol）、ラクチュロース（3.4 g, 9.9 mmol）を酢酸ナトリウムバッファ（pH= 4.0, 50 mM, 8.6 mL）に溶解した。続いて、ガラクトシダーゼ（スミチームAGS：至適温度60℃、新日本化学工業株式会社製）0.6 mg（18 U）を加え、30℃にて168時間インキュベートした。反応終了後、100℃にて3分間加熱し酵素を失活し反応を停止した。その反応液を脱塩、フィルターし不溶成分を除去した後、GLサイ

50

エンス社製 (HPLCシステムPLC761)、Inertsil Amide 5 μ m (14 x 250 mm) カラムに供し (カラム温度: 40、溶離液: アセトニトリル/水 = 7/3)、流速: 9.5 mL / min)、検出はRIにて目的としたガラクトシルラクチュロース (60.9 mg) を得た (収率: 6.2%)。カラム精製においては、目的のガラクトシルラクチュロースの他に副生成物が無く、容易に精製することができた。

【0048】

実施例 2: ガラクトシルラクチュロースの合成

ラクチュロース (2.6 g, 7.6 mmol) を酢酸ナトリウムバッファー (pH= 5.0, 50 mM, 4.2 mL)、ガラクトシダーゼ (スミラクトL: 至適温度55、新日本化学工業株式会社製) 10 mg (100 U) を加え、30にて24時間インキュベートした。反応終了後、100にて3分間加熱し酵素を失活し反応を停止した。その反応液を脱塩、フィルターし不溶成分を除去した後、GLサイエンス社製 (HPLCシステムPLC761)、Inertsil Amide 5 μ m (14 x 250 mm) カラムに供し (カラム温度: 40、溶離液: アセトニトリル/水 = 7/3、流速: 9.5 mL / min)、検出はRIにて目的としたガラクトシルラクチュロース (47.8 mg) を得た (収率: 1.2%)。カラム精製においては、目的のガラクトシルラクチュロースの他に副生成物が無く、容易に精製することができた。

【0049】

実施例 3: ガラクトシルメリビオースの合成

メリビオース (280 mg, 0.82 mmol) を蒸留水 (700 μ L) に溶解した。次に、酢酸ナトリウムバッファー (pH= 5.0, 50 mM, 100 μ L)、ガラクトシダーゼ (スミチームAGS: 至適温度60、新日本化学工業株式会社製) 0.104 mg (3 U)、を加え、30にて96時間インキュベートした。反応終了後、100にて3分間加熱し酵素を失活し反応を停止した。その反応液を脱塩、フィルターし不溶成分を除去した後、GLサイエンス社製 (HPLCシステムPLC761)、Inertsil Amide 5 μ m (14 x 250 mm) カラムに供し (カラム温度: 40、溶離液: アセトニトリル/水 = 7/3、流速: 9.5 mL / min)、検出はRIにて目的としたガラクトシルメリビオース (75.9 mg) を得た (収率: 1.8%)。カラム精製においては、目的のガラクトシルメリビオースの他に副生成物が無く、容易に精製することができた。

【0050】

実施例 4: ガラクトシルメリビオースの合成

ラクトース (90 mg, 0.26 mmol)、メリビオース (450 mg, 1.32 mmol) を蒸留水 (1.2 mL) に溶解した。次に、酢酸ナトリウムバッファー (pH= 5.0, 50 mM, 100 μ L)、ガラクトシダーゼ (スミラクトL: 至適温度55、新日本化学工業株式会社製) 10 mg (100 U)、を加え、30にて12時間インキュベートした。反応終了後、100にて3分間加熱し酵素を失活し反応を停止した。その反応液を脱塩、フィルターし不溶成分を除去した後、GLサイエンス社製 (HPLCシステムPLC761)、Inertsil Amide 5 μ m (14 x 250 mm) カラムに供し (カラム温度: 40、溶離液: アセトニトリル/水 = 7/3、流速: 9.5 mL / min)、検出はRIにて目的としたガラクトシルメリビオース (19.7 mg) を得た (収率: 15%)。カラム精製においては、目的のガラクトシルメリビオースの他に副生成物が無く、容易に精製することができた。

【0051】

実施例 5: IgA誘導活性試験

実施例 1 ~ 4 で合成したガラクトシルオリゴ糖それぞれを、定法に従って培養 (RPMI培地中、5% CO₂、37) したマウスパイエル板細胞 (Journal of Applied Microbiology 116, 980-989, 2013) (1.25 x 10⁶ cells / mL) の培地 (100 μ L) に、終濃度100 μ g / mLになるように添加し、5日間培養した。培養後、培地上清のIgAレベルをmouse IgA ELISA kit (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) を用いて測定した。なお、ガラクトシルオリゴ糖を添加しない場合 (ネガティブコントロール)、及びガラクトシルオリゴ糖に代えて大腸菌由来のlipopolysaccharide (LPS)を終濃度5 μ g / mLになるように添加した場合 (IgA誘導のポジティブコントロール) についても、同様に培地上清のIgAレベルを

測定した。ネガティブコントロール及びポジティブコントロールについては $n = 3$ の、その他については $n = 6$ の平均値を求め、標準誤差及びP値を求めた。測定結果を図1に示す。図1中、「saline」はネガティブコントロールを示し、「LPS」はポジティブコントロールを示し、「3」はガラクトシルラクチュロースを示し、「4」はガラクトシルラクチュロースを示し、「8」はガラクトシルメリビオースを示し、「9」はガラクトシルメリビオースを示し、「13」はメリビオースを示す。

【0052】

図1に示されるように、実施例1～4で合成したガラクトシルオリゴ糖を添加した場合、ネガティブコントロールに比べて培地中のIgAレベルが高かった。このことから、これらのガラクトシルオリゴ糖は、IgA分泌促進作用を有することが示唆された。また、本試験系はピフィズス菌等の他の細菌非存在下で行われていることから、このIgA分泌促進作用は細菌（ピフィズス菌等）非介在性の作用であることが示唆された。さらに、同じガラクトシルオリゴ糖に分類されるメリビオースはIgA分泌促進作用が全く見られなかった。このことから、実施例1～4で合成したガラクトシルオリゴ糖のIgA分泌促進作用は、ガラクトシルオリゴ糖一般の性質ではなく、これらの糖に特有の性質であることが示唆された。

【0053】

実施例6：ピフィズス菌増殖活性試験

96 well plateに、Basal Media (0.2 % yeast extract, 1.0 % peptone, 0.5 % sodium acetate, 0.2 % diammonium citrate, 0.02 % magnesium sulfate, 0.2 % dipotassium hydrogen phosphate, 0.1 % cysteine hydrochloride) 172 μ Lと、実施例1～4で合成したガラクトシルオリゴ糖それぞれの10%水溶液20 μ Lを添加（最終濃度1%）し、一晚嫌気状態で静置した。一方で、ピフィズス菌（*B. longum* JCM1222、*B. animalis* sbsp. *Lactis* JCM10602、又は*B. breve* JCM1192）の菌体を、 $OD_{600}=0.1$ となるようにReducing reagent (2 % cysteine hydrochloride and 11 % sodium carbonate)に懸濁して、菌体懸濁液を得た。この菌体懸濁液8 μ Lを、一晚静置後の96 well plateに加え、37 嫌気条件で培養開始した。経時的に濁度(OD_{600})を測定（48時間まで）した。なお、ガラクトシルオリゴ糖を添加しない場合（ネガティブコントロール）、及びガラクトシルオリゴ糖に代えてグルコースを添加した場合（ピフィズス菌増殖のポジティブコントロール）についても、同様に濁度を測定した。測定結果を図2～4に示す。図2～4中、「3」はガラクトシルラクチュロースを示し、「4」はガラクトシルラクチュロースを示し、「7」はガラクトシルメリビオースを示し、「8」はガラクトシルメリビオースを示す。

【0054】

図2～4に示されるように、実施例1～4で合成したガラクトシルオリゴ糖を添加した場合、ネガティブコントロールに比べて一定時間経過後の濁度が高かった。このことから、これらのガラクトシルオリゴ糖は、ピフィズス菌増殖活性を有することが示唆された。

【0055】

実施例7：う蝕原性試験

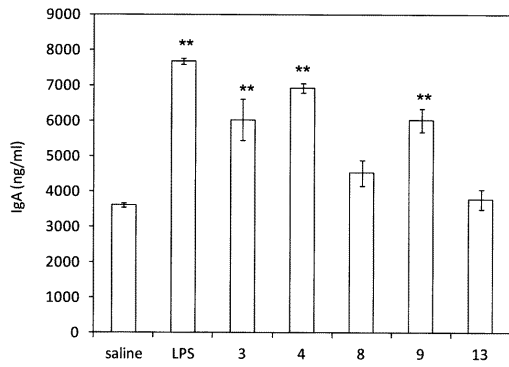
口腔内を水道水でゆすぎ、さらに蒸留水でうがいした後、唾液を回収した。ガラクトシルラクチュロース、ガラクトシルラクチュロース、スクロース、ラクチュロース、又はキシリトールの1%水溶液0.2 mLへ、新鮮な唾液0.6 mLとブレインハートインフュージョン培地（日水製薬株式会社製）0.2 mLを加えた。混合液を37 で加温し、継時的にpH変化をpHメーター（コンパクトpHメーターB 71X、HORIBA社製）測定した。唾液中の口内細菌により有機物が代謝されて有機酸が生じると、混合液のpH低下するので、その場合は添加した糖にう蝕原性があると評価することができる。測定結果を図5に示す。

【0056】

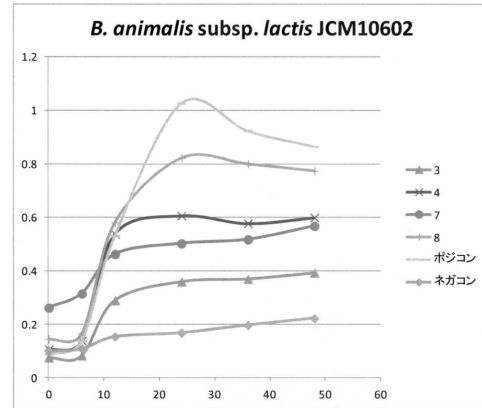
スクロースを添加した場合、5時間経過後にpHが大きく低下しているのに対し、ガラクトシルラクチュロース又はガラクトシルラクチュロースを添加した場合は、虫菌になりにくい糖として知られているキシリトールと同様に、pHの低下が少なかった。このことより、ガラクトシルラクチュロース又はガラクトシルラクチュロースは口内細菌に

より代謝されにくい、すなわち虫歯になりにくい糖鎖であることがわかった。

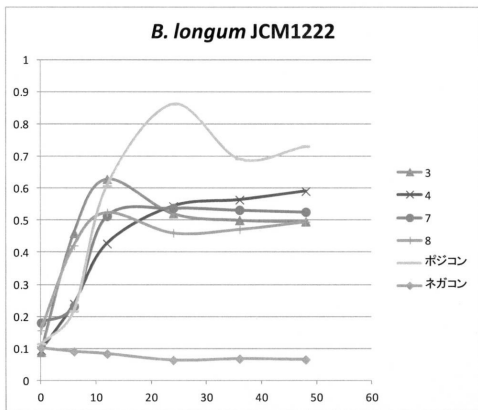
【 図 1 】



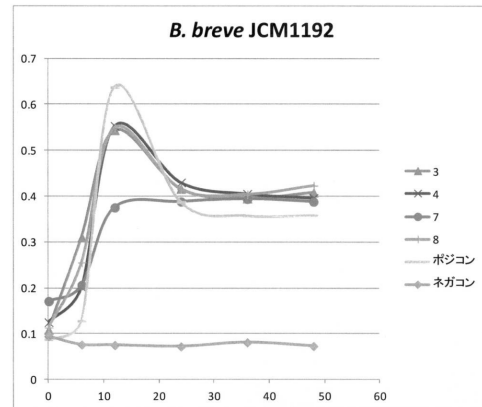
【 図 3 】



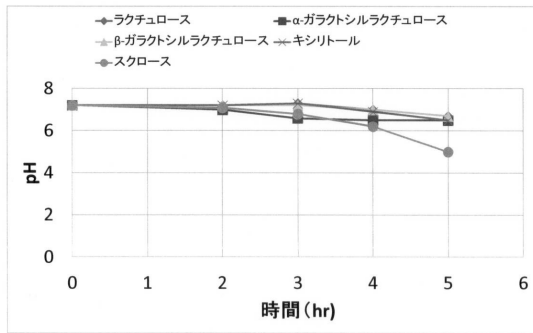
【 図 2 】



【 図 4 】



【 図 5 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 P 19/14 (2006.01) C 1 2 P 19/14 Z

(56)参考文献 特開昭63-094987(JP,A)
国際公開第2002/018614(WO,A1)
特開平03-038593(JP,A)
特開平06-205653(JP,A)
特開2006-298783(JP,A)
特開2003-201239(JP,A)
応用糖質科学, 1997年, Vol.44, No.1, pp.69-75
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012年, Vol.60, No.20, pp.5134-5141

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 1 / 3 3 - 3 3 / 4 4
C 0 7 H 3 / 0 6
C 1 2 P 1 9 / 1 4