

牛島廣治

1) 柳生文宏、沖津祥子、牛島廣治 絨毛癌細胞および直腸癌細胞におけるGプロテインレセプターの発現 日本ウイルス学会 第54回学術集会

2006. 11. 29-21

2) 牛島廣治、早川有子、清水優子、沖津祥子、山本直彦. HIV陽性母乳の加熱不活性化についての研究 第23回日本母乳哺育学会学術集会(2008. 10. 4-5) 岡山

3) 牛島廣治、早川有子、Phengxay Manilay、清水優子、沖津祥子、山本直彦: どこでも出来る固形アルコール燃料と飲料アルミ缶を用いた HIV 陽性母乳の加熱不活性化について 第 23 回日本国際保健医療学会学術集会 (2008. 10. 25-26) 東京

星野洪郎

1) 清水宣明、大上厚志、田中 淳、大槻貴博、森 隆久、中村孝子、内海英貴、野島美久、星野洪郎 HIV-1 感染感受性に対する重粒子線の効果の解析

第54回日本ウイルス学会学術集会、2006年、名古屋

2) 清水宣明、大上厚志、田中 淳、大槻貴博、森 隆久、中村孝子、内海英貴、野島美久、星野洪郎 臨床分離HIV株のコレセプター使用性の解析

第20回日本エイズ学会学術集会、2006年、東京

3) 星野洪郎、清水宣明、大上厚志、田中 淳、Manujendra N. Saha、品川雅彦、大槻貴博、Ariful Hoque、森 隆久、和田成一、浜田信行、船山知夫、小林泰彦 重イオン照射によるウイルスおよび細胞遺伝子発現への影響

第1回高崎量子応用研究シンポジウム、2006年、高崎

4) 大槻貴博、大上厚志、清水宣明、星野洪郎 Establishment of a convenient and rapid detection system for determination of HIV/SIV coreceptor usage.

第10回日本神経ウイルス研究会、2006年、石川

5) 清水宣明、大上厚志、田中 淳、大槻貴博、山口華代、中谷陽子、森 隆久、和田成一、小林泰彦、

星野洪郎 HIV-1感染における重粒子線照射の効果とフォルミルペプチド受容体のHIV-1コレセプター活性に関する研究

第10回日本神経ウイルス研究会、2006年、石川

6) 大上厚志、清水宣明、田中 淳、大槻貴博、星野洪郎 ヒト脳微小血管に由来する内皮細胞と周皮細胞の共存培養系を用いたHIV-1感染試験

第10回日本神経ウイルス研究会、2006年、石川

7) 大槻貴博、清水宣明、大上厚志、田中 淳、星野洪郎 重粒子線照射による潜伏感染からの再活性化機構の解明第12回COE研究会、2006年、前橋

8) 大上厚志、清水宣明、田中 淳、大槻貴博、星野洪郎 ヒト血液脳関門構成細胞へのHIV-1感染性におよぼす血清の影響について

第20回日本エイズ学会学術集会、2006年、東京

9) 重粒子線照射による細胞形質の特徴的变化についてウイルスを利用した解析. 星野洪郎、清水宣明、大上厚志、田中 淳、Saha M. Narayan、Hoque Ariful、品川雅彦、大槻貴博、森 隆久、小林泰彦、和田成一、浜田信行、舟山知夫、鳴海一成. 日本放射線影響学会 2007年11月(千葉)

10) 重粒子線を利用したHIV-1感染機構の解析. 大槻貴博、大上厚志、田中 淳、Islam Salequl、清水宣明、和田成一、浜田信行、舟山知夫、小林泰彦、星野洪郎. 第50回日本放射線影響学会 2007年11月(千葉)

11) HTLV-I粒子は広範囲の温度において非常に不安定である. 品川雅彦、大上厚志、田中淳、清水宣明、星野洪郎. 第55回日本ウイルス学会 2007年10月(札幌)

12) 血液脳関門構成細胞を用いたHIV-1感染試験. 大上厚志、清水宣明、田中 淳、大槻貴博、清水晶、小暮公孝、星野洪郎. 第11回日本神経ウイルス研究会 2007年7月(群馬、草津)

13) 色々なGタンパク質共役受容体を発現したヒト細胞を用いたHIV-1感染者末梢血リンパ球からのHIV-1分離. 清水宣明、大上厚志、田中淳、大槻貴博、森 隆久、Hoque S. Aliful、Islam MD. Salequl、

内海英貴、野島美久、星野洪郎. 第55回日本ウイルス学会 2007年10月 (札幌)

14) HIV-1感染感受性に対する重粒子線の効果の解析. 清水宣明、大上厚志、田中淳、大槻貴博、森隆久、和田成一、小林泰彦、星野洪郎. 第21回日本エイズ学会 2007年11月 (広島)

15) シンシチウム形成におけるHTLV-1遺伝子産物Taxの作用. 森隆久、品川雅彦、大上厚志、田中淳、清水宣明、星野洪郎. 第11回日本神経ウイルス研究会 2007年7月 (群馬、草津)

16) 爆発的な増殖能、長期生存能、可塑性を有する肝上皮性幹様細胞に対するVEGF, HGF, EGFの効果. 小暮公孝、石崎政利、根本雅明、志村龍男、末廣剛敏、鈴木秀樹、桑野博行、星野洪郎、小島 至、遠藤大晶、幕内雅敏. 第107回日本外科学会定期学術集会 2007年 4月 (大阪)

17) 著しい増殖能と長期生存能を有する肝上皮性幹様細胞に対するFGFの効果. 小暮公孝、石崎政利、根本雅明、志村龍男、末廣剛敏、鈴木秀樹、桑野博行、星野洪郎、小島 至、遠藤大晶、幕内雅敏. 第14回肝細胞研究会 2007年6月 (鹿児島)

18) 顕著な増殖能ならびに長期生存能を有する肝上皮性幹様細胞に対するEGFとFCSの効果. 小暮公孝、石崎政利、根本雅明、志村龍男、末廣剛敏、鈴木秀樹、桑野博行、星野洪郎、小島 至、遠藤大晶、幕内雅敏. 第6回再生医療学会総会 2007年3月 (横浜)

19) 爆発的に増殖し長期生存能と多分化能を有する肝上皮性幹様細胞の培養初期増殖形式の検討. 小暮公孝、石崎政利、根本雅明、鈴木秀樹、志村龍男、末廣剛敏、桑野博行、星野洪郎、小島 至、遠藤大輔、幕内雅敏. 第43回日本肝臓学会総会 2007年5月 (東京)

20) 清水 晶、田村敦志、安部万理絵、茂木精一郎、永井弥生、石川 治、中谷陽子、上里 博、星野洪郎. 爪甲色素線条を呈した爪下Bowen病におけるヒトパピローマウイルス56型の検出. 第106回日本皮膚科学会総会 2007年4月 (横浜)

21) 清水 晶、田中 淳、大上厚志、清水宣明、石川 治、星野洪郎. 水疱性口内炎ウイルスはLINE-1

によりヒト細胞内で逆転写される. 第55回日本ウイルス学会学術集会 2007年10月 (札幌)

22) 清水宣明、大上厚志、田中淳、Saha M. Narayan、Hoque Ariful、品川雅彦、大槻貴博、森隆久、和田成一、浜田信行、舟山知夫、小林泰彦、星野洪郎. 重粒子線照射ヒトグリオーマ細胞のヒト免疫不全ウイルス1型感受性の亢進. 第12回日本神経ウイルス研究会 2008年7月 (鹿児島)

23) Shimizu, N., A. Oue, A. Tanaka, T. Mori, I. Salequl, T. Ohtsuki, H. Uchiumi, Y. Nojima, S. Kusagawa, Y. Takebe, C. Apichartpiyakul, and H. Hoshino. Broad usage spectrum of G protein-coupled receptors by primary isolates of human immunodeficiency viruses. The seventh Japan-China International Conference of virology (2008), Tokyo.

24) Oue, A., N. Shimizu, N. Hamada, S. Wada, A. Tanaka, M. Shinagawa, T. Ohtsuki, T. Mori, M. Saha, A. Hoque, I. Salequl, K. Kogure, T. Funayama, Y. Kobayashi, and H. Hoshino. Cellular senescence induced by irradiation with carbon ion beam. The 4th International symposium on Biomedical Research Using Accelerator Technology (2008), maebashi.

25) Hoshino, H., N. Shimizu, A. Oue, A. Tanaka, M. Shinagawa, T. Ohtsuki, T. Mori, S. Islam, Y. Kobayashi, S. Wada, N. Hamada, T. Funayama, I. Narumi. Virological and molecular biological analyses of cellular phenotype-changes induced by irradiation with heavy ion beams. The 4th International symposium on Biomedical Research Using Accelerator Technology (2008), maebashi.

26) 大上厚志、清水宣明、田中淳、品川雅彦、大槻貴博、森隆久、Ariful Hoque, Salequl Islam, 浜田信行、小林泰彦、舟山知生、星野洪郎. ヒトグリオーマ由来細胞株への重粒子線照射による細胞老化の誘導. 第3回高崎量子応用研究シンポジウム(高崎)

27) Hoque SK Ariful、大上厚志、清水宣明、田中淳、大槻貴博、星野洪郎. Incorporation of non-susceptible bystander cells into HIV-1 syncytia. 第22回日本エイズ学会学術集会(2008)大阪

28) 清水宣明、大上厚志、田中淳、大槻貴博、森隆久、Islam Salequl、和田成一、舟山知生、浜田信行、小林泰彦、星野洪郎. 重粒子線が細胞のHIV-1-1感染感受性におよぼす効果の解析. 第56回日本ウイルス学会学術集会(2008)岡山

川崎ナナ

- 1) 川崎ナナ, 高倉大輔, 中島 紫, 橋井則貴, 伊藤さつき, 原園 景, 山口照英: LC/MSⁿを用いた糖鎖抗原付加タンパク質の同定. 日本プロテオーム機構第5回大会(2007. 7. 30-31)東京
 - 2) 橋井則貴, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 中島 紫, 原園 景, 山口照英: LC/MSⁿによる目的部分糖鎖構造を持つ糖タンパク質の特異的同定. 第27回日本糖質学会(2007. 8. 1-3)福岡
 - 3) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 山口照英: 糖鎖と医薬品. 日本応用糖質科学会平成19年度大会(2007. 8. 30)平塚
 - 4) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 橋井則貴, 原園 景, 中島 紫, 高倉大輔, 内田恵理子, 押澤 正, 山口照英: ヒトミエロペルオキシダーゼの部位特異的糖鎖構造解析. 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会(2007. 12, 11-15)横浜
 - 5) 橋井則貴, 川崎ナナ: シュードプロテオグリカンの検定と構造解析. 平成19年度厚生労働科学研究費補助金政策創薬総合研究推進事業研究成果発表会「糖鎖の機能解明と医療への応用」お茶の水女子大学糖鎖科学研究教育センターシンポジウム(2007. 11. 21)東京
 - 6) 川崎ナナ: LC/MSⁿを用いた糖蛋白質の特性解析 大阪大学蛋白質研究所セミナー「蛋白質翻訳後修飾」吹田市(2008. 1. 10, 11)
 - 7) 川崎ナナ: LC/MSを用いた糖鎖の微量かつ網羅的解析と創薬への応用. 日本薬学会第128年会一般シンポジウム「グライコサイエンスから創薬へ」. 横浜(2008. 3. 26-28) 予定
 - 8) 橋井則貴, 川崎ナナ, 原園 景, 伊藤さつき, 中島 紫, 高倉大輔, 山口照英: 質量分析法を用いたグリコサミノグリカンの構造特性解析. 日本薬学会第128年会, 横浜(2008. 3. 26-28)
 - 9) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 橋井則貴, 山口照英: LC/MSを用いた抗体医薬品の特性解析, 日本薬学会第128年会, 横浜(2008. 3. 26-28)
 - 10) 橋井則貴, 川崎ナナ, 中島 紫, 伊藤さつき, 山口照英: d₆-フェニルヒドラジンを用いた同位体標識法及び液体クロマトグラフィー/質量分析による糖鎖の定量解析. 第81回日本生化学会大会(2008. 12. 21-24)神戸
 - 11) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 篠原 聡, 橋井則貴, 山口照英: ヒト間葉系幹細胞のThy-1の糖鎖構造解析. 第81回日本生化学会大会(2008. 12. 21-24)神戸
 - 12) 橋井則貴, 川崎ナナ, 篠原 聡, 秦 艶, 黄笑宇, 伊藤さつき, 山口照英: 糖鎖プロファイル指標とした細胞治療薬の特性解析. 第8回日本再生医療学会総会(2009. 3. 5-6)東京
 - 13) 原園 景, 川崎ナナ, 橋井則貴, 山口照英: 低分子量ヘパリンの酸加水分解及びHPAEC-PADを用いた確認試験及び純度試験法の検討. 日本薬学会 第129年会(2009. 3. 26-28), 京都
 - 14) 秦 艶, 橋井則貴, 川崎ナナ, 山口照英: 強陰イオン交換HPLCを用いたヘパリンナトリウム確認試験及び限度試験に関する研究. 日本薬学会 第129年会(2009. 3. 26-28), 京都
 - 15) 橋井則貴, 川崎ナナ, 篠原 聡, 秦 艶, 黄笑宇, 伊藤さつき, 山口照英: 糖鎖を指標とした細胞治療薬の特性解析. 日本薬学会 第129年会(2009. 3. 26-28), 京都
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
 1. 小川温子, 中村公亮, 坂上ひろみ, 棚元憲一「抗ウイルス剤」(特願2008-301811)
 2. 星野洪郎. B型肝炎ウイルスの感染性を容易に短期間に判定する方法(国際出願: PCT/JP2006/317984)
 3. 小川温子, 斎藤泉, 坂上ひろみ, 「肺炎の予防・治療剤」(特願2008-301811)
 4. 棚元 憲一「新規ペプチドおよびこれを用いたエンドトキシン由来疾患治療剤」(特願2006-21779, 国内, PCT/JP2007/51439, 国外)
 5. 棚元 憲一「抗ウイルス剤」(特願2006-030248)
 6. 小川温子「シュードプロテオグリカンおよびその用途」(国際特許出願PCT/JP2004/004589審査請求中(2007))
 7. 小川温子「蛍光標識糖鎖の特異的固定化試薬および固定化方法」(特願2004-050592審査請求中(2007))
 2. 実用新案登録 なし

図 表

図 1 ~ 14

表 1 ~ 17

図1 シュードPGのサイズ排除HPLCにおける溶出曲線と分子量

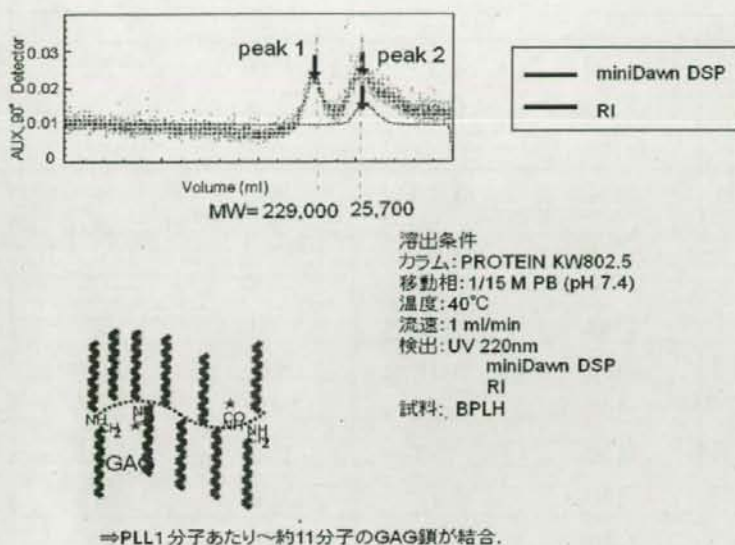


表1. 種々の天然GAGを用いて調製したシュードPGの抗HIV活性

サンプル	MT-4 assay		Magic 5A assay	
	細胞毒性最小濃度 (μg/ml)	最小HIV抑制濃度 (μg/ml)	細胞毒性最小濃度 (μg/ml)	IC ₅₀ (μg/ml)
BPLCSA	100	25	200	11.3
BPLH	200	12.5	200	5.9
BB	200	100	200	86.8
グリカンH	200	25	200	11.6
グリカンHC	200	25	200	5.9
BPLLAC	200	200	100	>100
BPLLNNT	80	NE	80	>80
BPLHS	>200	NE	>200	176.9
BPLHSCEL	200	NE	>200	>200
BHYH	>200	50	>200	10.9
HS	200	50	200	5.8
Cont	1.6	0.0005	18 μM	0.06 μM

表2. GAGおよび骨格分子の鎖長の異なるシュードPGの抗HIV活性

	サンプル名	MT-4細胞アッセイ		MAGIC5 アッセイ	
		CC	IC ₅₀	CC	IC ₅₀
複合体	H1P1P2	>100	3.13	>500	NE
	H1P3	>100	6.25	500	NE
	H1P4	>100	12.50	100	NE
	H2P1	>100	3.13	>500	NE
	H2P2	>100	3.13	>500	(125)
	H2P3	>100	12.50	>500	NE
	H2P4	>100	50.00	500	NE
	H3P1	>100	0.78	>500	11.0
	H3P2	>100	1.56	>500	11.5
	H3P3	>100	NE	500	16.5
	H3P4	>100	3.13	500	38.0
	H4P1	>100	12.50	>500	NE
	H4P2	>100	12.50	>500	NE
	H4P3	>100	NE	>500	NE
	H4P4	>100	1.56	>500	NE
	H5P1	>100	3.13	>500	10.5
H5P2	>100	1.56	>500	5.0	
H5P3	>100	1.56	>500	28.5	
H5P4	>100	3.13	>500	18.0	
多糖	H1	>100	3.13	>500	69.0
	H2	>100	6.25	>500	60.0
	H3	>100	1.56	>500	18.0
	H4	>100	0.39	>250	9.5
	H5	>100	3.13	>500	15.0
ポリマー	P1	>50	NE	500-100	NE
	P2	>50	NE	>500	NE
	P3	>12.5	NE	100	NE
	P4	>6.25	NE	20	NE
1. 陽性コントロール	AZT	>0.25	0.0039	NT	NT
	TAK-779	NT	NT	1 uM	0.004 uM

(表注) MT-4細胞アッセイ ・最終濃度100 μg/mlから2倍希釈

MAGIC5 アッセイ 最終濃度 500ug/mlから5倍希釈 (ただし、H4は250ug/mlから5倍希釈)

・(): 細胞毒性が認められない濃度では、完全なHIV増殖抑制効果は見られない

NE: not effected, NT: not tested, CC: cytotoxic concentration, IC: inhibitory concentration、

表3 1,6-ヘキサリンナトリウムのnanoLC/ESI-TOFMS(negative ion mode)により得られた主要糖鎖

Oligosaccharide size	Eluted times (min)	Observed ion charge (m/z)	The number of residues	Composition ^{a)}				Sulfates/units ^{b)}	theoretical Mass ^{c)} (Da)	Calculated Mass ^{c)} (Da)	Error	
				HexA	HexN	HexNAc	Sulfate					
Disaccharides	31.7,34.5	434.13	1	2	1	1	0	1	1.0	435.07	435.13	-0.06
	34.5,41.1	514.05	1	2	1	1	0	2	2.0	515.02	515.05	-0.03
	34.5,41.1	514.05	1	2	1	1	0	2	2.0	515.02	515.05	-0.03
Trisaccharide	40.4,41.3	594.04	1	2	1	1	0	3	3.0	594.98	595.04	-0.06
	46.7,47.3	434.56	2	3	2	1	0	4	2.7	850.97	851.12	-0.15
Tetrasaccharides	44.2,45.1,49.5,51.2	505.07	2	4	2	2	0	4	2.0	1012.04	1012.14	-0.10
	48.7,49.6,51.2	545.05	2	4	2	2	0	5	2.5	1092.00	1092.10	-0.10
	55.0,56.3	585.03	2	4	2	2	0	6	3.0	1171.95	1172.06	-0.11
Pentasaccharides	48.3,53.2	625.57	2	5	2	3	0	5	2.0	1253.06	1253.14	-0.08
	53.2,58.7	665.60	2	5	2	3	0	6	2.4	1333.02	1333.20	-0.18
	58.7,67.6	705.55	2	5	2	3	0	7	2.8	1412.98	1413.10	-0.12
	62.8	745.52	2	5	2	3	0	8	3.3	1492.94	1493.04	-0.11
	51	633.06	2	5	3	2	0	5	2.0	1268.03	1268.12	-0.09
	55.5	673.04	2	5	3	2	0	6	2.4	1347.98	1348.08	-0.10
Hexasaccharides	60.3	713.02	2	5	3	2	0	7	2.8	1427.94	1428.04	-0.10
	43.6,45.3	694.62	2	6	3	2	1	4	1.3	1391.15	1391.34	-0.09
	48.5,49.4	734.60	2	6	3	2	1	5	1.7	1471.11	1471.20	-0.09
	53	774.58	2	6	3	2	1	6	2.0	1551.06	1551.16	-0.10
	53.3	713.56	2	6	3	3	0	5	1.7	1429.10	1429.12	-0.02
	53.4,58.8	753.57	2	6	3	3	0	6	2.0	1509.05	1509.14	-0.09
Heptasaccharides	53.8,58.7	793.56	2	6	3	3	0	7	2.3	1589.01	1589.12	-0.11
	61.7,63.3,66.5,67.5	555.39	3	6	3	3	0	8	2.7	1668.97	1669.17	-0.20
	58.7	555.74	3	7	3	4	0	6	1.7	1670.12	1670.22	-0.10
	61.4	582.43	3	7	3	4	0	7	2.0	1750.08	1750.29	-0.21
	61.4	609.07	3	7	3	4	0	8	2.3	1830.04	1830.21	-0.17
Octasaccharides	65.1,68.8	635.73	3	7	3	4	0	9	2.6	1909.99	1910.19	-0.20
	68.6	662.38	3	7	3	4	0	10	2.9	1989.95	1990.14	-0.19
	61.8,63.2,67.3	614.07	3	7	4	3	0	8	2.3	1845.00	1845.31	-0.31
	68.8	640.70	3	7	4	3	0	9	2.6	1924.96	1925.10	-0.14
	76.8	667.32	3	7	4	3	0	10	2.9	2004.91	2004.96	-0.05
	53.1,57.7	628.48	3	8	4	3	1	6	1.5	1888.17	1888.44	-0.28
	57.7	655.10	3	8	4	3	1	7	1.8	1968.12	1968.30	-0.18
	61.7	681.75	3	8	4	3	1	8	2.0	2048.08	2048.25	-0.17
	73.6,75.4	420.61	4	8	4	4	0	4	1.0	1686.24	1686.44	-0.20
	73.6,75.5	440.62	4	8	4	4	0	5	1.3	1766.20	1766.48	-0.28
Decasaccharides	73.6,76.5	460.61	4	8	4	4	0	6	1.5	1846.15	1846.44	-0.29
	73.6,76.5	480.61	4	8	4	4	0	7	1.8	1926.11	1926.44	-0.33
	69.2,73.3,76.2	500.58	4	8	4	4	0	8	2.0	2006.07	2006.32	-0.25
	69.0,73.3,76.3	520.58	4	8	4	4	0	9	2.3	2086.02	2086.32	-0.30
	69.0,73.3,76.3	540.56	4	8	4	4	0	10	2.5	2165.98	2166.24	-0.26
	73.3,76.3	560.56	4	8	4	4	0	11	2.8	2245.94	2246.24	-0.30
	73.3,76.3	580.55	4	8	4	4	0	12	3.0	2325.90	2326.20	-0.30
	75.0,78.1	620.81	4	9	4	5	0	12	2.7	2486.96	2487.24	-0.28
	78.1,81.5	640.83	4	9	4	5	0	13	2.9	2566.92	2567.32	-0.40
	81.5,83.8	660.81	4	9	4	5	0	14	3.1	2646.88	2647.24	-0.36
	73.6,77.2	584.55	4	9	5	4	0	10	2.2	2342.01	2342.20	-0.19
77.3,90.5	604.55	4	9	5	4	0	11	2.4	2422.97	2423.20	-0.23	
78	624.54	4	9	5	4	0	12	2.7	2502.93	2502.16	-0.23	
81.6	595.33	4	10	5	4	1	8	1.6	2385.18	2385.32	-0.14	
83.5,85	615.37	4	10	5	4	1	9	1.8	2465.14	2465.48	-0.34	
88.7,72.3	635.35	4	10	5	4	1	10	2.0	2545.09	2545.40	-0.31	
72.3	655.33	4	10	5	4	1	11	2.2	2625.05	2625.32	-0.27	
75.2	675.30	4	10	5	4	1	12	2.4	2705.01	2705.20	-0.19	
75.2,78.5,90.1	604.82	4	10	5	5	0	9	1.8	2423.13	2423.28	-0.15	
75.2,90.5	499.07	5	10	5	5	0	10	2.0	2503.08	2503.35	-0.27	
75.1,78.7,82.2,94.3	515.09	5	10	5	5	0	11	2.2	2583.04	2583.45	-0.41	
75.1,78.7,82.2,94.6	531.82	5	10	5	5	0	12	2.4	2663.00	2663.10	-0.10	
79.0,82.1,84.4,85.1	547.62	5	10	5	5	0	13	2.6	2742.95	2743.10	-0.15	
81.2,82.3,84.3,85.1	563.65	5	10	5	5	0	14	2.8	2822.91	2823.25	-0.34	
84.2,88.6	579.59	5	10	5	5	0	15	3.0	2902.87	2903.95	-0.08	
73.7	506.07	6	12	6	5	1	12	2.0	3042.11	3042.42	-0.31	
87.4,90.1	499.06	6	12	6	6	0	12	2.0	3000.10	3000.38	-0.26	
87.5,90.3	512.18	6	12	6	6	0	13	2.2	3080.05	3080.28	-0.23	
87.4,90.1,93.1,93.8	525.66	6	12	6	6	0	14	2.3	3160.01	3160.14	-0.13	
86.3,87.9,90.2	539.03	6	12	6	6	0	15	2.5	3239.97	3240.18	-0.21	
88.1,90.3	552.39	6	12	6	6	0	16	2.7	3319.92	3320.34	-0.42	
90.1,92.6,94.7	565.69	6	12	6	6	0	17	2.8	3399.88	3400.14	-0.26	
92.7,94.7	578.90	6	12	6	6	0	18	3.0	3479.84	3479.40	0.44	
Tetradecasaccharides	90.0,92.7	592.32	6	12	6	6	0	19	3.2	3559.79	3559.92	-0.13
	89.8,93.0	581.84	6	14	7	7	0	14	2.0	3497.11	3497.04	0.07
	89.8,93.0	595.25	6	14	7	7	0	15	2.1	3577.07	3577.50	-0.43
	89.8,93.8	608.51	6	14	7	7	0	16	2.3	3657.03	3657.06	-0.03
	89.8,93.8	621.82	6	14	7	7	0	17	2.4	3736.98	3737.28	-0.30
	94.8	635.20	6	14	7	7	0	18	2.6	3816.94	3817.20	-0.26

a) HexA: プルクトロン糖, HexN: ドゥルロサミン, HexNAc: N-アセチルドルロサミン, sulfate: 硫酸基. b) 繰り返し残基数のみの場合. c) Monoisotopic values.

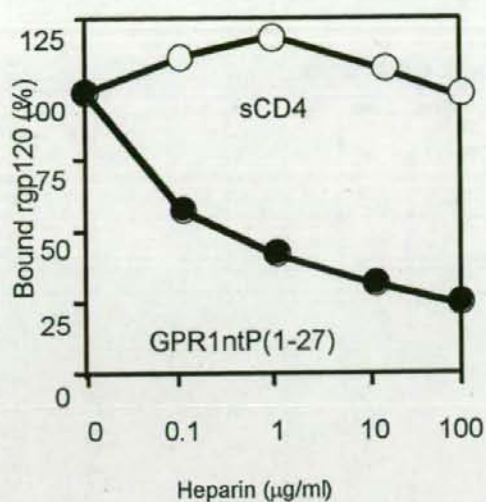
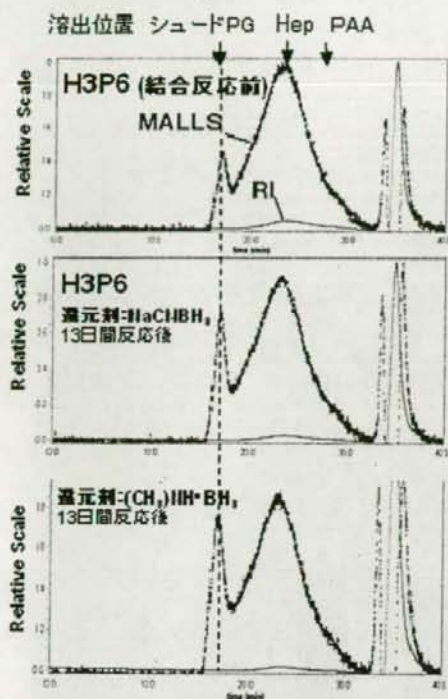


図2 ヘパリンはgp120のCD4結合領域ではなくV3領域に結合する。

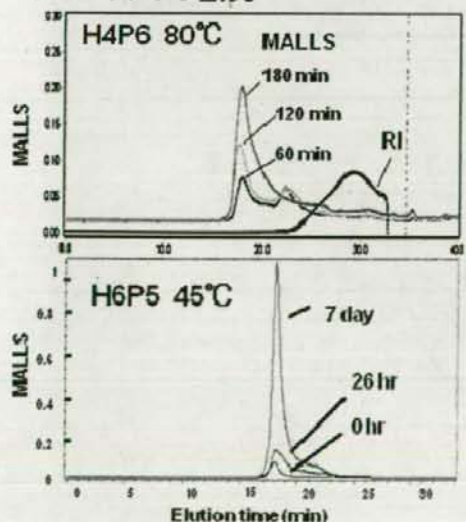
ヘパリンに対するウイルスレセプターと考えられるHIV-1エンベロープタンパク質gp120 (recombinant, rgp120)とHIV-1コレセプターGPR1のN末端側細胞外領域ペプチド(GPR1ntP(1-27))との結合をヘパリンは阻害したが、rgp120と可溶性CD4(sCD4)との結合は阻害しなかったことから、ヘパリンはgp120のCD4結合領域ではなくV3領域に結合することが示された。

図3. 種々のシュードPGの溶出曲線 (SEC-MALLS)

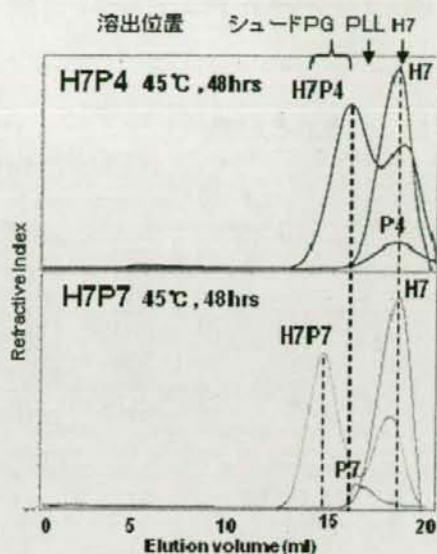
A 還元剤の比較 (ヘパリンシュードPGの合成)



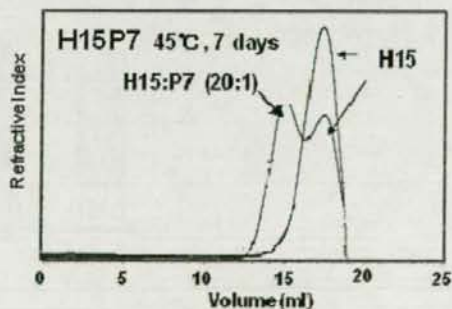
B 反応時間と温度による影響 (ヘパリンシュードPGの合成)



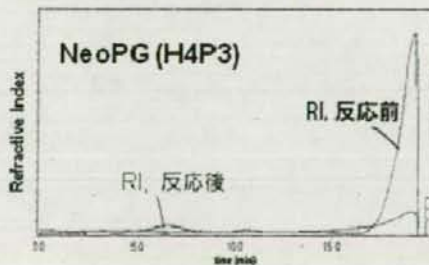
C デキストランシュードPGの合成



D ヒアルロン酸シュードPGの合成



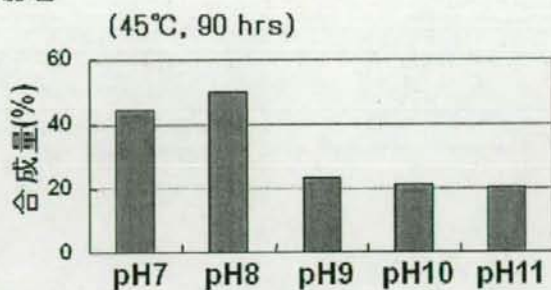
E ヘパリンネオPGの合成



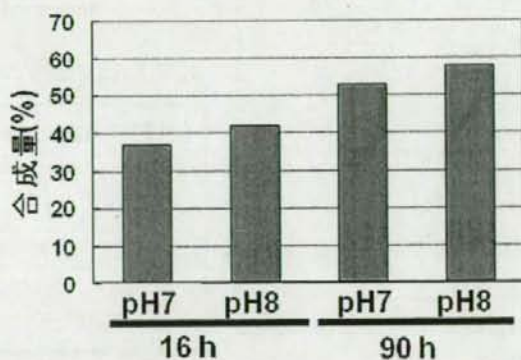
A, BはShodexカラム, C-日はUltrahydro gelカラムを用いた。

図 4 シュードPG (H7P4) 合成へのpH、時間、温度の影響

A pHによる影響



B 反応時間



C 反応温度

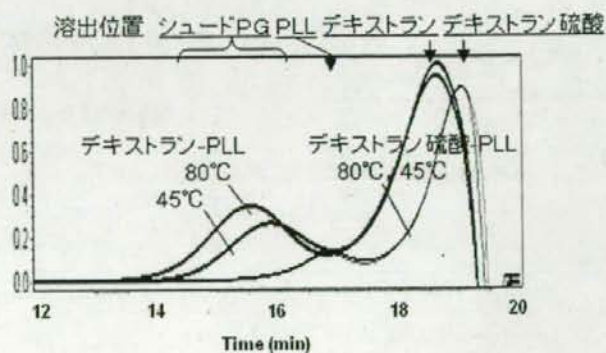
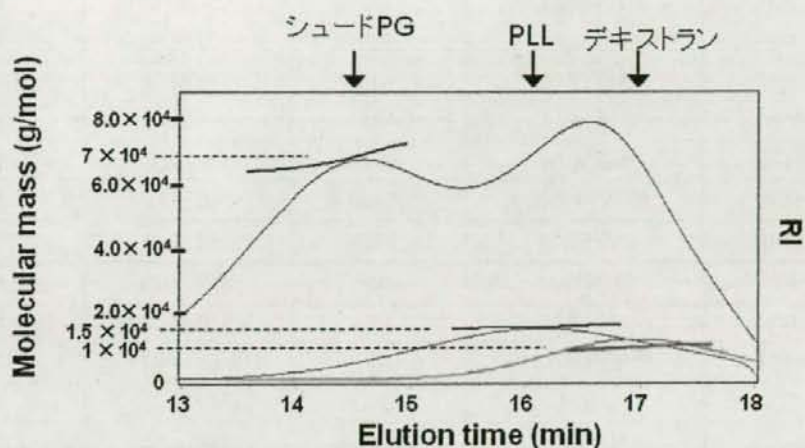
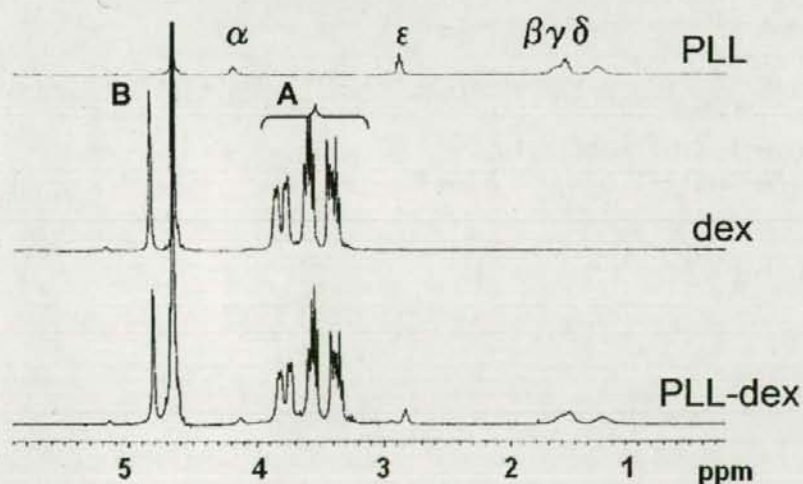


図 5. デキストランシュードPG (H7P4) の構造解析

A. SEC-MALLSによる分子サイズの測定



B. $^1\text{H-NMR}$ による複合体の構造解析



デキストランのプロトン帰属:

- A: 糖のリングプロトン
- B: 糖のアノメリックプロトン

PLLのプロトン帰属:

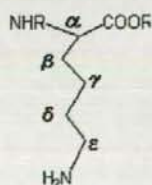


表4. 非硫酸化シュードPG (H7P7)、ネオPGの抗HIV活性

	サンプル名	MT-4細胞アッセイ		MAGIC5アッセイ	
		CC	IC	CC	IC50
ポリマー	P1	>原液/4	NE	>原液/8	NE
	P2	>原液/4	NE	>原液/8	NE
	P3	>原液/4	NE	(原液/8)	NE
	P6	>原液/4	NE	>原液/8	NE
多糖	H4	>原液/4	10.9	>原液/8	NE
複合体	H4P1	>原液/4	48.6	>原液/8	NE
	H4P2	>原液/4	83.0	>原液/8	NE
	H4P3	(原液/4=56.8)	(56.8)	>原液/8	NE
	H4P6	>原液/4	20.5	>原液/8	NE
ポリマー	P7	原液/256	NE	原液/1000	NE
多糖	H7	>原液/4	NE	>原液/8	NE
複合体	H7P7	原液/16=13.8	(6.9)	(原液/8=27.6)	(1.8)
	AZT	>1uM	0.031uM	NT	NT
	DS8000	>500ug/ml	7.8ug/ml	>500ug/ml	46.5ug/ml
	TAK-779	NT	NT	>1uM	0.029uM

(表注) H4P1~H4P6はネオPG, H7P7はシュードPG (非N-アセチル化物)

MT-4細胞アッセイ

・アッセイは原液の4倍希釈からスタートして2段階希釈で行った。

MAGIC5 Assay

・アッセイは原液の8倍希釈からスタートして5段階希釈で行った。(ただし、サンプル番号13-18は4倍希釈からスタート)

・MT-4、MAGIC5共にCC (細胞毒性) は目視のみで判定した

・(): 弱い活性 (または細胞毒性) が認められたことを示す

・NE: not effected

・NT: not tested

DS8000: デキストラン硫酸 MW8000

表5. 非硫酸化シュードPG型薬剤のHIV-1感染抑制効果

No.	Sample	IC ₅₀ *		CC ₅₀ *
		BaL*	IIIB*	
		R5 virus	X4 virus	
1	P4	>100	>100	10-100
2	sulfated P4	>100	>100	10-100
3	H7	>100	>100	>100
4	Low-sulfated H7	>100	14	>100
5	High-sulfated H7	>100	6.7	>100
6	H7P4	3.2	1.8	>100
7	Low-sulfated H7P4	>100	32	>100
8	High-sulfated H7P4	>85	>95	>100
9	H7P7	(0.3)	(0.1)	>5

10	H15	>100	>100	>100
11	Sulfated H15	6.1	0.9	>100
12	H15P4	18	9	>100
13	Sulfated H15P4	>100	>100	>100

14	H19	>100	>100	>100
15	H16	>100	>100	>100
16	H17	>100	>100	>100
17	H13	>100	>100	>100
18	P4	>100	>100	10-100
19	H16P4	>100	1.5	10-100
20	H17P4	>100	>100	1-10
21	H13P4	>100	>100	10-100

22	Heparin (Wako)	70	0.3	>100
23	Dextran sulfate (1400 k) (ICN)	5.9	1.2	>100

* IC₅₀, 50% inhibitory concentration (μg/ml); CC₅₀, 50% cytotoxic concentration (μg/ml); BaL, R5 HIV-1; IIIB, X4 HIV-1. 軽度の細胞毒性が認められた場合には、カッコつきで示した。

表6. シュードPG型薬剤のHIV-1 Envによる合胞体形成への影響

No. Sample	IC ₅₀ (μg/ml)				CC ₅₀ (μg/ml)
	Infection		Coculture		
	BaL (R5)	IIIB (X4)	HeLa/ M-env/Tat (R5)	HeLa KS386 (X4)	
1 Low-sulfated H7	>100	14	>100	>100	>100
2 High-sulfated H7	>100	6.7	>100	>100	>100
3 H7P4	3.2	1.8	>100	>100	>100
4 H7P7	(0.3)	(0.1)	(3)	>100	>100
5 Low-sulfated H7P4	>100	32	>100	>100	>100
6 High-sulfated H7P4	>85	>95	>100	>100	>100
7 Dextran sulfate (1,400 k) (ICN)	6.7	0.2	>100	4	>100
8 Sulfated H15	6.1	0.9	>100	>100	>100
9 H15P4	18	9	>100	>100	>100
10 H16P4	>100	1.5	>100	>100	10-100
11 Control (DMSO)	>100	>100	>100	>100	>100

なお、軽度の細胞毒性が認められた場合には、カッコつきで示した。

図6 ヒトサイクロフィリンA (Cyp A)のタンパク質発現と精製
大腸菌に発現させたrechCypAのSDS-PAGEと抗体反応性

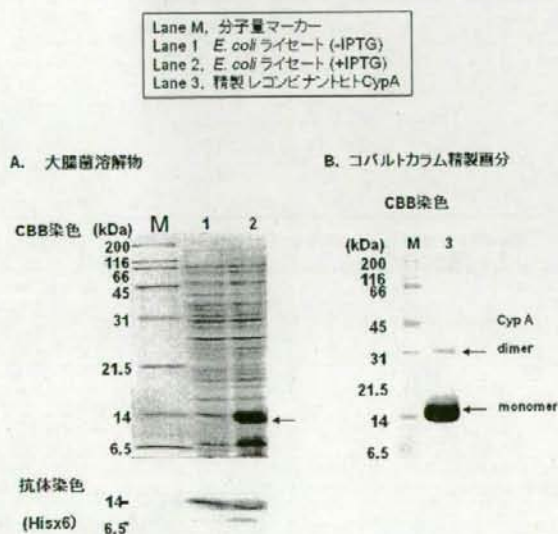


表7. HIV-1 感染者の特徴

感染者番号	RNA (copy number/ml)	CD4 (cells/ml)	AIDS 指標疾患	HAART*	GFP の発現誘導**
1	71	367	なし	AZT, NFV, 3TC	-
2	379	477	なし	治療前	-
3	999	160	なし	ATV,TDF,3TC	R5×4
4	1,890	206	なし	治療前	-
5	2,560	148	カリニ肺炎	EFV,TDF,3TC	R5×4G1
6	3,550	361	カリニ肺炎	ABC,ATV,3TC	-
7	1050	292	なし	中断	[R5]
8	6,180	393	なし	治療前	-
9	26,500	438	なし	治療前	-
10	27,100	234	なし	中断	-
11	29,700	132	カリニ肺炎	EFV, TDF, 3TC	-
12	35,600	489	なし	治療前	-
13	73,200	9	食道カンジダ症	治療前	[G1]
14	83,200	522	なし	中断	R5
15	90,600	350	なし	中断	R5
16	151,000	393	なし	治療前	R5

* ABC, ATV, AZT, EFV, NFV, TDF,3TC は、それぞれ Avacavir, Zidovudine, Efavirenz, Nelfinavir, Tenofovir, Lamivudine を略して表記した。

** 混合培養は、GFP 陽性の多核巨細胞を形成した N4R5/GFP, N4X4/GFP, N4G1/GFP 細胞を R5, X4, G1 と表記した。継代後に GFP 陽性細胞が消失したサンプルを括弧で示した。

表8. HIV-1 感染者由来のウイルスの力価

グループ	感染者番号	GFP 発現を誘導した細胞	混合培養日数	感染性(IU/ml)			コレセプター利用能
				N4R5/GFP	N4X4/GFP	N4G1/GFP	
(1)	14	N4R5/GFP	8	18,000	< 20	< 20	R5
	15	N4R5/GFP	16	40,000	< 20	< 20	R5
	16	N4R5/GFP	16	1,000	< 20	< 20	R5
(2)	3	N4R5/GFP	25	80,000	66,000	< 20	R5, X4
		N4X4/GFP	12	100,000	30,000	< 20	R5, X4
(3)	5	N4R5/GFP	16	27,000	83,000	17,000	R5, X4, G1
		N4X4/GFP	16	63,000	85,000	4,500	R5, X4, G1
		N4G1/GFP	16	1,200	3,500	400	R5, X4, G1
(4)	7	N4R5/GFP	16	< 20	< 20	< 20	-
		N4G1/GFP	16	< 20	< 20	< 20	-

16名の HIV-1 感染者由来の PBMC は NP-2/GFP 指示細胞と混合培養し、5 週間継代した。GFP 陽性細胞が 5%以上になったとき、培養上清を回収し、NP-2/GFP 指示細胞を用いてウイルス力価を測定した。

* 培養上清 1ml あたりの infectious units (IU/ml)。

** HIV/SIV のコレセプターとして機能する CCR5, CXCR4, GPR1 はそれぞれ R5, X4, G1 と略して表記した。

図7 ヒアルロン酸シュードPG (H15P4) の合成と
SEC-MALLSによる分子量測定

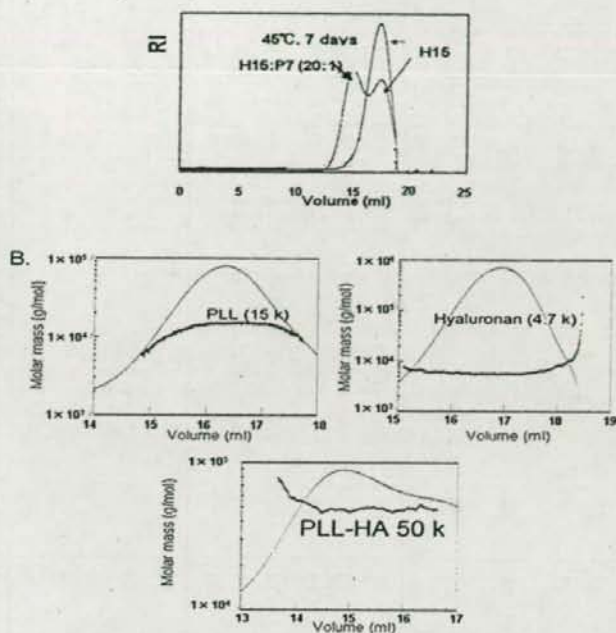


図8 ヒアルロン酸(M.W. 130,000) (A), 低分子量ヒアルロン酸(H15, M.W. 4,700) (B), 硫酸化H15(C) 及びシュードPG (PLL(M.W. 約20,000) + H15(P4H15))(D) の ^1H NMR. P4H15では, αGlcNAc のH1が観測されなかった. βGlcNAc のH1はDOHのピークと重なっている.

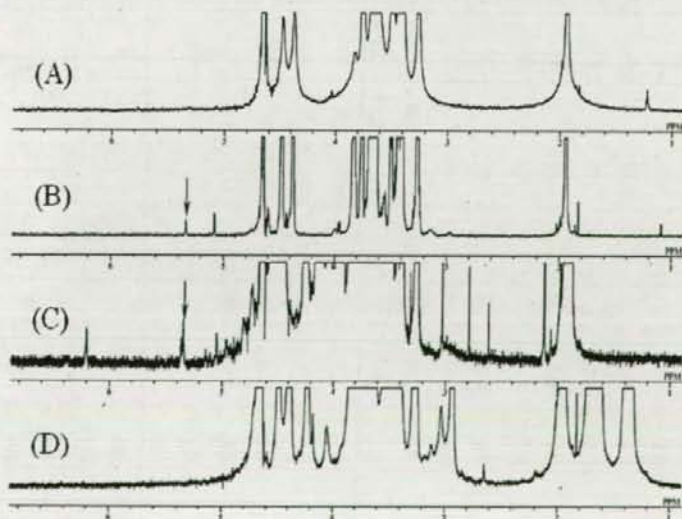


表1 ニアロロン酸 (HA, M.W. 130,000) (分子量とニアロロン酸 (H1, M.W. 4,700), 糖鎖化H₂(H1S), シュワード33 (PIL (M.W. 約20,000)+H1S (P4H1S))及び糖鎖化とニアロロン酸 (CSHA, M.W. 130,000) の化学シフト

Residue	Proton	¹ H Chemical shift (ppm)					¹³ C Chemical shift (ppm)					
		HA	H1S	H1S	P4H1S	CSHA	Carbon	HA	H1S	H1S	P4H1S	CSHA
GlcNAc	H1	① 4.8	① 4.48	① 4.51	① 4.49	4.84	C1	① 102.9	① 102.9	① 103.3	① 103.1	101.3
	H2	3.76	3.76	3.75	3.77	3.87	C2	53.2	56.5	57.2	57.0	56.6
	H3	3.63	3.62	3.63	3.64	4.39	C3	82.1	84.9	85.1	82.5	78.2
	H4	3.44	3.42	3.45	3.46	4.06	C4	67.1	70.9	71.2	71.4	70.5
	H5	3.41	3.41	3.39	3.40	3.87	C5	74.2	77.8	78.3	78.2	74.4
	H6a	3.66	3.68	3.65	3.69	4.17	C6	60.8	62.9	63.3	63.4	69.3
GlcA	H6b	3.84	3.84	3.81	3.84	4.54						
	HA		H1S	H1S	P4H1S	CSHA	HA	H1S	H1S	P4H1S		
	① 4.38	① 4.28	① 4.42	① 4.46	① 4.51	4.89	① 101.8	① 105.4	① 105.8	① 106.0	103.9	
	3.26	3.26	3.29	3.26	3.27	4.45	C2	71.5	74.9	75.0	75.3	81.1
	3.40	3.40	n.d.	3.55	n.d.	4.82	C3	72.4	n.d.	76.7	75.9	78.2
H4	3.66	3.68	n.d.	3.71	n.d.	4.47	C4	81.1	82.3	83.7	78.9	77.2
H5	3.41	3.63	n.d.	3.68	n.d.	4.22	C5	75.1	78.5	76.0	78.9	81.5
PIL	Hc				① 4.23	4.23	Cz				① 55.9	55.9
	Hd				1.67	1.73	Cd				33.4	33.4
	He				1.35	1.40	Ce				25.1	25.1
	Hf				1.63	1.63	Cf				20.1	20.1
	Hg				2.94	2.54	Cg				42.0	42.0

¹H NMR のアミカルシフトは DCE を 40 ppm に設定して算出した。① 非糖鎖化 GlcA (I) 非糖鎖化 GlcA (II) 非糖鎖化 GlcA (III) 還元末端 GlcNAc (IV) 6-O-糖鎖化 GlcNAc (V) 2-O-糖鎖化 GlcA (VI) 還元末端 GlcNAc (VII), アンダーラインの値は、HA 及び H1S と比較して大幅に低シフトしていることを示す。

表11 シュードPG (PLL-デキストラン) の組成と合成収率

(Dex(S) = H7 or H18, PLL(S) = P4, PLL(L) = P7)

	Dex(S)	PLL(S)	PLL(S)-Dex(S)	PLL(L)	PLL(L)-Dex(S)
dn/dc	0.120	0.160	0.115	0.158	0.146
\overline{M}_w (g/mol)	1.09×10^4	9.81×10^3	9.78×10^4 (1:8)**	2.14×10^4	1.38×10^5 (1:11)**
化学組成	PLL (mg/ml)	—	0.45	0.65	0.98
	糖鎖 (mg/ml)	10	—	6.03	—
モル比 PLL:糖鎖	—	—	1:8	—	1:9
合成収率(%)	—	—	64	—	65

* \overline{M}_w : SEC-MALLSにより算出.

** 括弧内の (PLL:糖鎖) はSEC-MALLSから求めた \overline{M}_w より算出した組成比.

図9 マクロファージ指向性ウイルスに対する有効性

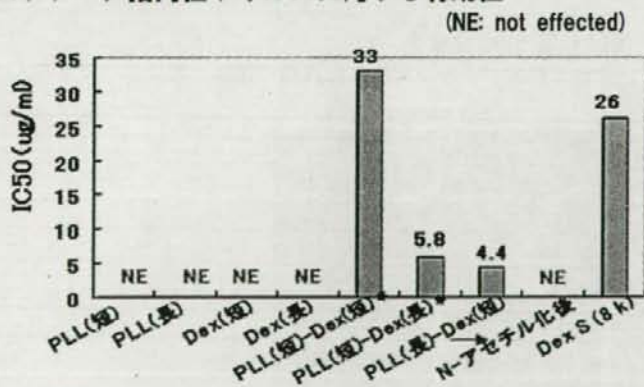


表12 種々のシュードPGのアミノ基修飾による抗HIV活性変化

サンプル	MAGIC5 アッセイ	
	CC	IC50
dextran	0	NE
acetylated dextran	0	NE
biotinylated dextran	0	NE
PLL1	7.6	NE
acetylated PLL1	>245	NE
biotinylated PLL1	15.9	NE
Acetylated/biotinylated PLL1	645	NE
PLL2	7.6	NE
acetylated PLL2	270	NE
biotinylated PLL2	1.76	NE
Acetylated/biotinylated PLL2	155	NE
PLL1-dextran	120	17.3
acetylated PLL1-dextran	>65	NE
biotinylated PLL1-dextran	>2.1	NE
Acetylated/biotinylated PLL1-dextran	>44.5	NE
PLL2-dextran	150	2.7
acetylated PLL2-dextran	>110	NE
biotinylated PLL2-dextran	95	NE
Acetylated/biotinylated PLL2-dextran	>46	NE
DS8000	>500 μ g/ml	45.0 μ g/ml
TAK779	>1 μ M	0.047 μ M

PLL1: 15-30K, PLL2: 40-60K, Dextran: 10K, DS8000: デキストラン硫酸 8K, NE: not effected

図10 NP-2/GFP細胞を用いた抗HIV活性検出

Bal株(左)およびIIIB株(右)で、それぞれのパネルに添加した薬剤の種類と量は同一である。

Bal strain		IIIB strain	
a. 骨格分子材料 1 μ g/ml	b. 多糖材料 100 μ g/ml		
c. H7P4100 μ g/ml	d. Mock		
e. DexS 50k 100 μ g/ml	f. AZT 10 μ g/ml		