

エイズウイルスと硫酸化多糖

Aids Virus and Sulfated Polysaccharides

吉 田 孝*・瓜 生 敏 之*

Takashi YOSHIDA and Toshiyuki URYU

硫酸化多糖は、抗凝血活性などのヘパリノイドとしての作用を持つほかに、最近高い抗エイズウイルス作用をもつことを見いだした。無水糖の開環重合により立体規則性多糖が得られることはすでに報告している。それらの合成多糖や天然多糖のカードランなどを硫酸化した硫酸化多糖が高い抗エイズウイルス作用を示し、特に、カードラン硫酸では抗凝血活性や細胞毒性も低いことが明らかとなった。

1. はじめに

エイズはHIVと呼ばれるレトロウイルスがT4リンパ球などに感染して免疫機能を低下させてしまう病気である。その結果、普通ではめったに感染しない弱いバクテリアやウイルスに簡単に感染してしまい(日和見感染)エイズという病気になる。アメリカやヨーロッパに比べ日本では患者の数は少ないものの、1991年4月末現在で、感染者は1652人、患者数は378人、死亡者は171人である。この数字は日を追って確実に増える傾向にあり、対策が急がれている。

エイズは、1981年に初めて発病が報告されて以来¹⁾、現在までにウイルスを殺傷する決定的なワクチンやエイズ薬の開発には至っていない。唯一治療に使われている薬にAZT(アジドチミジン)があるが、造血障害という重い副作用やAZTに耐性があるウイルスの出現など新たな薬剤の開発が望まれている。

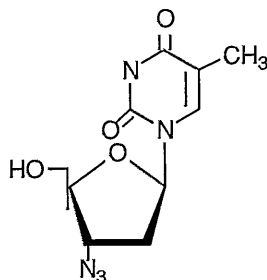
ドイツのH. Diringerらは、1984年に羊の脳炎を起こす

スクレピーウイルスに対してデキストラン硫酸が効果があることを発見し²⁾、1987年には抗エイズウイルス作用を持つことも見いだした³⁾。一方、同時期に海藻から抽出した天然硫酸化多糖が抗レトロウイルス作用を持つことを、山本直樹教授(東医歯大)らによって発見されて以来⁴⁾、われわれは合成硫酸化多糖が高い抗エイズウイルス作用を持つことを見いだした⁵⁾。リボース、キシロース、アラビノース、グルコース、マンノースなどからの硫酸化多糖およびレンチナン、カードラン、デキストランなどの天然多糖からも硫酸化により硫酸化多糖を合成した⁶⁾。カードランはある種の菌が生産する1,3-β構造を有する直鎖状多糖で食品添加物として使用されている。レンチナンは椎茸から抽出される分枝多糖でカードランと同じ1,3-β構造を持つが、抗ガン剤として使われている。デキストランも菌が生産する1,6-α構造の分枝多糖で血しょう増量剤など医療用として用いられている。硫酸化多糖の構造はNMRによって解析を行った。本解説では無水糖の開環重合による立体規則性多糖の合成、合成多糖および天然多糖の硫酸化、硫酸化多糖の抗エイズウイルス作用、今後の展望の順で述べる。

2. 無水糖の開環重合による立体規則性多糖の合成

リボース、キシロース、アラビノースなどの5炭糖やマンノース、グルコースなどの6炭糖などの無水糖を真空熱分解によって合成し、水酸基に保護基を導入後、ルイス酸触媒によるカチオン開環重合によって立体規則性多糖を得た⁷⁾。それを脱保護してフリー多糖とした。

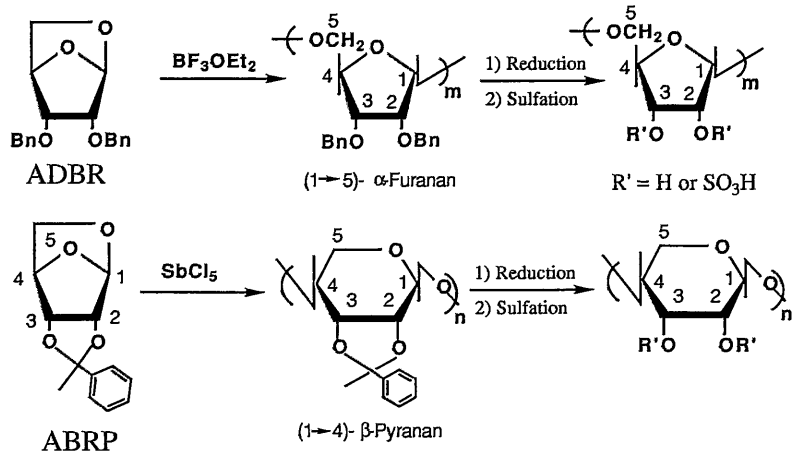
Scheme 1にはリボースのポリマーであるリボフランタンとリポピラナンの合成について示す⁸⁾。無水糖の開環重合では、得られたポリマーの構造はScheme 2に示すようにC1-O-C4かC1-O-C5結合の切れ方とH1のαとβにより4つの構造の可能性がある。しかしベンジル化無水



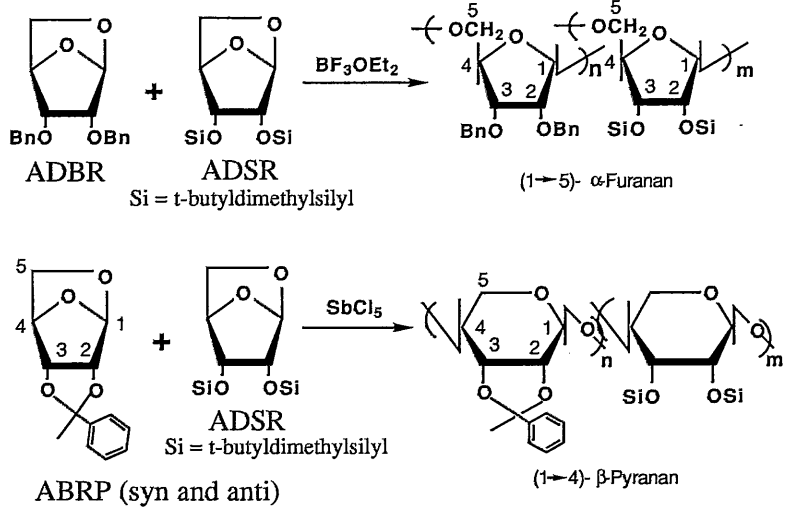
AZT
(3'-azido-2',3'-dideoxythymidine)

*東京大学生産技術研究所 第4部

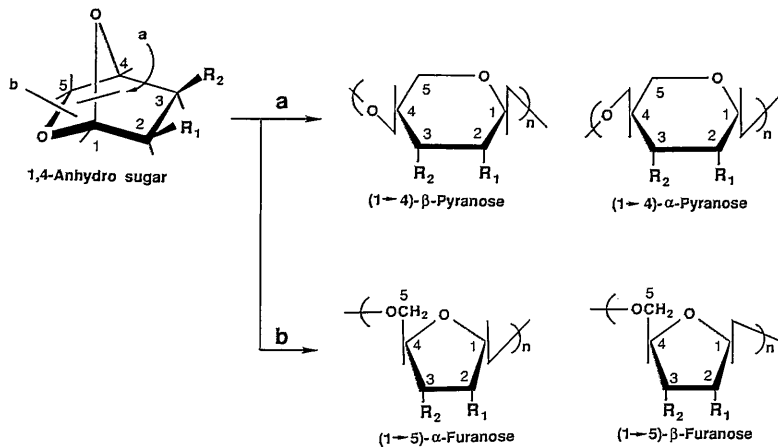
Homopolymerization



Copolymerization



Scheme 1 Synthesis of stereoregular polysaccharides by ring-opening polymerization of anhydro sugars

Scheme 2 Ring-opening modes of 1,4-anhydro- α -D-ribofuranose

リボース (ASBR) の場合には触媒として BF_3OEt_2 触媒を用いて重合を行うと、1,5- α 構造のポリマーが、ベンジリデン化無水リボース (ABRP) の場合には、 SbCl_5 触媒を用いると、1,4- β 構造のポリマーが得られた。これらは脱保護して (1 \rightarrow 5)- α -リボフランおよびセルロースと同じ主鎖の結合様式を持つ (1 \rightarrow 4)- β -リボピラナンとした。このほかにも *t*-ブチルジメチルシリル化無水リボース (ADSR) と ABRP、ADSR と ADBR との共重合によりフラノース構造またはピラノース構造を持つ立体規則性多糖を合成し、グルコースのオルトエステル体などにより枝を生やした分枝多糖も合成した。

3. 多糖の硫酸化

開環重合によって得られた合成多糖や天然多糖デキストラン、カードラン、レンチナンは DMSO に溶かしてピペリジン硫酸によって硫酸化を行い硫酸化多糖とした。

硫酸化多糖の構造を解析するために高分解能 ^{13}C NMR スペクトルや 2 次元 NMR を測定した⁶⁰⁾。図 1 には硫酸化度の異なったカードラン硫酸の ^{13}C NMR を示す。A は硫酸化度 1.6、B は 1.1、C は 0.35 のカードラン硫酸である。硫酸化度が高くなると C6 の吸収は硫酸基によって完全に置換されるために 63 ppm から 70 ppm 付近に低磁場シフトする。そして C1 吸収は A に示すように分裂した。

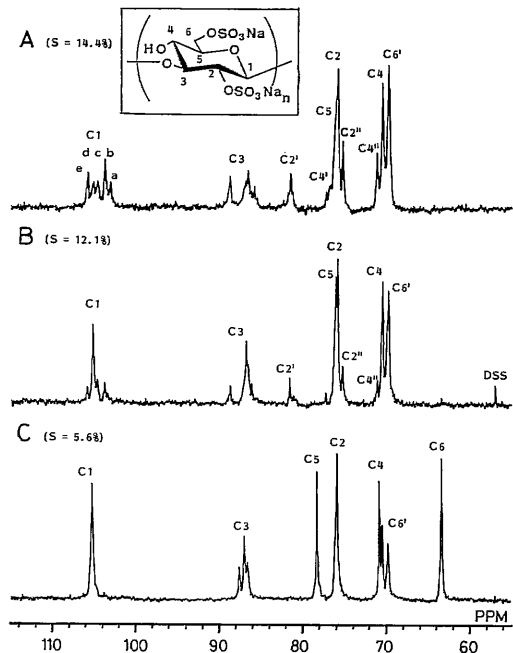


Fig. 1 67.8 MHz ^{13}C NMR spectra of curdulan sulfates prepared by piperidine N-sulfuric acid (D_2O as solvent at 37°C). (A) $S=14.4\%$ ($DS=1.6$), (B) $S=12.1\%$ ($DS=1.1$), (C) $S=5.6\%$ ($DS=0.35$).

そこで A の構造をもっと詳細に検討するために、この H1 の積分値を測定し、さらに H-H COSY スペクトル、C-H COSY スペクトルを測定し、硫酸基の位置と割合を決定した (図 2)。図 2D はカードラン硫酸の H-H COSY スペクトル、そしてスペクトル C、B、A はそれぞれ Relayed COSY スペクトルで、C は H1 と H2、H3、B は H1 と H2、H3、H4、A は H1 と H2、H3、H4、H5 の相関ピークが現れている。D で H1-H2 のクロスピークが 2 カ所に現れた。低磁場側の吸収 a、b は硫酸基が直接結合した H2、ピーク c、d、e は硫酸基の入っていない H2 の吸収であることがわかる。B では H1-H4 のクロスピークが現れている。低磁場側の吸収は H1e を示し、これに対応する H4e は直接硫酸基が入っていると考えられる。したがって図 1A の a と b は 6 位と 2 位が硫酸基によって置換された C1 の吸収、c、d は 6 位のみ、e には 6 位のみと 6 位と 4 位が置換された C1 の吸収が重なって現れていることがわかった。各位置における硫酸基は、6 位には 100%、2 位には約 40%、4 位には約 5% 導入されていることが明らかとなった。

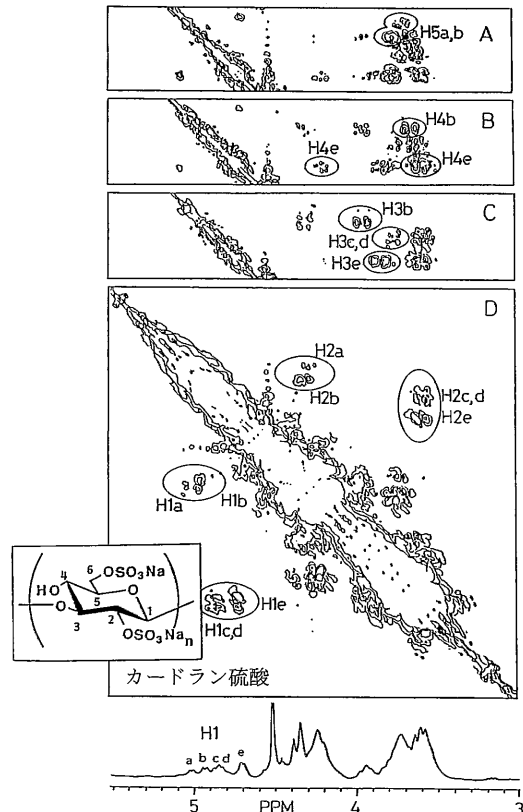


Fig. 2 2D NMR spectra of curdulan sulfate ($S=14.4\%$). (D) H-H COSY spectrum, (C), (B), (A) single, double, and triple relayed COSY spectra (D_2O as solvent at 37°C)

4. 硫酸化多糖の抗エイズウイルス作用

現在さまざまなエイズ治療法が考えられているが、3つに大別することができる。(1)エイズウイルスそのものを殺してしまうもので、ワクチンなどが該当する。しかし、エイズウイルスのエンベロープ糖タンパクgp120は変異しやすいために、有効に働くワクチンは作るのが難しいらしく誰も成功していない。(2)エイズウイルスのTリンパ球などへの結合を阻害する化合物。エイズウイルスの糖タンパクgp120が、T4リンパ球などの表皮タンパクCD4に結合することにより、エイズは感染するが、その結合を阻害する作用をもつと考えられる硫酸化多糖や可溶性CD4などが考えられる。(3)エイズウイルスの逆転写を阻害するもの。現在唯一治療に使われているAZTなどで、ウイルスの逆転写酵素の働きを抑制する。

エイズウイルスに感染したTリンパ球は約1万個のウイルスを放出する。その多くは不完全ウイルスで感染力を持つものは少ないと考えられている。しかし感染力のあるエイズウイルスが1個でもあれば、ウイルスの増殖を繰り返すので、エイズ薬としては完全にエイズウイルスの増殖を抑制しなければならない。

硫酸化多糖には血を固めなくする作用すなわち抗凝血作用があることがよく知られており、その代表としてのヘパリンは、血液中のアンチトロンビンIIIと相互作用し活性化されたアンチトロンビンIIIは凝血因子であるトロンビンの働きを抑えてしまうことにより抗凝血作用が起こる。またデキストランを硫酸化したデキストラン硫酸も抗凝血剤、コレステロール低下剤として使用されている。しかし抗エイズウイルス薬として硫酸化多糖を用いる場合には、抗凝血作用は低いほうがよい。

合成した硫酸化多糖について抗エイズウイルス作用、抗凝血作用⁹⁾を測定した。図3にはエイズウイルスの存

在下(斜線)および不在下(白棒)、30万個に調整したMT-4細胞を3日間と6日間培養したとき、生細胞数と免疫蛍光法陽性率に及ぼすカードラン硫酸の影響について調べた結果である。横軸にはカードラン硫酸の濃度($\mu\text{g/ml}$)、左軸は生細胞数、右軸はMT-4細胞がどのくらいの割合でエイズウイルスに感染したかを示す抗原陽性率である。6日目の結果で見ると、 $3.3\mu\text{g/ml}$ の濃度で抗原陽性率が0になるので、カードラン硫酸はエイズウイルスの増殖を完全に抑制することを見いだした。しかもMT-4細胞は150~200万個に正常に増殖し、 $5000\mu\text{g/ml}$ 添加としてもカードラン硫酸を加えない系($0\mu\text{g/ml}$)と比較してほとんど変わらなかった。このことは毒性がきわめて低いことを示している。

表1には硫酸化度の異なるカードラン硫酸の抗エイズ

Table 1 Anti-AIDS viral activity of curdlan sulfates prepared by piperidine N-sulfuric acid

Curdlan sulfate	S content %	DS ^a	$\overline{M}_n^b \times 10^4$	$[\alpha]_D^{25c}$ deg.	Anti-AIDS ^d activity $\mu\text{g/ml}$
1	5.6	0.35			no effect
2	8.9	0.8	6.8		1000
3	12.2	1.1	8.1	-1.7	10
4	12.1	1.1	11.8	-3.8	3.3
5	12.5	1.3	15.7	-2.3	3.3
6	13.6	1.4	3.4	-0.8	3.3
7	14.1	1.6	2.1	-1.9	3.3
8	14.4	1.6	4.6	+0.1	3.3
9	14.7	1.6	2.0	-1.5	3.3

a) The number of sulfate groups per glucose unit in curdlan sulfate. b) Determined by GPC. c) Measured in water (c1). d) Minimum effective concentration of curdlan sulfate on complete inhibition of HIV infection.

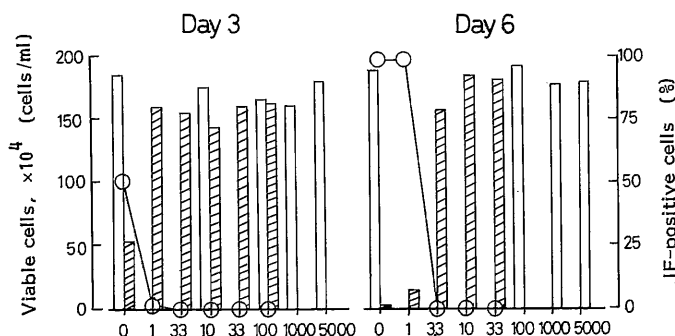


Fig. 3 Effects of curdlan sulfate (S=14.4%) on cell growth and HIV-induced cytopathic effects (CPE). Open bars: MT-4 cells. Slash bars: MT-4 cells and HIV-infected MT-4 cells (0.2%). Open circles: The percentage of IF-positive cells was determined by counting the IF-positive cells per approximately 500 cells after 3 and 6 days of infection.

ウイルス活性を調べた結果を示す。No. 1や2のように硫酸化度が低いと、抗エイズウイルス活性はほとんどない。しかし硫酸化度が上がるに従って、活性は高くなり、No. 7, 8, 9で示すように、硫酸化度1.6の場合には $3.3\mu\text{g}/\text{ml}$ の低濃度で、完全にエイズウイルスの増殖を抑制することを見いだした。また分子量は硫酸化度が大きい場合には2万程度でも抗エイズウイルス活性は高いが、硫酸化度が低いと、たとえばNo. 3, 4, 5のように、11万8千, 15万7千など大きな分子量が必要であることがわかった。また、カドラン硫酸の抗凝血活性値は、アメリカ薬局方へパリンカ価検定法に従いデキストラン硫酸を基準(NC-1032, $20.3\text{unit}/\text{mg}$)として測定したところ、 $10\text{unit}/\text{mg}$ 以下となり他の硫酸化多糖にくらべて低いことがわかり、抗エイズ薬として有望であることを示している。

続いて合成硫酸化多糖の抗エイズウイルス活性と抗凝血活性を測定した結果を表2に示す。エイズウイルス存在下、MT-4細胞を6日間培養するとアラビノフラナン硫酸、リボフラナン硫酸、デキストラン硫酸は、 $3.3\sim 10\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で抗原陽性率は0となり、完全にエイズウイルスの増殖を抑制する。キシロフラナン硫酸では、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で効く。一方、これら合成硫酸化多糖の抗凝血活性値は $28\sim 85\text{unit}/\text{mg}$ と標準デキストラン硫酸と比較して高い値となった。カドラン硫酸やレンチナン硫酸などと比べて、このままではエイズ薬としては副作用が大きいだろう。

エイズウイルスの感染によって巨細胞を形成しやすいMOLT-4細胞を用いて硫酸化多糖の有無による巨細胞の形成を観察した結果を図4に示す。この写真は山本直

樹教授(東医歯大)によって撮影されたものである。写真eはMOLT-4細胞にエイズウイルスを感染させて3日間培養したもので、巨細胞の形成が見られる。一方写真a~dはデキストラン硫酸(aとb)、キシロフラナン硫

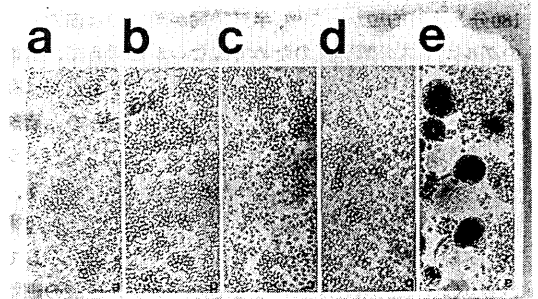


Fig. 4 Inhibitory effects of sulfated polysaccharides on giant cell formation in the coculture of MOLT-4/MOLT-4_{HTLV-IIIb} cells. (a) Multinucleated giant cells were observed after 3 days of infection without any sulfated polysaccharides. (b), (c), (d), (e) No giant cells were observed in the coculture with $100\mu\text{g}/\text{ml}$ of dextran sulfate ($M_n = 3.4 \times 10^4$), dextran sulfate ($M_n = 0.7 \times 10^4$), xylofuranan sulfate, and ribofuranan sulfate, respectively.

Table 3 The half-life time of curdlan sulfates in rat plasma *in vivo*

No.	$\bar{M}_w \times 10^4$	S content %	$T_{1/2}$ min
1	7	14.6	60
2	17	14.5	180

Table 2 Physical and biological properties of sulfated polysaccharides

Sulfated polysaccharide	S content %	DS ^a	$[\alpha]^{25}_D$ ^b deg	$\bar{M}_n^c \times 10^4$	Anticoagulant ^d activity unit/mg	Anti-AIDS ^e activity $\mu\text{g}/\text{ml}$
Arabinofuranan	15.7	1.6	+5.1	2.4	34	3.3
Xylofuranan	14.2	1.6	+93.1	0.7	28	100
Ribofuranan	17.6	1.9	+83.0	1.7	56	3.3
Mannose-branched (13%) ribofuranan	16.1	1.7	+78.4	1.2	55	3.3
Linear dextran	12.4	1.2	+127.3	4.2	49	3.3
Linear dextran	13.5	1.7	+105.2	2.2	59	3.3
Mannose-branched (49%) dextran	15.2	1.9	+80.6	2.4	85	10
Natural dextran (1→4 13%, 1→3 18%)	13.5	1.4	+121.7	6.6	56	10
Lentinan	16.4	2.1	+2.2	1.9	21	3.3
Curdlan	14.4	1.6	+0.1	4.6	10	3.3

a) The degree of substitution of sulfate groups per glucose unit.

b) Measured in H_2O (c1). c) Determined by GPC. d) Commercial dextran sulfate NC-1032, $20.6\text{unit}/\text{mg}$.

e) Minimum effective concentration.

酸, リポフラン硫酸を100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で加えて培養したもので巨細胞は観察されないで硫酸化多糖は完全にエイズウイルスの増殖を抑制した。

実際の血液中でのカードラン硫酸の半減時間は表3に示すように, 分子量7万のもので60分, 17万のものでは180分と比較的短かった¹⁰⁾。半減時間が短いのは血液中でのグルコース分解酵素のためではないかと考えて, 硫酸化多糖の血液中での半減時間を延ばす目的で天然には存在しないL体の糖の枝をカードランに生やしたあと硫酸化を行った。表4にはMTT法¹¹⁾で調べた分枝カードラン硫酸の抗エイズウイルス活性の結果を示してある。EC₅₀はエイズウイルス感染によるMT-4細胞の細胞障害を50%保護する濃度で, 抗エイズウイルス活性を示している。CC₅₀は50%細胞障害濃度でカードラン硫酸の細胞毒性を示している。選択指数SIはCC₅₀/EC₅₀の値で, 大きいほど抗エイズウイルス作用の効果が高いことを示している。基準物質として用いたカードラン硫酸(CS), デキストラン硫酸(DS), およびAZTの値も示した。分枝カードラン硫酸は, 基準のCSと比べほとんど同じ抗エイズウイルス活性を示したが硫酸化度の高いD-グルコース分枝カードラン硫酸では, EC₅₀が0.29 $\mu\text{g/ml}$, SIが3431 $\mu\text{g/ml}$ と特に効果が高いことがわかった。CC₅₀は1000 $\mu\text{g/ml}$ 以上となり細胞毒性は低い。そこでラットを用いて分枝カードラン硫酸の血中保持時間を調べたが, 現在, 基準としたカードラン硫酸とほとんど同じ挙動を示し顕著な時間の増大は認められていない。このことは初め考えたようにカードラン硫酸は血液中での分解酵素によって分解代謝されるのではなく肝臓や骨髄など他の臓器に蓄積されて血中濃度が時間経過によって減ることが明らかになってきた¹²⁾。しかし, 他の臓器に分子量の減少や硫酸基の脱離なしにほとんどそのままの形で残っているため, 硫酸化多糖の抗エイズウイルス作用にとってはそれほど悪いことではないという考えもある。

5. 今後の展望

カードラン硫酸は, エイズウイルスがTリンパ球などに侵入する初めの段階を阻害する作用なので, 感染のごく初期の段階で効果的であると考えられる。また抗凝血活性や毒性も低いことがわかったが, 実際のヒトに対してはFDA(アメリカ食品医薬局)に臨床試験許可申請をする予定である。抗がん剤として市販されている, 免疫賦活作用を有するレンチナンはすでにフェーズI/IIの毒性和最適投与方法を確認する試験を終了し薬効を確認するフェーズII/IIIに入る予定と伝えられている。

現在のどのエイズ薬でもウイルスが感染した細胞に対しては見かけ上正常細胞と区別がつかないので治療の方

Table 4 Anti-AIDS viral activity of branched curdolan sulfates

Curdlan Sulfate ^a (Branch)	S content %	$\bar{M}_n \times 10^4$	EC ₅₀ ^b $\mu\text{g/ml}$	CC ₅₀ ^c $\mu\text{g/ml}$	SI ^d
DGCS1 (39%)	13.2	4.2	0.97	>1000	>1031
DGCS2 (39%)	14.4	3.6	0.29	>1000	>3431
LGCS (35%)	13.2	4.7	1.28	>1000	>781
DMCS (19%)	15.1	1.7	1.87	>1000	>534
LMCS (17%)	15.2	1.2	1.53	>1000	>651
CS	14.1	4.6	0.43	>1000	>2326
DS	18	0.7	4.48	>1000	>223
AZT (μM)			0.0077	8.52	1110

a) DGCS: D-glucose-branched curdolan sulfate, LGCS: L-glucose-branched curdolan sulfate, DMCS: D-mannose-branched curdolan sulfate, LMCS: L-mannose-branched curdolan sulfate, DS: dextran sulfate. b) 50% Effective concentration. c) 50% Cytotoxic concentration. d) Selectivity index: CC₅₀/EC₅₀.

法がない。エイズウイルスに感染してから発病するまでは平均約10年なので, エイズの発病を抑え潜伏期間を長くして感染者が死なないようにする薬の開発も重要との考えもある。(1991年6月11日受理)

参考文献

- 1) M.S. Gottlieb, et al., *New Engl. J. Med.*, 305, 1425 (1981).
- 2) B. Ehlers, et al., *J. Gen. Virol.*, 65, 423 (1984).
- 3) ハノイ・デイリンジャー, 公開特許公報(A), 昭62-215529.
- 4) H. Nakashima, et al., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 113, 413 (1987).
- 5) H. Nakashima, et al., *Jpn. J. Cancer Res.*, 78, 1164, (1987).
- 6) a) K. Hatanaka, et al., *Jpn. J. Cancer Res.*, 80, 95 (1989)., b) 畑中研一, 瓜生敏之, 生産研究, 41, 167(1989)., c) T. Yoshida, et al., *Macromolecules*, 23, 3717 (1990)., d) 吉田 孝, 瓜生敏之, 生産研究, 42, 626(1990).
- 7) a) T. Uryu and C. Schuerch, *Macromolecules*, 4, 342 (1971)., b) T. Uryu, et al., *ibid.*, 14, 1 (1981)., c) T. Uryu, et al., *ibid.*, 16, 320 (1983)., d) T. Uryu, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 6865 (1983)., e) T. Yoshida, et al., *Polym. J.*, 19, 923 (1987).
- 8) T. Yoshida, et al., *Chemistry Lett.*, 477 (1991).
- 9) K. Hatanaka, et al., *J. Medicinal Chem.*, 30, 810 (1987).
- 10) Y. Kaneko, et al., *Biochem. Pharm.*, 39, 793 (1990).
- 11) 中島秀喜, 組織培養, 15, 185(1989).
- 12) 金子有太郎, 未発表データ。