

糖鎖ポリマーを用いた O-157 感染症治療装置の開発

Development of Device Using Glyco-polymer for Treatment of Infection by *Escherichia coli* O157

宮 川 淳*・畑 中 研 一*

Atsushi MIYAGAWA and Kenichi HATANAKA

1. は じ め に

Emil Fischer によって創始された糖質化学の分野が大きく広がり¹⁾, 最近, 糖質のもつ多彩な生理機能に多方面から大きな関心が集まっている. それは, 糖鎖がホルモン, 細菌毒素, ウィルスその他の受容体機能を持ち, 細胞の認識や情報伝達, 分化・増殖, ガン化, 細胞接着, 血液凝固, 免疫応答, 脳神経機能など多様な生命現象に深く関わっていることが明らかになってきたためである. またそれに伴い, 生理活性糖鎖を新しい医薬品や機能性材料の標的とする応用研究が活発に行われるようになり, この分野の研究者は今, 大きな広がりを見せている²⁾. しかし, 糖鎖は, タンパク質と異なり, 糖脂質や糖タンパク質では糖鎖の配列や長さが遺伝子の直接支配を受けず, 個々の糖転移酵素の特性や性質に依存しているため, 新しい分子生物学的手法(遺伝子組み換え)をそのまま持ち込むことが出来ず³⁾, 研究には困難を伴っていた. また, きわめて多様性に富む糖鎖の構造と生理活性の相関の研究には, 糖鎖分子を自在に合成し, 修飾する技術が求められていた. 現在, 糖鎖の合成には化学法と酵素法が用いられ, 目覚ましい進歩を挙げている. こうして様々な糖鎖の合成手法が開発されたお陰で, 構造活性相関研究が可能になり, 自在な分子設計ができるようになってきた. 特に化学法は, 天然の糖鎖はもとより, その類縁体の合成にも有効である. こうしたドラッグデザイン的手法やコンピューター化学の進歩は, 様々な生理活性糖鎖の創出に役立っている²⁾. また, 糖鎖の構造決定を行う際の単離・精製方法の進歩, 及び分析機器の発達に伴い, これまで行えなかった複雑なオリゴ糖や分岐多糖などの構造決定を行えるようになり, 生理活性のキーとなる部分を解明できるようになってきた.

本稿では, 病原性大腸菌 O-157 に由来するペロ毒素と特異的に相互作用するオリゴ糖鎖について解説し, 糖鎖高分子を用いたペロ毒素吸着装置の開発について解説する.

2. 糖 脂 質

糖脂質とは, 糖と脂質を構成成分とする物質群. 分子内に親水性部分と疎水性部分をあわせもつ脂質 2 分子膜の主要構成成分として細胞膜などを形成し, 生命活動にとって本質的な機能を示す. 脂質部分の種類によりスフィンゴ糖脂質, グリセロ糖脂質, その他の糖脂質に分けられる. スフィンゴ糖脂質は, スフィンゴシンまたはその誘導体をアグリコンとする配糖体で, 通常この部分はセラミドとよばれる N-アシル体となっている. スフィンゴ糖脂質は動物界の代表的な糖脂質で, 細胞膜表面に存在して細胞の識別や分化, 増殖, ガン化, 免疫, レセプター機能など重要な膜機能に関与している⁴⁾. 糖部分に中性糖だけを含むセレブロシドのほかに, アミノ糖を含むグロボシド, シアル酸を含むガングリオシド, 硫酸エステルを含むスルファチドなどがある. グリセロ糖脂質はグリセリンのアシルまたはアルコキシ誘導体, あるいはそのリン酸エステルをアグリコンとし, 糖部分には硫酸エステルやスルホ基を含むものもある. 高等植物の葉緑体や細菌の細胞膜などに広く存在するほか, 量は多くないが動物の胃液や精細胞, 神経ミエリンにも見出されている. その他の糖脂質としては, リン酸エステルを含み内毒素の本体をなすリポ多糖や, 二糖の長鎖脂肪酸ジエステルなどがある⁵⁾.

細胞膜上のスフィンゴ糖脂質とコレステロールの集合体であるドメイン構造をしている Raft は, 他の領域と異なるタンパクを含んでおり, その細胞外側には, GPI アンカー蛋白質など, 細胞間情報伝達分子の受容体が局在し, 細胞質側には, src ファミリーキナーゼが結合しており, 細胞外から細胞内への情報伝達に関与している^{6,7)}. また, スフィンゴ糖脂質はある種の細菌外毒素の膜表面受容体として機能しており, コレラ毒素が GM 1 に特異的に結合することはよく知られており, Raft 中の GM 1 検出にもしばしば用いられる^{8,9)}. また, インフルエンザウィルスのヘマグルチニンが, ガングリオシド系列のシアリル糖脂質 GM 3 を認識し, 結合することもよく知られている^{10,11)}. 現在では, GM 3 の非還元末端にあるシアリル酸を用いたインフルエンザ治療薬が開発され, 利用されている. シガ毒

*東京大学生産技術研究所 物質・環境系部門

素は、CD 77またはP式血液型 P^k としても知られるグロボトリオシルセラミド(Gb3)に結合し、出血性大腸炎や溶血性尿毒症症候群(HUS)を引き起こす¹²⁾。

3. 病原性大腸菌 O-157

病原性大腸菌 O-157 が日本で多く知られるようになったのは、1996年、大阪府堺市の学校給食から起きた集団食中毒だった。この年の発生件数は、87件。死者8人、患者数は1万人を超える大惨事となった。この食中毒の原因である病原性大腸菌 O-157 が産生する毒素は、1977年に Konowalchuk 等により下痢性大腸菌の産生する毒素がペロ細胞に毒性を示すことを報告され、以来この大腸菌の産生する毒素は、ペロ毒素と呼ばれてきた¹³⁾。O'Brien 等は、大腸菌の産生する毒素が志賀赤痢菌毒素に対する抗体によって中和されることから、志賀様毒素と呼ぶことを提唱した¹⁴⁾。日本より前に、1982年にアメリカで発生した食中毒事件の原因菌 E. coli O-157: H7 が志賀様毒素を産生すること、これがペロ毒素と同一であることが示された。ペロ毒素は、分子量 32000 の A サブユニット 1 分子と分子量 7500 の B サブユニット 5 分子からなる¹⁵⁾。A サブユニットは、28 SrRNA の 4324 番目のアデニン塩基を遊離させ、タンパク合成の阻害と細胞傷害を引き起こす。細胞膜上にある Gb3 と B サブユニットが結合することにより、A サブユニットが細胞内に取り込まれ、毒性を発現する¹⁶⁾。

4. 糖鎖高分子

これまで、多くの糖鎖高分子が合成されてきた。ポリアクリルアミドやポリスチレンの側鎖に機能性糖鎖を担持させたもの^{17,18,19,20)}、アミド dendrimer やカルボシラン dendrimer の末端に機能性糖鎖を担持させたものなどがある^{21,22,23,24)}。このような糖鎖高分子が多く合成されているのは、糖鎖-タンパク質の相互作用における“クラスター効果”があるためである²⁵⁾。この“糖鎖クラスター効果”は、Lee, Y. C. and Lee, R. T. らによって、マルチバレントから生じるリガンドの濃度増加によるアフィニティーの増加以上に、マルチバレントのリガンドであることにより、アフィニティーの増加がある、と提唱された²⁶⁾。リニアポリマーであれば、共重合の比率やリンカーの長さを調整することで、dendrimer であれば、世代を変えるにより自在に糖鎖間距離及び糖鎖の集積化を行うことができる。また、ターゲットとするタンパク質の多くは、マルチバレントなレセプターを有しているため、このクラスター効果が顕著に現れている。モノバレントのリガンドであれば、Kd 値が、mM ~ μ M の範囲であるが、マルチバレントにすることにより、nM までも増加する^{27,28,29)}。

5. アフィニティークロマトグラフィー

生化学の領域で、タンパク質や酵素などの生体高分子を純化することは、重要な研究課題の一つであり、過去多数の研究者により多大の努力が払われてきた。特に今日、生

体高分子に関する構造レベルでの研究が一層盛んになるに従って、目的とする物質を短時間で大量かつ高度に精製することがますます要求されている。生体高分子の多くは、特定の物質と特異的に結合しないし、相互作用する固有の性質を持つ。酵素であれば、反応の第一段階で基質と、抗原なら抗体と、レセプターなら情報物質と、tRNA なら mRNA と相補的に結合する。こうした相互作用は主に静電結合、水素結合、疎水結合などを介したものであるが、アフィニティークロマトグラフィーは生体高分子のもつこれらの生物学的識別の原理を巧妙に利用した方法といえる。したがって、その一般原理は、生体高分子に親和性のある物質、つまりリガンドを不溶担体に化学結合させてカラムに充填し、生体抽出液などの試料をカラムに流して目的物質のみを吸着させ、適当な溶媒で溶出することになる。

アフィニティークロマトグラフィーの準備として、不溶担体とリガンド、スペーサーの選定が重要である。不溶担体は、生体高分子など目的物質が非特異的に吸着しないこと、リガンドと共有結合できるような官能基を多数含んでいること、物理的な力に抵抗力があり、かつリガンドを結合させるときや、吸着した物質を溶出する際の溶媒、変性剤、pH、温度変化に耐えられること、多孔性でタンパク質などがマトリックス内に拡散できること、リガンドを結合させた後も流速が変化しないことなどの条件を満たす必要がある。従来、不溶体として、アガロース及びデキストラン、セルロースなどが用いられてきた。また、リガンドは目的とする物質に対し、高い親和性を持つことが第一条件であり、化学的に安定なもの、非特異的相互作用の少ないもの、担体に結合させるのに必要な官能基を持つものである必要がある。一般に、リガンドと目的物の解離定数は、 $10^{-4} \sim 10^{-7}$ 程度のものが選ばれる。しかし、リガンドを担体に結合させた後に親和性は相当減少する。そのため、リガンドの結合には直接担体に結合させる方法とリガンドと担体の間にスペーサーを介して結合させる方法がある。スペーサーを介して結合させることで、リガンドと担体の間に空間的な距離ができ、立体傷害を受けにくい状態で、リガンドに接触できるため、親和性の減少を抑えることができる。リガンドの結合方法は様々であり、担体とリガンド、スペーサーそれぞれに適した方法を選択する必要がある。近年、アフィニティーメンブランという分野が、発展している³⁰⁾。これまで、アフィニティークロマトグラフィーというと、担体として、ゲルやビーズが用いられてきたが、成膜技術の向上に伴い、様々な素材のフィルムや透析膜、濾紙を用いたものが、活発に研究されている³¹⁾。その中の多くの研究者が、生体抽出物の精製や直接的な医療利用へのアフィニティーメンブランの開発を目的としている。リガンドの固定化反応などは、これまで培われてきたアフィニティークロマトグラフィーで用いられている方法を用いている。そのため、様々な方法があり、メンブランによる拡散の効果もあることから、直接的なモジュールの開発が期待されている。

6. 人工透析

健全な生体では、身体の全ての要素は恒常性を保たれている。しかし、腎臓の機能に異常が生じると代謝産物の排泄が不十分となり、やがて死を招きかねない。排泄が不十分である場合には、摂取量を抑制せざるを得ない。それでも、体内に水や尿素が蓄積する状態になるといわゆる尿毒症であり、患者の体液中から人工的に代謝産物を除去し、病態を改善させる治療手段をとらざるをえない。これが、体液浄化法、または通常血液を介して行われるために血液浄化法と呼ばれている³²⁾。

血液の体外浄化処理は、1914年にAbelが犬を用いて行った実験が最初であるが、当時は周辺技術が未発達で実用化にはいたらなかった。実用化の端緒を切り開いたのはKolffであり、1944年にセロファン膜を用いて腎不全患者の血液透析治療を行った。その後、血液体外循環技術や透析器の進歩とともに発展し、1970年代に腎不全患者の治療として普及定着した。この治療により、腎臓の機能が失われた多くの患者が10年、20年と延命できるようになったことは画期的なことである。1998年末のわが国の慢性透析患者は約16万人である。膜を用いる血液浄化法には、血液透析、血液透析ろ過、血液ろ過、血漿成分分離及び血漿分離、生体膜を用いる方法には腹膜透析、さらに吸着剤を用いる方法には、直接血液灌流がある。透析は濃度差を推進力とする拡散によって尿毒症の原因物質を体外に排泄、あるいは欠乏物質を体内に補充する方法であり、特に低分子量物質の透過に優れている。血液ろ過は圧力差（通常500 mmHg以下）を推進力とするろ過によって分子量10000ぐらいまでの物質を効率よく除去する方法である。血漿分離は血液を有形成分と血漿成分に分離する操作であり（圧力差は通常50 mmHg以下）、分子量の大きい病因物質（分子量数万～数十万）の除去に優れている。これらの血液浄化法は腎不全患者の生命維持にとどまらず、急性薬物中毒、肝不全のほか、自己免疫疾患、精神分裂症などの治療に対しても、応用できるようになり、新しい治療法として注目されている。生体において血液浄化は、腎臓および肝臓で主に行われている。これらの機能を人工的に具現することはきわめて困難である。腎臓の機能として、①水・電解質（ Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cl^- など）の調節、②たんぱく質代謝産物（尿素、クレアチン、尿酸など）の排出、③薬物の排泄、④血圧の調節、⑤赤血球数の調節、⑥ビタミンDの活性化、などがある。腎臓は、動脈血を糸球体でろ過し、高分子量溶質を含まない原尿を120 ml/min程度の速さで作る。糸球体の排除限界分子量は6万である。このような機能に対して、血液透析では生体腎の機能のうち①～③を不完全に代替しているにすぎない。さらに、水分については圧力差を利用した限外ろ過により、溶質については濃度差を拡散の駆動力としている。つまり、生体腎は、能動輸送であるのに対して、血液透析は、受動輸送であるという最も異なる点がある。

血液透析用の膜は、溶質透過性、水透過性および力学的強度に優れていることが必要である。現在血液浄化用に使われている膜素材の中ではセルロースが中心であったが、血液透析で生命を長年維持している患者が増えるに従い、しだいにセルロース膜を透過できない微量の代謝産物が患者の体内に蓄積され、患者にいろいろな病態が現れることが問題視されるようになってきた。この解決策として、合成ポリマー製の多孔質膜を利用するようになった。さらに、セルロースのもつ水酸基が補体の活性化を惹起するため、透析開始初期に一過性の白血球減少が起こることが指摘され、セルロースの水酸基に直接血液が触れないようにする改良がなされた。それと前後して、 $\beta 2$ -ミクログロブリンがしだいに患者の体内に蓄積され、手根幹症候群の原因物質であるとのデータが明らかにされ、高分子量溶質の除去には、不適切なセルロースの均質膜からポリスルホン多孔質膜に透析膜の主流は、移りつつある。ただし、合成ポリマー製の多孔質膜を使うようになり、新たな問題も生じている。すなわち、透析膜の細孔が大きくなったため、透析液側からエンドトキシンなどが血液中に拡散することを防ぐために、逆浸透法で精製された水で透析液を作ることが求められ、透析のコストアップにもつながっている。つまり、セルロース膜、合成高分子膜それぞれにおいて、いまだに問題点が多く、材料と血液の界面現象もまだまだ解明されていない部分が多く、生体適合性ととも膜開発における今後の課題である。

7. 糖鎖を有するポリマーの合成

近年、病原性大腸菌O-157による食中毒が深刻な問題となっている。食中毒の原因物質であるO-157が産生するベロ毒素（shiga-like toxin）は、VT1型とVT2型があり、細胞内のリボゾームの働きを妨げる作用を持ち、主に腸管上皮を死滅させることにより、腸管出血性大腸菌感染症を引き起こす。1992年11月～1993年2月にかけて米国西部で発生したビーフバーガーを原因とした大規模なO-157による集団感染で推定された感染菌量は、1000個以下と非常に少ない量であり、わずか100個でも感染すると言われていた。腸炎ブリストリオやサルモネラのような食中毒菌が100万～1000万個なければ感染しないことと比べると、大変強い感染力があると言える³³⁾。

初期症状として、腹痛や水溶性の下痢を起こし、発症後、1日から2日で固形物のない血性下痢となる。さらに、吐き気、嘔吐、発熱などを伴う場合もある。重症の場合は溶血性尿毒症症候群（Hemolytic Uremic Syndrome）を発症する。このHUSは、O-157感染の6～7%に見られ、貧血・腎不全・血小板数の減少を伴うものである。また、HUSを起こした人のうち、約3分の1の人は、何年後かになっても腎臓の働きに異常を残すことがあり、長期間人工透析が必要になる場合もある。（人工透析は、HUSに起因する急性の尿毒症に対しても有効である。）それ以外にも、約8%の人が高血圧、痙攣、失明、麻痺などの一生残る合併

症などの影響が残ることがある³³⁾。しかし、現在も、この O-157 感染の効果的な治療方法が確立されておらず、早期開発が望まれている。現在、開発が最も進んでいるのは、カナダのシンソルブ社で開発された O-157 が産生するペロ毒素を吸着する製剤である。この薬は、シラノールと毒素を吸着するグロボ3糖からできており³⁴⁾、糖鎖部分をペロ毒素が特異的に認識し、強く吸着し、毒素の細胞毒性を阻害する。カナダで、Phase I ならびに Phase II 試験を終了し、現在、Phase III 試験が実施されている。具体的な効果としては、この薬の使用群では HUS の発症率は 6.1% で死亡や脳症に至った例はなく、非使用群では HUS の発症率は 7.1% で死亡 1 例、脳症 3 件とされている³⁴⁾。死亡や脳症に至るような例は減少されたが、HUS 発症に対し、大きな減少とまでは効果がない。

それゆえに、今も多くの研究者が新しい中和剤を開発している。ここに、これまで合成された代表的な化合物を挙げる。Starfish は、ペロ毒素に対して最も強い結合活性を有し、ペロ毒素の結合サイト間の距離を考慮した構造であり、一つの Starfish で、2 つの毒素に挟まれるように結合することができる³⁵⁾。ケイ素を含む dendrimer は中性であり、生体内においても、毒性を示さない。つまり、*in vivo* での実験も行われており、Starfish ほど強い結合活性はないが、実際の投薬という面においては、最も実用的である³⁶⁾。リニアポリマーにグロボ3糖を担持させたものはペンダント型と呼ばれる。このような化合物は、論文などのデータがあまり出しておらず、これから期待されるものである³⁷⁾。以上のように、ペロ毒素に結合するグロボ3糖をモノバレントでは用いずに、マルチバレントで用いているのは、モノバレントでは結合力がそれほど高くなく、血液中の毒素と結合するほどの力がない。そのため、マルチバレントにし、クラスター効果を利用して、毒素との結合力を高めているのである。Starfish など、これに関する多くの研究を行っている David R. Bundle らの結果では、モノバレントの Gb3 とペロ毒素との結合定数は、 10^{-3} であるが³⁸⁾、Starfish の場合には、 10^{-9} にもなる³⁹⁾。このような効果を利用するため、マルチバレントのリガンドを構築することを計画している。また、マルチバレントにするための骨格として、これまであまり研究が行われていないリニアポリマーとし、アクリルアミド骨格を持ったポリマーにグロボ3糖誘導体を担持させ、ペンダント型の水溶性ポリマーを合成する。次に、このポリマーを投与という形で用いるのではなく、吸着剤に利用し、体内の毒素を取り除くことを目的としているため、担体にポリマーの固定化を必要とする。そこで、共重合を行うモノマーの中に、固定化の反応点となるものが必要であり、また固定化したことを確認するために標識が必要である。これら、ペロ毒素のリガンドとしてのグロボ3糖誘導体、固定化に必要な反応点と吸着剤としたときにポリマーが固定化したことを確認するための蛍光標識の全てを担持したポリマーを合成することが必要となってくる。

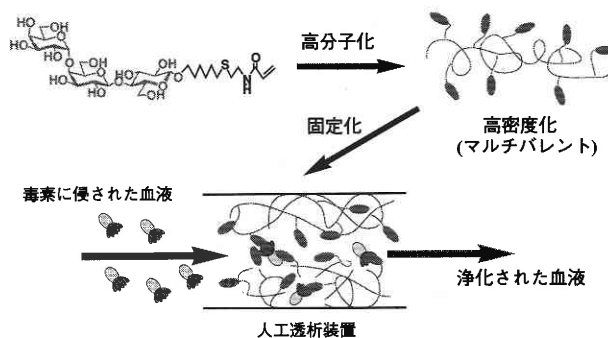


図 1. ペロ毒素除去装置の概略図

8. 中空糸への固定化

血液透析に用いられている材料は様々な高分子でできている。その中でも、再生セルロースは、人工透析に最も利用されている素材である。この再生セルロースの中空糸を、修飾することにより新しい治療へと生かすことを目的としている。具体的には、拡散による透析ではなく、除去したい粒子に対して特異的に吸着する分子を固定化し、選択的に除去できる透析装置の開発であり、研究のターゲットは、糖タンパク質の相互作用を利用したペロ毒素の除去である。この装置は、医療用装置であるが、中空糸を利用したカラムの開発は行われている。例えば、PAN の中空糸にコレステロールオキシダーゼを固定化し、入ってきたコレステロールを分解する装置⁴⁰⁾ や、中空糸の表面に GMA をグラフとさせ、BSA を結合させることでキラルな化合物を分離する装置⁴¹⁾ がある。これらの装置はタンパク質がリガンドを捕まえており、本研究の糖タンパク質の相互作用とは逆である。リガンドである糖が除去したいペロ毒素との結合力が非常に高くなければ、吸着しない。しかし、糖タンパク質の相互作用は、モノバレントではそれほど強いものではない。そこで、図 1 に示すように、モノバレントではなく、マルチバレントのリガンドを固定化することが重要になってくる。未だに、特効薬もなく、治療方法が確立されていないペロ毒素による食中毒への新しいアプローチである。

謝 辞

ペロ毒素吸着装置の開発は所内選定研究（研究代表者：畑中研一）として立ち上げられ、顕著な成果が得られつつあります。ここに謝意を表します。

(2004 年 3 月 12 日受理)

参 考 文 献

- 1) 畑中研一・西村紳一郎・大内辰郎・小林一清 著、「糖質の科学と工学」, (1997), 講談社サイエンティフィック
- 2) 木曾 眞 編著, 「生理活性糖鎖研究法」, (1999), 学会出版センター
- 3) 木幡陽・箱守仙一郎・永井克孝 編著, 「糖鎖の多様な世界」, (1993), 講談社

- 4) 岐阜大学 農学部 生物資源利用学科 生理活性物質研究室のホームページ
- 5) 長倉三郎・井口洋夫・江沢 洋等 編集, 「理化学辞典 第5版」, (1999), 岩波書店
- 6) “Glycoforum” のホームページ
- 7) Simons, K. and Ikonen, E., *Nature*, 387, 569–572, (1997)
- 8) “Glycoforum” のホームページ
- 9) van Heyningen, W. E., *Nature*, 249, 415–417, (1974)
- 10) “Glycoforum” のホームページ
- 11) 稲田祐二・川寄敏祐 著, 「糖鎖ハイブリッド」, (1995), 共立出版
- 12) Fujimoto J., *et al.*, *Trend in Glycoscience and Glycotechnology*, 13, 281–290, (2001)
- 13) Konowalchuk, J. *et al.*, *Infection and Immunity*, 18, 775–779, (1977)
- 14) O’Brien, A.D. and La Veck, G.D., *et al.*, *J. Infectious diseases*, 146, 763–769, (1982)
- 15) Hong Ling, Randy J. Read, *et al.*, *Biochemistry*, 37, 1777–1788, (1998)
- 16) Endo, Y. and Igarashi, K., *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 171, 45–50, (1988)
- 17) Suoding Cao and Rene Roy, *Tetrahedron Lett.*, 37, 3421–3424, (1996)
- 18) Rene Roy, *Current Opinion in Structural Biology*, 6, 692–702, (1996)
- 19) Tetsuya Furuike, Shin-Ichiro Nishimura, *et al.*, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 3000–3005, (2000)
- 20) Hirofumi Dohi, Kazukiyo Kobayashi, *et al.*, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 7, 2053–2062, (1999)
- 21) Peter R. Ashton, Mía Young, *et al.*, *J. Organic Chemistry*, 63, 3429–3437, (1998)
- 22) Thisbe K. Lindhorst, Stefan Ehlers, *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.*, 2027–2034, (2000)
- 23) W. Bruce Turnbull, J. Fraser Stoddart, *Reviews in Mol. Biotechn.*, 90, 231–255, (2002)
- 24) Hiroyuki Oka, Koji Matsuoka, *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 42, 3327–3330, (2001)
- 25) Jason E. Gestwick, Laura Kiessling, *et al.*, *J. Am. Chem., Articles*, (2002)
- 26) Yuan C. Lee and Reiko T. Lee, *Acc. Chem. Res.*, 28, 321–327, (1995)
- 27) Rene Roy, *Current Opinion in Structural Biology*, 6, 692–702, (1996)
- 28) W. Bruce Turnbull, J. Fraser Stoddart, *Reviews in Mol. Biotechn.*, 90, 231–255, (2002)
- 29) 畑中研一・西村紳一郎・大内辰郎・小林一清 著, 「糖質の科学と工学」, (1997) 講談社
- 30) Elias Klein, *Journal of Membrane Science*, 179, 1–27, (2000)
- 31) Wei Gou, Eli Ruckenstein, *Journal of Membrane Science*, 182, 227–234, (2001)
- 32) 中林宣男・石原一彦・岩崎泰彦 共著, 「バイオマテリアル」, コロナ社, (1999)
- 33) 東京都立衛生研究所のホームページ
- 34) 岐阜市医師会のホームページ
- 35) Pavel I. Kitov, David R. Bundle, *et al.*, *Nature*, 403, 669–672, (2000)
- 36) Kiyotaka Nishikawa, Koji Matsuoka, *et al.*, *PNAS*, 99, 7669–7674, (2002)
- 37) Hirofumi Dohi, Kazukiyo Kobayashi, *et al.*, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 7, 2053–2062, (1999)
- 38) Anna M. Soltyk, David R. Bundle, *et al.*, *J. Biological Chemistry*, 277, 5351–5359, (2002)
- 39) Pavel I. Kitov, David R. Bundle, *et al.*, *Nature*, 403, 669–672, (2000)
- 40) Chi-Chang Lin, Ming-Chein Yang, *Biomaterials*, 24, 549–557, (2003)
- 41) Satoshi Kiyohara, Takanobu Suga, *et al.*, *J. Membrane Science*, 152, 143–149, (1999)