

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

| | |
|--|--|
| 論文提出者 | 清水 一郎 |
| 論文審査委員 | (主 査) 朝日大学歯学部 教授 北井 則行 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 明坂 年隆 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 村上 幸孝 |
| 論文題目 シアルオリゴ糖のキトサンへの多価添加による効率的インフルエンザウイルス結合阻害剤の一段階合成 | |
| 論文内容の要旨 <p>[目 的] インフルエンザウイルスはそれらの持つ高い変異能によりヒトにとって最も脅威のある病原体のひとつである。本研究では、インフルエンザの感染に深く関わる赤血球凝集素(HA)のもつ糖鎖結合特異性に注目し、HA が認識するシアル酸をもつ糖鎖をポリマーに多価に結合させることで、高HA 結合能を持つ結合阻害剤を一段階で合成する方法を開発したものである。</p> <p>[方 法] ウイルスを認識するシアロ糖鎖を結合させるポリマー基材として、キトサンを選択した。シアロ糖鎖としては、シアリルα2, 6 ラクトース(6SL)とフリーのシアリルグリカン(FSG)の二種類を選択した。 上記のシアロ糖鎖を、還元アミノ化反応によりキトサンのアミノ基へ付加、還元を行い、キトサンとシアロ糖鎖の結合を行った。キトサンに結合する6SL の最適量を調べるために、キトサンのグルコサミン残基に対して、0.5 モル当量もしくは1.0 モル当量の二種類の反応条件下で合成を行った。合成した6SL-chitosan (0.5 モル当量, 1.0 モル当量) とFSG-chitosan はNMR (核磁気共鳴法) 解析を用いて、キトサン上の6SL とFSG の置換度(DS 値)を求めた。 合成した結合阻害剤(6SL-chitosan, FSG-chitosan) と最も典型的なヒトインフルエンザウイルスのひとつであるA/ニューカレドニア/20/99(H1N1)を混合した後に、Madin-Darby イヌ腎細胞へ播種し阻害活性を測定した。コントロールとしてfetuin, 6SL, FSG を使用した。その後、Madin-Darby イヌ腎細胞を免疫蛍光法で染色し、陽性細胞数を蛍光顕微鏡により計測することで重量(mg/ml) とシアル酸モル濃度(μmol) における50%阻害濃度(IC₅₀ 値)を求めた。IC₅₀ 値を求める際の残留感染力価は阻害剤なしでの感染細胞の数を100%として算出した。</p> <p>[結果および考察] 今回、一段階の反応でウイルスHA の認識成分であるシアル酸を多価に含んだ6SL-chitosan を合成した。NMR 解析により6SL-chitosan-0.5, 6SL-chitosan-1.0 のDS 値はそれぞれ37.9%, 31.7%であり、シアロ糖鎖の添加量が増加しているにもかかわらず、合成体のDS 値は低くなっていた。これは0.5 モル当量の6SL が最適であることを示している。また、過剰量の6SL は</p> | |



キトサングルコサミンの還元的アミノ化反応において結合しにくい状態を引き起こすと考えられる。

IC₅₀値は、6SL-chitosan-0.5では0.2mg/mlと192 μmol, 6SL-chitosan-1.0では0.5mg/mlと444 μmolとなり、6SL-chitosan-0.5のほうが高い阻害活性を示した。これはキトサンに結合したシアロ糖鎖の量が影響すると考えられる。また6SL-chitosan-0.5, 6SL-chitosan-1.0はコントロール(6SL)よりはるかに高い阻害活性を示したが、過去に当グループが合成した結合阻害剤であるCDO-chitosanほど有効ではなかった。この結果はキトサンにおけるシアロ糖鎖の量以外にシアロ糖鎖の長さなども影響していると考えられる。

FSG-chitosan に関してはDS 値が4.4%と6SL-chitosan と比較して低いものであったが、シアル酸モル濃度におけるFSG-chitosan のIC₅₀値は352 μmol であり、6SL-chitosan-0.5 のIC₅₀値と6SL-chitosan-1.0 のIC₅₀値の中間に位置した。これは、FSG-chitosan では、シアル酸の量が6SL-chitosan の1/4であるにもかかわらず、ウイルスを捕らえる能力が6SL-chitosan に匹敵することを意味する。この結果は、キトサンに結合するシアロ糖鎖の長さが高い阻害活性を示すために重要であるということを示唆している。

[結 論]

6SL 並びに FSG をキトサンに結合させることにより、それぞれのモノマーである6SL と FSG の阻害活性を増強できた。6SL は、FSG と比較して長さが短くシアロ糖鎖の長さによって示される阻害活性という面では不利となるが、一方で高いDS 値を有していることで、インフルエンザウイルスの感染に対して十分な阻害活性を示した。FSG も反応条件の検討などでDS 値を上げることができれば非常に優れた結合阻害剤としての利用が期待できる。

また、6SL-chitosan の合成は極めて簡便であることから高いコストパフォーマンスを誇り、かつ糖鎖のみを原料として用いることから安全である。この結果より実用的かつ商業的利用のできる様々な糖成分の結合阻害剤を開発できる可能性がある。