

## 米糠より作られ、活性化されたアラビノキシラン MGN-3 のインビトロでの抗 HIV 活性

マンドゥーゴーナム、ドゥルー医科大学 耳鼻咽喉科

1621 E. 120 ストリート、ロサンゼルス、カルフォルニア 90059

MGN-3 の抗 HIV 活動が実験された。MGN-3 は、糸状菌類の菌系由来より抽出された酵素によって修飾された米糠より作られたアラビノキシランである。MGN-3 の HIV-1(SF 株)に対する活性を、培養された末梢血液中の単細胞の中で試験した。MGN-3 は HIV-1 の反応を次の様に押さえた。

(1) HIV-1 p24 抗原の増殖を、投与により押さえた。MGN-3 を 12.5、25、50、100  $\mu$ g/ml ずつ投与した結果、それぞれ 18.3、42.8、59、75% の割合で p24 抗原を減少させた。

(2) 100  $\mu$ g/ml の投与により HIV 誘導融合細胞形成を最大 75% まで抑制することができた。これに続く研究より、一日に 15mg/kg の MGN-3 の投与することにより T 細胞と B 細胞のマイトゲン反応の増加が、2 カ月の投与の後に現われた。PHA については 146%、ConA については 140%、PWM マイトゲンについては 136.6% の増加が見られた。このことにより、MGN-3 は抗 HIV 作用を持ち、副作用もなく、MGN-3 が AIDS 患者に治療できる可能性の高いものであることを結論づけた。

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)は後天性免疫不全症候群(AIDS)を惹起する要因である。HIV は世界中の人類の生命をおびやかす根源の一つとなっている。いくつかの資料(疾病コントロールセンター、アメリカの赤十字、公の健康機関)によるとアメリカには約 150 万人の HIV 患者が存在し、世界中では 5000 万人に近い人が感染している。西暦 2000 年までには約 1 億 1000 万人が HIV に感染すると推定されている。(これは世界の人口の 2% に相当する) AZT や他のヌクレオサイドアナログのような薬剤が、AIDS の病気の進行を遅らせる治療法のなかで大きな問題を投げかけている。前回カナダのバンクーバーで開催された国際エイズ会議において、エイズに対するワクチンの可能性はほとんどなかった。ワクチンが存在しないこと、また効果的な治療法がないことがこの病気にたいする警戒信号を送ることとなっている。このため、一般的に抗 HIV 作用を有する物質だけでなく、有害な副作用のない生体の免疫系を強化する物質に対して、強い関心とそれらを解明するニーズが高まっている。

最近、我々は米糠から抽出された修飾アラビノキシラン MGN-3 が、ガン患者のナチュラルキラー(NK)細胞を強化する有力な生体応答調節物質(BRM)である可能性を立証した。この研究で我々は MGN-3 が、HIV 誘導融合細胞形成を抑制するだけでなく、患者の末梢血液中の単細胞(MNC)でも HIV の増殖を抑える事を証明した。更に MGN-3 を摂取することで、T と B 細胞マイトゲン反応を促進した。これらの研究は、

MGN-3 が強い抗 HIV 作用を持ち、他の療法と併用して HIV-1 に犯された患者の治療に有効であることを立証した。

## **物質と方法**

MGN-3.

MGN-3 は、担子菌の菌糸由来の酵素によって修飾された米糠から抽出したアラビノキシランである。 -1.4 キシロピラノース環 (Fig.1) を有する多糖類である。MGN-3 は商品名バイオブラン (大和薬品株式会社、東京、日本) として知られている。

完全培地 (CM)

RPMI-1640 (シグマ) に 1% の抗生物質 (v v), 20% (v v) の牛胎児血清そして組み換え IL-2 を追加。

HIV-1 p24 抗原の産生 3 名の健康な人より採取された MNCS を、PHA (5  $\mu$ g/ml) と共に 3 日間培養 (37 度) した。さらに HIV-1SF 株 (HIV-1 p24 3000pg/10<sup>6</sup>セル) で培養 (37 度、1hr) する前に洗浄。MNCS は PBS と共に、結合していないウイルスを取り除くために 3 度洗浄。感染した細胞は、MGN-3 を様々な濃度で混入した CM (0-100  $\mu$ /ml)、混入しない CM の中で (37 度、7 日間) 培養。培地の半分は週に 2 回 MGN-3 の濃度に応じて交換。培養期間の最後に培養され表面に浮かんでいる HIV-1 に感染された細胞を採取、ウイルスの産生を分析された。市販されているキット (デュポン MEN, ボストン、MA) を使って ELISA を抗原より取りだし、HIV-1 p24 が測定された。

HIV 誘導融合細胞形成

ジョンソンアンドウオーカーにわずかに手を加えた細胞溶解測定器が用いられた。要約すると、5 人の AIDS 患者より採取された MNC が PHA と共に、また様々な濃度 (0-100  $\mu$ g/ml) の MGN-3 を混入したもの、混入していないものと共に培養された。HIV に感染した MNC は 96 穴 (well) の平底の培養器 (2x10/穴) で培養 (37 度) された。7 日後に培養物は検査された。HIV 誘導細胞の総数は、各穴 (well) ごとに対する細胞の数として報告された。

FIG.1

糸状菌菌糸よりできた炭水化物分解酵素で処理した米糠より抽出された、米糠粗ヘミセルローズ。MGN-3 の主な化学構造。キシロースを主鎖に、アラビノースを側鎖に持つ、アラビノキシランである。

米糠より抽出された米糠粗ヘミセルローズの化学構造式 MGN-3 のアラビノキシラン化

## 学構造式系状菌菌系よりできた炭水化物分解酵素で処理

### In vivo における T と B リンパ球の増殖

我々は MGN-3 の In vivo における T と B 細胞の増殖効果を、<sup>3</sup>H チミジン摂取量を使って調査した。5 人の健康なコントロールグループの被験者に 2 カ月に渡って経口より 1 日 15mg/kg MGN-3 を投与。これらの人達の MNCS を彼等の末梢血液よりベースラインとし採取、投与をおこなって 2 カ月後にも採取した。MNC は 10mg/l の血球凝集素 (PHA)、コンカヴァリン A (Con A) またはアメリカヤマゴボウのマイトゲン (PWM) を混ぜたもの、混入しないものに分けられ 3 日間培養された。最後の 18 時間前に H チミジン 1mCi が細胞に加えられた。DNA が採取され、<sup>3</sup>H チミジンの上清がシンチレーション計数器を使って測定された。

### 細胞の生存能力

生存能力が熱量測定であるテトラゾリウム塩 MTT 測定器で計測された。ミトコンドリア状のデヒドロゲナーゼは、テトラゾリウム塩より青色のホルマザン (formazan) 結晶が形成されるプロセスのなかで、触媒の役目をする。産生するホルマザンの量は、生存している細胞の量に比例する。簡潔に言えば、4、7、11 日間 HIV-1 に感染させた細胞を、感染後 3 種類をセットとして 96 穴の丸底の組織培養皿に分けた。それぞれの穴 (well) に MTT (50g) が加えられ、その皿は 37 度で 4 時間培養された。ホルマザン結晶は 40mM HCl/同位プロパノンと一緒に溶解し、光学濃度 590nm が ELISA プレートリーダー測定法により計測された。(分子装置、Menlo Park, CA)

### 統計分析

コントロールグループと MGN-3 を投与されたグループの In Vitro での細胞、また In Vivo での (MGN-3) 処理前後の T と B 細胞マイトゲン反応の違いが顕著なものであるかどうかを判定するため、学生達の T テストが統計学的な分析として用いられた。

### 結論

#### HIV-1 p24 の産生

MGN-3 が投与された状態で、MNC が HIV-1 を抑制している。表 1 で示された様に MGN-3 は、全ての被験者に対して HIVp24 の抑制となっている。しかし MGN-3 によるその抑制効果は、各個人ごとに明確な差がある。MGN-3 の効果は、余り投与されていない (12.5 μ/ml) の被験者については、最低 (5.5%) であるが、同量投与した被験者 II については 34% の抗原産生となっている。同様に MGN-3 の高い投与量 (100 μg/ml) に於いては、3 名の被験者各々で p24 を抑制するパーセンテージのバラ

ツキが大きい。Fig.2 は、表 1 の平均と標準偏差 (スタンダードディビエーション SD) の結果を要約したデータである。MGN-3 の投与量 25、50、100  $\mu$ g/ml に対して、それぞれ 18.3、42.8、59、75% の HIV-1 p24 を抑制した事を示している。

#### HIV 誘導融合細胞形成の効果

我々は、MGN-3 の HIV が引き起こす誘導融合細胞形成の効果を、In vivo で研究した。表 2 の結果が、MGN-3 が顕著に細胞形成を抑制する事を顕わしている。効果は投与する量に依り、100  $\mu$ g/ml の投与量で最大の抑制効果 (75%) を示した。

#### In vitro に於ける MGN-3 の T と B 細胞の増殖効果

3H の上清を使って、In vivo での MGN-3 の細胞増殖に対する効果が、研究された。15mg/kg の MGN-3 を、毎日 2 カ月間投与された、5 人の健康な人の末梢血液を使って、MNC が用意された。Fig.3 は、MGN-3 の投与が MNC の増殖に著しい違いをもたらした事を、表わしている。ベースとなる値 ( $p < 0.001$ ) と比較して、PHA (T 細胞マイトゲン) と一緒になった MNC の、細胞増殖 (146%) が見られた。同じ様に ConA マイトゲンの場合も、(140%,  $p < 0.001$ ) の増殖結果が現れた。MNC については、ベースとなる B 細胞マイトゲンである BMW の値より、136.6% の増殖反応が得られた。

#### 表 I

##### MGN-3 の投与量による HIV-1 の増殖抑制 MGN-3 の投与量

被験者 I 被験者 II 被験者 III

注: (投与後) 7 日の時点での 3 名の被験者からのデータが調べられた。

#### FIG.2 キャプション

%抑制 (p24 抗原、pg/ml)、MGN-3 濃度 ( $\mu$ g/ml)

MGN-3 の HIV-1 p24 抗原を産生する効果。データは表 I の被験者 3 名の平均と標準偏差 (スタンダードディビエーション) を表わしている。

#### 細胞の生存能力

HIV-1 に感染している細胞の生存能力に対する MGN-3 の効果が調べられた。MTT 測定法により、感染後 4 日、7 日、11 日の細胞を使い (MGN-3) 処理された細胞と、コントロールグループの細胞に著しい差が生じていない事が明かになった。

## 表 2

MGN-3 による誘導融合細胞形成の抑制、誘導融合細胞形成、MGN-3 濃度、SF 量抑制 (%)

### 考察

この研究で我々は、MGN-3 が In vitro で細胞障害なく HIV の増殖を抑制することを立証した。MGN-3 は変性ヘミセルロースで、米糖のヘミセルロースを糸状菌類の菌糸に由来する複数の炭水化物分解酵素で処理し、主鎖に反応させて出来上がったものである。MGN-3 のおもな化学構造は、キシロースをアラビノースを側鎖に持つ、アラビノキシランである。(Fig.1) MGN-3 は生体応答調節物質 (BRM) であり、人間の NK 細胞を In vivo でも In vitro (1,2) でも活性させるものであることが立証された。またこの研究の結果は、MGN-3 が抗ウイルスとしても働くことも示している。MGN-3 は末梢血液中の単細胞 (MNC) で HIV-1 の産生を抑制する。このことは 1) HIV-1 24 抗原の産生の抑制 2) 誘導融合細胞形成の抑制として表われている。

副作用は、抗 HIV 物質を治療に用いる時の 1 つの問題となっている。PI, アジドチミジン (azidothymidine), ディデオキシチジン (dideoxycytidine), ディデオキシノシン (dideoxyinosine) そして D4T などの長期に渡る服用は、強い毒性をもち、また薬に対する抗体 (4-6) を作り上げることとなる。したがって最近、副作用のない、抗 HIV をもった物質を作りだす試みが、行われている。ハッカ属 (シソ科) の植物に HIV (7-10) を含んだ色々なウイルスに対して、抗ウイルス作用をもったものがあると報告されている。ヒソップオフィシアルリス (Hyssop officinalis) は抗 HIV の作用をもたらす、たとえばタンニン (tannins) (11), やセルロース (MAR-10) は、HIV-1 に感染した MNC の中や HUT78 T 細胞群 (12) の中で、HIV-1 抗原の産生を抑制する。さらに松の実からとれるセルロース (Pinus parviflora Sieb Zucc) は HIV の活動を抑制すると報告されている。

米糠より抽出されたセルロースに関していえば、以前からの研究において、米糠繊維 (RBF) より抽出されたヘミセルロースは、独特の生体効果を持っていることが立証されている。例えば米糖のアルファグルカン ( $\alpha$ -glucan) はハツカネズミを使った研究 (14) で抗癌性の働きがある可能性を示唆、また RBF から抽出されたアラビノースとキシロースは、二(エヌトリビュチルチン) 酸化物 (TBTO) に依って誘発された胸腺萎縮症ラットの病気の侵攻を阻止する効果を示した。

(15) 加工されていない RBF とコレスタイラミンが人間の末梢血管の白血球を増殖させることが観察された。

(16) この研究で使われた多糖類は、インターフェロンを誘発するものとして働き、種々

の悪性腫瘍の患者に対して抗癌作用を持ったものとして、実験された。

(2)MGN-3の毒性が、血液の化学分析を用いて、SMACと肝臓酵素(SGOTとSGPT)に関して検査された。5名の健康な被験者に1日に45mg/kgのMGN-3が経口投与された。1カ月後、全ての検査されたパラメーターに何の変化は認められなかった。In vivoに於ける研究では、MGN-3はHA(p MGN-3のT細胞とB細胞の機能に及ぼす影響

FIG.3: In vivoでMGN-3を2カ月投与した後の、T細胞とB細胞のマイトゲン反応活性に関するMGN-3の影響。MNCはPHA, Con A, PWMを含んだものと含まないものに分け3日間培養された。<sup>3</sup>Hが含まれているか調査。データは5名の平均値と標準偏差(スタンダードディビエーション)を表わしている。

#### REFERENCES

1. Ghoneum, M., and Manattala, G. (1996) Abstract 87th Annual Meeting of the American Association of Cancer Research, Washington DC, April 22-24, 1996.
2. Ghoneum, M. (1995) Abstract Cancer: The Interference between Basic and Applied Research. An American Association for Cancer Research (AACR) Special Conference, Baltimore, MD. November 5-8, 1995.
3. Johnson, V. A., and Walker, B. D. (1990). in Techniques in HIV Research (Aldovini, A., and B. D. Walker Eds.), pp. 92-94, Stockton Press, New York.
4. Larder, B. A., Darby, G., and Richman, D. D. (1989) Science 243, 1731-1734.
5. Boucher, C. A. B., Tersmette, M., Lange, J. M. A., et al. (1990) Lancet 336, 585-590.
6. Japour, A. J., Welles, S., D'Aquila, R. T., et al. (1995) J. Infect. Dis. 171, 1172-1179.
7. Schenck, G., and Brieskorn, C. H. (1944) Arch. Pharm. Ber. Dtsch. Ges. 282, 1-9.
8. Kucera, L. S., Cohen, R. A., and Harrmann, E. C. Jr. (1965) Ann N. Y. Acad. Sci. 130, 474-482.
9. Harrmann, E. C. Jr., and Kucera, L. S. (1967) Proc. Ex. Biol. Med. 124, 869-874
10. Harrmann, E. C. Jr., and Kucera, L. S. (1967) Proc. Ex. Biol. Med. 124, 874-978.
11. Wheeler, S. R. (1979) Science 204, 6.
12. Gollapudi, S., Sharma, H. A., Aggarwal, S., Byers, L.D., Ensley, H. E., and Gupta, S. (1995) Biochem.

Biophys. Res. Commun. 210, 145-151.

13. Lai, P. K., Donovan, J., Takayama, J., Sakagami, H., Tanaka, A., Konno, K., and Nonoyama, M. (1990) AIDS Re. Human Retroviruses 6, 205-217.

14. Takeo, S., Kado, H., Yamamoto, H., Kamimura, M., Watanabe, N., Uchida, K., and Mori, Y. (1988) Chem. Pharm Bull. 36, 3609-3613.

15. Takenaka, S., (1992) Chemosphere 25, 327-334.

16. Tsuji, H., Nomiya, K., Ikeda, K., Kawatoko, T., Cai, J.P., Fujishima, M., and Takahashi, K. (1991) Fukuoka Igaku Zasshi Fukuoka Acta Media 82, 330-334.

17. Ghoneum, M., Namattala, G., and Kim, C. (1996) FASEB Journal of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, New Orleans, LA. June 2-6, 1996.10