

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02018/225847

発行日 令和2年4月9日 (2020. 4. 9)

(43) 国際公開日 平成30年12月13日 (2018. 12. 13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/737 (2006.01)	A 6 1 K 31/737 Z N A	4 C 0 8 6
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	4 C 0 8 8
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2019-523986 (P2019-523986)	(71) 出願人 504426218 株式会社サウスプロダクト 沖縄県うるま市字州崎12-75
(21) 国際出願番号 PCT/JP2018/021962	
(22) 国際出願日 平成30年6月8日 (2018.6.8)	
(31) 優先権主張番号 特願2017-113196 (P2017-113196)	(71) 出願人 504145308 国立大学法人 琉球大学 沖縄県中頭郡西原町字千原1番地
(32) 優先日 平成29年6月8日 (2017.6.8)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国 (JP)	(74) 代理人 110000590 特許業務法人 小野国際特許事務所
	(72) 発明者 伊波 匡彦 沖縄県うるま市字州崎12-75 株式会社サウスプロダクト内
	(72) 発明者 友利 誠 沖縄県うるま市字州崎12-75 株式会社サウスプロダクト内

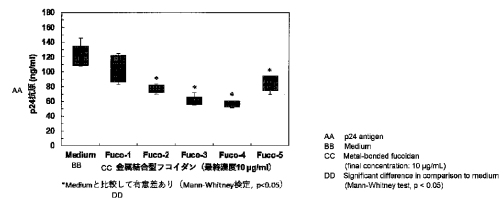
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 レトロウイルス増殖抑制剤およびこれを含有するレトロウイルス感染予防薬、レトロウイルス感染症発症予防薬

(57) 【要約】

後天性免疫不全症候群、HTLV-1関連脊髄症、成人T細胞白血病等のレトロウイルス感染症にかかわるレトロウイルスの増殖を抑制し、レトロウイルスの感染を予防したり、レトロウイルス感染症の発症を予防したりするものを提供する。

フコイダンの硫酸基にカリウム、カルシウム、マグネシウム、亜鉛およびセレンからなる群から選ばれる金属の1種または2種以上が結合した金属結合型フコイダンを含有し、金属が亜鉛の場合には、金属結合型フコイダンにおける亜鉛の含有量が質量換算でフコイダン1に対して0.005%以上であることを特徴とするレトロウイルス増殖抑制剤およびそれを含有するレトロウイルス感染予防薬、レトロウイルス感染症発症予防薬。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

フコイダンの硫酸基にカリウム、カルシウム、マグネシウム、亜鉛およびセレンからなる群から選ばれる金属の 1 種または 2 種以上が結合した金属結合型フコイダンを含む、金属が亜鉛の場合には、金属結合型フコイダンにおける亜鉛の含有量が質量換算でフコイダン 1 に対して 0.005% 以上であることを特徴とするレトロウイルス増殖抑制剤。

【請求項 2】

レトロウイルスが、HTLV-1 または HIV-1 である請求項 1 記載のレトロウイルス増殖抑制剤。

【請求項 3】

フコイダンが、オキナワモズクフコイダンである請求項 1 または 2 記載のレトロウイルス増殖抑制剤。

【請求項 4】

構造タンパク質の産生を抑制するものである請求項 1 ~ 3 の何れかに記載のレトロウイルス増殖抑制剤。

【請求項 5】

合胞体の形成を阻止するものである請求項 1 ~ 4 の何れかに記載のレトロウイルス増殖抑制剤。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 の何れかに記載のレトロウイルス増殖抑制剤を含むレトロウイルス感染予防薬。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 5 の何れかに記載のレトロウイルス増殖抑制剤を含むレトロウイルス感染症発症予防薬。

【請求項 8】

フコイダンの硫酸基にカリウム、カルシウム、マグネシウムおよびセレンからなる群から選ばれる金属の 1 種または 2 種以上が結合したことを特徴とする金属結合型フコイダン。

【請求項 9】

フコイダンが、オキナワモズクフコイダンである請求項 8 記載の金属結合型フコイダン。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、レトロウイルス増殖抑制剤およびこれを含むレトロウイルス感染予防薬、レトロウイルス感染症発症予防薬に関する。

【背景技術】

【0002】

レトロウイルスは、遺伝子として 1 本鎖 RNA を有する球状のウイルスである。このレトロウイルスは、オンコウイルス、レンチウイルス、スプーマウイルス等のいくつかの亜科に分かれる。

【0003】

これらレトロウイルス亜科のうち、HIV-1、2 等のレンチウイルス亜科は後天性免疫不全症候群 (AIDS) との関連、HTLV-1、2 のオンコウイルス亜科は HTLV-1 関連脊髄症 (HAM)、成人 T 細胞白血病 (ATL)、HTLV-1 関連ブドウ膜炎 (HU) との関連が知られている。

【0004】

これまでレトロウイルスに関連する疾患の治療には抗ウイルス薬を複数併用する抗レトロウイルス療法が主流であるが (例えば、インテグラーゼ阻害薬 1 剤と核酸系逆転写酵素

10

20

30

40

50

阻害薬 2 剤の併用療法)、服薬のコンプライアンスの維持や費用が高いうえ、有効性にも問題があり、広く普及していない(非特許文献 1)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献 1】Casartelli N., HIV-1 cell-to-cell transmission and antiviral strategies: an overview., Curr. Drug Targets, 17, 65-75, 2016.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、簡便な方法で、レトロウイルスの増殖を抑制する手段を提供することを課題とした。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究した結果、フコイダンの硫酸基のカウンターイオンを特定の金属イオンにすることにより、レトロウイルスの増殖を抑制することを見出し、本発明を完成させた。

【0008】

すなわち、本発明は、フコイダンの硫酸基にカリウム、カルシウム、マグネシウム、亜鉛およびセレンからなる群から選ばれる金属の 1 種または 2 種以上が結合した金属結合型フコイタンを含有し、

金属が亜鉛の場合には、金属結合型フコイタンにおける亜鉛の含有量が質量換算でフコイタン 1 に対して 0.005% 以上であることを特徴とするレトロウイルス増殖抑制剤である。

【0009】

また、本発明は、上記レトロウイルス増殖抑制剤を含有するレトロウイルス感染予防薬またはレトロウイルス感染症発症予防薬である。

【0010】

更に、本発明は、フコイダンの硫酸基にカリウム、カルシウム、マグネシウムおよびセレンからなる群から選ばれる金属の 1 種または 2 種以上が結合したことを特徴とする金属結合型フコイタンである。

【発明の効果】

【0011】

本発明のレトロウイルス増殖抑制剤は、レトロウイルスのカプシドタンパク質産生を抑制するためレトロウイルスの増殖を阻止することができる。また、本発明のレトロウイルス増殖抑制剤は、レトロウイルスが感染した細胞が合胞体となることも阻止することができる。

【0012】

従って、本発明のレトロウイルス増殖抑制剤は、レトロウイルス感染予防薬またはレトロウイルス感染症発症予防薬に利用できる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図 1】実施例 1 における合胞体形成の有無の判定基準を示す図である (A: 合胞体形成陰性、B: 合胞体形成陽性)。

【図 2】実施例 1 で得た硫酸基に結合する金属を変化させたフコイタンを、ATL-056i 培養細胞に最終濃度 10 μg/ml で培地に添加・投与した後、2 日後の p24 産生量を測定した結果を示す図である。

【図 3】実施例 1 2 で得たセレン結合型フコイタンを、ATL-056i 培養細胞に最終濃度 10 μg/ml で培地に添加・投与した後、2 日後の p24 産生量を測定した結果を示す図である。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明のレトロウイルス増殖抑制剤の有効成分は、硫酸基に、カリウム、カルシウム、マグネシウム、亜鉛およびセレンからなる群から選ばれる金属の1種または2種以上が結合した金属結合型フコイダン（以下、単に「金属結合型フコイダン」ということもある）である。

【0015】

この金属結合型フコイダンにおいて金属の含有量は、金属がカリウム、カルシウム、マグネシウムおよびセレンからなる群から選ばれる場合には、特に限定されないが、例えば、質量換算でフコイダン1に対してカリウム、カルシウム、マグネシウムおよびセレンからなる群から選ばれる金属が0.005%以上、好ましくは0.01%以上、より好ましくは0.1%以上、特に好ましくは0.5%以上、特により好ましくは1%以上である。これら金属量の上限は特に限定されないが、例えば、5%以下である。

10

【0016】

また、この金属結合型フコイダンにおいて金属の含有量は、金属が亜鉛の場合には、後記するように通常のフコイダンに含まれる亜鉛の含有量と区別するため、質量換算でフコイダン1に対して亜鉛が0.005%以上、好ましくは0.01%以上、より好ましくは0.1%以上、特に好ましくは0.5%以上、特により好ましくは1%以上である。これら金属量の上限は特に限定されないが、例えば、5%以下である。

【0017】

フコイダンの由来は特に限定されず、例えば、オキナワモズク (*Cladosiphon okamuranus*)、ワカメ (*Undaria pinnatifida*)、アカモク (*Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh)、マコンブ (*Laminaria Japonica* Areschoug)、ヒバマタ (*Fucus distichus*)、ホンダワラ (*Sargassum fulvellum*) 等の褐藻綱の海藻由来のものが挙げられる。これらのフコイダンの中でもオキナワモズク由来のオキナワモズクフコイダンが好ましい。

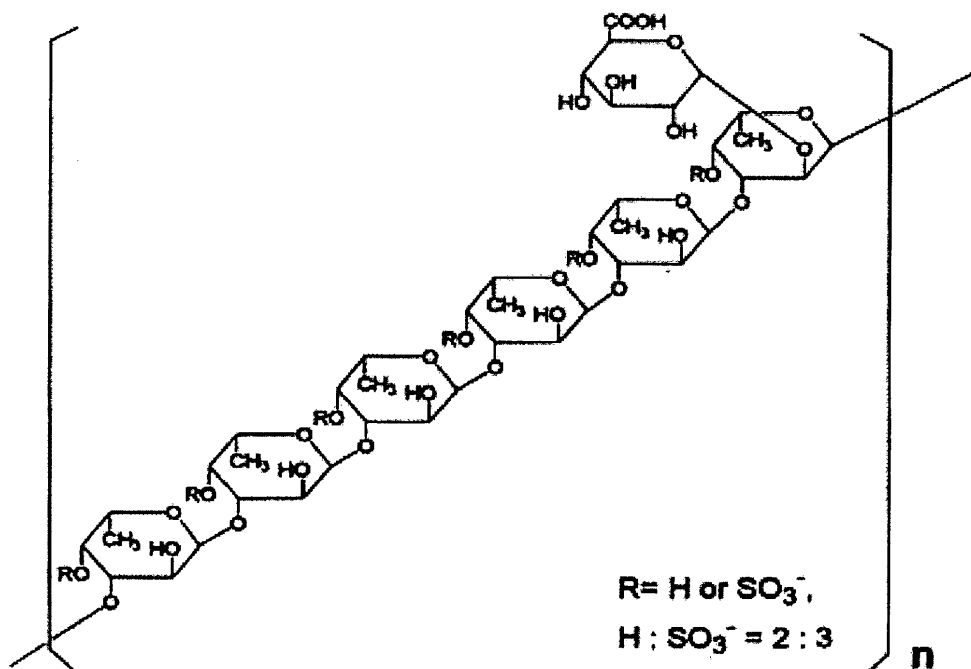
20

【0018】

オキナワモズクフコイダンは下記式で示すように 1,3 結合したフコースを主鎖として、フコース6分子にグルクロン酸が1分子結合したものであり、また、フコースの半分は硫酸化されているものである。

【0019】

【化1】



30

40

50

【 0 0 2 0 】

上記したフコイダンは、例えば、株式会社サウスプロダクト、タカラバイオ株式会社、フナコシ株式会社等から市販されているものや、文献 (M.Nagaoka, et al. : Structural study of fucoidan from Cladosiphon okamuranus TOKIDA. Glycoconjugate Journal 16 : 19-26, 1999) 記載の方法により抽出したもの等を特に制限なく使用することができる。また、フコイダンは、塩酸等の酸で加水分解して分子量を調整したものであってもよい。

【 0 0 2 1 】

フコイダンの硫酸基には通常、何も結合していないが、ナトリウムや少量 (0.0001 ~ 0.002 質量%程度) の亜鉛が結合しているが、これに代えてカリウム、カルシウム、マグネシウム、亜鉛およびセレンからなる群から選ばれる金属の1種または2種以上を結合させるには、フコイダンを含有する溶液を調製し、イオン交換によってフコイダンの硫酸基にこれらの金属を結合させればよい。

10

【 0 0 2 2 】

上記で用いられるフコイダンを含有する溶液は、特に限定されず、例えば、既に精製されたフコイダンを水等に溶解させた溶液や、フコイダンを含有する褐藻類を弱酸性溶液などで抽出し、不溶物を除去して調製されたもの等が挙げられる。この溶液におけるフコイダンの含有量は特に限定されないが、例えば、0.1 ~ 5 質量%、好ましくは1 ~ 3 質量%である。

【 0 0 2 3 】

上記において、イオン交換の方法は、特に限定されず、例えば、フコイダンを含有する溶液を、酸性の溶液に対して透析や加水ろ過し、その後、カリウム、カルシウム、マグネシウム、亜鉛およびセレンからなる群から選ばれる金属 (以下、単に「金属」ということもある) の1種または2種以上を含むアルカリ性の水溶液で中和する方法 (中和法)、フコイダンを含有する溶液に前記金属の塩の1種または2種以上を添加し、更にエタノールを添加して沈殿させる方法 (沈殿法)、イオン交換樹脂を用いる方法等を行うことができる。

20

【 0 0 2 4 】

上記中和法で用いられる酸性の溶液は、特に限定されず、例えば、水に塩酸等の酸を添加してpHを1 ~ 5、好ましくは2.5 ~ 3.5に調製することにより得られる。

【 0 0 2 5 】

フコイダンを含有する溶液を、酸性の溶液に対して透析する方法は特に限定されず、例えば、3 質量%程度のフコイダンを含有する溶液を透析膜に入れ、約10倍容以上の酸性溶液に入れ、一晚攪拌することでできる。なお、透析膜のかわりに限外ろ過膜を用いれば加水ろ過ができる。

30

【 0 0 2 6 】

上記で用いられる前記金属の1種または2種以上を含有するアルカリ性の水溶液は、水に溶解した際にアルカリ性を呈するカリウム化合物、カルシウム化合物、マグネシウム化合物、亜鉛化合物およびセレン化合物からなる群から選ばれる1種または2種以上を添加する等して調製される。水に溶解した際にアルカリ性を呈するカリウム化合物としては、例えば、水酸化カリウム、炭酸カリウム、酢酸カリウム等が挙げられる。水に溶解した際にアルカリ性を呈するカルシウム化合物としては、例えば、水酸化カルシウム、炭酸カルシウム、酢酸カルシウム等が挙げられる。水に溶解した際にアルカリ性を呈するマグネシウム化合物としては、例えば、水酸化マグネシウム、炭酸マグネシウム等が挙げられる。水に溶解した際にアルカリ性を呈する亜鉛化合物としては、例えば、水酸化亜鉛、炭酸亜鉛、グルコン酸亜鉛等が挙げられる。水に溶解した際にアルカリ性を呈するセレン化合物としては、例えば、亜セレン酸ナトリウム等が挙げられる。アルカリ性の水溶液に含まれるカリウム化合物、カルシウム化合物、マグネシウム化合物、亜鉛化合物およびセレン化合物の量は、フコイダンに対するカリウム、カルシウム、マグネシウム、亜鉛、セレンの量が上記した量になるように添加すればよい。このように調製したアルカリ性の水溶液を上記のようにして調製されたフコイダンを含有する酸性の水溶液に接触させる。この接触

40

50

は水溶液中で行われる。また、アルカリ性の水溶液中の金属量は、特に限定されず、フコイダンに結合させたい金属の量にあわせて適宜調整すればよい。

【0027】

上記沈殿法に用いられるフコイダンを含む溶液は、上記中和法で用いられるものと同様で良い。また、前記金属の塩の1種または2種以上は、水に溶解した際にカチオンとして解離するものである。カリウム化合物としては、塩化カリウム、水酸化カリウム、炭酸カリウム等が挙げられる。カルシウム化合物としては、塩化カルシウム、炭酸カルシウム、硫酸カルシウム等が挙げられる。マグネシウム化合物としては、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム等が挙げられる。亜鉛化合物としては、塩化亜鉛、酢酸亜鉛等が挙げられる。セレン化合物としては、四塩化セレン、亜セレン酸ナトリウム等が挙げられる。フコイダンを含む溶液に添加される金属塩の量は特に限定されず、フコイダンに結合させたい金属の量にあわせて適宜調整すればよい。フコイダンを含む溶液に、前記金属の塩の1種または2種以上を添加した後は、更に等倍量程度のエタノール等のアルコールを添加し、静置等する。

10

【0028】

上記方法でイオン交換を行った後は、適宜、洗浄、乾燥、精製を行ってもよい。

【0029】

上記のようにしてフコイダンの硫酸基にカリウム、カルシウム、マグネシウム、亜鉛およびセレンからなる群から選ばれる金属の1種または2種以上が結合した金属結合型フコイダンが得られる。これら金属結合型フコイダンにおいて、フコイダンの硫酸基にカリウム、カルシウム、マグネシウム、亜鉛およびセレンが結合したことおよびその量は原子吸光度計やイオンクロマトグラフィで測定することができる。

20

【0030】

以上説明したフコイダンの硫酸基にカリウム、カルシウム、マグネシウム、亜鉛およびセレンからなる群から選ばれる金属の1種または2種以上が結合した金属結合型フコイダン、好ましくはフコイダンの硫酸基にカリウム、カルシウム、マグネシウムおよびセレンからなる群から選ばれる金属の1種または2種以上が結合した金属結合型フコイダンは、レトロウイルス増殖を抑制することができる。なお、ここでレトロウイルス増殖の抑制とは、感染細胞と非感染細胞の合胞体形成を抑制すること、p24等のカプシドタンパク等の構造タンパク質の産生を抑制することをいう。

30

【0031】

そのため、上記金属結合型フコイダンはレトロウイルス増殖抑制剤とすることができる。ここでレトロウイルスとしては、HTLV-1またはHIV-1が好ましい。

【0032】

本発明のレトロウイルス増殖抑制剤は、上記金属結合型フコイダンを含んでいるだけでよいが、フコイダンを1日あたり100mg以上、好ましくは500mgとなる量で、金属結合型フコイダンの効果を損なわない成分と共に、常法に従って、粉末状、顆粒状、液状、ゲル状にし、これらを飲料、錠剤、ソフトカプセル等の形態にすればよい。

【0033】

また、本発明のレトロウイルス増殖抑制剤の有効成分である金属結合型フコイダンは、従来から食用の褐藻綱の海藻由来であるため、これをそのまま従来公知の飲食品に含有させてもよい。

40

【0034】

なお、本発明のレトロウイルス増殖抑制剤は、レトロウイルスのカプシドタンパク質産生を抑制することができ、また、レトロウイルスが感染した細胞が合胞体となることも阻止することができる。

【0035】

そのため、本発明のレトロウイルス増殖抑制剤は、レトロウイルス感染予防薬またはレトロウイルス感染症発症予防薬にすることができる。

【0036】

50

具体的に、本発明のレトロウイルス増殖抑制剤をレトロウイルス感染予防薬に用いる場合、HTLV-1またはHIV-1に感染していない者が、上記形態にした金属結合型フコイダンを1日4000mg程度までの量で、1日1~3回に分けて1か月以上、連続して摂取すればよい。

【0037】

更に、本発明のレトロウイルス増殖抑制剤をレトロウイルス感染症発症予防薬に用いる場合、抗HTLV-1またはHIV-1抗体陽性で臨床的にキャリアの状態であるが、ATLおよびHAM、HU、AIDSを発症していない者が、上記形態にした金属結合型フコイダンを1日4000mg程度までの量で、1日1~3回に分けて1か月以上、連続して摂取すればよい。

10

【実施例】

【0038】

以下、本発明を実施例を挙げて詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に何ら限定されるものではない。

【0039】

実施例 1

金属結合型フコイダンの調製：

(1) フコイダン(ナトリウム結合型)の調製

水に生のオキナワモズクを投入、攪拌した。6N HClを用いてpH3.0に調整し、90にて1時間抽出した。遠心分離し、上清をUF膜(分画分子量10,000)にて脱塩・濃縮した。25% NaOHを用いて中和(pH5.5)した。凍結乾燥し、フコイダン(分子量10,000以上)とした。

20

【0040】

(2) 金属の異なるフコイダンの調製

(a) 亜鉛結合型フコイダンの調製

上記(1)で得たフコイダン1gをミリQ水100mLに溶解し、分画分子量8,000の透析膜を用いて、希薄塩酸(pH3.0)1Lに対して一晩透析した。透析終了後pH3.0以下であることを確認した。これに水酸化亜鉛をpH5.5になるよう加えた。遠心分離によって不溶な水酸化亜鉛を除去した。上清を凍結乾燥し、亜鉛結合型フコイダンとした。

30

(b) カルシウム結合型フコイダンの調製

上記(1)で得たフコイダン1gをミリQ水100mLに溶解し、分画分子量8,000の透析膜を用いて、希薄塩酸(pH3.0)1Lに対して一晩透析した。透析終了後pH3.0以下であることを確認した。これに水酸化カルシウムをpH5.5になるよう加えた。遠心分離によって不溶な水酸化カルシウムを除去した。上清を凍結乾燥し、カルシウム結合型フコイダンとした。

(c) ナトリウム結合型フコイダンの調製

上記(1)で得たフコイダン1gをミリQ水100mLに溶解し、分画分子量8,000の透析膜を用いて、希薄塩酸(pH3.0)1Lに対して一晩透析した。透析終了後pH3.0以下であることを確認した。これに水酸化ナトリウムをpH5.5になるよう加えた。遠心分離によって不溶な水酸化ナトリウムを除去した。上清を凍結乾燥し、ナトリウム結合型フコイダンとした。

40

(d) マグネシウム結合型フコイダンの調製

上記(1)で得たフコイダン1gをミリQ水100mLに溶解し、分画分子量8,000の透析膜を用いて、希薄塩酸(pH3.0)1Lに対して一晩透析した。透析終了後pH3.0以下であることを確認した。これに水酸化マグネシウムをpH5.5になるよう加えた。遠心分離によって不溶な水酸化マグネシウムを除去した。上清を凍結乾燥し、マグネシウム結合型フコイダンとした。

(e) カリウム結合型フコイダンの調製

上記(1)で得たフコイダン1gをミリQ水100mLに溶解し、分画分子量8,000

50

0の透析膜を用いて、希薄塩酸(pH 3.0) 1Lに対して一晩透析した。透析終了後pH 3.0以下であることを確認した。これに水酸化カリウムをpH 5.5になるよう加えた。遠心分離によって不溶な水酸化カリウムを除去した。上清を凍結乾燥し、カリウム結合型フコイダンとした。

【0041】

上記で調製したフコイダンを表1のように命名した。また、原子吸光光度計で各フコイダンに含まれる置換した金属含量を測定した結果も表1に示した。

【0042】

【表1】

	フコイダンの種類	濃度
Fuco-1	フコイダン(ナトリウム結合型)	417.5ppm(Na ⁺)
Fuco-2	カリウム結合型フコイダン	15.3 ppm(K ⁺)
Fuco-3	カルシウム結合型フコイダン	207.3ppm (Ca ²⁺)
Fuco-4	マグネシウム結合型フコイダン	149.7ppm(Mg ²⁺)
Fuco-5	亜鉛結合型フコイダン	126ppm(Zn ²⁺)

10

【0043】

カリウム結合型フコイダンは、カリウムを質量換算でフコイダン1に対して0.15%含んでいた。カルシウム結合型フコイダンは、カルシウムを質量換算でフコイダン1に対して2.07%含んでいた。マグネシウム結合型フコイダンは、マグネシウムを質量換算でフコイダン1に対して1.50%含んでいた。亜鉛結合型フコイダンは、亜鉛を質量換算でフコイダン1に対して1.26%含んでいた。

20

【0044】

実施例 2

p24の産生量の測定:

実施例1で得た硫酸基に結合する金属を変化させたフコイダンを、ATL-056i培養細胞に最終濃度10µg/mlで培地に添加・投与した後、2日後のp24産生量を測定した。p24産生量は、HTLV-1p24抗原捕獲抗体およびHRP標識p24検出抗体を用いて以下の手順で測定した。なお、抗体は文献(Tanaka Y., et al., Elimination of human T cell leukemia virus type-1-infected cells by neutralizing and antibody-dependent cellular cytotoxicity-inducing antibodies against human T cell leukemia virus type-1 envelope gp46. AIDS Res. Hum. Retroviruses, 30, 542-552, 2014.)記載の方法に従って作製した。その結果を図2に示した。

30

【0045】

<測定試薬・器具>

カセット: ELISA用16ウエル(8ウエル×2)

p24抗原捕獲抗体液: p24抗原捕獲抗体の200倍液、0.2% Triton-X 100、0.2% BSA、0.01% チメロサルを含むPBSに溶解したもの

ブロッキング溶液: 1%カゼイン/PBS、0.01% チメロサルを含む

40

抗原希釈液: 0.2% Triton-X 100、0.2% BSA、0.01% チメロサルを含むPBSに溶解したもの

p24スタンダードの原液: 組み換えHTLV-1p24 500ng/ml

HRP標識p24検出抗体液: HRP標識p24検出抗体の200倍液、0.2% Triton-X 100、0.2% BSA、0.01% チメロサルを含むPBSに溶解したもの

洗浄液: 0.05% Tween-20を含むPBS

基質発色溶液: 気質として0.01%過酸化水素、発色剤としてTMBを含むクエン酸緩衝液

停止液: 2N硫酸

50

【 0 0 4 6 】

< 測定手順 >

p 2 4 抗原捕獲抗体液 5 0 μ l を各ウエルに入れ、1 時間静置し、次いでブロッキング溶液 1 0 0 μ l を各ウエルに入れ 1 0 分間静置し、洗浄する操作を 5 回繰り返し、p 2 4 抗原捕獲抗体がコーティングされたカセットを作製した。p 2 4 抗原捕獲抗体がコーティングされたカセットの各ウエルに抗原希釈液を 5 0 μ l 入れる。p 2 4 スタンダードの原液 5 0 μ l をウエルに入れ、希釈液で段階希釈を行った。各ウエルに検体を 5 0 μ l ずつ入れる。HRP 標識抗体 p 2 4 検出抗体液を 5 0 μ l 入れ、シールした後、室温で 1 時間反応させた。反応後、反応液を捨て、洗浄液で 5 回洗浄する。次に、基質発色溶液を各ウエルに 8 0 μ l ずつ入れた後、遮光して、室温で 1 0 ~ 1 5 分間静置し、発色を確認し、その後、停止液を各ウエルに 5 0 μ l ずつ入れる。最後にプレート吸光度計で波長 4 5 0 nm (対照波長 5 4 0 nm または 6 3 0 nm) で吸光度を測定し、予め作成した検量線から、検体中の p 2 4 抗原を定量する。

10

【 0 0 4 7 】

以上の結果から、フコイダンの硫酸基にカリウム、カルシウム、マグネシウムまたは亜鉛が結合した金属結合型フコイダン (Fuco-2、Fuco-3、Fuco-4、Fuco-5) は、フコイダン (ナトリウム結合型) に比べて、HTLV-1 のカプシドタンパク質 (p 2 4) の産生を顕著に抑制することが分かった。

【 0 0 4 8 】

実施例 3

20

合胞体形成の有無：

実施例 1 で調製した硫酸基に結合する金属を変化させたフコイダンを、各種濃度で ATL 患者由来 HTLV-1 感染細胞および非感染ヒト T 細胞株 Jurkat に投与し、8 時間後と 2 4 時間後に顕微鏡で細胞の様子を観察した。図 1 の A の状態であれば合胞体の形成を阻止したと判断し、B の状態であれば合胞体の形成を阻止していないと判断した。8 時間後と 2 4 時間後に合胞体の形成を完全に阻止したと判断できた濃度を完全阻止濃度とし、それを表 2 に示した。

【 0 0 4 9 】

【表 2】

	完全阻止濃度
Fuco-1	1.25mg/ml
Fuco-2	0.31mg/ml
Fuco-3	0.31mg/ml
Fuco-4	0.31mg/ml
Fuco-5	0.62mg/ml

30

【 0 0 5 0 】

以上の結果から、フコイダンの硫酸基にカリウム、カルシウム、マグネシウムまたは亜鉛が結合した金属結合型フコイダン (Fuco-2、Fuco-3、Fuco-4、Fuco-5) は、フコイダン (ナトリウム結合型) に比べて合胞体の形成を阻止することが分かった。特にフコイダンの硫酸基にカリウム、カルシウムまたはマグネシウムが結合した金属結合型フコイダン (Fuco-2、Fuco-3、Fuco-4) の形成阻止効果は顕著であった。

40

【 0 0 5 1 】

実施例 4

飲料：

実施例 1 (1) で得たフコイダン (ナトリウム結合型) 1 g、クエン酸 1 2 5 m g、スクラロース 2 5 m g を 5 0 m l の水に溶解させたものを容器に充填し、飲料を得た。

【 0 0 5 2 】

実施例 5

50

投与試験：

実施例4で得た飲料を被験者（HTLV-1キャリア：年齢20才以上：10人）に配布して1回1本、1日3回で6か月間毎日飲用してもらった。この飲料飲用前から飲用が終了する6か月後まで1か月ごとに体重・血圧を測定して静脈血10mlを採血した。静脈血は、比重遠心法によりPBMCsを分離後、-80℃で保存した。保存PBMCsより常法に従ってDNAを抽出して、以下のようなリアルタイムPCR法によりプロウイルス量を測定した。その結果を表4に示した。

【0053】

<リアルタイムPCR法>

リアルタイムPCRにより症例DNA中のHTLV-1プロウイルスおよびヒトβ鎖グロビン遺伝子のコピー数を測定し、1細胞あたりのHTLV-1プロウイルスは1コピー、β鎖グロビン遺伝子は2コピーとして100 PBMCs中のHTLV-1プロウイルスのコピー数を算出した。測定にはLightCycler 480 (Roche Diagnostics)を使用し、TaqManプローブ法で行った。HTLV-1の検出には、HTLV-1でよく保存されているpX領域をターゲットとした。使用したプローブおよびプライマーの配列（配列番号1～6）を表3に示した。反応液は1×LightCycler 480 Probe Master (Roche Diagnostics)、0.5 μM sense primer、0.5 μM antisense primer、0.1 μM TaqMan probe、テンプレートDNA 50 ngで総量20 μlに調製した。検量線はHTLV-1プラスミドDNAを $1 \times 10^1 \sim 10^6$ コピー、健常人DNAを $2.5 \times 10^1 \sim 10^4$ コピーで作成した。反応条件は最初の熱変性を95℃で5分行い、95℃で10秒、60℃で30秒を50サイクルとした。

【0054】

【表3】

		配列
HTLV-1	sense primer	5' -CCCACTTCCCAGGGTTTGGGA- 3'
	anti sense primer	5' -GGCCAGTAGGGCGTGA-3'
	probe	5' -FAM-CCAGTCTACGTGTTTGGAGCTGTGTACA-TAMRA-3'
β鎖グロビン遺伝子	sense primer	5' -GTGCACCTGACTCCTGAGGAGA-3'
	anti sense primer	5' -CCTTGATACCAACCTGCCAG-3'
	probe	5' -FAM-AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGG-TAMRA-3'

【0055】

【表4】

	飲用前	1か月後	2か月後	3か月後	4か月後	5か月後	6か月後
A	10.0	12.0	13.6	12.2	11.4	7.8	10.0
B	15.2	11.1	16.1	10.6	13.9	11.3	12.1
C	27.1	22.9	23.6	22.3	20.6	21.9	22.1
D	9.3	9.4	11.6	12.2	10.4	—	6.9
E	13.3	11.6	12.2	10.2	11.0	8.5	11.9
F	14.5	6.7	5.9	5.7	5.6	5.5	6.3
G	5.3	2.8	3.8	4.0	—	—	7.0
H	6.7	3.9	4.3	5.2	5.1	4.6	3.9
I	13.6	10.7	15.9	9.2	14.2	11.1	10.0
J	11.2	6.5	6.7	7.2	7.5	8.2	10.3

: 測定せず

【0056】

HTLV-1プロウイルス量(コピー数/100 PBMCs)は、飲用前よりも飲用6カ月後で有意に低下していた(中央値12.3 vs 10.0、Wilcoxonの符号付順位検定、 $p = 0.021$)。

【0057】

以上の通り、HTLV-1キャリアがフコイダン(ナトリウム結合型)を飲用することによりHTLV-1プロウイルス量を減少させることができた。そのため、合胞体形成試験でフコイダン(ナトリウム結合型)よりも顕著に効果が高かったフコイダンの硫酸基にカリウム、カルシウム、マグネシウムおよび亜鉛からなる群から選ばれる金属の1種または2種以上が結合した金属結合型フコイダンを、HTLV-1キャリアが飲用した場合には、顕著にHTLV-1プロウイルス量を減少させると予測される。

10

【0058】

実施例 6

金属結合型フコイダンの調製:

実施例1(1)において、生のオキナワモズクを生のガゴメ昆布に代える以外は同様にしてフコイダンを調製する。このフコイダンについて、実施例1(2)の操作を行い、金属の異なるフコイダンを調製し得る。

【0059】

実施例 7

金属結合型フコイダンの調製:

実施例1(1)において、生のオキナワモズクを生のわかめに代える以外は同様にしてフコイダンを調製する。このフコイダンについて、実施例1(2)の操作を行い、金属の異なるフコイダンを調製し得る。

20

【0060】

実施例 8

飲料:

実施例1(2)で得た各金属結合型フコイダンの一つを1.5g、クエン酸125mg、スクラロース25mgを50mLの水に溶解させたものを容器に充填し、飲料を得た。

【0061】

実施例 9

飲料:

実施例1(2)で得た各金属結合型フコイダンの一つを0.5g、クエン酸125mg、スクラロース25mgを50mLの水に溶解させたものを容器に充填し、飲料を得た。

30

【0062】

実施例 10

細胞毒性の確認:

実施例1(2)で得られた各金属結合型フコイダン(0、62.5、125、250、500または1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)について、文献(Haneji K., et al., *Fucoidan extracted from Cladosiphon okamuranus Tokida induces apoptosis of human T-cell leukemia virus type 1-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. Nutr. Cancer.*, 52, 189-201, 2005.)に従って細胞毒性を調べた。その結果、少なくとも1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度まで細胞毒性は認められなかった。

40

【0063】

実施例 11

安全性の確認:

実施例1(2)(a)で得られた亜鉛結合型フコイダン(0、250、500または833mg/kg/rat)について、文献(Li N. et al., *Toxicological evaluation of fucoidan extracted from Laminaria japonica in Wistar rats. Food Chem Toxicol.* 43, 421-426, 2005.)に従ってラットを用いた安全性を調べた。その結果、少なくとも8

50

33 mg / kg / rat の濃度で 28 日まで問題は認められなかった。

【0064】

実施例 12

金属結合型フコイダンの調製：

実施例 1 の (1) で得たフコイダン 5 g を蒸留水 100 mL に溶解した。これとは別に 4 塩化セレン 2.2077 g を蒸留水 100 mL に溶解した。これらを混合した後、エタノール 200 mL を加え、室温で放置した。遠心 (10000 rpm、10 分間) を行い、沈殿物をエタノールで 3 回洗浄し、エバポレーター (70) で乾燥させた。エタノール沈殿物をミリ Q 水で溶解後、透析を行った。透析後、凍結乾燥を行い、セレン結合型フコイダンとした。原子吸光光度計でセレン結合型フコイダンに含まれる置換した金属含量を測定したところ、セレン結合型フコイダンはセレンを 177.1 ppm で含んでいた (セレン結合型フコイダンは、セレンを質量換算でフコイダン 1 に対して 1.77 % 含んでいた)。

10

【0065】

実施例 13

合胞体形成の有無：

実施例 12 で得られたセレン結合型フコイダンについて、実施例 3 と同様の方法により合胞体形成抑制作用を調べた結果、合胞体形成完全阻止濃度は 1.25 mg / mL であった。

【0066】

20

実施例 14

p24 の産生量の測定：

実施例 12 で得られたセレン結合型フコイダンについて、実施例 2 と同様の方法により、ATL-056i 培養細胞に最終濃度 10 μg / mL で培地に添加・投与した 2 日後の p24 産生量を測定した。その結果を図 3 に示した。セレン結合型フコイダンは p24 抗原産生を顕著に抑制することが分かった。

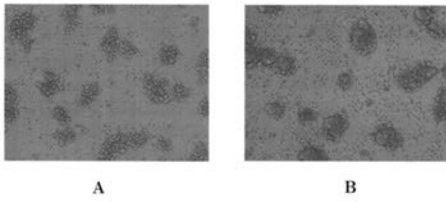
【産業上の利用可能性】

【0067】

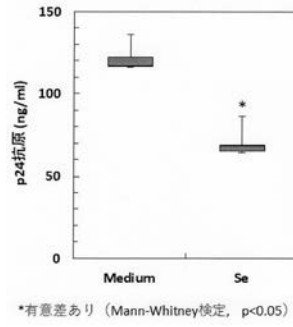
本発明のレトロウイルス増殖抑制剤は、レトロウイルスの感染を予防したり、レトロウイルス感染症の発症を予防したりすることができる。

30

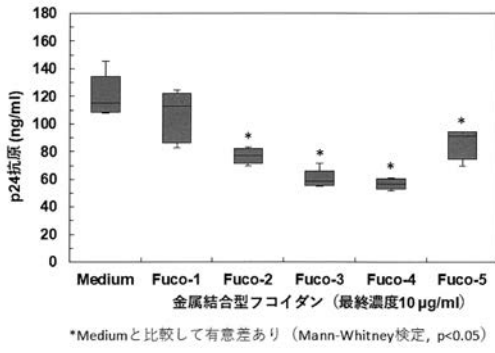
【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】



【 配列表 】

[2018225847000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2018/021962
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int.Cl. A61K31/737(2006.01)i, A61K36/03(2006.01)i, A61P31/14(2006.01)i, A61P31/18(2006.01)i, C08B37/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. A61K31/737, A61K36/03, A61P31/14, A61P31/18, C08B37/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Published examined utility model applications of Japan		1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan		1971-2018
Registered utility model specifications of Japan		1996-2018
Published registered utility model applications of Japan		1994-2018
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 10-237103 A (TAKO, Masakuni) 08 September 1998, example 1 & EP 994122 A1, example 1	8, 9 1-7
X A	JP 2006-83285 A (UBE INDUSTRIES, LTD.) 30 March 2006, paragraph [0017], claim 1, examples 3, 4, table 3 (Family: none)	8, 9 1-7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 10 August 2018 (10.08.2018)		Date of mailing of the international search report 28 August 2018 (28.08.2018)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/021962

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DINESH, S. et al., "In vitro anti-HIV-1 activity of fucoidan from Sargassum swartzii", International Journal of Biological Macromolecules, 2016, vol. 82, pp. 83-88, ISSN: 0141-8130 (in particular, abstract)	1-9
A	PROKOFJEVA, M. M. et al., "Fucoidans as Potential Inhibitors of HIV-1", Marine Drugs, 2013, vol. 11, no. 8, pp. 3000-3014, ISSN: 1660-3397 (in particular, abstract)	1-9
A	JP 2007-217410 A (YOSHIDA, Tsutomu, YAMASHITA, Masako) 30 August 2007, claims 1, 11 (Family: none)	1-9
P, X	WO 2017/098653 A1 (SOUTH PRODUCT LTD.) 15 June 2017, claims 4-6, example 1 (Family: none)	8, 9

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 2 1 9 6 2	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K31/737(2006.01)i, A61K36/03(2006.01)i, A61P31/14(2006.01)i, A61P31/18(2006.01)i, C08B37/00(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K31/737, A61K36/03, A61P31/14, A61P31/18, C08B37/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2018年 日本国実用新案登録公報 1996-2018年 日本国登録実用新案公報 1994-2018年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X A	JP 10-237103 A (田幸 正邦) 1998.09.08, 実施例1 & EP 994122 A1 Example1	8,9 1-7	
X A	JP 2006-83285 A (宇部興産株式会社) 2006.03.30, 段落0017、請求項1、実施例3、4、表3 (ファミリーなし)	8,9 1-7	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 10.08.2018		国際調査報告の発送日 28.08.2018	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 馬場 亮人	4C 1149
		電話番号 03-3581-1101 内線 3452	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2018/021962
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	DINESH, S. et al., In vitro anti-HIV-1 activity of fucoidan from Sargassum swartzii, International Journal of Biological Macromolecules, 2016, VOL. 82, PAGES 83-88, ISSN: 0141-8130 (特に Abstract)	1-9
A	PROKOFJEVA, M. M. et al., Fucoidans as Potential Inhibitors of HIV-1, Marine Drugs, 2013, VOL. 11, NO. 8, PAGES 3000-3014, ISSN: 1660-3397 (特に Abstract)	1-9
A	JP 2007-217410 A (吉田 勉、山下 雅子) 2007.08.30, 請求項1, 11 (ファミリーなし)	1-9
P, X	WO 2017/098653 A1 (株式会社サウスプロダクト) 2017.06.15, 請求項4-6、実施例1 (ファミリーなし)	8, 9

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	Z
A 6 1 K 36/03 (2006.01)	A 6 1 K 36/03	

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. TRITON
2. TWEEN

(72) 発明者 田中 勇悦
 沖縄県中頭郡西原町字千原 1 番地 国立大学法人琉球大学内
 (72) 発明者 福島 卓也
 沖縄県中頭郡西原町字千原 1 番地 国立大学法人琉球大学内
 (72) 発明者 宮良 恵美
 沖縄県中頭郡西原町字千原 1 番地 国立大学法人琉球大学内
 (72) 発明者 今泉 直樹
 沖縄県中頭郡西原町字千原 1 番地 国立大学法人琉球大学内

F ターム(参考) 4C086 AA01 AA02 EA24 MA01 MA04 MA17 MA28 MA35 MA37 MA41
 MA43 MA52 NA14 ZA02 ZA33 ZB27 ZB33 ZC55
 4C088 AA13 BA06 BA09 BA12 CA05 CA21 MA17 MA28 MA35 MA37
 MA41 MA43 MA52 NA14 ZA02 ZA33 ZB27 ZB33 ZC55

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。