

平成13年度

エイズ医薬品等開発研究

重点研究報告書

第1分野

抗エイズウイルス薬、エイズ付随症状
に対する治療薬の開発に関する研究

エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所
主任研究者 部長 棚元憲一

要旨

参加企業5社、及び1大学から提出されたエイズ医薬品候補物質合計378サンプルを得て抗エイズウイルス活性を試験した。従来のマイクロプレート法に加え、今年度から新たにマクロファージ好性ウイルスの増殖抑制を Magic-5A アッセイ法を用いて調べた。今年度のサンプルに関しては、いずれのアッセイ系においても陽性反応を示したものはなかった。

1. 研究組織

- (1) 北海道立衛生研究所
田村 正秀、伊木 繁雄
- (2) 京都府保健環境研究所
前田 知穂、石崎 徹
- (3) 東京都立衛生研究所
関根 大正
- (4) 神奈川県衛生研究所
益川 邦彦、斉藤 隆行
- (5) 愛知県衛生研究所
鈴木 康元、森下 高行
- (6) 大阪府立公衆衛生研究所
大竹 徹、森 治代、川畑 拓也、大石 功
- (7) 神戸市環境保健研究所
秋吉 京子、須賀 知子
- (8) 大分県環境研究センター
小野 哲郎
- (9) 横浜市衛生研究所
野口 有三
- (10) 福岡県保健環境研究所
加藤 元博、千々和勝己
- (11) 東京大学医学部
牛島 廣治
- (12) 国立医薬品食品衛生研究所
棚元憲一

2. 研究目的

現在までに幾つかのエイズウイルスに対する医薬品が開発されてきたが、その数は限定されており、かつこれらの効力や副作用にも問題が多いなど、未だに決定的な薬剤は得られていない。わが国の医薬品メーカーの新薬開発能力は優れたものがあり、多くの潜在的な抗エイズウイルス薬の存在の可能性がある一方、日本国内ではエイズ患者数が少ないことから企業レベルでの採算の問題もあって、エイズ医薬品開発は困難な状況にある。従ってこのような研究は国、公共機関がリードして行われなければならない。本研究では、企業・大学等から提供される合成化学物質や生薬抽出物について、国立医薬品食品衛生研究所、東京大学医学部及び10地方衛生研究所から成る研究班で、エイズウイルス増殖抑制を指標にして、産学官の力を結集してスクリーニング研究を行うものである。併せて、より効率的でかつ迅速なスクリーニング法の開発研究や、効果

が認められた化合物についてその詳細な作用メカニズムの検討、臨床分離株への応用等の研究を進展させる。なお、特許などの関係で、詳細な研究を公表することは参加企業側の要請とヒューマンサイエンス振興財団との話し合いにより、さし控えることになっている。このため、本研究成果の発表についても、抗 HIV 活性陽性物質の化学名は言うに及ばず、サンプル提出企業名も伏せてある。そのような経緯から、きわめて限定された結論のみを紹介することになる。

3. 研究方法

本研究班では、以下の箇条書きに従った研究方法により、エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究を行った。

(1) 参加企業が合成した医薬品の中で、エイズ医薬品候補として有望と思われるものを各社で選考する。これら医薬品の特性を調べた後、希望する活性測定条件を記して、原則として1件につき2サンプルが国立医薬品食品衛生研究所に送付される(希少サンプルの場合は1サンプルでも可)。

(2) 班会議を開催し、牛島教授の指導の下に各10地研エイズウイルス研究担当者のためのウイルス取り扱い法と、スクリーニングに関する討論会を行い、技術と実験方法の統一を計る。

(3) 国立医薬品食品衛生研究所に送付された化学物質等は集結後、通し番号をうつ。製品名は伏せたまま等分し、それぞれ愛知衛研、及び大阪府公衆衛研を除く8地方衛研雄及び東大のいずれかに送付する。

(4) まず MT-4 細胞の HIV 感染による細胞障害性の抑制を指標としたマイクロプレート法により、エイズ医薬品候補物質の抗 HIV 活性のスクリーニング研究を行う。陽性対照としては AZT(3'-azido-3'-deoxythymidine)やデキストラン硫酸を使用する。被検サンプル数のうち判定の難しいものは牛島研で重複してテストし、総合判定を行う。マイクロプレート法を終えたサンプルはすべて愛知衛研、及び大阪府公衆衛研の2箇所にて等分になるように送付され、そこで Magic-5 細胞を用いたスクリーニングを行う。

以下にマイクロプレート法及び magic-5 アッセイ法を記す。

a) **マイクロプレート法**: 抗 HIV 物質の細胞毒性と抗 HIV 活性を測定するプレートを用意する。両プレートとも 96 穴平底培養プレートを使用し、左端 8 穴に 10%FCS 加 RPMI1640 培地で所定の濃度に希釈した試料溶液を加える。残りの穴には培地を 100 μ l ずつ入れ、左端の穴から 8 連ピペットで 2 倍あるいは 5 倍段階希釈を 11 穴 (5 倍希釈については 8 穴) まで行い、12 穴目は薬剤濃度を 0 として細胞増殖及び HIV 感染のコントロールとする。被検薬剤 1 種類につき細胞毒性と抗 HIV 活性測定プレートのそれぞれ 2 列を使用する。細胞毒性測定用には、対数増殖期にある MT-4 細胞を集め、その 2 $\times 10^6$ 個を 10 ml の培地に再浮遊し、被検薬剤をすでに加えたプレートのすべての穴に 100 μ l ずつ加えた。一方、抗 HIV 測定用のプレートには遠心分離により集めた 2 $\times 10^6$ の MT-4 細胞に 100TCID₅₀ となるように HIV (HTLV-B) のストック溶液を加え、37°C1 時間感染させた後、培地 10 ml で再浮遊し抗 HIV 活性測定プレートのすべての穴に 100 μ l 加える。培養 5 日目に顕微鏡により HIV による細胞変性効果 (CPE) と細胞毒性を観察する。

b) **magic-5 アッセイ法**: ウェルあたり 10,000 個の MAGIC 5A 細胞を 96 穴平底プレートにまき、細胞がプレート底面に張り付くまで 37°C インキュベーター内で培養する。培養液を取り除いた後、培養液で 2 段階希釈 (希釈倍数は 5 倍) した薬剤液を加える。その後 HIV-1 Ba-L 株を 100 ~ 200BFU/50 μ l になるように DEAE-dextran 添加培養液で調整し加える。37°C の CO₂ インキュベーターで 48 時間培養する。培養液を取り除き固定液 (1% formaldehyde and 0.2% glutaraldehyde in PBS) を加えて室温で 5 分間インキュベートし、洗浄の後、染色液 (4 mM potassium ferrocyanide, 4 mM potassium ferricyanide, 2 mM MgCl₂ and 400 μ g/ml X-gal.) を加えて、37°C で 1 時間インキュベートした。染色液を取り除き洗浄し、青く染まった細胞の数を顕微鏡下でカウントする。抗 HIV 活性陽性検体として TAK-779 および AZT を用いる。

これらのスクリーニングで活性が認められたサンプルに関しては、生細胞数測定法や巨細胞形成抑制法により、抗 HIV 活性の確認を行う。また被検物質によっては、逆転写酵素活性阻害も試験する。試験成績は国立医薬品食品衛生研究所を経て、ヒューマンサイエンス振興財団から提出企業に報告される。各地方衛研で使用される細胞やウイルスの分与やチェックは定期的に牛島研でなされる。

(5) 地方衛研で得られた実験結果は、国立医薬品食品衛生研究所で集計され、牛島研のデータと共に、製品名をマスクした形で、各研究機関の担当者の意見を聞く。有望と考えられたものや、結果があいまいなものは、再度ウイルス試験が担当研究機関や牛島研で行われ、最終判定が国立医薬品食品衛生研究所で行われた班会議でなされる。また牛島研では新しいスクリーニング法等本研究の推進につながる基礎研究も行っている。

4. 研究成果及び考察

企業5社、及び1大学から寄せられた合計378サンプルについて、従来のマイクロプレート法及び今年度から新たに導入したマクロファージ系 Magic-5A 細胞を用いた抗 HIV 活性スクリーニングを行った。その結果、いずれのサンプルに於いても有意の活性は得られなかった。本年度に陽性サンプルが得られなかったことは残念であるが、新たに導入した Magic-5 アッセイ法によって、これまでの T 細胞好性 (X4) ウイルスのみならず、マクロファージ好性 (R5) ウイルスの増殖に及ぼす影響をも検討することが可能となり、抗 HIV 活性物質の検索範囲が大きく広げられたことになる。また、今年度よりヒューマンサイエンス振興財団のホームページに本スクリーニング研究班の紹介を掲載し、アッセイ法を紹介している。来年度は Magic-5 アッセイ法についても掲載する予定であり、この意味からも広く新規活性物質の検索の推進を図っていく予定である。スクリーニング以外にも本研究班では HIV-1 のサブタイプの鑑別法の開発研究を行った。HIV-1 のサブタイプの鑑別は感染経路の特定、感染地域でのウイルスの広がりなどを推察することができ、ワクチン開発のための重要な情報となるものである。本研究の結果、新たにサブタイプ特異的プライマーをデザインすることによって、サブタイプ A, C, E, F, G を鑑別することが可能となった。サブタイプ B と D についても A, E, G の鑑別と同様にデザインすることで B, D の鑑別も可能性があると思われる。

本研究はヒューマンサイエンス振興財団のエイズ医薬品開発研究が開始された当初から、主要な研究の一つとして現在まで継続されてきた。これまですでに三千数百に及ぶ試料についてスクリーニング研究が行われている。その中には約 50 種の候補物質が見出され、さらにそれらの作用について詳細な検討が行われてきた。日本国内ではエイズ患者数自体少ないことから企業レベルでは採算がとれないこともあって、エイズ医薬品開発は困難な状況にあると思われる。このような研究は国、公共機関がリードすべきであることは言うまでもない。本研究のように国立の研究機関、及び地方衛研が協力してエイズ医薬品のスクリーニングを行っている例は諸外国ではない。これは日本における地方衛研のレベルの高さを証明するものであり、本研究のベースはそこにあると思われる。

本研究は、特許などの関係で詳細な内容を公表することは、参加企業・研究機関側の要請とヒューマンサイエンス振興財団との話し合いにより差し控えることとなっている。このため、本研究成果の発表についても、きわめて限定された結論のみしか紹介できない。しかし、国内のエイズ患者数が少ないにもかかわらず、例年多くの企業、研究機関から多数のスクリーニングに応募があることは、エイズ医薬品のスクリーニング研究に対する関心の高さと、本研究の必要性を示しているものと思われる。

5. 結論

企業5社、及び1大学から寄せられた合計378サンプルについて、従来のマイクロプレート法及び今年度から新たに導入したマクロファージ系 Magic-5A 細胞を用いた抗 HIV 活性スクリーニングを行った。その結果、いずれのサンプルに於いても有意の活性は得られなかった。新たに導入した Magic-5 アッセイ法によって、抗 HIV 活性物質の検索範囲が従来に比べて大きく広げられたことになり、今後が期待される。また、サブタイプ特異的なプライマーを用いた PCR 法による HIV-1 のサブタイプの鑑別法の開発研究を行い、成果を得た。

6. 研究発表

1) 論文発表

Min B S, Kim Y H, Tomiyama M, Nakamura N, Miyashiro H, Otake T, Hattori M, Inhibitory effects of Korean plants on HIV-1 activity, *Phytotherapy Research*, **15**, 481-486, 2001

Yagyu, F., Ikeda, Y., Ariyoshi, K., Sugiura, W., Wongkhomthong, SA., Masuda, M., and Ushijima, H.: Differentiation of subtype B and E of human immunodeficiency virus type 1 by polymerase chain reaction using novel env grnr primers. *J. Virol. Method.* 101:11 -20, 2002.

8. 知的所有権の取得状況

本研究の成果をもとにして、特許取得などがなされる可能性があるが、我々には通知されないことになっている。

平成13年度

エイズ医薬品等開発研究
重点研究報告書

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社