

厚生労働科学研究研究費補助金

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 棚元憲一

平成15(2003)年 4月

## 目 次

I. 総括研究報告				
エイズ医薬品候補物質の検査、保存及び総合評価			-----	1
棚元憲一				
II. 分担研究報告				
1. スクリーニング法の開発と技術移転及び総合評価			-----	8
牛島廣治				
2. HIVウイルスを使用したエイズ医薬品候補物質の			-----	11
スクリーニング研究				
小野哲郎				
3.	同	上	-----	12
加藤元博				
4.	同	上	-----	13
秋吉京子				
5.	同	上	-----	16
大竹 徹				
6.	同	上	-----	19
前田知穂				
7.	同	上	-----	20
鈴木康元				
8.	同	上	-----	22
関根大正				
9.	同	上	-----	25
野口有三				
5.	同	上	-----	26
益川邦彦				
5.	同	上	-----	27
田村正秀				
III. 研究成果の刊行に関する一覧表			-----	29
IV. 研究成果の刊行物・別刷			-----	30

厚生科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）  
総括研究報告書

エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究

主任研究者 棚元憲一 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部長

研究要旨：企業および大学より提供された 230 検体についてマイクロプレート法、magic-5 アッセイ、巨細胞形成による抗 HIV 活性スクリーニングを行った。その結果、magic-5 アッセイでは 14 サンプルにおいて、マイクロプレート法ではそのうち 13 サンプルにおいて、巨細胞形成においてはさらにそのうちの 11 サンプルにおいて抗 HIV 活性が認められた。3 種のスクリーニング法での結果にはよい相関が見られた。これらのサンプルはいずれも毒性が弱いことから、エイズ薬の候補物質への期待が持たれる。

分担研究者

田村 正秀	北海道立衛生研究所
前田 知穂	京都府保健環境研究所
関根 大正	東京都立衛生研究所
益川 邦彦	神奈川県衛生研究所
鈴木 康元	愛知県衛生研究所
大竹 徹	大阪府立公衆衛生研究所
秋吉 京子	神戸市環境保健研究所
小野 哲郎	大分県衛生環境研究センター
野口 有三	横浜市衛生研究所
加藤 元博	福岡県保健環境研究所
牛島 廣治	東京大学医学部

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。

A. 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。

B. 研究方法

エイズ医薬品候補物質スクリーニング

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、通し番号を一つ。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'-deoxy-thymidine)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 箇所等に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 加え 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 . 1 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 . . . 1 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 100TCID<sub>50</sub> となるように HIV (HTLV-B) のストック溶液を加え、37°C 1 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 . . . 1 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：ウエルあたり 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 . 1 になるように DEAE-dextran 添加培養液で調整し加える。37°C の CO<sub>2</sub> 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 MgCl<sub>2</sub> and 400 . g/ml X-gal.）を加えて、37°C で 1 時間インキュベートする。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、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。

#### 定量的擬似 HIV 感染モデルの作成

ルシフェラーゼ遺伝子と T7 プロモーター

(pT7EMCluc) をもつ HeLaT4 細胞と、T7 ポリメラーゼと CAG プロモーター (pCAGT7pol) を持つ HeLa KS386 細胞を用いた。陽性対照として HeLaT4-pCAGluc、HeLaKS386-pCAGluc を実験時に作成した。ルシフェラーゼ活性系の試薬を用いて反応させ、ルミノメーターで測定した。また、抗 CD4 モノクローナル抗体、抗 CXCR4 モノクローナル抗体、抗 CCR5 抗体を 2 細胞の融合時に添加することでルシフェラーゼ活性の変化を見た。

### C. 研究結果

#### エイズ医薬品候補物質スクリーニング

企業 4 社、1 大学、1 公立研究所から寄せられた合計 230 サンプルについて、マイクロプレート法及びマクロファージ系 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、マイクロプレート法では表 1 に示すように 13 サンプルにおいて強い抗 HIV 活性が認められた。これらの陽性サンプルについて、

Molt-4 細胞を用いた巨細胞形成抑制活性を調べたところ、比較的活性の弱い 2 サンプルを除く 11 サンプルに活性が認められた。なお、対照薬剤として使用した AZT の  $IC_{50}$  は 1.5ng/ml であった。一方、マクロファージ好性 HIV-1 株の MAGIC-5A 細胞での増殖抑制活性においては、15 検体に抗ウイルス活性を認めた (表 1)。そのうち 11 検体は抑制濃度 8 ~40. g/ml、50%抑制濃度 ( $IC_{50}$ ) 値 0.18~9.0. g/ml と強い抗ウイルス活性を示した。また、4 検体は抑制濃度がいずれも 1,000. g/ml と弱い抗ウイルス活性を示した。強い活性を認めた 11 検体のうち 1 検体 (No.2180) を除く 10 検体は MAGIC-5 細胞への毒性も弱く、いずれも薬剤濃度 1,000 . g/ml で毒性を示さず、選択計数 (SI) は 25~125 以上を示した。なお、対照薬剤として使用した AZT の  $IC_{50}$  は 2.7 ng/ml であった。

$IC_{50}$  値が 0.18. g/ml と最も強く強い活性を示した No.2180 は細胞への毒性が強く 2. g/ml 濃度にて毒性が示され、SI は 5 に止まった。

#### 定量的擬似 HIV 感染モデルの作成

HeLaT4-pT7EMCluc 細胞と種々の比で HeLaKS386-pCAGT7pol 細胞を混ぜることによりルシフェラーゼ活性が 100-300 倍上昇した。陽性対照の HeLaT4-pCAGluc、HeLaKS386-pCAGluc 細胞ではより上昇した。抗 CD4 モノクローナル抗体、抗 CXCR4 モノクローナル抗体を添加すると活性が抑制されたが、抗 CCR5 抗体では活性は抑制されなかった。

### D. 考察

企業 4 社、1 大学、1 公立研究所から寄せられた合計 230 サンプルの抗 HIV 活性スクリーニングの結果、マイクロプレート法では 13 サンプルに、またマクロファ

ージ好性ウイルスの増殖抑制が 15 サンプルに活性が見られた。このうちマイクロプレート法で活性を示したサンプルはすべて magic-5 アッセイにおいても活性が見られた。なお、T 細胞好性ウイルスを用いたスクリーニング試験で抗ウイルス活性を示さなかったにも拘わらず magic-5 アッセイにおいて最も強い活性を示した No.2180 は細胞毒性が強く、その後の追試の結果、毒性濃度と阻止濃度が同程度であり、効果は疑わしいと思われる。マイクロプレート法では活性を示さなかった No.2214 は magic-5 アッセイでは活性を示したが、その活性は非常に弱いものであった。またこれらの陽性サンプルについて、Molt-4 細胞を用いた巨細胞形成抑制活性を調べたところ、マイクロプレート法及び magic-5 アッセイで比較的活性の弱い 2 サンプルを除く 11 サンプルに活性が認められた。これらの結果から、3 つのスクリーニング法での結果はメカニズムが異なるにも拘わらず非常によい相関を示すことが明らかになった。なお、今回の陽性サンプルはすべて一社から提供されたものであり、多糖類とされている。今回得られた活性は、本研究班始まって以来最も強い活性であり、またいずれも細胞への毒性が低く SI は 25~125 以上であることから、有力なエイズ薬の候補物質となる可能性が示された。残念ながら、特許などの関係で詳細な研究内容に関して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、我々研究者にも知らされないことになっている。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、報告も研究自体も極めて限定されたものとなっている。

しかしながら、今回のように有望な物質が得られた場合は、HS 財団の仲介によりサンプル提供企業との協議のもと、同意が得られれば、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ことが可能となる。当研究班には充分その潜在能力はあると考えている。

## E. 結 論

企業、大学、公立研究所から寄せられた合計 230 サンプルについて、マイクロプレート法、magic-5 アッセイ、巨細胞形成による抗 HIV 活性スクリーニングを行った。その結果、magic-5 アッセイでは 14 サンプルにおいて、マイクロプレート法ではそのうち 13 サンプルにおいて、巨細胞形成においてはさらにそのうちの 11 サンプルにおいて抗 HIV 活性が認められた。3 種のスクリーニング法での結果にはよい相関が見られた。これらのサンプルはいずれも毒性が弱いことから、エイズ薬の候補物質への期待が持たれる。

また HeLa 細胞株 2 種類とレポーター遺伝子を用いた HIV 細胞融合法により、定量的擬似 HIV 感染モデルが得られた。

表1. 抗HIV活性

検体番号	細胞毒性	細胞障害抑制試験 有効濃度( $\mu\text{g/ml}$ )	巨細胞抑制試験 有効濃度( $\mu\text{g/ml}$ )	magic-5アッセイ 阻止濃度 (IC50)
2180	2 (0.4)	抑制せず	抑制せず	0.4 (0.18)
2201	>1,000	$\geq 1,000-1.9$	$\geq 1,000-200$	8 (1.1)
2203	>1,000	$\geq 1,000-7.5$	$\geq 1,000-200$	40 (4.1)
2204	>1,000	$\geq 1,000-3.8$	$\geq 1,000-200$	8 (2.7)
2205	>1,000	$\geq 1,000-1.9$	$\geq 1,000-40$	40 (1.1)
2206	>1,000	$\geq 1,000-3.8$	$\geq 1,000-200$	40 (3.4)
2207	>1,000	$\geq 1,000-7.5$	$\geq 1,000-200$	40 (4.4)
2208	>1,000	$\geq 500-1.9$	$\geq 500-20$	40 (9.0)
2209	>1,000	$\geq 1,000-62.5$	抑制せず	1,000 (-)
2212	>1,000	$\geq 1,000-500$	抑制せず	40 (3.6)
2213	>1,000	$\geq 1,000-1.9$	$\geq 1,000-8$	8 (0.72)
2214	>1,000	抑制せず	抑制せず	1,000 (-)
2215	>1,000	$\geq 1,000-1.9$	$\geq 1,000-8$	1,000 (-)
2216	>1,000	$\geq 1,000-1.9$	$\geq 1,000-8$	1,000 (-)
2217	>1,000	$\geq 1,000-1.9$	$\geq 1,000-8$	8 (1.6)
AZT		(0.0015)		(0.0027)

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yagyu, F., Ikeda, Y., Ariyoshi, K., Sugiura, W., Wongkhomthong, S.A., Masuda, M., Ushijima, H. Differentiation of subtype B and E of human immunodeficiency virus type 1 by polymerase chain reaction using novel env gene primers. J. Virol. Method. 101:11-20, 2002.
- 2) Horikoshi H, Kinomoto M, Kurosu T, Komoto S, Shiraga M, Otake T, Mukai T, Ikuta K, Resting CD4+ T cells with CD38+CD62L+ produce interleukin-4 which contributes to enhanced replication of T-tropic human immunodeficiency virus type 1, Virology, 293, 94-102,2002
- 3) El-Mekkawy S, Meselhy M R, Abdel-Hafez A A M, Nakamura N, Hattori M, Kawahata T, Otake T, Inhibition of cytopathic effect of human immunodeficiency virus type-1 by various phorbol derivatives, Chemical and Pharmaceutical Bulletin,

- 50, 523-529, 2002
- 4) Komoto S, Kinomoto M, Horikoshi H, Shiraga M, Kurosu T, Mukai T, Auwanit W, Otake T, Oishi I, Ikuta K, Ability to induce p53 and caspase-mediated apoptosis in primary CD4+ T cells is variable among primary isolates of human immunodeficiency virus type 1, *AIDS Research and Human Retroviruses*, 18, 435-446, 2002
  - 5) Ma C, Nakamura N, Miyashiro H, Hattori M, Komatsu K, Kawahata T, Otake T, Screening of Chinese and Mongolian herbal drugs for anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) activity, *Phytotherapy Research*, 16, 186-189, 2002
  - 6) Ma C, Nakamura N, Hattori M, Kawahata T, Otake T, Inhibition effects of triterpene-azidothymidine conjugates on proliferation of human immunodeficiency virus type 1 and its protease, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50, 877-550, 2002
  - 7) Muroi M., Ohnishi T. & Tanamoto K. Lipopolysaccharide-mimetic activities of Toll-like-receptor 2-stimulatory substance(s) contained in *Escherichia coli* lipopolysaccharide preparations. *Infect.Immun.* Accepted for publication
  - 8) Ohnishi, T. Muroi M., & Tanamoto K. N-linked glycosylation critical to the Toll-like receptor 4 function require the presence of MD-2. *Clin, Diagn. Lab. Immunol.* In press
  - 9) Sakai A., Kikuchi Y., Muroi M., Masui T., Furuhashi C., Uchida E., Takatori K. & Tanamoto K. Overexpression of NP95 mRNA by tumor promoters in the promotion phase of a two-stage BALB/3T3 cell transformation assay. *Biol. Pharm. Bull.* 26(3), 347-351, 2003.
  - 10) Muroi M., Ohnishi T. & Tanamoto K. Regions of the mouse CD14 molecule required for Toll-like receptor 2- and 4-mediated activation of NF- $\kappa$ B. *B. J. Biol. Chem.* 277 (44), 42372-42379, 2002
  - 11) Muroi M. & Tanamoto K. Polysaccharide regions is indispensable for *Salmonella* lipopolysaccharide to activate NF- $\kappa$ B through human Toll-like receptor. *Infect.Immun.* 70(11), 6043-6047, 2002
  - 12) Muroi M., Ohnishi T. & Tanamoto K. MD-2, a novel accessory molecule, is involved in species-specific actions of *Salmonella* lipid A. *Infect.Immun.* 70(7), 3546-3550, 2002
  - 13) Kikuchi Y., Kakeya T., Yamazaki T., Takekida K., Nakamura N., Matsuda H., Takatori K., Tanimura A., Tanamoto K., Sawada J. G1-dependent prion protein expression in human glioblastoma cell line T98G. *Biol. Pharm. Bull.* 25(6), 728-733, 2002
  - 14) Takaekida, K., Kikuchi Y., Yamazaki T., Horiuchi M., Kakeya T., Shinagawa M., Takatori K., Tanimura A., Tanamoto K., Sawada J. Quantitative analysis

of Prion protein by immunoblotting. J. Health Sci. 48(3), 288-291, 2002

2. 学会発表

- 1) 鈴木映子、牛島廣治他：新しいHIV-1 fusion assay系の有用性に関する研究：多核巨細胞の定量と再現性. 日本ウイルス学会 2002 札幌
- 2) 岩坂正和、牛島廣治他：擬似微小重力磁場がウイルス感染モデル細胞系に与える影響. 日本ウイルス学会 2002 札幌
- 3) 鈴木映子、牛島廣治他：Cell fusionモデルを用いたHIV候補薬の評価. 抗ウイルス学会 2002 千葉
- 4) 林京子、牛島廣治：細胞融合系を用いたHIVの吸着・侵入阻害効果の評価 日本薬学会 2003 長崎
- 5) 伊部史朗、森下高行、佐藤克彦、内海 眞、金田次弘 Gag p6 遺伝子に検出された挿入変異の意義 第16回日本エイズ学会(名古屋)
- 6) 伊部史朗、森下高行、竹尾 歌、堀田直恵、佐藤克彦、内海 眞、金田次弘 2001年次に新規受診した未治療HIV-1感染症患者の薬剤耐性検査結果 第16回日本エイズ学会(名古屋)
- 7) 山本直彦、森下高行、佐藤克彦、大竹 徹、森 治代、川畑拓也、金田次弘、内海 眞新規低分子化合物；ペンダント型亜鉛サイクレン錯体の抗HIV活性とその作用機序 第16回日本エイズ学会(名古屋)
- 8) 永井裕美、和田かおる、森下高行、佐藤克彦、内海 眞、西山幸廣、金田次弘 高感度リアルタイムPCRによるHIV-1 DNA定量法の検討 第16回日本エイズ学会(名古屋)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス研究事業）  
分担研究報告書

エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究  
（エイズ医薬品候補物質のスクリーニングと新規方法の開発）

所属：東京大学大学院 医学系研究科 発達医科学教室  
分担研究者：教授 牛島廣治  
協力者： 沖津祥子、柳生文宏、坂本辰徳、鈴木映子

要旨

平成 14 年度送付された 30 サンプルのうち、13 サンプルにおいて抗 HIV 活性が認められた。また、スクリーニングのために HeLa 細胞株 2 種類とレポーター遺伝子を用いた HIV 細胞融合法の作成を行った。定量的擬似 HIV 感染モデルが得られた。

研究 1

エイズ医薬品候補物質スクリーニング

A. 緒言

HIV の治療薬が開発されて約 20 年になる。HAART に代表される薬剤のように、エイズでの死亡を激減させることが可能となった。しかしながらより有効で副作用の少ない薬剤の開発が望まれている。ここでは産学官の力を結集してわが国の抗エイズ薬開発のスクリーニングを行うものである。

B. 目的

参加企業および大学から提供された合成化学物質や生薬抽出物等についてエイズ医薬品候補物質のスクリーニングを実施する。

C. 方法

**候補薬剤**：平成 14 年度送付された 30 サンプル（002201-002230）について抗 HIV 活性を測定した。送付されたサンプルを指示された溶液で溶解した後、さら

に RPMI1640 培地 950  $\mu$ l に 20mg/ml の濃度で検体溶液を 50  $\mu$ l を加え、1mg/ml のストック溶液とし、実験に使用した。送付された量が少ない時は適宜量を変えた。また、対照薬剤として 50  $\mu$ g/ml の AZT 溶液を使用した。スクリーニング薬剤の抗 HIV 活性の測定濃度は、1000-0.95  $\mu$  g/ml, 500-0.5  $\mu$  g/ml, 100-0.1  $\mu$  g/ml, 125-0.13  $\mu$  g/ml など指定あるいは送付された量から決めた。AZT は 50ng/ml から 0.05ng/ml まで測定した。

**細胞障害抑制試験**

スクリーニングは抗 HIV 物質の細胞毒性と抗 HIV 活性を測定する 2 種類のプレートを用意した。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 加え RPMI1640 培地で所定の濃度に希釈した試料溶液 200  $\mu$ l を加えた。残りの穴には培地を 100  $\mu$ l ずつ入れ、左端の穴から 8 連ピペットで 100  $\mu$  l で 2 倍段階希釈を 11 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した。検査薬剤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列を使用した。検査薬剤を希釈したプレートに1プレート当たり $2 \times 10^6$ の対数増殖期にあるMT-4細胞を遠心分離により集め、細胞毒性測定用のプレートには培地10mlで再浮遊し100 $\mu$ lずつすべての穴に加えた。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100TCID<sub>50</sub>となるようにHIV(HLV-III<sub>B</sub>)のストック溶液を加え、37℃1時間感染させた後、培地10mlで再浮遊し抗HIV活性測定プレートのすべての穴に100 $\mu$ l加えた。培養5日目に顕微鏡によりHIVによる細胞変性効果(CPE)と細胞毒性を観察した。また有効性の確認されたサンプルについてはMolt4細胞による巨細胞抑制試験を行った。測定濃度は、最大有効濃度から5倍段階希釈により実施した。

#### D. 結果

表に示すように30サンプルのうち13サンプルが抗HIV活性を示した。なお、対照薬剤として使用したAZTのIC<sub>50</sub>は1.5ng/mlであった。

サンプルNo.	有効濃度( $\mu$ g/ml)	
	細胞障害抑制試験	巨細胞抑制試験
201	$\geq 1,000-1.9$	$\geq 1,000-200$
203	$\geq 1,000-7.5$	$\geq 1,000-200$
204	$\geq 1,000-3.8$	$\geq 1,000-200$
205	$\geq 1,000-1.9$	$\geq 1,000-40$
206	$\geq 1,000-3.8$	$\geq 1,000-200$
207	$\geq 1,000-7.5$	$\geq 1,000-200$
208	$\geq 500-1.9$	$\geq 500-20$
209	$\geq 1,000-62.5$	抑制せず
212	$\geq 1,000-500$	抑制せず
213	$\geq 1,000-1.9$	$\geq 1,000-8$
215	$\geq 1,000-1.9$	$\geq 1,000-8$
216	$\geq 1,000-1.9$	$\geq 1,000-8$
217	$\geq 1,000-1.9$	$\geq 1,000-8$

#### E. 考案

表に示すように今年度の分担の30検体のうち13検体が有効な物質であった。これらの抗体は細胞障害抑制試験、巨細胞抑制試験とともに、同研究班でおこなうマクロファージ好性ウイルスの増殖抑制を調べるMagic5アッセイでも同様の結果を得た。詳細は省略する。今回、約1/3の検体に陽性を認めた。検体の詳細は不明である。

#### 研究2

HeLa細胞株2種類とレポーター遺伝子を用いたHIV細胞融合法の作成

##### A. 緒言

抗HIV薬のスクリーニングとして、従来この研究班では、細胞障害性抑制試験、および巨細胞抑制試験を行ってきた。さらに近年Magic5アッセイを加えた。これらの試験はHIV感染のすべての過程を視野にいれており簡単に調べるために有効な方法である。しかし生ウイルスを用いるため、研究に必ずしも有利ではない。そのため、新しい方法を考える必要がある。

##### B. 目的

我々は、CD4遺伝子を組み込んだHeLa細胞(HeLa T4)、あるいはHIV gp160遺伝子を組み込んだ細胞(HeLa KS386)を用い巨細胞形成を見る方法を開発した。硫酸化多糖体などの侵入過程を阻害する物質は、その巨細胞形成を抑制した。この方法は、生ウイルスを使用しないために比較的実験しやすい方法である。しかし、顕微鏡下での巨細胞形成観察法は定量性にかけていた。ここでは、HeLa2種類の細胞にレポーター遺伝子を導入し、巨細胞が形成されるとルシフェラーゼ活性が上昇系を開発した。

### C. 方法

ルシフェラーゼ遺伝子と T7 プロモーター (pT7EMCluc) をもつ HeLaT4 細胞と、T7 ポリメラーゼと CAG プロモーター (pCAGT7pol) を持つ HeLa KS386 細胞を用いた。陽性対照として HeLaT4-pCAGluc、HeLaKS386-pCAGluc を実験時に作成した。ルシフェラーゼ活性系の試薬を用いて反応させ、ルミノメーターで測定した。また、抗 CD4 モノクローナル抗体、抗 CXCR4 モノクローナル抗体、抗 CCR5 抗体を 2 細胞の融合時に添加することでルシフェラーゼ活性の変化を見た。

### D. 結果

HeLaT4-pT7EMCluc 細胞と種々の比で HeLaKS386-pCAGT7pol 細胞を混ぜることによりルシフェラーゼ活性が 100-300 倍上昇した。陽性対照の HeLaT4-pCAGluc、HeLaKS386-pCAGluc 細胞ではより上昇した。抗 CD4 モノクローナル抗体、抗 CXCR4 モノクローナル抗体を添加すると活性が抑制されたが、抗 CCR5 抗体では活性は抑制されなかった。

### E. 考案

この擬似感染モデル系を用いることにより、HIV の細胞融合を定量化できた。この結果は T 細胞好性ウイルスが CXCR4 と CD4 をレセプターとすることを明らかにした。また、これらの抗体以外に細胞に侵入する過程の阻害物質を調べることに用いることがわかった。

### 文献

#### 1. 学会発表

- 1) 鈴木映子、牛島廣治他:新しい HIV-1 fusion assay 系の有用性に関する研究:多核巨細胞の定量と再現性. 日本ウイルス学会 2002 札幌
- 2) 岩坂正和、牛島廣治他:擬似微小重力磁場がウイルス感染モデル細胞系に与える影響. 日本ウイルス学会 2002 札幌
- 3) 鈴木映子、牛島廣治他:Cell fusion モデルを用いた HIV 候補薬の評価. 抗ウイルス学会 2002 千葉
- 4) 林京子、牛島廣治:細胞融合系を用いた HIV の吸着・侵入阻害効果の評価 日本薬学会 2003 長崎

#### 2. 発表論文

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

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス研究事業）  
分担研究報告書

エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究

分担研究者 小野 哲郎 大分県衛生環境研究センター専門研究員

エイズ医薬品候補物質 25 サンプルについて、MT-4 細胞のHIV-1 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を用いたスクリーニング検査を実施した。その結果、25 サンプルの全てに抗HIV活性は認められなかった。

A. 研究目的

エイズ治療薬の開発を目的として、平成14年度に依頼されたサンプルについて抗HIV作用の有無とその有効性を検討した。

B. 研究方法

提供された薬剤サンプルを希望測定濃度に溶解後、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（5日間観察法）を使用した。

試験は間隔をおいて2回実施した。

C. 研究結果

エイズ医薬品候補物質002151～002175までの合計25サンプルにおいて、抗HIV活性を示す薬剤は認められなかった。

D. 考察

今回、5日間観察法によるスクリーニング検査を実施したが、抗HIV活性を示す有効な薬剤は認められなかった。また、Magic-5細胞を用いた抗HIV活性試験法も実施したが、抗HIV活性を示す有効な薬剤は認められなかった。

E. 結論

平成14年度、25サンプルについてスクリーニング検査を実施したが、抗HIV活性を示す薬剤は認められなかった。

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス研究事業）  
分担研究報告書

エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究

分担研究者 加藤 元博（福岡県保健環境研究所）

研究要旨

民間企業・大学等から、抗 HIV 活性のスクリーニング試験の依頼があった 24 件のサンプルについて、MT-4 細胞を用いたスクリーニング試験を行った。その結果、今回試験を行ったサンプルには、抗 HIV 活性は認められなかった。

A. 研究目的

エイズの治療薬としては、すでに数種類の医薬品が実用化されているが、未だ決定的に有効な医薬品はない。そこで、抗 HIV 作用を有する可能性がある物質を広く求め、それらの物質の抗 HIV 作用の有無をスクリーニング試験で明らかにし、抗 HIV 作用を有するものについてはその作用機序を探り、エイズの治療に使用できる医薬品の開発を目的とする。

B. 研究方法

サンプルは、企業・大学等からヒューマンサイエンス振興財団を通じて試験依頼のあった 25 件（検体番号、002-026～050）であったが、1 件（002-030）は秤量不能であったために、試験を行えなかった。サンプルは DMSO で溶解し、蒸留水で 400 または 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に希釈したものを試験に供した。スクリーニング試験は、検体をさらに培養液（FCS 10% + RPMI1640）で 2 段階希釈し、あらかじめ HIV-1 を感染させた MT-4 細胞を加えるマイクロプレート法で実施し、5 日目の顕微鏡観察により細胞毒性と HIV-1 による細胞変性効果を観察した。その結果、細胞毒性が見られず、細胞変性効果を抑制したものを抗 HIV 活性があるものと判定した。試験は、各検体を 100-0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、または 50-0.025  $\mu\text{g}/\text{ml}$  まで 2 段階希釈したのについて行った。なお、AZT を抗 HIV 活

性の陽性コントロールとして、同時に試験を行った。

C. 研究結果

今回試験を行った 24 件のサンプルでは、MT-4 細胞に対しての最小毒性濃度は 12.5-50.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を示したが、それ以下の濃度において HIV-1 による細胞変性効果を抑制したものは無かった。

D. 考察及び結論

今回試験を行った 24 件のサンプルには、抗 HIV 活性を示すものは、見られなかった。

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス研究事業）  
分担研究報告書

エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究

分担研究者 秋吉 京子・須賀 知子（神戸市環境保健研究所）

研究要旨

医薬品関連企業から提出されたエイズ医薬品候補物質 25 サンプル(コード番号 00216~00250)の抗 HIV 活性を試験した。MT-4 細胞を使用し、HIV 感染による細胞障害性の抑制を指標にした。今年度担当した、25 サンプル(コード番号 002126~002150)すべてにおいて抗 HIV 抑制が認められた物質はなかった。

A. 研究目的

HIV-1 感染症の治療薬は 1980 年代後半の AZT などの逆転写酵素阻害剤による治療から、現在は HAART と称した逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤の数剤を併用する多剤療法に変わってきた。この療法により、先進諸国における AIDS 死亡率は大きく低下したが、薬剤耐性ウイルスの出現や副作用は大きな問題として残っている。現在、わが国では 15 種類の抗 HIV 薬が実用化されている。しかしながら、類似の薬剤間で交叉耐性が存在するため、薬剤の選択肢は多くない。したがって、現在求められていることは、新しい作用メカニズムを持つ抗 HIV 薬を早急に開発することである。国内の医薬品メーカーの新薬開発技術は優れており、その中に、抗 HIV 作用のあるものが含まれている可能性がある。本研究では新たな抗 HIV 薬の開発のために、国内の企業および大学から提供されたサンプルの抗 HIV 作用をスクリーニングすることを目的としている。

B. 研究方法

国立医薬品食品衛生研究所より送付されたエイズ医薬品候補物質 25 サンプル(コード番号 002126~002150)

について、下記の方法で抗 HIV 活性のスクリーニングを実施した後、細胞毒性を示した最小濃度の 2 倍濃度に調整し、MAGIC5 のアッセイ用に愛知県衛生研究所の森下高行分担研究者のもとへ送付した。

・MT-4 細胞を用いたスクリーニングテスト

ヒト T 細胞性白血病ウイルス I 型に持続感染している T-細胞株である MT-4 細胞に、ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) を 0.001TCID<sub>50</sub>/cell の割合で 1 時間感染させた後、96 穴の平底培養プレート上にて 2 倍希釈した薬剤を含む 10% 牛胎児血清 (FCS) 含有 RPMI-1640 培地に  $1.5 \times 10^5$  cells/ml の濃度で浮遊させ、1 well あたり 200  $\mu$ l 量で培養した。培養 5 日目に顕微鏡により HIV-1 増殖による細胞変性効果 (CPE) および細胞毒性 (観察した) の溶解方法)

送付された被検物質は量が少ない上、静電気により容器内部壁面全体に付着しており容器から取り出して、秤量することは困難と考えられた。依頼者からの試験での希望する使用溶媒は DMSO であった。よって、DMSO 100  $\mu$ l を容器に直接添加し溶解後、DMSO の毒性が見られない濃度まで 10% FCS

含有 RPMI 培地で希釈し試験に供した。また提出サンプル量が 1~2mg と正確な量でなかったため、容器内サンプル量が 1mg だと仮定して濃度の計算をおこなった。初濃度は 50 $\mu$ g/ml から実施した。毒性の強かった物質についてはさらに培地で希釈をおこない再試験を実施した。毒性が強かつ不溶物の多い物質については、培地での再希釈をすると共に元物質の DMSO 溶解物をさらに DMSO で 10 倍希釈した後、10%FCS 含有 RPMI 培地で希釈をしておし、再試験を実施した。

(手順)

- 1) 96 穴平底培養プレート上で、10% FCS 含有 RPMI 培地にて薬剤の倍々希釈をおこなった。抗 HIV 活性を持つ陽性対照物質として AZT を用いた。各サンプルは 12 段階の希釈を行った。感染細胞添加用の薬剤希釈列と薬剤の毒性を調べるための非感染細胞添加用の薬剤希釈列を作成した。それぞれの希釈は duplicate で行った。
- 2) 対数増殖期にある MT-4 細胞の生細胞数をカウントし、プレート 1 枚あたり  $3 \times 10^6$  個の細胞を遠心分離により集め、ごく少量の血清無添加 RPMI 培地に懸濁した。これに 0.001TCID<sub>50</sub>/cell 量の HIV-1 を加え、37°C のインキュベーターで 1 時間感染させた。時々攪拌し、細胞へのウイルス感染を促した。
- 3) ウイルス感染済み MT-4 細胞にプレート 1 枚あたり 10ml の 10%FCS 含有 RPMI-1640 培地を加え、薬剤希釈後の感染細胞用希釈列にウエルあたり 100 $\mu$ l ずつ添加した。非感染細胞用の薬剤希釈列には同数 ( $3 \times 10^6$  個/plate) の非感染 MT-4 細胞にプレートあたり 10ml の 10%FCS 添加 RPMI-1640 培地を加えウエルあたり 100 $\mu$ l ずつ添加した。プレートをミキサーで攪拌し、37°C、5%CO<sub>2</sub> ガス存在下にて培養を

行った。

4) 5 日目に顕微鏡下にて細胞毒性と HIV による CPE を観察した。

(倫理面への配慮)

本研究に関して特に倫理面での問題は無い。

### C. 研究結果および考察

国立医薬品食品衛生研究所より送付された薬剤 25 サンプル (コード番号 002126~002150) すべてにおいて、抗 HIV 抑制は認められなかった。

最初の希釈濃度 (50 $\mu$ g/ml) においてエイズ医薬品候補物質 25 サンプル (コード番号 002126~002150) のうち 002128、002131、002146、002147、002148 以外の物質はすべて細胞毒性を示した。毒性が強かつ不溶物が多かった物質は 002130、002132、002143、002144、002145 の 5 物質であった。これら 5 物質については、DMSO 100 $\mu$ l に溶解した元のサンプルをさらに DMSO で 10 倍希釈することによって DMSO での溶解を促し、さらに 10%FCS 含有 RPMI 培地で希釈をしておいた。初回希釈の DMSO 量の 10 倍量で再希釈し直した結果と、初回溶解 DMSO のものから培地での再希釈を行ったものと毒性濃度および抗 HIV 抑制結果において差異はなかった。

最終的に 25 物質のサンプル瓶に添加した DMSO の量、および、測定濃度と細胞毒性を示した最小濃度、試験結果を表に示す。

陽性対照である AZT の CPE 抑制濃度は 0.08 $\mu$ M (0.021 $\mu$ g/ml) であった。

### D. 結論

今回、提供された 25 薬剤の中で抗 HIV 作用を持つものはなかった。

表

コード No.	測定濃度範囲 μg/ml	細胞毒性を示した 最小濃度μg/ml	サンプル瓶に添 加した DMSO の量 μl	抗 HIV 抑制
002126	50 <sup>-</sup> 0.02	12.5	100	-
002127	50 <sup>-</sup> 0.002	0.63	100	-
002128	50 <sup>-</sup> 0.02		100	-
002129	50 <sup>-</sup> 0.002	0.08	100	-
002130	50 <sup>-</sup> 0.002	0.02	1000	-
002131	50 <sup>-</sup> 0.02		100	-
002132	50 <sup>-</sup> 0.002	0.04	1000	-
002133	50 <sup>-</sup> 0.002	0.02	100	-
002134	50 <sup>-</sup> 0.02	50	100	-
002135	50 <sup>-</sup> 0.002	0.16	100	-
002136	50 <sup>-</sup> 0.002	0.16	100	-
002137	50 <sup>-</sup> 0.002	0.04	100	-
002138	50 <sup>-</sup> 0.002	0.63	100	-
002139	50 <sup>-</sup> 0.002	0.02	100	-
002140	50 <sup>-</sup> 0.02	25	100	-
002141	50 <sup>-</sup> 0.02	12.5	100	-
002142	50 <sup>-</sup> 0.02	50	100	-
002143	50 <sup>-</sup> 0.002	0.08	1000	-
002144	50 <sup>-</sup> 0.002	1.25	1000	-
002145	50 <sup>-</sup> 0.002	0.63	1000	-
002146	50 <sup>-</sup> 0.02		100	-
002147	50 <sup>-</sup> 0.02		100	-
002148	50 <sup>-</sup> 0.02		100	-
002149	50 <sup>-</sup> 0.002	1.25	100	-
002150	50 <sup>-</sup> 0.02	12.5	100	-

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス研究事業）  
分担研究報告書

エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究  
(MAGIC-5A 細胞を用いた抗 HIV 活性スクリーニング試験)

分担研究者 大竹 徹（大阪府立公衆衛生研究所病理課）  
研究協力者 森 治代 川畑拓也（同上）

研究概要

企業および大学より提供されたサンプル105件についてマクロファージ好性ウイルスの MAGIC-5A 細胞における抗ウイルス活性についてスクリーニング試験を行った。その結果、11 検体に強い抗 HIV 活性が認められ、4 件体に弱い抗 HIV 活性が認められた。強い活性が示された検体のうち 10 検体(50%抑制濃度が 0.72, 9.018 $\mu$ g/ml)は多糖類であり細胞毒性も低く選択係数は25以上を示した。残りの1検体は IC50 が 0.18 $\mu$ g/ml と、最も強い活性を示したが、細胞毒性も強く選択係数は5であった。

目的

新たな作用メカニズムを持つ抗 HIV 剤の出現が待たれている現状において、ウイルスの細胞への侵入過程を阻害する薬剤の開発は重要なターゲットのひとつとなっている。これらの薬剤を見い出すためには 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も検討する必要がある。今回マクロファージ好性ウイルスの増殖を簡便に捉えることができる MAGIC-5A 細胞を用いた抗 HIV 活性スクリーニング試験を行った。

方法

ウエルあたり 10,000 個の MAGIC5A 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した。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）した薬剤液を加えた。その後 HIV-1 Ba-L 株を 100, 200BFU/50 $\mu$ l にな

るように DEAE-dextran 添加培養液で調整し加えた。37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーターで 48 時間培養した。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 MgCl<sub>2</sub> and 400  $\mu$ 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した。抗 HIV 活性陽性検体として TAK-779 および AZT を用いた。

結果

今回、105 検体についてマクロファージ好性 HIV-1 株の MAGIC-5A 細胞での増殖抑制活性の有無を調べたが、15 検体に抗ウイルス活性を認めた（表 1）。そのうち 11 検体は抑制濃度 8, 40 $\mu$ g/ml、50%抑制濃度 (IC<sub>50</sub>) 値 0.18, 9.0 $\mu$ g/ml と強

い抗ウイルス活性を示した。また、4 検体は抑制濃度がいずれも 1,000 $\mu$ g/ml と弱い抗ウイルス活性を示した。強い活性を認めた 11 検体のうち 1 検体(No.2180)を除く 10 検体は MAGIC-5 細胞への毒性も弱く、いずれも薬剤濃度 1,000  $\mu$ g/ml で毒性を示されず、選択計数 (SI) は 25 ~125 以上を示した。

IC50 値が 0.18 $\mu$ g/ml と、最も強く強い活性をしめした No.2180 は細胞への毒性が強く 2 $\mu$ g/ml 濃度にて毒性が示され、SI は 5 に止まった。

### 考察

今回のスクリーニング研究にてマクロファージ好性ウイルスの増殖を抑制した検体が 15 件みられた。そのうち 11 件は強い活性が認められた。No.2180 を除く検体は多糖類とされるが、それらは特に細胞への毒性が低く SI は 25. 125 以上を示し、エイズ薬の候補物質となる可能性が示された。最も強い活性を示した No.2180 は細胞毒性が比較的強く SI は 5 に止まった。またこの検体は T 細胞好性ウイルスを用いたスクリーニング試験で抗ウイルス活性を示さなかったことから、マクロファージ好性ウイルスにのみ活性を示す薬剤である可能性が示されたが、さらなる詳細な検討が必要である。

### 発表論文

1. Komoto S, Kinomoto M, Ibrahim M S, Zhong Q, Auwanit W, Ayuthaya P I N, Otake T, Mori H, Oishi I, Kurosu T, Takahashi H, Mukai T, Ikuta K, Low or no antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 Nef in infected carriers with subtype E, in contrast to sbtype B that showed antibodies preferentially recognizing subtype-specific Nef

epitopes, Vaccine, 19, 3019-3032, 2001

2. Ohyama M, Otake T, Morinaga K, Effect of size of man-made and natural mineral fibers on chemiluminescent response in human monocyte-derived macrophages, Environmental Health Perspectives, 109, 1033-1038, 2001
3. 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
4. Horikoshi H, Kinomoto M, Kurosu T, Komoto S, Shiraga M, Otake T, Mukai T, Ikuta K, Resting CD4+ T cells with CD38+CD62L+ produce interleukin-4 which contributes to enhanced replication of T-tropic human immunodeficiency virus type 1, Virology, 293, 94-102, 2002
5. El-Mekkawy S, Meselhy M R, Abdel-Hafez A A M, Nakamura N, Hattori M, Kawahata T, Otake T, Inhibition of cytopathic effect of human immunodeficiency virus type-1 by various phorbol derivatives, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 50, 523-529, 2002
6. Komoto S, Kinomoto M, Horikoshi H, Shiraga M, Kurosu T, Mukai T, Auwanit W, Otake T, Oishi I, Ikuta K, Ability to induce p53 and caspase-mediated apoptosis in primary CD4+ T cells is variable among primary isolates of human immunodeficiency virus type 1, AIDS Research and Human Retroviruses, 18,

435-446, 2002  
 7. Ma C, Nakamura N, Miyashiro H, Hattori M, Komatsu K, Kawahata T, Otake T, Screening of Chinese and Mongolian herbal drugs for anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) activity, *Phytotherapy Research*, 16, 186-189, 2002

8. Ma C, Nakamura N, Hattori M, Kawahata T, Otake T, Inhibition effects of triterpene-azidothymidine conjugates on proliferation of human immunodeficiency virus type 1 and its protease, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50, 877-550, 2002

表1 抗HIV活性が見られた検体

検体番号	阻止濃度	50%阻止濃度 (IC50)	細胞毒性	選択係数 (SI)
2180	0.4	0.18	2	5
2201	8	1.1	>1,000	>125
2203	40	4.1	>1,000	>25
2204	8	2.7	>1,000	>125
2205	40	1.1	>1,000	>25
2206	40	3.4	>1,000	>25
2207	40	4.4	>1,000	>25
2208	40	9.0	>1,000	>25
2209	1,000	-	>1,000	>1
2212	40	3.6	>1,000	>25
2213	8	0.72	>1,000	>125
2214	1,000	-	>1,000	>1
2215	1,000	-	>1,000	>1
2216	1,000	-	>1,000	>1
2217	8	1.6	>1,000	>125
TAK-779	-	0.023	-	-
AZT	-	0.0027	-	-

単位は $\mu\text{g/ml}$