

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 前田知穂 京都府保健環境研究所

研究要旨

MT-4 細胞を使い、供試薬剤 25 検体について抗 HIV 活性の有無を測定した。今年度、京都府実施分については、抗 HIV 活性が認められた薬剤はなかった。

A. 研究目的

本研究の主要な目的は、参加企業・大学等から提供される合成化学物質や天然物について、産官学共同研究班で、エイズウイルス増殖抑制を指標にして、スクリーニング研究を行う。

B. 研究方法

エイズ医薬品候補物質について、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、抗 HIV 第一次スクリーニング研究を行う。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。

（倫理面への配慮）

本研究に関して、現段階では特に倫理面での問題はない。

C. 研究結果

供試薬剤 25 検体について抗 HIV 活性の有無を測定した。今年度、京都府実施分については、抗 HIV 活性が認められた薬剤はなかった。

D. 考察

MAGIC5 細胞による方法（愛知衛研実施）においても抗 HIV 活性が認められなかったことから、京都府実施分における供試薬剤については、抗 HIV 活性はなかったものと考えられた。

E. 結論

京都府実施分における供試薬剤については、抗 HIV 活性はなかった。

F. 健康危険情報

本研究に関して、現段階ではない。

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

本研究に関して、現段階ではない。

2. 実用新案登録

本研究に関して、現段階ではない。

3. その他

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
(MAGIC5A 細胞を用いた薬剤のスクリーニング試験)

班員研究者 鈴木康元、(愛知県衛生研究所)
研究協力者 森下高行、佐藤克彦 (愛知県衛生研究所)

研究概要

Tトロピック HIV-1 ウイルスを用いた MT-4 細胞による抗 HIV 活性のスクリーニングが終了した検体 175 検体について、MAGIC5A 細胞と M トロピック HIV-1 ウイルスを用い、CCR5 に対する抑制活性をスクリーニングした。スクリーニングの結果、すべて CCR5 に対し抑制活性を示さなかった。

1、研究目的

Tトロピック HIV-1 ウイルスを用いた MT-4 細胞による抗 HIV 活性のスクリーニングが終了した検体 175 検体について、MAGIC5A 細胞と M トロピック HIV-1 ウイルスを用い、CCR5 に対する抑制活性をスクリーニングした。

2、研究方法

実験当日の朝、MAGIC5 細胞を 1×10^5 cells/ml の濃度で 2.5%FCS 添加 DMEM に浮遊し $100 \mu\text{l}$ ずつ 96 穴平底プレートに分注した。5 から 6 時間培養後、細胞が平底プレートにしっかりと張り付いていることを確認し、培養上清を取り除いた。薬剤を MT-4 細胞によるスクリーニングの結果、細胞毒性がないと思われる最大濃度とその 5 倍希釈した 2 点の濃度に培養液を用いて希釈し（薬剤濃度については別紙に記載）、各穴に $50 \mu\text{l}$ ずつ加えた。HIV-1 Ba-L 株を 100~200BFU/ $50 \mu\text{l}$ になるように $40 \mu\text{l}/\text{ml}$ DEAE-dextran(最終濃度 $20 \mu\text{l}/\text{ml}$) 添加培養液で調整し、薬剤添加プレートに $50 \mu\text{l}$ 加え、 37°C の CO_2 インキュベーターで 48 時間培養した。培養液を取り除いた後、1% formaldehyde

and 0.2%glutaraldehyde を用い固定した後、X-gal で染色し、顕微鏡観察により薬剤の IC_{50} を求めた。また、抗ウイルス活性の陽性対照として TAK779 および AZT を使用した。

3、研究成果

残念ながら、今年度スクリーニングした 175 検体はスクリーニングの結果、すべて CCR5 に対し抑制活性を示さなかった。なお、対照薬剤として使用した TAK779 および AZT の IC_{50} はそれぞれ $0.08 \mu\text{M}$ と $0.006 \mu\text{M}$ であった。

学会発表

1. Gag p6 遺伝子に検出された挿入変異の意義

伊部史朗、森下高行、佐藤克彦、内海眞、金田次弘

第 16 回日本エイズ学会(名古屋)

2. 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

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

第 16 回日本エイズ学会(名古屋)

3. 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

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

第 16 回日本エイズ学会(名古屋)

4. 高感度リアルタイム PCR による HIV-1 DNA 定量法の検討

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

第 16 回日本エイズ学会(名古屋)

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 関根 大正 東京都立衛生研究所
研究協力者 村田以和夫 東京都立衛生研究所 微生物部ウイルス研究科
貞升 健志 東京都立衛生研究所 微生物部ウイルス研究科

研究要旨

配られた25件のエイズ医薬品候補物質についてマイクロプレート法を用いて抗エイズウイルス活性をスクリーニングした。その結果、23件の候補物質においてはウイルスの細胞障害効果または薬剤の細胞毒性が認められた。2件の候補物質(002193,002198)においては配られたサンプル量から試験に用いることのできた最高濃度の250 $\mu\text{g/ml}$ でウイルスによる細胞障害効果が認められた。したがって、試験を行った25件の候補物質のいずれにも抗エイズウイルス活性は確認されなかった。

A. 研究目的

エイズの病原体であるエイズウイルスに対してはいくつかの薬剤が開発されているが、副作用、薬剤耐性株の出現などの問題もあり、さらに使用しやすい薬剤が求められている。この研究の目的はマイクロプレート法を用いて、様々な抗エイズウイルス作用物質をスクリーニングして、抗エイズウイルス活性物質を見出し、抗エイズウイルス薬の開発に役立てることである。

B. 研究方法

25件のエイズ医薬品候補物質に対し抗エイズウイルス活性のスクリーニング試験を行った。MT-4細胞にエイズウイルス株 HTLV-III 株を感染させ、薬剤を2倍階段希釈した培養液の中で培養し、3日後、6日後に観察した。対照として薬剤もウイルスも加えない MT-4 細胞ならび

に薬剤非存在下でエイズウイルスを感染させた MT-4 細胞と比較し、ウイルスによる細胞障害効果の程度および薬剤による細胞増殖の抑制と細胞死から抗エイズウイルス活性を評価した。判定は6日後の結果で行った。

（倫理面への配慮）

本研究では細胞株及びウイルス株を用いヒト由来材料を用いない。したがって、検体採取や研究対象をめぐる倫理上の問題は生ずることはない。

C. 研究結果

試験を行った25件のうち23件の候補物質では試験したいずれの薬剤濃度においても、ウイルスによる細胞障害効果か薬剤による増殖抑制のいずれかが認められた。2件の候補物質(002193,002198)では試験に用いることのできた薬剤の最高濃度(250 $\mu\text{g/ml}$)でウイルスによる細

胞障害効果が認められたが薬剤による毒性は認められなかった。

D. 考察

23件の候補物質については我々の用いた実験方法では抗エイズウイルス活性は確認されない。2件については用いることのできた最高濃度の250 μ g/mlで薬剤による毒性は認められなかった。より高濃度で試験すればウイルスによる細胞障害効果を抑制する可能性は有り得ないわけではないが、細胞障害効果の見られた250 μ g/mlはかなり高い濃度ではある。

E. 結論

実施したスクリーニング試験において25件の候補物質のいずれにも明らかな抗エイズウイルス活性は確認されなかった。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

山口剛、関根大正他：東京都におけるHIV抗体検査へのHIV遺伝子検査導入の検討、日本感染症学会誌、投稿中。

2. 学会発表

貞升健志他：HIV-1抗体陽性者血清中の逆転写酵素遺伝子の解析、地方衛生研究所全国協議会、第17回関東甲信静ウイルス研究部会、2002

平成14年度抗HIV医薬品候補物質スクリーニング試験結果

検体	CPEが観察された	薬剤の細胞毒性による増殖抑制
002176	12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以下	25 $\mu\text{g/ml}$ 以上
002177	0.78 $\mu\text{g/ml}$ 以下	1.56 $\mu\text{g/ml}$ 以上
002178	7.81 $\mu\text{g/ml}$ 以下	15.6 $\mu\text{g/ml}$ 以上
002179	3.13 $\mu\text{g/ml}$ 以下	6.25 $\mu\text{g/ml}$ 以上
002180	0.2 $\mu\text{g/ml}$ 以下	0.39 $\mu\text{g/ml}$ 以上
002181	0.2 $\mu\text{g/ml}$ 以下	0.39 $\mu\text{g/ml}$ 以上
002182	12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以下	25 $\mu\text{g/ml}$ 以上
002183	0.2 $\mu\text{g/ml}$ 以下	0.39 $\mu\text{g/ml}$ 以上
002184	1.56 $\mu\text{g/ml}$ 以下	3.13 $\mu\text{g/ml}$ 以上
002185	0.78 $\mu\text{g/ml}$ 以下	1.56 $\mu\text{g/ml}$ 以上
002186	0.78 $\mu\text{g/ml}$ 以下	1.56 $\mu\text{g/ml}$ 以上
002187	12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以下	25 $\mu\text{g/ml}$ 以上
002188	6.25 $\mu\text{g/ml}$ 以下	12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上
002189	3.13 $\mu\text{g/ml}$ 以下	6.25 $\mu\text{g/ml}$ 以上
002190	1.56 $\mu\text{g/ml}$ 以下	3.13 $\mu\text{g/ml}$ 以上
002191	0.1 $\mu\text{g/ml}$ 以下	0.2 $\mu\text{g/ml}$ 以上
002192	12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以下	25 $\mu\text{g/ml}$ 以上
002193	250 $\mu\text{g/ml}$ 以下	実施濃度ではなし
002194	62.5 $\mu\text{g/ml}$ 以下	125 $\mu\text{g/ml}$ 以上
002195	125 $\mu\text{g/ml}$ 以下	250 $\mu\text{g/ml}$ 以上
002196	12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以下	25 $\mu\text{g/ml}$ 以上
002197	125 $\mu\text{g/ml}$ 以下	250 $\mu\text{g/ml}$ 以上
002198	250 $\mu\text{g/ml}$ 以下	実施濃度ではなし
002199	31.3 $\mu\text{g/ml}$ 以下	62.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上
0021200	0.78 $\mu\text{g/ml}$ 以下	1.56 $\mu\text{g/ml}$ 以上

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 野口有三 横浜市衛生研究所 検査研究課担当係長

要旨

平成14年度の抗HIV増殖抑制候補医薬品25検体について、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検体全てに有効な抗HIV増殖抑制候補医薬品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増殖抑制候補医薬品の有無とその有効性を検討した。

B. 研究方法

スクリーニングは、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使用した（エイズ医薬品候補スクリーニング研究，I. 1988年度報告，衛生試報，108，128～131，1990）。なお，当衛研担当の25検体のMAGIC 5 Assayについては，大阪府立公衆衛生研究所において実施された。

C. 研究成果

本年度，当衛生研究所の担当分25検体（NO.002051～002075）について，スクリーニング検査を実施した。その結果，第1回目のスクリーニング検査で行った試験薬剤濃度（50～0.05 $\mu\text{g/ml}$ ）の範囲内では，HIV増殖抑制に有効な薬剤は全て認められなかった。しかし，サンプルNO.2061，NO.2067，NO.2070，NO.2074の4検体に関しては，細胞毒性が強いため，薬剤の有効性が確認できなかった。そのために再度試験薬剤濃度（3.13～0.002 $\mu\text{g/ml}$ ）の範囲内で試験したが，HIV増殖抑制に有効な薬剤は全て認められな

かった。なお，NO.2056，NO.2065，NO.2071の3検体に関しては，サンプル不足のために，細胞毒性が認められる濃度までは試験が実施できなかった。

また，NO.2053の検体は，感染初期の2日目までは，試験薬剤濃度（6.25～0.78 $\mu\text{g/ml}$ ）の範囲内で，抗HIV活性が認められたが，最終的には無効となってしまった。

D. 考察

従来と同様に「3日目継代6日目判定法」と昨年度からの「5日目観察法」の両試験法を試みてみたが，ほぼ同じ結果が得られた。細胞毒性に関しては「3日目継代法」の方がより明瞭に観察できると思われる。

E. 結論

本年度の25検体についてスクリーニング検査を実施した結果，HIV増殖抑制に有効な薬剤は全て認められなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

国立医薬品食品衛生研究所報告

2. 学会発表

未定

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

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

分担研究者 益川 邦彦 神奈川県衛生研究所長
齋藤 隆行 ウイルス部専門研究員

研究要旨

国立医薬品食品研究所から送付された25サンプルについて、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を用い、抗HIV活性を測定したが、その結果はすべて陰性であった。

A. 研究目的

参加企業から提供される合成化学物質や生薬抽出物等について、抗HIV活性のスクリーニングを実施し、エイズ医薬品として有望な物質を見出す。

B. 研究方法

国立医薬品食品衛生研究所から送付された25サンプルについて、抗HIV活性を測定した。概略は次のとおりである。

ヒトT細胞性白血病ウイルスI型（HTLV-1）に持続感染しているT細胞株であるMT-4細胞にHIV-1

（HTLV-III_B株）培養上清を0.001TCID₅₀/cellの割合で1時間感染させる。2倍段階希釈した薬剤を含むRPMI1640培養液（10%のウシ胎児血清および抗生物質を含む）に 1.5×10^5 cells/mlの濃度で浮遊させ、96穴の平底マイクロプレートにて200 μ /wellで培養する。培養開始後5日目に検鏡によりMT-4細胞のHIV-1感染による細胞変性効果（CPE）の有無および細胞の生育状態（細胞毒性）を観察し、抗HIV効果を判定した。

C. 研究結果

25サンプル（002079～002100）について、500 μ g/ml～0.25 μ g/mlの範囲で抗HIV活性を測定した。範囲内では強い細胞毒性を示すサンプルが多かったため、すべてのサンプルについて、10 μ g/ml～0.005 μ g/mlの範囲で再度抗HIV活性

を測定した。その結果、すべてのサンプルにおいて抗HIV活性は認められなかった。

D. 考察

1回目の濃度設定で判定できなかったものが3サンプルあった。その他にも、10 μ g/ml以下の濃度で細胞毒性を示すものが8サンプルあり、今年度の提供サンプルは細胞毒性の強いものが多く見受けられた。

E. 結論

国立医薬品食品研究所から送付された25サンプルについて、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を用い、抗HIV活性を測定したが、その結果はすべて陰性であった。

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 田村 正秀 北海道立衛生研究所長

研究要旨

平成 14 年度エイズ医薬品等開発研究の一端として、送付された 25 件の被検薬剤 001～025（コード番号 002001～002025）に対し抗 HIV 活性についてのスクリーニング試験を、細胞障害抑制試験により行なった。その結果、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の濃度で細胞毒性を示すことなく HIV による MT-4 細胞の障害を抑制するものはなかった。

A. 研究目的

本事業に参加している民間企業等から提供された、抗 HIV 活性の期待される検体についてスクリーニングを行い、その有効性を明らかにする。

B. 研究方法

平成 14 年度エイズ医薬品等開発研究の一端として、送付された 25 件の被検薬剤 001～025（コード番号 002001～002025）に対し抗 HIV 活性についてのスクリーニング試験を、細胞障害抑制試験により行なった。

細胞は株化された MT-4 細胞を、ウイルスは HIV-1, LAI 株を使用した。

MT-4 細胞を 0.001TCID₅₀/cell の割合でウイルス液に浮遊させ、37°C で 1 時間処理したものを感染細胞とした。これを、96 穴の平底培養プレートにて、被検薬剤を含む RPMI-1640 培養液（10% の牛胎児血清及び抗生物質を含む）に 1

ウエルあたり 200 μl 量で $1.5 \times 10^5/\text{ml}$ の濃度となるように浮遊させ、37°C で 5 日間培養した。被検薬剤は、試験時の濃度が 500～0.24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように細胞培養液であらかじめ 2 倍階段希釈して使用した。

HIV による細胞変性効果 (CPE) を培養最終日に鏡検によって観察し、被検薬剤による CPE の抑制効果について調べた。

C. 研究結果

500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の濃度で細胞毒性を示すことなく HIV による MT-4 細胞の障害を抑制するものはなかった。

D. 考察

5 日目の判定の結果、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度ではすべての被検薬剤において細胞毒性が認められたため 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の濃度による判定となった。25 件の薬剤のうち 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で CPE の抑制効果を示すものが 1 件 (015) 存在したが、

当濃度における細胞増殖は非感染細胞に比べ明らかに劣っており、また一段階低い 125 $\mu\text{g/ml}$ の濃度では CPE を抑制しなかった。従って、有効と判定するには至らなかった。

それ以外の被検薬剤については、250 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で細胞毒性を示すことなく CPE を抑制するものは存在しなかった。

このため、いずれの被検薬剤についても本法により有効性を認められないと判定した。

E. 結論

当所において試験を行った 25 件の被検薬剤の中には、500 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で HIV に対して増殖抑制効果を持つものは存在しなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

		課題番号	H13-創薬-006
		氏名	棚元憲一
刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、 巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
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. <i>J. Virol. Method.</i> 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, <i>Virology</i> , 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, <i>Chemical and Pharmaceutical Bulletin</i> , 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, <i>AIDS Research and Human Retroviruses</i> , 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, <i>Phytotherapy Research</i> , 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, <i>Chemical and Pharmaceutical Bulletin</i> , 50, 877-550, 2002			
7) Muroi M., Ohnishi T. & <u>Tanamoto K.</u> Lipopolysaccharide-mimetic activities of Toll-like-receptor 2-stimulatory substance(s) contained in <i>Escherichia coli</i> lipopolysaccharide preparations. <i>Infect.Immun.</i> Accepted for publication			
8) Ohnishi, T. Muroi M., & <u>Tanamoto K.</u> N-linked glycosylation critical to the Toll-like receptor 4 function require the presence of MD-2. <i>Clin, Diagn. Lab. Immunol.</i> In press			
9) Sakai A., Kikuchi Y., Muroi M., Masui T., Furuhashi C., Uchida E., Takatori K. & <u>Tanamoto K.</u> Overexpression of NP95 mRNA by tumor promoters in the promotion phase of a two-stage BALB/3T3 cell transformation assay. <i>Biol. Pharm. Bull.</i> 26(3), 347-351, 2003.			
10) Muroi M., Ohnishi T. & <u>Tanamoto K.</u> Regions of the mouse CD14 molecule required for Toll-like receptor 2- and 4-mediated activation of NF- κ B. <i>J. Biol. Chem.</i> 277 (44), 42372-42379, 2002			
11) Muroi M. & <u>Tanamoto K.</u> Polysaccharide regions is indispensable for Salmonella lipopolysaccharide to activate NF- κ B through human Toll-like receptor. <i>Infect.Immun.</i> 70(11), 6043-6047, 2002			
12) Muroi M., Ohnishi T. & <u>Tanamoto K.</u> MD-2, a novel accessory molecule, is involved in species-specific actions of <i>Salmonella</i> lipid A. <i>Infect.Immun.</i> 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 prionprotein expression in human glioblastoma cell line T98G. <i>Biol. Pharm. Bull.</i> 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. <i>J. Health Sci.</i> 48(3), 288-291, 2002			