

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

エイズおよび関連する新興・再興ウイルス感染症の
医薬品候補物質のスクリーニングと新薬開発に向けた研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 棚元憲一

平成16(2004)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

- エイズおよび関連する新興・再興ウイルス感染症の医薬品候補物質の
スクリーニングと新薬開発に向けた研究 1
棚元 憲一

II. 分担研究報告

1. エイズおよび関連する新興・再興ウイルス感染症の医薬品候補物質の
スクリーニングと新薬開発に向けた研究 14
牛島 廣治
2. エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究 20
小河 正雄
3. エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究 22
加藤 元博
4. エイズおよび関連する新興・再興ウイルス感染症の医薬品候補物質の
スクリーニングと新薬開発に向けた研究 23
秋吉 京子
5. MAGIC-5A 細胞を用いた抗 HIV 活性スクリーニング試験および
抗 HIV 作用メカニズムの検討 26
大竹 徹
6. エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究 30
石崎 徹
7. MAGIC5A 細胞を用いたスクリーニング試験と陽性サンプルの
HIV-1 薬剤耐性臨床分離ウイルスに対する抑制活性 32
鈴木 康元
8. エイズおよび関連する新興・再興ウイルス感染症の医薬品候補物質の
スクリーニングと新薬開発に向けた研究 36
関根 大正
9. HIV ウイルスを使用したエイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究 41
野口 有三
10. エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究 42
益川 邦彦
11. エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究 43
本間 寛

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 45

IV. 研究成果の刊行物・別冊 (別綴添付)

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

エイズおよび関連する新興・再興ウイルス感染症の医薬品候補物質の
スクリーニングと新薬開発に向けた研究

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部长

研究要旨：2企業、2大学及び3国公立研究所から寄せられた合計443サンプルについて抗HIV活性スクリーニングを行った結果、マイクロプレート法では15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においても15サンプルと、延べ30の物質に活性が認められた。また、昨年度の陽性サンプルについて作用機作を検討した結果、薬剤IIIは巨細胞形成抑制試験、感染阻害作用いずれも強い活性を示し、その作用としてはCD4に作用してウイルスと細胞との結合を阻害することにより抗ウイルス作用を示すこと、さらにT-トロピック、M-トロピック株の薬剤耐性臨床分離株に対して、野生株と同様の抗HIV活性が認められることがわかった。

分担研究者

本間 寛	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

等に比べ日本のエイズ患者は少ないものの、血液製剤の投与による感染や、近年では性交渉による感染の増加傾向も窺え、特に若年層における感染増加が深刻な社会問題となっている。以上のように決定的な薬剤がない現在、耐性ウイルスにも効果を示す、新しいメカニズムを有する新薬が切望されている。一方、新薬候補物質の探索のためのスクリーニングを行うには、それなりの施設、背景、合目的性が必要であることから、大企業はともかく、候補物質を多く持っている企業、大学は容易にシステムを持ってないのが現状であり、その意味で日本国内を見た場合、必ずしもエイズ医薬品候補物質探索が有効に機能しているとは思えない。本研究班は、そのような体制の不備のために見過ごされるかも知れない有望な物質を、幅広く拾い上げることを第一義的な目的として広範な未知物質の探索を行い、さらに薬剤の開発に向けた作用メカニズムや生理作用についても詳しい解析を行うことによって、総合的に創薬への道を開こう

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中で、多剤併用療法が延命効果を示し、死亡率の低下が報告されている。しかし、その効果発現には薬の継続投与が必要であり、それによる副作用、さらには耐性ウイルスの出現等の問題が起こってきている。米国やアフリカ

とするものである。

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) ヒューマンサイエンス財団が企業、大学研究所に対し、エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究への募集を募る。なお、平成 15 年度は、従来のヒューマンサイエンスを通してのサンプル募集に加え、一部、研究班独自のルート開発により募集を行った。応募サンプルは医薬品の特性、希望活性測定条件等を記して、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。
- (2) 国立医薬品食品衛生研究所に送付された化学物質等は通し番号をうち、製品名は伏せたまま各分担研究者に送付する。
- (3) 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。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。ウイルス取り扱い法とスクリーニングに関する技術的な問題は班会議において検討し、技術と実験方法の統一を計っている。

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 づつ入れ、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 2×10^6 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 づつ加えた。一方、抗 HIV 測定用のプレートには遠心分離により集めた 2×10^6 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°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 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 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 µg/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。

(4) 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。

(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し、活性物質、判定不能なサンプルを再検討し、班会議において最終判定を行う。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。

抗エイズウイルス活性物質の作用機構

1) ウイルスを用いない巨細胞形成抑制試験

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: 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。3 種類の薬剤を 100 µg/ml から 2 倍ずつ 12 段階希釈した培養液に、片方の細胞を 30 分間 incubate し、その後残りの細胞を加え、16 時間後に harvest する。ギムザ染色し、顕微鏡下で巨細胞の数を数える。

2) GFP 発現を指標とする HIV 感染検出

細胞による感染抑制試験

N4X4/GFP (CD4/CXCR4 を発現) に HIV-1IIB を、N4R5/GFP (CD4/CCR5 を発現) に HIV-BaL を感染させ 2 日後それぞれの系、それぞれの薬剤(4 種類) について蛍光顕微鏡下で観察し、IC₅₀ となる濃度を求めた。

3) 抗エイズウイルス活性物質の作用点の解析

CD4、CXCR4、CCR5 それぞれに対するモノクローナル抗体と細胞との反応時に薬剤を存在させ、抗体の結合量をフローサイトメーターにて測定した。HIV-1 のエンベロープ gp120 の V3 ループに対するモノクローナル抗体と HIV-1 持続感染細胞との反応時に薬剤を存在させ、抗体の結合量をフローサイトメーターにて測定した。HeLa 細胞に CD4 と HIV gp160 遺伝子を組み込んだ、ウイルスを用いない擬似感染モデルを用い、吸着阻害活性を調べた。HIV-1 と薬剤を 37°C 30 分間反応させた後、遠心により薬剤を除き、ウイルスの感染価を MT-4 細胞において測定した。

4) HIV-1 薬剤耐性臨床分離ウイルスに対する抑制活性の測定

薬剤耐性ウイルスは T-トロピック、M-トロピック 3 株ずつを用い、それぞれ MT4 細胞の細胞障害抑制、MAGIC-5 アッセイで抗 HIV 活性を測定した。

C. 研究結果

エイズ医薬品候補物質スクリーニング

2 企業、2 大学及び 3 国公立研究所から寄せられた合計 443 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15サンプルにおいて抗HIV活性が認められ、そのうち5サンプルは低い濃度まで細胞傷害を抑制していた。これらの陽性サンプルのうち4サンプルに、Molt-4細胞を用いた巨細胞形成抑制活性が認められたが、その抑制強度に相関は認められなかった。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、14検体に抗ウイルス活性を認めた。そのうち2検体(No.3019, 3029)は抑制濃度10.1~50.5 μ g/mLおよび13.~65.5 μ g/mLと比較的強い抗ウイルス活性を示したが、毒性濃度との差は大きくなく、選択係数(SI)は5であった。また、残りの12検体は抑制濃度が40~200 μ g/mLと弱い抗ウイルス活性を示した。MT-4細胞によるスクリーニングの結果、14検体ともにすべて抑制活性を示さなかったことより、これらの抑制効果はCCR5に対するものと推測された。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 μ Mと0.006 μ Mであった。なお、強い活性を示した3439-3443についてはMAGIC-5アッセイを行っていない。

抗エイズウイルス活性物質の作用機構

昨年のスクリーニング試験において強い抗ウイルス作用を示した4検体(I, II, III, IV)についてその作用メカニズムの検討を行った。

1) ウイルスを用いない巨細胞形成抑制試験：段階希釈した薬剤とHeLa/KS386を先に作用させた場合を表2、HeLa/T4を先に作用させた場合を表3に示した。IIIはI、IIと比べると巨細胞形成を良く

抑えている。また、IもIIと比較すると巨細胞形成を抑えている。

2) GFP発現を指標としてHIV感染を検出する細胞株を用いた感染抑制試験：表4に示した。I、II、IVはBaLと比べるとIIIBにより効果があった。しかしポジティブコントロールとして抑制効果がすでに確認されているD.Sと比較するとII、IVは感染阻害効果が少なかった。一方IIIはD.Sと比較してもそれ以上か同等の阻害効果があり、またBaL、IIIB両方に対して効果が見られた。

3) 抗エイズウイルス活性物質の作用点の解析：細胞のウイルスレセプターに及ぶ影響について調べたところCD4分子と抗CD4モノクローナル抗体の結合を検体IIIが抑制した(表5)。また、薬剤のウイルスへの影響を調べるために、HIV-1のエンベロープ蛋白が表出しているHIV-1に持続感染しているMOLT-4細胞と抗エンベロープ蛋白(gp120のV3領域)モノクローナル抗体の結合を検体IVが抑制した(表6)。その作用はgp120に作用することが知られているdextran sulfateとほぼ同程度であった。一方、薬剤のウイルスへの直接作用を調べるためにウイルスと薬剤を反応させた後にウイルスの感染価を測定したところ、顕著なウイルスの感染性の低下を示した薬剤はなかった。

4) HIV-1薬剤耐性臨床分離ウイルスに対する抑制活性の測定：使用したHIV-1薬剤耐性臨床分離ウイルスのプロテアーゼ、逆転写酵素領域の薬剤耐性アミノ酸変異を表1に示した。これらの株は臨床の場で広く使われているプロテアーゼ、逆転写阻害剤に対する耐性遺伝子を持っており、それら

薬剤に対し耐性ウイルスとなっている。これらのウイルスを使用した抑制活性試験の結果を表7及び表8に示した。今回 HIV-1 抑制活性を測定した4サンプルは、薬剤耐性を持った臨床分離ウイルスの T トロピック M トロピック両ウイルスウイルスに対し、薬剤耐性を持っていない野生株(III B, Ba-L)とほぼ同様の抑制活性が認められた。これらの結果よりこれら4サンプルは、HIV-1 薬剤耐性臨床分離ウイルスに対しても有効であることが示唆された。

D. 考察

2 企業、2 大学及び3 国公立研究所から寄せられた合計 443 サンプルについて抗 HIV 活性スクリーニングを行った結果、マイクロプレート法では 15 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においても同じく 15 サンプルに活性が見られた。しかしながら、両方に対して活性を示したサンプルは 1 サンプルのみであった。マイクロプレート法での陽性サンプルの中では、3380 は比較的強い活性を示したが、巨細胞形成は抑制しなかった。しかしこのことが、直ちに抗 HIV 薬の候補にならないというわけではないのでさらに検討の必要があると思われる。一方、マクロファージ好性ウイルスの増殖を抑制した 14 検体のうち 2 件 (No.3019,3029) はその抑制濃度が約 10 μ g/mL と比較的強い抗ウイルス作用を示したが、細胞毒性も比較的強く、その選択係数 (SI) は 5 にとどまった。さらに他の 10 検体についてはその抑制濃度は 40 μ g/mL 以上であり、その選択係数も 5 を超えるものは無かった。以上のように、今回延べ 30 と、多くの物質に活性が認められ

たが、非常に有力と思われる物質は認められなかった。しかし、表にも示したように、今回テストした物質の多くは天然由来物質であり、しかもほとんどが単に抽出しただけのもので、まったく未精製のものであることを考えれば、今後精製を進めることにより、非常に活性の強い抗エイズ物質が得られることが大いに期待される。

本研究班では、昨年のスクリーニング試験においてすぐれた抗ウイルス作用を示した薬剤の中から4検体を選び出し、それらの作用メカニズムについていくつかの検討を行った。その結果、スクリーニング研究で見いだされた陽性物質4検体はいずれも巨細胞形成抑制作用、感染阻害作用を示したが、特に薬剤 III は強い活性を示し、感染阻害では BAL、IIIB のいずれに対しても陽性対照と同等以上の効果を示した。また、薬剤 III は HIV の主要レセプターである CD4 に作用し、ウイルスと細胞との結合を阻害することにより抗ウイルス作用を示すことが示唆された。一方、薬剤 IV は HIV-1 の gp120 の V3 ループに作用したことから、ウイルスの CD4 との結合後のコレセター (CXCR4, CCR5) と gp120 との相互作用になんらかの作用を及ぼすことにより抗ウイルス作用を示すことが示唆された。さらに4検体は、いずれも T-トロピック、M-トロピック株の薬剤耐性臨床分離株に対して、野生株 (III B, Ba-L) とほぼ同様の抗 HIV 活性が認められ、薬剤耐性ウイルスに対しても有効であることが示された。このように薬剤 III は感染抑制試験で、かなり低い濃度まで効果があり、薬剤耐性臨床分離株に対して効果があること、特異な作用点を持つことから、抗 HIV 薬候補として有力である

と思われる。今後、さらに詳細な作用機作を解明すると共に、化学的な検討を加えることにより、創薬への発展が期待される。

本研究は、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差し控えることとなっている。従って、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等の情報提供には制限があり、不本意ながらきわめて限定された結論のみしか紹介できない。本研究班の本来の研究は行政ニーズから発生したこともあり、スクリーニングに限られてきた。しかし今回のように有望な物質が得られた場合は、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。

最後に、国内のエイズ患者数が少ないにもかかわらず、多くの企業、研究機関がスクリーニングに応募することは、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を示すと共に、本研究の存在意義と必要性を示しているものと思われる。

E. 結 論

2 企業、2 大学及び 3 国公立研究所から寄せられた合計 443 サンプルについて抗 HIV 活性スクリーニングを行った結果、マイク

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Tran T-T, Ushijima H, Ngoc TT, Ha LD, Hayashi S, Sata T, Abe K. Recombination of genotype B and C in hepatitis B virus isolated from a Vietnamese patient with fulminant

ロプレート法では 15 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においても同じく 15 サンプルと、延べ 30 もの多くの物質に活性が認められた。活性自体は非常に強力な抗エイズ作用を示す物質は認められなかったが、今回スクリーニングした物質の多くは天然由来の粗抽出物でまったく未精製のものであることから、今後精製によっては非常に活性の強い抗エイズ物質が得られることが大いに期待される。

昨年度の陽性サンプルについてその作用機作を検討した結果、特に薬剤 III は巨細胞形成抑制試験、GFP 発現を指標とする HIV 感染検出細胞による感染抑制試験、いずれに対しても強い活性を示した。さらに薬剤 III は CD4 に作用し、ウイルスと細胞との結合を阻害することにより抗ウイルス作用を示すこと、さらに T-トロピック、M-トロピック株の薬剤耐性臨床分離株に対して、野生株と同様の抗 HIV 活性を示すことがわかった。

- hepatitis. *Jpn J Infect Dis* 56: 35-37, 2003.
- 2) Zhou Y, Li L, Okitsu S, Maneekarn N, and Ushijima H. Distribution of Human Rotaviruses, especially G9 Strains, in Japan from 1996 to 2000. *Microbiol & Immunol* 47: 591-599, 2003.
 - 3) Schroder HC, Ushijima H, Krasko A, Gamulin V, Thakur NL, Diehl-Seifert B, Mueller WEG. Emergence and disappearance of an immune molecule, an antimicrobial lectin, in basal Metazoa, a tachylectin-related protein in the sponge *Suberites domuncula*. *J Biol Chem* 278:32810-7, 2003.
 - 4) Tran T-T, Ushijima H, Quang X, Phuong N, Li TC, Hayashi S, Lien TX, Sata T, Abe K. Prevalence of hepatitis virus types B through E and genotypic distribution of HBV and HCV in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Hepatology Research* 26: 275-280, 2003.
 - 5) Komoriya T, Kohno H, Kimura A, Ushijima H. The development of sensitive latex agglutination tests for detecting astroviruses (serotype 1 and 3) from clinical stool specimen. *JARMAN* 13: 103-114, 2003.
 - 6) Okame M, Yan H, Akihara S, Okitsu S, Tani H, Matsuura Y, Ushijima H. Evaluation of a newly developed immunochromatographic method for detection of Norovirus. *J. J. A. Infect. Dis* 77: 637-639, 2003.
 - 7) Zhou Y, Li L, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Distribution of human rotaviruses, especially G9 strains in Japan from 1996 to 2000. *Microbiol Immunol* 47: 591-9, 2003.
 - 8) Yan H, Yagyu F, Okitsu S, Nishio O, Ushijima H. Detection of norovirus (GI, GII), sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single round multiplex PCR. *J Virol Methods* 114: 37-44, 2003.
 - 9) Tran T-T, Ushijima H, Win KM, Luengrojanakul, Shrestha PK, Zhong ZH, Smirnov AV, Taltavull TC, Sata T, Abe K. High prevalence of hepatitis B virus pre-S mutant in countries where it is endemic and its relationship with genotype and chronicity. *J Clin Microbiol J Clin Microbiol* 41: 5449-5455, 2003.
 - 10) Phan PG, Tuan NA, Okame M, Maneekarn N, Nishio O, Okitsu S, Ushijima H. Human astrovirus, Norovirus (GI, GII), and Sapovirus infections among diarrheal children in Pakistan. (*J Med Virol* in press)
 - 11) Hansman GS, Katayama K, Maneekarn N, Peerakome S, Khamrin P, Tonusin S, Okitsu S, Nishio O, Takeda N, Ushijima H. Genetic diversity of Norovirus and Sapovirus in hospitalized infants with sporadic cases of acute gastroenteritis. (*J Clin Microbiol* in press)
 - 12) Hansman GS, Doan LT, Katayama K, K Nguyen TA, Okitsu S, Kato Y, Nishio O, Takeda N, Ushijima H. Norovirus strains belonging to the Lordsdale virus cluster are a major cause of acute sporadic infantile gastroenteritis in Ho Chi Minh city, Vietnam (*J Clin Microbiol* submitted)
 - 13) Adhikary AK, Inada T, Numaga J, Suzuki E, Ushijima H, Banik U, Mukoyama A, Matsuno

- S. Characterization of hexon and fiber genes of a novel strain of adenovirus involved in epidemic keratoconjunctivitis. *J Clin Pathol* 57: 95-97, 2004
- 14) Sakamoto T, Ushijima H, Okitsu S, Suzuki E, Sakai K, Morikawa S, Muller WEG. Establishment of an HIV cell-cell fusion assay by using two genetically modified HeLa cell lines and receptor gene. *J Virol Methods* 114:159-166, 2003
- 15) Tran T-T, Ushijima H, Quang VX, Win KM, Luengrojanakul P, Kikuchi K, Sata T, Kenji Abe. Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups. *J Gen Virol* 85: 283-292, 2004.
- 16) Abdel-Hafez A A, Elsherief H A H, Jo M, Kurokawa M, Shiraki K, Kawahata T, Otake T, Nakamura N, Hattori M, Synthesis and evaluation of anti-HIV-1 and anti-HSV-1 activities of 4H-[1,2,4]-triazolo[1,5-a]pyrimidin-5-one derivatives, *Arzneim.-Forsch/Drug Res.* 52, 833-839, 2002
- 17) Kawahata T, Otake T, Mori H, Kojima Y, Oishi I, Oka S, Fukumori Y, Sano K, A novel substance purified from *Perilla frutescens* Britton inhibits an early stage of HIV-1 replication without blocking viral adsorption, *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 13, 283-288, 2002
- 18) Tewtrakul S, Miyashiro H, Nakamura N, Hattori M, Kawahata T, Otake T, Yoshinaga T, Fujiwara T, Supavita T, Yuenyongsawad S, Rattanasuwon P, Dej-Adisai S, HIV-1 integrase inhibitory substances from *Coleus parvifolius* Phytoterapy Research, 17, 232-239, 2003
- 19) 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 twostage BALB/3T3 cell transformation assay. *Biol. Pharm. Bull.* 26(3), 347-351, 2003.
- 20) Ohnishi, T. Muroi M., & Tanamoto K N-linked glycosylation critical to the Toll-like receptor 4 function require the presence of MD2. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10(3), 405-410, 2003
- 21) Muroi M., Ohnishi T. Azumi S. & Tanamoto K. Lipopolysaccharide-mimetic activities of Toll-like-receptor 2-stimulatory substance(s) contained in *Escherichia coli* lipopolysaccharide preparations. *Infect. Immun.* 71(6), 3221-3226, 2003
- 22) Ogawa Y., Kawamura Y., Kikuchi Y., Nishimura T., Nihsikawa J., Nishihara T. & Tanamoto K. Estrogen receptor binding activities of UV stabilizer used in food contact plastics and benzophenone derivatives. *J. Health Sci.* 49(3), 205-212, 2003
- 23) Abe Y., Sugita T., Wakui C., Ninno T., Yomota C., Ishiwata H., Tanamoto K. & Maitani T. Material labeling of soft toys and plasticizers in polyvinyl chloride products. *J. Food Hyg. Soc Japan* 44(3), 168-174 (2003)
- 24) Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol Ther.* 2003 Nov;100(2):171-194.
- 25) Kawasaki Y., Yomota C. & Tanamoto K. Determination of six hydroxybenzoic acid esters in

laver (Nori) by HPLC. Bull. Natl. Inst. Health Sci., 121, 4850, 2003

26) Sato K., Sugimoto N., Ohta M., Yamazaki T., Maitani T. & Tanamoto K. Structure determination of minor red pigment in carthamus red colorant isolated by preparative LC/MS. Food Addit Contam. 20(11), 1015-22, 2003

27) Mustuga M., Kawamura Y. & Tanamoto K. Analytical method for formaldehyde, acetaldehyde and PET cyclic oligomers in polyethylene terephthalate products. Japanese Journal of Food Chemistry 10(3), 138-144, 2003

28) Sugimoto N., Sato K., Yamazaki T. & Tanamoto K. Analysis of constituents in Jamaica Extract, a natural bittering agent. J. Food Hyg. Soc. Japan 44(6), 328-331, 2003

学会発表

- 1) 川畑拓也、大竹 徹、森 治代、小島洋子、岡 修一、佐野浩一、アオジソから分離された糖蛋白 Pf-gp6 の抗 HIV-1 作用, 第 30 回日本防菌防黴学会、大阪、2003
- 2) 山本直彦、大竹徹、森治代、川畑拓也、和田かおる、伊部史朗、金田次弘、内海真、森下高行、佐藤克彦、北里健二、塩谷光彦、ペンダント型亜鉛サイクレン錯体の HIV 増殖抑制作用機序に関する研究, 第 17 回日本エイズ学会、神戸、2003
- 3) 森下高行、佐藤克彦、宮城島拓人、内海 真、山本直彦、ケニア、ナイロビにおける HIV と梅毒の抗体保有状況, 第 17 回日本エイズ学会、神戸、2003
- 4) 服部純子、伊部史朗、永井裕美、和田かおる、森下高行、佐藤克彦、内海 真、金田次弘、男性同性愛者における HIV-1 と GBV-C 感染率及び GBV-C ジェノタイプの解析, 第 17 回日本エイズ学会、神戸、2003
- 5) 永井裕美、和田かおる、森下高行、内海 真、西山幸廣、金田次弘、高感度リアルタイム PCR 法のバリデーション、第 17 回日本エイズ学会、神戸、2003

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

表1. 平成15年度スクリーニング研究で見いだされた抗HIV活性物質

サンプル	由来	細胞障害抑制 有効濃度($\mu\text{g/ml}$)	巨細胞抑制	MAGIC5
03002	植物からの単離有機 化合物及び植物エキス	—*		200
03008	同上	—		>190-38
03009	同上	—		$\geq 380-76$
03019	同上	—		$\geq 50.5-10.1$
03025	同上	—		$\geq 270-54$
03029	同上	—		$\geq 65.5-13.1$
03030	同上	—		$\geq 430-86$
03031	同上	—		$\geq 230-46$
03035	同上	—		$\geq 205-41$
03201	天然物メタノール、 一部アセトンエキス	—	—	$\geq 250-62.5$
03235	同上	—	≥ 1000	$\geq 1000-500$
03244	同上	$\geq 1062.5-132.8$		—
03246	同上	$\geq 156.3-39.1$		—
03247	同上	$\geq 156.3-39.1$		—
03248	同上	$\geq 312.5-78.1$		—
03253	同上	$\geq 312.5-78.1$		—
03259	同上	$\geq 212.5-53.1$		—
03268	同上	$\geq 62.5-15.6$		—
03318	合成化合物			$\geq 100-20$
03366	生薬抽出エキス	$\geq 100-12.5$	—	$\geq 80-80$
03379	同上	$\geq 1000-125$	$\geq 125-62.5$	$\geq 1000-200$
03380	同上	$\geq 250-7.5$	—	—
03386	天然物メタノール抽出	—		$\geq 100-20$
03399	同上	—		$\geq 100-20$
03438	多糖類	$\geq 500-15$	—	
03439	同上	$\geq 500-62$	$\geq 1000-40$	
03440	同上	$\geq 500-1.9$	$\geq 1000-200$	
03442	同上	$\geq 500-125$	$\geq 500-20$	
03443	同上	$\geq 500-15$	—	

*抑制せず

表2 巨細胞抑制作用 I

HeLa/KS386 と薬剤を先に作用させた場合の巨細胞の数

薬剤No.	薬剤濃度(μ g/ml)											
	100	50	25	12.5	6.25	3.1	1.5	0.75	0.38	0.19	0.095	0.005
I	0	0	1	6	63	154	164	204	266	-	-	-
II	0	2	48	199	204	203	258	-	-	-	-	-
III	0	0	0	0	0	0	0	0	172	270	-	-

一: 効果なし、バックグラウンドの巨細胞数: 286 個

表3 巨細胞抑制 II

HeLa/T4 と薬剤を先に作用させた場合の巨細胞の数

薬剤No.	薬剤濃度(μ g/ml)											
	100	50	25	12.5	6.25	3.1	1.5	0.75	0.38	0.19	0.095	0.005
I	0	0	0	24	52	209	235	257	-	-	-	-
II	0	0	44	212	242	309	-	-	-	-	-	-
III	0	0	0	0	0	0	0	0	99	161	278	-

一: 効果なし、バックグラウンドの巨細胞数: 286 個

表4 GFP 発現を指標とする HIV 感染検出細胞による感染抑制試験

薬剤	IC ₅₀ となる濃度(μ g/ml)	
	N4R5/GPF	N4X4/GPF
	+ HIV-BaL	+ HIV-III B
I	5.1	0.56
II	20	3.1
III	0.85	0.37
IV	40	8.4
D.S-500K	8.5	2.7
D.S-8K	0.97	0.21

表5 細胞レセプター/抗レセプターモノクローナル抗体反応への薬剤の影響

薬剤 (50 μ g/mL)	結合阻害率 (%)		
	抗 CD4&MT-4 細胞 (抗 Leu3a)	抗 CXCR4&MOLT-4 細胞 (12G5)	抗 CCR5&MAGIC-5A 細胞 (2D7)
I	-0.13	0.43	-1.11
III	17.94	1.51	3.56
IV	3.96	2.37	0.78
Dextran sulfate 8000	-2.38	1.62	2.1

表6 HIV-1 持続感染 T細胞と抗 gp120 モノクローナル抗体反応への薬剤の影響

薬剤 (100 μ g/mL)	結合阻害率 (%)
	抗 gp120(0.5 β)&HIV-1 感染 MOLT-4 細胞
I	1.81
III	-7.1
IV	20.83
Dextran sulfate 8000	14.45

表7 IIIB および薬剤耐性臨床分離株に対する抗 HIV 活性 (T トロピックウイルス)

Sample	Virus IC ₅₀ (μg/ml)				CC ₅₀ (μg/ml)
	IIIB	#39	KK39-5	KK81-3	
I	0.9	4.8	1.6	0.9	≥1000
II	24	200	24	24	≥1000
III	0.9	1.6	0.9	0.9	≥1000
IV	0.9	0.9	0.32	0.32	≥1000
AZT*	0.8	0.8	4	100	
3TC	0.016	≥50	≥50	0.24	

*(ng/ml)

表8 Ba-L および薬剤耐性臨床分離株に対する抗 HIV 活性 (M トロピックウイルス)

Sample	Virus IC ₅₀ (μg/ml)				CC ₅₀ (μg/ml)
	Ba-L	#12	#31	#47	
I	1.6	1.6	1.6	1.6	≥1000
II	40	40	24	40	≥1000
III	1.6	1.6	3.2	3.2	≥1000
IV	1.6	3.2	1.6	1.6	≥1000
AZT*	2.4	4	4	4	
3TC	0.08	≥50	0.1	0.4	

*(ng/ml)

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総合研究事業）
分担研究報告書

エイズおよび関連する新興・再興ウイルス感染症の
医薬品候補物質のスクリーニングと新薬開発に向けた研究

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

研究要旨

平成 15 年度送られてきた 49 サンプルについて MT-4 細胞の HIV(HTLV-III B) 感染による細胞傷害性抑制試験および Molt 4 細胞を用いた巨細胞抑制試験で、スクリーニングを行った。3 サンプルが細胞傷害抑制を示し、そのうちの 1 サンプルが巨細胞抑制を示した。平成 14 年度送付され抗 HIV 活性が認められた薬剤について HeLa 細胞を用いた巨細胞形成抑制試験および GFP 発現を指標とする HIV 感染検出細胞による感染抑制試験を行った。1 サンプルは低濃度で効果があり、抗 HIV 薬候補として有力である。

A. 研究目的

A-1. 細胞傷害抑制試験および巨細胞抑制試験(スクリーニング)

平成 15 年度送られてきた 49 サンプルについて MT-4 細胞の HIV(HTLV-III B) 感染による細胞傷害性抑制試験および Molt 4 細胞を用いた巨細胞抑制試験でスクリーニングを行った。

A-2.1 ウイルスを用いない巨細胞形成抑制試験

平成 14 年度にスクリーニングを行い抗 HIV 活性の認められた 4 サンプルのうち 3 サンプルについてウイルスを用いない巨細胞形成抑制試験を行った。この方法は HeLa 細胞にそれぞれ CD4 と HIVgp160 遺伝子を組み込んだ 2 種類の

細胞を使用するものでウイルスを用いない擬似感染モデルである。

A-2.2 GFP 発現を指標とする HIV 感染検出細胞による感染抑制試験

ヒトグリオーマ細胞に CD4 および HIV のコレセプター (CXCR4 もしくは CCR5) の遺伝子、HIV-1LTR をプロモーターとする GFP を持つプラスミドを組み込んだ細胞を製作した。平成 14 年度にスクリーニングを行い抗 HIV 活性のあった薬剤 4 サンプルについてウイルスの感染抑制試験を行った。

B. 研究方法

B-1. 細胞傷害抑制試験および巨細胞抑制試験(スクリーニング)

スクリーニングは 49 サンプルについて抗 HIV 活性を測定した。抗 HIV 物質の

細胞毒性と抗 HIV 活性を測定するプレートの 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 RPMI で所定の濃度に希釈した試料溶液 200 μ l を加えた。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 段階希釈を 11 穴まで行い、12 穴目は薬剤濃度を 0 として細胞増殖および HIV 感染のコントロールとした。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 列を使用した。被検薬剤を希釈したプレートに 1 プレート辺り 2×10^4 個の対数増殖期にある MT-4 細胞を遠心分離により集め、培地 10ml で再浮遊し細胞毒性測定用のプレートには 100 μ l ずつすべての穴に加えた。一方、抗 HIV 活性測定プレートは以下のように調整した。遠心分離により集めた 2×10^4 個の MT-4 細胞に 100TCID₅₀ となるように HIV (HTLV-IIIB) のストック溶液を加え、37°C1 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 μ l ずつ加えた。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 Molt-4 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 倍段階希釈とした。

B-2.1 ウイルスを用いない巨細胞形成抑制試験

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：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。

3 種類の薬剤を 100 μ g/ml から 2 倍ずつ 12 段階希釈した培養液に、片方の細胞を 30 分間 incubate し、その後残りの細胞を加え、16 時間後に harvest する。ギムザ染色し、顕微鏡下で巨細胞の数を数える。

B-2.2 GFP 発現を指標とする HIV 感染検出細胞による感染抑制試験

N4X4/GFP (CD4/CXCR4 を発現) に HIV-IIIB を、N4R5/GFP (CD4/CCR5 を発現) に HIV-BaL を感染させ 2 日後それぞれの系、それぞれの薬剤 (4 種類) について蛍光顕微鏡下で観察し、IC₅₀ となる濃度を求めた。

C. 研究結果

C-1. 細胞傷害抑制試験および巨細胞抑制試験(スクリーニング)

スクリーニングの結果は表 1 に示した。49 サンプルのうち 3 サンプルが抗 HIV 活性を示したが、そのうち 2 サンプル (RS, PL) は低い濃度まで細胞傷害を抑制しているものの巨細胞形成を抑制できなかった。残りの 1 サンプル (クミスワチンエキス末) での細胞傷害抑制試験は RS, PL と比較して、低い濃度ではなかったが巨細胞抑制も示した。

C-2.1 ウイルスを用いない巨細胞形成抑制試験

段階希釈した薬剤と HeLa/KS386 を先に作用させた場合を表 2、HeLa/T4 を先に作用させた場合を表 3 に示した。III は I, II と比べると巨細胞形成を良く抑

えている。また、IもIIと比較すると巨細胞形成を抑えている

C-2.2 GFP 発現を指標として HIV 感染を検出する細胞株を用いた感染抑制試験

表4に示した。I、II、IVはBaLと比べるとIIIBにより効果があった。しかしポジティブコントロールとして抑制効果がすでに確認されているD.Sと比較するとII、IVは感染阻害効果が少なかった。一方IIIはD.Sと比較してもそれ以上か同等の阻害効果があり、またBaL、IIIB両方に対して効果が見られた。

D. 考察

D-1. 細胞傷害抑制試験および巨細胞抑制試験(スクリーニング)

巨細胞形成を抑制できなかったことが、直ちに抗 HIV 薬の候補にならないというわけではないので、低い濃度まで細胞傷害を抑制しているRS、PLはさらに検討の必要がある。

D-2.1 ウイルスを用いない巨細胞形成抑制試験

IもIIと比較すると巨細胞形成を抑えているように見えるが、薬剤濃度が低くなるにつれて徐々に巨細胞数が増えていることを考えると細胞毒性の作用によるものだと思われる。実際顕微鏡下での観察によるとIをかけた細胞は高い薬剤濃度では細胞が萎縮していた。

薬剤をどちらの細胞に先に作用させても効果はほとんど変わらないことから、ブロッキングの反応は薬剤を作用させたと同時に起こっていると考えられる。

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。

そこで今後、薬剤耐性株のライブラリー、サブタイプ別の株のライブラリーを作製し、1次スクリーニング(細胞傷害抑制試験および巨細胞抑制試験)陽性の薬剤に対して検討する予定である。

D-2.2 GFP 発現を指標とする HIV 感染検出細胞による感染抑制試験

薬剤によって HIV のトロピズム感受性の違いが見られるため、さらにサブタイプ別の株のライブラリーを作製し、1次スクリーニング(細胞傷害抑制試験および巨細胞抑制試験)陽性の薬剤に対して検討する予定である。

E. 結論

IIIは巨細胞形成抑制試験、GFP発現を指標とする HIV 感染検出細胞による感染抑制試験で、かなり低い濃度まで効果があり、抗 HIV 薬候補として有力である。また、薬剤のブロッキングの反応は薬剤を作用させたと同時に起こっていると考えられ、HIVのトロピズム感受性の違いが見られる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) Tran T-T, Ushijima H, Ngoc TT, Ha LD, Hayashi S, Sata T, Abe K. Recombination of genotype B and C in hepatitis B virus isolated from a Vietnamese patient with fulminant hepatitis. Jpn

- J Infect Dis 56: 35-37, 2003.
- 2) Zhou Y, Li L, Okitsu S, Maneekarn N, and Ushijima H. Distribution of Human Rotaviruses, especially G9 Strains, in Japan from 1996 to 2000. *Microbiol & Immunol* 47: 591-599, 2003.
- 3) Schroder HC, Ushijima H, Krasko A, Gamulin V, Thakur NL, Diehl-Seifert B, Mueller WEG. Emergence and disappearance of an immune molecule, an antimicrobial lectin, in basal Metazoa, a tachylectin-related protein in the sponge *Suberites domuncula*. *J Biol Chem* 278:32810-7, 2003.
- 4) Tran T-T, Ushijima H, Quang X, Phuong N, Li TC, Hayashi S, Lien TX, Sata T, Abe K. Prevalence of hepatitis virus types B through E and genotypic distribution of HBV and HCV in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Hepatology Research* 26: 275-280, 2003.
- 5) Komoriya T, Kohno H, Kimura A, Ushijima H. The development of sensitive latex agglutination tests for detecting astroviruses (serotype 1 and 3) from clinical stool specimen. *JARMAN* 13: 103-114, 2003.
- 6) Okame M, Yan H, Akihara S, Okitsu S, Tani H, Matsuura Y, Ushijima H. Evaluation of a newly developed immunochromatographic method for detection of Norovirus. *J. J. A. Infect. Dis* 77: 637-639, 2003.
- 7) Zhou Y, Li L, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Distribution of human rotaviruses, especially G9 strains in Japan from 1996 to 2000. *Microbiol Immunol* 47: 591-9, 2003.
- 8) Yan H, Yagyu F, Okitsu S, Nishio O, Ushijima H. Detection of norovirus (GI, GII), sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. *J Virol Methods* 114: 37-44, 2003.
- 9) Tran T-T, Ushijima H, Win KM, Luengrojanakul, Shrestha PK, Zhong ZH, Smirnov AV, Taltavull TC, Sata T, Abe K. High prevalence of hepatitis B virus pre-S mutant in countries where it is endemic and its relationship with genotype and chronicity. *J Clin Microbiol J Clin Microbiol* 41: 5449-5455, 2003.
- 10) Phan PG, Tuan NA, Okame M, Maneekarn N, Nishio O, Okitsu S, Ushijima H. Human astrovirus, Norovirus (GI, GII), and Sapovirus infections among diarrheal children in Pakistan. (*J Med Virol* in press)
- 11) Hansman GS, Katayama K, Maneekarn N, Peerakome S, Khamrin P, Tonusin S, Okitsu S, Nishio O, Takeda N, Ushijima H. Genetic diversity of Norovirus and Sapovirus in hospitalized infants with sporadic cases of acute gastroenteritis. (*J Clin Microbiol* in press)
- 12) Hansman GS, Doan LT, Katayama K, Kuyen TA, Okitsu S, Kato Y, Nishio O, Takeda N, Ushijima H. Norovirus strains belongong to the Lordsdale

virus cluster are a major cause of acute sporadic infantile gastroenteritis in Ho Chi Minh city, Vietnam (J Clin Microbiol submitted)

13) Adhikary AK, Inada T, Numaga J, Suzuki E, Ushijima H, Banik U, Mukoyama A, Matsuno S. Characterization of hexon and fiber genes of a novel strain of adenovirus involved in epidemic keratoconjunctivitis. J Clin Pathol 57: 95-97, 2004

14) Sakamoto T, Ushijima H, Okitsu S, Suzuki E, Sakai K, Morikawa S, Muller WEG. Establishment of an HIV cell-cell fusion assay by using two genetically

modified HeLa cell lines and receptor gene. J Virol Methods 114:159-166, 2003

15) Tran T-T, Ushijima H, Quang VX, Win KM, Luengrojanakul P, Kikuchi K, Sata T, Kenji Abe. Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups. J Gen Virol 85: 283-292, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 細胞傷害抑制試験および巨細胞抑制試験によるスクリーニング

薬剤No.	有効濃度(μg/ml)	
	細胞傷害抑制試験	巨細胞抑制試験
RS (03366)	≥100-12.5	巨細胞抑制せず
クミスワチンエキス末 (03379)	≥1000-125	≥125-62.5
PL (03380)	≥250-7.5	巨細胞抑制せず