

表2 巨細胞抑制試験 (HeLa/KS386 と薬剤を先に作用させた場合)

薬剤No.	薬剤濃度(μg/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	-	-

—: 明らかに効果が見られない

薬剤を入れてないコントロールは平均 286 個の巨細胞が観察された

表3 巨細胞抑制試験 (HeLa/T4 と薬剤を先に作用させた場合)

薬剤No.	薬剤濃度(μg/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	-

—: 明らかに効果が見られない

薬剤を入れてないコントロールは平均 270 個の巨細胞が観察された

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(μg/ml)	
	N4R5/GPF	N4X4/GPF
	+ HIV-BaL	+ HIV-IIIIB
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

厚生省科学研究費補助金(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

エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究

分担研究者 小河 正雄 大分県衛生環境研究センター 主幹研究員

研究要旨

エイズ候補物質 48 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たスクリーニング検査を実施した。その結果、6 サンプルに弱い抗 HIV 活性が見られた。一方、MAGIC5 によるスクリーニングでは、抗 HIV 活性は認められなかった。

A. 研究目的

エイズ治療のため様々な治療薬が開発されている。しかし、それらの治療薬に対する耐性ウイルスの出現や、副作用が問題となっており、新しい薬の開発が待たれている。そこで、エイズ医薬品候補物質について抗 HIV 活性を指標にスクリーニングを行い、有効な薬剤の開発に役立てることを目的に研究を行った。

B. 研究方法

スクリーニング候補物質は国立医薬品食品衛生研究所より送付された 48 サンプル(コード No.03241~03228)を用いた。検体の溶解は、指定された DMSO 又は EtOH を用い、希釈は RPMI-1640 培養液を用いた。2 倍階段希釈したサンプルに、HIV を感染させた MT-4 細胞を加え、37°C、5%炭酸ガス存在下にて 5 日間培養した。顕微鏡を用いて、サンプルによる細胞毒性及び、HIV による細胞障害性を抑制する効果を観察し、抗 HIV 活性の判定を行った。また、溶解したサンプルを愛

知県衛生研究所の森下高行分担研究員に送付し、MAGIC5 の試験を依頼した。

C. 研究結果

MT-4 細胞によるスクリーニングの結果、No.3244 は最小有効濃度が最小細胞毒性濃度の 2^3 倍であり、No.3246、3247、3248、3253、3256、3259 では最小有効濃度が最小細胞毒性濃度の 2^2 倍という弱い抗 HIV 活性が認められた。一方、MAGIC5 によるスクリーニングでは、抗 HIV 活性をもつサンプルは認められなかった。

D. 考察

抗 HIV 活性が認められたサンプルは、いずれも EtOH で溶解しており、溶媒の影響も考えられる。また、MAGIC5 によるスクリーニングでは抗 HIV 活性が認められず、エイズ医薬品候補として有望なサンプルはないと考えられる。

E. 結論

48 サンプルのスクリーニングの結果、明らかに有効な抗 HIV 活性を示すサンプルはなかった。

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総合研究事業）
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）
研究協力者 千々和 勝己（同上）

研究要旨

民間企業・大学等から、抗 HIV 活性試験の依頼があった48件のサンプルについて、MT-4 細胞を用いたマイクロプレート法による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 活性を示すもの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、すでに多数の医薬品が認可されており、発症予防については効果を上げている。しかし、決定的に有効な医薬品は未だ無く、また現在使用されている薬剤についても薬剤耐性の問題が生じている。そこで、新たにエイズ医薬品候補となり得る物質を広く求めるため、企業・大学等から依頼のあったサンプルについて抗 HIV 作用のスクリーニング試験を実施した。その結果、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・大学等から試験依頼のあった48件（コード番号、03049～03096）であった。サンプルはDMSOで1～10mg/mlに溶解し、蒸留水でさらに希釈したものを試験に供した。スクリーニング試験は、サンプルをさらに培養液（FCS 10% + RPMI1640）で2段階希釈したものに、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、培養開始後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。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48件のサンプルでは、MT-4 細胞に対しての最小毒性濃度は 3.9-313 μ g/ml を示した。しかし、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48件のサンプルには、MT-4 細胞を用いたスクリーニング試験で、抗 HIV 活性を示すものは見られなかった。また、愛知県衛生研究所で行われた、MAGIC5A細胞を用いたスクリーニング試験でも、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

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 48 サンプル(コード番号 03193～03240)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、48 サンプル (コード番号 03193～03240) 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。しかし、現行の抗 HIV 療法では HIV 感染を完治させることは困難である。その結果、一生涯薬剤を投与し続けることになり、薬剤耐性ウイルスの出現や副作用が大きな問題となっている。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ち、副作用の少ない抗 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、大学、研究所内には抗 HIV 効果を調べていない医薬品候補物質が多数存在していると考えられる。その中には有力な抗 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 作用のスクリーニングを行う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候補医薬品候補物質 48 サンプル(コード番号 03193～03240)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

(概要)

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 0.001TCID₅₀/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 2 倍希釈した薬剤を含む 10% 牛胎児血清含有 RPMI-1640 培地に 1.5×10^5 cells/ml の濃度で浮遊させ、1well あたり 200 μ 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) および細胞毒性を観察した。

(サンプルの溶解方法)

サンプルを少量のメタノールに溶解した後、RPMI 培地で希釈した。初濃度は

1000 $\mu\text{g/ml}$ から実施した。

(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。
- 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 3×10^6 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 0.001 TCID₅₀/cell 量の HIV-1 を加え、37°C のインキュベーターで 1 時間吸着させた。時々攪拌し、細胞へのウイルス吸着を促した。
- 3) ウイルス吸着済み MT-4 細胞にプレート 1 枚あたり 10 ml の 10% FCS 添加 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 μl ずつ添加した。非感染細胞用の薬剤希釈列には同数 (3×10^6 個/plate) の非感染 MT-4 細胞を添加した。プレートをプレートミキサーで攪拌し、37°C、5% CO₂ 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。
- 5) 試験は 2 回実施した。

(倫理面への配慮)

本研究に関して特に倫理面での問題はない。

C. 研究結果

国立医薬品食品衛生研究所より送付された薬剤 48 サンプル (コード番号 03193~03240) すべてにおいて、抗 HIV 抑制が認められた薬剤はなかった。

48 物質の細胞毒性を示した最小濃度、および試験結果を表に示す。

陽性対照である AZT の CPE 抑制濃度は 0.16 μM であった。

D. 考察

最高濃度 1000 $\mu\text{g/ml}$ でも毒性を示さない薬剤が多数存在した。提供された物質の量が限られていたためこれ以上の濃度で試験ができなかった。また不溶物が見られる検体は 03194, 03199, 03201, 03208, 03209, 03211, 03214, 03217, 03218, 03222, 03225, 03226, 03227, 03228, 03229, 03233, 03234, 03235, 03236, 03238, 03239 であった。動植物等からの抽出物など複数の物質の混合物である場合、成分を分離、濃縮してさらに試験を試みる意義はあるかもしれない。

E. 結論

今回、提供された 48 薬剤の中で抗 HIV 作用を持つものはなかった。

コード No.	測定濃度 μg/ml	細胞毒性を 示した最小 濃度 μg/ml	抗 HIV 抑制
03193	1000~0.5		-
03194	1000~0.5	500	-
03195	1000~0.5		-
03196	1000~0.5	125	-
03197	1000~0.5		-
03198	1000~0.5	500	-
03199	1000~0.5	1000	-
03200	1000~0.5		-
03201	1000~0.5	250	-
03202	1000~0.5		-
03203	1000~0.5		-
03204	1000~0.5		-
03205	1000~0.5		-
03206	1000~0.5		-
03207	1000~0.5	1000	-
03208	1000~0.5	250	-
03209	1000~0.5	500	-
03210	1000~0.5	1000	-
03211	1000~0.5	500	-
03212	1000~0.5		-
03213	1000~0.5	500	-
03214	1000~0.5	250	-
03215	1000~0.5	31.3	-
03216	1000~0.5		-
03217	1000~0.5	500	-
03218	1000~0.5	250	-
03219	1000~0.5	500	-
03220	1000~0.5		-
03221	1000~0.5		-
03222	1000~0.5	1000	-
03223	1000~0.5	1000	-
03224	1000~0.5		-
03225	1000~0.5	1000	-
03226	1000~0.5	500	-
03227	1000~0.5	500	-

03228	1000~0.5	500	-
03229	1000~0.5	500	-
03230	1000~0.5		-
03231	1000~0.5		-
03232	1000~0.5	1000	-
03233	1000~0.5	1000	-
03234	1000~0.5		-
03235	1000~0.5		-
03236	1000~0.5	500	-
03237	1000~0.5	500	-
03238	1000~0.5		-
03239	1000~0.5	250	-
03240	1000~0.5		-

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

分担研究者 大竹 徹 (大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課)
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 194 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、2 検体に比較的強い抗 HIV 活性が認められ、10 件体に弱い抗 HIV 活性が認められた。比較的強い活性が示された検体の抑制濃度は約 10 μ g/mL であったがそれらの選択係数は 5 にとどまった。

昨年度のスクリーニング試験において強い抗 HIV 活性を示した 3 種の検体についてその抗 HIV 作用メカニズムを検討した。そのうち 1 種については細胞の CD4 レセプターに、他の 1 種はウイルスのエンベロープ蛋白 gp120 にそれぞれ作用し、ウイルスの細胞への吸着侵入過程を阻止することにより抗ウイルス作用を示すことが判明した。

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。

また、昨年のスクリーニング試験において強い抗 HIV 活性を示した検体はいずれも HIV 感染細胞と非感染細胞を混合培養した時に見られる巨細胞形成を強く抑制したことから、これらの薬剤はウイルスの細胞への侵入過程に作用していることがうかがわれた。このため、薬剤の作用点を明らかにするために、HIV のエンベロープ蛋白および細胞表面の HIV レセプターに及ぼす影響をモノクローナル抗体とフローサ

イトメーターを用いて検討した。また薬剤のウイルスへの直接作用の有無を調べた。

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 μ L になるように DEAE-dextran 添加培養液で調整し加えた。37°C の CO₂ 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 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した。抗 HIV 活性陽性検体として

TAK-779 および AZT を用いた。

HIV の細胞レセプターである CD4 およびコレセプターである CXCR4 および 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 (37°C30 分間) 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。細胞とモノクローナル抗体の組み合わせはそれぞれ、抗 CD4 抗体 (抗 Leu3a) と MT-4 細胞、抗 CXCR4 抗体 (12G5) と MOLT-4 細胞、抗 CCR5 抗体 (2D7) と MAGIC-5A 細胞であった。

また、HIV-1 に持続感染している MOLT-4 細胞と HIV-1gp120 の V3 領域に対するモノクローナル抗体である 0.5β 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 (LAI 株) と薬剤を 37°C30 分間反応させ、遠心により薬剤を除いた後ウイルス感染価を MT-4 細胞を用いて測定した。

結果

今回、194 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、12 検体に抗ウイルス活性を認めた (表 1)。そのうち 2 検体 (II019, 3029) は抑制濃度 10.1、50.5µg/mL および 13.1、65.5µg/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 10 検体は抑制濃度が 41、200µg/mL と弱い抗ウイルス活性を示した。

昨年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検体についてその作用メカニズムについて検討した。

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 II が抑制した (表 2)。

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 3)。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。

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。

考察

今回のスクリーニング研究におい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 12 件認められた。そのうち 2 件 (II019, 3029) はその抑制濃度が約 10µg/mL と比較的強い抗ウイルス作用が示されたが、細胞毒性も比較的強く示されその選択係数 (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 40µg/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。これらのことから今回活性が示された物質のなかで特にすぐれたものは認められなかった。

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について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。

検体 II は HIV-1 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。さらに検体 IV は HIV-1 の gp120 の V3 ループ領域に作用したことから、ウイルスの CD4 との結合の後に起こるコレセプター (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したことが示唆された。

発表論文

1. 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

2. 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
3. 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*, *Phytotherapy Research*, 17, 232-239, 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、ペンダント型垂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

表1 マクロファージ好性ウイルスと MAGIC-5A 細胞を用いた抗 HIV 活性スクリーニング

検体番号	有効濃度(μg/mL)	細胞毒性濃度(μg/mL)
3008	38	>190
3009	76	380
3019	10.1	50.5
3025	54	270
3029	13.1	65.5
3030	86	430
3031	46	230
3035	41	205
3318	20	100
3379	200	1000
3386	20	100
3399	20	100

表2 細胞レセプターと抗細胞レセプターモノクローナル抗体との反応におよぼす薬剤の影響

薬剤 (50μg/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
II	17.94	1.51	3.56
IV	3.96	2.37	0.78
Dextran sulfate 8000	-2.38	1.62	2.1

表3 HIV-1 持続感染 T 細胞と抗 gp120 モノクローナル抗体との反応に及ぶ薬剤の影響

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

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

エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究

分担研究者 石崎 徹 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 48 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

今年度京都府に割り当てられた供試薬剤は 48 検体であった。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った。96 穴培養プレートに、各サンプル薬剤について FCS を含まない(または 10%FCS を含む)RPMI-1640 培養液にてピペットチップを替えながら 12 段階の希釈を行った(各ウエル液量は 100 μ L)。

次に培養液中の MT-4 細胞の生細胞数をカウントし、プレート 1 枚あたり(10 mL) 3×10^6 個の細胞を用意し、細胞を遠心機でチューブの底に集め、ごく少量(約 1 mL)の培養液に懸濁させる。これに 0.001TCID₅₀/cell 量の HIV-1 を加え、37°C の CO₂ インキュベーターにて 1 時間反応させる。ウイルスと反応済みの MT-4 細胞にプレート 1 枚あたり 10 mL の RPMI-1640 培養液(20%または 10%の FCS を含む)を加え各ウエルあたり 100 μ L ずつ分注した。この場合、

最終的な細胞濃度は 1.5×10^5 cell/mL となる。

薬剤を加えない非感染あるいは感染細胞のウエルをおき、プレートの空いているウエルには PBS などを満たして乾燥を防ぎ、37°C、5%CO₂ ガス存在下で培養を行った。

5 日目に顕微鏡下で細胞毒性と HIV による CPE を観察し、目視で判定困難な場合はトリパンブルー染色法により生細胞数をカウントした。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 活性の確認を行った。

(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無い。

C. 研究結果

供試薬剤 48 検体について MT-4 細胞を使ったスクリーニング法により抗 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総合研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究者 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

研究要旨

今年度 MAGIC5A 細胞でスクリーニングした 240 検体のうち 2 検体から弱いながら HIV-1 抑制効果が認められた。また、昨年度の本事業で高い HIV-1 抑制活性を示した 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。

1、研究目的

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 240 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。また、昨年度のエイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究において、高い HIV-1 抑制活性を示した 4 サンプルについて、HIV-1 薬剤耐性臨床分離ウイルスに対する抑制活性を測定した。

5 倍希釈した 2 点の濃度に培養液を用いて希釈し、各穴に 50 μ l ずつ加えた。HIV-1 Ba-L 株を 100~200BFU/50 μ l になるように 40 μ l/ml DEAE-dextran(最終濃度 20 μ l/ml)添加培養液で調整し、薬剤添加プレートに 50 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C の CO₂ 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、所定の方法により染色し IC₅₀ 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。

2、研究方法

1) スクリーニング試験

実験当日の朝、MAGIC5 細胞を 1 \times 10⁵ cells/ml の濃度で 2.5%FCS 添加 DMEM に浮遊し 100 μ 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

2) HIV-1 薬剤耐性臨床分離ウイルスに対する抑制活性

HIV-1 抑制活性を測定したサンプルは、昨年度の本事業で高い HIV-1 抑制活性を示した 4 サンプル (309-2, 309-5, 309-8, 310-2) について実施した。使用した薬剤耐性ウイルスは、プロテアーゼ、逆転写阻害剤に対して耐性を持つウイルスで T トロピックウイルス 3 株、M トロピックウイル

ス3株を使用した。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は、TトロピックウイルスについてはMT-4細胞による細胞障害抑制試験で、MトロピックウイルスについてはMAGIC-5アッセイにて行った。

3、結果および考察

今年度スクリーニングした240検体のうち2検体から弱いながらHIV-1抑制効果が認められた(表1)。MT-4細胞によるスクリーニングの結果、2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。なお、対照薬剤として使用したTAK779およびAZTのIC₅₀はそれぞれ0.08μMと0.006μMであった。

HIV-1薬剤耐性臨床分離ウイルス抑制試験に使用した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2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3、表4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。

4、学会発表

- 1、ケニア、ナイロビにおけるHIVと梅毒の抗体保有状況
森下高行、佐藤克彦、宮城島拓人、
内海 眞、山本直彦
第17回日本エイズ学会(神戸)
- 2、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

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 眞、
金田次弘

第17回日本エイズ学会(神戸)

- 3、ペンダント型亜鉛サイクレン錯体の抗HIV増殖抑制作用機序に関する研究
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17回日本エイズ学会(神戸)

- 4、高感度リアルタイムPCR法のバリデーション

永井裕美、和田かおる、森下高行、
内海 眞、西山幸廣、
金田次弘

第17回日本エイズ学会(神戸)

表 1

有効濃度 ($\mu\text{g/ml}$)		
サンプル No.	Magic-5 アッセイ	巨細胞抑制試験
201	$\geq 250-62.5$	抑制せず
235	$\geq 1,000-500$	$\geq 1,000$

表 2 薬剤耐性臨床分離株のアミノ酸変異

Virus	RT		PR		細胞嗜好性
	1 次変異	2 次変異	1 次変異	2 次変異	
#39	M184V	L210W	D30N	V77I, N88D	T
KK39-5	T69D, M184V, T215Y	D67N	G48V, V82A	A71V, V77I	T
KK81-3	T215Y	D67N	V82A, I84V	L10I, I54V A71V, V77I	T
#12	M184V		D30N	L63P, A71V	M
#31				L10I, M63I	M
#47			L90M	L63P	M

表3 III B 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)
	III B	# 39	KK39-5	KK81-3	
309-2	0.9	4.8	1.6	0.9	≥ 1000
309-5	24	200	24	24	≥ 1000
309-8	0.9	1.6	0.9	0.9	≥ 1000
310-2	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4 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
309-2	1.6	1.6	1.6	1.6	≥ 1000
309-5	40	40	24	40	≥ 1000
309-8	1.6	1.6	3.2	3.2	≥ 1000
310-2	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

分担研究者 関根 大正 東京都健康安全研究センター

研究要旨：配られた47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、47件の候補物質において、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。したがって、試験を行った47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。

研究協力者

村田以和夫 東京都健康安全研究センター
微生物部ウイルス研究科

負升 健志 東京都健康安全研究センター
微生物部ウイルス研究科

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

47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倍段階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）

本研究では細胞株およ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47件のうちいずれの候補物質でも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。サンプル番号3322番では、1回目の実験でウイルスによる細胞障害効果ははっきりしなかったが、再度実験したところ、表のように細胞障害効果が認められた。

D. 考察

47件の候補物質については我々の用いた実験方法では明らかな抗エイズウイルス活性は確認されない。サンプル番号3322番については、細胞障害効果ははっきりしないことがあったので、仮にこの物質が分画できるのならば、分画したものについてスクリーニング試験を行う価値はあると思われるが、このサンプルに関しては明らかな抗エイズウイルス活性は確認されなかった。

E. 結論

実施したスクリーニング試験において47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

なし。

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

平成15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
3289	160 μ g/ml 以下	実施濃度ではなし
3290	160 μ g/ml 以下	実施濃度ではなし
3291	160 μ g/ml 以下	実施濃度ではなし
3292	20 μ g/ml 以下	40 μ g/ml 以上
3293	500 μ g/ml 以下	実施濃度ではなし
3294	5 μ g/ml 以下	10 μ g/ml 以上
3295	10 μ g/ml 以下	20 μ g/ml 以上
3296	40 μ g/ml 以下	80 μ g/ml 以上
3297	125 μ g/ml 以下	250 μ g/ml 以上
3298	500 μ g/ml 以下	1000 μ g/ml 以上
3299	160 μ g/ml 以下	実施濃度ではなし
3300	320 μ g/ml 以下	実施濃度ではなし
3301	20 μ g/ml 以下	40 μ g/ml 以上
3302	0.63 μ g/ml 以下	1.25 μ g/ml 以上
3303	1000 μ g/ml 以下	実施濃度ではなし
3304	1000 μ g/ml 以下	1000 μ g/ml 以上
3305	160 μ g/ml 以下	実施濃度ではなし
3306	160 μ g/ml 以下	実施濃度ではなし
3307	160 μ g/ml 以下	実施濃度ではなし
3308	160 μ g/ml 以下	実施濃度ではなし
3309	80 μ g/ml 以下	160 μ g/ml 以上
3310	7.8 μ g/ml 以下	15.6 μ g/ml 以上
3311	10 μ g/ml 以下	20 μ g/ml 以上
3312	20 μ g/ml 以下	40 μ g/ml 以上
3313	10 μ g/ml 以下	20 μ g/ml 以上