

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
3314	2.5 $\mu\text{g/ml}$ 以下	5 $\mu\text{g/ml}$ 以上
3315	20 $\mu\text{g/ml}$ 以下	40 $\mu\text{g/ml}$ 以上
3316	20 $\mu\text{g/ml}$ 以下	40 $\mu\text{g/ml}$ 以上
3317	40 $\mu\text{g/ml}$ 以下	80 $\mu\text{g/ml}$ 以上
3318	20 $\mu\text{g/ml}$ 以下	40 $\mu\text{g/ml}$ 以上
3319	5 $\mu\text{g/ml}$ 以下	10 $\mu\text{g/ml}$ 以上
3320	40 $\mu\text{g/ml}$ 以下	80 $\mu\text{g/ml}$ 以上
3321	20 $\mu\text{g/ml}$ 以下	40 $\mu\text{g/ml}$ 以上
3322	160 $\mu\text{g/ml}$ 以下	320 $\mu\text{g/ml}$ 以上
3323	10 $\mu\text{g/ml}$ 以下	20 $\mu\text{g/ml}$ 以上
3324	10 $\mu\text{g/ml}$ 以下	20 $\mu\text{g/ml}$ 以上
3325	10 $\mu\text{g/ml}$ 以下	20 $\mu\text{g/ml}$ 以上
3326	160 $\mu\text{g/ml}$ 以下	実施濃度ではなし
3327	80 $\mu\text{g/ml}$ 以下	160 $\mu\text{g/ml}$ 以上
3328	80 $\mu\text{g/ml}$ 以下	160 $\mu\text{g/ml}$ 以上
3329	2.5 $\mu\text{g/ml}$ 以下	5 $\mu\text{g/ml}$ 以上
3330	10 $\mu\text{g/ml}$ 以下	20 $\mu\text{g/ml}$ 以上
3331	10 $\mu\text{g/ml}$ 以下	20 $\mu\text{g/ml}$ 以上
3332	40 $\mu\text{g/ml}$ 以下	80 $\mu\text{g/ml}$ 以上
3333	320 $\mu\text{g/ml}$ 以下	実施濃度ではなし
3334	160 $\mu\text{g/ml}$ 以下	320 $\mu\text{g/ml}$ 以上
3335	5 $\mu\text{g/ml}$ 以下	10 $\mu\text{g/ml}$ 以上

研究成果の刊行に関する一覧表

研究課題名	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
課題番号	H13-創薬-006
氏名	関根大正
	該当なし

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総合研究事業）
分担研究者研究報告書

エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究

分担研究テーマ：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

分担研究者 野口有三 横浜市衛生研究所検査研究課課長補佐兼担当係長

研究要旨

平成 14 年度の抗 HIV 増殖抑制候補医薬品 48 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、48 検体の全てに有効な抗 HIV 増殖抑制候補医薬品は認められなかった。しかし、サンプル No.03013, No.03014, No.03015, No.03043, No.03044, No.03045, No.03047 の 7 検体については、弱いながらも多少の HIV 増殖抑制効果が認められた。

1. 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。

No.03013(46~23 μ g/ml), No. 03014(46~23 μ g/ml), No.03015(56~28 μ g/ml), No.03043(15~7 μ g/ml), No.03044(33~16 μ g/ml), No.03045(16~8 μ g/ml), No.03047(13~6 μ g/ml)。

2. 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）。

4. 考 察

各機関で統一された検査法である平底プレートを用いた「5 日目観察法」によりスクリーニング検査を実施したが、従来から用いられていた「3 日目継代 6 日目判定法」を同時に採用した。両試験法の結果は、ほぼ同じであるが、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。

3. 研究成果

本年度、当衛生研究所の担当分 48 検体について、スクリーニング検査を実施した結果では、試験薬剤濃度(470~0.05 μ g/ml)の範囲内で、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.03013, No. 03014, No.03015, No.03043, No.03044, No.03045, No.03047 の 7 検体については、5 日目の最終判定では有効性は認められなかったが、3 日目の判定では、以下の試験薬剤濃度で弱いながらも、多少の HIV 増殖抑制効果が認められた。

5. 結 論

本年度の 48 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。

6. 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

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 益川 邦彦 神奈川県衛生研究所長
齋藤 隆行 微生物部専門研究員

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、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

48サンプル（03097～03144）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。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

細胞毒性の範囲は2.0 μ g/mL \geq ～250 μ g/mL \geq であり、10 μ g/mL以下の濃度で細胞毒性を示したものが48サンプル中9サンプルであった。

E. 結論

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

F. 研究発表

なし

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 本間 寛 北海道立衛生研究所長

協力研究者 伊木 繁雄 北海道立衛生研究所 微生物部ウイルス科

研究要旨

平成 15 年度エイズ医薬品等開発研究の一端として、送付された 50 件の被検薬剤（コード番号 03385～03434）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、各試験濃度で HIV 増殖抑制効果が有効と判定されるものは存在しなかったが、更に分画することで有効となる可能性のあるものが 7 件存在した。

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 15 年度エイズ医薬品等開発研究の一端として、送付された 50 件の被検薬剤（コード番号 03385～03434）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℃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 200μl 量で 1.5 × 10⁵/ml の濃度となるように浮遊させ、37℃で5日間培養した。被検薬剤は、試験時の濃度がそれぞれ 500～0.24μg/ml（No.03385～03403 及び 03415～03434）、50～0.025μg/ml（No.03404、03406～03407 及び 03409～03414）、60～0.03μg/ml（No.03405 及び 03408）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

今回の試験では、各試験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効果について、有効性の基準である2管以上の濃度に渡る抑制が認められた物質は存在しなかったものの、1管ではあるが抑制が見られた物質が7件（No.03392（250μg/ml）、03395（125μg/ml）、03399（125μg/ml）、03408（30μg/ml）、03427（125μg/ml）、03428（125μg/ml）及び 03433（250μg/ml））存在した。

D. 考察

5日目における判定の結果、50 件の被検薬剤のうち43件には、細胞毒性を示さない薬剤濃度で細胞障害を抑制する効果は全く見られなかった。しかし7件については、有効と判定するには至らなかったものの抑制効果が確認されたことから、これらの物質が抗 HIV 活性を保有している可能性が示唆された。またこれらの多くは天然物由来の粗抽出物であることから、夾雑物を取り除くことで毒性が低下し活性が上昇する可能性もあると考えられた。特に No.03433

は、250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度においてのみ効果が見られたが、125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でも現れた CPE はわずかであったことから、抽出状態の違いによって有効と判定される可能性は高い。

更にこれらの効果が期待できる候補物質について、由来となった天然物の他の部位や近縁種にまで拡大してその存在を調べることは、効果の再現性を確認できるだけでなく、高い安定性、高い純度、あるいはより高い活性を持つ類似化合物の発見にも繋がるものと考えられる。

E. 結論

当所において試験を行った 50 件の被検薬剤の中には、各試験濃度で HIV 増殖抑制効果が有効と判定されるものは存在しなかったが、更に分画することで有効となる可能性のあるものが 7 件存在した。

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(1/2)

課題番号：H13-創薬-006				棚元憲一(国立医薬品食品衛生研究所)			
著者氏名	論文タイトル	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
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. <i>Jpn J Infect Dis</i> 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. <i>Microbiol & Immunol</i> 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 <i>Suberites domuncula</i> . <i>J Biol Chem</i> 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. <i>Hepatology Research</i> 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. <i>JARMAN</i> 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. <i>J. J. A. Infect. Dis</i> 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. <i>Microbiol Immunol</i> 47: 591-9, 2003.							
8)Yan H, Yagy 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. <i>J Virol Methods</i> 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. <i>J Clin Microbiol J Clin Microbiol</i> 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. (<i>J Med Virol in press</i>)							
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. (<i>J Clin Microbiol in press</i>)							
12)Hansman GS, Doan LT, Katayama K, Kgyuen TA, Okitsu S, Kato Y, Nishio O, Takeda N, Ushijima H. Norovirus strains belongong to the Lordsdale virus cluster are a major cuase of acute sporadic infantile gastroenteritis in Ho Chi Minh city, Vietnam (<i>J Clin Microbiol submitted</i>)							
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. <i>J Clin Pathol</i> 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. <i>J Virol Methods</i> 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. <i>J Gen Virol</i> 85: 283-292, 2004.							

研究成果の刊行に関する一覧表(2/2)

課題番号：H13-創薬-006				棚元憲一(国立医薬品食品衛生研究所)			
著者氏名	論文タイトル	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
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, <i>Arzneim.-Forsch/Drug Res.</i> 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 <i>Perilla frutescens</i> Britton inhibits an early stage of HIV-1 replication without blocking viral adsorption, <i>Antiviral Chemistry and Chemotherapy</i> , 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 <i>Coleus parvifolius</i> , <i>Phytotherapy Research</i> , 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 two-stage BALB/3T3 cell transformation assay. <i>Biol. Pharm. Bull.</i> 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 MD-2. <i>Clin. Diagn. Lab. Immunol.</i> 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 <i>Escherichia coli</i> lipopolysaccharide preparations. <i>Infect. Immun.</i> 71(6), 3221-3226, 2003							
22) Ogawa Y., Kawamura Y., Kikuchi Y., Nishimura T., Nishikawa J., Nishihara T. & Tanamoto K. Estrogen receptor binding activities of UV stabilizer used in food contact plastics and benzophenone derivatives. <i>J. Health Sci.</i> 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. <i>J. Food Hyg. Soc Japan</i> 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. <i>Pharmacol Ther.</i> 2003 Nov;100(2):171-194.							
25) Kawasaki Y., Yomota C. & Tanamoto K. Determination of six p-hydroxybenzoic acid esters in laver (Nori) by HPLC. <i>Bull. Natl. Inst. Health Sci.</i> , 121, 48-50, 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. <i>Food Addit Contam.</i> 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. <i>Japanese Journal of Food Chemistry</i> 10(3), 138-144, 2003							
28) Sugimoto N., Sato K., Yamazaki T. & Tanamoto K. Analysis of constituents in Jamaica Extract, a natural bittering agent. <i>J. Food Hyg. Soc. Japan</i> 44(6), 328-331, 2003							