

200400856A

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

エイズ医薬品候補物質のスクリーニングを基盤とした、
抗エイズ新薬開発に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

棚元 憲一

平成17(2005)年 4月

エイズ医薬品候補物質のスクリーニングを基盤とした、

抗エイズ新薬開発に関する研究

平成16年度 研究組織

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 部長

分担研究者

牛島 廣治	東京大学大学院	医学系研究科	教授
小河 正雄	大分県衛生環境研究センター	微生物学	主幹研究員
千々和勝己	福岡県保健環境研究所	ウイルス学	課長
秋吉 京子	神戸市環境保健研究所	微生物部	研究員
石崎 徹	京都府保健環境研究所	細菌ウイルス課	主任研究員
貞升 健志	東京都健康安全研究センター		主任研究員
齋藤 隆行	神奈川県衛生研究所	微生物部	専門研究員
野口 有三	横浜市衛生研究所	ウイルス学	課長補佐
本間 寛	北海道立衛生研究所	微生物部ウイルス科	所長
大竹 徹	大阪府立公衆衛生研究所	感染症部ウイルス課	課長
山本 直彦	名古屋大学大学院	医学系研究科	助教授
星野 洪郎	群馬大学大学院	医学系研究科	教授

協力研究者

須賀 知子	神戸市環境保健研究所
森 治代	大阪府立公衆衛生研究所
川畑 拓也	大阪府立公衆衛生研究所
小島 洋子	大阪府立公衆衛生研究所
森下 高行	愛知県食品衛生検査所
佐藤 克彦	愛知県衛生研究所
秋場 哲哉	東京都健康安全研究センター
長島 真美	東京都健康安全研究センター
甲斐 明美	東京都健康安全研究センター
諸角 聖	東京都健康安全研究センター
伊木 繁雄	北海道立衛生研究所
大槻 貴博	群馬大学大学院医学系研究科
清水 宣明	群馬大学大学院医学系研究科

目 次

I 総括研究報告

- エイズ医薬品候補物質のスクリーニングを基盤とした、
抗エイズ新薬開発に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・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・・・・・・・・・・・・13
牛島 廣治
2. エイズ医薬品候補物質のスクリーニングを基盤とした、抗エイズ新薬開発に関する研究・・20
小河 正雄
3. エイズ医薬品候補物質のスクリーニングを基盤とした、抗エイズ新薬開発に関する研究・・22
千々和勝己
4. エイズ医薬品候補物質のスクリーニングを基盤とした、抗エイズ新薬開発に関する研究・・26
秋吉 京子
5. エイズ医薬品候補物質のスクリーニングを基盤とした、抗エイズ新薬開発に関する研究・・29
抗 HIV 候補薬のリアルタイム PCR 法を応用した薬剤のスクリーニング I
石崎 徹
6. エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究・・・・・・・・・・・・33
貞升 健志
7. エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究・・・・・・・・・・・・35
齋藤 隆行
8. エイズ医薬品候補物質のスクリーニングを基盤とした、抗エイズ新薬開発に関する研究・・36
本間 寛
9. エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究・・・・・・・・・・・・38
野口 有三
10. MAGIC-5A 細胞を用いた抗 HIV 活性スクリーニング試験・・・・・・・・・・・・40
大竹 徹
11. MAGIC 5 A 細胞を用いたスクリーニング試験・・・・・・・・・・・・43
山本 直彦
12. GFP 発現を指標とした HIV 感染検出系の開発・・・・・・・・・・・・49
星野 洪郎

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物

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を基盤とした、抗エイズ新薬開発に関する研究

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：1 企業、4 大学及び 2 国公立研究所から寄せられた合計 505 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 11 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 27 サンプルと、延べ 38 の物質に活性が認められた。スクリーニング法開発として GFP 発現を指標とした indicator cell line を開発したが、HIV の感染を迅速かつ特異的に検出する事が可能であることから、抗 HIV 剤スクリーニングへの応用が可能である。また、リアルタイム PCR 法を応用した薬剤のスクリーニング法を検討した結果、今回設計したプライマーとプローブは、抗ウイルス薬の薬剤効果判定に有効である事を確認した。この方法は、新たな作用領域の推定にも応用できる。

分担研究者

本間 寛	北海道立衛生研究所
石崎 徹	京都府保健環境研究所
齋藤 隆行	神奈川県衛生研究所
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
小河 正雄	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
千々和勝己	福岡県保健環境研究所
牛島 廣治	東京大学大学院
山本 直彦	名古屋大学大学院
貞升 健志	東京都健康安全研究センター
星野 洪郎	群馬大学大学院

問題が起こってきている。一方、米国やアフリカ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い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。このような背景を受けて本研究では、以下の 3 本柱を掲げてエイズ医薬品の探索、さらには創薬への発展を目指す。一つ目は、この研究班の基盤である、従来より行ってきた新薬候補物質探索のためのスクリーニング研究を、より拡張した形で

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

継承することである。戦略として、従来は H S 財団経由のみで、極めて短期間のサンプル収集であったところを、より幅広いルート開発と、期間を限定せず通年でのサンプル収集およびスクリーニングの実施を行う。また、スクリーニング法も従来の MT-4 細胞に対する細胞傷害性抑制試験および Molt 4 細胞を用いた巨細胞形成抑制試験に加え、一昨年よりマクロファージ好性 MAGIC-5A 細胞アッセイも加え始めた。さらに遺伝子工学的技術を用いて、迅速かつ高精度で、新たな作用点を有する薬剤発見にもつながるスクリーニング法の開発を行う。2 つ目は、当研究班で見いだした有力な活性物質群、さらには今後補足される医薬品候補物質の創薬に向けての基礎的な研究である。系統的な作用点の解析による作用機構の解明、in vivo 実験、さらには物質の化学修飾・部分合成等により、創薬への開発研究に繋げようと言うものである。さらに 3 つ目は耐性ウイルス対策として、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、2 次スクリーニングとして 1 次スクリーニング陽性の薬剤に対して変異株に対する有効性を確認する。以上のように、本研究は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、総合的な新規エイズ医薬品の開発へと系統的に発展させるものである。

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 16 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、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 箇所に分かれるように送付され、そこで MAGIC-5A 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-5A 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与抗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°C1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-5A 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 μ 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。

(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等も試験する。

(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。

新規スクリーニング方法の開発

1) ウイルスを用いない巨細胞形成抑制試験

ウイルスを用いない巨細胞形成抑制試験として、それぞれCD4(HeLa/T4)とHIVgp160遺伝子(HeLa/KS386)を組み込んだ2種類の細胞による擬似感染モデルを作成した。このHeLa/KS386とHeLa/T4の巨細胞形成においてレセプターがどのように働いているか調べるために電子顕微鏡(日立電子顕微鏡(H-7100型))で経時的に細胞融合を観察した。

2) GFP発現を指標としたHIV感染検出系の開発

HIV-1のlong Terminal Repeat (LTR)のpromoterで発現制御される*green fluorescent protein (GFP)*遺伝子を持つplasmid (pHIVLTR-GFP)を、CD4とCCR5あるいはCXCR4を発現させたNP-2細胞(NP-2/CD4/CCR5およびNP-2/CD4/CXCR4)へ導入し、細胞のクローニングによりindicator cell lineを開発した。

3) リアルタイムPCR法を応用したスクリーニング法の開発

AZT を用いてプライマー、プローブの有効性について検討した。96 穴培養プレート中で、AZT を 10%FCS を含む RPMI-1640 培養液にて 1000 μ g/ml から 0.025 μ g/ml まで 12 段階の希釈を行った(各ウエル液量は 100 μ L)。次に HIV(HTLV III b 株) を 100TCID₅₀/ml に感染させた 3x10⁶個/ml の MT-4 細胞を用意し、それぞれのウエルに 100 μ L 混合した後、37°C で培養した。経時的に細胞を採取し、HIV 関連 mRNA を抽出後、リアルタイムPCR機で、HIV 特異的な種々の遺伝子(env, pol, gag) 領域について半定量的に遺伝子量を測定した。

C. 研究結果

エイズ医薬品候補物質スクリーニング

1 企業、4 大学及び 2 国公立研究所から寄せられた合計 505 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 11 サンプルにおいて抗 HIV 活性が認められ、27 サンプルが MAGIC-5A アッセイで活性を示した。これらのうちマイクロプレート法及び MAGIC-5A アッセイ両方に活性を示したものはわずか 5 サンプルであり、多くのものは T 細胞好性ウイルス及びマクロファージ好性ウイルスの増殖を選択的に抑制した。活性強度に関してはマイクロプレート法で 0.03 μ g/ml でも有効なサンプルが見いだされ、またマクロファージ好性ウイルスの増殖を抑制したサンプルの中には IC₅₀ が 2 μ g/ml 前後という強い抗ウイルス効果を示したものがあ

った。

新規スクリーニング方法の開発

1) ウイルスを用いない巨細胞形成抑制試験：二種の細胞は融合時間が経過するにつれてお互いが接着し、大形の細胞塊を形成した。両者の細胞の細胞膜は完全に密着することなく少しの間隔を開けて向かい合って存在し、その間に 30nm の大きさの高電子密度の粒子が観察された。しかし、融合処理 110 分後に至るまで、両者の細胞膜が融合することはなかった。

2) GFP 発現を指標とした HIV 感染検出系の開発：HIV-1 感染 2~3 日後に合胞体を形成すると共に GFP の蛍光が有意に増大する 3 つのクローンが得られた。これらの細胞は、HIV-1 が感染した時のみ、GFP の蛍光が検出された。Indicator cell における CD4、CCR5、CXCR4 の発現は、CD4 (10%)、CCR5 (23.1%)、CXCR4 (0%) であった。GFP 発現誘導はウイルス濃度に比例し、感染後の日数が進むにつれてその率が増加した。GFP 発現細胞率と Immunofluorescent assay (IFA) による HIV 抗原陽性細胞率と相関した。また、細胞指向性の異なる HIV-1 感染では、それぞれのウイルスのコレセプター利用能と特異的な GFP の発現がみられた。AZT、dextran sulfate を用いて抗ウイルス剤の感染阻害効果の定量を試みたところ、共に薬剤濃度依存的に GFP 発現を抑制した。AZT の IC₅₀ は 2ng/ml、IC₉₀ は 27ng/ml であった。Dextran sulfate の IC₅₀ は 0.6 μ g/ml、IC₉₀ は 3.8 μ g/ml であった。

3) リアルタイムPCR法を応用したスクリーニング法の開発：標準ウイルスの HIV(HTLVIII b 株)において、これらのブラ

イマー、プローブを用いたところ、gag, pol, env 遺伝子の特異的増幅が認められた。また、AZT を作用させた HIV 感染 MT-4 細胞からの mRNA について、gag、env 遺伝子の特異的増幅は認められたが、pol 遺伝子の増幅は認められず、AZT の薬理作用による遺伝子増幅抑制を顕著に捉えることができた。

D. 考察

サンプル収集に関しては、従来は HS 財団の募集による収集のみであったが、今年度は研究班でも独自に全国規模での試料提供可能な施設のリスト作りを行い、積極的な資料収集を行った。その結果、本研究が始まって以来最も多い 505 サンプルの供与を受けることが出来た。またこれまでは極めて短期間でのサンプル収集であったが、この方法により通年でのサンプル収集、およびスクリーニング試験の実施を行うことが可能となった。さらにこの方法により、本研究班員とサンプル提供者との間に個人的な繋がりが出来、ある意味では共同研究的な要素が芽生え、活性を持つ薬剤が見出された場合はその物質に焦点を絞って精製を進めることや、由来となった天然物の他の部位や近縁種得から得られたサンプルについての提供を依頼すること等により、系統的に研究を進めることが可能となった。単なるランダムなサンプル収集ではあり得なかった有望なサンプルの開発に繋がる方法である。

1 企業、4 大学及び 2 国公立研究所から寄せられた合計 505 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 11 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 27 サンプルに活性が見られた。それらの中で、両方に対して活性を示したサンプルは 5 サンプルであった。マイクロプレート法での陽性サンプルの中では、これまでになく非常に強い活性体が見られた。最も強い活性体は $0.03\mu\text{g/ml}$ で有効であり、また毒性が非常に弱いことから医薬品応用への期待が持たれる。一方、マクロファージ好性ウイルスの増殖を抑制した 27 検体のうち 8 件はその抑制濃度が約 $10\mu\text{g/mL}$ と比較的強い抗ウイルス作用を示した。興味深いことに IC50 が $2\mu\text{g/mL}$ 前後という強い抗ウイルス効果を示した 2 件 (No.4158, 4204) を含めて 17 件の検体が今回の MAGIC-5A アッセイのみで活性が示され、T 細胞好性ウイルスの T 細胞 (MT-4 細胞) における抗ウイルス試験で活性が示されなかったことである。このことはこれら 17 件の検体がマクロファージ好性ウイルスのみの増殖を選択的に抑制する性質をもつ可能性が考えられる。

表 1 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、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、サンプル提供者との協議のもと、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。実際、今年度の陽性サンプル提供者の中には本研究班との共同研究を望む研究者もいることから、創薬への研究推進が期待される。

E. 結論

1企業、4大学及び2国公立研究所から寄せられた合計505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11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は27サンプルと、延べ38もの多くの物質に活性が認められた。活性自体もかなり強いこと、多くは天然由来の粗抽出物であることから、創薬への発展が大いに期待される。また、いくつかの新規スクリーニング方法の開発研究を推進した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yagyu F., Okitsu S., Tanamoto K. & Ushijima H. Determination of HIV-1 subtypes (A-D, F, G, CRF01_AE) by PCR with novel designed primers. J. Med virol. 2005
2. Hatao F, Hiki N, Mimura Y, Ogawa T, Kojima J, Mafune K, Hawkins LD, Muroi M, Tanamoto K., Kaminishi M. The induction of super-resistance using synthetic lipopolysaccharide receptor agonist rescues fatal endotoxemia in rats without excessive immunosuppression. Shock. 23, 365-370, 2005.
3. Kawamura Y., Mutsuga M., Kato T., Iida M. and Tanamoto K. Estrogenic and anti-androgenic activities of benzophenones tested by the human estrogen and androgen receptor mediated receptor gene assays. J. Health Sci, 51, 48-54, 2005
4. Mutsuga M., Tojima T., Kawamura Y. & Tanamoto K. Determination of formaldehyde, acetaldehyde and pigments in PET food packaging. Food. Addit. Contam. 2004
5. Sato S., Uematsu Y., Isagawa S., Tateba H., Tomisawa M., Oosaki K., Hasebe A., Shibuya S., Nii H., Higashinaka R., Watanabe I., Yamazaki S., Tanamoto K. & Maitani T. Analysis of residual solvents in natural flavourings by headspace GC using the standard addition method. J. Food Hyg. So. 45, 302-306, 2004
6. Yashiro T., Sugimoto N., Sato K., Yamazaki T. & Tanamoto K. Analysis of Absintin in Absinth extract bittering agent. Jpn. J. Food Chem. 11, 86-90, 2004

7. Kikuchi Y., Kakeya T., Sakai A, Takatori K., Nakamura N., Matsuda H., Yamazaki T., Tanamoto K. & Sawada J. In vitro propagation of a sporadic CJD-like form of PrP^{Sc} in long-term cultured human glioblastoma cell line T98G. J. gen. Virol. 85, 3449-3457, 2004
8. Hatao H., Muroi M., Hiki N., Ogawa T., Mimura Y., Kaminishi M & Tanamoto K. Prolonged Toll-like receptor stimulation leads to down-regulation of IRAK-4 protein. L. Leukocyte Biol. 2004
9. Iso A., Sugimoto N., Sato K., Yamazaki T., Ishibashi K., Shiomi S. & Tanamoto K. Identification of Alo extract, a natural thickening stabilizer. J. Food Hyg. Soc. Japan, 44(6), 328-3331, 2004
10. Hong C-C., Shimizu M., Muroi M. & Tanamoto K. Effects of endocrine disrupting chemicals on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- and nitric oxide production by mouse macrophages. Biol. Pharm. Bull. 27(7), 1136-1139, 2004
11. Kubota H., Ohnishi Y., Yomota C. & Tanamoto K. Analysis of ferrocyanides in grade salts. Jpn. J. Food Chem. 11, 32-35, 2004
12. Abe-Onishi, Y., Yomota, C., Sugimoto, N., Kubota, H. & Tanamoto, K. Determination of benzoyl peroxide and benzoic acid in wheat flour by high performance liquid chromatography and its identification by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 1040, 211-216, 2004
13. Ohkado Y., kawamura Y., Mutsuga M., Tamura H & Tanamoto K. Analysis of Residual volatiles in recycled polyethylene terephthalate. J. Food Hyg. Soc. Japan, 45, 13-20, 2005.
14. Tamura K, Oue A, Tanaka A, Shimizu N, Takagi H, Kato N, Morikawa A, and Hoshino H. Efficient formation of vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing the native forms of hepatitis C virus envelope proteins detected after sonication. Microbes Infect. 2005, 7: 29-40.
15. Shimizu A, Shimizu N, Tanaka A, Jinno-Oue A, Roy BB, Shinagawa M, Ishikawa O, and Hoshino H. Human T-cell leukaemia virus type I is highly sensitive to UV-C light. J. Gen. Virol. 2004. 85:2397-406.
16. H. Nagai, K. Wada, T. Morishita, M. Utsumi, Y. Nishiyama and T. Kaneda New estimation method for highly sensitive quantitation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA and its application. J. Virol. Methods, in press.
17. Yagyu F, et al. Determination of HIV-1 subtypes (A, B, C, D, G, CRF01_AE) by PCR in the transmembrane region (gp41) with novel primers. J Med Virol In press
18. Phan TG, et al. Etiologic agents of acute gastroenteritis among Japanese infants and children: virus diversity and genetic analysis of sapovirus.

Arch Virol In press

19. Hansman GS, et al. Characterization of polyclonal antibodies raised against five virus-like particles. Arch Virol In press
20. Oka T, et al. Proteolytic processing of sapovirus ORF1 polyprotein. J Virol In press
21. Phan TG, et al. A novel RT-multiplex PCR for enteroviruses, hepatitis A and E viruses and influenza A virus among infants and children with diarrhea in Vietnam. Arch Virol In press
22. Li L, et al. Molecular Epidemiology of Adenovirus Infection among Pediatric Population with Diarrhea in Asia. Microbiol Immunol 49(2):121-128, 2005
23. Phan TG, et al. Genetic diversity of sapovirus in fecal specimens from infants and children with acute gastroenteritis in Pakistan. Arch Virol 150(2):371-377, 2005
24. Yan H, et al. Outbreak of acute gastroenteritis associated with group A rotavirus and genogroup I sapovirus among adults in a mental health care facility in Japan. J Med Virol 75(3):475-481, 2005
25. Hansman GS, et al. Viral gastroenteritis in Mongolian infants. Emerg Infect Dis 11(1): 180-182, 2005
26. Hansman GS, et al. Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. Arch Virol 150(1):21-36, 2005
27. Li L, et al. Characterizations of adenovirus type 41 isolates from children with acute gastroenteritis in Japan, Vietnam, and Korea. J Clin Microbiol 42(9):4032-4039, 2004
28. Phan TG, et al. Virus diversity and an outbreak of group C rotavirus among infants and children with diarrhea in Maizuru city, Japan during 2002-2003. J Med Virol 74(1):173-179, 2004
29. Yan H, et al. Development of RT-multiplex PCR assay for detection of adenovirus and group A and C rotaviruses in diarrheal fecal specimens for children in China. Kansenshogakuzasshi 78(8):699-709, 2004
30. Hansman GS, et al. Detection of norovirus and sapovirus infection among children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. Arch Virol 149(9):1673-1688, 2004
31. Phan TG, et al. Human astrovirus, norovirus (GI, GII), and sapovirus infections in Pakistani children with diarrhea. J Med Virol 73(2):256-261, 2004
32. Okitsu-Negishi S, et al. Molecular epidemiology of viral gastroenteritis in Asia. Pediatr Int 46(2):245-252, 2004
33. Ushijima H and Eshita Y. Foreword: Molecular epidemiology of viral

- infection in Asia. *Pediatr Int* 46(2):202-206, 2004
34. Sakamoto T, et al. 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, 2004
 35. Hansman GS Genetic diversity of Norovirus and Sapovirus in hospitalized infants with sporadic cases of acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J Clin Microbiol* 42:1305-1307, 2004
 36. Adhikary AK, et al. Characterization of hexon and fiber genes of a novel strain of adenovirus involved in epidemic keratoconjunctivitis. *J Clin Pathol* 57:95-97, 2004
 37. Tran TTH, et al. Genotypic C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups. *J Gen Virol* 85 :283-292, 2004
 38. Tran TTH, et al. Characteristics of core promoter and precore stop codon mutants of hepatitis B virus in Vietnam. *J Med Virol* 74:228-236, 2004
 39. Urata H, Kumashiro T, Kawahata T, Otake T, Akagi M, Anti-HIV-1 activity and mode of action of mirror image oligodeoxynucleotide analogue of zintevir, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313, 55-61, 2004
 40. 森 治代、小島洋子、川畑拓也、大竹 徹、巽 正志、コレセプター阻害剤を用いた R5/X4 ウイルス測定法、*MINOPHAGEN MEDICAL REVIEW* vol.49, 81-82, 2004
 41. Dan Turner, Bluma Brenner, Daniela Moisi, Mervi Detorio, Raymond Cesaire, Takashi Kurimura, Haruyo Mori, Max Essex, Shlomo Maayan and Mark A. Wainberg, Nucleotide and Amino Acid Polymorphisms at Drug Resistance Sites in Non-B-Subtype Variants of Human Immunodeficiency Virus Type 1, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 2993-2998, 2004
 42. 大竹 徹、ウイルスの高圧不活化と血液製剤への利用、*FFI ジャーナル*、210(1)、44-48、2005

2. 学会発表

- 1) 大竹 徹、川畑拓也、森 治代、小島洋子、早川 潔、凍結昇圧法によるヒト免疫不全ウイルスの不活化、第14回抗ウイルス化学療法研究会、名古屋、2004
- 2) 森 治代、小島洋子、川畑拓也、大竹 徹、未治療 HIV-1 感染者に検出された V108I 変異の NVP 耐性獲得に対する影響、第18回日本エイズ学会、静岡、2004
- 3) Dhole TN, N.Yamamoto. Presence of Primary mutations Associated with Protease inhibitor Resistance in Antiviral-naïve HIV-1 infected patient in India 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, February 2005. Boston
- 4) Dhole TN, N.Yamamoto A T69N and K74I mutation in HIV-1 clade C viruses exposed to Protease inhibitors confers cross resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic

Infections, February 2005. Boston

- 5) 山本直彦、森下高行、佐藤克彦、森治代、川畑拓也、大竹徹、伊部史朗、金田次弘『Non-subtype B型HIVにみられる薬剤耐性関連遺伝子に関する研究』（日本ウイルス学会、2004年、横浜）
- 6) 山本直彦、森下高行、佐藤克彦、伊部史朗、金田次弘『ケニアにおける未治療 HIV 感染者の薬剤耐性遺伝子とサブタイプの流行状況について』（日本エイズ学会、2004年、静岡）
- 7) Shimizu N, Tanaka A, Oue A, Takebe Y, and Hoshino H. G protein-coupled receptors, CCR9B, D6, FML1, and XCR1, have capacity to mediate the CD4-dependent infection of HIV-1, HIV-2, and SIV as coreceptors. XV International AIDS Conference, Bangkok, 11-16 July, 2004
- 8) Jinno-Oue A, Shimizu N, Soda Y, Tanaka A, Ohtsuki T, Kurosaki D, and Hoshino H. Inhibition of HIV-1 infection by the synthetic ppeptide derived from the NH₂-terminal extracellular region of an orphan G protein-coupled receptor, GPR1. XV International AIDS Conference, Bangkok, 11-16 July, 2004
- 9) 大上厚志、清水宣明、田中 淳、星野洪郎. ヒト脳微小血管由来周皮細胞に指向性の HIV-1 変異株の利用する coreceptor, GPR1 のアミノ末端側合成ペプチドによる多様な HIV-1 株の感染抑制；第 8 回日本神経ウイルス研究会（札幌）. 2004 年 6 月 11-12 日
- 10) 田中 淳、清水宣明、品川雅彦、大上厚志、星野洪郎. ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型（HTLV-I）感染を促進する細胞膜蛋白について；第 8 回日本神経ウイルス研究会（札幌）. 2004 年 6 月 11-12 日
- 11) 清水宣明、田中 淳、園田美奈、大上厚志、武部 豊、草川 茂、星野洪郎. ケモカイン・レセプター-D6, 及びフォルミルペプチド・レセプター-FML1 の HIV-1 コレセプター活性の解析；第 52 回日本ウイルス学会学術集会（横浜）. 2004 年 11 月 21-23 日
- 12) 田中 淳、清水宣明、大上厚志、品川雅彦、星野洪郎. ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型（HTLV-I）感染を促進する細胞膜蛋白について；第 52 回日本ウイルス学会学術集会（横浜）. 2004 年 11 月 21-23 日
- 13) 田村一志、大上厚志、清水宣明、加藤宣之、星野洪郎. Native form の HCV をもつ VSV pseudotype virus の作製、およびその感染性についての検討；第 52 回日本ウイルス学会学術集会（横浜）. 2004 年 11 月 21-23 日
- 14) 清水宣明、田中 淳、園田美奈、大上厚志、星野洪郎. HIV-1 との相互作用に関与する GPR1 の N 末端側細胞外領域のアミノ酸配列の解析；第 18 回日本エイズ学会学術集会（静岡）. 2004 年 12 月 9-11 日
- 15) 大槻貴博、清水宣明、大上厚志、巽 正志、星野洪郎. GPR1 をコレセプターとして使用する HIV-1 株の感染を検出する細胞株の作製；第 18 回日本エイズ学会学術集会（静岡）. 2004 年 12 月 9-11 日
- 16) 大上厚志、清水宣明、田中 淳、大槻貴博、星野洪郎. HIV-1 変異株の利用する coreceptor, GPR1, のアミノ末端側合成ペプチドによる多様な HIV-1 株の感染抑制；第 18 回日本エ

イズ学会学術集会（静岡）. 2004年12月9-11日

- 17) 藤 秀義、田中真理、宮内浩典、松田善衛、星野忠次、有吉紅也、星野洪郎、佐藤裕徳、横幕能行. HIV-1env クローニングライブラリー作成の試み—HIV-1env の迅速なクローニング、発現および組み換えウイルス作成システムの構築—; 第18回日本エイズ学会学術集会（静岡）. 2004年12月9-11日

H. 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16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 ($\mu\text{g/ml}$)	MAGIC 5(IC_{50}) ($\mu\text{g/ml}$)
04056	植物	7.8-2.0	0.26mg
04067	植物抽出物	-	3.5
04092	同上	-	30.2
04158	植物抽出物	-	1.9
04169	同上	-	26
04173	同上	-	21.5
04175	同上	-	8.4
04204	同上	-	2.6
04226	伝統薬物抽出物	-	16.2
04315	同上	-	2.9
04351	同上	-	11.6
04353	同上	-	19.5
04377	同上	>100-0.03	-
04380	同上	-	10.5
04391	同上	>100-0.8	-
04394	同上	-	15.0
04397	同上	>100-0.16	-
04406	同上	-	25.0
04412	植物抽出物	-	30.5
04415	同上	$\geq 500-125$	30.0
04431	植物抽出物	-	35.0
04432	同上	-	21.0
04445	同上	-	44.0
04453	植物由来化合物	$\geq 50-12.5$	-
04455	同上	$\geq 50-6.25$	-
04457	同上	$\geq 50-6.25$	-
04461	動物由来多糖	$\geq 289-12$	10.0
04463	合成品	>1100-9	8.8
04464	動物由来多糖	$\geq 1000-8$	7.2
04494	植物抽出物	-	84.0
04495	植物抽出物	-	39.0
04497	植物抽出物	-	56.0
04503	同上	-	67.0

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16年度送られてきた103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でスクリーニングを行った。6サンプルが細胞傷害抑制を示した。

巨細胞形成の電子顕微鏡観察においては融合処理110分後に至るまで細胞膜が融合している場面に遭遇しなかったものの、細胞膜間に30nmの大きさの高電子密度粒子が観察された。

三つの絨毛癌細胞 (BeWo, JEG-3, JAR) に発現するGタンパクレセプターは三つの細胞間で発現の強弱に差はあるものの、C5a receptor、CCR7、CCR9/CCR10、RDC1で、どの細胞にも発現していることが確認された。

A. 研究目的

A-1. 細胞傷害抑制試験による抗 HIV 薬のスクリーニング

平成16年度送られてきた103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でスクリーニングを行った。

A-2. HeLa/KS386とHeLa/T4の巨細胞形成の電子顕微鏡観察

ウイルスを用いない巨細胞形成抑制試験として、それぞれCD4(HeLa/T4)とHIVgp160遺伝子(HeLa/KS386)を組み込んだ2種類の細胞による擬似感染モデルがある。このHeLa/KS386とHeLa/T4の巨細胞形成においてレセプターがどのように働いているか調べるために電子

顕微鏡で観察した。

A-3. 絨毛癌細胞に発現するGタンパクレセプター

アジアでは特に女性感染者の増加が顕著であり、現在では男女比は同等となるまでに至っている。わが国においてもHIV感染妊婦と母子感染の急増が危惧され、より有効な予防対策の確立が急務である。そこで、ウイルス感染阻害薬のスクリーニングを胎盤感染阻止まで対象を広げていく。胎盤感染において用いられるコレセプターを同定するために絨毛癌細胞を対象にし、HIVのコレセプターとなり得るGタンパク受容体の発現について探索的に調べた。

B. 研究方法

B-1. 細胞傷害抑制試験による抗HIV薬のスクリーニング

スクリーニングは103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 2×10^6 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 2×10^6 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。阻害効果が見込めるものについてはより低い濃度について調べられるように5倍希釈を使った。

B-2. HeLa/KS386とHeLa/T4の巨細胞形成の電子顕微鏡観察

HeLa/KS386とHeLa/T4を1:1の比率で混ぜ合わせ、経時的に融合過程を観察した。プラスチックシートに培養した両細胞を等量添加して、10分、20分、50分、60分、70分、80分、90分、100分、110分後に細胞を固定した。最終濃度1.5%グルタルアルデヒド (1/15 Mリン酸緩衝液, pH7.4) になるように固定液を加えて前固定を行った。その細胞を1%四酸化オスミウムと0.8%フェロシアン化カリの混合液 (0.1Mカコシル酸緩衝液) で1時間、後固定した。その後、標本を1%没食酸水溶液に室温、30分浸漬し、1%酢酸ウランで更に30分処理した。さらに、アルコール脱水した後に、Quetol 812樹脂に細胞を培養しているシートを包埋した。シートに載っている細胞から切片を作製し、これらに4%酢酸ウランで20分、クエン酸鉛で10分、電子染色を施した。これら切片は日立電子顕微鏡 (H-7100型) で観察した。

B-3. 絨毛癌細胞に発現するGタンパクレセプター

三つの絨毛癌細胞 (BeWo, JEG-3, JAR) にどのようなGタンパク受容体が発現しているかをRT-PCRを用いて調べた。RT-PCRに用いたGタンパク受容体のプライマーは、APJ、C5a receptor、CCR1、CCR4、CCR7、CCR9/CCR10、CXCR3、CXCR4、CXCR5/BLR1、DEZ α 、DEZ β 、Duffy antigen、GPR9-6、GPR5、GPR12、GPR15、GPR25、RDC1のmRNAをターゲットにしたものを用いた。

C. 研究結果

C-1. 細胞傷害抑制試験による抗HIV薬のスクリーニング

スクリーニングの結果は表1に示した。103サンプルのうち6サンプルが抗HIV活性を示した。

C-2. HeLa/KS386とHeLa/T4の巨細胞形成の電子顕微鏡観察

電顕解析すると、二種の細胞は融合時間が経過するにつれてお互いが接着し、大形の細胞塊を形成した。始めは細胞表面の細胞突起が別の細胞表面に接触し、ついで接触面は広範囲になった。接触面では細胞突起は消失し平滑な細胞膜がお互いに向き合っていた。両者の細胞の細胞膜は完全に密着することなく少しの間隔を開けて向かい合って存在し、その間に30nmの大きさの高電子密度の粒子が観察された。この粒子と両者の細胞膜は接触していた。しかし、融合処理110分後に至るまで、両者の細胞膜が融合している場面に遭遇しなかった。写真は図1に示した。

C-3. 絨毛癌細胞に発現するGタンパクレセプター

実験は4回行い、同様の結果が得られた。結果は表2に示した。C5a receptor、CCR7、CCR9/CCR10、RDC1は三つの細胞間で発現の強弱に差はあるものの、どの細胞にも発現していることが確認された。この中で、少なくともCCR9やCXCR4、RDC1は他の論文からHIVのコレセプターとなることが確認されている。

D. 考察

D-1. 細胞傷害抑制試験による抗HIV薬のスクリーニング

これらの効果のあった薬剤については巨細胞抑制試験等のほかの方法でも検討の必要がある。

D-2. HeLa/KS386とHeLa/T4の巨細胞形成の電子顕微鏡観察

細胞の融合にかかる時間は110分以上である事が分かった。混合培養後110分では多核の細胞塊は完全な合胞体とはならず多数の細胞が密着している像であると判断出来る。また、向かい合った細胞膜に見られた高電子密度の粒子には何か融合に関わる構造的基盤を示している可能性がある。

D-3. 絨毛癌細胞に発現するGタンパクレセプター

同じ絨毛癌細胞でも、種類が違っていると発現しているコレセプターの種類に違いが見られ、また発現量も異なっている。実際の胎盤での発現とその量は興味のあるところである。また垂直感染がこのようなコレセプターを介して行われるかは、ウイルスのコレセプターユースの研究と共に今後の研究課題である。

E. 結論

E-1. 細胞傷害抑制試験による抗HIV薬のスクリーニング

6サンプルが抗HIV活性を示した。

E-2. HeLa/KS386とHeLa/T4の巨細胞形成の電子顕微鏡観察

細胞の融合にかかる時間は110分では足りない事が分かった。抗HIV薬のスクリーニングに用いる際はコカルチャー16時間後に固定をするので、110分以降の経過を1時間おきの観察を今後予定している。また細胞膜間に30nmの大きさの高電子密度の粒子が観察された。

E-3. 絨毛癌細胞に発現するGタンパクレセプター

C5a receptor、CCR7、CCR9/CCR10、RDC1は三つの細胞に発現していることが確認された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Yagyu F, et al. Determination of HIV-1 subtypes (A, B, C, D, G, CRF01_AE) by PCR in the transmembrane region (gp41) with novel primers. J Med Virol In press
Phan TG, et al. Etiologic agents of acute gastroenteritis among Japanese infants and children: virus diversity and genetic analysis of sapovirus. Arch Virol In press
Hansman GS, et al. Characterization of polyclonal antibodies raised against five virus-like particles. Arch Virol In press
Oka T, et al. Proteolytic processing of

sapovirus ORF1 polyprotein. J Virol In press

Phan TG, et al. A novel RT-multiplex PCR for enteroviruses, hepatitis A and E viruses and influenza A virus among infants and children with diarrhea in Vietnam. Arch Virol In press

Li L, et al. Molecular Epidemiology of Adenovirus Infection among Pediatric Population with Diarrhea in Asia. Microbiol Immunol 49(2):121-128, 2005

Phan TG, et al. Genetic diversity of sapovirus in fecal specimens from infants and children with acute gastroenteritis in Pakistan. Arch Virol 150(2):371-377, 2005

Yan H, et al. Outbreak of acute gastroenteritis associated with group A rotavirus and genogroup I sapovirus among adults in a mental health care facility in Japan. J Med Virol 75(3):475-481, 2005

Hansman GS, et al. Viral gastroenteritis in Mongolian infants. Emerg Infect Dis 11(1): 180-182, 2005

Hansman GS, et al. Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. Arch Virol 150(1):21-36, 2005

Li L, et al. Characterizations of adenovirus type 41 isolates from children with acute gastroenteritis in Japan, Vietnam, and Korea. J Clin Microbiol 42(9):4032-4039, 2004

Phan TG, et al. Virus diversity and an outbreak of group C rotavirus among infants and children with diarrhea in Maizuru city, Japan during 2002-2003. J Med Virol 74(1):173-179, 2004

Yan H, et al. Development of RT-multiplex PCR assay for detection of adenovirus and group A and C rotaviruses in diarrheal fecal specimens for children in China.

- Kansenshogakuzasshi 78(8):699-709, 2004
- Hansman GS, et al. Detection of norovirus and sapovirus infection among children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. Arch Virol 149(9):1673-1688, 2004
- Phan TG, et al. Human astrovirus, norovirus (GI, GII), and sapovirus infections in Pakistani children with diarrhea. J Med Virol 73(2):256-261, 2004
- Okitsu-Negishi S, et al. Molecular epidemiology of viral gastroenteritis in Asia. Pediatr Int 46(2):245-252, 2004
- Ushijima H and Eshita Y. Foreward: Molecular epidemiology of viral infection in Asia. Pediatr Int 46(2):202-206, 2004
- Sakamoto T, et al. 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, 2004
- Hansman GS Genetic diversity of Norovirus and Sapovirus in hospitalized infants with sporadic cases of acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. J Clin Microbiol 42:1305-1307, 2004
- Adhikary AK, et al. Characterization of hexon and fiber genes of a novel strain of adenovirus involved in epidemic keratoconjunctivitis. J Clin Pathol 57:95-97, 2004
- Tran TTH, et al. Genotypic C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups. J Gen Virol 85:283-292, 2004
- Tran TTH, et al. Characteristics of core promoter and precore stop codon mutants of hepatitis B virus in Vietnam. J Med Virol 74:228-236, 2004
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし