

表1 細胞傷害抑制試験

薬剤	(No.)	細胞毒性のある濃度	HIVによるCPEがおこる濃度
T325	(04377)	>=100	>0.006
T339	(04391)	>=100	>0.16
T345	(04397)	> 100	>0.03
BPLH150	(04462)	>=100	>1.8
グリカンH	(04464)	> 200	>1.6
BPLH16	(04461)	> 58	>2.3

表2 絨毛癌細胞に発現するGタンパクレセプター

gene	BeWo	JEG-3	JAR
C5a	+	±	+
CCR7	++	±	++
CCR9/CCR10	++	++	++
CXCR4	+	+	-
CXCR5/BLR1	-	+	+
GPR5	±	-	±
RDC1	++	++	++

±, faint ; +, weak ; ++, strong ; -, not detected



図1. A HeLa/KS386とHeLa/T4の巨細胞形成の電子顕微鏡写真



図1. B HeLa/KS386とHeLa/T4の巨細胞形成の電子顕微鏡写真  
(接合部を拡大)

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を基盤とした、抗エイズ  
新薬開発に関する研究

分担研究者 小河 正雄 (大分県衛生環境研究センター微生物部)

研究要旨

エイズ候補物質 50 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、抗 HIV 活性を示すサンプルはなかった。一方、MAGIC-5 によるスクリーニングを実施したところ抗 HIV 活性を示すサンプルが 3 件あった。

A. 研究目的

エイズ治療のために様々な治療薬が開発されてきた。しかし、これらの薬に抵抗するウイルスが出現し、患者の治療を困難にしている。また、長期に薬を服用するため、より副作用の弱い薬の開発が待ち望まれている。我々は、耐性ウイルスに有効で、より副作用の少ない抗エイズウイルス薬を開発するため、様々なエイズ医薬品候補物質について抗 HIV 活性を指標としてスクリーニングを行った。

B. 研究方法

エイズ医薬品候補物質は国立医薬品食品衛生研究所から送付された 50 サンプル(コード No.4156~4205)を用いた。サンプルは DMSO で溶解し、10mg/ml に調製されていた。サンプルを平底 96 穴培養プレートを用いて 10%牛胎児血清加 RPMI-1640 培養液で 2 倍階段希釈し、これに 0.001 TCID<sub>50</sub>/cell の HIV を感染させた MT-4 細胞を加えた。5%炭

酸ガス存在下にて 37°C、5 日間培養し、倒立顕微鏡で細胞を観察し、HIV による細胞障害性を抑制する薬剤の効果を判定した。同様に HIV を感染させていない MT-4 細胞を用いて、薬剤の細胞毒性を測定した。薬剤の最小細胞毒性の 4 分の 1 以下の濃度まで HIV による細胞障害性を抑制したサンプルを抗 HIV 活性 + とした。

また、同じサンプルを大阪府立公衆衛生研究所 大竹 徹 分担研究員に送付し、MAGIC-5 細胞によるスクリーニング試験を依頼した。

C. 研究結果

MT-4 細胞によるスクリーニングでは、抗 HIV 活性を有するサンプルは検出されなかった。

一方、MAGIC5細胞によるスクリーニングでは、No.4169、No.4175、No.4204 がそれぞれ 26  $\mu$ g/ml、8.4  $\mu$ g/ml、2.6  $\mu$ g/ml の最小有効濃度で抗 HIV 活性が認

められた。

#### D. 考察

MT-4 細胞によるスクリーニングでは抗 HIV 活性を有するサンプルは見つからなかったが、MAGIC-5 細胞によるスクリーニングでは 3 サンプルに抗 HIV 活性が認められた。この 3 サンプルについてはさらに他の試験法で抗 HIV 活性の確認を行う必要があると考えられる。

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

分担研究者 千々和 勝己（福岡県保健環境研究所）

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56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、3件に抗HIV活性が認められた。そこで、さらに同細胞を用いて、生細胞数測定法で試験を行ったところ、1件に、抗 HIV 活性が確認された。

A. 研究目的

エイズの治療薬としては、すでにくつかの医薬品が認可・使用されており、カクテル療法により、発症予防についてはある程度の効果を上げている。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ため、さらに新たなエイズ治療薬が必要とされている。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56件（コード番号、4001～4056）であった。サンプルはDMSOで0.5～10mg/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。なお、4056については、提出されたサンプルが、0.85g/mlの水溶液であり、そのまま蒸留水で希

釈し、試験に供した。

最初のスクリーニング試験は、マイクロプレート法で実施した。96穴マイクロプレート中で、サンプルをさらに培養液（FCS 10% + RPMI1640）で2倍段階希釈したもの（100 $\mu$ l）に、あらかじめ HIV-1 を感染させた MT-4 細胞（100 $\mu$ l）を加え、炭酸ガス存在下、37 $^{\circ}$ Cで培養した。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、その結果、細胞毒性が見られず、かつ HIV-1 による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。

マイクロプレート法で抗 HIV 活性があると判定されたものについて、さらに生細胞数測定法で確認を行った。同法は、マイクロプレート法と同じく MT-4 細胞を用いるが、全容量を 1ml に増やし、24 穴のプレートで培養を行った。マイクロプレート法で活性が見られたサンプル濃度を中心に、HIV-1 感染細胞を 5 日間培養し、培養液中の生細胞数をトリパンブルー染色によって測定し、非感染細胞の数と比較を行い、抗 HIV 効果を判定した。

### C. 研究結果

56件のサンプルについて、マイクロプレート法で試験を行った結果を、表1に示す。検体番号4030は7.8  $\mu$ g/ml、4042は2.0  $\mu$ g/mlの1段階で、4056は3.9mg/mlと2.0mg/mlの2段階の濃度でHIV-1による細胞変性効果を抑制した。次に、これら3件について生細胞数測定法で試験を実施した結果を、表2に示す。HIV-1による細胞変性効果を抑制し、生細胞数が非感染細胞の数に比べ50%以上を維持していたのは、検体番号4056の、3.9(99%)、2.0(64%)、1.0mg/ml(63%)の

各濃度の場合であった。

### D. 考察及び結論

今回試験を行った56件のサンプルでは、1件のみに抗HIV活性が確認された。しかしながら、有効濃度は1.0-3.9mg/mlとかなり高濃度であり、効果が弱いため、すぐには医薬品の候補とは考えにくい。なお、大阪府立公衆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、同サンプルには抗HIV活性が見られた。今後、同サンプル中の有効成分を検討し、さらなる精製が必要であると考えられる。

表1. 抗 HIV スクリーニング試験結果 (マイクロプレート法)

検体番号	最小毒性濃度 ( $\mu$ g/ml)	最小有効濃度 ( $\mu$ g/ml)	検体番号	最小毒性濃度 ( $\mu$ g/ml)	最小有効濃度 ( $\mu$ g/ml)
4001	15.6	—	4029	31.3	—
002	31.3	—	030	15.6	7.8
003	31.3	—	031	78.1	—
004	31.3	—	032	3.1	—
005	15.6	—	033	15.6	—
006	7.8	—	034	31.3	—
007	31.3	—	035	3.9	—
008	15.6	—	036	15.6	—
009	3.9	—	037	7.8	—
010	7.8	—	038	31.3	—
011	31.3	—	039	31.3	—
012	31.3	—	040	31.3	—
013	15.6	—	041	19.5	—
014	7.8	—	042	3.9	2.0
015	7.8	—	043	19.5	—
016	31.3	—	044	19.5	—
017	31.3	—	045	19.5	—
018	15.6	—	046	15.6	—
019	15.6	—	047	39.1	—
020	15.6	—	048	78.1	—
021	15.6	—	049	31.3	—
022	15.6	—	050	31.3	—
023	15.6	—	051	15.6	—
024	15.6	—	052	31.3	—
025	7.8	—	053	15.6	—
026	31.3	—	054	15.6	—
027	15.6	—	055	31.3	—
028	31.3	—	056	7.8(mg/ml)	2.0(mg/ml)

表2. 抗 HIV スクリーニング試験結果 (生細胞数測定法)

検体番号	薬剤濃度	生細胞数	細胞対照との比率	抗 HIV 作用
細胞対照	—	$1.44 \times 10^6$ /ml	—	
感染細胞	—	$2.0 \times 10^5$ /ml	14%	
4030	15.6 $\mu$ g / ml	$2.6 \times 10^5$ /ml	18%	—
”	7.8 $\mu$ g / ml	$3.6 \times 10^5$ /ml	25%	—
4042	3.9 $\mu$ g / ml	$6.0 \times 10^5$ /ml	42%	—
”	2.0 $\mu$ g / ml	$4.8 \times 10^5$ /ml	33%	—
”	1.0 $\mu$ g / ml	$3.6 \times 10^5$ /ml	25%	—
4056	7.8 mg / ml	$3.0 \times 10^5$ /ml	21%	—
”	3.9 mg / ml	$1.42 \times 10^6$ /ml	99%	+
”	2.0 mg / ml	$9.2 \times 10^5$ /ml	64%	+
”	1.0 mg / ml	$9.0 \times 10^5$ /ml	63%	+
”	0.5 mg / ml	$5.0 \times 10^5$ /ml	35%	—

サンプル存在下で HIV-1 感染 MT-4 細胞の生存細胞数が、非感染 MT-4 細胞の細胞数に比べ 50% 以上であったものを、抗 HIV 作用 (+) とした。



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を基盤とした、抗エイズ新薬開発に関する研究

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

医薬品関連企業または大学から提出されたエイズ医薬品候補物質 50 サンプル（コード番号 04057～04106）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、50 サンプル（コード番号 04057～04106）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 50 サンプル（コード番号 04057～04106）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、MAGIC5 のアッセイ用に名古屋大学 山本直彦・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 0.001TCID<sub>50</sub>/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て 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<sup>5</sup> cells/ml の濃度で浮遊させ、1well あたり 200μl 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）

サンプルは RPMI 培地で希釈した。測定濃度は 500μg/ml～0.25μg/ml である。

（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

こなつた。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。

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  $3 \times 10^6$  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  $0.001 \text{TCID}_{50} / \text{cell}$  量の HIV-1 を加え、 $37^\circ\text{C}$  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  $100 \mu\text{l}$  ずつ添加した。プレートをプレートミキサーで攪拌し、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  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。

(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 50 サンプル (コード番号 04057~04106) すべてにおいて、抗 HIV 抑制が認められた薬剤はなかった。

50 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  $0.08 \mu\text{M}$  であった。

### D. 考察および結論

最高濃度  $500 \mu\text{g}/\text{ml}$  においてすべての薬剤で細胞毒性が観察され増殖が阻害された。また不溶物が見られる検体は 04057, 04066, 04068, 04070, 04074, 04080, 04081, 04084, 04086, 04087, 04088, 04089, 04090, 04091, 04096, 04099, 04103 であった。

今回、提供された 50 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
04057	500~0.25	125	-
04058	500~0.25	250	-
04059	500~0.25	250	-
04060	500~0.25	250	-
04061	500~0.25	62.5	-
04062	500~0.25	250	-
04063	500~0.25	250	-
04064	500~0.25	250	-
04065	500~0.25	250	-
04066	500~0.25	62.5	-
04067	500~0.25	62.5	-
04068	500~0.25	62.5	-
04069	500~0.25	125	-
04070	500~0.25	250	-
04071	500~0.25	125	-
04072	500~0.25	250	-
04073	500~0.25	500	-
04074	500~0.25	125	-
04075	500~0.25	125	-
04076	500~0.25	250	-
04077	500~0.25	125	-
04078	500~0.25	500	-
04079	500~0.25	500	-
04080	500~0.25	500	-
04081	500~0.25	62.5	-
04082	500~0.25	62.5	-
04083	500~0.25	250	-
04084	500~0.25	500	-
04085	500~0.25	250	-
04086	500~0.25	500	-
04087	500~0.25	125	-
04088	500~0.25	250	-
04089	500~0.25	31.3	-
04090	500~0.25	250	-
04091	500~0.25	250	-
04092	500~0.25	125	-
04093	500~0.25	500	-
04094	500~0.25	250	-

04095	500~0.25	500	-
04096	500~0.25	250	-
04097	500~0.25	500	-
04098	500~0.25	62.5	-
04099	500~0.25	250	-
04100	500~0.25	500	-
04101	500~0.25	500	-
04102	500~0.25	125	-
04103	500~0.25	500	-
04104	500~0.25	500	-
04105	500~0.25	250	-
04106	500~0.25	250	-

研究報告書

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を基盤とした、抗エイズ新薬開発に関する研究

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 49 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 49 検体であった。これら供試薬剤について、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  $\mu$ 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)  $3 \times 10^6$  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 0.001TCID<sub>50</sub>/cell 量の HIV-1 を加え、37°C の CO<sub>2</sub> 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  $\mu$ L ずつ分注した。この場合、最終的な細胞濃度は  $1.5 \times 10^5$  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%CO<sub>2</sub> 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ない。

C. 研究結果

供試薬剤 49 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

研究報告書

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

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

分担研究者 石崎 徹 京都府保健環境研究所

研究要旨 HIVの構造遺伝子である gag, pol, env に特異的な定量 PCR 用のプライマーとプローブの設計を行い、HIV(HTLVIII b株)を標準ウイルスとして、またアジドチミジン(AZT)を抗ウイルス薬の標準薬として半定量的な PCR を行ったところ、そのプライマー等の有効性が確かめられた。

A. 研究目的

HIV 特異的な種々の遺伝子をリアルタイムPCR法により経時的に測定し、抗HIV活性の有無とHIV増殖抑制領域を迅速かつ精度を高めて特定する。今年度は抗HIV薬剤の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。

B. 研究方法

96穴培養プレート中で、AZTを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1000 $\mu$ g/mlから0.025 $\mu$ g/mlまで12段階の希釈を行った(各ウェル液量は100 $\mu$ L)。次にHIV(HTLVIII b株)を100TCID<sub>50</sub>/mlに感染させた3x10<sup>6</sup>個/mlのMT-4細胞を用意し、それぞれのウェルに100 $\mu$ 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、当所が所有するリアルタイムPCR機(Applied BioSystems, ABI PRISM 7900HT)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。mRNAについてHIVのgag, pol, envについて特異的プライマー及びTaqMan probe

を用いて半定量的な real-time PCR を実施した。用いたHIVのgag, pol, envプライマーは primer express(ABI Co.)を用いて設計した。内部コントロールとしてはPBMCのアルブミン領域を用い、その配列は primer : Alb-f 5' -GCTGTCATCTCTGTGGGCTGT-3'、Alb-r 5' -AAACTCATGGGAGCTGCTGGTT-3'、probe : 5' -CCTGTCATGCCACACAAATCTCTCC-3' (Laurendeau et al, 1999).である。HIVのgagについては、primer gagS5' -GGCCAGGGAATTTTCTTCAG-3'、primer gagAS 5' -TCCCCAAACCTGAAGCTCTC-3' 及び probe として gagpro FAM 5' -AGACCAGAGCCAACAGCCCCAC TAMRA-3'、polについては、polS 5' -TGCCATGGGTACCAGCAC-3'、polAS 5' -CTGGCTACTATTTCTTTTGCT-3'、及び probe FAM 5' -TTTATCTACTTGTTTCATTCCTCCAATTC TAMRA-3'、envについては envS 5' -TTACTATGGGACCAGGAC -3'、envAS5' -GCCAAGTACCATTAACCAAGT -3'、及び envpro 5' FAM-

CGGGAGGGGATCTAGAAATTACAAT TAMRA-3' を用いた。

### C. 研究結果

標準ウイルスの HIV( HTLVIII b株)において、これらのプライマー、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(図 1, 2)

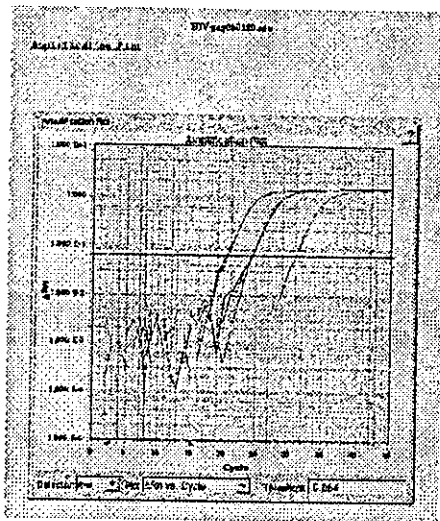


図 1 gag 遺伝子の増幅

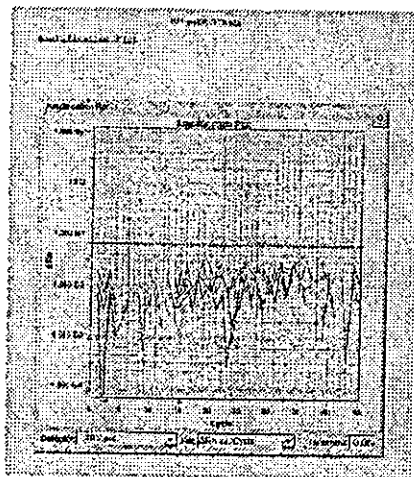


図 2 AZT による pol 遺伝子増幅抑制

### D. 考察

今回用いた HIV 特異的なプライマー、プローブについては、HIV 構造遺伝子の増幅が認められたことから、有効であることが明らかとなっ

た。また、AZT を加えた薬剤効果判定では、HIV 構造遺伝子である pol 領域の遺伝子抑制が認められたことから、このシステムは抗 HIV 薬剤効果判定及び作用領域の推定に有効であると考えられる。

### E. 結論

HIV の構造遺伝子である gag, pol, env に特異的な定量 PCR 用のプライマーとプローブの設計を行い、HTLVIII b株を標準ウイルスとして、またアジドチミジン(AZT)を抗ウイルス薬の標準薬として半定量的な PCR を行ったところ、そのプライマー等の有効性が確かめられた。現在までの抗 HIV 薬は、逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ活性阻害剤であるが、この方法を用いることによって、新たな作用領域の推定に有効であると考えられる。

### 来年度の研究計画の概略

標準曲線を得るための HIV 遺伝子が組み込まれたコピー数の明らかなプラスミドを作成し、定量性を確認する。これらのプライマー、プローブを用いて、平成 16 年度にスクリーニングで陽性になった候補薬について定量 PCR を試み、薬剤の構造遺伝子の面から作用領域を明らかにする。

### 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

現段階ではない。

#### 2. 学会発表 (発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

現段階ではない。

### 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

## 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 貞升健志（東京都健康安全研究センター）

研究協力者 秋場 哲哉，長島 真美，甲斐明美，諸角 聖（東京都健康安全研究センター）

### 研究概要

抗 HIV 薬候補物質を探索する目的で，MT-4 細胞を用いた HIV 増殖抑制試験を用い，50 件のエイズ医薬品候補薬のスクリーニング検査を実施した。

その結果，50 件の候補薬の中に MT-4 HIV 増殖抑制試験で抗 HIV 活性を有する候補薬は存在しなかった。

### （目的）

現在，逆転写酵素阻害薬やプロテアーゼ阻害薬等の多くの抗 HIV 薬が開発され，HAART に代表される治療法として，臨床現場で用いられている。

一方で，投与薬剤の効かない薬剤耐性 HIV の問題もあり，臨床現場においては新たな抗 HIV 薬の出現が望まれている。

今回，新たな抗 HIV 薬候補物質を探索する目的で，MT-4 細胞を用いた HIV 増殖抑制試験を用い，エイズ医薬品候補薬のスクリーニング検査を実施した。

### （方法）

#### （1）被検薬剤と薬剤濃度

検体番号 04303～04352（50 件）について検討を行った。

候補物質の指定薬剤濃度および実施薬剤濃度は表 1 に示すとおりである。

#### （2）方法

既報の MT-4 細胞を用いた HIV 増殖抑制試験法を用いた<sup>1)</sup>。

### （結果）

50 件の候補薬の中に MT-4 HIV 増殖抑制試験で抗 HIV 活性を有する候補薬は存在しなかった。（表 2）。

### （文献）

1)大竹 徹 他：単糖類イノシトールの誘導体の HIV 増殖効果，感染症誌，63,7,676-683,1989





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 齋藤 隆行 神奈川県衛生研究所 微生物部

研究要旨

国立医薬品食品衛生研究所から配付されたエイズ医薬品候補物質50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<sub>B</sub>株）培養上清を0.001TCID<sub>50</sub>/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 $1.5 \times 10^5$  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 $\mu$ /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

50サンプル（04235～04302）について、500 $\mu$ g/mL～0.25 $\mu$ g/mL（04277については0.0005 $\mu$ g/mLまで）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

10 $\mu$ g/mL以下の濃度で細胞毒性を示したものは、50サンプル中4サンプルであった。04291が7.8 $\mu$ g/mL $\geq$ 、04256が3.9 $\mu$ g/mL $\geq$ 、04276が2.0 $\mu$ g/mL $\geq$ であり、04277は0.063 $\mu$ g/mL $\geq$ と非常に強い細胞毒性を示した。

E. 結論

国立医薬品食品衛生研究所から配付された50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を基盤とした、抗エイズ新薬開発に関する研究

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 16 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 04411～04460）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が 4 件、また更に分画することで有効となる可能性のあるものが 6 件存在した。

・ 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 16 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 04411～04460）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 0.001TCID<sub>50</sub>/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 × 10<sup>5</sup>/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.04411～04450)、50 ～ 0.025μg/ml (No.4451～04460) 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。

CPE の抑制効果が認められた検体については、更に 48 穴平底培養プレートを用いた巨細胞形成抑制試験により、薬剤によるウイルスの細胞への吸着抑制効果について調べた。

細胞は株化された MOLT-4 細胞及び MOLT-4/LAI 細胞を使用した。

1 × 10<sup>5</sup> cells/ml となるように調整した MOLT-4、MOLT-4/LAI 及び両者を 1:1 で混合したものをそれぞれプレートに 300μl ずつ分注し、被検薬剤を 300μl 添加して 24 時間後に生細胞をカウントした。巨細胞形成抑制率は、Fusion Index (FI) の計算法により求めた。

C. 研究結果

今回試験を行なった結果、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が認められた（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）物質が 4 件（No.04415 (250 ～ 125μg/ml)、No.04453 (25～12.5μg/ml)、No.04455 (25～6.25μg/ml)、No.04457 (25～12.5μg/ml)）存在した。また 1 管ではあるが抑制が見られた物質が 6 件（No.04438 (250μg/ml)、04419 (250μg/ml)、04422 (1.95μg/ml)、

04423 (250 $\mu$ g/ml)、04454 (25 $\mu$ g/ml)、04459 (25 $\mu$ g/ml)存在した。

細胞障害抑制効果の認められた4件については、巨細胞形成抑制試験を行なった。被検薬剤濃度は、No.04415が250 $\mu$ g/mlで、No.04453、04455及び04457は25 $\mu$ g/mlとなるよう設定した。

その結果、巨細胞形成抑制率はNo.04415は0.19%、No.04453及び04455は0%、No.04457は0.17%で、いずれも巨細胞形成抑制効果を認めることはできなかった。

#### 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40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6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4件については細胞障害抑制効果が見られたため、更に巨細胞形成抑制試験を行なったが、いずれの検体にも巨細胞形成を抑制する効果は認められなかった。巨細胞形成抑制試験では、細胞障害抑制効果の見られた薬剤濃度よりも10倍程度高い濃度に設定する必要があるが、今回提供された薬剤の濃度ではこれ以上高い濃度設定は不可能であったことから、巨細胞形成抑制効果を認めることは困難であったと考えられる。今後、濃縮した薬剤の提供を受ければ巨細胞形成抑制効果が認められるかもしれない。

今回試験に供した検体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。従って、効果の認められた検体を

中心に、今後更に分画を進めて純度を高めれば、抗 HIV 活性が上昇する可能性があると考えられる。

また、これらの候補物質について、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 MT-4 細胞に対する細胞障害抑制試験を行なった50件の被検薬剤のうち、HIV 増殖抑制効果が有効と判定されるものが4件、更に分画することで有効となる可能性のあるものが6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