

[表 1]

Human gene	Product length, bp	Sequence
CD4	589	sense:5'-GGA TAC AGT GGA ACT GAC CTG-3' antisense:5'-TTC AAC TGT AAA GGC GAG TGG-3'
APJ	1143	sense:5'-ATG GAG GAA GGT GGT GAT TTT GAC AAC TAC-3' antisense:5'-CTA GTC AAC CAC AAG GGT CTC CTG GCT GTA G-3'
C5a receptor	1053	sense:5'-ATG AAC TCC TTC AAT TAT ACC ACC CCT GAT-3' antisense:5'-CTA CAC TGC CTG GGT CTT CTG GGC CAT AGT G-3'
CCR1	1068	sense:5'-ATG GAAACT CAA AAC ACC ACA GAG GAC TAT G-3' antisense:5'-TCA GAA CCC AGC AGA GAG TTC ATG CTC CCC TG-3'
CCR4	1083	sense:5'-ATG AAC CCC ACG GAT ATA GCA GAT ACC ACC-3' antisense:5'-CGT CGC ATT CGC GGC CGC CTA CAG AGC ATC ATG AAG-3'
CCR7	573	sense:5'-CGC GTC CTT CTC ATC AGC AAG CTG TCC TGT G-3' antisense:5'-GTG CCG ACA GGA AGA CCA CTG CCG GAG CTG-3'
CCR9/CCR10	510	sense:5'-ATC CCT GAT ATG GTC TTT GTA CAG ACA CAT G-3' antisense:5'-GCT GGA TAA TGA GGC CTG GGC AGT GCC AGG-3'
CXCR3	555	sense:5'-CGG GGG CCC CCG GCC CGC GTG ACC CTC ACC TG-3' antisense:5'-CTG GAG CCC TCT CTG GTT GGG GCA GCC CAG GC-3'
CXCR4	570	sense:5'-CCAAGG AAG CTG TTG GCT GAA AAG GTG GTC TA-3' antisense:5'-TCC ACC TCG CTT TCC TTT GGA GAG GAT CTT-3'
CXCR5/BLR1	570	sense:5'-GGG ACC ATC TGG CTG GTG GGC TTC CTC CTT G-3' antisense:5'-GAG ACT GCT CCT GCG CCA GCT AGG GAA GAG-3'
DEZ α	1122	sense:5'-ATG AGAATG GAG GAT GAA GAT TAC AAC ACT TC-3' antisense:5'-TCA AAG CAT GCC GGT CTC CCT CTC ATT CAT AG-3'
DEZ β	1116	sense:5'-ATG GAG GAT GAA GAT TAC AAC ACT TCC ATC-3' antisense:5'-TCA AAG CAT GCC GGT CTC CCT CTC ATT CAT AG-3'
Duffy antigen	1017	sense:5'-ATG GCC TCC TCT GGG TAT GTC CTC CAG GCG GAG-3' antisense:5'-CTA GGA TTT GCT TCC AAG GGT GTC CAG ATG AG-3'
GPR-9-6	1074	sense:5'-ATG GCT GAT GAC TAT GGC TCT GAA TCC ACA TC-3' antisense:5'-TCA GAG GGA GAG TGC TCC TGA GGT TGT CTC C-3'
GPR5	1002	sense:5'-ATG GAG TCC TCA GGC AAC CCA GAG AGC ACC-3' antisense:5'-TCA GTA GAA GGA GGC GCC CTC ATA GGC GAA G-3'
GPR12	1005	sense:5'-ATG AAT GAA GAC CTG AAG GTC AAT TTAAGC GG-3' antisense:5'-CTA CAC ATC ACT GGG CGA GCG CGC TCT CTG GG-3'
GPR15	1083	sense:5'-ATG GAC CCA GAA GAAACT TCA GTT TAT TTG-3' antisense:5'-TTA GAG TGA CAC AGA CCT CTT CCT CCT GG-3'
GPR25	1083	sense:5'-ATG GCC CCC ACA GAG CCC TGG AGC CCC AGC CC-3' antisense:5'-CTA CCA GGA GGC CGA GGC AGT GTT CGC GGC C-3'
RDC1	281	sense:5'-AAG AAG ATG GTA CGC CGT GTC GTC TGC ATC CTG-3' antisense:5'-CTG CTG TGC TTC TCC TGG TCA CTG GAC GCC GAG-3'

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が 1 件あった。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 7 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、多種類の薬を長期に服用するため、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植物由来の 50 サンプル(コード No.5184~5233)を用いた。サンプルを DMSO で溶解し、10mg/ml に調製した。平底 96 穴培養プレートを用いて 10% 牛胎児血清加 RPMI-1640 培養液でサンプルを 2 倍階段希釈し、これに 0.001 TCID₅₀/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℃、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、No.5204 が抗 HIV 活性を示した。最小有効濃度が 62.5 μ g/ml、細胞毒性が 250 μ g/ml であった。一方、MAGIC5細胞によるスクリーニングでは、No.5186、No.5193、No.5207、No.5209、No.5221、

No.5229、No5231 にそれぞれ 20.5 μ g/ml、13.5 μ g/ml、5.0 μ g/ml、18.5 μ g/ml、0.47 μ g/ml、8.0 μ g/ml、4.9 μ 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抗HIV 活性を有するサンプルが 1 件、MAGIC-5 細胞によるスクリーニングでは 7サンプルに抗HIV活性が認められたが、両スクリーニングとも陽性のサンプルはなかった。いずれのサンプルも最小有効濃度と細胞毒性を示す濃度が近く、ただちに薬の開発につながるものは無かったが、MT-4 のスクリーニングよりも MAGIC 5 のスクリーニングで陽性になるものが多い傾向が認められ、抗HIV活性の作用メカニズムが同一の物質であったことが推定された。

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 ($\mu\text{g/ml}$)	最小有効濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	検体番号	最小毒性濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	最小有効濃度 ($\mu\text{g/ml}$)
5184	250	—	5209	62.5	—
5185	15.7	—	5210	31.3	—
5186	125	—	5211	62.5	—
5187	31.3	—	5212	31.3	—
5188	4	—	5213	31.3	—
5189	31.3	—	5214	62.5	—
5190	62.5	—	5215	250	—
5191	62.5	—	5216	125	—
5192	62.5	—	5217	31.3	—
5193	62.5	—	5218	125	—
5194	15.7	—	5219	125	—
5195	7.9	—	5220	62.5	—
5196	250	—	5221	2	—
5197	31.3	—	5222	15.7	—
5198	15.7	—	5223	125	—
5199	250	—	5224	0.5	—
5200	62.5	—	5225	125	—
5201	125	—	5226	125	—
5202	62.5	—	5227	62.5	—
5203	62.5	—	5228	62.5	—
5204	250	62.5	5229	31.3	—
5205	125	—	5230	62.5	—
5206	15.7	—	5231	4	—
5207	31.3	—	5232	250	—
5208	31.3	—	5233	31.3	—

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

分担研究者 千々和 勝己（福岡県保健環境研究所）

研究要旨

抗HIV活性試験の依頼があった50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、1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、生細胞数計測法で試験を行ったところ、抗HIV活性が確認されたが、有効濃度の範囲は狭かった。

A. 研究目的

エイズの治療薬としては、すでにいくつかの医薬品が認可され、現在多くの感染者に使用されている。しかし、これらの薬剤は発症予防にはある程度効果があっても、ウイルスを完全に排除できるような、決定的に有効な医薬品は未だ見つかっていない。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、さらに多種類の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、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、抗HIV作用を有するものについてはその作用機序を明らかにし、エイズの治療に使用できる医薬品を開発することを目的とする。

B. 研究方法

サンプルは、大学から試験依頼のあった50件（コード番号、5134～5183）であった。サンプルはDMSOで1.0～20mg/mlに溶解し、蒸留水で希釈したものを試験に供した。

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 μ l）に、あらかじめHIV-1を感染させたMT-4細胞（100 μ 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、さらに生細胞数計測法で確認を行った。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計測し、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

50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5159は0.24 $\mu\text{g/ml}$ と0.49 $\mu\text{g/ml}$ 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、このサンプルについて生細胞数計測法で試験を実施した。その結果を、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、1.0 $\mu\text{g/ml}$ (54%)、0.5 $\mu\text{g/ml}$ (77%)の各濃度の場合だけであった。

D. 考察及び結論

今回試験を行った50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0.5-1.0 $\mu\text{g/ml}$ とかなり狭い範囲であるため、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、MAG IC5A細胞を用いたスクリーニング試験では、同サンプルには抗HIV活性が見られなかった。

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。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし

G.知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

表1. 抗HIVスクリーニング試験結果 (MT-4細胞法)

検体番号	最小毒性濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	最小有効濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	検体番号	最小毒性濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	最小有効濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
5134	62.5	—	5159	0.98	0.24
135	125.0	—	160	250.0	—
136	0.24	—	161	125.0	—
137	250.0	—	162	125.0	—
138	62.5	—	163	250.0	—
139	250.0	—	164	3.9	—
140	250.0	—	165	125.0	—
141	125.0	—	166	250.0	—
142	31.3	—	167	250.0	—
143	7.8	—	168	62.5	—
144	15.6	—	169	125.0	—
145	7.8	—	170	250.0	—
146	7.8	—	171	31.3	—
147	15.6	—	172	250.0	—
148	7.8	—	173	125.0	—
149	7.8	—	174	250.0	—
150	7.8	—	175	250.0	—
151	2.0	—	176	500.0	—
152	3.9	—	177	62.5	—
153	500.0	—	178	125.0	—
154	125.0	—	179	15.6	—
155	250.0	—	180	250.0	—
156	125.0	—	181	62.5	—
157	15.6	—	182	250.0	—
158	125.0	—	183	250.0	—

検体は、DMSOに溶解し1-20mg/mlに調整し、それらをさらに蒸留水で希釈し試験を行った。

表2. 抗HIVスクリーニング試験結果（生細胞数計測法）

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	—	1.3×10^6 /ml	—	
感染細胞	—	1.0×10^5 /ml	7.7%	
5159	2.0 μ g / ml	6.2×10^5 /ml	48%	—
〃	1.0 μ g / ml	7.0×10^5 /ml	54%	+
〃	0.5 μ g / ml	1.0×10^6 /ml	77%	+
〃	0.25 μ g / ml	4.4×10^5 /ml	34%	—
〃	0.13 μ g / ml	1.1×10^5 /ml	8.5%	—

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 05234~05283)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 05234~05283) 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

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 05234~05283)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 0.001TCID₅₀/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

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 1.5×10^5 cells/ml の濃度で浮遊させ、1 well あたり 200 μ l 量で培養した。培養 5 日目に顕顕により 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)

サンプルは少量のメタノールに溶解した後 RPMI 培地で希釈した。測定濃度は 1000 μ g/ml ~ 0.5 μ g/ml である。細胞毒性の強い薬剤 05234、05280 に関しては再度希釈管数を増やし、薬剤濃度 0.001 μ g/ml まで測定を行った。

(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。

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 0.001TCID₅₀/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 μ 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 $^{\circ}$ 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。

(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 05234~05283) 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 0.04 μ M であった。

D. 考察および結論

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 μ g/ml	細胞毒性を示した最小濃度 μ g/ml	抗 HIV 抑制
05234	1000~0.001	0.06	-
05235	1000~0.5	62.5	-
05236	1000~0.5	125	-
05237	1000~0.5	62.5	-
05238	1000~0.5	125	-
05239	1000~0.5	125	-
05240	1000~0.5	62.5	-
05241	1000~0.5	500	-
05242	1000~0.5	250	-
05243	1000~0.5	125	-

05244	1000~0.5	31.3	-
05245	1000~0.5	125	-
05246	1000~0.5	125	-
05247	1000~0.5	250	-
05248	1000~0.5	1000	-
05249	1000~0.5	62.5	-
05250	1000~0.5	250	-
05251	1000~0.5	2.0	-
05252	1000~0.5	15.6	-
05253	1000~0.5	250	-
05254	1000~0.5	250	-
05255	1000~0.5	1000	-
05256	1000~0.5	125	-
05257	1000~0.5	1000	-
05258	1000~0.5	125	-
05259	1000~0.5	62.5	-
05260	1000~0.5	250	-
05261	1000~0.5	2.0	-
05262	1000~0.5	62.5	-
05263	1000~0.5	250	-
05264	1000~0.5	500	-
05265	1000~0.5	500	-
05266	1000~0.5	250	-
05267	1000~0.5	62.5	-
05268	1000~0.5	1000	-
05269	1000~0.5	250	-
05270	1000~0.5	62.5	-
05271	1000~0.5	125	-
05272	1000~0.5	62.5	-
05273	1000~0.5	62.5	-
05274	1000~0.5	250	-
05275	1000~0.5	125	-
05276	1000~0.5	250	-
05277	1000~0.5	125	-
05278	1000~0.5	31.3	-
05279	1000~0.5	500	-
05280	1000~0.001	3.9	-
05281	1000~0.5	31.3	-
05282	1000~0.5	125	-
08283	1000~0.5	31.3	-

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

協力研究者 山田 明 滋賀県立大学

研究要旨 MT-4 細胞を使い、供試薬剤 50 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 50 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 穴培養プレートの全ウエルに 100 μ l の 10%FCS 加 RPMI-1640 培養液を入れた。第一ウエルに入れた 100 μ l の薬剤をピペットチップを替えながら 12 段階の希釈を行った。

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(10mL)3x10⁶ 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 10mL 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。

同時に細胞毒性を観察するために、薬剤を希釈したプレートに非感染細胞を分注した。他に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ない。

C. 研究結果

供試薬剤 50 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。MAGIC5細胞による方法(愛知衛研実施)において、5検体について抗HIV活性が認められたが、 IC_{50} 値が高く、活性は弱かった。

D. 考察

MAGIC5細胞による方法(愛知衛研実施)において5検体に弱い抗HIV活性が認められたことから、今後の解析に期待できる。

E. 結論

京都府実施分における供試薬剤については、弱いながらもMAGIC5細胞に活性を示したことにより、今後の抗HIV活性薬剤の開発に期待できる。

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
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

別紙 4

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） 分担研究中間報告書

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II

分担研究者 石崎 徹 京都府保健環境研究所
協力研究者 山田 明 滋賀県立大学

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、またポリメラーゼ阻害剤のアジドチミチン (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。今年度においても pol 領域に対する抗HIV有効薬剤について検討した結果、阻止領域を判別することが可能であった。

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。今年度はスクリーニングで抗HIV活性が認められた薬剤と抗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 μ g/mlから0.025 μ g/mlまで12段階の希釈を行った(各ウェル液量は100 μ L)。次にHIV(HTLVIII b株)を100TCID₅₀/mlに感染させた3x10⁶個/mlのMT-4細胞を用意し、それぞれのウェルに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、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た。その配列はprimer : Alb-f
5' -GCTGTCATCTCTGTGGGCTGT-3'、Alb-r
5' -AAACTCATGGGAGCTGCTGGTT-3' , probe :
5' -CCTGTCATGCCCACACAAATCTCTCC-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' -TGGCATGGGTACCAGCAC-3'、polAS
5' -CTGGCTACTATTTCTTTTGGCT-3'、及びprobe

FAM 5' -TTTATCTACTTGTTCATTTCTCCAATTC
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。

続いて、検体番号 5092 及び 5204 に対して、
5 日目まで継時的に培養液及び培養細胞について
pol プライマーを用いて定量 PCR を試みた。

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、env 遺伝子の特異的増幅は
認められたが、gag-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)。

次に検体番号 5092 及び 5204 に対して、pol
プライマーを用いて増幅を試みたところ、5092
については、増幅が認められなかった。5204 に
ついては、5 日目に弱い増幅が認められた。

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 gag-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。供試検体である 5092 について
は増幅が認められず、5204 については 5 日目に
弱い増幅が認められたことから、5092 は pol 領域
について抑制効果が推測された。

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 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。MT-4 細胞スクリーニング

法で陽性となった薬剤検体について継時的な
定量 PCR を試みたところ、pol 領域で遺伝子増
幅抑制が認められたことから、この領域に対し
ての薬剤効果が推測された。

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

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

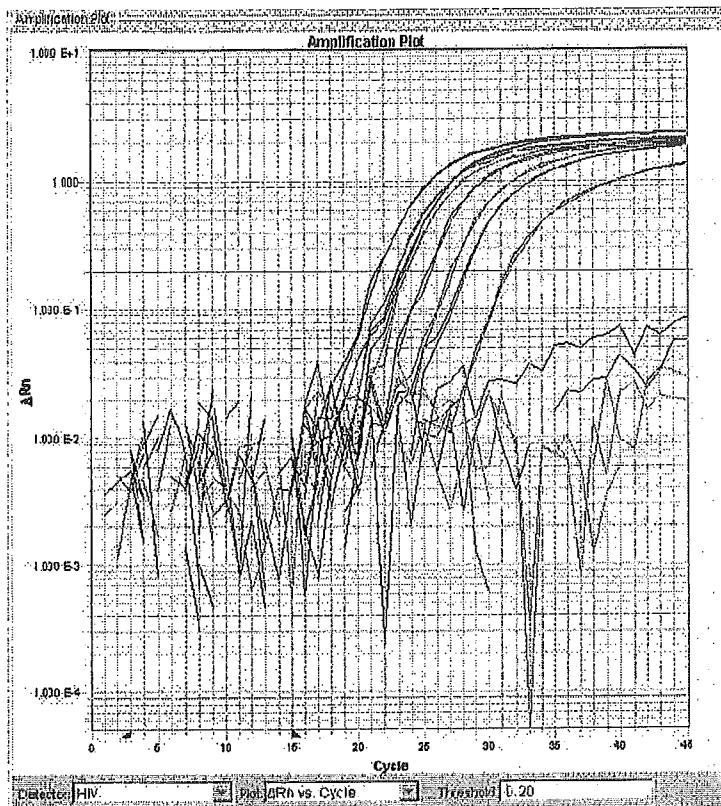


図1 env 遺伝子の増幅

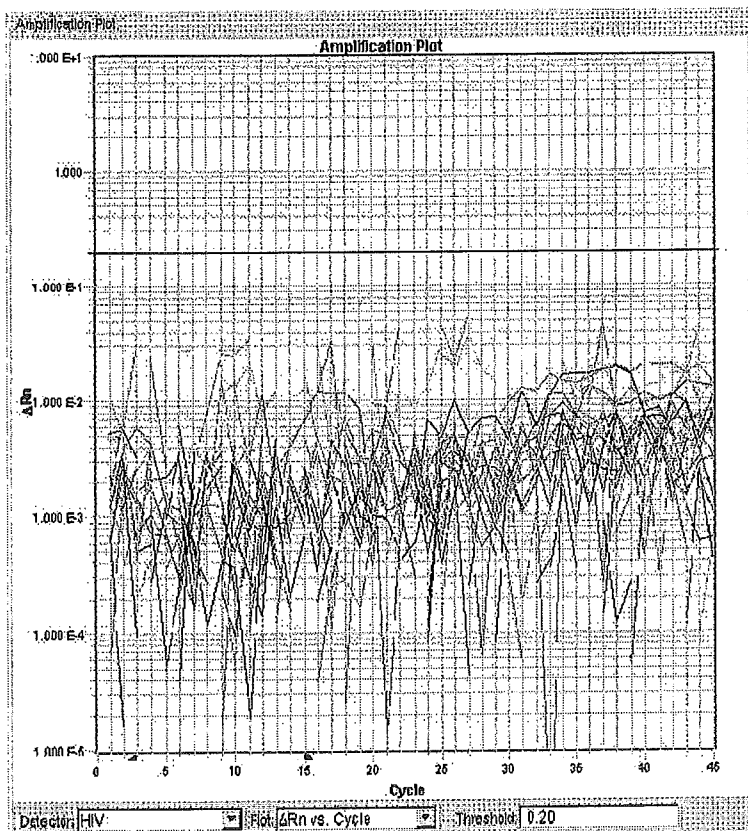
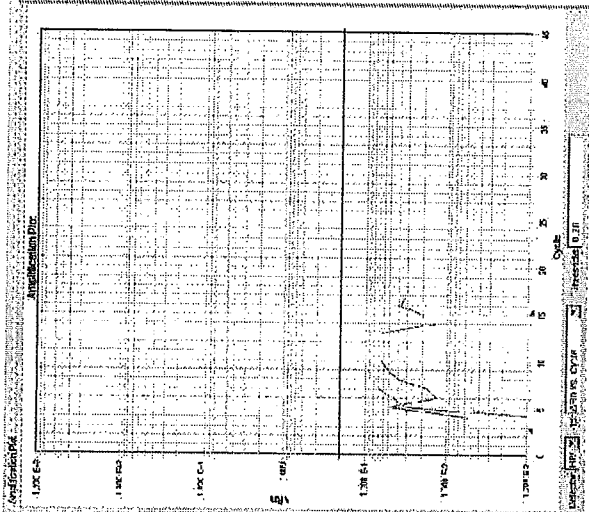
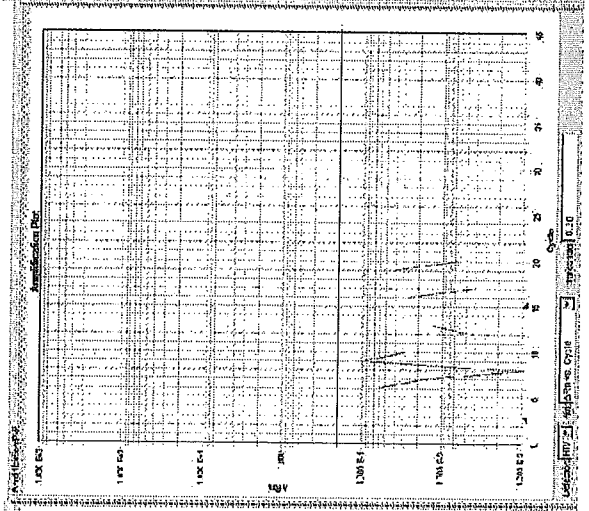


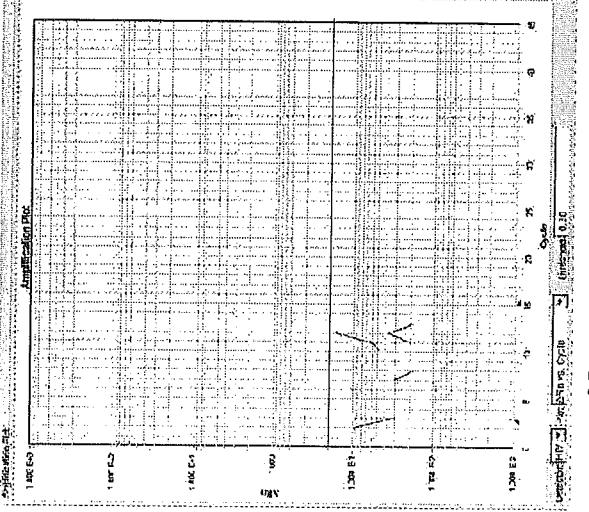
図2 RTVによる pol 遺伝子増幅抑制



No5092 15.6ug 5th day

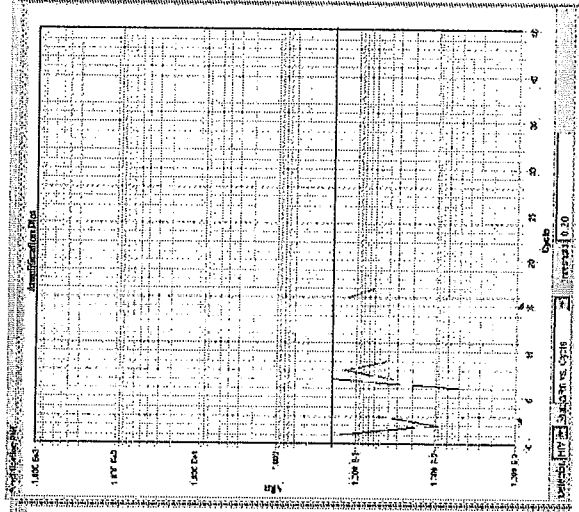


No5092 15.6ug 3rd day

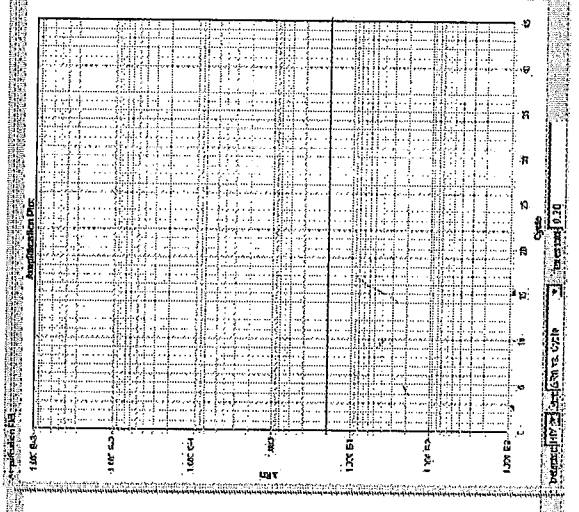


No5092 15.6ug 0day

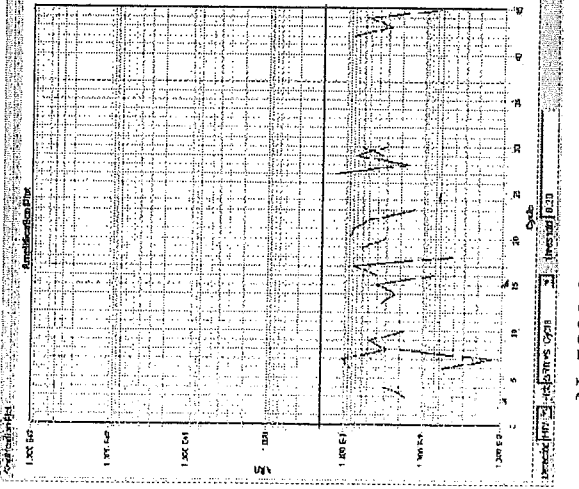
CC
CC



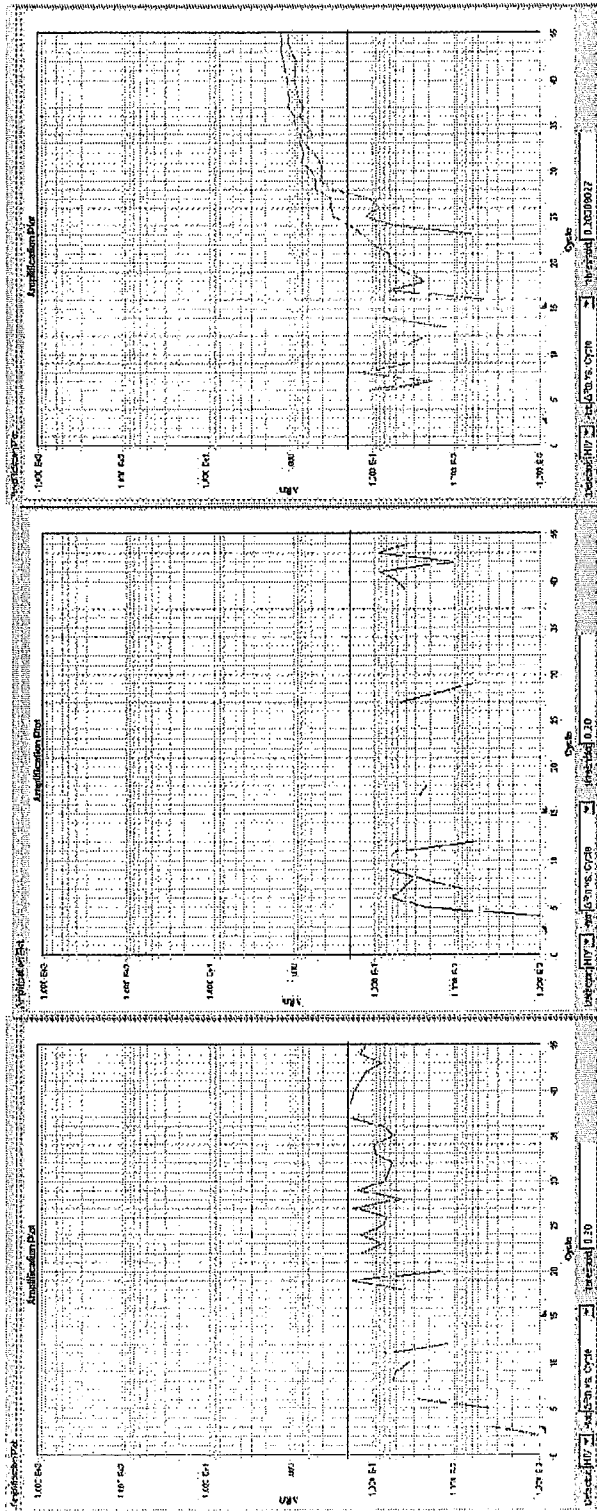
No5092 31.1ug 5th day



No5092 31.1ug 3rd day



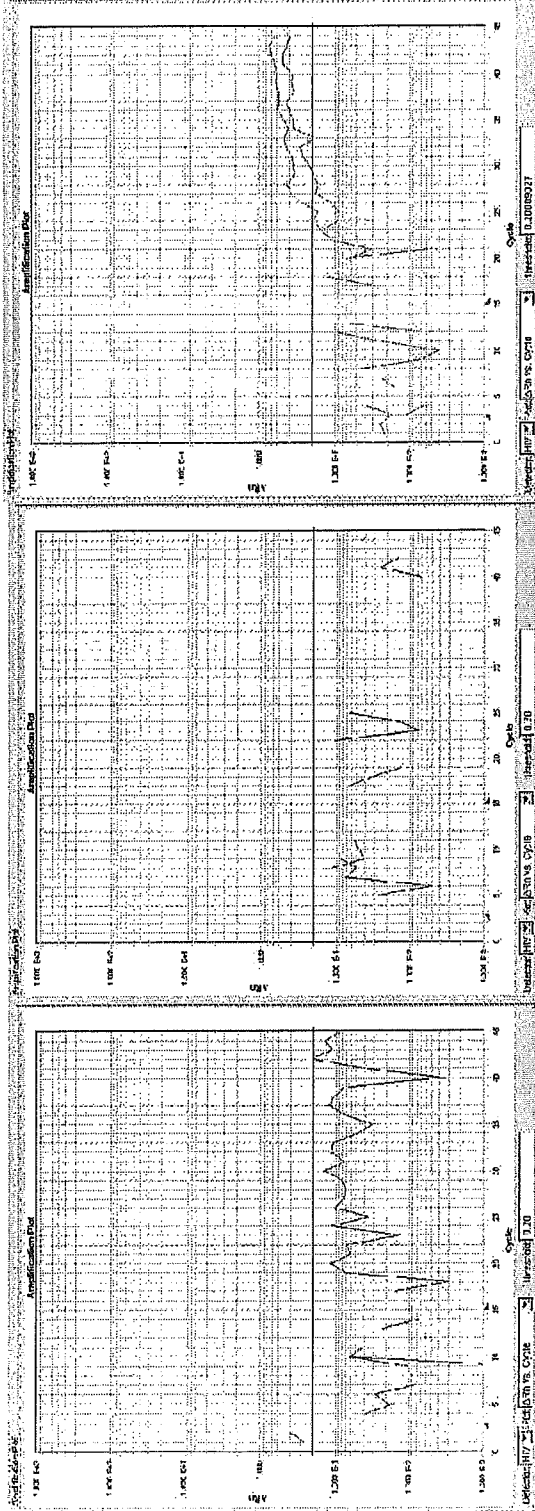
No5092 31.1ug 0day



No5204 62.5ug 5th day

No5204 62.5ug 3rd day

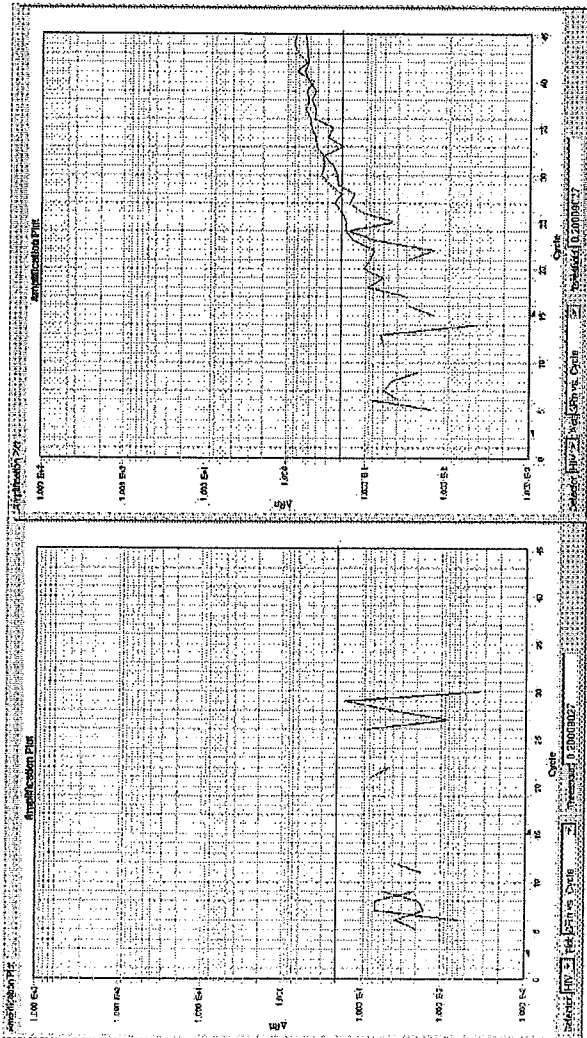
No5204 62.5ug 0day



No5204 125ug 5th day

No5204 125ug 3rd day

No5204 125ug 0day



AZT 4th day

HIV control

Primer : pol 領域

Probe : 同上

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 新開敬行，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、48 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、48 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。

A. 研究目的

近年、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、また、薬の組合せにも限界があることから、新たな抗 HIV 薬の出現が、HIV 治療現場で望まれている。

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-1 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。

B. 研究方法

（1）被検薬剤と薬剤濃度

検体番号 5432～5479（48 件）のエイズ医薬品候補薬について検討を行った。候補物質の希釈法および実施薬剤濃度は表 1 に示す通りである。

（2）方法

MT-4 細胞を用いた HIV-1 増殖抑制試験法を用い、細胞毒性が認められず、かつ、希

釈薬剤濃度の二濃度以上で、HIV-1 増殖抑制効果を示す薬剤を、抗 HIV 活性を有する薬剤と判定した。

さらに、マイクロプレート上の二濃度以上で HIV-1 増殖効果を示す薬剤については、追加検査として、生細胞数の測定と巨細胞抑制試験を実施した。

C. 研究結果と考察

MT-4 を用いた HIV-1 増殖抑制試験で、48 件の候補薬の中に、2 管以上の薬剤濃度で抗 HIV 活性を有するエイズ医薬品候補薬は存在しなかった。なお、サンプル番号 5467 は 15.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で HIV-1 の増殖抑制が僅かに認められたが、それ以外の濃度では抗 HIV 活性は認められなかった（表 2）。

また、希釈液として DMSO と培養液を使用したことが、完全に溶解できないサンプルもあったことから、そのようなサンプルについての取扱いについても今後検討していく必要があるものと思われた。

D. 結論

検体番号 5432~5479(48 件)について、MT-4 細胞を用いた HIV-1 増殖抑制試験を実施した結果、抗 HIV 活性を有する薬剤は認められなかった。

E. 研究発表

1. 論文発表

(1) 長島真美、貞升健志、新開敬行、秋場哲哉、吉田 勲、吉田靖子、矢野一好、甲斐明美、諸角 聖、東京都における HIV 検査成績 (1999 年-2004 年)、東京都健康安全研究センター一年報、56,2005 (印刷中)

(2) Sasaki Y, Kai A, Hayashi Y, Shinkai T, Noguchi Y, Hasegawa M, Sadamasu K, Mori K, Tabei Y, Nagashima M, Morozumi S, Yamamoto T. Multiple Viral Infections and Genomic Divergence among Noroviruses during an Outbreak of Acute Gastroenteritis. *J Clin Microbiol.* 44,790-797,2006

2. 学会発表

(1) 貞升健志、秋場哲哉、新開敬行、長島真美、吉田 勲、吉田靖子、甲斐明美、諸角 聖、東京都における HIV 検査の状況、衛生微生物協議会第 26 回研究会、福井、2005

(2) 貞升健志、長島真美、新開敬行、秋場哲哉、甲斐明美、諸角 聖、東京都内で検出された HIV-1 の Protease および Reverse Transcriptase 遺伝子の解析、第 19 回日本エイズ学会、熊本、2005