

表1. エイズ医薬品候補薬(5432~5479)の希釈濃度および実施薬剤濃度

検体	希釈液	実施薬剤濃度
5432	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5433	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5434	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5435	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5436	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5437	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5438	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5439	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5440	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5441	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5442	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5443	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5444	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5445	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5446	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5447	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5448	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5449	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5450	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5451	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5452	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5453	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5454	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5455	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5456	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5457	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5458	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5459	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5460	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5461	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5462	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5463	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5464	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5465	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5466	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5467	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5468	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5469	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5470	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5471	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5472	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5473	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5474	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5475	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5476	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5477	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5478	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml
5479	DMSO+培養液	初濃度250 μg/ml~0.1 μg/ml

表2. エイズ医薬品候補薬(5432~5479)のCPE観察濃度および細胞毒性濃度

検体	細胞毒性濃度(ug/ml)	抗HIV抑制
5432	250.0以上	(-)
5433	31.3以上	(-)
5434	125.0以上	(-)
5435	範囲内で(-)	(-)
5436	2.0以上	(-)
5437	62.5以上	(-)
5438	15.6以上	(-)
5439	範囲内で(-)	(-)
5440	範囲内で(-)	(-)
5441	範囲内で(-)	(-)
5442	125.0以上	(-)
5443	範囲内で(-)	(-)
5444	125.0以上	(-)
5445	範囲内で(-)	(-)
5446	62.5以上	(-)
5447	範囲内で(-)	(-)
5448	範囲内で(-)	(-)
5449	範囲内で(-)	(-)
5450	範囲内で(-)	(-)
5451	範囲内で(-)	(-)
5452	62.5以上	(-)
5453	範囲内で(-)	(-)
5454	範囲内で(-)	(-)
5455	範囲内で(-)	(-)
5456	62.5以上	(-)
5457	範囲内で(-)	(-)
5458	62.5以上	(-)
5459	範囲内で(-)	(-)
5460	範囲内で(-)	(-)
5461	範囲内で(-)	(-)
5462	125.0以上	(-)
5463	31.3以上	(-)
5464	範囲内で(-)	(-)
5465	範囲内で(-)	(-)
5466	範囲内で(-)	(-)
5467	31.3以上	(-)*
5468	125.0以上	(-)
5469	125.0以上	(-)
5470	125.0以上	(-)
5471	62.5以上	(-)
5472	62.5以上	(-)
5473	範囲内で(-)	(-)
5474	範囲内で(-)	(-)
5475	250.0以上	(-)
5476	範囲内で(-)	(-)
5477	250.0以上	(-)
5478	250.0以上	(-)
5479	62.5以上	(-)

* 15.6 μg/mlでCPEの抑制が僅かに認められた。

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 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い出す。

B. 研究方法

国立医薬品食品衛生研究所から送付された48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 1.5×10^5 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（05384～05431）について、500 μ g/mL～0.25 μ g/mL（05388、05411、05420については0.005 μ 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 μ g/mL以下の濃度で細胞毒性を示したものは、48サンプル中5サンプルであった。05388と05411が0.31 μ g/mL \geq 、05420が2.0 μ g/mL \geq 、05400が3.9 μ g/mL \geq 、05424が7.8 μ g/mL \geq であった。

E. 結論

国立医薬品食品衛生研究所から配付された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。

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 17 年度エイズ医薬品等開発研究の一端として、送付された 101 件の被検薬剤（コード番号 05042～05133 および 05487～05495）に対し抗 HIV 活性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2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9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 17 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 05042～05133 および 05487～05495）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. 05042～05081, 05104～05105, 05108～05133 および 05487～05495)、500～0.24μl/ml (No. 05082～05103)、50～0.025μl/ml (No. 05106～05107)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。

1×10⁶cells/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^{*1)}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2件（No.05104 および No.05105、いずれも 0.31～0.01μg/ml）存在した。また1管ではあるが抑制が見られた物質が9件 [No.05046、No.05070、No.05072、No.05073、No.05077 および No.05078

(いずれも 250 μ g/ml)、No.05109 および No.05110 (62.5 μ g/ml)、No.05111 (31.3 μ g/ml)]存在した。

細胞障害抑制効果の認められた2件 (No.05104 および No.05105) 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、いずれも 0.31 μ 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.05104 は 0.868(86.8%)、No.05105 は 0.86(86.0%) で、いずれの薬剤についても強い巨細胞形成抑制効果認められた。

D. 考察

5日目における判定の結果、101 件の被検薬剤のうち 90 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 9 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 2 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った結果、強い巨細胞形成抑制効果が認められた。これらの有効な検体は将来的に新薬開発に繋がる可能性があることから、提供者と連携を取りながら、更なる検討を進めるべきであると考えられた。

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、有効との判定には至らなかった検体についても、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 101 件の被検薬剤のうち、HIV 増殖抑制効果が有効と判定されたものが 2 件、更に分画することで有効となる可能性のあるものが 9 件存在した。HIV 増殖抑制効果が見られた 2 件はいずれも強い巨細胞形成抑制効果を示した。

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

※1) Fusion Index (FI) の計算による巨細胞形成抑制率 (%)

$$FI=1-Mix/Cont=1-N(Mix)/\{(N(Mock)+N(HIV))/2\}$$

$$ih=1-FI(d)/FI(n), \quad ih(\%)=ih \times 100$$

N(Mix) : HIV 持続感染細胞と非感染細胞の混合培養における生細胞数

N(Mock) : 非感染細胞のみ培養における生細胞数

N(HIV) : HIV 感染細胞のみ培養における生細胞数

FI(d) : ある濃度における FI

FI(n) : 薬剤無添加培養における FI

ih : この薬剤の巨細胞形成抑制割合

ih(%) : この薬剤の巨細胞形成抑制率

表1 MT-4による細胞障害抑制試験結果

コードNo.	サンプル名	抑制効果	初濃度	毒性	備考
05042	MA-189-E	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05043	MA-189-EA	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05044	MA-189-B	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05045	MA-189-H	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05046	MA-194-E	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	250 μ g/mlのみで抑制
05047	MA-194-EA	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05048	MA-194-B	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05049	MA-194-H	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05050	MA-201-E	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05051	MA-201-EA	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05052	MA-201-B	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05053	MA-201-H	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05054	MA-203-E	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05055	MA-203-EA	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05056	MA-203-B	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05057	MA-203-H	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05058	MA-221-E	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05059	MA-221-EA	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05060	MA-221-B	—	500 μ g/ml	~125 μ g/ml	
05061	MA-221-H	—	500 μ g/ml	~125 μ g/ml	
05062	AK-26	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05063	AK-27	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05064	AK-28	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05065	AK-29	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05066	AK-30	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05067	AK-31	—	500 μ g/ml	~250 μ g/ml	
05068	AK-32	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05069	AK-33	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05070	AK-34	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	250 μ g/mlのみで抑制
05071	AK-35	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05072	AK-36	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	250 μ g/mlのみで抑制
05073	AK-37	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	250 μ g/mlのみで抑制
05074	AK-38	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05075	AK-39	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05076	AK-40	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05077	AK-41	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	250 μ g/mlのみで抑制
05078	AK-42	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	250 μ g/mlのみで抑制
05079	AK-43	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05080	AK-44	—	500 μ g/ml	~250 μ g/ml	
05081	AK-45	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05082	S-1	—	500 μ l/ml	~31.3 μ l/ml	
05083	S-2	—	500 μ l/ml	~125 μ l/ml	
05084	S-3	—	500 μ l/ml	>500 μ l/ml	
05085	S-4	—	500 μ l/ml	~31.3 μ l/ml	
05086	S-5	—	500 μ l/ml	~250 μ l/ml	
05087	S-6	—	500 μ l/ml	~500 μ l/ml	
05088	S-7	—	500 μ l/ml	~125 μ l/ml	
05089	S-8	—	500 μ l/ml	~250 μ l/ml	
05090	S-9	—	500 μ l/ml	~250 μ l/ml	
05091	S-10	—	500 μ l/ml	~125 μ l/ml	
05092	S-11	—	500 μ l/ml	~500 μ l/ml	

コードNo.	サンプル名	抑制効果	初濃度(final)	毒性	備考
05093	S-12	—	500 μ l/ml	~500 μ l/ml	
05094	S-13	—	500 μ l/ml	~62.5 μ l/ml	
05095	S-14	—	500 μ l/ml	~62.5 μ l/ml	
05096	S-15	—	500 μ l/ml	~500 μ l/ml	
05097	S-16	—	500 μ l/ml	~62.5 μ l/ml	
05098	S-17	—	500 μ l/ml	~62.5 μ l/ml	
05099	S-18	—	500 μ l/ml	~15.6 μ l/ml	
05100	S-19	—	500 μ l/ml	~500 μ l/ml	
05101	S-20	—	500 μ l/ml	~500 μ l/ml	
05102	S-21	—	500 μ l/ml	~125 μ l/ml	
05103	S-22	—	500 μ l/ml	~125 μ l/ml	
05104	S-23	0.31~0.01 μ g/ml	500 μ g/ml	~0.63 μ g/ml	巨細胞形成抑制率:86.8%
05105	S-24	0.31~0.01 μ g/ml	500 μ g/ml	~0.63 μ g/ml	巨細胞形成抑制率:86.0%
05106	S-25	—	50 μ l/ml	~0.1 μ l/ml	
05107	S-26	—	50 μ l/ml	~1.56 μ l/ml	
05108	S-27	—	500 μ g/ml	~62.5 μ g/ml	
05109	S-28	—	500 μ g/ml	~125 μ g/ml	62.5 μ g/mlのみで抑制
05110	S-29	—	500 μ g/ml	~125 μ g/ml	62.5 μ g/mlのみで抑制
05111	S-30	—	500 μ g/ml	~62.5 μ g/ml	31.3 μ g/mlのみで抑制
05112	S-31	—	500 μ g/ml	~31.3 μ l/ml	
05113	S-32	—	500 μ g/ml	~125 μ l/ml	
05114	S-33	—	500 μ g/ml	~250 μ g/ml	
05115	S-34	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05116	S-35	—	500 μ g/ml	~250 μ g/ml	
05117	S-36	—	500 μ g/ml	~125 μ g/ml	
05118	S-37	—	500 μ g/ml	~125 μ g/ml	
05119	S-38	—	500 μ g/ml	~125 μ g/ml	
05120	S-39	—	500 μ g/ml	~125 μ g/ml	
05121	S-40	—	500 μ g/ml	~125 μ g/ml	
05122	S-41	—	500 μ g/ml	~125 μ g/ml	
05123	S-42	—	500 μ g/ml	~125 μ g/ml	
05124	S-43	—	500 μ g/ml	~250 μ g/ml	
05125	S-44	—	500 μ g/ml	~250 μ g/ml	
05126	S-45	—	500 μ g/ml	~62.5 μ g/ml	
05127	S-46	—	500 μ g/ml	~62.5 μ g/ml	
05128	S-47	—	500 μ g/ml	~250 μ g/ml	
05129	S-48	—	500 μ g/ml	~125 μ g/ml	
05130	S-49	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05131	S-50	—	500 μ g/ml	~125 μ g/ml	
05132	S-51	—	500 μ g/ml	~250 μ g/ml	
05133	S-52	—	500 μ g/ml	~125 μ g/ml	
05487	S-53	—	500 μ g/ml	~250 μ g/ml	
05488	S-54	—	500 μ g/ml	~250 μ g/ml	
05489	S-55	—	500 μ g/ml	~125 μ g/ml	
05490	S-56	—	500 μ g/ml	~125 μ g/ml	
05491	S-57	—	500 μ g/ml	~250 μ g/ml	
05492	S-58	—	500 μ g/ml	~125 μ g/ml	
05493	S-59	—	500 μ g/ml	~125 μ g/ml	
05494	S-60	—	500 μ g/ml	~500 μ g/ml	
05495	S-61	—	500 μ g/ml	~125 μ g/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

分担研究者 野口有三 横浜市衛生研究所

研究要旨

平成 17 年度に民間企業・大学等から提供された抗 HIV 増殖抑制候補医薬品 50 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（5 日間観察法）を用いたスクリーニング検査を実施した。その結果、50 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。

1. 研究目的

エイズ治療薬の開発を目的として、平成 17 年度に依頼されたサンプル（50 検体）について抗 HIV 増殖抑制活性をスクリーニング検査し、その有効性を検討した。

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（5 日間観察法）を使用した。

方法の概略を述べると、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）を 0.001TCID₅₀/cell の割合で 1 時間感染させた。その後、2 倍段階希釈した薬剤を含む RPMI1640 培養液（10% 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 l/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）の有無および細胞毒性を観察し、抗 HIV 効果を判定した。

3. 研究成果

本年度、当衛生研究所の担当分 50 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（500～0.49 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。

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 日間観察法」によりスクリーニング検査を実施した。試験薬剤濃度（500～0.49 μ g/ml）の範囲内では、本年度の 50 検体は全て有効な薬剤は見出せなかった。なお、No.04207 と No.04223 の 2 検体については、その試験薬剤濃度範囲内では細胞毒性も認められなかった。

5. 結 論

本年度の 50 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
未定

平成 17 年度抗 HIV 医薬品候補物質スクリーニング試験結果

測定濃度範囲は全て、500~0.49 ($\mu\text{g/ml}$)

検体 NO.	細胞毒性濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	抗 HIV 抑制	検体 NO.	細胞毒性濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	抗 HIV 抑制
05334	500 以上	(-)	05359	125 以上	(-)
05335	250 以上	(-)	05360	31.25 以上	(-)
05336	62.5 以上	(-)	05361	15.63 以上	(-)
05337	0.49 以上	(-)	05362	31.25 以上	(-)
05338	500 以上	(-)	05363	15.63 以上	(-)
05339	62.5 以上	(-)	05364	31.25 以上	(-)
05340	62.5 以上	(-)	05365	31.25 以上	(-)
05341	31.25 以上	(-)	05366	62.5 以上	(-)
05342	31.25 以上	(-)	05367	125 以上	(-)
05343	31.25 以上	(-)	05368	250 以上	(-)
05344	62.5 以上	(-)	05369	250 以上	(-)
05345	15.63 以上	(-)	05370	3.91 以上	(-)
05346	15.63 以上	(-)	05371	125 以上	(-)
05347	0.49 以上	(-)	05372	500 以上	(-)
05348	125 以上	(-)	05373	500 以上	(-)
05349	31.25 以上	(-)	05374	0.49 以上	(-)
05350	0.49 以上	(-)	05375	500 以上	(-)
05351	0.49 以上	(-)	05376	62.5 以上	(-)
05352	125 以上	(-)	05377	3.91 以上	(-)
05353	0.49 以上	(-)	05378	31.25 以上	(-)
05354	62.5 以上	(-)	05379	7.82 以上	(-)
05355	3.91 以上	(-)	05380	500 以上	(-)
05356	3.91 以上	(-)	05381	500 以上	(-)
05357	250 以上	(-)	05382	31.25 以上	(-)
05358	250 以上	(-)	05383	62.5 以上	(-)

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 260 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、37 検体に抗 HIV 活性が認められ、そのうち 18 件は比較的強い抗 HIV 活性が認められた。

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 5 種の検体についてその抗 HIV 作用メカニズムを検討した。マクロファージ好性 HIV-1 の増殖を抑制した薬剤については MAGIC-5A 細胞への抗 CCR5 モノクローナル抗体の結合阻止能を、T 細胞好性 HIV-1 を抑制した薬剤については MOLT-4 細胞への抗 CXCR4 モノクローナル抗体結合阻止能を指標に試験を行った。その結果、マクロファージ好性 HIV-1 の増殖を抑制する 3 種の薬剤については明確な阻止能が示されず、薬剤の作用点を特定することができなかった。一方、T 細胞好性 HIV-1 の増殖を抑制する 2 種の薬剤は抗 CXCR4 モノクローナル抗体の細胞への結合を阻止し、CXCR4 分子に何らかの作用を及して抗ウイルス効果を示したことが示された。

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、昨年度、T 細胞好性 HIV-1 およびマクロファージ好性 HIV-1 の増殖を抑制活性を測定する二種類のスクリーニング試験を 505 検体について実施したところ、28 検体に活性を認めた。それらには、T 細胞好性ウイルス

またはマクロファージ好性ウイルスどちらか一方を抑制するもの、あるいは双方を抑制するものが含まれた。薬剤の作用機序を調べるために、特に活性の強いものに関して、ウイルスが細胞に侵入する際にセカンドレセプターとして働く CCR5 および CXCR4 分子への作用を調べた。

方法

1. マクロファージ好性ウイルス抑制スクリーニング試験

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。

2. 薬剤の作用メカニズム解析試験 (薬剤)

マクロファージ好性ウイルスの増殖を強く抑制した検体 No.4158 (IC₅₀:1.9 μ g/mL)、No.4175(同 8.4 μ g/mL)、No.4204(同 2.6 μ g/mL)および T 細胞好性ウイルスの増殖を強く抑制した No.4377(IC₁₀₀:0.03 μ g/mL)、No.4397(同 0.16 μ g/mL)を実験に用いた。いずれも植物由来の物質である。陽性対照薬剤として CCR5 に働いてマクロファージ好性ウイルスを抑制する TAK-779、CXCR4 に働いて T 細胞好性ウイルスを抑制する Bicyclam(JM3100)を用いた。

(セカンドレセプターへのモノクローナル抗体結合抑制試験)

(a)CCR5 へのモノクローナル抗体結合抑制試験

標的細胞として Hela 細胞に遺伝子導入により CD4 分子および CCR5 分子を発現させた MAGIC5A 細胞(巽正志博士より分与)を用いた。細胞を PBS にて3回洗浄した後チューブ(Falcon)に入れ、PBS にて100 μ g/mLになるように希釈した薬剤検体 No.4145、4175、4202 および10 μ M に調整した TAK-779 を加え、さらに抗 CCR5 抗体として 45531.111 (Genzyme, Mpls, MN, USA) および 2D7/CCR5-FITC(Research Diagnostics

Inc. Flanders, NJ, USA)を加えた。それぞれの抗体の陰性対照としてマウス IgG2b(Serotec, Oxford, England) および FITC 標識マウス IgG2a を加えた。37°C30分反応の後細胞を PBS にて3回洗浄した。2D7/CCR5-FITC 反応細胞は3%グルタルアルデヒド PBS に浮遊させた。45531.111 反応細胞は2次抗体として FITC 標識抗マウス IgG2b(ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA)抗体を加え、37°C30分反応の後細胞を PBS にて3回洗浄し、同様に3%グルタルアルデヒド PBS に浮遊させた。

(b)CXCR4 へのモノクローナル抗体結合抑制試験

標的細胞として T 細胞株である Molt-4 細胞を用いた。上記と同様に洗浄した細胞に10 μ g/mLになるように希釈した薬剤検体 No.4377、4397 および Bicyclam を加え、さらに抗 CXCR4 抗体として、12G5 (Serotec, Oxford, England) および 44716.111(Genzyme, Mpls, MN, USA)を加えた。それぞれの抗体の陰性対照としてマウス IgG2a およびマウス IgG2b (Serotec, Oxford, England)を加えた。37°C30分反応の後細胞を PBS にて3回洗浄した。2次抗体として12G5 反応検体には FITC 標識抗マウス IgG2a(ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA)抗体、44716.111 反応検体には FITC 標識抗マウス IgG2b(ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA)抗体を加え、37°C30分反応の後細胞を PBS にて3回洗浄し、3%グルタルアルデヒド PBS に浮遊させた。

(c)蛍光強度の測定

各検体の蛍光強度はフローサイトメーター (Epics XL, Beckman Coulter, Fullerton, Calif. USA) を用いて測定した。

結果

1. マクロファージ好性ウイルス抑制スクリーニング試験

今回、260 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、37 検体に抗ウイルス活性を認めた (Table 1)。そのうち 18 検体は抑制濃度 (IC₅₀) が 10 μ g/mL 以下であり、比較的強い抗ウイルス活性を示した。特に検体番号 No.05001-05004 は 1 μ g/mL 以下と、強い抗ウイルス活性が認められた。Table 1 に示したとおり、T 細胞好性ウイルス、あるいはマクロファージ好性ウイルスどちらか一方を抑制する検体、双方のウイルスを抑制する検体がみられたが、そのうちマクロファージ好性ウイルスを抑制する検体が 30 検体と、多数を示したのが特徴的であった。検体番号 No.05001-05004 は抗ウイルス活性と細胞毒性濃度との差が大きかったが、残り検体のそれはそれほど大きいものは見られなかった。

2. 薬剤の作用メカニズム解析試験

昨年度のスクリーニング試験でマクロファージ好性 HIV-1 の増殖を抑制した 3 種の薬剤 (No.4158, 4175, 4204) について MAGIC-5A 細胞を標的にした抗 CCR5 モノクローナル抗体の結合への影響を調べた。その結果、Table 2 に示すように陽性対照として用いた TAK-779 は 2 種のモノクローナル抗体の細胞への結合を抑制したが、3 種の検体については抑制効果は見られなかった。

また、T 細胞好性 HIV-1 の増殖を抑制した 2 種 (No.4377, 4397) について MOLT-4 細胞を標的にした抗 CXCR4 モノクローナル抗体の結合への影響を調べた。その結果、Table 3 に示すように、検体 No.4377 は mAb44716.111 の結合を抑制し、検体 No.4397 は mAb12G5 および 44716.111 双方の細胞への結合を抑制した。陽性検体の Bicyclam は両 mAb の細胞への結合を強く抑制した。

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する検体が多数認められたことから、ウイルスの細胞への侵入に関わるセカンドレセプターへの薬剤の影響などを検討する必要があると考えられた。またマクロファージ好性、T 細胞好性双方のウイルスに抑制効果を示した検体については、侵入過程におけるウイルス側への影響、および逆転写過程など他のウイルス増殖過程に及ぼす影響について検討する必要がある。

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。

マクロファージ好性 HIV-1 を抑制した薬剤 3 種について、マクロファージ好性 HIV-1 が細胞に侵入する際にセカンドレセプターとして利用する細胞表面の分子 CCR5 に対する影響を mAb 結合阻止を指標に調べたが (Table 2)、用いた 2 種の mAb の結合を阻止する作用は認められなかった。このことからこれらの薬剤が CCR5 に作用するか否かは結論づけることはできなかったが、薬剤が TAK-779 とは異なる CCR5 分子の部位に作用しているか、あるいは TAK-779 よりゆるやかな作用を CCR5 分子におよぼして抗ウイルス効果を示している可能性が考えられた。さらに今回用いたものとは異なる mAb を用いた検討が必要であると思われた。

一方、T 細胞好性 HIV-1 を抑制した 2 種の薬剤について、T 細胞好性 HIV-1 が細胞に侵入する際にセカンドレセプターとして利用する細胞表面の分子 CXCR4 に対する影響を mAb 結合阻止を指標に調べたが、薬剤 No.4377 は 1 種の mAb、薬剤 No.4397 は 2 種の mAb の細胞への結合を抑制した (Table 3)。これからのことから 2 種の薬剤は細胞表面の CXCR4 分子に何らかの作用をおよぼして抗ウイルス作

用を示した可能性が高いことが示唆された。

発表論文

1. Otake T, Kawahata T, Mori H, Kojima Y, Hayakawa K, Novel method of inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by the freeze pressure generation method, Applied Microbiology and Biotechnology, 67, 746-751, 2005

学会発表

1. 川畑拓也、小島洋子、森 治代、大竹 徹、STI クリニックにおける HIV 感染のモニタリング、第 22 回大阪 STI 研究会、大阪、2005
2. 森 治代、小島洋子、川畑拓也、大竹 徹、未治療感染者から検出された V108I 変異が非核酸系逆転写酵素阻害剤耐性獲得に及ぼす影響、第 19 回近畿エイズ研究会、京都、2005
3. 小島洋子、川畑拓也、森 治代、大竹 徹、Dual infection of 2 distinct HIV-1 subtype B, 第 7 回アジア・大平洋地域エイズ国際会議、神戸、2005
4. 森 治代、小島洋子、川畑拓也、大竹 徹、Influence of V108I mutation in a treatment-naive HIV-1-infected patient on the development of NNRTI-resistance, 第 7 回アジア・太平洋地域エイズ国際会議、神戸、2005

Table 1 Screening test of Anti-HIV-1 activity

検体番号	MAGIC 5	MT-4*	
	IC50	IC100	細胞毒性
05001	0.0065	NE	62.5
05002	0.042	NE	62.5
05003	0.2	NE	15.6
05004	0.00046	NE	125
05006	NE	(125)	125
05023	5.5	NE	62.5
05038	2.2	3.9	125
05108	(28.0)	NE	62.5
05109	1.7	62.5	125
05110	1.9	62.5	125
05111	NE	31.3	62.5
05045	35.0	NE	500
05046	NE	250	500
05049	73.0	NE	500
05070	NE	250	500
05072	NE	250	500
05073	53.0	250	500
05077	NE	250	500
05078	NE	250	500
05088	3.9	NE	125
05090	9.8	NE	250
05091	17.0	NE	125
05092	17.5	NE	500
05093	48.0	NE	500
05094	6.3	NE	62.5
05095	4.4	NE	62.5
05096	(150)	NE	500
05100	52.0	NE	500
05102	(46.0)	NE	125
05103	7.9	NE	125
05104	14.5	10.0	630
05105	14.5	10.0	630
05156	(270)	NE	125
05159	NE	0.39	0.77
05161	(56.0)	NE	125
05177	(18.5)	NE	62.5
05179	(7.8)	NE	15.6
05186	20.5	NE	125
05193	13.5	NE	62.5

05204	NE	62.5	250
05207	5.0	NE	31.3
05209	18.5	NE	62.5
05221	0.47	NE	2.0
05229	8.0	NE	31.3
05231	4.9	NE	4.0
05505	15.5**	0.8***	25.0
			($\mu\text{g}/\text{ml}$)
*MT-4アッセイの結果は各分担者のデータを記載			
**MAGIC5アッセイにおける細胞毒性は $>500\mu\text{g}/\text{ml}$			
***IC50			
() : 活性と細胞毒性が近いことを示す			

Table 2 Effects of the compounds on the binding of the anti-CCR5 mAb to the MAGIC5A cells (% Inhibition)

mAb \ Drug	4158	4175	4204	TAK-779
45531.111	-4.5	-3.2	-3.3	56.5
2D7	-0.6	0.7	-3.8	6.0

Table 3 Effects of the compounds on the binding of the anti-CXCR4 mAb to the MOLT-4 cells (% Inhibition)

mAb \ Drug	4377	4397	Bicyclam (JM3100)
12G5	-4.2	22.7	100
44716.111	45.7	20.6	100

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

MAGIC 5 A 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 山本直彦（名古屋大学大学院医学系研究科）
研究協力者 森下高行（愛知県食品衛生検査所）

研究要旨

MAGIC 5 A 細胞を用いたスクリーニングの結果、246 検体のうち 20 検体に M-tropic virus に対して増殖抑制効果が認められた。また、昨年度分離したプロテアーゼ阻害剤耐性臨床分離株で解析された耐性関連変異のデータをもとに、L90M および M46I に変異をもつプロテアーゼ阻害剤耐性感染性クローンを作成した。

1. 研究目的

MT-4 細胞による T-tropic virus に対する抗 HIV 活性のスクリーニングが終了した 246 検体について、MAGIC5A 細胞と M-tropic HIV-1 を用い、CCR5 に対する増殖抑制活性をスクリーニングした。また、昨年度分離したプロテアーゼ阻害剤耐性臨床分離株で解析された耐性関連変異のデータをもとに、L90M および M46I に変異をもつ耐性感染性クローンを作成した。

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 1×10^5 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。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 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°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、プラーク数により判定した。

2) 薬剤耐性感染性クローンの作成

HXB2・PRL90M 感染性クローンは pSUM8 plasmid を用いて、protease gene の codon 90 の TTG を ATG に site-directed mutagenesis により作成した。また、HXB2・PRM46I 感染性クローンは、同様に pSUM8 plasmid を用いて、protease gene の codon 46 の ATG を ATA に変換し、作成した。

3. 結果および考察

今年度スクリーニングした246検体のうち、20検体に抗HIV活性がみられた(別表)。これらM-tropic virusに対し、比較的効果のあった薬剤について、50%ウイルス増殖抑制濃度(IC₅₀; 50% Inhibitory Concentration)を測定した。なお、対照薬剤として使用したTAK779のIC₅₀はそれぞれ0.08μMである。また、今回作成した感染性クローンはそれぞれSaquinavir, Indinavirに耐性を持っていることを確認し、さらに野生株と同等の複製能をもっており、プロテアーゼ阻害剤耐性スクリーニングを行なう上で有用であることが示された。

4. 研究発表

1) New estimation method for highly sensitive quantitation of human immunodeficiency virus type 1 DNA and its application; H. Nagai, K. Wada, T. Morishita, M. Utsumi, Y. Nishiyama and T. Kaneda J. Virol. Methods 124, 157-165 (2005)

2) "Presence of drug-resistance-associated mutations in HIV-1 clade C- infected patients in India" Naohiko Yamamoto, Takayuki Morishita, Tapankumar Dhole.

(The 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific (ICAAP), (2005.07.02))

3) Persistence of protease inhibitor resistant HIV-1 in therapy naïve patients; T. Kaneda, S. Ibe, K. Sawaki, T. Morishita, U. Shigemi, N. Mamiya and M. Hamaguchi.

(2nd International Workshop on HIV Persistence during Therapy Saint Martin, FWI, December 6-9, 2005)

4) 「B、CRF01_AEを含む複数のサブタイプのHIV-1定量法の確立」水野善文、永井裕美、加堂真由、渡辺朝子、森下高行、山本直彦、伊部史朗、重見麗、藤崎誠一郎、稲田頼太郎、金田次弘
(第19回日本エイズ学会総会平成17年12月-2005)。

(別表)

M-tropic virus に対して増殖抑制効果を示したサンプルの 50%ウイルス増殖抑制濃度 (IC₅₀; 50% Inhibitory Concentration) と細胞毒性濃度

サンプル番号	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	細胞毒性濃度 ($\mu\text{g/ml}$)
05235	42.5	62.5
05236	40.3	125
05237	46.5	62.5
05238	73.2	125
05239	22.1	125
05241	203.6	500
05242	104.7	250
05244	20.8	31.3
05245	90.3	125
05247	243.6	250
05264	170.3	500
05290	22.8	250
05302	20.7	125
05304	43.6	250
05309	22.4	250
05311	40.9	500
05334	172.5	500
05336	93.2	500
05368	59.7	500
05371	61.4	500
TAK779	0.08 μM	

スクリーニング法の開発、作用メカニズムの解明

所 属 群馬大学大学院医学系研究科
研究者 星野 洪郎

研究要旨 R5 あるいは X4 の細胞指向性の HIV-1 の感染を簡便に迅速に、かつ経時的に検出する系を開発した。また、この細胞を用いることで、HIV-1 による細胞融合を容易に判定することができた。更に、抗 Tat 活性も測定できると期待される。この系を用い、数十種類の化合物について、抗 HIV-1 活性を検討した。

A. 研究目的

我々は、HIV-1 の感染を簡単に、かつ迅速に検出でき、また感染経過を経時的に観察できる細胞系を昨年度開発した。この系では、R5 あるいは X4 タイプの HIV-1 に非常に感受性の高い NP-2/CD4/CCR5 あるいは NP-2/CD4/CXCR4 細胞に、HIV-1 の promoter の下流に nuclear localization signal を持つ green fluorescent protein (GFP) 遺伝子を持つプラスミドを導入した。そのため HIV-1 が感染すると GFP 遺伝子の発現が誘導され、核に集積する。また、この細胞は、HIV-1 の Tat タンパク質のみを発現させても強く GFP が細胞核に発現される。この発現を減少させる化合物をスクリーニングすると Tat タンパク質の機能を阻害する物質の検出も容易であると考えられる。

本研究では、数十種類の物質について、NP-2/CD4 細胞系を用い、抗 HIV-1 剤のスクリーニングが簡便にできるか、抗 Tat 剤のスクリーニングが可能か検討した。

B. 研究方法

試料の抗 HIV-1 作用の検討

HIV-1 感染に対する薬剤の効果は、以下の手順で検討した。昨年度樹立した NP-2/CD4/CXCR4/GFP 細胞 (N4X4/GFP 細胞) を 96 穴のプレートに接種し、翌日試料を終濃度 100, 30, 10, 3, 1, 0.3 $\mu\text{g/ml}$ で培養細胞に加えた。更に HIV-1 IIIIB 株を 100 IU/well で感染させ、2 日後 GFP 陽性細胞をカウントし、薬剤を添加していない対照と比較した。

薬剤の細胞融合抑制作用の検討

N4X4/GFP 細胞を 96 穴のプレートに接種し、翌日試料を終濃度 100, 30, 10, 3, 1, 0.3 $\mu\text{g/ml}$ で培養細胞に加えた。HIV-1 の NL432 株の Tat と Env を発現している HeLaKS386 細胞を、N4X4/GFP 細胞の 1/20 量重層し、3 日培養した。GFP 陽性の合胞体をカウントし、薬剤を添加していない対照の混合培養の合胞体数と比較した。

GFP 発現への薬剤の影響の検討

N4X4/GFP 細胞に Tat 発現ベクターを導入し、GFP 陽性となった細胞 N4X4/GFP/Tat を分離した。N4X4/GFP/Tat 細胞を 6 穴のプレートに接種し、翌日試料を終濃度 100, 30, 10, 3, 1, 0.3 $\mu\text{g/ml}$ で培養細胞に加えた。1 日培養し、GFP の発現程度を flow cytometer を用い測定した。対照としては、Tat 抑制作用が報告されている 2,3 dimercapto-1-propanol (DMP) を用いた。

核酸類似体の抗 HIV-1 効果の検討

昨年報告した NP-2/CD4/CCR5/GFP 細胞 (N4R5/GFP 細胞) を用い検討した。N4R5/GFP 細胞は、R5 株の HIV-1 に感受性であり、その感染の成立で GFP を大量に発現し、細胞核が GFP 強陽性となる。DMSO を用い、サンプルを 10mg/ml で溶かし、stock 溶液とし、 -20°C に保存した。N4R5/GFP 細胞を、48 穴のプレートに well 当たり 1.5 万個接種し、翌日サンプルを終濃度 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$

となるように加え、1 時間後 R5 の HIV-1 の BaL 株を加えた。3 日培養後、可視光下で観察し、細胞の増殖程度を判定した。対照と同程度の細胞数があるものは、細胞毒性 0 とし、細胞数が 20% 程度減少したものを 1、40% 程度細胞数が減少した時は 2、の様に判定した。また、紫外線照射により、GFP を発現する合胞体をカウントした。薬剤を含まない、対照の GFP 陽性合胞体数と比較し判定した。対照の合胞体数を+++とし、2/3、1/3 程度に減少した場合は、それぞれ++、+とした。これらのデータをもとにグラフを利用し、HIV-1 感染を 50% 阻害する薬剤濃度、細胞増殖を 50% 阻害する薬剤濃度を求めた。

薬剤

ランダムに選んだ新規の核酸関連化合物 50 種類を用いた。また、下記に記す緑茶や植物から抽出したカテキン類、タイで用いられている各種の茶から抽出された粗精製物を用い、検討した。緑茶抽出物の粗精製品 (GTE: green tea extract)、epigallocatechin galate (EGCG)、epigallocatechin、

epicatechin, geraniin, dextran sulfate (DS, MW 8000), 3'azidothymidine (AZT), AMD3100, 2,3 dimercapto-1-propanol (DMP) を用い検討した。

C. 研究結果

お茶の抽出物の作用について

4種類のお茶の抽出物について、抗 HIV-1 作用を検討した (図 1)。3種類のサンプルで、10-100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で抗 HIV-1 作用が見出された。これらのサンプルは、粗精製物であるので、更に精製し、検討する必要がある。次に、Tat により誘導される GFP の発現への影響を検討した (図 2)。いずれの抽出物も明らかな効果は示さなかった。これらの抽出物は、10-100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度では、細胞毒性が明らかではなかった (表 1)。本実験は、薬剤添加 1 日後に GFP 陽性の程度を判定しているので、更に長時間処理した場合の効果を見る必要があるであろう。また、正確な評価のためには、Tat タンパク質の安定性 (活性の半減期) を確認する必要があるであろう。

緑茶成分などの抗 HIV-1 活性

緑茶などから抽出されるカテキン類について、精製物を用い検討した (図 3、表 2)。Geraniin, EGCG, GTE, epicatechin などに抗 HIV-1 作用が見出された。これら化合物が、X4 の HIV-1 株の誘導する合胞体形成を阻害するか検討し (図 4)、結果をまとめた (表 2)。20 $\mu\text{g/ml}$ 程度の濃度で合胞体形成の抑制が観察された。Dextran sulfate (DS) も合胞体形成を阻害した。AMD3100 は、CXCR4 を介した HIV-1 感染を抑制することが報告されている。AMD3100 は、1 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で合胞体形成を著明に抑制した (図 5)。

この方法では、合胞体が形成されると GFP の発現が誘導されるので、細胞を固定染色しなくても、合胞体が容易に同定できる。この方法は、簡便で、かつ判定が容易であり優れた方法であると考えられる。

核酸類似物質の抗 HIV-1 作用

ランダムに選んだ核酸類似物質 50 種類について、抗 HIV-1 作用を検討した。いずれの化合物にも、明らかな抗 HIV-1 作用は認められなかった。多くの化合物は、細胞増殖にも大きな影響を与えなかった。同様な化合物がまだ非常に多数入手可能であるので、今後更に抗 HIV-1 作用について検討を続けたい。

D. 考察

核酸関連化合物 50 種類について、抗 HIV-1 活性を検討したが有効なものは検出できなかった。候補となる化合物は、まだ数千種類準備されているので、条件が許せば順次検討したい。タイで飲用されている 4 種類のお茶の粗抽出物について、抗 HIV-1 作用を検討したところ、弱いながら抗

HIV-1 活性が認められた。活性のあるもののうち、ひとつにはカテキン類がほとんど含まれないと思われる。これらについて更に精製することで、有効な化合物が見出されるかもしれない。緑茶由来のカテキン類に抗 HIV-1 作用があることが報告されており、我々の系の結果でもこのことが確認された。

X4 タイプの HIV-1 の Env 及び Tat を発現する HeLa 細胞と N4X4/GFP 細胞を混合培養すると、著明な合胞体が形成され、細胞の核が GFP 陽性となった。この現象は、AMD3100 で強く抑制された。すなわち、既に強い抗 HIV-1 作用を持つことが知られている AZT と AMD3100 を、我々の系で検討し、期待通りの結果が得られた。我々の系が信頼できる系であることが確認された。

E. 結論

N4R5/GFP 細胞あるいは N4X4/GFP 細胞を用いた系で、簡便に抗 HIV-1 剤のスクリーニングが可能となった。また、CXCR4 に反応する AMD3100 については、合胞体形成抑制試験で容易にその活性を判定できた。これらの細胞は、HIV-1 の感染・増殖を阻害する薬剤の簡便かつ迅速なスクリーニングに有用であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Roy BB, Jinno-Oue A, Shinagawa M, Shimizu A, Tamura K, Shimizu N, Tanaka A, and Hoshino H. Isolation of the feline alpha1,3-galactosyltransferase gene, expression in transfected human cells and its phylogenetic analysis. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 2005, 306B, 59-69.
- 2) Shimizu, Y., Okoba, M., Yamazaki, N., Goto, Y., Miura, T., Hayami, M., Hoshino, H. and Haga T. Construction and in vitro characterization of a chimeric simian and human immunodeficiency virus with the RANTES gene. *Microbes Infect.* 2006, 8, 105-113
- 3) Saha, M. N., Tanaka, A., Jinno-Oue, A., Shimizu, N., Tamura, K., Shinagawa, M., Chiba, J., and Hoshino H. Formation of vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing surface proteins of hepatitis B virus. *J. Virol.* 2005, 79, 12566-12574.
- 4) Jinno-Oue A, Shimizu N, Soda Y, Tanaka A, Ohtsuki T, Kurosaki D, Suzuki Y, and Hoshino H. The synthetic peptide derived from the NH2-terminal extracellular region of an orphan G protein-coupled receptor, GPR1, preferentially inhibits infection of X4 human immunodeficiency virus type 1. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 30924-30934.