

27. Li Y, Hotta M, Shi A, Li Z, Yin J, Guo G, Kawata K, Ushijima H. Malnutrition Improvement for Infants and Young Children under 18 months old of Dai Minority in Luxi, China. *Pediatrics International*, in press.
28. Kominami M, Kawata K, Ali M, Meena H, Ushijima H. Factors determining prenatal HIV testing for PMTCT in Dar Es Salaam, Tanzania. *Pediatrics International*, in press.
29. Nguyen TH, Ushijima H. Nutritional status of low birth weight ethnic minority infants in Backan province, Vietnam. *Pediatrics International*, in press.
30. Hotta M, Ali M, Ushijima H, Lee S, Nakamura Y, Shigeta M, Kobayashi N. Situational analysis of maternal and child health services for foreign residents in Japan. *Pediatrics International*, in press.
31. Li L, Li K, Ushijima H. Moderate- to -vigorous physical activity and body fatness in Chinese urban school children. *Pediatrics International*, in press.
32. Manilay P, Ali M, Yagyu F, Soulivanh P, Kuroiwa C, Ushijima H. Risk factors for protein-energy malnutrition of children under 5 years: A study from Luangprabang province, Lao PDR. *Pediatrics International*, in press.
33. Dey SK, Phan TG, Nguyen TA, Nishio O, Salim AFM, Yagyu F, Ushijima H. Prevalence of sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh during 2004-2005. *J Med Virol*, in press.
34. Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Tonusin S, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of rare G3P[9] rotavirus strains isolated from children hospitalized with acute gastroenteritis. *J Med Virol*. in press.
35. Phan TG, Khamrin P, Quang TD, Dey SK, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Detection and genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan. *J Virol*, in press.
36. Phan TG, Khamrin P, Trinh DQ, Dey SK, Takanashi S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Emergence of Intragenotype Recombinant Sapovirus in Japan. *Infection, Genetics and Evolution*, in press.

Table 1. Characterization of samples from Vietnam

Sample No.	sex	Age (month)	Date of collection	Drug treatment
VC01	M	26	1/Oct/2004	-
VC02	F	27	4/Oct/2004	-
VC03	F	9	4/Oct/2004	-
VC04	F	3	7/Oct/2004	-
VC05	M	16	22/Oct/2004	-
VC06	M	3	25/Oct/2004	-
VC07	M	39	26/Oct/2004	-
VC08	M	2	26/Oct/2004	-
VC09	F	3	27/Oct/2004	-
VC10	F	9	27/Oct/2004	-
VC11	M	2	1/Nov/2004	-
VC12	M	8	1/Nov/2004	-
VC13	F	7	3/Nov/2004	-
VC14	F	4	3/Nov/2004	-
VC15	F	21	4/Nov/2004	-
VC16	F	50	5/Nov/2004	-
VC17	M	9	8/Nov/2004	-
VC18	F	8	16/Nov/2004	-
VC19	F	3	19/Nov/2004	-
VC20	M	34	22/Nov/2004	-
VC22	F	2	29/Nov/2004	-
VC23	F	6	30/Nov/2004	-
VC24	M	14	6/Dec/2004	-
VC25	M	3	6/Dec/2004	-
VC27	F	1	11/Dec/2004	-
VC28	F	4	14/Dec/2004	-
VC31	M	4	22/Dec/2004	-
VC32	F	3	24/Dec/2004	-
VC33	F	14	27/Dec/2004	-

Table 2. Results of subtyping by sequencing and PCR

Sample No.	β -actin	Subtype by v3 sequence	Subtype by pol sequence	Subtype By PCR in gp41
VC01	+	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
VC02	+	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
VC03	+	CRF01_AE	CRF01_AE	-
VC04	+	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
VC05	+	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
VC06	+	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
VC07	+	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
VC08	+	-	-	-
VC09	+	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
VC10	+	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
VC11	+	CRF01_AE	-	-
VC12	+	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
VC13	+	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
VC14	+	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
VC15	+	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
VC16	+	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
VC17	+	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
VC18	+	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
VC19	+	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
VC20	+	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
VC22	+	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
VC23	+	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
VC24	+	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
VC25	+	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
VC27	+	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
VC28	+	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
VC31	+	CRF01_AE	CRF01_AE	CRF01_AE
VC32	+	CRF01_AE	CRF01_AE	
VC33	+	CRF01_AE	CRF01_AE	

∴ no product generated

Table 3. The sequence analysis of resistance to protease inhibitor

Sample No.	L10V	K20R	L63P
VC06			○
VC07		○	
VC10		○	
VC20	○	○	
VC24			○
VC28		○	

厚生労働科学研究費補助金(政策創薬総合研究事業)
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 微生物担当)

研究要旨

エイズ候補物質 46 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 6 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合成品 6 サンプル(コード No.6001~6006)と植物抽出物 40 サンプル(コード No.6007~6046)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°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、No.6003 が抗 HIV 活性を示した。最小有効濃度が 1.0 μg/ml、細胞毒性が 4.0 μg/ml であった。一方、MAGIC-5 細胞によるスクリーニングでは、No.6007、

No.6008、No.6010、No.6014、No.6016、No.6019 にそれぞれ 19.5 μ g/ml、10.0 μ g/ml、1.0 μ g/ml、4.8 μ g/ml、4.4 μ g/ml、4.5 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 6 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。MT-4 細胞によるスクリーニングで陽性となった合成品のサンプルは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繋がるものではないと考えられる。一方、植物由来物質は 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る。今回は MAGIC 5 のスクリーニングで最小有効濃度と細胞毒性を示す濃度が 10 倍以上あるものがあり、薬の開発に繋がる可能性があると考えられた。

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 ($\mu\text{g/ml}$)
6001	2	—	6024	4	—
6002	0.08	—	6025	0.5	—
6003	4	1	6026	4	—
6004	2	—	6027	31.3	—
6005	1	—	6028	4	—
6006	0.5	—	6029	15.7	—
6007	31.3	—	6030	7.9	—
6008	62.5	—	6031	31.3	—
6009	4	—	6032	15.7	—
6010	0.5	—	6033	0.3	—
6011	4	—	6034	4	—
6012	31.3	—	6035	31.3	—
6013	31.3	—	6036	31.3	—
6014	15.7	—	6037	31.3	—
6015	1	—	6038	31.3	—
6016	7.9	—	6039	31.3	—
6017	7.9	—	6040	0.01	—
6018	7.9	—	6041	31.3	—
6019	4	—	6042	2	—
6020	4	—	6043	15.7	—
6021	31.3	—	6044	0.08	—
6022	1	—	6045	62.5	—
6023	15.7	—	6046	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

本年は、45件の検体について抗HIV活性試験を担当した。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が、抗HIV活性が認められたものは無かった。また、昨年当研究班で実施したスクリーニング試験で、抗HIV活性が確認された7件について、市販のキットを用いてHIV-1逆転写酵素阻害活性を測定した。その結果、3件について逆転写酵素阻害活性が認められた。

A. 研究目的

エイズの治療薬としては、すでになんらかの薬剤が使用されているが、ウイルスを体内から完全に排除できるような、決定的に有効な治療薬は未だ無く、現在用いられている薬剤についても、薬剤耐性や副作用等の問題が生じている。そのため、より有効なエイズ治療薬の開発が必要とされている。そこで、当研究班は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検体について抗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

当所が担当したスクリーニング試験の検体は、45件（コード番号,6093~6137）であった。検体はメタノールで6.0 ~60mg/mlに溶解し、蒸留水で希釈したものを試験に供した。

抗HIV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、

検体をさらに培養液（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。

一方、昨年当研究班でのスクリーニング試験の結果、抗HIV作用が認められた7件について、抗HIV活性の作用機序のひとつである逆転写酵素阻害作用の有無を検討した。逆転写酵素の阻害試験については、CAVIDI社から市販されているLenti RT Activity Kitを用いて測定した。手技、及び判定基準は添付のマニュアルに従った。

C. 研究結果

マイクロプレート法で行った抗HIVスクリーニング試験の結果を、表1に示す。45件の検体は、いずれもHIV-1による細胞変性効果を抑制しなかった。また、MT-4細胞に対する最小毒性濃度は、2.0~500 μ g/mlであった。

次に、昨年当研究班のスクリーニング試験で抗HIV活性が認められた7件の検体について、逆転写酵素阻害活性を検討した。その結果を、表2に示す。7件中4件には、阻害活性は認められなかったが、3件については阻害活性が認められた。そのIC₅₀値（50%阻害濃度）は、5103では13.5 μ g/ml、5109では16.9 μ g/ml、5505では8.5 μ g/mlであった。

D. 考察及び結論

今回、MT-4細胞を用いたスクリーニング試験を行った45件の検体では、抗HIV活性が確認されたものはなかった。なお、大阪府立公衆衛生研究所で実施した、MAGIC5A細胞を用いたスクリーニング試験でも、これらの検体には抗HIV活性が見られなかった。

昨年スクリーニング試験で抗HIV活性が認められた検体について、逆転写酵素阻害試験を行った結果、7件中3件に阻害活性が見られた。スクリーニング試験でこの3件に見られた細胞変性抑制効果の主な作用機序が、逆転写酵素阻害であ

ると決定するには、さらに他の作用機序についても検討する必要がある。

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(平成18年度)

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 ($\mu\text{g/ml}$)
6093	250	—	6116	250	—
6094	31	—	6117	250	—
6095	500	—	6118	125	—
6096	125	—	6119	2.0	—
6097	7.8	—	6120	125	—
6098	63	—	6121	250	—
6099	125	—	6122	63	—
6100	250	—	6123	63	—
6101	63	—	6124	125	—
6102	125	—	6125	31	—
6103	16	—	6126	63	—
6104	31	—	6127	250	—
6105	125	—	6128	16	—
6106	7.8	—	6129	250	—
6107	31	—	6130	63	—
6108	16	—	6131	125	—
6109	125	—	6132	63	—
6110	125	—	6133	125	—
6111	125	—	6134	500	—
6112	31	—	6135	500	—
6113	125	—	6136	31	—
6114	31	—	6137	125	—
6115	250	—			

サンプルは、1mlのメタノールで溶解し、その後滅菌蒸留水で各濃度へ希釈した。

表2.逆転写酵素阻害試験

検体番号	逆転写酵素阻害濃度 (IC50)	細胞変性抑制試験	
		MAGIC5(IC50)*	MT-4(IC100)**
5023	—	5.5	—
5095	—	4.4	—
5103	13.5	7.9	—
5104	—	14.5	10.0
5109	16.9	1.7	62.5
5207	—	5.0	—
5505	8.5	15.5	0.8***

単位; μ g/ml

*この試験は、大阪府立公衆衛生研究所、及び名古屋大学で行われた。

**各検体の試験は、次の機関で行われた。

5023, 5505; 東京大学

5095, 5103, 5104, 5109; 北海道立衛生研究所

5207; 大分県衛生環境研究センター

*** IC50

研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（政策創薬総合研究事業）
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 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 46 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(10 mL)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た。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 時間反応させた。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 などを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 46 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が、抗 HIV 活性は認められなかった。また、

MAGIC5 細胞による方法（愛知衛研実施）においても、抗 HIV 活性は認められなかった。

D. 考察

MT-4 細胞を使ったスクリーニング法及び MAGIC5 細胞による方法（愛知衛研実施）において、抗 HIV 活性を示すものは無かったことから、供試薬剤 46 検体のすべてについて、HIV に対する増殖抑制効果を有するものは無かったと考えられる。

E. 結論

京都府実施分における供試薬剤については、HIV に対する増殖抑制効果を有するものは無かった。

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

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，吉田靖子，山田澄夫（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、51 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結果、有効濃度の範囲は狭いながら、1 件に抗 HIV 活性が認められた。

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 6246～6279（34 件）、6306～6322（17 件）の計 51 件のエイズ医薬品候補薬について検討を行った。

（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、51 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サンプル 6250 のみであり、500～1000 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で抑制効果を示した。なお、サンプル番号 6262 および 6267 については、500 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でのみ、HIV-1 の増殖抑制を認められ、それ以外の濃度では抗 HIV 活性は認められなかった（表 1）。

効果の認められた濃度における生細胞率は表 2 に示す通りである。

D. 結論

サンプル番号 6246～6279、6306～6322 の計 51 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、有効濃度が狭いながら、抗 HIV 活性を有する薬剤が 1 件認められた。

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年報、56,2005

(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

(3) 貞升健志、長島真美、新開敬行、甲斐明美、諸角聖、山口 剛、イムノクロマト法で陰性を示した HIV 検査陽性の 2 症例について、第 80 回日本感染症学会総会、東京、2006、

(4) 貞升健志、長島真美、新開敬行、吉田靖子、山田澄夫、東京都内で検出された HIV-1 の Protease 遺伝子の解析、第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2006

(5) 長島真美、貞升健志、新開敬行、吉田靖子、山田澄夫、イムノクロマト法のロット間差に関する検討、第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2006

(6) 新開敬行、貞升健志、長島真美、吉田靖子、山田澄夫、東京都の HIV 検査におけるイムノクロマト法偽陰性例について、第 20 回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、2006

表1 MT-4による細胞障害抑制試験結果

検体番号	抑制効果	細胞毒性濃度($\mu\text{g}/\text{mL}$)	備考
6246	(-)	62.5以上	
6247	(-)	1000以上	
6248	(-)	125以上	
6249	(-)	1000以上	
6250	(+)	2000以上	2管抑制
6251	(-)	250以上	
6252	(-)	1000以上	
6253	(-)	1000以上	
6254	(-)	62.5以上	
6255	(-)	500以上	
6256	(-)	>1000	
6257	(-)	>1000	
6258	(-)	15.6以上	
6259	(-)	1000以上	
6260	(-)	500以上	
6261	(-)	>1000	
6262	(-)	1000以上	1管のみ抑制
6263	(-)	500以上	
6264	(-)	1000以上	
6265	(-)	125以上	
6266	(-)	>1000	
6267	(-)	250以上	
6268	(-)	1000以上	1管のみ抑制
6269	(-)	>1000	
6270	(-)	>1000	
6271	(-)	0.125以上	
6272	(-)	0.25以上	
6273	(-)	250以上	
6274	(-)	7.8以上	
6275	(-)	31.3以上	
6276	(-)	3.9以上	
6277	(-)	250以上	
6278	(-)	15.6以上	
6279	(-)	7.8以上	
6306	(-)	250以上	
6307	(-)	125以上	
6308	(-)	250以上	
6309	(-)	15.6以上	
6310	(-)	1000以上	
6311	(-)	31.3以上	
6312	(-)	>1000	
6313	(-)	1000以上	
6314	(-)	62.5以上	
6315	(-)	125以上	
6316	(-)	7.8以上	
6317	(-)	62.5以上	
6318	(-)	250以上	
6319	(-)	250以上	
6320	(-)	250以上	
6321	(-)	250以上	
6322	(-)	7.8以上	

表2 トリパンブルー染色による生細胞比率

検体番号	細胞毒性濃度	生細胞率
6250	1000 μ g/mL	0.93
	500 μ g/mL	0.91
6262	500 μ g/mL	0.54
6268	500 μ g/mL	0.79

厚生労働科学研究費補助金（政策創薬等総合研究事業）
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34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。その結果、抗HIV活性を示すサンプルは認められなかった。

A. 研究目的

参加企業・大学等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1.5×10⁵cells/mLの濃度で浮遊させ、96穴の平底マイクロプレートにて200μ/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

34サンプル（06212～06245）について、1000μg/mL～0.5μg/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

MT-4細胞に対する細胞毒性は通常細胞の増殖を抑制し、死滅させるものであるが、今回、34サンプル中1サンプル（06244）において、7.8μg/mL以上の濃度でMT-4細胞の増殖を抑制はしないが、著しく円形化・巨細胞化させる作用が認められた。MT-4細胞への毒性を示さない3.9μg/mL以下の濃度においては、抗HIV活性は認められなかった。

E. 結論

国立医薬品食品衛生研究所から配付された34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。その結果、抗HIV活性を示すサンプルは認められなかった。

厚生労働科学研究費補助金（政策創薬総合研究事業）

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 澤田 幸治 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18年度エイズ医薬品等開発研究の一端として、送付された66件の被検薬剤（コード番号06172～06211および06280～06305）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3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2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活性が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18年度エイズ医薬品等開発研究の一端として、送付された66件の被検薬剤（コード番号06172～06211および06280～06305）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. 06172～06292 および06298～06299、50～0.025μl/ml（No. 06295～06297 および06300～06305）、0.05～0.00025μl/ml（No.06293～06294）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3件[No.06298（250～31.3μg/ml）、No.06299（250～15.6μg/ml）およびNo.06305（6.25～0.78μg/ml）存在した。また1管ではあるが抑制が見られた物質が2件[No.06196(125μg/ml)およ

び No.06285 (250 μ g/ml)]存在した。

MT-4 細胞に対する細胞障害抑制効果の認められた3件(No. 06298、No.06299 および No.06305)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、各薬剤が毒性を示さない最大の濃度となるよう設定した。

その結果、巨細胞形成抑制率は No.06298 は 0.632(63.2%)、No.06299 は 0.718(71.8%)、No. 06305 は 0.596(59.6%)であった。

D. 考察

5日目における判定の結果、66件の被検薬剤のうち61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2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3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、明らかな巨細胞形成抑制効果が認められた。これらの有効な検体に関しては、将来的に新薬開発に繋がる可能性が示唆された。

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、ある程度効果の認められた検体に対し、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66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3件、更に分画することで有効となる可能性のあるものが2件存在した。HIV 増殖抑制効果が見られた3件はいずれも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