

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 18 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 34 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、34 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 18 年度に依頼されたサンプル(34 検体;No. 06138~06171) 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 × 10⁵ 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 μl/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 34 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 μg/ml, 5~0.0049 μg/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、全て有効な薬剤は見出せなかった。なお、今年度の検体については、強い細胞毒性が認められず、明瞭な細胞変性効果 (CPE) がいないために抗 HIV 活性があるように見える検体が約半数程度あったが、細胞継代を行うことにより明瞭な細胞毒性が認められ、最終的には細胞毒性のために細胞増殖が抑制されている結果と考えられた。

5. 結 論

本年度の 34 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18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、500~0.49 ($\mu\text{g/ml}$) :06138~06147、06153、06160~06164
 5~0.0049 ($\mu\text{g/ml}$) :06148~06152、06154~06159、06165~06171

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
06138	250 以上	(-)	06155	2.5 以上	(-)
06139	250 以上	(-)	06156	0.156 以上	(-)
06140	250 以上	(-)	06157	0.156 以上	(-)
06141	250 以上	(-)	06158	0.156 以上	(-)
06142	125 以上	(-)	06159	0.313 以上	(-)
06143	125 以上	(-)	06160	62.5 以上	(-)
06144	62.5 以上	(-)	06161	250 以上	(-)
06145	62.5 以上	(-)	06162	125 以上	(-)
06146	250 以上	(-)	06163	125 以上	(-)
06147	62.5 以上	(-)	061664	125 以上	(-)
06148	0.039 以上	(-)	06165	5.0 以上	(-)
06149	0.039 以上	(-)	06166	1.25 以上	(-)
06150	0.078 以上	(-)	06167	2.5 以上	(-)
06151	0.078 以上	(-)	06168	0.625 以上	(-)
06152	0.156 以上	(-)	06169	0.156 以上	(-)
06153	125 以上	(-)	06170	0.0391 以上	(-)
06154	5.0 以上	(-)	061671	0.010 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 157 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、12 検体に抗 HIV 活性が認められ、そのうち 6 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 8 種の検体についてその抗 HIV 作用メカニズムを検討した。8 種の検体のうち 5 種はマクロファージ好性 HIV-1 のみを、残りの 3 種は T 細胞好性ウイルスの増殖も抑制したものであった。8 種の検体は 1 種を除いて、細胞と抗 CCR5 モノクローナル抗体の結合を強く抑制したが、細胞と抗 CXCR4 モノクローナル抗体の結合の抑制は見られなかった。これらのことから、これらの検体は HIV-1 のセコンドレセプターである CCR5 分子に作用することにより抗ウイルス効果を示したことが示唆された。

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。これらの薬剤を見い出すためには 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、32 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コ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 µg/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あるいは T 細胞好性ウイルスを抑制した 32 検体のうち、抗ウイルス活性の強い 8 検体を選んだ。そのうち 5 検体はマクロファージ好性ウイルスのみを抑制し、3 検体は T 細胞好性ウイルス、マクロファージ好性ウイルス双方を抑制した。8 検体のうち 7 検体が植物由来の物質であり、1 検体が合成品であった。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 100µg/mL になるように希釈した 8 薬剤検体および 10µM になるように 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 5µl ずつ加えた。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 IgG2a5µl ずつを加えた。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 5µl 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 100µg/mL になるように希釈した 8 薬剤検体および 10µg/mL になるように Bicyclam を加え、さらに抗 CXCR4 抗体として、12G5 (Serotec, Oxford, England) および 44717.111(Genzyme, Mpls, MN, USA) を 5µl ずつ加えた。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 5µl ずつ加えた。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 5µl ずつ加え、37°C 30 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、157 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、12 検体に抗ウイルス活性を認めた (Table 1)。他に 2 検体に弱い活性を認めた。そのうち 6 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.06010 と 06300 は 2 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 10 検体と、多数を示したのが特徴的であった。また 9 検体は細胞毒性濃度と抗ウイルス活性を示した濃度の比である選択係数が 10 以上を示した。

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、あるいは T 細胞好性ウイルスの増殖を抑制した 8 種の薬剤について、HIV のセコンドレセプターである CCR5 分子への影響を調べるために 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 に示すようにモノクローナル抗体 45531.111 の MAGIC-5A 細胞への結合を抑制する検体は TAK-779 を除いて見られなかった。しかし、モノクローナル抗体 2D7 の細胞への結合を抑制する効果は検体 No.5104 を除いて 7 種の検体について認められた。特に検体 No.5023, 5038, 5505 の抗体結合抑制効果は強いものであった。これらのことからモノクローナル抗体 2D7 の認識する部位に 7 種の検体が作用を及していることを示すものであった。

一方、同じく HIV-1 の第 2 受容体である CXCR4 に及ぶ影響を調べるために 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、8 種の検体すべてにおいて結合抑制効果は認められなかった。ただし、MT-4 細胞アッセイにおいて抗ウイルス効果が認められた No.5038 および 5505 は細胞毒性を示したためにデータを得ることが出来ず、これらの検体の作用は不明であった。

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 12 検体認められ、選択係数が 10 以上となる薬剤が多数を占めたことことから、ウイルスの細胞への侵入に関わるセコ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ぶ影響について検討する必要がある。

昨年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 8 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コ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)、1 検体 (No.5104) を除いて強い抗体結合阻止効果が認められた。このことからこれら効果が認められた検体は HIV-1 のセコンドレセプターである CCR5 分子に作用して抗ウイルス効果を示したことが示唆された。

一方、T 細胞好性 HIV-1 を抑制した 3 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コ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、抑制効果は明確

ではなかった。(Table 3)。これからのことからこれらの物質がT細胞好性ウイルスを抑制した作用機序についてはさらに、詳細な検討が必要であると考えられた。

HIV感染症の病期の長期間体内ではマクロファージ好性ウイルスが多数を占めることが明らかにされているが、今回、多くの検体がマクロファージ好性ウイルスの増殖を強く抑制することが分かり、これらの検体がすぐれたエイズ薬のシードとなる可能性が示された。

性感染症罹患リスクの解析，第20回日本エイズ学会学術集会、東京、2006

発表論文

1. 川畑拓也、小島洋子、森 治代、大竹 徹、大國 剛、当所にて HIV 感染を確認した、2 例のイムノクロマトグラフィー法陰性の感染初期例、感染症学雑誌 81, 76-77, 2007

学会発表

1. 川畑拓也、小島洋子、森 治代、大竹 徹、大國 剛、HIV 感染に対して感染リスクの高い行動を取る人々を対象にした疫学調査において見つかった、HIV-1 遺伝子陽性である 3 例の感染初期例、第 20 回近畿エイズ研究会学術集会、大阪、2006
2. 小島洋子、川畑拓也、森 治代、大竹 徹、大阪府内において HIV 感染に対してリスクの高い行動をとるグループ内で広がる HIV-1 の疫学調査、第 20 回近畿エイズ研究会学術集会、大阪、2006
3. 森 治代、小島洋子、川畑拓也、大竹 徹、V108I polymorphism が EFV 耐性の誘導に及ぼす影響、第 20 回日本エイズ学会、東京、2006
4. 川畑拓也、小島洋子、森 治代、大竹 徹、大國 剛、IC 法において陰性を示した 3 例の HIV 感染初期例、第 20 回日本エイズ学会学術集会、東京、2006
5. 川畑拓也、小島洋子、森 治代、大竹 徹、大國 剛、HIV 疫学調査における母集団の

Table 1 Screening test of Anti-HIV-1 activity

検体番号	MAGIC 5		MT-4*	
	IC50	最小毒性濃度	IC100	最小毒性濃度
06003	NE	5.0	1.0	4.0
06007	19.5	100	NE	31.1
06008	10.0	200-100	NE	62.5
06010	1.0	20-10	NE	0.5
06014	4.8	100-50	NE	15.7
06016	4.4	>10.0	NE	7.9
06019	4.5	50	NE	4.0
06032	(50)	50	NE	15.7
06175	36.0	250	NE	500
06179	(125)	250	NE	500
06181	12.5	250	NE	250
06188	12.5	250-125	NE	125
06196	NE	100	(125)	250
06285	NE	100	(250)	500
06298	12.8	500-250	31.3	500
06299	13.5	500-250	15.6	500
06300	1.6	50-25	NE	>50
06305	NE	2.0	0.78	12.5
				($\mu\text{g}/\text{ml}$)
*MT-4アッセイの結果は各分担者のデータを記載				
() : 弱い抗HIV-1活性が認められた				

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

mAb Compounds	45531.111	2D7
5023	-0.25	43.7
5038	-1.3	55.8
5109	-0.1	17.7
5095	-3.4	26.2
5103	-4.7	40.8
5104	-4.6	-10.9
5207	-4.0	19.6
5505	-0.8	63.7
TAK-779	90.4	70.9

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

mAb Compounds	12G5	44717.111
5023	13.9	4.8
5038	Cell toxic	Cell toxic
5109	-9.1	-1.3
5095	16.3	3.4
5103	-0.3	0.1
5104	-18.9	1.1
5207	15.9	0.2
5505	cell toxic	Cell toxic
Bicyclam(JM3100)	100.0	63.8

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

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、165 検体のうち 55 検体(33%) に M-tropic virus に対して増殖抑制効果が認められた。そのうち、7 検体は選択性が 20 倍以上を示した。また、昨年度、抗 HIV 活性の見られた 7 種類の薬剤の感染後期（持続感染系）における効果はすべて、細胞毒性のない最大濃度においても巨細胞の形成の抑制はみられなかった。さらに、昨年度、分離した逆転写酵素阻害剤に対する耐性臨床分離株で解析された変異のデータをもとに、M184V, T215Y, K103N に変異をもつ耐性感染性クローンを作成した。

A. 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 165 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評価する。

また、新規薬剤開発に向けての作用メカニズムの解析として、昨年度、抗 HIV 活性の見られた薬剤の感染後期（持続感染系）における効果を解析する。

さらに、従来の薬剤と交差耐性の有無を検討し、当研究班で見出された抗 HIV 活性をもつ化合物が临床上使用されている従来の薬剤にない新規薬剤となりうるかどうかの判定に応用するため、これまでに分離した逆転写酵素阻害剤に対する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、M184V, T215Y,

K103N に変異をもつ耐性感染性クローンを作成する。

B. 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) 作用メカニズムの評価

感染後期（持続感染系）における効果を昨年度 抗 HIV 活性の見られた化合物のうち、7 種類（05023, 05095, 05103, 05104, 05109, 05207, 05505）を選別し、HIV-1(HTLV-III_B)が持続感染している MOLT-4 細胞を、種々の濃度の薬剤とともに培養した。培養 7 日目に洗浄によりウイルスを除いた後、種々の濃度の薬剤を含む培養液中で未感染の MOLT-4 細胞と 1 : 1 の割合で混合し、24 時間培養した。巨細胞の有無を検鏡により観察し、生細胞数の計測によって巨細胞形成の程度を測定した。

3) 薬剤耐性感染性クローンの作成

HXB2・RT M18V 感染性クローンは pSUM8 plasmid を用いて、RT gene の codon 184 の ATG を GTG に site-directed mutagenesis により作成した。また、HXB2・RT T215Y 感染性クローンは、同様に pSUM8 plasmid を用いて、RT gene の codon 215 の ACC を TAC に変換し、作成した。HXB2・RT K103N 感染性クローンは、同様に pSUM8 plasmid を用いて、RT gene の codon 103 の AAA を TAC 変換し、作成した。

C. 研究結果および考察

今年度スクリーニングした 165 検体のうち、55 検体に CCR5 に対する増殖抑制活性がみられ、10 倍以上の選択性がみられた（表 1）。特に、コード番号 148, 158, 166, 253, 259, 262, 265 の 7 検体は選択性が 20 倍以上を示した。なお、対照薬剤として使用した TAK779 の IC₅₀ はそれ

ぞれ 0.06 μ M である。今年度は例年になく、多くの検体で CCR5 に対する増殖抑制活性がみられており（約 33%）、この中で、将来、臨床的に応用可能な候補薬剤が見つかる可能性があり、今後、新規薬剤の開発に向けて、作用メカニズムを解析していく予定である。

昨年度、抗 HIV 活性の見られた 7 種類の薬剤の感染後期（持続感染系）における効果は 7 種類すべて、細胞毒性のない最大濃度においても巨細胞の形成の抑制はみられなかった。なお、対照として用いたグリコシダーゼ阻害剤 n-butyl-1-deoxy-nojirimycin (BDN) は 200 μ g/ml の濃度において巨細胞形成を完全に抑制した（表 2）。

今回作成した薬剤耐性感染性クローンは、当研究班で見出された抗 HIV 活性をもつ化合物が、従来の薬剤と交差耐性の有無を検討し、临床上使用されている従来の薬剤にない新規薬剤となりうるかどうかの判定に有用である。一般的に臨床分離株は M-tropic が多く、アッセイ系が煩雑であるため、我々が作成した T-tropic 耐性クローンは、MTT のアッセイ系を用いることにより、交差耐性試験を容易に行うことが可能である。今後はさらに多くの M-tropic および T-tropic 薬剤耐性ウイルスのライブラリーを作成し、候補薬剤が従来の薬剤にない新規薬剤となりうるかどうかの評価を行っていく予定である。

D. 結論

MAGIC 5 A 細胞を用いたスクリーニングの結果、165 検体のうち 55 検体(33%)に M-tropic virus に対して増殖抑制効果が認められた。そのうち、7 検体は選択性が 20 倍以上を示した。また、昨年度、抗

HIV 活性の見られた7種類の薬剤の感染後期（持続感染系）における効果はすべて、細胞毒性のない最大濃度においても巨細胞の形成の抑制はみられなかった。さらに、昨年度、分離した逆転写酵素阻害剤に対する耐性臨床分離株で解析された変異のデータをもとに、M184V, T215Y, K103N に変異をもつ耐性感染性クローンを作成した。

E. 研究発表

Raphael Lwembe, Washington Ochieng, Annie Panikulam, Charles O. Mongoina, Tresa Palakudy, Mary Owens, Yusuke Koizumi, Seiji Kageyama, Naohiko Yamamoto, Tatsuo Shioda, Rachel Musoke, Angelo D'Agostino, Elijah M. Songok, Frederick A. Okoth, and Hiroshi Ichimura.

Anti-retroviral drug resistance-associated mutations among non-subtype B HIV-1-infected Kenyan children with treatment failure.

the Journal of Medical Virology. (in press)

表1 Magic 5 assay (MT-4 assay との対比)

コード番号	Magic 5			MT-4	
	IC50 (a) ($\mu\text{g/ml}$)	細胞毒性(b) ($\mu\text{g/ml}$)	選択性 (b/a)	IC100 ($\mu\text{g/ml}$)	細胞毒性 ($\mu\text{g/ml}$)
049	20.3	32	1.6	NE	31.3
050	115	400	3.5	NE	125
052	26.2	80	3.1	NE	31.3
057	32.7	80	2.4	NE	31.3
*072	0.9	16	*17.8	NE	7.8
139	148	500	3.4	NE	250
145	2.6	20	7.7	NE	62.5
*148	0.001	0.032	*32	NE	0.039
150	0.043	0.064	1.5	NE	0.078
*152	0.08	0.8	10	NE	0.156
153	21.3	125	5.9	NE	125
*156	0.05	0.8	*16	NE	0.156
*157	0.08	0.8	*10	NE	0.156
*158	0.03	0.8	*26.7	NE	0.156
*159	0.07	0.8	*11.4	NE	0.313
160	22	100	4.5	NE	62.5
161	51.2	250	4.9	NE	250
162	22.6	125	5.5	NE	125
163	18.9	125	6.6	NE	125
*166	0.1	4	*40	NE	1.25
167	0.7	3.2	4.5	NE	2.5
170	0.01	0.06	6	NE	0.039
214	7.1	16	2.3	NE	7.8
215	32.8	160	4.9	NE	125
218	3.7	16	4.3	NE	7.8
219	53.7	160	2.9	NE	62.5
*227	13.8	160	*11.6	NE	125
229	86.3	160	1.9	NE	250
231	24.1	160	6.6	NE	31.3
235	432	640	1.5	NE	500
236	46.8	160	3.4	NE	62.5
240	213	400	1.9	NE	250
241	54.8	320	5.8	NE	250
243	264	1000	3.8	NE	500
246	11.8	80	6.8	NE	62.5
*247	73.1	800	*10.9	NE	1000
249	247	800	3.2	NE	1000
250	241	2000	8.3	500	2000
252	369	800	2.2	NE	1000
*253	53.7	2000	*37.2	NE	1000
*255	53.8	800	*14.9	NE	500
256	431	2000	4.6	NE	1000
*259	57.5	2000	*34.8	NE	1000
260	254	800	3.1	NE	500
*262	47.8	2000	*41.8	500	1000
*263	51.1	800	*15.7	NE	500
*265	5.8	400	*68.9	NE	125
266	967	2000	2.1	NE	2000
*267	24.7	400	*16.2	NE	250
*268	58.8	1000	*17	500	1000
270	457	2000	4.4	NE	1000
274	5.8	40	6.9	NE	7.8
275	22.8	80	3.5	NE	31.3
277	158	320	2	NE	250
279	4.2	12.8	3	NE	7.8

* は選択性が10倍以上みられたサンプル49

表 2

Inhibitory effect of the compounds on giant cell formation
on chronic infected cells

Compounds	Conc. (ug/ml)	Inhibition (%)
05023	0.2	0
05095	x20	0
05103	x2500	0
05104	500	0
05109	10	0
05207	20	0
05505	100	0
BDN	200	100

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 感染初期に重要なマクロファージ指向性の 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、この系を用いて HIV-1 の感染および細胞間感染による細胞融合を容易に判定することができた。さらにこの系を用いて二百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

昨年度までに HIV-1 の感染を簡便かつ迅速に検出可能で、また感染経過を経時的に観察できる細胞系を開発した。すなわち HIV-1 に非常に感受性の高い NP-2/CD4/CCR5 細胞および 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て NP-2/CD4/CCR5/GFP 細胞(N4R5/GFP 細胞)あるいは NP-2/CD4/CXCR4/GFP 細胞(N4X4/GFP 細胞)を樹立した。この細胞は HIV-1 が感染すると GFP 遺伝子の発現が誘導され、GFP が核に局在した。さらに CXCR4 をコレセプターとして利用する T 細胞株指向性 HIV-1 (X4-HIV-1) の Env および Tat を発現している HeLaKS386 細胞と N4X4/GFP 細胞を混合培養することで GFP 陽性の合胞体を形成した。昨年度までにこれらの結果から、T-tropic HIV-1 のウイルス感染における各種薬剤のスクリーニング法を開発し、その作用メカニズムの解析を行った。

今回我々は、HIV-1 感染初期に重要な CCR5 をコレセプターとして利用するマクロファージ指向性 HIV-1 (R5-HIV-1) のウイルス感染に効果のある薬剤をスクリーニングするために、標的細胞として N4R5/GFP 細胞を、HIV-1 Env 発現細胞として R5-HIV-1 SF162 株の envelope および Tat を発現している HeLa 細胞 (HeLa/M-env/Tat 細胞) を用いて、これらの細胞の混合培養を行った。さらに本研究では、約二百種類の物質を用いて、抗 HIV-1 剤のスクリーニングを N4R5/GFP 細胞および M-tropic HIV-1 BaL 株を用いて検討した。

B. 研究方法

細胞

C8166/CCR5 細胞および Molt-4/IIIB 細胞は 10% の FBS 含む RPMI1640 培地で培養した。N4R5/GFP 細胞および N4X4/GFP 細胞は 10% の FBS 含む EMEM 培地で培養した。HeLaKS386 および HeLa/M-env/Tat 細胞は、10% の FBS 含む DMEM 培地で培養した。

ウイルス

HIV-1 BaL 株は、C8166/CCR5 細胞に感染させ、感染 7 日後の上清を回収し、0.45 μ m のポアフィルターでろ過滅菌した。IIIB 株は、Molt-4/IIIB 株の上清を回収し、0.45 μ m のポアフィルターでろ過滅菌した。すべてのウイルスは使用するまで -80 $^{\circ}$ C に凍結保存した。

薬剤

逆転写酵素阻害剤 3'azidothymidine (AZT)、CCR5 アンタゴニスト TAK-779、CXCR4 アンタゴニスト AMD3100、ランダムに選んだ新規の核酸関連化合物 50 種類 (KH-1~KH-50)、デアザフラビン類および類縁化合物 142 種類 (GY-1~GY-452) を用い検討した。

細胞融合形成試験

N4R5/GFP 細胞あるいは N4X4/GFP 細胞 25,000 個を 250 μ l の培地に浮遊させ、24-well plate の各 well に播種し、翌日 HeLaKS386 細胞あるいは HeLa/M-env/Tat 細胞 25,000、5,000、1,000、200、40、8 個を 250 μ l の培地に浮遊させ上層した。6、12、24 時間後に GFP 陽性の合胞体を観察した。

薬剤による細胞融合抑制試験

合胞体形成に対する薬剤の効果は、以下の手順で検討した。N4R5/GFP 細胞および N4X4/GFP 細胞 12,500 個を 250 μ l の培地に浮遊させ、48-well plate の各 well に播種し、翌日 TAK-779 あるいは AMD3100 を、10%FBS を含む EMEM 培地で段階希釈して 50 μ l ずつ各 well に加えた。37 $^{\circ}$ C で 1 時間後、HeLa/M-env/Tat 細胞あるいは HeLaKS386 細胞を GFP 陽性合胞体が 1well あたり 200 個出る細胞数に希釈して 200 μ l 上層した。37 $^{\circ}$ C で 1 日培養後、GFP 陽性合胞体数をカウントし、薬剤を添加していない対照の混合培養の GFP 陽性合胞体数と比較し、合胞体形成を 50%抑制する濃度 (IC50) を算出した。

薬剤による HIV-1 感染抑制試験

HIV-1 感染に対する薬剤の効果は、以下の手順で検討した。N4R5/GFP 細胞あるいは N4X4/GFP 細胞

胞 5,000 個を 100 μ l の培地に浮遊させ、96-well plate の各 well に播種した。翌日薬剤は 10%FBS を含む EMEM 培地で段階希釈して 20 μ l 細胞に加えた。抗ウイルス剤の陽性コントロールには AZT、TAK-779、AMD3100 を用いた。37°C で 1 時間反応後、HIV-1 BaL 株あるいは IIIB 株 100 μ l を GFP 陽性細胞数が 1well あたり 100-200 個出る濃度で感染させた。2 日後 GFP 陽性細胞数をカウントし、薬剤を添加していない対照と比較し、感染を 50%または 90%抑制する濃度 (IC50、IC90) を算出した。薬剤の 50%細胞毒性濃度 (TC50) は、N4R5/GFP 細胞に薬剤を処理し、2 日後に Tetracolor one を添加後に 37°C で 1 時間 CO2 incubator で培養後、OD450 を測定して算出した。また、IC50 と TC50 の比を指標として選択性指数 (TD50/ID50) を算出した。

C. 研究結果

細胞融合形成試験

N4R5/GFP 細胞および N4X4/GFP 細胞に HIV-1 の envelope および Tat が発現している HeLa/M-env/Tat 細胞あるいは HeLaKS386 細胞の混合培養を行った。

はじめに、混合培養による合胞体形成について時間経過を追って観察した (Fig. 1)。N4R5/GFP 細胞と HeLa/M-env/Tat 細胞との混合培養および N4X4/GFP 細胞と HeLaKS386 細胞との混合培養で検討したところ、混合培養後 6 時間で合胞体形成が観察された。さらに 12 時間後には GFP 陽性の細胞核が観察された。混合培養 24 時間後には GFP 強度の強い合胞体が観察された (Fig. 1)。

合胞体形成のコレセプター依存性を検討した (Fig. 2)。N4R5/GFP 細胞は HeLa/M-env/Tat 細胞との混合培養により合胞体が形成され、細胞核が GFP 陽性となった (Fig. 2A)。HeLaKS386 細胞との混合培養では合胞体および GFP 陽性の細胞核も観察されなかった。また、この GFP 陽性巨細胞は HeLa/M-env/Tat 細胞数に依存していた (Fig. 2B)。N4X4/GFP 細胞では、昨年までに報告してきたとおり HeLaKS386 細胞との混合培養で合胞体および GFP 陽性の細胞核が観察された (Fig. 2C)。HeLa/M-env/Tat 細胞との混合培養でも、HeLa/M-env/Tat 細胞の量を増やすことで、少数ではあるが細胞核数の少ない合胞体が形成され、GFP 陽性の細胞核も観察された (Fig. 2C)。また、この GFP 陽性合胞体は HeLaKS386 細胞数に依存していた (Fig. 2D)。

薬剤による細胞融合抑制試験

合胞体形成阻害を指標とした抗 HIV-1 剤スクリーニングのために CCR5 あるいは CXCR4 アンタゴニストを用いて細胞融合抑制試験を行った (Fig. 3)。N4R5/GFP 細胞と HeLa/M-env/Tat 細胞との混合培養において、CCR5 アンタゴニスト TAK-779 は細胞融合抑制効果を示した。IC50 は 500 μ g/ml、

IC90 は、1mg/ml 以上であった (Fig. 3A)。N4X4/GFP 細胞と HeLaKS386 細胞との混合培養において、AMD3100 は、細胞融合抑制効果を示した。IC50 は 0.4 μ g/ml、IC90 は 0.9 μ g/ml であった (Fig. 3B)。

HIV-1 感染抑制試験の検討

R5-HIV-1 を用いた抗 HIV-1 剤のスクリーニングのために、R5-HIV-1 の BaL 株および X4-HIV-1 の IIIB 株を用いて TAK-779 および AMD3100 の抗 HIV-1 活性を検討した。AMD3100 は N4R5/GFP 細胞への BaL 株の感染を抑制しなかったが、TAK-779 は BaL 株の感染を特異的に抑制した。TAK-779 の IC50 は 0.3 μ g/ml であった (Fig. 4A)。しかし、TAK-779 は N4X4/GFP 細胞への IIIB 株の感染は抑制しなかった。AMD3100 は IIIB 株の感染を特異的に抑制し、IC50 は 0.02 μ g/ml であった (Fig. 4B)。

薬剤の R5-HIV-1 感染抑制試験

AZT、核酸関連化合物 50 種類および 142 種類のデアザフラビン類および類縁化合物について R5-HIV-1 に対する感染抑制効果を検討した (Fig. 5、Table 1)。このうち 6 種類の薬剤 GY-206、GY-278、GY-387、GY-397T、GY-443、GY-444 で R5-HIV-1 に対する感染抑制効果が認められた。各薬剤の IC50 は、それぞれ 0.9、4、0.7、0.1、0.2、0.06 μ g/ml であった (Fig. 5A、Table 1)。GY-443、GY-444 については IC90 が算出でき、0.7、0.5 μ g/ml であった。AZT および TAK-779 の IC50 は、0.002、0.3 μ g/ml であった。IC90 は 0.05、5 μ g/ml 以上であった (Fig. 5A)。

今回の HIV-1 感染抑制試験に用いた薬剤の多くは、10-100 μ g/ml で細胞毒性を示した。感染抑制効果を示した GY-206、GY-278、GY-387、GY-397T、GY-443、GY-444 の TC50 は、10、40、3、0.3、1.2、0.4 μ g/ml であった (Fig. 5B)。AZT および TAK-779 の TC50 は、100 μ g/ml 以上であった。GY-206、GY-278、GY-387、GY-397T、GY-443、GY-444 の選択性指数は、11.1、10、4.3、3、6、6.7 であり、AZT は 50000 以上、TAK-779 は 333 以上であった (Table 1)。

GY-283、GY-284 では 1 μ g/ml で処理をしたとき、合胞体形成を抑制し、GFP の発現は弱かった。この二つの薬剤のみ感染 3 日後まで観察したが、合胞体形成は抑制され、GFP は低発現を維持していた。

D. 考察

昨年度までに R5-HIV-1 および X4-HIV-1 に対する感染、X4-HIV-1 における抗 HIV-1 剤のスクリーニング法の開発を報告してきた。今年度は、感染初期に重要な役割を果たす R5-HIV-1 の合胞体形成および R5-HIV-1 感染に抑制作用を示す抗 HIV-1 剤のスクリーニングを行い、6 種類の抗 HIV-1 感染抑制効果示す薬剤候補が見つかった。

今回の実験では、HIV-1 による合胞体形成は、混

合培養後 6 時間以内に起こり、GFP の転写および発現は、12 時間以内に確認できるがわかった (Fig. 1)。Tat による転写促進により過剰に発現された GFP 分子は、ある程度の分子が集まらなると蛍光顕微鏡下では観察することはできないので、実際には 12 時間より早い段階で発現される。

混合培養による GFP 陽性の合胞体形成は、HIV-1 envelope の細胞指向性に依存していた。ただし、N4X4/GFP 細胞と R5-HIV-1 Env および Tat を発現している HeLa/M-env/Tat 細胞の混合培養では、少数の細胞核数の少ない GFP 陽性巨細胞が検出された。これは、HeLa/M-env/Tat 細胞で発現している R5-HIV-1 SF162 株の envelope が弱い X4 指向性持つことが知られており、そのためであると思われる。

N4R5/GFP 細胞と HeLa/M-env/Tat 細胞との混合培養系を用いれば感染初期のステップにおける抗 HIV-1 剤のスクリーニングが可能であり、HIV-1 を使用せずにアッセイを行えるメリットがある。CCR5 アンタゴニスト TAK-779 を用いることにより R5-HIV-1 の envelope を介した合胞体形成が抑制することから、R5 の HIV-1 に対するスクリーニング法に利用できることがわかった (Fig. 3)。

TAK-779 および AMD3100 を用いた BaL 株および IIIB 株の感染抑制試験から、N4R5/GFP 細胞を用いることで R5-HIV-1 感染に特異的に作用する抗 HIV-1 剤のスクリーニングに応用できることが確認できた (Fig. 4)。

この結果に基づき、新規の核酸関連化合物 50 種類 (KH-1~50)、デアザフラビン類および類縁化合物 142 種類 (GY-1~GY-452) について、抗 HIV-1 活性および細胞毒性を検討した (Fig. 5)。この結果、デアザフラビン類および類縁化合物 142 種類 (GY-1~GY-452) のうち 6 種類の薬剤 (GY-206、GY-278、GY-387、GY-397T、GY-443、GY-444) で抗 HIV-1 活性を有したものが検出された。これらの薬剤のうち GY-206、GY-278、GY-443、GY-444 の選択性指数は 5 以上を示した。

GY-283、GY-284 は、合胞体形成を抑制し、細胞核内の GFP の発現を低く抑えた。これは HIV-1 感染後に HIV-1 の転写の抑制がかかり、Env および Tat の発現が抑制され、細胞融合および GFP の発現が抑制されたことが考えられる。

E. 結論

N4R5/GFP 細胞を用いた系で、R5-HIV-1 に対するウイルス感染および細胞間感染をモデルとした抗 HIV-1 剤のスクリーニング法を開発した。このスクリーニング法は、感染初期に重要なマクロファージ指向性の R5-HIV-1 の感染・増殖・複製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. 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(1):105-13.
2. K Abe, A Nozaki, K Tamura, M Ikeda, K Naka, H Dansako, H Hoshino, K Tanaka, and N Kato. Tandem repeats of lactoferrin-derived anti-hepatitis C virus peptide enhance antiviral activity in cultured human hepatocytes. *Microbiol Immunol.* 2007, 51: 117-125.
3. 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.* 2006, 306: 59-69.

2. 学会発表

1. Ohtsuki T, Jinno-Oue A, Shimizu N, Hoshino H. Establishment of a convenient and rapid detection system for determination of HIV/SIV coreceptor usage. 第 10 回神経ウイルス研究会 (石川) 2006 年 6 月 8-10 日
2. 清水宣明、大上厚志、田中淳、大槻貴博、山口華代、中谷陽子、森隆久、和田成一、小林泰彦、星野洪郎. HIV-1 感染における重粒子線照射の効果とフォルミルペプチド受容体の HIV-1 コレセプター活性に関する研究. 第 10 回神経ウイルス研究会 (石川) 2006 年 6 月 8-10 日
3. 大上厚志、清水宣明、田中淳、大槻貴博、星野洪郎. ヒト脳微小血管に由来する内皮細胞と周皮細胞の共存培養系を用いた HIV-1 感染試験. 第 10 回神経ウイルス研究会 (石川) 2006 年 6 月 8-10 日
4. 大槻貴博、清水宣明、大上厚志、星野洪郎. 重粒子線照射による潜伏感染からの再活性化機構の解明. 第 2 回 COE 研究報告会 (群馬) 2006 年 8 月 24 日
5. 清水宣明、大上厚志、田中淳、大槻貴博、森隆久、中村孝子、和田成一、小林泰彦、星野洪郎. HIV-1 感染感受性に対する重粒子線の効果の解析. 第 54 回日本ウイルス学会 (名古屋) 2006 年 11 月 19 日~11 月 21 日
6. 清水宣明、大上厚志、田中淳、大槻貴博、森隆久、中村孝子、内海英貴、野島美久、星野洪郎. 臨床分離株 HIV 株のコレセプター使用性の解析. 第 20 回日本エイズ学会 (東京) 2006 年 11 月 30 日~12 月 2 日
7. 大上厚志、清水宣明、田中淳、大槻貴博、星野洪郎. ヒト血液脳関門構成細胞への HIV-1 感

8. 染性におよぼす血清の影響について. 第 20 回日本エイズ学会 (東京) 2006 年 11 月 30 日～12 月 2 日
9. Takahiro OHTSUKI, Nobuaki SHIMIZU, Ariful HOQUE, Atsushi TANAKA, Atsushi OUE, Hiroo HOSHINO. NP-2 cell system for determination and detection of HIV/SIV coreceptor usage and infection. The First CMU - Gunma Scientific Meeting on HIV Infection, Chiang Mai University, Chiang Mai, 12 January, 2007.
10. Atsushi OUE, Nobuaki SHIMIZU, Atsushi TANAKA, Takahiro OHTSUKI, and Hiroo HOSHINO. The Blood-brain Barrier and HIV-1. The First CMU - Gunma Scientific Meeting on HIV Infection, Chiang Mai University, Chiang Mai, 12 January, 2007.
11. Nobuaki SHIMIZU, Atsushi OUE, Atsushi TANAKA, Takahisa MORI, Takahiro OHTSUKI, Ariful HOQUE, Chatchawann Apicharpiyakul, Hideki UCHIUMI, Yoshihisa NOJIMA and Hiroo HOSHINO. Identification of Novel Coreceptors and Multiple Uses of Coreceptors by Primary Isolates of Human Immunodeficiency virus type-1. The First CMU - Gunma Scientific Meeting on HIV Infection, Chiang Mai University, Chiang Mai, 12 January, 2007.
- G. 知的所有権の取得状況
B 型肝炎ウイルスの感染性を容易に短期間に判定する方法 (国際出願 : PCT/JP2006/317984)

Table 1 薬剤スクリーニングのまとめ

Drug	IC50 (μg/ml)	IC90 (μg/ml)	TC50 (μg/ml)	TC50/IC50	Remark
AZT	0.002	0.05	>100	>50000	
TAK-779	0.3	>5	>100	>333	
GY-206	0.9	>1	10	11.1	
GY-278	4	>10	40	10	
GY-283	>1	>1	3	<3	Inhibition of syncytia formation Reduction of GFP intensity
GY-284	>1	>1	1.1	<1.1	Inhibition of syncytia formation Reduction of GFP intensity
GY-387	0.7	>1	3	4.3	
GY-397T	0.1	>0.1	0.3	3	
GY-443	0.2	0.7	1.2	6	
GY-444	0.06	0.5	0.4	6.7	

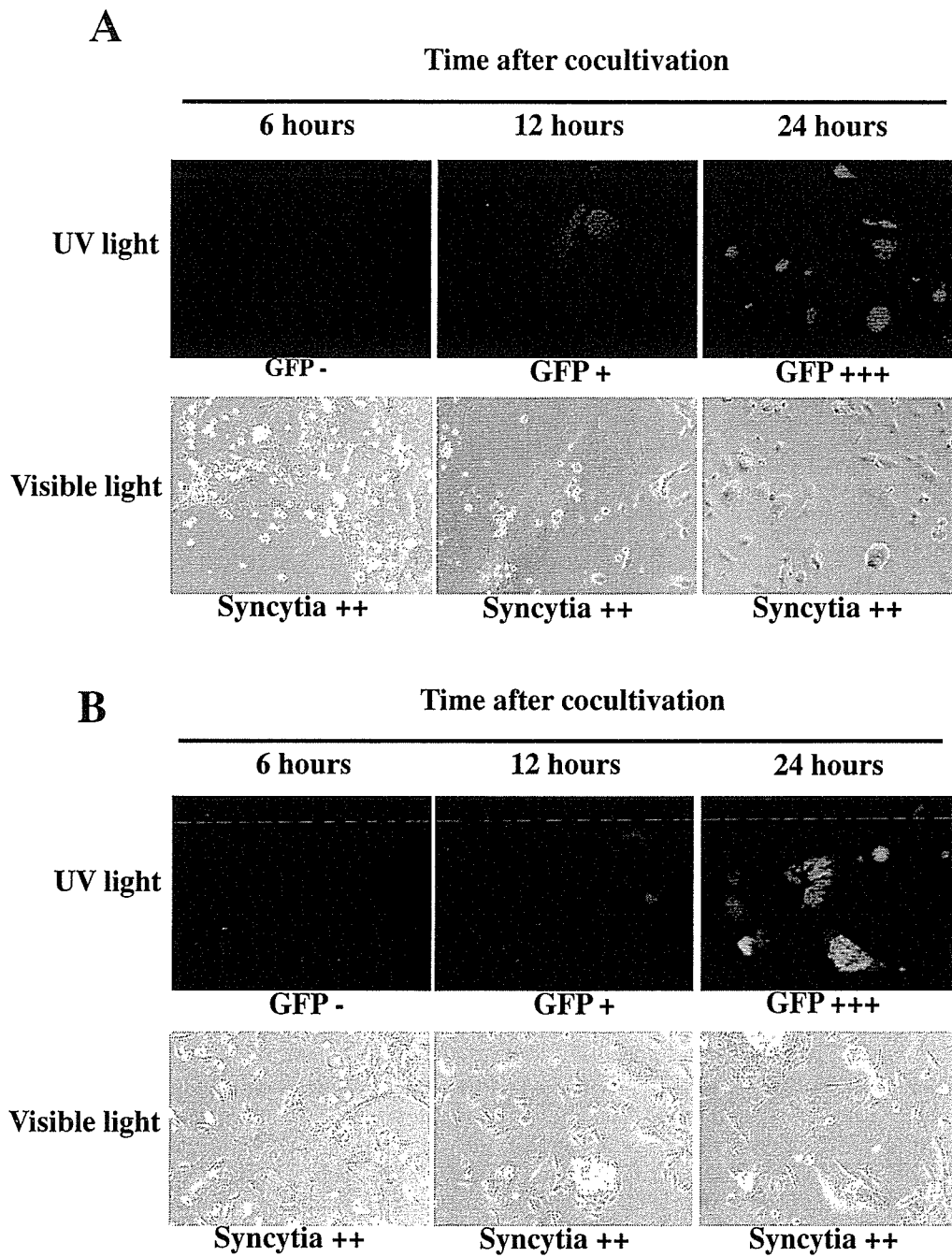


Fig. 1. Time course of syncytia formation.

(A) N4R5/GFP cells were cocultured with HeLa/M-env/Tat cells and observed using a fluorescence microscope. (B) N4X4/GFP cells were cocultured with HeLaKS386 cells and observed using a fluorescence microscope.

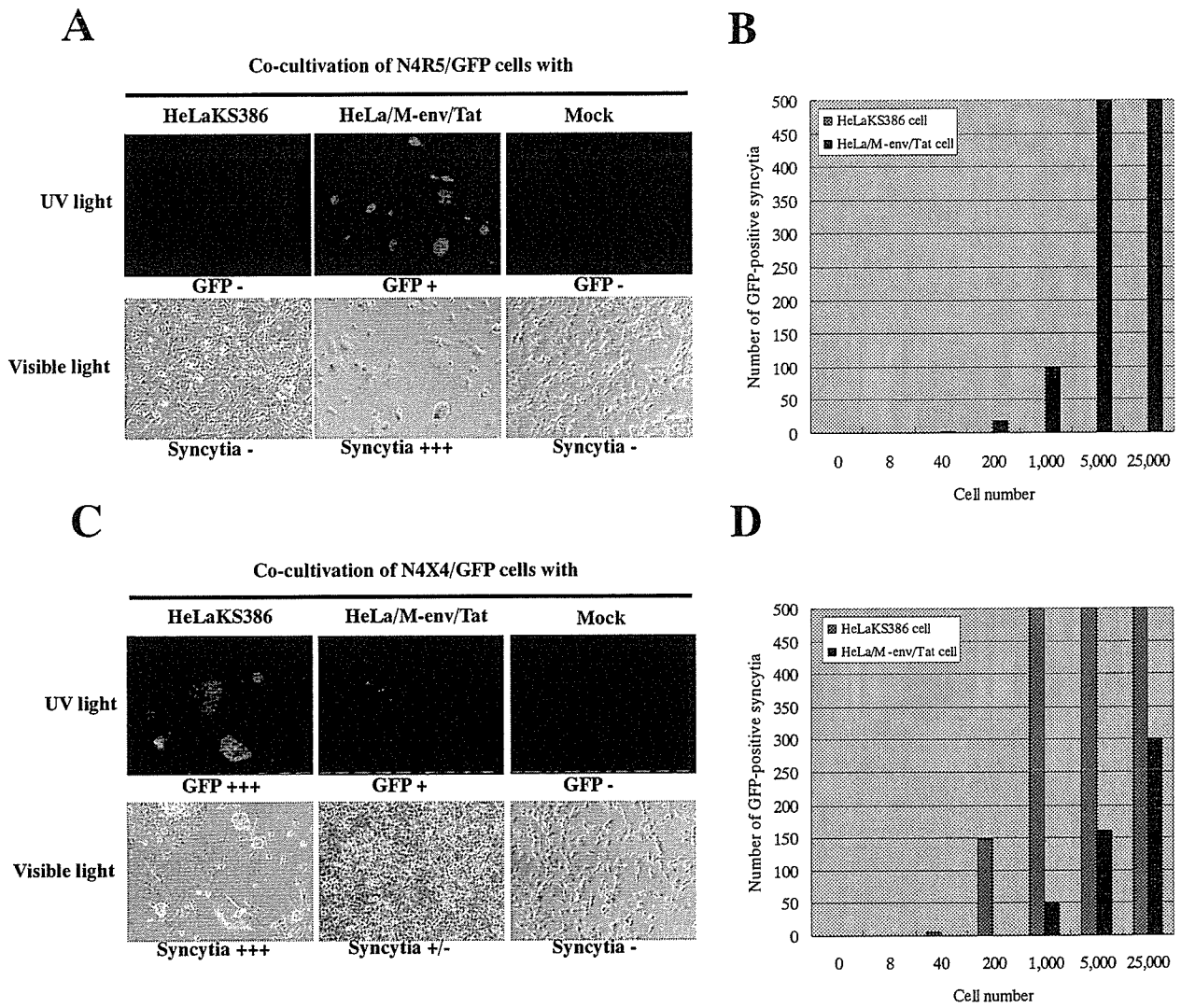


Fig. 2. Co-cultivation of NP-2 indicator cells with HeLa cells expressing HIV-1 envelope and Tat. (A) N4R5/GFP cells were cocultured with HeLaKS386 or HeLa/M-env/Tat cells and observed using a fluorescence microscope 24 hours after cocultivation. (B) Number of GFP-positive syncytia after cocultivation of N4R5/GFP cells with HeLaKS386 or HeLa/M-env/Tat cells. (C) N4X4/GFP cells were cocultured with HeLaKS386 or HeLa/M-env/Tat cells and observed using a fluorescence microscope 24 hours after cocultivation. (D) Number of GFP-positive syncytia after cocultivation of N4X4/GFP cells with HeLaKS386 or HeLa/M-env/Tat cells.

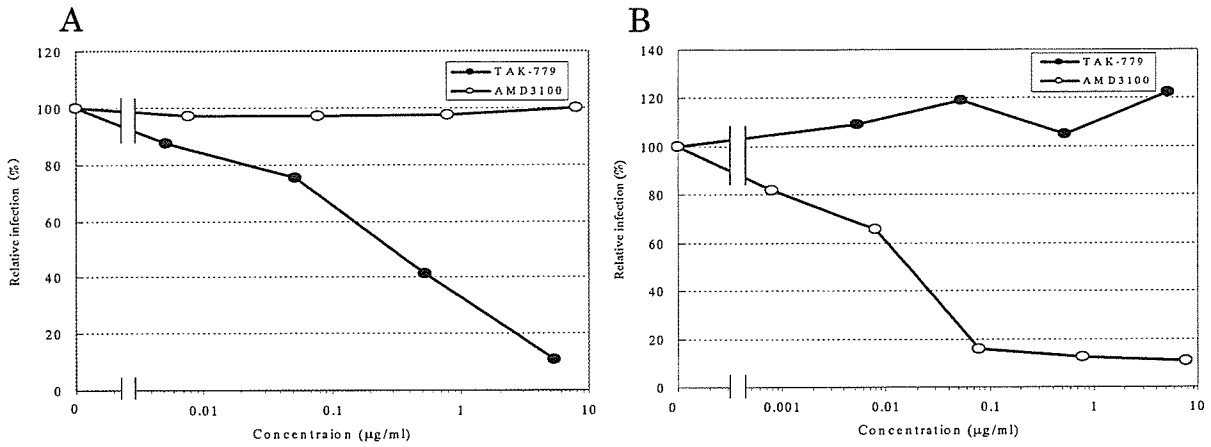


Fig. 4. Inhibitory effect of TAK-779 and AMD3100 on HIV-1 infection.

(A) N4R5/GFP cells were treated with TAK-779 or AMD3100 for 1 hour and inoculated with R5-HIV-1 BaL strain. Anti-HIV-1 activities of the drugs were determined by counting GFP-positive cells 2 days after infection. Fifty % inhibitory concentrations (IC₅₀) was 0.3µg/ml for TAK-779. (B) N4X4/GFP cells were treated with TAK-779 and AMD3100 for 1 hour, and inoculated with X4-HIV-1 IIIB strain. Anti-HIV-1 activities of the drugs were determined by counting GFP-positive cells 2 days after infection. IC₅₀ was 0.02µg/ml for AMD3100.

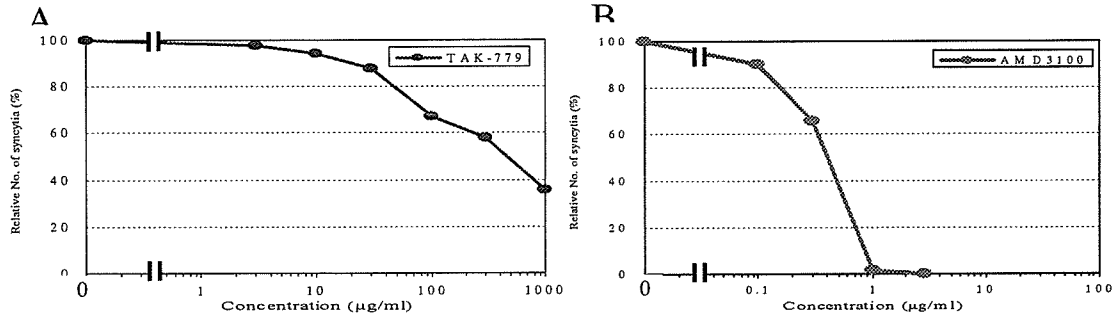


Fig. 3. Inhibitory effects of TAK-779 and AMD3100 on syncytia formation induced by HIV-1 Env.

NP-2 indicator cells treated with TAK-779 or AMD3100 were cocultured with HeLa expressing HIV-1 Env and Tat. Anti-HIV-1 activity of the drugs was determined by counting GFP-positive syncytia 1 day after cocultivation. (A) N4R5/GFP cells were treated with TAK-779 and cocultured with HeLa/M-env/Tat cells. IC₅₀ and IC₉₀ were 500 and > 1000 µg/ml for TAK-779. (B) N4X4/GFP cells were treated with AMD3100 and cocultured with HeLaK5386 cells. IC₅₀ and IC₉₀ were 0.4 and 0.9 µg/ml for AMD3100.

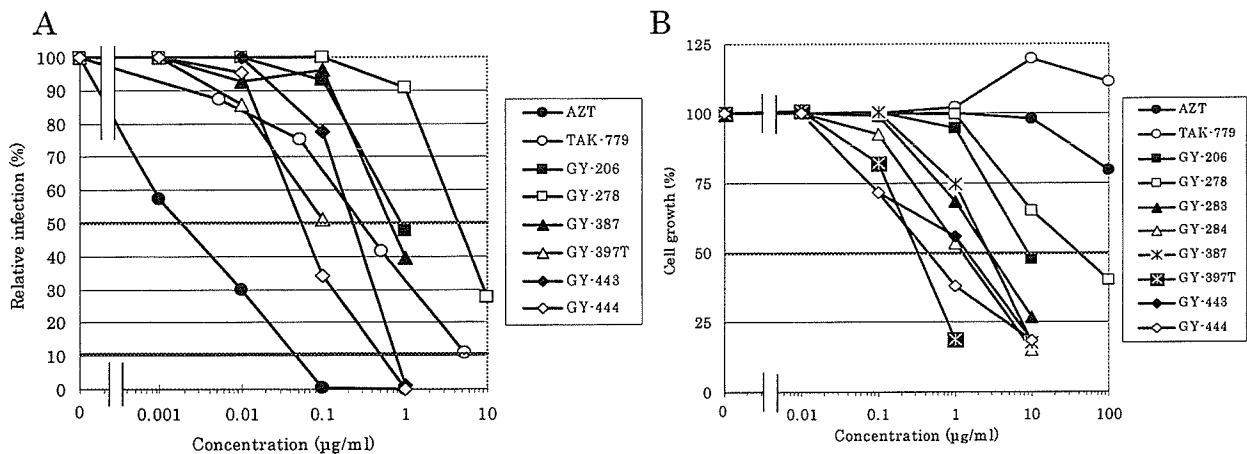


Fig. 5. Antiviral effects of drug samples.

(A) Antiviral effects of drug samples. (B) Cytotoxicity of drug samples.