

厚生労働科学研究費補助金

政策創薬総合研究事業

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

平成16～18年度 総合研究報告書

主任研究者
棚元 憲一

平成19(2007)年 4月

目 次

I. 総合研究報告

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	1
棚元 憲一	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物

厚生科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）

総合研究報告書

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

主任研究者 柵元憲一 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部部长

研究要旨：平成 16-18 年度のスクリーニング研究において、総計 1332 のサンプルについて、抗 HIV 活性スクリーニング研究を行い、マイクロプレート法では 21、また MAGIC-5 アッセイでは 83 の活性物質を見出した。新規スクリーニング法として GFP 発現を指標とする方法、及びリアルタイム PCR 法を応用した方法を開発し、特に前者に関しては実際 200 サンプル（6 陽性）の抗 HIV 活性を調べ、スクリーニングへの応用が可能であることを検証した。得られた陽性サンプルの多くは天然由来の粗抽出物であることから、今後の精製をはじめ創薬への発展が期待される。これら陽性サンプルについては、新規作用機作物質の探索を目的として、セコンドレセプターへの作用、逆転写酵素阻害活性、巨細胞形成等の作用機作等の検討を行った。耐性菌ライブラリー作成等、耐性ウイルス研究も推進した。

分担研究者

澤田 幸治	北海道立衛生研究所
石崎 徹	京都府保健環境研究所
貞升 健志	東京都健康安全研究センター
齋藤 隆行	神奈川県衛生研究所
大竹 徹	大阪府立公衆衛生研究所
小河 正雄	大分県衛生環境研究センター
野口 有三	横浜市衛生研究所
千々和勝巳	福岡県保健環境研究所
牛島 廣治	東京大学医学系研究科
星野 洪郎	群馬大学医学系研究科
山本 直彦	名古屋大学医学系研究科

問題が起こってきている。一方、米国やアフリカ等に比べ日本のエイズ患者は少ないものの、血液製剤の投与による感染や、近年では性交渉による感染の増加傾向も窺え、特に若年層における感染増加が深刻な社会問題となっている。以上のように決定的な薬剤がない現在、耐性ウイルスにも効果を示す、新しいメカニズムを有する新薬が切望されている。一方、新薬候補物質の探索のためのスクリーニングを行うには、それなりの施設、背景、合目的性が必要であることから、大企業はともかく、候補物質を多く持っている企業、大学は容易にシステムを持っていないのが現状であり、その意味で日本国内を見た場合、必ずしもエイズ医薬品候補物質探索が有効に機能しているとは思えない。このような背景を受けて本研究では、以下の 3 本柱を掲げてエイズ医薬品の探索、さらには創薬への発展を目指す。一つ目は、この研究班の基盤である、従来より行ってきた新薬候補物質探索のための

A. 研究目的

現在までに幾つかのエイズウイルスに対する医薬品が開発されてきた中で、多剤併用療法が延命効果を示し、死亡率の低下が報告されている。しかし、その効果発現には薬の継続投与が必要であり、それによる副作用、さらには耐性ウイルスの出現等の

スクリーニング研究を、より拡張した形で継承することである。戦略として、従来はHS財団経由のみで、極めて短期間のサンプル収集であったところを、より幅広いルート開発と、期間を限定せず通年でのサンプル収集およびスクリーニングの実施を行う。また、スクリーニング法も従来のMT-4細胞に対する細胞傷害性抑制試験およびMolt 4細胞を用いた巨細胞形成抑制試験に加え、マクロファージ好性MAGIC 5細胞アッセイも加えて幅広いスクリーニングを行っている。さらに遺伝子工学的技術を用いて、迅速かつ高精度で、新たな作用点を有する薬剤発見にもつながるスクリーニング法の開発を行う。2つ目は、当研究班で見いだした有力な活性物質群、さらには今後補足される医薬品候補物質の創薬に向けての基礎的な研究である。系統的な作用点の解析による作用機構の解明、in vivo 実験、さらには物質の化学修飾・部分合成等により、創薬への開発研究に繋げようと言うものである。さらに3つ目は耐性ウイルス対策として、薬剤耐性株のライブラリー、サブタイプ別の株のライブラリーを作製し、2次スクリーニングとして1次スクリーニング陽性の薬剤に対して変異株に対する有効性を確認する。以上のように、本研究は広範な未知物質の探索を行い、さらに薬剤の開発に向けた作用メカニズムや生理作用についても詳しい解析を行うことによって、総合的な新規エイズ医薬品の開発へと系統的に発展させるものである。

B. 研究方法

エイズ医薬品候補物質スクリーニング

本研究班では、以下の研究方法によりエ

イズ医薬品候補物質のスクリーニング研究を行った。

(1) ヒューマンサイエンス財団を通して企業、大学研究所に対し、エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究への募集を募る。加えて、研究班独自に開発したルートにより幅広い募集を行った。スクリーニング応募者には、応募サンプルを医薬品の特性、希望活性測定条件等を記して、原則として1件につき2サンプル国立医薬品食品衛生研究所に送付してもらう。

(2) 国立医薬品食品衛生研究所に送付された化学物質等は通し番号をうち、製品名は伏せたまま各分担研究者に送付する。

(3) まず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、エイズ医薬品候補物質の抗HIV活性のスクリーニング研究を行う。陽性対照としてはAZT(3'-azido-3'-deoxy-thymidine)やデキストラン硫酸を使用する。マイクロプレート法を終えたサンプルはさらに、愛知衛研及び大阪府公衆衛研においてMAGIC-5細胞を用いたスクリーニングを行う。ウイルス取り扱い法とスクリーニングに関する技術的な問題は班会議において検討し、技術と実験方法の統一を計っている。

以下にマイクロプレート法及びMAGIC-5アッセイ法を記す。

a) マイクロプレート法：抗HIV物質の細胞毒性と抗HIV活性を測定するプレートを用意する。両プレートとも96穴平底培養プレートを使用し、左端8穴に10%FCS加RPMI1640培地で所定の濃度に希釈した試料溶液を加える。残りの穴には培地を100 μ lずつ入れ、左端の穴から8連ピペットで2

倍あるいは5倍段階希釈を11穴(5倍希釈については8穴)まで行い、12穴目は薬剤濃度を0として細胞増殖及びHIV感染のコントロールとする。被検薬剤1種類につき細胞毒性与抗HIV活性測定プレートのそれぞれ2列を使用する。細胞毒性測定用には、対数増殖期にあるMT-4細胞を集め、その 2×10^6 個を10 mlの培地に再浮遊し、被検薬剤をすでに加えたプレートのすべての穴に100 μ lずつ加えた。一方、抗HIV測定用のプレートには遠心分離により集めた 2×10^6 のMT-4細胞に100TCID₅₀となるようにHIV (HTLV-B)のストック溶液を加え、37°C、1時間感染させた後、培地10 mlで再浮遊し抗HIV活性測定プレートのすべての穴に100 μ l加える。培養5日目に顕微鏡によりHIVによる細胞変性効果(CPE)と細胞毒性を観察する。

b) MAGIC-5 アッセイ法: ウェルあたり10,000個のMAGIC 5A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する。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)した薬剤液を加える。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る。37°CのCO₂インキュベーターで48時間培養する。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する。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

でカウントする。抗HIV活性陽性検体としてTAK-779およびAZTを用いる。

(4)これらのスクリーニングで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活性の確認を行う。また被検物質によっては、逆転写酵素活性阻害等も試験する。

以下に巨細胞形成抑制法を示す。

c) 巨細胞形成抑制法: 平底24well plateに所定の濃度に希釈した試料溶液500 μ lを加える。培地に懸濁した持続感染Molt-4/HIV細胞浮遊液 1×10^6 個/mlを250 μ l/well加え、さらに非感染Molt-4細胞浮遊液 1×10^6 個/mlを250 μ l/well加え、攪拌し、CO₂存在下、37°Cで混合培養する。混合培養後数時間で巨細胞形成は認められ、20時間後には顕著となる。検鏡により試料の巨細胞形成抑制効果を判定する。結果を定量的に求める場合は検鏡後、培養液をよく攪拌した後、少量をサンプリングし、トリパンブルー染色により生細胞数を測定し、Fusion Index(被検生細胞数/対照生細胞数)を算出する。

(5)地方衛研で得られた実験結果は、国立医薬品食品衛生研究所で集計し、活性物質、判定不能なサンプルを再検討し、班会議において最終判定を行う。試験成績は国立医薬品食品衛生研究所を経て、ヒューマンサイエンス振興財団から提出企業に報告される。

新規スクリーニング方法の開発

1) ウイルス不使用巨細胞形成抑制試験

ウイルスを用いない巨細胞形成抑制試験として、それぞれCD4(HeLa/T4)とHIVgp160遺伝子(HeLa/KS386)を組み込んだ2種類の細胞による擬似感染モデルを作成し、この

HeLa/KS386 と HeLa/T4 の巨細胞形成においてレセプターがどのように働いているか調べるために電子顕微鏡（日立（H-7100 型））で経時的に細胞融合を観察した。

2) GFP 発現を指標とした HIV 感染検出系

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、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開発した。薬剤効果は GFP 陽性合胞体数をカウントし、薬剤無添加の対照の混合培養の 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。

3) リアルタイム PCR 法を応用したスクリーニング法の開発

96 穴培養プレート中で、AZT を 10%FCS を含む RPMI-1640 培養液にて 1000 μg/ml から 0.025 μg/ml まで 12 段階の希釈を行った（各ウェル液量は 100 μL）。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 μL 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、リアルタイム PCR 機で、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。

活性物質の作用機作研究

CCR5 および CXCR4 分子への作用：スクリーニングの結果、特に強い活性を示した物質につき、CCR5 および CXCR4 分子への作用をこれらのモノクローナル抗体の結合抑

制試験により調べた。抗体としては FITC ラベルした 45531.111、2D7/CCR5、及び 12G5、44716.111 をそれぞれ用いた。2 次抗体として FITC 標識抗マウス IgG2a もしくは IgG2b 抗体を用い、フローサイトメーターで蛍光強度を測定した。

逆転写酵素阻害作用：CAVIDI 社の 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。薬剤耐性感染性クローンの作成

HXB2・RT M18V、HXB2・RT T215Y、HXB2・RT K103N 各感染性クローンは pSUM8 plasmid を用いて、それぞれ RT gene の codon 184 の ATG を GTG に、codon 215 の ACC を TAC に、codon 103 の AAA を TAC 変換し、作成した。HXB2・PR L90M、HXB2・PR M46I は同様に pSUM8 plasmid を用いて、protease gene の codon 90 の TTG を ATG に、codon 215 の ACC を TAC に、codon 46 の ATG を ATA 変換し、作成した。

C. 研究結果

エイズ医薬品候補物質スクリーニング

平成 16-18 年度のスクリーニング研究において、総計 1332 のサンプル申し込みがあった。それらについて、上記のマイクロプレート法、MAGIC-5 アッセイによる抗 HIV 活性スクリーニング結果を行った。各年度のサンプル状況、陽性サンプル数を表 1 および表 2 にまとめた。

まず、平成 16 年度においては 1 企業、4 大学及び 2 国公立研究所から寄せられた合計 505 サンプルの抗 HIV 活性スクリーニングを行い、マイクロプレート法では 11 サンプルに、またマクロファージ好性ウイルス

の増殖抑制では 27 サンプルの、延べ 38 の物質に活性が認められた。

平成 17 年度は 1 企業、7 大学及び 1 国公立研究所から寄せられた合計 505 サンプルについて抗 HIV 活性スクリーニングを行い、マイクロプレート法では 5 サンプルに、またマクロファージ好性ウイルスの増殖抑制では 27 サンプルと、延べ 32 の物質に活性が認められた。

さらに平成 18 年度は 2 企業、6 大学及び 1 国公立研究所から寄せられた合計 322 サンプルについて抗 HIV 活性スクリーニングを行い、マイクロプレート法では 5 サンプルに、またマクロファージ好性ウイルスの増殖抑制では 29 サンプルと、延べ 29 の活性物質が認められた。

3 年間として計 4 企業、17 大学及び 4 国公立研究所から寄せられた合計 1332 サンプルがスクリーニングに寄せられ、マイクロプレート法では 21 サンプルに、またマクロファージ好性ウイルスの増殖抑制では 83 サンプルと、延べ 104 の活性物質が見出されたことになる。これらの陽性サンプルの多くのは T 細胞好性ウイルス及びマクロファージ好性ウイルスの増殖を選択的に抑制した。活性強度に関しては $1\mu\text{g/ml}$ 以下でもウイルスの増殖を抑制する強い抗ウイルス効果を示したものも多く見ついている (表 2)。

抗エイズウイルス活性物質の作用機構

マクロファージ好性 HIV-1 の増殖を抑制した平成 16 年度の陽性サンプル 3 種の薬剤につき 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が抑制効果は見られず、薬剤の作用点を特定することができなかったが、T 細

胞好性 HIV-1 の増殖を抑制した 2 種の薬剤は MOLT-4 細胞を標的にした抗 CXCR4 モノクローナル抗体の結合を抑制したことから、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 (表 3)。

また平成 17 年度のスクリーニング試験において強い抗 HIV 活性を示した検体についてその抗 HIV 作用メカニズムを検討した (表 4)。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。またこれらの薬剤の感染後期 (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。さらに逆転写酵素阻害活性を検討したところ、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、その IC_{50} 値 (50%阻害濃度) はそれぞれ、 $513.5\mu\text{g/ml}$ 、 $16.9\mu\text{g/ml}$ 、 $8.5\mu\text{g/ml}$ であった (表 4)。

新規スクリーニング方法の開発

GFP 発現を指標とした HIV 感染検出系の開発 : HIV-1 感染 2~3 日後に合胞体を形成すると共に GFP の蛍光が有意に増大する 3 つのクローンが得られた。これらの細胞は、HIV-1 が感染した時にのみ、GFP の蛍光が検出された。Indicator cell における CD4、CCR5、CXCR4 の発現は、CD4 (10%)、CCR5 (23.1%)、CXCR4 (0%) であった。GFP 発現誘導はウイルス濃度に比例し、感染後の日数が進むにつれてその率が増加した。GFP 発現細胞率と Immunofluorescent assay

(IFA)による HIV 抗原陽性細胞率と関連した。また、細胞指向性の異なる HIV-1 感染では、それぞれのウイルスのコレセプター利用能と特異的な GFP の発現がみられた。AZT、dextran sulfate を用いて抗ウイルス剤の感染阻害効果の定量を試みたところ、共に薬剤濃度依存的に GFP 発現を抑制した。AZT の IC_{50} は 2ng/ml、 IC_{90} は 27ng/ml であった。Dextran sulfate の IC_{50} は 0.6 μ g/ml、 IC_{90} は 3.8 μ g /ml であった。

この方法を用いて新規の核酸関連化合物 50 種類、デアザフラビン類および類縁化合物 142 種類について、抗 HIV-1 活性および細胞毒性を検討した。この結果、デアザフラビン類および類縁化合物 142 種類(のうち 6 種類の薬剤で抗 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 4 サンプルが選択性指数 5 以上を示した。

リアルタイム PCR 法を応用したスクリーニング法の開発：標準ウイルスの HIV (HTLV III 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。

耐性ウイルスに対する研究

プロテアーゼ阻害剤耐性臨床分離株で解析した耐性関連変異のデータをもとに、感染性クローンを使用し、M18V、T215Y、K103N、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。作成した感染性クローンはそれぞれ Saquinavir、Indinavir に耐性を示し、さらに野生株と同

等の複製能をもっており、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。

D. 考察

本エイズスクリーニング研究班ではサンプル収集に関しては、従来は HS 財団の募集による収集のみであったが、数年前より研究班でも独自に全国規模での試料提供可能な施設のリスト作りを行い、積極的な資料収集を行ってきた。その結果、この 3 年間は毎年 5 百を超える多くのサンプル供与を受けることが出来た。またこれまでの極めて短期間でのサンプル収集ではなく募集期間を長くしたこと、さらに各班員を通して通年でのサンプル収集とスクリーニング試験の実施を行う体制を整えたことにより、従来よりもはるかに広範で合理的なスクリーニング研究体制が構築できたものと思われる。さらにこの方法により、本研究班員とサンプル提供者との間に個人的な繋がりが出来、ある意味では共同研究的な要素が芽生え、活性を持つ薬剤が見出された場合はその物質に焦点を絞って精製を進めることや、由来となった天然物の他の部位や近縁種得から得られたサンプルについての提供を依頼すること等により、系統的に研究を進めることが可能となった。単なるランダムなサンプル収集ではあり得なかった有望なサンプルの開発に繋がる方法である。

この 3 年間 2 企業、6 大学及び 1 国公立研究所から寄せられた合計 1332 サンプルについて抗 HIV 活性スクリーニングを行った結果、マイクロプレート法では 21 サンプ

ルに、またマクロファージ好性ウイルスの増殖抑制においても同じく 83 サンプルに活性が見られた。それらの中で、両方に対して活性を示したサンプルは少なく、どちらかの系に特異的に作用を示すものが多かった。陽性サンプルの中には 1 μ g/ml 以下という強い抗ウイルス効果を示したものも多く見出されている。実際の応用を考えたとき、サンプルの毒性が問題となるため選択性が重要であるが、多くの有効物質が選択性 10 以上を示し、中には約 100 を超えるものもあった。得られた陽性サンプルについて興味深いことは T 細胞好性ウイルスの T 細胞 (MT-4 細胞) における抗ウイルス試験では活性を示さないが、マクロファージ好性ウイルスのみの増殖を選択的に抑制する性質をもつ化合物が多く見つかったことである。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。一方、表 2 にも示したように、今回テストした物質の多くは天然由来物質であり、しかも一部を除いてはほとんどが単に抽出しただけのもので、まったく未精製のものであることを考えれば、今後精製を進めることにより、非常に活性の強い抗エイズ物質、さらにはもっと毒性の低い物質が得られることが大いに期待される。

本研究班では 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、平成 18 年度は

そのスクリーニング法を用いて約 200 サンプルのスクリーニングを行った。検討結果から、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。

現在、耐性株の問題、多剤併用療法の観点からも、新しい作用点を持つ化合物が求められている。我々の研究班での未知物質の探索は、その意味でも新規作用機作を有する化合物を見いだすことが期待されるものである。実際昨年度の陽性サンプルの中には、セコンドレセプターに作用する可能性のあることから新規性を期待させる化合物も見いだされている。今年度の研究において捕まった多くの陽性化合物についても、今後さらに詳細な作用機作を解明すると共に、化学的な検討を加えることにより、創薬への発展が大いに期待される。

本研究は、特許などの関係で詳細な研究を公表することは、参加企業側の要請とヒューマンサイエンス振興財団との話し合いにより差し控えることとなっている。従って、本研究成果の発表についても、抗 HIV 活性陽性物質の化学名等の情報提供には制限があり、不本意ながらきわめて限定された結論しか紹介できない。本研究班の本来の研究は行政ニーズから発生したこともあり、スクリーニングに限られてきた。しかし研究班の質的変換を行ったことで、今回のように有望な物質が得られた場合は、サンプル提供者との協議のもと、詳細な作用メカニズムの検討、臨床分離株への応用等の研究を発展させることが可能となる。実際、陽性サンプル提供者の中には本研究班

との共同研究を望む研究者も増えつつあり、その意味でこの研究班が機能的に動き出したという実感と共に、創薬への研究推進が大いに期待される。

E. 結 論

平成 16-18 年度のスクリーニング研究において、総計 1332 のサンプルについて、マイクロプレート法、MAGIC-5 アッセイによる抗 HIV 活性スクリーニングを行い、マイクロプレート法では 21、また MAGIC-5 アッセイでは 83 の活性物質を得た。活性自体も強いものが多く含まれていることや、多くは天然由来の粗抽出物であること、さらに新規作用機作をうかがわせる化合物も得られたことから、創薬への発展が大いに期待される。また、本研究班で開発した新規スクリーニング法を検証し、ファーストスクリーニングとして大量のサンプル処理に適していることを確認した。また得られた陽性サンプルの作用機作の検討、及び耐性ウイルス研究を推進した。

F. 研究発表

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. 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.
3. 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)
4. 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
5. Huy TT, Ushijima H, Sata T, Abe K. Genomic characterization of HBV genotype F in Bolivia: genotype F subgenotypes correlate with geographic distribution and T(1858) variant. *Arch Virol.* 2006 Mar;151(3):589-97.
6. Yagyu F, Okitsu S, Tanamoto K, Ushijima H. Determination of HIV-1 subtypes (A-D, F, G, CRF01_AE) by PCR in the transmembrane region (gp41) with novel primers. *J Med Virol.* 2005 May;76(1):16-23.
7. 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
(印刷中)
9. 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
 10. 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)
 11. 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.*
 12. 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.
 13. 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.
 14. Yagyu F, et al. Determination of HIV-1 subtypes (A, B, C, D, G, CRF01_AE) by PCR in the transmembrane region (gp41) with novel primers. *J Med Virol* In press
 15. Ushijima H and Eshita Y. Foreward: Molecular epidemiology of viral infection in Asia. *Pediatr Int* 46(2):202-206, 2004
 16. Sakamoto T, et al. Establishment of an HIV cell-cell fusion assay by using two genetically modified HeLa cell lines and receptor gene. *J Virol Methods* 114:159-166, 2004
 17. Urata H, Kumashiro T, Kawahata T, Otake T, Akagi M, Anti-HIV-1 activity and mode of action of mirror image oligodeoxynucleotide analogue of zintevir, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313, 55-61, 2004
 18. 森 治代、小島洋子、川畑拓也、大竹 徹、巽 正志、コレセプター阻害剤を用いた R5/X4 ウイルス測定法、*MINOPHAGEN MEDICAL REVIEW* vol.49, 81-82, 2004
 19. Dan Turner, Bluma Brenner, Daniela Moisi, Mervi Detorio, Raymond Cesaire, Takashi Kurimura, Haruyo Mori, Max Essex, Shlomo Maayan and Mark A. Wainberg, Nucleotide and Amino Acid Polymorphisms at Drug Resistance Sites in Non-B-Subtype Variants of Human Immunodeficiency Virus Type 1, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 2993-2998, 2004
 20. 大竹 徹、ウイルスの高圧不活化と血液製剤への利用、*FFI ジャーナル*、

- 210(1)、44-48、2005
20. Shimizu A, Shimizu N, Tanaka A, Jinno-Oue A, Roy BB, Shinagawa M, Ishikawa O, and Hoshino H. Human T-cell leukaemia virus type I is highly sensitive to UV-C light. *J. Gen. Virol.* 2004. 85:2397-406.
- 学会発表
1. 第7回アジア・太平洋地域エイズ国際会議 2005年 Molecular Epidemiology of HIV-1 among children in Vietnam and developing subtype CRF01_AE specific primers for PCR. Yagy F, Trinh DQ, Nguyen AT, Okitsu S, Hoang TK, Tanamoto K, Ushijima H
 2. 第53回 日本ウイルス学会 2005年 「ベトナムにおける HIV 感染妊婦から生まれた児の HBV・HCV の検出」 F. Yagy, Q.D. Trinh, T.A. Nguyen, S. Okitus, H. Ushijima
 3. 第19回 日本エイズ学会 2005年 「ベトナムにおける HIV 母子感染の分子疫学」 F. Yagy, Q.D. Trinh, H. Ushijima
 4. 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
 5. 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
 6. 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
 7. 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
 8. 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・太平洋地域エイズ国際会議、神戸、2005
 9. 森 治代、小島洋子、川畑拓也、大竹 徹、Influence of V108I mutation in a treatment-naïve 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
 10. “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)
 11. 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)
 12. 「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月ー

- 2005)
13. 清水宣明、大上厚志、田中淳、大槻貴博、武部豊、草川茂、森隆久、山口華代、中谷陽子、星野洪郎. アミノ末端領域にチロシンを持つ様々な GPCR の HIV/SIV コレセプター活性の解析. 第 19 回日本エイズ学会学術集会 (熊本) 2005 年 12 月 1-3 日
 14. 清水宣明、大上厚志、田中淳、大槻貴博、和田成一、森隆久、山口華代、星野洪郎. HIV-1 感染感受性に及ぼす重粒子線の効果の解析. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2005 年 11 月 20-22 日
 15. 田中淳、清水宣明、大上厚志、品川雅彦、星野洪郎 ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型(HTLV-I)感染を促進する細胞膜蛋白について 第 53 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2005 年 11 月 21-22 日
 16. 清水宣明、大上厚志、田中淳、大槻貴博、和田成一、森隆久、山口華代、星野洪郎. HIV-1 感染感受性に及ぼす重粒子線の効果の解析. 21st Century COE program. The 2nd International Symposium on Biological Research using Accelerator Technology (前橋) 2005 年 11 月 10-11 日
 17. 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 19 回日本エイズ学会学術集会 (熊本), 2005 年 12 月 1-3 日
 18. Oue A, Shimizu N, Tanaka A, Ohtsuki T, Shinagawa M, Mori T, Nakamura T, Yamaguchi K, Nakatani Y, Saha NM, Hoque ASK, Shimizu A, Ishikawa O, Wada S, Funayama T, Kobayashi Y, Hoshino N. Effect of heavy-ion irradiation on the expression of cellular and viral genes involved in the replication of human retroviruses. The second international symposium on biomedical research using accelerator technology (Maebashi, Japan November 10-11, 2005)
 19. 大竹 徹、川畑拓也、森 治代、小島洋子、早川 潔、凍結昇圧法によるヒト免疫不全ウイルスの不活化、第 14 回抗ウイルス化学療法研究会、名古屋、2004
 20. 森 治代、小島洋子、川畑拓也、大竹 徹、未治療 HIV-1 感染者に検出された V108I 変異の NVP 耐性獲得に対する影響、第 18 回日本エイズ学会、静岡、2004
 21. Dhole TN, N.Yamamoto. Presence of Primary mutations Associated with Protease inhibitor Resistance in Antiviral-naïve HIV-1 infected patient in India 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, February 2005. Boston
 22. Dhole TN, N.Yamamoto A T69N and K74I mutation in HIV- 1 clade C viruses exposed to Protease inhibitors confers cross resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, February 2005. Boston
 23. 山本直彦、森下高行、佐藤克彦、森治代、川畑拓也、大竹徹、伊部史朗、金田次弘 『Non-subtype B 型 HIV にみられる薬剤耐性関連遺伝子に関する研究』(日本ウイルス学会、2004 年、横浜)
 24. 山本直彦、森下高行、佐藤克彦、伊部史朗、金田次弘『ケニアにおける未治療 HIV 感染者の薬剤耐性遺伝子とサブタイプの

- 流行状況について』 日本エイズ学会、
2004年、静岡)
25. Shimizu N, Tanaka A, Oue A, Takebe Y, and Hoshino H. G protein-coupled receptors, CCR9B, D6, FML1, and XCR1, have capacity to mediate the CD4-dependent infection of HIV-1, HIV-2, and SIV as coreceptors. XV International AIDS Conference, Bangkok, 11-16 July, 2004
 26. Jinno-Oue A, Shimizu N, Soda Y, Tanaka A, Ohtsuki T, Kurosaki D, and Hoshino H. Inhibition of HIV-1 infection by the synthetic ppeptide derived from the NH2-terminal extracellular region of an orphan G protein-coupled receptor, GPR1. XV International AIDS Conference, Bangkok, 11-16 July, 2004
 27. 大上厚志、清水宣明、田中 淳、星野洪郎. ヒト脳微小血管由来周皮細胞に指向性の HIV-1 変異株の利用する coreceptor, GPR1 のアミノ末端側合成ペプチドによる多様な HIV-1 株の感染抑制; 第 8 回日本神経ウイルス研究会 (札幌). 2004 年 6 月 11-12 日
 28. 田中 淳、清水宣明、品川雅彦、大上厚志、星野洪郎. ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-I) 感染を促進する細胞膜蛋白について; 第 8 回日本神経ウイルス研究会 (札幌). 2004 年 6 月 11-12 日
 29. 清水宣明、田中 淳、園田美奈、大上厚志、武部 豊、草川 茂、星野洪郎. ケモカイン・レセプター-D6, 及びフォルミルペプチド・レセプター-FML1 の HIV-1 コレセプター活性の解析; 第 52 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜). 2004 年 11 月 21-23 日
 30. 田中 淳、清水宣明、大上厚志、品川雅彦、星野洪郎. ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-I) 感染を促進する細胞膜蛋白について; 第 52 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜). 2004 年 11 月 21-23 日
 31. 田村一志、大上厚志、清水宣明、加藤宣之、星野洪郎. Native form の HCV をもつ VSV pseudotype virus の作製、およびその感染性についての検討; 第 52 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜). 2004 年 11 月 21-23 日
 32. 清水宣明、田中 淳、園田美奈、大上厚志、星野洪郎. HIV-1 との相互作用に関与する GPR1 の N 末端側細胞外領域のアミノ酸配列の解析; 第 18 回日本エイズ学会学術集会 (静岡). 2004 年 12 月 9-11 日
 33. 大槻貴博、清水宣明、大上厚志、巽 正志、星野洪郎. GPR1 をコレセプターとして使用する HIV-1 株の感染を検出する細胞株の作製; 第 18 回日本エイズ学会学術集会 (静岡). 2004 年 12 月 9-11 日
 34. 大上厚志、清水宣明、田中 淳、大槻貴博、星野洪郎. HIV-1 変異株の利用する coreceptor, GPR1, のアミノ末端側合成ペプチドによる多様な HIV-1 株の感染抑制; 第 18 回日本エイズ学会学術集会 (静岡). 2004 年 12 月 9-11 日
 35. 藤 秀義、田中真理、宮内浩典、松田善衛、星野忠次、有吉紅也、星野洪郎、佐藤裕徳、横幕能行. HIV-1env クローニングライブラリー作成の試みーHIV-1env の迅速なクローニング、発現および組み換えウイルス作成システムの構築ー; 第 18 回日本エイズ学会学術集会 (静岡). 2004 年 12 月 9-11 日

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

[発明の名称] 抗ウイルス剤
出願日 平成18年2月7日 出願番号
特願 2006-030248

[発明者] 棚元憲一（国立医薬品食品衛生
研究所）牛島廣治（東京大学大学院）

吉田尚之（チッソ石油化学株式会
社）石田和史（チッソ石油化学株式会社）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1. 3年間のスクリーニング結果

年度（平成）	申請企業・ 大学	検体数	陽性検体数	
			MT-4	MGIC-5
16	7	505	11	27
17	9	505	5	27
18	9	322(+200)	5	29
計	19	1332(+200)	21	83

表2. 平成16-18年度スクリーニング研究で見いだされた抗HIV活性物質

通し No.	由来	MT-4		MAGIC5	
		最小有効濃度	最小毒性濃度	IC50	細胞毒性
04056	植物	2	7.8	0.26mg	
04067	植物抽出物	-	31.3	3.5	
04092		-	125	30.2	
04158		-	62.5	1.9	
04169		-	250	26.0	
04173		-	62.5	21.5	
04175		-	31.2	8.4	
04204		-	3.91	2.6	
04226		伝統薬物抽出物	-	125	16.2
04315	-		2.0	2.9	
04351	-		62.5	11.6	
04353	-		>100	19.5	
04377	0.03		>100	-	
04380	-		25	10.5	
04391	0.8		>100	-	
04394	-		>100	15.0	
04397	0.16		>100	-	
04406	-		>100	25.0	
04412	植物抽出物	-	250	30.5	
04415		125	500	30.0	
04431		-	500	35.0	
04432		-	500	21.0	
04445		-	500	44.0	
04453	植物由来化合物	12.5	50	-	
04455		6.25	50	-	
04457		6.25	50	-	
04461	動物由来多糖	12	289	10.0	
04462	合成品	9	>1100	8.8	
04464	動物由来多糖	8	1000	7.2	
04494	植物抽出物	-	>100	84.0	
04495		-	100	39.0	
04497		-	>100	56.0	

04503		-	>100	67.0	
05001	合成品	-	62.5	0.0065	
05002		-	62.5	0.042	
05003		-	15.6	0.2	
05004		-	125	0.00046	
05023	植物	-	62.5	5.5	
05038	藍藻	3.9	250	2.2	
05045	植物	-	500	35.0	
05049		-	500	73.0	
05073	キノコ	-	500	53.0	
05088	植物	-	125	3.9	
05090		-	250	9.8	
05091		-	125	17.0	
05092		-	500	17.5	
05093		-	500	48.0	
05094		-	62.5	6.3	
05095		-	62.5	4.4	
05100		-	500	52.0	
05103		-	125	7.9	
05104		10	630	14.5	
05105		10	630	14.5	
05109		-	125	1.7	
05110		-	125	1.9	
05186		植物	-	125	20.5
05193	-		62.5	13.5	
05204	62.5		250	NE	
05207	-		31.3	5.0	
05221	-		2	0.47	
05229	-		31.3	8.0	
05239	-		125	22.1	125
05368	-		500	59.7	500
05371	-		250	61.4	500
05505	合成品		0.8***	100	15.5
06003	合成品	1	4	-	5
06007	植物抽出物	-	31.3	19.5	100
06008		-	62.5	10.0	200-100

06010		-	0.5	1.0	20-10
06014		-	15.7	4.8	100-50
06016		-	7.9	4.4	>10.0
06019		-	4	4.5	50
06072		-	7.8	0.9	16
06148		-	0.039	0.001	0.032
06156		-	0.156	0.05	0.8
06157		-	0.156	0.08	0.8
06158		-	0.156	0.03	0.8
06159		-	0.313	0.07	0.8
06166		-	1.25	0.1	4
06175	植物	-	500	36.0	250
06181		-	250	12.5	250
06188		-	125	12.5	250-125
06227	伝統薬物抽出物	-	125	13.8	160
06247		-	1000	73.1	800
06250		500	2000		
06253		-	1000	53.7	2000
06255		-	500	53.8	800
06259		-	1000	57.5	2000
06262		500	1000	47.8	2000
06263		-	500	51.1	800
06265		-	125	5.8	400
06267		-	250	24.7	400
06268		500	1000	58.8	1000
06298	未公開	31.3	500	12.8	500-250
06299		15.6	500	13.5	500-250
06300		-	>50	1.6	50-25
06305		0.78	12.5 μ l/ml	-	2

***IC50

単位： μ g/ml

表 3. 平成 16 年度陽性サンプルの抗 HIV 作用機作

検体番号	CXCR4 への作用 (mAb)	
	12G5	44716.111
4377	-4.2	45.7
4397	22.7	20.6
Bicyclam (JM3100)	100	100