

論文要旨

Colorimetric lactate dehydrogenase (LDH) assay for evaluation of antiviral activity against bovine viral diarrhoea virus (BVDV) *in vitro*

〔 ウシ下痢症ウイルスに対する抗ウイルス活性評価
のための乳酸脱水素酵素発色定量法 〕

馬場 千晶

【序論および目的】

C型肝炎ウイルス (HCV) に対する抗ウイルス薬のスクリーニング方法として、HCV は培養細胞で複製系が確立されていないため、HCV レプリコンや、HCV と同じフラビウイルス科に属し、遺伝子構成や複製様式が類似しながらも培養系で増殖可能な、ウシ下痢症ウイルス (BVDV) が用いられている。現在、BVDV を用いて薬剤の活性を調べる方法としては、プラーク減少法や MTT を用いた細胞死抑制試験が一般的である。しかし、プラーク減少法は操作が煩雑であり、判定も主観的であるという欠点がある。MTT 法は操作が簡便で、結果は吸光度測定により客観的に判定できるが、BVDV のような比較的細胞障害性の弱いウイルスでは、感染細胞における吸光度が高く (ダイナミックレンジが低い)、再現性のある結果を得にくい。そこで本研究においては、乳酸脱水素酵素 (LDH) 法を用いた薬剤の抗 BVDV アッセイ法について検討した。

【材料および方法】

宿主細胞は Madin-Darby bovine kidney (MDBK) 細胞、ウイルスは Nose 株を使用した。培養液はペニシリン/ストレプトマイシン混合溶液及び、ウシもしくはウマ血清を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, high glucose) を用いた。テスト薬剤として ribavirin, cyclosporin A, および human interferon (IFN) $\alpha 2b$ を用いた。薬剤の抗 BVDV 活性は、マイクロプレートに種々の濃度の薬剤を希釈した後、MDBK 細胞浮遊液と BVDV を添加した。BVDV の増殖は、ウイルスによる細胞死によって上清中に放出される LDH の量を、市販の発色キットを用いることにより測定した。薬剤が非感染宿主細胞の増殖を抑制しない濃度において、感染細胞から放出される上清中の LDH 量を減少させた場合、薬剤がウイルスによる細胞死を抑制していると考え、抗ウイルス効果を持つ薬剤であるとした。50% 有効濃度 (EC₅₀) は、薬剤を添加することにより、薬剤を添加しない感染細胞上清中の LDH 量と比較して、LDH 量が 50% まで減少した時の薬剤の濃度として定義した。

【結 果】

培養液の血清の種類と濃度，細胞の濃度，感染させるウイルスの量，培養日数について検討した結果，培養液の血清は3%ウマ血清，細胞濃度は 2×10^4 cells/well，multiplicity of infection は0.01，培養日数は3日が最適であった。LDH法およびMTT法での薬剤のEC₅₀値はそれぞれ，ribavirinが3.9および1.9 μM，cyclosporin Aが2.8および1.3 μM，IFNが5.5および2.7 units/mlであった。LDH法で求めたEC₅₀値は，MTT法よりも2倍高かったが，両者は非常に良い相関を示した ($r=0.999$)。ダイナミックレンジは，LDH法で5.3，MTT法で1.6であった。

【結論及び考察】

以上の結果から，LDH法を用いた抗BVDVアッセイは，従来法とほぼ同等の感度を有し，かつ高いダイナミックレンジが得られ，また再現性も高いことから，BVDVに対する優れたアッセイ法であると考えられた。本アッセイ法によりBVDVに有効な薬剤を同定することにより，新しい抗HCV薬の発見にも役立つと思われた。

(Antiviral Chemistry and Chemotherapy 2005;16(1):33-9 掲載)

論 文 審 査 の 要 旨

| | | | |
|---------|---------------|---------|---------|
| 報 告 番 号 | 医 研 第 6 1 4 号 | 氏 名 | 馬 場 千 晶 |
| 審 査 委 員 | 主 査 | 榮 鶴 義 人 | |
| | 副 査 | 山 田 勝 士 | 坪 内 博 仁 |

Colorimetric lactate dehydrogenase (LDH) assay for evaluation of antiviral activity against bovine viral diarrhoea virus (BVDV) *in vitro*

(ウシ下痢症ウイルスに対する抗ウイルス活性評価のための乳酸脱水素酵素発色定量法)

C型肝炎ウイルス(HCV)の抗ウイルス剤のスクリーニングは、HCV の培養細胞での複製系がない為、HCV レプリコンや、同じフラビウイルス科に属し、遺伝子構成や複製様式が類似し培養系で増殖可能なウシ下痢症ウイルス(BVDV)が用いられている。BVDV を用いた抗ウイルス剤のスクリーニング法は、プラーク減少法や MTT を用いた細胞死抑制試験 (MTT 法) が一般的である。しかし、プラーク法は操作が煩雑で判定が主観的であるという欠点がある。また、MTT 法は操作が簡便で吸光度測定で客観的判定ができるが、BVDV のような比較的細胞障害性の弱いウイルスでは、感染細胞でも吸光度が高く、再現性のある結果を得にくい。そこで申請者は、感染細胞から培養上清に放出される乳酸脱水素酵素 (LDH) を指標とした抗 BVDV 活性評価方法の確立を試みた。

細胞は Madin-Darby bovine kidney (MDBK)細胞を、ウイルスは Nose 株を用いた。培養液は非働化したウシもしくはウマ血清を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)を用い、テスト薬剤としては ribavirin、cyclosporin A、human interferon (IFN) α 2b を用いた。BVDV 感染細胞から細胞上清に放出される LDH の量は、市販の発色キットで発色させ 490nm における吸光度を測定した。

本研究でえられた新知見は次の3点である。

1. 血清の種類と濃度、細胞濃度、接種ウイルス量、培養日数について検討した結果、血清は3%ウマ血清、細胞濃度は 2×10^4 cells/well、接種ウイルス量は multiplicity of infection(MOI)=0.01、培養日数は3日間が最適であった。
2. LDH 法および MTT 法で測定した EC₅₀ 値は、ribavirin は 3.9 μ M および 1.9 μ M、cyclosporin A は 2.8 μ M および 1.3 μ M、IFN α 2b は 5.5 units/ml および 2.7 units/ml であり、LDH 法では MTT 法より約2倍高い値であったが、両者の結果は非常に良い相関を示した (r=0.999)。
3. signal/noise ratio (SNR)は、LDH 法で 5.3、MTT 法で 1.6 であり、LDH 法で高いダイナミックレンジが得られた。

以上の結果より、LDH を指標とした新しい抗 BVDV 剤スクリーニング法を確立した。

本研究は、これまで抗 BVDV 剤スクリーニングに用いられてきたプラーク減少法および MTT 法の持つ欠点を克服し、簡便で再現性の高いアッセイ方法 (LDH 法) を確立しており、安定した抗 BVDV 物質のハイスループット・スクリーニングが可能になったことを示している。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

| | | | |
|--|---------|-------|-------|
| 報告番号 | 医研第614号 | 氏名 | 馬場 千晶 |
| 審査委員 | 主査 | 榮鶴 義人 | |
| | 副査 | 山田 勝士 | 坪内 博仁 |
| <p>主査および副査の3名は、平成18年2月13日、学位請求者 馬場千晶 君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1：MOIとは？ 回答：MOIとは multiplicity of infection の略で、1個の細胞に感染させるウイルス量のことであり、感染性ウイルス数/細胞濃度で求められる。MOIが高いほど、1個の細胞に感染させるウイルス量が多いということである。</p> <p>質問2：実験にウマ血清を用いているが、ウシ血清に抗BVDV抗体が入っている可能性があるのか？ 回答：抗BVDV抗体チェック済みの血清もあるが、コストが高くなる。ウマ血清でも支障なく測定に用いることができたので、抗体検査の確認の必要性のないウマ血清を用いた。</p> <p>質問3：Figure 1の実験の細胞濃度は？ 回答：2×10^4 cells/well で実験した。</p> <p>質問4：Figure 1の3% horse serumでのCell + Triton X-100の吸光度が3.0だったのに対して、Figure 2の2×10^4 cells/wellのCell + Triton X-100の吸光度が1.0と低いのはなぜか？ 回答：ご指摘の通り、再現性に若干の問題がある点是否めないが、異なる日に異なるロットの細胞を用いて行ったために生じたバラツキだと思われる。</p> <p>質問5：薬剤のLDH活性の測定データは、実際どのようなグラフになるか？ 回答：薬剤0 μMの時はLDH活性が高く、薬剤濃度が高くなるにつれLDH活性は低くなっていくので、シグモイドカーブを描くようなグラフになる。</p> <p>質問6：薬剤の併用でのデータは調べなかったのか？ 回答：今回は施行していない。</p> <p>質問7：なぜ皮膚科医がC型肝炎の研究をしたのか？ 回答：皮膚疾患においてもC型肝炎ウイルス感染が関与している疾患があるので研究のテーマにした。また、種々のウイルス感染による皮膚疾患も多いので、ウイルスの感染実験を行うことは皮膚科臨床にも役立つと考えた。</p> <p>質問8：ウシ下痢症ウイルスとC型肝炎ウイルスとの類似点、相違点とは？ 回答：両者はフラビウイルス科に属するが、前者はペスチウイルス属、後者はヘパチウイルス属である。両者はウイルス蛋白の構成が類似しており、またインターナルリボゾームエントリーサイトという領域からウイルスの複製が開始されるという複製様式も同じである。相違点としては前者が培養細胞系でよく増殖するのに対し、後者ではあまり増殖しない。</p> | | | |

質問 9 : ウシ下痢症ウイルスは、ウシにおいて慢性感染を起こすのか？またその症状は？

回 答 : ウシ下痢症ウイルスに感染する時期や個体の免疫状態により異なるが、ワクチンを接種されていないウシでは、急性に発症し、血性下痢、高熱、口腔内潰瘍を引き起こす。妊娠したウシに感染すると、ウイルスは胎牛に移行し、慢性的な持続感染を起こす。

質問 10 : C 型肝炎ではウイルスの細胞への傷害ではなく肝臓での免疫系の反応を介して肝臓での炎症が起こっていると考えられるが、ウシ下痢症ウイルスは細胞に感染し細胞傷害性に作用するということは、C 型肝炎に対する薬剤のスクリーニングに用いるのは、適切でないと思われるがどうか？

回 答 : 確かに生体内での反応のモデルには向かないと思われるが、実際にウイルスの複製を抑制し、ウイルス量を減少させる薬剤をスクリーニングする目的には用いることができるとと思われる。今回用いた Nose 株は細胞傷害性の株であるが、同じウシ下痢症ウイルスでも非細胞傷害性の株もあり、その株を使用することで持続感染系のモデルを作り出すことも可能である。ただ非細胞傷害性の株を使用したウイルスモデルでは、結果の判定なども煩雑となり、必ずしも大量の薬剤のスクリーニングに向かないと思われるので、今回は細胞障害性の株を使用した。

質問 11 : 培地が high glucose なのは何か意味があるか？

回 答 : MDBK 細胞を用いた今回の実験では、高グルコース濃度は必ずしも必須ではない。

質問 12 : LDH 活性を測定する際にストッパーは使用しているか？

回 答 : ストッパーは使用していない。またストッパーを使用したものと結果の比較はしていない。

質問 13 : Figure 3 にて MOI が高くなりグラフがプラトーに達するが、全ての細胞が感染していると考えてよいのか？

回 答 : 顕微鏡による形態学的観察の結果からは、全ての細胞が感染しているとは考えにくい。

質問 14 : このウイルスの 1 回のレプリケーションサイクルの時間はどれくらいか？

回 答 : 約 16 ~ 24 時間くらいである。

質問 15 : 使用した血清は熱処理しているか？

回 答 : 血清は熱処理して非働化したものを使用している。

質問 16 : なぜ COX inhibitor に注目したのか？

回 答 : COX inhibitor は近年様々な効果が報告されているので、試しに活性を測定してみたところ、抗ウイルス活性があることが判明した。

質問 17 : C 型肝炎ウイルスのレプリコンでの COX inhibitor を調べたものはあるか？

回 答 : 無いと思う。

以上の結果から、3 名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を具備しているものと判断し、博士（医学）の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。