

論文要旨

Inhibition of bovine viral diarrhea virus (BVDV) by mizoribine : synergistic effect of combination with interferon- α

(ミゾリビンによる BVDV 増殖阻害；インターフェロン- α との相乗効果)

柳田 恒一郎

BVDV（牛下痢症ウイルス；Bovine viral diarrhea virus）はフラビウイルス科に属する、よく研究されているウイルスである。同じフラビウイルス科のHCV（C型肝炎ウイルス；Hepatitis C virus）は、難治性ウイルス疾患であるC型肝炎の原因となるウイルスであり、その治療法（PEG-インターフェロンとリバピリンの併用療法）は完全ではなく、新しい抗ウイルス薬の開発が必要とされているが、細胞培養系や動物モデルがないため、BVDVがそのモデルウイルスとして研究に使用される。

我々は、BVDVの抗ウイルス活性評価系として、plaque assay法と、感染細胞が細胞変性（CPE）を生じることを利用したCPE assay法を構築した。

plaque assayによって、ミゾリビン（免疫抑制剤として使用される核酸アナログ）に抗BVDV活性があることを見出した。さらにミゾリビンとインターフェロン（IFN- α ）の併用時に、MDBK細胞（牛腎臓細胞）におけるBVDV増幅を阻害する相乗効果がみられることを、CPE assayで見出した。このミゾリビンと IFN- α の相乗効果は、ウイルス収量assay（Viral yield assay）でも確認され、両者が相乗的に、BVDV感染細胞培養時の培養上清中に得られるウイルス量を低下させた。また、リバピリンと IFN- α 併用時にも、CPE assay及びウイルス収量assayにおいて、同様の相乗効果が確認された。

これらの結果から、ミゾリビンと IFN- α はBVDVに対する相乗的抗ウイルス活性を持ち、C型肝炎治療にもミゾリビンと IFN- α の併用が効果的である可能性が示唆された。

論文審査の要旨

報告番号	医論第1464号	氏名	柳田 恒一郎
審査委員	主査	小田 紘	
	副査	榮鶴 義人	坪内 博仁

Inhibition of bovine viral diarrhea virus (BVDV) by mizoribine: Synergistic effect of combination with interferon- α

[ミゾリビンによるBVDV増殖阻害：インターフェロン- α との相乗効果]

牛下痢症ウイルス (bovine viral diarrhea virus, BVDV) はフラビウイルス科に属するウイルスであり、培養細胞にて良く増殖するために、獣医学領域では詳しく研究されているウイルスである。一方、同じフラビウイルス科に属するC型肝炎ウイルス (hepatitis C virus, HCV) は、難治性ウイルス疾患であるC型肝炎の原因となるウイルスであり、その感染は慢性化しやすく、放置すると肝不全や肝臓癌と言った重篤な疾患を引き起す。現在治療法として用いられているインターフェロン- α (IFN- α) とリバビリンの併用療法は完全ではなく、新しい抗ウイルス薬の開発が必要とされているが、HCVは一部の特殊な株を除いて、細胞培養系や動物モデルがないため、遺伝子構造が類似したBVDVがその代替ウイルスとして、抗HCV薬の研究に用いられている。本研究では、BVDVを用いて各種のアッセイ系を構築し、新規の核酸誘導体の抗BVDV効果について検討した。

【実験方法】

MDBK細胞を用いて、感染細胞のplaques数をカウントする方法 (plaque assay), 感染細胞が細胞変性(CPE)を起こし死滅することを利用した方法 (cytopathicity inhibition assay), そして培養上清中に產生される感染性ウイルス量を定量する方法 (virus yield reduction assay) を構築し、これらの方法を用いて薬剤の抗ウイルス効果を測定した。また、抗BVDV効果を示した薬剤については、isobogram法を用いて IFN- α との併用効果について検討した。

【結果】

- ① Plaque assayを用いて、30種類以上の新規核酸誘導体の抗BVDV効果を検討したところ、その中で既に免疫抑制剤として臨床的に使用されているミゾリビンに抗BVDV活性があることを見出した。
- ② ミゾリビンの抗BVDV活性は cytopathicity inhibition assay を用いても同様に観察された。また、ミゾリビンはリバビリンと比較して抗ウイルス活性は若干弱かったが、リバビリンと異なり細胞毒性をほとんど示さなかった。
- ③ ミゾリビンと IFN- α を併用すると、BVDVの増幅を相乗的に阻害すること（相乗効果）が cytopathicity inhibition assay および virus yield reduction assay の両方において確認された。

【結論と考察】

リバビリンより毒性の少ないミゾリビンは、リバビリンと同様に抗BVDV効果を有し、また IFN- α との併用で相乗的な抗ウイルス効果を示すことが明らかとなった。以上の結果は、C型肝炎治療にもミゾリビンと IFN- α の併用が有効である可能性を示唆しており、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。

試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論第1464号		氏名	柳田 恒一郎
審査委員	主査	小田 紘		
	副査	榮鶴 義人		坪内 博仁

主査および副査の3名は、平成21年7月27日、学位請求者の柳田恒一郎君に対して、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。

質問1) 3種類のアッセイ系の違いは何か？どのように使い分けたか？

回答) Plaque assayは、ウイルスのタイトレーションや阻害剤アッセイに広く使われるポピュラーな方法である。従って、抗ウイルス薬スクリーニングに説得力のある方法として採用した。欠点として手間がかかるため、一度に大量のサンプルを評価する場合には、マイクロプレートで容易にアッセイできる cytopathicity inhibition assay が適している。Viral yield reduction assayは、ウイルスの産生量を直接測定するため、阻害の程度を比較しやすく、相乗効果を示す試験に用いた。

質問2) Virus yield reduction assayは、実際的には cytopathicity inhibition assayとは違うのか？

回答) 後者は、宿主細胞の viability を見ている。前者は宿主細胞から放出された感染性ウイルスの数を定量している。測定は共に CPE によって判定するが、検出しているものは異なる。

質問3) Plaque assayで24時間後に薬剤を取り除くことにどのような意味があるのか？

回答) 薬剤を除去した後に寒天重層を実施するが、ウェルごとに異なる濃度の薬剤を含む寒天を準備し重層することが操作上不可能なため、寒天重層後は薬剤のない系で培養した。それでも24時間で効果の判定は充分に可能であった。

質問4) Virus yield reduction assayにおける相乗効果試験の結果は、リバビリンの場合単独での作用がミゾリビンよりも強く、IFN- α がなくても充分抑えているように見えるが。

回答) これはミゾリビンよりもリバビリンのほうが単独では強い抗ウイルス活性を持っていたためである。しかし、抗BVDV効果をほとんど示さない低濃度において、IFN- α との相乗効果が見られている。

質問5) HCVのパーティクルの大きさに幅(35-65nm)があるのはなぜか？

回答) 文献の報告にばらつきがあるためである。この原因として、電子顕微鏡で測定している操作上、輪郭の見え方に誤差が出ているのではないかと思われる。

質問6) BVDVが牛に起こす病態としては粘膜病、下痢のほかにもあるか？また、どのくらいの割合の牛が感染しているか？感染経路は？

回答) 感染により流産を生じる。市販の牛血清のほとんどに BVDV 抗体が含まれていると言われていることから、高率で感染していると思われる。感染経路は、直接・間接接触、空気伝播、母子感染がある。

質問7) サイクロスポリンAはHCVのsubgenomic replicon systemでHCV複製を阻害するが、ミゾリビンでその辺のメカニズムは分かっているか？

回答) ミゾリビンの作用機序については IMPDH 阻害が推定される。ミゾリビンは三リン酸化されないため、リバビリンのような RNA ポリメラーゼ阻害効果についてはないと考えられる。

質問8) Plaque assayとcytopathicity inhibition assayとでEC₅₀の値が違う理由は何か？

回答) 前者はウイルス感染により生じるplaques数を見ており、後者はウイルス感染による細胞のviabilityの低下を見ている。また、薬剤の作用期間が前者では1日、後者では3日と異なっている。これらの条件の違いによるものであると考えられる。

質問9) BVDVのreplication cycleは何時間くらいなのか？

回答) 24時間の培養で感染性ウイルスが上清中に出てくるので、24時間以内であると思われる。

質問 10) 抗 HCV 薬探索によく用いられている replicon assay と、BVDV plaque assay の利点・欠点は何か？

回答) BVDV の系は、宿主での全ての増殖サイクルを阻害する物質を広く拾うことができる利点がある反面、どこを阻害しているかわからない欠点がある。Replicon の系は宿主細胞として肝細胞を使っているため、肝細胞特異的な宿主因子をより正確に拾うことができるという利点がある。しかし cell-free の HCV 感染系ではないので、感染性や毒性が低下しているなど、HCV 感染系とはいえない欠点がある。

質問 11) スクリーニングの結果、ミゾリビン以外で活性のあった化合物は、ミゾリビンやリバビリンと似た構造か？ミゾリビンを選んだのは構造式を見たためか？

回答) ミゾリビンと全く違う構造であった。ミゾリビンは構造がリバビリンに類似しており、同様の活性を持つ可能性を期待して選んだ。

質問 12) 相乗効果試験での combination ratio は臨床で使われる濃度から決めたのか？

回答) In vitro で細胞毒性がなく、抗ウイルス活性を測定できる適当な濃度として決めた。

質問 13) 臨床で使われている濃度と、今回実施した薬剤濃度との関係はどうか？臨床に応用できそうな濃度であるのか？

回答) IFN の濃度は試薬濃度の単位が U/ml で、臨床試験ではモル濃度で表記されており、その相関確認は今後の課題である。ミゾリビンは臨床での濃度 (4-8 μM) より低い濃度で試験した。ミゾリビンが IFN- α との併用で活性を示した濃度 (2-5 μM) は臨床的に十分達成できると思われる。

質問 14) ミゾリビンを HCV 薬として開発しようという会社の動きはないのか？臨床試験を行う予定は？

回答) コストの面などから考えて、今のところ企業としてミゾリビンを HCV 薬として臨床開発する動きはない。

質問 15) ミゾリビンの作用機序は何と考えるか？また、併用時の作用機序はどう考えるか？

回答) ミゾリビンの作用機序としては IMPDH 阻害が推定されている。デオキシグアノシン添加により GTP プールを補うことで、BVDV 阻害が弱められることにより裏づけられた。ミゾリビンと IFN- α との作用機序が異なるものであれば、併用時に相乗的に働くと考えられる。

質問 16) IFN- α +リバビリンと IFN- α +ミゾリビンの併用を比較したときの、利点・欠点は何か？

回答) リバビリンと比較してミゾリビンは副作用が少ないことが利点である。リバビリンで 20% 程度生じる溶血性貧血はミゾリビンの臨床では 1% 以下である。欠点としては、ミゾリビンはウイルス性肝炎患者への投与は慎重に行うという注意事項がある点や、骨髄抑制による感染症の悪化のリスクを否定出来ない。

質問 17) 他の DNA, RNA ウィルスに対するミゾリビンの抗ウイルス活性は、臨床で明らかにされているのか？

回答) In vitro のアッセイ系で抗ウイルス活性を測定した報告はあると記憶しているが、臨床的に有効かどうかは明らかでない。臓器移植後の免疫抑制剤としてのミゾリビン投与がサイトメガロウイルス感染を減少させるという記載はある。

質問 18) BVDV の取り扱いに、規制はあるのか？

回答) BVDV は国の「家畜伝染病予防法」の「届出伝染病」に指定されており、発生したら届出を行う必要はあるが、実験における取り扱いの規制はない。

以上の結果から、3 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士（医学）の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。