

エボラウイルス等特定一種病原体に対する核酸アナログの培養細胞における抗ウイルス効果の検証
分担研究報告書

核酸アナログの抗ウイルス効果をBSL4で検証する実験系の確立と検証

研究分担者 吉河智城
国立感染症研究所 ウイルス第一部 主任研究官

研究要旨：エボラウイルス等特定一種病原体は感染した場合の致死率が高く、故にその治療法の確立は必須である。治療には薬剤を用いるが、薬剤の選択は当然事前に得られる科学的知見に基づく。抗ウイルス薬の *in vitro* で評価するにあたり、有効濃度のレンジ、効果を検証するために適切な培養細胞の選択をBSL2レベルで検討、そして確定することは、作業負荷が高いBSL4で本試験を行う前に必須である。そこで本年度は、特定一種病原体に対する核酸アナログの有効性評価を行う系の確立と検証を、BSL2病原体を用いて行った。エボラウイルスのサロゲートとして使用可能なエボラGPでシュードタイピングした組換えVSV（rVSV-ZaireGP）を用いて、核酸アナログである、ファビピラビル、モルヌピラビル、レムデシビルの効果を検証した。検証に当たりフィロウィルスの主要な標的細胞である肝細胞、または単球/マクロファージ由来とされる2種類の全く性質の異なる細胞であるHuh-7とTHP-1を用いて評価を行った。その結果、本実験で使用した薬剤濃度では、Huh-7を用いて薬剤を評価したとき、ファビピラビルのみで顕著なウイルス産生量の抑制が確認された。驚くべきことにTHP-1を用いて評価した場合ファビピラビルを含む全ての薬剤でウイルス産生量の抑制は確認されなかった。このことは薬剤の有効性評価には複数の細胞種を用いることが重要であり、特に一種病原体に含まれるウイルスの第一標的である単球、マクロファージ由来の細胞を用いるべきであると考えられる。以上の結果より本研究で確立された核酸アナログによる抗ウイルス効果の検証法は、特定一種病原体を用いた際にも正確に薬剤を評価することが出来ると考えられる。

A. 研究目的

エボラウイルス等特定一種病原体は発症した際の致死率が高く、故にその治療法の確立は必須である。治療に際して薬剤の選択は当然事前に得られる科学的知見に基づく。そこで実際に特定一種病原体と動物や培養細胞を用いた *in vivo*、*in vitro* での薬剤評価が必須となり、まずは *in vitro* での検討を行うこととなる。また、抗ウイルス薬の評価にあたり、有効濃度のレンジ、適切な培養細胞の選択をBSL2レベルで検討、確立することは、作業負荷が高いBSL4で本試験を行う前には必須である。

そこで本年度はBSL4にて特定一種病原体に対する核酸アナログの効果を *in vitro* で評価する系の確立と検証を、BSL2病原体を用いて行った。具体的にはエボラウイルスのサロゲートとして使用可能な、エボラGPでシュードタイピングした組換えVSV（rVSV-ZaireGP）を用いて、核酸アナログである、

ファビピラビル、モルヌピラビル、レムデシビルの効果を検証した。更に薬剤効果の適切な評価には、複数種類の性質の異なる細胞を用いることが必須と判断し、フィロウィルスの主要な標的細胞である肝細胞由来とされるHuh-7、または単球/マクロファージ由来とされるTHP-1を用いて評価を行った。

B. 研究方法

ヒト肝細胞癌由来の上皮細胞様培養細胞株であるHuh-7とヒト急性単球性白血病由来の単球系細胞株であるTHP-1を用いた。それぞれ96ウェルプレートに 5×10^4 cells/wellで播種した。その際THP-1は50ng/mlになるようにホルボール12-ミリストート13-アセート(PMA)を加えて単球由来マクロファージ様細胞に分化させた。

播種翌日にファビピラビル、モルヌピラビル、レムデシビルを4 μ M/wellから2倍の希釈系列になるよ

うに用意し、それらを 96 ウェルプレートに加えた。直後に rVSV-ZaireGP を MOI=0.01 になるように各ウェルに添加し細胞にウイルスを感染させた。

感染 2 日後に培養上清を回収し、各薬剤の添加濃度毎のウイルス産生量について VeroE6 細胞を用いたブラークアッセイにより定量した。

【倫理面への配慮】

該当なし

C. 研究結果

Huh-7 または THP-1 を使用した際の rVSV-ZaireGP の各種薬剤に対する感受性を図 1 に示す。Huh-7 を用いて薬剤を評価したとき、ファビピラビルのみで 1 μ M/well 辺りから顕著なウイルス産生量の抑制が確認された。一方でモルヌピラビル、レムデシビルについては今回の実験で用いた最高濃度である 4 μ M/well でもウイルス産生量の抑制は確認されなかった。

一方 THP-1 を用いた場合ファビピラビルを含む全ての薬剤で最高濃度である 4 μ M/well でもウイルス産生量の抑制は確認されなかった。

D. 考察

rVSV-ZaireGP はエボラウイルスの GP を用いて細胞への吸着、侵入を行うため野生型のエボラウイルスのそれを模していると考えられる。更に VSV はエボラウイルス同様に一本鎖のマイナス鎖 RNA ウィルス、所謂モノネガウィルスである為、ヌクレオシドアナログ系の抗ウイルス薬についてもエボラウイルスに近い評価が可能であると考えられる。

rVSV-ZaireGP とエボラウイルスの類似性を鑑みて今回の結果から、以下の事が考察される。まず、核酸アナログの有効性が想定していたよりも低い。今回の薬剤濃度域では Huh-7 を用いた際のファビピラビルしかウイルスの産生を抑制する効果が確認できなかった。これが *in vivo* での効果と全く同一にならない可能性はあるとしても、これら核酸アナログの単剤での有効性に疑問を持つには十分な結果となった。更に驚くべきことに、THP-1 を用いた場合にはウイルス産生の抑制効果を示した核酸アナログが存在しなかった。特にファビピラビルについては Huh-7 では有効な濃度域に於いて THP-1 では全く効果が確認されなかった。一般的に抗ウイルス薬の有効性を評価する場合には接着細胞を用いることが多い。この場合、当然実質細胞由来である事が多く、裏を返せば骨髓由来である免疫細胞等に対する評価が不十分となりが

ちである。しかし、エボラウイルス感染症を含めた一種病原体による感染症においてそれらのウイルスは免疫担当細胞、特に単球、マクロファージなどを第一標的として感染すること、かつこれらの感染症は免疫疾患の様相も示すことから、本実験で得られた結果は非常に示唆的である。2018 年にコンゴ民主共和国で行われたエボラ治療薬に関する WHO 主導の研究について、用いられた 4 種類の薬剤（レムデシビルと、3 種類の性状の異なるモノクローナル抗体製剤、またはモノクローナル抗体カクテル製剤）のうち、特に効果の高かった 2 剤はどちらもモノクローナル抗体製剤でありレムデシビルは有効性に劣っていた。Preliminary でありながらも本実験で得られたレムデシビルに対する評価も臨床結果と齟齬はなく、本実験で確立された核酸アナログによる抗ウイルス効果の検証方法は、実際に特定一種病原体を用いることでより正確に薬剤を評価することが出来ると考えられる。

E. 結論

本研究ではBSL4で特定一種病原体に対する核酸アナログの評価を行う系を確立した。実際にrVSV-ZaireGPを用いて、核酸アナログである、ファビピラビル、モルヌピラビル、レムデシビルの効果をHuh-7とTHP-1という2種類の全く性質の異なる細胞用いて行ったところ、驚くべきことに細胞が異なると薬剤の効果が全く異なることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特記事項なし

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
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

rVSV-ZaireGPの薬剤感受性

