



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | An in vitro System for Screening Anti-Hepatitis B Virus Drugs   |
| Author(s)    | 上田, 啓次  |
| Citation     | 大阪大学, 1990, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/37120">https://hdl.handle.net/11094/37120</a>   |
| rights       |   |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|         |   |         |         |             |
|---------|---|---------|---------|-------------|
| 氏名・(本籍) | うえ<br>上   | だ<br>田  | けい<br>啓 | じ<br>次      |
| 学位の種類   | 医   | 学       | 博       | 士           |
| 学位記番号   | 第   | 9099    | 号       |             |
| 学位授与の日付 | 平成  | 2年3月24日 |         |             |
| 学位授与の要件 | 医学研究科内科系専攻  |         |         |             |
|         | 学位規則第5条第1項該当  |         |         |             |
| 学位論文題目  | An in vitro System for Screening Anti-Hepatitis B Virus Drugs<br>(抗B型肝炎ウイルス剤のin vitroスクリーニングシステム) |         |         |             |
| 論文審査委員  | (主査)<br>教 授<br>(副査)<br>教 授  | 鎌田 武信   | 松原 謙一   | 教 授<br>吉川 寛 |

### 論文内容の要旨

#### [目的]

B型肝炎ウイルス(HBV)は、急性肝炎の起因ウイルスであるばかりでなく、慢性肝炎を起こし肝癌の発生率を有意に高めることができることが明らかにされている。これに対処するには、肝炎の鎮静化を図ることが重要であると考えられている。抗ウイルス剤の開発は、この目的に沿って最大の課題となるがHBVは培養細胞系を用いての感染系を有さず、感染増殖機構の解明、及びそれに根ざした抗ウイルス剤の開発は立ち遅れているのが現状である。

最近、ヒト肝芽腫由来の培養細胞株HuH6を用いてその宿主染色体にHBVゲノムを組み込むことにより永続的にHBVを産生するシステム(HB611細胞)が完成された。そこで、この系を利用して、多くの抗ウイルス剤を簡便にスクリーニングするシステムを作ることを目的として次の様な実験を行った。

#### [方法]

HB611細胞は、HBVゲノムを3コピー、head-to-tailに繋いだ形でpBR322挿入し、セレクションマーカーとしてG418耐性遺伝子(neo<sup>r</sup>)をもたせたプラスミド(pBR3HBneo)をヒト肝芽腫由来の培養細胞株HuH6にトランسفェクションし、G418耐性クローンを選択することによって得られた。細胞内には、コア粒子を、培養上清中にはS粒子(Dane粒子を含む)を永続的に蓄積する。又、組み込まれたゲノムからDane粒子を放出するまでの過程は、自然感染における感染成立以後のすべての正常ライフサイクルを営むと考えられる。

ウイルスの増殖は、必然的に複製を伴うものである。従って、抗ウイルス剤の効果は、複製量を検

討することによって判定されるものと考えられる。HB611細胞を、直径約3cmのウェルに $5 \times 10^4$ 個播いた時、組み込み型HBVDNAを細胞数のマーカーとして細胞内HBVの複製中間体量をサザンプロット法で調べると、播種後、約2週間で最高に達していることが明らかになった。

そこで、薬剤存在下におけるHBV複製中間体量の動態を上述の方法で解析した。薬剤は、三～五段階に濃度を変化させ、free HBVのサザンプロットにおけるバンドの強さをデンシトメトリーによって比較検討した。一方、薬剤の効果は、宿主に対する毒性を検討し、相対的に評価されなければならない。この点を検討するため、薬剤存在下における $^3\text{H}$ -チミジン取り込み能を調べた。

#### 〔成績〕

今回、試した薬剤は、interferon(IFN)- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , Acyclovir, Ara-C, Ara-A, dideoxy adenosine(ddA), dideoxy cytidine(ddC), azidothymidine(AZT)，及び，oxetanocine(OXT-A)等である。50%複製阻止量(ID<sub>50</sub>)，50%宿主細胞増殖阻止量(CD<sub>50</sub>)を求め、治療効果指標(TI=CD<sub>50</sub>/ID<sub>50</sub>)を算出した。試された薬剤のうち、選択的にHBVのDNA合成を阻害するものは、IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , Acyclovir, ddCなどであった。

IFN- $\alpha$ (TI>25), - $\beta$ (TI>65)は既にB型慢性肝炎の治療に用いられ、ある程度の効果の確認された薬剤である。これらは、2',5'-oligoadenylate synthase(2,5AS)を誘導し、ウイルス蛋白合成を阻害することにより抗ウイルス作用を示すとされている。HB611の系においても2,5ASは確かに誘導されていたが、ウイルス蛋白合成は全く阻害されなかった。

したがって、IFN- $\alpha$ , - $\beta$ による抗HBV作用は、別の機構(例えば、逆転写過程の阻害)によるものと考えられた。尚、IFN- $\gamma$ では2,5ASの誘導も、抗HBV DNA合成抑制作用もみられなかった。

Acyclovir(TI=19)は、ヘルペスチミジンキナーゼにより活性型となりウイルス複製の際にとり込まれて複製阻止効果をあらわす。従って、感染細胞においてのみ効果を発起するため毒性は低くヘルペス感染症に対して既にその有効性が確認されている。HBVはチミジンキナーゼをコードしておらず、この系において得られた中等度のHBV合成抑制効果の機構は不明である。

AraA(TI=1.4), AraC(TI=7.1)もHBV感染症に対して臨床的に試された核酸アナログの一つである。比較的高いHBV DNA合成抑制効果を示す反面、臨床の場でも認められた様に、毒性も強く有用性は低い薬剤であると考えられた。

AZT(TI=7.5)は、HIV感染症に対して著効を示す薬剤であるが、HBV DNA合成抑制効果は弱かった。又、ddC(TI=375), ddA(TI=ND)といった類似性の高い化合物の一方が著効を示すに對して、他方は全く効果を示さないなどHBVポリメラーゼの特異な性質が示唆された。

OXT-A(TI=4.3)は、抗ウイルス効果の期待されるBacillus megateriumより分離された新種の核酸アナログである。この物質そのもののHBV感染症における有用性はそれ程高いものではなかったが、類似の化合物で有用性の高いものがいくつか確認されている。

#### 〔総括〕

抗HBV治療剤のin vitroにおける極めて簡便なスクリーニングシステムを完成させた。このシ

システムはHBVの感染過程がないこと、薬剤の生体相互作用のないことを除けば *in vivo* の系に非常に近いものであることが確認された。又、有用性の高い薬剤について、抗HBV作用の作用機構の解明（複製過程におけるどの step を阻害しているか等）にも有用な系であるものと考えられた。

### 論文の審査結果の要旨

この研究は、*in vitro* における感染系を有さないB型肝炎ウイルス(HBV)を、遺伝子工学的手法を用いて半永久的に產生せしめた培養細胞株HB611をもちいて、世界に先がけて、*in vitro* における抗HBV剤のスクリーニングシステムを確立した。

このシステムは、*in vitro* における薬剤の効果を如実に反映するという点、簡便で多量の薬剤を短期間に処理できるという点などスクリーニングシステムとして極めて有用であり、その必要かつ十分条件を備えているといえる。

また、薬剤の作用メカニズムをも探ることができるという点でも有用性が示された。このシステムの確立は、今後の抗HBV剤の開発への基礎を築いたという大きな意味をもち、学位論文として評価に値するものである。