

ハイスループットシステム：CellTiter 96® AQueous One Solution Assayを用いた抗ウイルス化合物のスクリーニング



By Thomas Fletcher III, Ph.D., Roger Ptak, B.S., Stacy Bartram, B.S., Susan Halliday, M.S. and Robert Buckheit, Jr., Ph.D. Infectious Disease Research Department, Serquest, Southern Research Institute, Frederick, MD; and Rich Moravec, B.S., and Terry Riss, Ph.D. Promega Corporation

プロメガのCellTiter 96® AQueous One Solution Assay[®]は、MTSテトラゾリウム化合物としての特長を示し、生細胞中で強力に発色する組織培養培地に可溶性のホルマザン産物に変換されます。CellTiter 96® AQueous One Solution Systemに含まれる試薬では、エンドポイントとして細胞の生存能力をモニターするためのワンステップ型ハイスループットスクリーニング試験をデザインすることができます。本稿では、多様なウイルスに対して抗ウイルス活性を示す化合物を評価するために、ウイルス感染により誘導される細胞変性効果(CPE)の阻害試験にプロメガのCellTiter 96® AQueous One Solution Assayを使用しました。

はじめに

多くのウイルスは複製のときに感染した宿主細胞だけでなく、近隣の新感染細胞も細胞障害作用により破壊します。これらの多くのウイルスに対して治療薬となりうる薬剤の抗ウイルス活性は、このウイルスによって誘導される細胞死の阻害を評価することによって決められます。プロメガではセルベースのCPEアッセイを使い、ヒト免疫不全ウイルスタイプ1(human Immunodeficiency Virus Type 1; HIV-1)、牛ウイルス性下痢性ウイルス(Bovine Viral Diarrhea Virus; BVDV)、ヒトヘルペスウイルス(human herpesviruses; HSV-1およびHSV-2)、呼吸器症候群ウイルス(respiratory viruses)(表1)を含むウイルスの阻害剤を同定するための自動化ハイスループットの方法を開発しました。このアッセイの方法論では、ある単一のウイルスに対して1週間で15,000種類までの化合物をスクリーニングすることができます。このハイスループット法は多様なウイルスのパネルに対する潜在的な抗ウイルス剤の活性測定にも使用できます。このアッセイ系では天然化合物とコンビナトリアルケミストリーライブラリーの両方から抗ウイルス化合物の迅速なスクリーニングを行うことができます。このように薬物の発見とリード化合物の最適化の間隔を短縮することができます。

表1. CPE阻害試験とCellTiter 96® AQueous One Solutionの試薬を使って解析されたウイルスと細胞

Virus	Cell Line	Length of Assay
HIV-1	CEM-SS	6 days
HSV-1	Vero	5 days
HSV-2	Vero	5 days
BVDV	MDBK	6 days
CMV	MRC-5	7 days
Coxsackie	MRC-5	5 days
Echovirus	MRC-5	4 days
Enterovirus	MRC-5	4 days
Rhinovirus	MRC-5	5 days
Adenovirus	HeLa	3-4 days
Influenza	MDCK	2-3 days
Parainfluenza	Hep2	3 days
RSV	Hep2	4 days

ハイスループットアッセイフォーマット

細胞を適当な培養培地を用いて96ウェルプレートで培養します。自動化した抗ウイルス試験はBeckman Coulter SAGIAN™ Core System(図1)を用いて行われました。試験は目的とするウイルスに対して、プレートあたり24種の化合物を一回のテストに用いるように設計しています(図2)。100μlのテストする薬物化合物と100μlのウイルス浮遊液を各サンプルウェルに加えます。コントロールを各プレートに設定します(表2)。プレートを37℃に設定した5% CO₂を含む湿式恒温槽でインキュベートします。コントロール試験において最も高いCPEが観察されるまでインキュベーションを続けます(表1を参照)。

CPEの阻害はプロメガのCellTiter 96® AQueous One Solution Assay(カタログ番号G3580, G3581)を使った細胞増殖試験によって決定されます。この試験では細胞の増殖を測定します。これは生存宿主細胞のデヒドロゲナーゼにより生成されるNADHとNADPHがMTSテトラゾリウム塩[®]をホルマザンへ変換する、生物学的還元機構を基礎にしています(図3)。CellTiter 96® AQueous One Solutionの試薬をウェル内の溶液量の10%となるように加えます。十分な発色が起こるまで(細胞種に依存するが、通常2~6時間)、プレートを37℃でインキュベートします。紫色のホルマザン産物を490nmの測定波長と650nmのリファレンス波長を用いて分光光度計で測定します。各培養培地におけるO.D.値は生成されたホルマザン量を表し、生細胞数に比例します(2)。

表2. 抗ウイルス試験のコントロール

Control	Well Contents			
	Virus	Drug	Cells	Media
Cell			✓	✓
Virus	✓		✓	✓
Toxicity		✓	✓	✓
Colorimetric		✓		✓
Media				✓



図1. 自動化ロボットワークステーションSAGIAN™ Core System (Beckman Coulter)

1回の投与テストで活性を示した化合物は、さらに投与に応じた反応曲線を作成するために評価されます。この反応曲線は IC_{50} (ウイルスによって誘導される細胞死の50%を阻害する濃度)と TC_{50} (非感染細胞の50%を化合物のみで殺す濃度)を決定するために使われます。投与反応テストのプレートのレイアウトを図に示しています。HIV-1、HSV-2、CMVに対するコントロール化合物の典型的な結果を図のパネルA~Cに示しました。

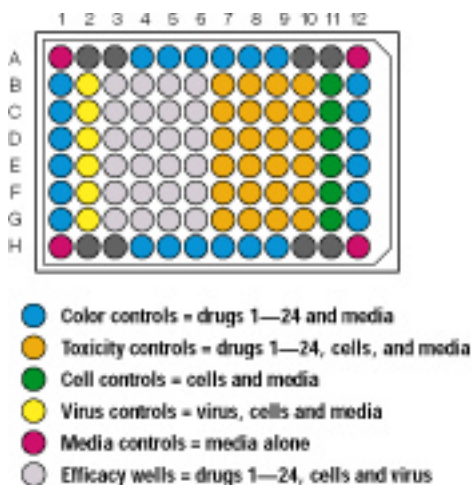


図2. 抗ウイルス化合物の1回投与テストでのプレートレイアウト

- Color controlでは薬物の色に起因するバックグラウンドの吸光度を決定し、この値は対応する ● efficacy(効果)や ● toxicity(毒性)の値から差し引く。● Toxicity controlでは抗ウイルス活性と毒性を区別している。● Cell controlでは非処理の細胞の吸光度が決定され、生存率が100%としている。● Virus controlではウイルス処理によって死滅した細胞の吸光度が決定され、生存率が0%としている。
- Media controlでは組織培養培地のバックグラウンドとなる吸光度が決定される。● Efficacy wellsではcontrol wellsに対する生存能力のパーセンテージによって薬物化合物の効果を決定する。

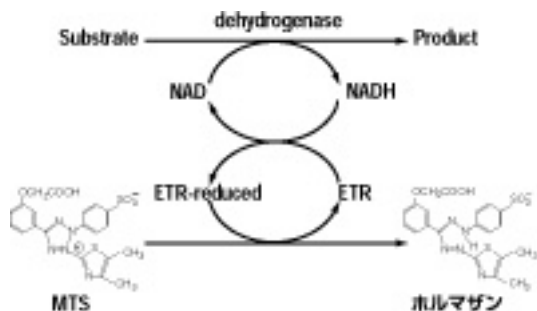


図3. MTSからホルマザンへの細胞代謝を介した変換の概要

MTSが代謝活性を有する細胞によってホルマザン産物に還元される主な要因はデヒドロゲナーゼの作用でNADHやNADPHなどの還元型補酵素が生成されるためであると考えられています。

NADHは自身の電子をphenazine methosulfate(PMS)やphenazine ethosulfate(PES)のような電子輸送試薬(electron transfer reagent; ETR)に移すことができ、その結果、これらの化合物が還元される。還元型ETRは次に直接的な反応によりMTSテトラゾリウム化合物を還元し、呈色を示すホルマザンを生成する。

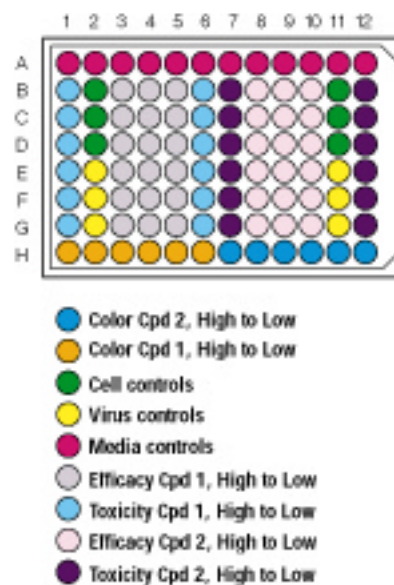
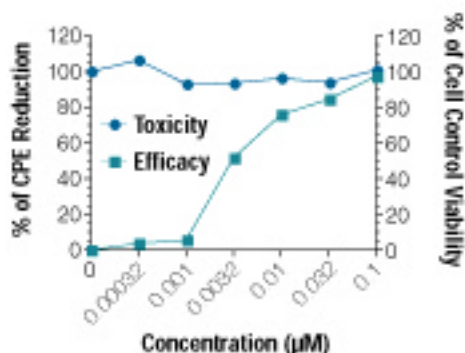


図4. 抗ウイルス化合物の投与テストをするためのプレートレイアウト
コントロールは図に記載されているのと同じ。化合物を上図のように高濃度から低濃度まで添加した。

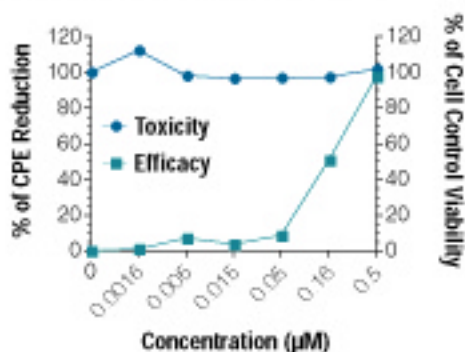
考察

CellTiter 96® Aqueous One Solution Assayにより、迅速で効果的なハイスループットスクリーニングが可能となりました。水溶性のホルマザンを使った試薬の“添加して計測”の簡単な方式により、培地を除く作業や、その他サンプルの取り扱いを省くことができます。このことからウェル間の誤差を減少させると同時に、効率とスループット(処理量)が上がりました。CellTiter 96® Aqueous One Solution Assayは384ウェルプレートのアプリケーションでも、96ウェルプレートの場合と類似したパフォーマンス特性を保持しています(2, 図6)。ここで紹介したプロセスは、CellTiter 96® Aqueous One Solution Assayがハイスループットのセッティングにおいてテストする化合物の抗ウイルス効率や細胞毒性を決定するために有用なツールであることを示しています。

A. AZT vs. HIV-1 RF in CEM-SS Cells



B. Acyclovir vs. HSV-2 MS in VERO Cells



C. Ganciclovir vs. CMV AD169 in MRC-5 Cells

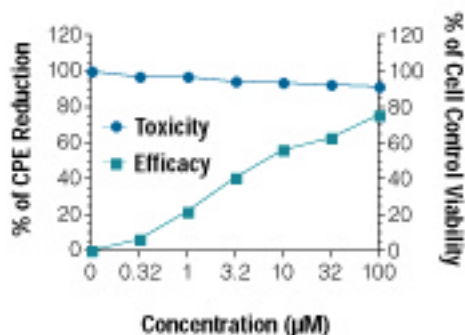


図5. 既知の3種類の抗ウイルス化合物における用量作用曲線

CPE阻害試験をCellTiter 96® AQueous One Solution Assayを用いて行った。結果は化合物の毒性を非処理細胞と比較した生存率(%)として、有効性をCPEの減衰率(%)として表した。3種類の化合物は濃度依存的にウイルスにより誘導される細胞変性効果を抑えた。加えて、テストした濃度の範囲において化合物は最小の毒性(つまり100%の生存率)を示した。パネルA: Human Immunodeficiency Virus Type 1, Strain RF (HIV-1 RF)に対するZidlovudin(AZT)。パネルB: Human Herpesvirus, Type 2 (HSV-2)に対するAcyclovir。パネルC: Cytomegalovirus, Strain AD1 69 (CMV AD169)に対するGanciclovir。

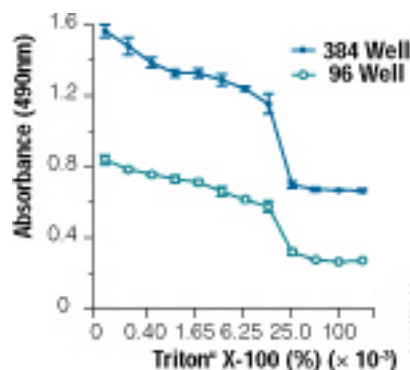


図6. 384ウェルと96ウェルフォーマットでの毒性試験の比較

対数増殖期にあるマウスのハイブリドーマを遠心操作により回収し、10%仔ウシ血清を含むF12/DME培地に懸濁した。Corning®の96ウェル組織培養プレートには1ウェルあたり90µl(45,000 cells)になるように分注した。一方、Corning®の384ウェル組織培養プレートには1ウェルあたり35µl(17,500 cells)になるように分注した。細胞を殺すため、培地に希釈したさまざまな濃度のTriton® X-100を、384ウェルプレートでは4µl/ウェル、96ウェルプレートでは10µl/ウェル加えた。CellTiter 96® AQueous One Solution Reagentは384ウェルプレートでは8µl/ウェル、96ウェルプレートでは20µl/ウェル加え、37℃に設定した5%のCO₂インキュベーターで4時間インキュベートした。吸光度はWallac™ 1420 VICTOR²™プレートリーダーで記録した。吸光度の値はそれぞれの処理について複数実施した平均とその標準偏差を示した。

参考文献

1. Bartrop, J.A. *et al.* (1991) *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **1**, 611.
2. Riss, T. and Moravec, R. (1998) *Promega Notes* **69**, 15.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	1,000回分	G3580	32,000
	5,000回分	G3581	99,000
	200回分	G3582	10,000

関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	1,000回分	G1780	35,000
CellTiter 96® AQueous MTS Powder ^(a)	1g	G1111	96,000
	250mg	G1112	38,000
CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay	1,000回分	G5421	31,000
	5,000回分	G5430	94,000
	50,000回分	G5440	765,000

CellTiter 96 and CytoTox 96 are trademarks of Promega Corporation and are registered with the U.S. Patent and Trademark Office. Corning is a registered trademark of Corning, Inc. SAGIAN is a trademark of Beckman Coulter, Inc. Triton is a registered trademark of Union Carbide Chemicals and Plastics Co., Inc. VICTOR² and Wallac are trademarks of Perkin Elmer Life Sciences.

^(a)The MTS tetrazolium compound is the subject of U.S. Pat. No. 5,185,450 assigned to the University of South Florida and is licensed exclusively to Promega Corporation.