

***In vitro* 感染細胞を用いた抗結核薬スクリーニング法(SFA 法)**

標準作業手順書(SOP)

令和4年度AMED新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
課題名:薬剤耐性結核および非結核性抗酸菌症治療薬開発を加速する支援技術の開発
(課題管理番号: JP21fk0108590、研究開発代表者:瀧井猛将(結核予防会 結核研究所))

令和5年11月27日 ver.1

略号:

BDT, broth dilution test

BSL, biosafety level

D-MEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO, dimethyl sulfoxide

MIC, minimum inhibitory concentration

PBS, phosphate-buffered saline

RFP, rifampicin

SFA, simple fibroblast assay

SOP, standard operating procedures

まえがき

本標準作業書(SOP)は令和 4 年度 AMED 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業「COVID-19を含む公衆衛生危機管理上医薬品等の確保が必要な感染症に対する治療薬開発を加速する非臨床測定技術の供給体制整備に資する研究【*in vitro* 感染実験支援】」課題名:薬剤耐性結核および非結核性抗酸菌症治療薬開発を加速する支援技術の開発(課題管理番号:21fk0108590h0001)、研究開発代表者:瀧井猛将(結核予防会 結核研究所)、研究分担者:浅見行弘、君嶋葵(北里大学)、大原直也(岡山大学))の支援で実施された課題の成果である。

目次

1. 試薬、器具、測定機器
 - 1-1. 試薬
 - 1-2. 器具
 - 1.3. 培養機器
 - 1-4 測定機器
2. 方法
 - 2-1. 菌培養
 - 2-2. 細胞培養
 - 2-3. Simple fibroblast assay (SFA)法
 - 2-4. Both dilution test (BDT) 法
3. 評価方法
 - 3-1.概要図
 - 3-2. SFA 法による抗菌活性(1 次スクリーニング)
 - 3-3. SFA 法による細胞毒性(1 次スクリーニング)
 - 3-4. BDT 法による抗菌活性(1 次スクリーニング)
 - 3-5. MIC 測定(2 次スクリーニング)
4. 評価例
5. 参考資料
6. 謝辞

1. 試薬、器具、測定機器

1-1. 試薬

(比較試験用抗生剤)

- リファンピシン、Sigma-Aldrich R3501-250MG 10mg/ml in DMSO (冷凍保存)
- エリスロマイシン、TCI(東京化成工業)E0751 10mg/ml in DMSO (冷凍保存)

(細胞培養用抗生剤)

- 注射用ペニシリン G カリウム 100 万単位、明治製菓ファルマ
100 万単位/ml in PBS(-)(冷蔵保存)
- 硫酸ストレプトマイシン注射用 1g、明治製菓ファルマ 1g/ml in PBS(-)(冷蔵保存)

(菌培養用)

- Middlebrook 7H9、BD 271310
 - Middlebrook ADC Enrichment、BD 211887
 - Tween 80、Sigma-Aldrich P4780-100ML
- (細胞培養用)
- D-MEM(Low Glucose)、Wako 041-29775
 - ウシ血清、Hyclone
 - PBS (-)、Wako 166-23555
 - 10x トリプシン溶液、0.5w/v% Trypsin-5.3mM EDTA/4Na solution, Wako 208-17251
 - Trypan Blue Solution, 0.4% (Gibco 15250061)
 - フィブロネクチン、Merk MFCD00131062 1MG 1mg/ml in PBS(-)(冷蔵保存)

1-2. 器具

(菌培養用)

- Falcon チューブ 15ml 、Falcon 352029

(BDT 法用)

- 96 穴組織培養プレート(無菌)Falcon353075
- (培養用)
- ペトリディッシュ(無菌、細胞培養用)Falcon353003
- (AXION-Z 用)
- CytoView-Z、AXION

1.3. 培養機器

- ・孵卵器 (BSL-3 に設置、*M. tuberculosis* 用、BSL-2 に設置、*M. avium* 用)
- ・CO₂ インキュベーター (Maestro Z は CO₂ インキュベーターとしての機能があるが、複数のプレートを同時に培養・連続測定ができない。複数のプレートを用いる場合、*M. tuberculosis* に対する抗菌活性を測定する場合、BSL-3 内に設置、*M. avium* の場合は BSL-2 に設置)

1-4. 測定機器

- ・デジタル比色計、TITEC 簡易 OD モニター miniphoto 518R、干渉フィルター530nm
- ・マイクロプレート免疫凝集反応確認用器具 チェックミラー、トッケン、TK-MA01/
- ・Maestro Z (AXION)

2. 方法

2-1. 菌培養

- ・菌株、*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (BSL-3 病原体)、*Mycobacterium avium* 104 (BSL-2 病原体)(菌株分譲依頼先;結核研究所、岡山大学)
- ・小川培地等の抗酸菌用の培地からディスポループ(ガンマー線滅菌済、アズワン 6-488-01)を用いて 6ml の MiddleBrook 7H9 10% ADC 0.05% Tween 80 培地に殖菌する。
- ・数週間培養後、BDT 法、もしくは SFA 法に使用する。凍結保存用スクリーバイアルに分注し、-80 保存する。保存後一部は、寒天培地 (MiddleBrook 7H11 ager (BD 212203, 10% OADC enrichment (BD 211886))にて生菌数(CFU, colony forming unit)を測定しておく。

2-2. 細胞培養

- ・細胞株 (MRC-5 SV 1TG1, human lung fibroblast) (細胞株分譲以来先:結核研究所)
- ・10ml の細胞継代用培地 (D-MEM 5% ウシ血清培地[100units/ml ペニシリン、100μg/ml ストレプトマイシン含有])に細胞を懸濁し、細胞培養用ペトリディッシュ(Falcon 353003)に播種後、37°C 5% CO₂ インキュベーターで培養する。
- ・継代時には、PBS(-)で1回洗浄後、1x トリプシン溶液を添加後、CO₂ インキュベーター内で 10～15 分反応させて細胞をペトリディッシュから細胞を剥がし、低速遠心機(120g x 5min)で遠心後、沈

殿した細胞を細胞継代用培地で 5～10 倍に希釈後、10ml の細胞継代用培地に懸濁して細胞培養用ペトリディッシュ(Falcon 353003)に播種後、37°C 5% CO² インキュベーターで培養する。

- SFA 法でアッセイ時には、PBS(-)で1回洗浄後、1x トリプシン溶液を用いて細胞をペトリディッシュから細胞を剥がし、低速遠心機(120g x 5min)で遠心後、5ml のアッセイ用培地 (D-MEM 5%ウシ血清培地[100units/ml ペニシリンのみ含有]) の培地に懸濁する。一部 (30μl) をサンプリングチューブに移し、等量の 0.025%トリパンプルー溶液を加えてピペッティング後、血球計測板で透明(青色に染色されていない)の細胞をカウントし、細胞数を測定する。

細胞懸濁液 1ml 当たりの細胞数は以下の計算式で求める:

計測板の 5 視野を測定し、 $\text{平均値} \times 2 (\text{トリパンプルー溶液で希釈した分}) \times 10^4$ 個

2-3. 2-4. Simple fibroblast assay (SFA)

(注:Maestro-Z, AXION の HP を参照、adherent cell lines protocol,

<https://www.axionbiosystems.com/resources/culture-protocol/adherent-cell-lines-protocol>)

- CyroView-Z プレート内に 100μl のフィブロネクチン溶液 (1μg/ml in PBS(-)) を添加し、室温で 1 時間静置してプレコーティングを行う。
- フィブロネクチン溶液を 12 連 (もしくは 8 連) マルチピペットで吸い出し、100μl の D-MEM 培地 (PBS なし、ペニシリン含有でも OK) をプレートに加える。
- 8ml の滅菌蒸留水もしくは PBS(-) をプレート内のリザーバー (プレートの両縁) に加える (蒸発を避けるため)
- Maestro-Z の Dock (インキュベーター装置) にプレートを設置し、Maestro-Z 制御のアプリケーション (AXION) を Maestro-Z に接続された PC で立ち上げ、Experiment (CyroView-Z プレート毎にバーコード登録された番号が自動的に Maestro-Z の Dock にプレートをセットすると認識される) を確認し、アプリケーションの MO (media only) baseline を測定のコマンドをクリックする。(測定のバーが表示される。測定が終わると自動的に消える)。
- アプリケーションに Experiment 情報 (日付や各プレート内の情報を入力する。(測定後でも変更可能))
- プレートを Dock から取り出す。
- 培地を 12 連 (もしくは 8 連) マルチピペットで吸い出し、100μl の MRC-5 細胞 (1x10⁴ cells/well in D-MEM 10% FBS with penicillin G) をプレートに加える。
- 1～2 時間 CO₂ インキュベーターで培養後する。
- 終濃度の 4 倍濃度の比較用の抗菌薬 (リファンピシン、エリスロマイシン) と終濃度の 4 倍濃度の

被検体 50 μ lをプレートに加える。通常各濃度 2 穴を使った duplicate で行う。

注意: 必ず菌なし・抗菌剤なし(陰性コントロール)と菌あり・抗菌剤なし(陽性コントロール)の2つのコントロールを置く。

- 1 時間 CO2 インキュベーターで培養後する。
- 4x10⁶ CFU/ml の菌を含む D-MEM 10% FBS with penicillin G 培地に 50 μ l 加える。
- Maestro-Z の Dock にプレートをセットし、測定を開始する。測定は自動的にスタートする。
- 複数のプレートがある場合は、MO baseline の測定、菌液を加えたあとのプレートの測定は、適宜プレートを Dock に入れ替えて測定する。プレートの判別はプレートに記載されたバーコードで自動的に Maestro-Z が行う。各プレートの測定も測定機器の Dock にプレートがセットされると自動的に開始される。

2.4 Both dilution test (BDT) 法

- 培養した菌液を滅菌した中試験管に 3~4ml 移し、デジタル比色計(干渉フィルター530nm)で濁度を測定する。
- 菌液を MiddleBrook 7H9 10% ADC 0.05% Tween 80 で O.D.530nm が 0.1 になるように希釈する。
- 希釈した菌液をさらに MiddleBrook 7H9 10% ADC 0.05% Tween 80 で 10 倍に希釈する。
- 終濃度の 2 倍濃度の比較用の抗菌薬(リファンピシン、エリスロマイシン)と終濃度の 2 倍濃度の被検体 100 μ lをアッセイ用の 96 穴組織培養プレート(Falcon 353075)に加える。通常各濃度 2 穴を使った duplicate で行う。

注意: 必ず菌なし・抗菌剤なし(陰性コントロール)と菌あり・抗菌剤なし(陽性コントロール)の2つのコントロールを置く。

(抗菌薬と被検化合物配置例)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.25	0.125	0.0625	0.0313	0.016	0.008	0.004	0.002	菌のみ	菌なし
B	RFP (μ g/ml)									
C	1	1	7	7	13	13	19	19	25	25
D	2	2	8	8	14	14	20	20	26	26
E	3	3	9	9	15	15	21	21	27	27
F	4	4	10	10	16	16	22	22	28	28
G	5	5	11	11	17	17	23	23	29	29
H	6	6	12	12	18	18	24	24	30	30

(抗菌活性判定例)

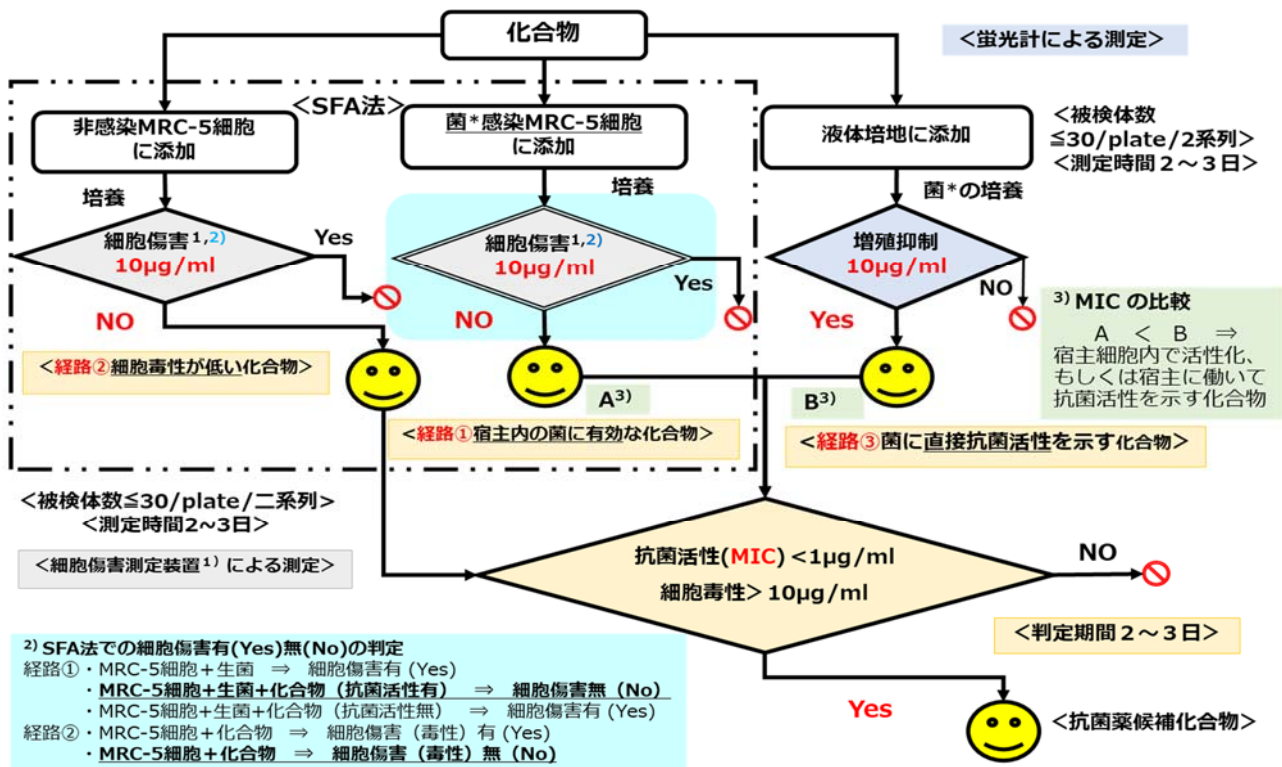
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
B	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
D	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
E	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
F	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
G	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
H	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+

+: 菌の増殖あり、-: 菌の増殖なし

- ・前のステップで希釈した菌液を 100μl 加える。
- ・蒸発を防ぐためにタッパー(例えば 870ml Millon Pack を使用した場合 3 枚のプレートが収まる)にプレートを収める。
- ・孵卵器(*M. tuberculosis* の場合は BSL-3 に設置された孵卵器)、*M. avium* の場合は BSL-2 に設置された孵卵器)に静置し、37°Cで培養する。
- ・3 日、7 日、14 日後、チェックミラー(トッケン)にて目視で白濁したウェルを観察する。増殖が悪い場合は 10 日目や 21 日後に観察する場合もある。

3. 評価法

3-1.概要図



3-2. SFA 法による抗菌活性(1 次スクリーニング)

- ・被験化合物の最終濃度は 10 μ g/ml とする。
- ・経路①では宿主細胞内菌に抗菌活性を持つ化合物の抗菌活性を評価する。

MRC-5 細胞 + 生菌 \Rightarrow 細胞傷害有 (Yes)

MRC-5 細胞 + 生菌 + 化合物 (抗菌活性有) \Rightarrow 細胞傷害無 (No)

細胞傷害活性が無い化合物を 2 次スクリーニング (MIC 測定に進める)

- ・Time killing 効果については、24 時間目から 72 時間まで抗菌活性が持続している化合物を活性ありと判定する。

3-3. SFA 法による細胞毒性

- ・被験化合物の濃度は 10 μ g/ml とする。
- ・経路②では化合物の細胞毒性を評価する。

MRC-5 細胞 + 化合物 \Rightarrow 細胞傷害 (毒性) 有 (Yes)

MRC-5 細胞 + 化合物 \Rightarrow 細胞傷害 (毒性) 無 (No)

細胞毒性が無い化合物を 2 次スクリーニング (MIC 測定に進める)

3-4. BDT 法による抗菌活性(1 次スクリーニング)

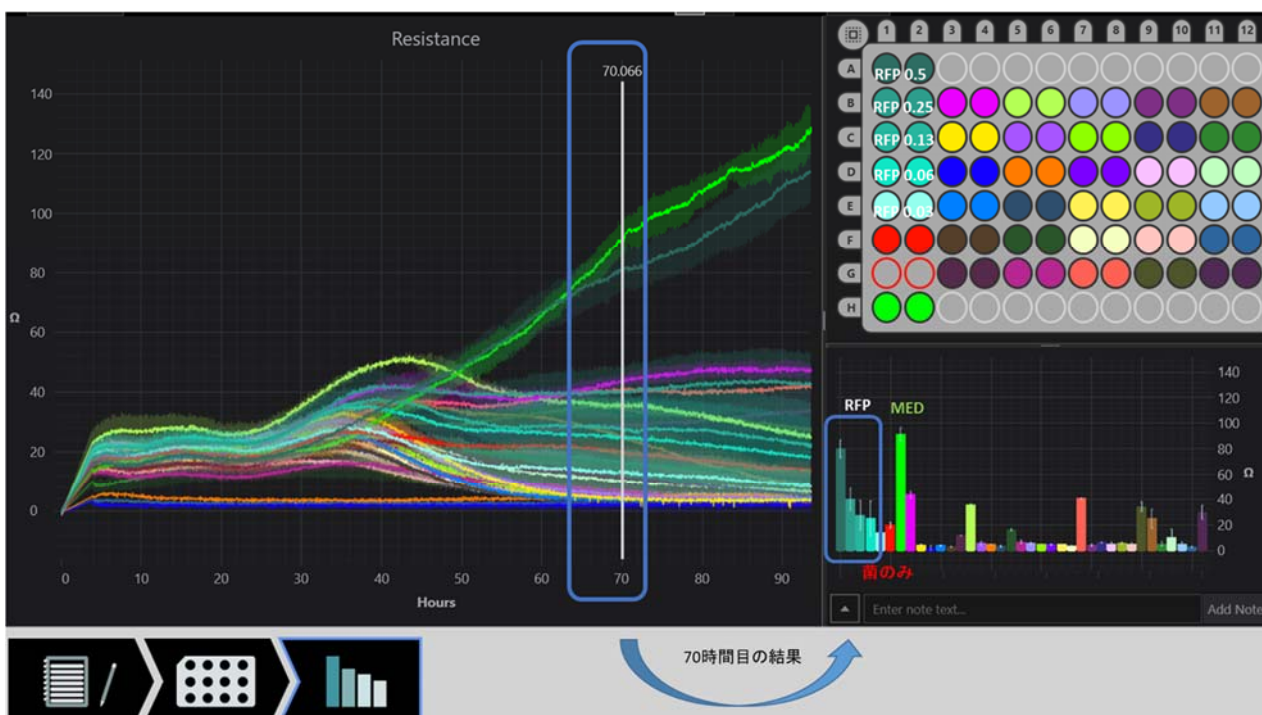
- ・被験化合物の濃度は 10 μ g/ml とする。
- ・*M. tuberculosis* の場合は 2 週間目を評価時点とする。
- ・*M. avium* の場合は 1 週間目を評価時点とする。
- ・Time killing 効果については、3 日目、7 日目、(10 日目)、14 日目、21 日目時点の抗菌活性を測定し、*M. tuberculosis* の場合は 14 日、*M. avium* の場合は 7 日目以降も抗菌活性持続している化合物について効果ありと判定する。

3-5. MIC 測定(2次スクリーニング)

・MIC 測定を実施し、MIC が $1 \mu\text{g/ml}$ を下回る化合物を候補とする。

※但し、BDT 法で直接抗菌活性が見られない化合物(宿主に作用作用して抗菌活性を示す化合物)も hit 化合物とするかは研究開発者の判断による。

4. 評価例

リアルタイム細胞傷害活性測定装置
(Maestro Z)での測定例

例として、70 時間目の結果、リファンピシン $0.25 \mu\text{g/ml}$ と同等の場合を強陽性、 $0.6 \sim 0.13 \mu\text{g/ml}$ を陽性をとした。

・BDT 法と SFA 法での MIC (最小増殖阻止濃度) の比較 (文献2, 文献3から)

Reagents		MIC (μ g/ml)		fold (b)/(a)
		BDT (a)	SFA (b)	
Antibiotics				
Isoniazid	(INH)	0.107	0.428	4
Streptomycin	(STR)	0.227	1.816	8
Rifampicin	(RIF)	0.026	0.013	1/2
Ethambutol	(EMB)	1.733	3.465	2
Pyrazinamide ^(c,d)	(PZA)	>1,231 (pH 6.6) 492 (pH 5.8)	3.847	1/128

- 液体培地(Middlebrook 7H9 10%ADC)を用いて 3 週間培養後、目視で濁度判定
- SFA 法で 3 日間培養後、宿主細胞をクリスタルバイオレットで染色、プレートリーダーで測定し、生存率を計算
- 中性もしくは酸性の液体培地を用いて 3 週間後、目視で濁度判定
- PZase activity, acid ager test と比較して、SFA 法は一致率:95.9%、感度:96.4%、特異度:95.2%

5. 参考文献等

- Takii T, Abe C, Tamura A, Ramayah S, Belisle JT, Brennan PJ, Onozaki K.
Interleukin-1 or tumor necrosis factor-alpha augmented the cytotoxic effect of mycobacteria on human fibroblasts: application to evaluation of pathogenesis of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium* complex
J Interferon Cytokine Res. **21**(3):187-96 (2001)
- Takii T, Yamamoto Y, Chiba T, Abe C, Belisle JT, Brennan PJ, Onozaki K.
Simple fibroblast-based assay for screening of new antimicrobial drugs against *Mycobacterium tuberculosis*
Antimicrob Agents Chemother. **46**(8):2533-9 (2002)
- Takii T, Hamasaki S, Hirano K, Abe C, Onozaki K.
Simple fibroblast-based assay to test the pyrazinamide susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*
Antimicrob Agents Chemother. **49**(2):804-7 (2005)
- Rybniker J, Chen JM, Sala C, Hartkoorn RC, Vocat A, Benjak A, Boy-Röttger S, Zhang M, Székely R, Greff Z, Orfi L, Szabadkai I, Pató J, Kéri G, Cole ST.

Anticytolytic screen identifies inhibitors of mycobacterial virulence protein secretion

Cell Host Microbe. **16**(4):538-48 (2014)

5) Rybniker J, Vocat A, Sala C, Busso P, Pojer F, Benjak A, Cole ST.

Lansoprazole is an antituberculous prodrug targeting cytochrome bc1

Nat Commun. **6**:7659.(2015)

6) Maestro-Z, AXION、adherent cell lines protocol,

<https://www.axionbiosystems.com/resources/culture-protocol/adherent-cell-lines-protocol>

6. 謝辞

本 SOP 作製にかかる薬剤耐性結核および非結核性抗酸菌治療薬開発を加速する支援技術の開発にあたり、新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業(JP21fk0108590)によりご支援を頂きました日本医療研究開発機構(Japan Agency for Medical Research and Development, AMED)に深く感謝申し上げます。