

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K15721

研究課題名（和文）難治性致死性疾患である亜急性硬化性全脳炎への治療法開発のための基礎的研究

研究課題名（英文）Basic research for the development of a treatment for subacute sclerosing panencephalitis

研究代表者

前田 創（Maeda, Hajime）

福島県立医科大学・公私立大学の部局等・助教

研究者番号：90746059

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：亜急性硬化性全脳炎（SSPE）は難治性遅発性疾患でリバビリン脳室内投与が行われているが、臨床効果は十分ではない。ファビピラビルは、RNAウイルスに広く活性があり、高い抗ウイルス活性があると報告されている。本研究では、*in vitro*においてファビピラビルとリバビリンの50%効果濃度（EC50）は、麻疹ウイルス実験室株（Edmonston株）では、108.7 $\mu$ M、172.3 $\mu$ M、SSPEウイルス臨床分離株（SSPE Yamagata-1株）では、38.6 $\mu$ M、38.1 $\mu$ Mであり、ファビピラビルの50%細胞障害濃度（CC50）は、野生株で>1000 $\mu$ M、変異株で>1000 $\mu$ Mであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

亜急性硬化性全脳炎（SSPE）は、麻疹ウイルス変異株（SSPEウイルス）の持続感染による遅発性ウイルス感染症である。発展途上国では麻疹の流行が続いており、日本を含む先進国では散発的な麻疹の症例が報告されている。本研究は、*in vitro*において、ファビピラビルは、麻疹ウイルスとSSPEウイルスにリバビリンと同等のウイルス増殖阻害効果を認め、高濃度においても細胞毒性がないことを確認した。本研究は、ファビピラビルが血液脳関門を通過し、脳脊髄液で十分な血中濃度を維持できるかという課題はあるが、ファビピラビルがSSPEの新規の治療薬になる可能性があり大変意義のある研究と考える。

研究成果の概要（英文）：Subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) is a late-onset and intractable disease. Ribavirin is administered intracerebroventricularly to patients with SSPE. However, its therapeutic efficacy is insufficient. Favipiravir demonstrates anti-viral effects against RNA viruses. In this study, the antiviral effect of favipiravir against measles virus (Edmonston strain) and SSPE virus (Yamagata-1 strain) was examined *in vitro*. The 50% effective concentration (EC50) of favipiravir against Edmonston and Yamagata-1 strains were 108.7  $\mu$ M and 38.6  $\mu$ M, respectively, which were similar to those of ribavirin. The 50% cytotoxic concentration (CC50) of favipiravir against Edmonston and Yamagata-1 strains were >1,000  $\mu$ M and >1,000  $\mu$ M, respectively.

研究分野：Neonatology

キーワード：亜急性硬化性全脳炎 麻疹ウイルス ファビピラビル

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) は、難治性致死性疾患で、麻疹罹患後およそ 2-10 年の潜伏期間の後に発症し、いったん発症後は進行性に増悪して死に至る、麻疹ウイルス変異株 (SSPE ウイルス) による遅発性ウイルス感染症である。申請者の所属する研究室から、リバビリンを脳室内に投与することにより、髄液中リバビリン濃度がウイルスの増殖を完全に抑制する濃度 (50-200  $\mu\text{g/mL}$ ) に達し、重篤な副反応はなく、少数例における臨床の有効性を報告した (Hosoya et al. Antimicrob Agents Chemother, 2004)。当施設は、研究的な治療として IFN- およびリバビリンの脳室内持続投与を実施している唯一の施設である。しかし、リバビリンの臨床効果は十分とは言えず、更に有効な治療法の確立が望まれている。われわれは、これまで免疫不全マウスであるヌードマウスを用いて SSPE モデルマウスを作成し、様々な化合物の抗 SSPE 効果を検討してきた (Abe et al. J Virol, 2013 & Watanabe et al. PloS One, 2016)。当施設は、SSPE モデルマウスを用いた実験ができる国内唯一の施設であり、SSPE モデルマウスを用いて SSPE に対しさらに安全で有効な治療法を確立したいと考える。

ファビピラビルは、本邦で開発された RNA ポリメラーゼ阻害薬に分類される抗インフルエンザ薬である。ファビピラビルは細胞内でリン酸化を受けて、mRNA が合成される伸長反応の過程で核酸アナログとして取り込まれ、伸長反応を停止することで mRNA 転写過程を阻害する (Sangawa et al. Antimicrob Agents Chemother, 2013 & Furuta et al. Antiviral Res, 2009)。ファビピラビルは、インフルエンザのみならず他の RNA ウイルスでもその効果が報告されている (Tani et al. mSphere, 2016 & Bai et al. Clin Infect Dis, 2016)。麻疹ウイルスはパラミキソウイルス科に属する RNA ウイルスであり、ファビピラビルに SSPE ウイルス増殖抑制効果が期待できる。ファビピラビルは既に本邦において認可された医薬品であり、SSPE に対する新規の治療薬となりうる。

### 2. 研究の目的

SSPE の発生頻度は、自然麻疹罹患患者 100 万人あたり 10 人程度とされている。麻疹予防接種の普及により SSPE 患者数は減少しているが、近年においても年間数人の発症がある。ワクチン接種後に発症したと考えられる SSPE 症例も存在することから、今後も発症は続くと考えられている。当施設は、研究的な治療方法として IFN- およびリバビリンの脳室内持続投与を実施している唯一の施設であり、また SSPE モデルマウスを用いて抗 SSPE 薬を評価できる唯一の施設でもある。本研究では、SSPE モデルマウスを用いてファビピラビルの効果を評価し、SSPE に対する安全で有効な治療法を確立することを目的とする。本研究により、臨床使用が可能なファビピラビルの SSPE に対する効果が証明されれば、SSPE に対する新たな治療薬になる可能性がある。

### 3. 研究の方法

SSPE 感染細胞培養、SSPE 感染致死マウスモデルを用いて、ファビピラビルのウイルス増殖阻害効果を判定する。同様の手法を用いて、臨床利用されているリバビリンと生存率を比較し、ファビピラビルの有効濃度を測定する。また、IFN- を併用し、SSPE に対するウイルス増殖阻害効果を評価する。

#### ・SSPE 致死マウスモデルでの評価

4 週齢のメスのヌードマウスを用い、イソフルランで全身麻酔下に 27G の二段針を用いて大脳半球に SSPE ウイルスを脳内接種する。コントロールとして、培養液を用いる。接種する SSPE ウイルス量は、30  $\mu\text{L}$  のウイルス溶解液で、10000, 1000, 500, 200 PFU/30  $\mu\text{L}$  として 100%致死量を決定する。倫理的エンドポイントは最大体重の 20%減少と定義する。

#### ・SSPE 致死マウスモデルにおけるファビピラビルのウイルス増殖阻害効果の判定

同様にイソフルランで全身麻酔下に 27G の二段針を用いて大脳半球に 100%致死量の SSPE ウイルスを脳内接種する。ファビピラビル投与量を 0, 30, 300mg/kg/day とし、各群 n=10 の群に分けて実験する。SSPE 接種 1 時間後にファビピラビルを脳内接種し、5 日間投与し、ウイルス増殖阻害効果を判定する。倫理的エンドポイントに達したマウスの脳を採取し、培地とともにホモジェナイザで脳をホモジェナイズする。ホモジェナイズした脳懸濁液をブランクアッセイ、real-time PCR によりウイルス量を測定し、液体高速クロマトグラフィー (HPLC) によりファビピラビルの脳組織内濃度を測定する。なお、PCR のプライマーとプロベは、麻疹ウイルス株 (Edmonston strain) の N 遺伝子から設計した (Abe et al. J Virol, 2013)。PCR 増幅は、Quant studio 6<sup>®</sup>を用いて行い、HPLC は LaChrom Elite を用いて測定する。また、採取した脳の組織標本を作製し、病理組織学的検索も行う。

リバビリンあるいは IFN- を併用した場合の生存率の比較を行う。

#### ・SSPE 感染細胞培養におけるリバビリンおよびファビピラビルと IFN- 併用のウイルス増殖阻害効果の比較

段階希釈した薬剤と麻疹ウイルス野生株 (Edmonston 株) と変異株 (SSPE Yamagata-1 株) を Vero

細胞に接種し、プラークアッセイによりウイルス増殖阻害効果を判定する。また、WST-1 法により薬剤の細胞毒性の判定も行う。

・SSPE 致死マウスモデルにおけるリバビリンおよびファビピラビルと IFN- 併用のウイルス増殖阻害効果の比較

ファビピラビル単独と同様の手法で、SSPE 致死マウスモデルにリバビリンおよびファビピラビルと IFN- を脳内接種し、ウイルス増殖阻害効果を判定する。

4 . 研究成果

in vitro においてファビピラビルとリバビリンの 50%効果濃度 (EC<sub>50</sub>) はそれぞれ、麻疹ウイルス実験室株 (Edmonston 株) では、108.7 μM、172.3 μM、SSPE ウイルス臨床分離株 (SSPE Yamagata-1 株) では、38.6 μM、38.1 μM であり、ファビピラビルの 50%細胞障害濃度 (CC<sub>50</sub>) は、野生株で >1000 μM、変異株で >1000 μM であった。in vitro において、ファビピラビルは、麻疹ウイルスと SSPE ウイルスにリバビリンと同等のウイルス増殖阻害効果を認め、高濃度においても細胞毒性がないことを確認した。

	野生株 (Edmonston 株)			変異株 (SSPE Yamagata-1 株)		
	EC <sub>50</sub>	CC <sub>50</sub>	SI	EC <sub>50</sub>	CC <sub>50</sub>	SI
ファビピラビル	108.7 μM	>1000 μM	>9.1	38.6 μM	>1000 μM	>25.9
リバビリン	172.3 μM	>1000 μM	>5.8	38.1 μM	>1000 μM	>26.2
IFN-α	69.7 IU/mL	>100,000 IU/mL	>1,434.7	64.9 μM	>100,000 IU/mL	>1,540.8

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hashimoto K, Maeda H, Miyazaki K, Watanabe M, Norito S, Maeda R, Kume Y, Ono T, Chishiki M, Suyama K, Sato M, Hosoya M.	4. 巻 74
2. 論文標題 Antiviral Effect of Favipiravir (T-705) against Measles and Subacute Sclerosing Panencephalitis Viruses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Jpn J Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 154-156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7883/yoken.JJID.2020.481	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------