

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591591

研究課題名(和文) アシクロビル治療抵抗性新生児ヘルペスと薬剤耐性ウイルスに対する治療に関する研究

研究課題名(英文) Study on the therapeutic strategy for acyclovir-resistant HSV-1 infections in neonate

研究代表者

西條 政幸 (SAIJO, MASAYUKI)

国立感染症研究所・その他部局等・その他

研究者番号：50300926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、世界で初めてウイルス学的に証明されたアシクロビル耐性HSV-1による新生児脳炎患者の報告をした。DNApol関連ACV耐性HSV-1の性状を解析し、多くの耐性株は神経病原性が低下しているものが多いものの、中には病原性が維持されているウイルスも存在する。また、DNApol関連ACV耐性HSV-1のほとんどがガンシクロビルに感受性を有し、逆にフォスカルネットには交叉耐性を示すことが明らかになった。ACV耐性HSV感染症の増加等が予想されることから、今後、病原ウイルスの薬剤感受性を調べる耐性の構築と、その結果に基づく適切な治療ができるようにする必要がある。

研究成果の概要(英文)：The neonatal herpes with encephalitis, which was resistance to acyclovir (ACV) therapy, was virologically confirmed to be caused by ACV-resistant herpes simplex virus type 1 (HSV-1) in this study for the first time. DNA polymerase-associated ACV-resistant HSV-1 was generated by selection of the HSV-1 with S2242. Most of the viruses were sensitive or hypersensitive to ganciclovir, while they were cross-resistant to foscarnet. In recent years, the number of patients with immunodeficiency including those who received organ transplantation, suggesting that drug-resistant HSV-1 infections might become a great concern. The diagnostic system including the sensitivity assay and effective therapeutic strategies should be prepared in advance.

研究分野：ウイルス感染症，小児科学，感染症学

キーワード：新生児ヘルペス ヘルペス脳炎 薬剤耐性 単純ヘルペスウイルス1型 アシクロビル

### 1. 研究開始当初の背景

骨髄移植医療の発達や HIV 感染症患者の増加などにより免疫不全状態にある患者が増加している。このような状態にある患者においては、単純ヘルペスウイルスや水痘・帯状疱疹ウイルスによる感染症は重篤なものとなり、治療に難渋し、時に致死的である。免疫不全患者の増加に伴い、小児を含めてアシクロビル等の薬剤耐性単純ヘルペスウイルス感染症の増加する傾向が認められ、迅速かつ効果的な治療法選択の戦略が求められる。しかし、現在の日本では、単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) などのウイルスの抗ウイルス薬に対する感受性試験が実施できる施設は限られ、ウイルス学的検査結果に基づいて適切に治療がなされているとは言えない状況にある。

### 2. 研究の目的

重症難治性ヘルペスウイルス感染症の病態の一端を明らかにする目的で、1) 治療に難渋した新生児ヘルペス患者の治療前および治療後に得られた HSV-1 の vTK 遺伝子を用いて、ACV 耐性 HSV-1 による新生児ヘルペス (脳炎を併発) 感染症であるか否かについて解析する、2) ヒトにおける DNAPol 関連 ACV 耐性 HSV-1 の性状解析と、潜伏感染や再活性化の機序をウイルス学的に解析し、診断、治療、予防に関する新知見の確立と治療ストラテジー構築する、ことを目的とした。

### 3. 研究の方法

1) ACV 治療に抵抗性を示したヘルペス脳炎患者における病原 HSV-1 の薬剤感受性に関する研究

ACV による治療に抵抗性を示したヘルペス脳炎を伴う新生児ヘルペス患者の CSF から vTK 遺伝子を増幅するのに成功した。その組換え vTK 蛋白質を 293 細胞に発現させ、その細胞における vTK 欠損高度 ACV 耐性 HSV-1 に対する ACV の増殖抑制効果を評価する方法で、ACV リン酸化能を間接的に測定した (Shiota T, et al. Antiviral Res, 2011)。

同様に ACV 耐性 HSV-1 による脳炎として報告された論文 (Ann Neurol;67:830, 2010) で報告されている vTK (41 番目アルギニンのヒスチジンへの変異) が ACV 耐性を誘導するか否かについて解析した。

2) 人工的に作製された DNAPol 関連 ACV 耐性 HSV-1 の性状解析に関する研究

DNA ポリメラーゼ (DNAPol) に変異を有し、それが ACV 耐性を誘導することが確かめられている HSV-1 株を、S2242 含有培地を用いて HSV-1 を増殖させることにより作製し、それらのマウスにおける神経毒性、DNAPol におけるアミノ酸変異の性質、ACV 以外の薬剤に対する感受性等を調べた。

3) 造血幹細胞移植患者から分離された ACV 耐性 HSV-1 の耐性獲得機序と治療戦略に関する研究

造血幹細胞移植患者から分離された ACV 耐性 HSV-1 の性状を解析し、その結果から診断・治療戦略を考察した。

### 4. 研究成果

1) ACV 治療に抵抗性を示したヘルペス脳炎患者における病原 HSV-1 の薬剤感受性に関する研究

a) ACV による治療に抵抗性を示したヘルペス脳炎を伴う新生児ヘルペス患者の CSF から vTK 遺伝子を増幅するのに成功し、375 番目の塩基が G から T に、125 番目のアミノ酸が Q から H に変異していることが明らかとなった。その変異 vTK の組換え蛋白質を 293T 細胞に発現させ、ACV のリン酸化能を間接的に測定したところ、その活性が低下していることを証明した (図 1)。この患者が ACV 耐性 HSV-1 による脳炎を発症していたことが世界で初めて証明された。

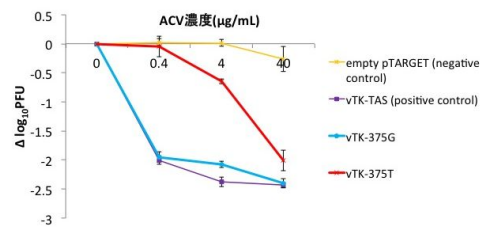


図 1. ACV 感受性 HSV-1 TAS 株の vTK 発現 293T 細胞細胞においては、vTK 欠損 ACV 高度耐性 HSV-1 TAR 株の増殖は抑制され、コントロールではほとんど抑制されないのに対し、当該患者の脳脊髄液に認められた vTK 遺伝子を有する組換え vTK 発現細胞では、抑制効果が低減されている。

b) ACV 耐性 HSV-1 による脳炎として報告された論文 (Ann Neurol;67:830, 2010) で報告されている vTK が ACV 耐性を誘導するか否かの検討

ACV 耐性 HSV-1 による脳炎として報告された論文 (Ann Neurol;67:830, 2010) で報告されている vTK (41 番目アルギニンのヒスチジンへの変異) が ACV 耐性を誘導しないことが明らかにされた。つまり、治療抵抗性が、薬剤耐性ウイルスによる感染症ではないことを示している (図 2)

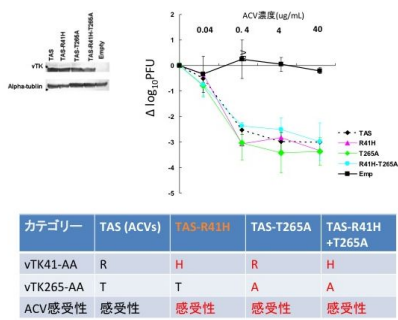


図 2 .41 番目アルギニンのヒスチジンへの変異を挿入させた vTK 発現 293T 細胞における ACV の vTK 欠損 ACV 高度耐性 HSV-1 TAR 株の増殖抑制効果は、ACV 感受性 HSV-1 TAS 株の vTK 発現 293T 細胞細胞における増殖抑制効果と同等であり、当該アミノ酸変異は ACV 耐性を誘導しないことが明らかにされた。

2) 人工的に作製された DNAPol 関連 ACV 耐性 HSV-1 の性状解析に関する研究

DNAPol に変異を有し、それが ACV 耐性を誘導することが確かめられている HSV-1 株を、S2242 含有培地を用いて HSV-1 を増殖させることにより作製し、それらのマウスにおける神経毒性、DNAPol におけるアミノ酸変異の性質、ACV 以外の薬剤に対する感受性等を調べ、以下の成績を得た。DNAPol 変異による ACV 耐性 HSV-1 感染症において、1) アミノ酸変異は保存領域に多く認められる、2) ACV に交差耐性を示すだけでなく、フォスカルネットにも耐性を示すが、ガンシクロビル(GCV)には高度感受性を示すことが多い、3)ACV 治療に抵抗性を示すが、GCV による治療が効果的である、等であった(図 3)。

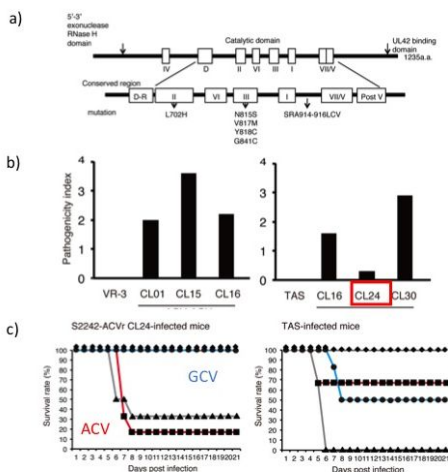


図 3 .a)抗ウイルス薬 S2242 による選択で得られた DNAPol 関連 ACV 耐性株の DNAPol におけるアミノ酸変異部位。補損領域に変異が認められることが多い。b) DNAPol 関連 ACV 耐性株 HSV-1 の 6 株の中で、神経病原性が低下していない株 (CL24) が認められ

た。c)その CL24 による感染症の ACV による治療は無効であったが、ガンシクロビル (GCV) による治療は効果が認められた。

3) 薬剤 (ACV) 耐性 HSV-1 の耐性獲得機序と治療戦略に関する研究

これまでの報告では ACV 耐性 HSV-1 の約 95% は vTK 関連耐性株で、残る 5% が DNA ポリメラーゼ関連 HSV-1 であるとされている。しかし、現実には DNA ポリメラーゼ関連 HSV-1 が免疫不全患者において比較的高い割合で出現している可能性が示唆された。また、そのため ACV 耐性 HSV-1 感染症に対する治療において感受性検査と抗ウイルス薬の選択において緻密な選択戦略が必要であると考える。

vTK 関連 ACV 耐性 HSV-1 感染症の場合には Foscarnet やシドフォビルが用いられることになるが、比較的副作用が強い。DNAPol 関連 ACV 耐性 HSV-1 感染症の場合には、すべてガンシクロビルに感受性が高度感受性を示していることから、その場合にはガンシクロビルを用いることも選択しのひとつである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

- 1) Kakiuchi S, Nonoyama S, Wakamatsu H, Kogawa K, Wang LX, Kinoshita-Yamaguchi H, Takayama-Ito M, Lim CK, Inoue N, Mizuguchi M, Igarashi T, Saijo M. Neonatal herpes encephalitis caused by virologically confirmed acyclovir resistant herpes simplex virus type 1. *Journal of Clinical Microbiology* 51(1):356-359, 2013
- 2) Wang LX, Takayama-Ito M, Kinoshita-Yamaguchi H, Kakiuchi S, Suzutani T, Nakamichi K, Lim CK, Kurane I, Saijo M. Characterization of DNA polymerase-associated acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1: mutations, sensitivity to antiviral compounds, neurovirulence, and in-vivo sensitivity to treatment. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 66(5):404-410, 2013 (<http://dx.doi.org/10.7883/yoken.66.404>)
- 3) Nakamichi K, Inoue N, Shimokawa T, Kurane I, Lim CK, Saijo M. Detection of human herpesviruses in the cerebrospinal fluid from patients diagnosed with or without suspected of having progressive multifocal leukoencephalopathy. *BMC Neurology* 13:200, 2013 (doi: 10.1186/1471-2377-13-200)
- 4) 西條政幸. アシクロビル耐性単純ヘルペスウイルスによる脳炎の診断と治療戦略. 臨

〔学会発表〕(計 8 件)

- 1) Masayuki Saijo, Satsuki Kakiuchi. Drug-resistant herpes simplex virus type 1 infections in children. The 9th Japan-China International Conference of Virology. Sapporo, June 2012
- 2) 西條政幸. 神経ウイルス感染症の遺伝子診断とその応用. 第 17 回日本神経感染症学会総会・学術集会, 京都, 2012 年 10 月
- 3) 佐藤正明, 垣内五月, 木下(山口)一美, 伊藤(高山)睦代, 林昌宏, 西條政幸. アシクロビル耐性ヘルペスウイルス脳炎症例報告から同定された単純ヘルペスウイルス 1 型のチミジンキナーゼ 41 番目アミノ酸変異はアシクロビル耐性を誘導しない. 第 23 回抗ウイルス療法研究会総会, 東京, 2013 年 6 月 13-14 日
- 4) 垣内五月, 王麗欣, 伊藤(高山)睦代, 林昌宏, 西村秀一, 辻正徳, 谷口修一, 水口雅, 岡明, 西條政幸. 造血幹細胞移植におけるアシクロビル耐性単純ヘルペスウイルス 1 型感染症の臨床的意義に関する研究. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013 年 11 月 10-12 日
- 5) 佐藤正明, 垣内五月, 木下(山口)一美, 伊藤(高山)睦代, 林昌宏, 西條政幸. ウイルス分離が不可能なヘルペス脳炎病原ウイルスの薬剤感受性試験法の開発と臨床応用. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013 年 11 月 10-12 日
- 6) 西條政幸. アシクロビル耐性単純ヘルペスウイルスによる脳炎の診断と治療戦略. 第 55 回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014 年 5 月 21-24 日
- 7) Masayuki Saijo, Satsuki Kakiuchi, Masanori Tsuji, Hidekazu Nishimura, Mutsuyo Ito-Takayama, Madoka Horiya, Yukie Yamaguchi, Shuichi Taniguchi, Masashi Mizuguchi, Akira Oka, Chang-Kweng Lim. Acyclovir-resistant herpes simplex virus 1 shedding and the mortality in the hematopoietic stem cell transplantation patients. 39th Annual International Herpesvirus Workshop, Kobe city, Japan, 19-23 July, 2014
- 8) Satsuki Kakiuchi, Masanori Tsuji, Hidekazu Nishimura, Mutsuyo Ito-Takayama, Chang-Kweng Lim, Madoka Horiya, Yukie Yamaguchi, Shuichi Taniguchi, Masashi Mizuguchi, Akira Oka, Masayuki Saijo. Association of acyclovir-resistant herpes simplex virus 1 emergence with their outcome in hematopoietic stem cell transplantation patients. International Union of Microbiological

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
○出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者 (西條 政幸)

研究者番号: 50300926

(2)研究分担者 ( )

研究者番号:

(3)連携研究者 ( )

研究者番号: