

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592686

研究課題名(和文) アデノウイルス眼感染症の新しい薬物治療の探求と臨床実用化に関する研究

研究課題名(英文) Evaluation of new medical treatment and its clinical development for adenoviral ocular infectious diseases

研究代表者

内尾 英一 (UCHIO, Eiichi)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：70232840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：結膜炎をヒトに生じる型に対して、ガンシクロピルの有効性を検討した。A549細胞の培養系とアデノウイルス3, 4, 8, 19aおよび37型を用いた。さまざまな濃度に希釈したガンシクロピルをアデノウイルスに24時間作用させた。7日間培養後に定量PCR法でアデノウイルスDNAを測定した。細胞毒性はCC50, 抗ウイルス作用はEC50によって評価した。ガンシクロピルのCC50は平均で212 microg/mlであり, EC50は2.64～5.10 microg/mlであった。有意な抑制作用はすべての型にみられた。今後ガンシクロピルがアデノウイルス眼感染症の治療薬として使用する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Effectiveness of ganciclovir against adenovirus types inducing conjunctivitis in humans were evaluated. Incubation system with A549 cells and adenovirus types 3, 4, 8, 19a and 37 were used. Adenovirus was treated with various concentrations of ganciclovir for 24 hours. After seven days' incubation, adenovirus DNA was measured by real time PCR method. CC50 (50% cytotoxicity concentration) and EC50 (50% effective concentration) was used for evaluation. Average CC50 of ganciclovir was 212 microg/ml and EC50 ranged between 2.64 and 5.10 microg/ml. Significant inhibitory effect was observed in all types studied. These results indicate that ganciclovir may be a candidate of treatment measure for adenoviral ocular diseases.

研究分野：眼科学

キーワード：アデノウイルス 抗ウイルス薬 結膜炎 感染症 薬物治療

1. 研究開始当初の背景

アデノウイルスによる感染症は呼吸器領域の上気道炎とともに眼科領域における流行性角結膜炎 (epidemic keratoconjunctivitis) 及び咽頭結膜熱 (pharyngoconjunctival fever) などのウイルス性結膜炎があり、わが国は他の近隣アジア諸国とともにアデノウイルス結膜炎の発症数が世界的にも多い地域である。わが国では、感染症サーベイランスのデータから患者数が毎年 100 万人前後にのぼっていることがわかっている。臨床的には、免疫抑制状態においてアデノウイルスによって播種性感染症や急性出血性膀胱炎を発症すると、致命的な経過をたどることもある。しかし現在までアデノウイルスに対する特異的な抗ウイルス治療薬は十分に確立されていない。そこで、本研究では抗アデノウイルス薬の臨床応用を目指して、抗アデノウイルス作用を持つ薬物の探索、アデノウイルス感染動物モデルの確立のための基礎研究、新型アデノウイルスへの作用の解析などを総合的に行っていくことを計画した。

2. 研究の目的

私と協力研究者はこれまで、アデノウイルス治療薬の開発のために、可能性のある薬物についての *in vitro* の増殖抑制作用の先行的な基礎研究を行い、いくつかの薬剤の可能性を明らかにした。それらは既存の抗ウイルス薬の中で HIV 感染症に用いられる治療薬、C 型肝炎治療薬で用いられるインターフェロン、アデノウイルスレセプターを阻害する GRGDSP ペプチド、抗菌ペプチドの hCAP-18、および自然免疫関連物質の N-chlorotaurine などであり、これらにいずれもアデノウイルス増殖抑制作用がみられることを報告した。その過程で、型ないし種によ

ってそれらの抗アデノウイルス作用に差がみられることが明らかになった。この感受性の差がアデノウイルス種間のレセプターの差異の原因となっていると考えられるファイバー領域のタンパク質によるものなのか、レセプターの解析を分子生物学的にも行う予定である。また臨床への応用のために、ひとつはヒト結膜の特異性について動物との比較を行いたいと考えている。また、角結膜炎などを生じるアデノウイルス眼感染症治療を中心としての目標としていることから、点眼薬としての特殊性、安全な点眼薬としての製剤化のための製剤化学的側面も含めて研究を行う予定である。さらに近年新型アデノウイルス (52 型以降) が次々と報告されており、その中には結膜炎を生じるものやわが国で流行例から分離されているものも多く、今後の臨床応用を見据えて、新型に対する治療候補薬剤の作用についても研究を行いたいと考えている。以上のような多方面のアプローチからこれから 3 年間の研究を進めていくことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 臨床応用されている抗ウイルス薬におけるアデノウイルス増殖抑制作用の解析

アデノウイルスに増殖抑制作用がある薬剤として私たちはこれまで、複数の薬物について検討してきたが、その中では抗ウイルス薬が最も強い EC_{50} (50% effective concentration) を持ち、細胞毒性 CC_{50} (50% cytotoxic concentration) との比である選択指数も大きく、安全域が広いことがわかった。そこで既存で臨床応用されている抗ウイルス薬の中で、これまで検討されていない薬物について抗アデノウイルス作用を検討し、これまでの結果との比較を解析した。候補薬物はガンシクロビルであり、培養に用いる A549

細胞に対して、薬物のみを作用させた場合の細胞毒性を求め、その安全域である CC_{50} を算出した。 CC_{50} が臨床応用可能な範囲にあるかを検討した後、その約 1/10 の濃度から、アデノウイルス感染細胞に薬物を作用させ、その後 7 日間の培養を行い、LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics, 米国) でアデノウイルス DNA 量を測定した。薬剤非添加ウエルのアデノウイルス量と薬剤添加ウエルのアデノウイルス量を比較し、アデノウイルス各血清型に対する各薬剤の抗ウイルス効果を求め、50%有効濃度 EC_{50} を求めた。型間の相違を詳細に検討して、臨床応用の方向性を考察した。

(2) 新型アデノウイルスに対する抗ウイルス薬の検討

新型のアデノウイルスである 53 型、54 型および 56 型のそれぞれ臨床分離株と 19 型から新型と新しく決定された 64 型、そして近年発症者数の多い 4 型の 5 型について、抗 HIV 薬として用いられているスタブジンを用いて、そのアデノウイルス増殖抑制作用を検討した。スタブジンは核酸系逆転写酵素阻害薬に属し、従来の結膜炎起炎型には有効性があると報告されている。抗アデノウイルス作用については下記のように *in vitro* で検討した。A549 細胞による培養系を用い、上記の 5 つの型の臨床分離株および 4 型標準株を用いた。増殖抑制作用の評価には薬剤自体の細胞毒性を MTS 法で検討した後、スタブジンその結果をもとに決定した希釈倍率の種々の濃度でアデノウイルスに 24 時間作用させ、さらに 7 日間培養し、定量 PCR 法でアデノウイルス DNA を測定する。指標としては細胞毒性の CC_{50} と EC_{50} を算出し、それらの比である選択指数によって、これまで検討されてきた抗

アデノウイルス薬との対比を行ってその臨床的な有用性を評価した。

(3) アデノウイルス潜伏感染に関する免疫担当細胞の分子生物学的研究

アデノウイルス感染症は免疫抑制例では出血性膀胱炎や肺炎などで致命的な転機を取ることがあるが、免疫学的健常例では流行性角結膜炎に見られるように、臨床的には自然治癒するのが特徴である。しかし流行性角結膜炎治癒後に角膜上皮下混濁を生じることやほかのウイルス性上気道炎感染を契機に結膜炎症状を欠く角膜上皮下混濁が見られることなどがあり、結膜あるいは角膜にアデノウイルスの潜伏感染があることが推測されている。ヒトの扁桃、アデノイド組織にアデノウイルスが潜伏感染することは報告されているが、これは血清学的にアデノウイルス感染の既往を証明が関連づけされたものではなく、結膜における潜伏感染はまだ確認されていない。この研究では、臨床症状を有する流行性角結膜炎症例を対象とする。白内障、網膜剥離などの非感染性眼科患者を disease control とした。サイトブラシ法で結膜炎細胞を採取し、検体からリンパ球を分離し、Pan-T-cell marker, Pan-B-cell marker, CD4, CD8 などの細胞表面マーカーで染色したフローサイトメトリーを行った。また、アデノウイルスヘキソンに対するプライマーを用いた Nested PCR 法で、潜伏感染の指標となる初期転写因子の E1A 遺伝子、ファイバー遺伝子による解析、さらに、ウイルス感染性解析には、アデノウイルス遺伝子陽性リンパ球を human ME180 細胞に培養し、細胞致死効果 (CPE) 観察によって行った。ヒト結膜リンパ球の研究では、眼科手術時に無菌的に、かつ最小限の侵襲で採取したものを使用するが、

実験は臨床研究審査委員会の承認を受けて、被験者の同意を受け、ヘルシンキ宣言に従って行った。

4. 研究成果

(1) ガンシクロビルの CC₅₀ は平均で 212 µg/ml であり、EC₅₀ は 2.64~5.10 µg/ml であった。有意な抑制作用はすべての型にみられた。CC₅₀/EC₅₀ の比である選択指数からは、41.6~80.3 の間に分布し、これから薬剤としては安全に使用できる域にあることが示された。今後ガンシクロビルがアデノウイルス眼感染症の治療薬として使用する可能性が示唆された。

表 1. ガンシクロビルのヒトアデノウイルス 3, 4, 8, 19a および 37 型に対する増殖抑制作用と選択指数

| ガンシ クロビ ル濃度 (µg/ml) | DNA コピー数 (log copies/ml; 平均値) | | | | |
|------------------------------|-------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | 3 型 | 4 型 | 8 型 | 19a 型 | 37 型 |
| Control | 11.3 | 11.0 | 9.5 | 11.7 | 11.5 |
| 2.5 | 11.2 | 10.8 | 9.5 | 11.6 | 11.3 |
| 5 | 11.0* | 10.6 | 9.1 | 11.2* | 10.9* |
| 10 | 10.8* | 10.3* | 8.5 | 10.9* | 10.6* |
| 20 | 10.3* | 10.1* | 8.3* | 10.8* | 10.3* |
| EC ₅₀ (µg/ml) | 5.10 (19.9 µM) | 4.82 (18.9 µM) | 3.93 (15.4 µM) | 2.94 (11.5 µM) | 2.64 (10.3 µM) |
| 選択指 数 | 41.6 | 44.0 | 53.9 | 72.1 | 80.3 |

統計学的に有意な濃度依存的な増殖抑制作用がみられた(P<0.05*).

(2) スタブジンは既報と同様に、64 型と 4 型

については有意な増殖抑制作用がみられた。また新規の型である 53, 54 及び 56 型についても同様に濃度依存性の有意な増殖抑制作用がみられた。選択指数はこれまで報告された他の型と大きな違いはなく、スタブジンは新しく報告されたアデノウイルス型に対しても有効であることが確認された。今回報告した型は 4 型を除いていずれも D 種に属するわが国で結膜炎の流行を近年生じている型であるため、スタブジンの有効性は本症の治療管理の上で有用であることが示唆された。

(3) PCR でアデノウイルス DNA が 79% から検出されたが、培養では 6% のみ陽性であった。アデノウイルス DNA を含むリンパ球はほとんど T 細胞であり、B 細胞は少なかった。E1A 遺伝子およびファイバー遺伝子がほとんどの症例から検出された。1 型と 5 型の頻度が高かった。

〔雑誌論文〕(計 12 件)

Huang J, Kadonosono K, Uchio E. Anti-adenoviral effects of ganciclovir in vitro in types inducing keratoconjunctivitis confirmed by quantitative polymerase chain reaction methods. Clin Ophthalmol 8: 315-320, 2014 (査読あり)

Fukushima A, Ohashi Y, Ebihara N, Uchio E, Okamoto S, Kumagai N, Shoji J, Takamura E, Nakagawa Y, Namba K, Fujishima H, Miyazaki D. Therapeutic effects of 0.1% tacrolimus eye drops for refractory allergic ocular diseases with proliferative lesion or corneal involvement. Br J Ophthalmol 2014 (査読あり)

内尾英一. 結膜炎. ファルマシア 134: 196-200, 2014 (査読あり)

内尾英一. ウイルス性結膜炎の診断と管理. 日本眼科学会雑誌 118: 403-413, 2014 (査読あり)

内尾英一. 結膜炎. 日本医師会雑誌 143 (特別号 2): 89-90, 2014 (査読あり)

内尾英一. アデノウイルス結膜炎. 医学と薬学 71: 2263-2268, 2014 (査読あり)

Yanai K, Huang J, Kadonosono K, Uchio E. Corneal sensitivity after topical bromfenac sodium eye drops instillation. Clin Ophthalmol 7: 741-744, 2013(査読あり)

Uchio E, Inoue H, Kadonosono K. Anti-adenoviral effects of hCAP-18/LL37, an antimicrobial peptide, in vitro confirmed by quantitative polymerase chain reaction methods / Kor J Ophthalmol 27: 199-203, 2013 (査読あり)

内尾英一. ウイルス性結膜炎. Monthly Book OCULISTA 7: 21-26, 2013 (査読あり)

Hirai K, Takano Y, Uchio E, Kadonosono K. Clinical evaluation of the therapeutic effects of atelocollagen absorbable punctal plugs. Clin Ophthalmol 6: 133-138, 2012(査読あり)

Ebihara N, Ohashi Y, Fujishima H, Fukushima A, Nakagawa Y, Namba K, Okamoto S, Shoji J, Takamura E, Uchio E, Miyazaki D. Blood level of tacrolimus in patients with severe allergic conjunctivitis treated by 0.1% tacrolimus ophthalmic suspension. Allergol Int 61: 275-282, 2012 (査読あり)

藤田秀昭, ファン・ジェーン, 小沢昌彦, 吉富秀亮, 世良暢之, 鬼木信乃夫, 花岡希, 岡部信彦, 藤本嗣人, 内尾英一. 新型アデノウイルス 56 型による流行性角結膜炎の 1 例.

臨床眼科 66: 659-662, 2012 (査読あり)
〔学会発表〕(計 14 件)

Huang J, Uchio E : Antiadenoviral effects of ganciclovir in types inducing keratoconjunctivitis by quantitative polymerase chain reaction. 4th Asia Cornea Society. 2014 年 12 月 7 日. Taipei

内尾英一; 抗アデノウイルス薬の現状と課題; 第 15 回日本アデノウイルス研究会. 2014 年 11 月 8 日. 東京都東京インターシティ会議室

内尾英一; アデノウイルスの分子疫学: 第 51 回日本眼感染症学会; 2014 年 7 月 4 日; 東京都東京国際フォーラム

内尾英一; ウイルス性結膜炎の病態と診断 Update; 第 28 回北海道感染・免疫疾患フォーラム. 2014 年 5 月 16 日, 北海道札幌市札幌医科大学

内尾英一; ウイルス性結膜炎の最近のトピックス; 第 55 回筑波 TOC. 2014 年 4 月 19 日. 茨城県つくば市筑波大学

内尾英一; ウイルス性結膜炎: 第 118 回日本眼科学会総会; 2014 年 4 月 5 日; 東京都東京国際フォーラム

内尾英一: ウイルス性結膜炎の最近のトピックス - 新型と再興感染症 - ; 呉共済病院オープンカンファレンス 2013 年 3 月 14 日, 広島県呉市呉共済病院

内尾英一: ウイルス性結膜炎の院内感染対策; 第 50 回日本眼感染症学会; 2013 年 7 月 14 日, 大阪府大阪市大阪国際会議場

原田一宏, ファン・ジェーン, 淵上あき, 小沢昌彦, 安里良盛, 内尾英一: 沖縄における急性出血性結膜炎のウイルス学的解析. 第 60 回日本ウイルス学会. 2012 年 11 月 14 日, 大阪府大阪市大阪国際会議場

内尾英一：ウイルス性角結膜炎流行の最近の傾向について - 新型と再興感染症 - ; 第 50 回六大学眼科研究会 2012 年 9 月 15 日 , 福岡県福岡市九州大学百年講堂

内尾英一：ウイルス性結膜炎治療薬開発の現状 ; 国立感染症研究所校友会セミナー 2012 年 9 月 14 日 , 東京都新宿区国立感染症研究所

Huang J, Kozawa M, Yamaguchi H, Taniguchi T, Kishi K, Uchio E : A Newly Developed Rapid Diagnosis Kit (POCTEM@S Adeno) For Adenoviral Conjunctivitis. 82nd ARVO. 2012 年 5 月 4 日. Ft Lauderdale Convention Center

Harada K, Huang J, Fuchigami A, Kozawa M, Asato Y, Uchio E : Virological Analysis Of An Epidemic Of Acute Hemorrhagic Conjunctivitis In Okinawa, Japan. 82nd ARVO. 2012 年 5 月 3 日. Ft Lauderdale Convention Center

原田一宏 , ファン・ジェーン , 淵上あき , 小沢昌彦 , 安里良盛 , 内尾英一 : 沖縄における急性出血性結膜炎流行例のウイルス学的解析 : 第 116 回日本眼科学会総会. 2012 年 4 月 14 日. 東京都東京国際フォーラム

〔図書〕(計 10 件)

内尾英一：眼科診療クオリファイ，眼科救急疾患スクランブル，坂本泰二編，流行性角結膜炎. 21, 322-324, 2014

内尾英一：眼科診療クオリファイ，眼科救急疾患スクランブル，坂本泰二編，急性結膜炎の簡便な診断法について教えてください. 21, 325-326, 2014

内尾英一：眼科小手術 クローズアップ，江口秀一郎編，メディカルビュー社，アデノウイルスのイムノクロマト法検査. 34-37,

2014

内尾英一：眼感染症診療マニュアル，薄井紀夫，後藤浩編，ウイルス性結膜炎. 142-151, 2014

内尾英一：眼瞼，結膜，涙器，標準眼科学，第 12 版，木下茂，中澤満，天野史郎編集. 86-198, 2013

内尾英一：ウイルス性結膜炎，眼科疾患，最新の治療 2012-2015，大橋裕一，白神史雄編. 87, 2013

内尾英一：第 5 章 結膜疾患，現代の眼科学 改訂第 11 版，吉田晃敏，谷原秀信編. 84-97, 2012

内尾英一：結膜疾患，TEXT 眼科学改訂第 3 版，坪田一男，大鹿哲郎編. 137-142, 2012

内尾英一：ウイルス性結膜炎，眼科診療クオリファイ，村田敏規編，メディカルオフサルモロジー 15 巻. 10-13, 2012

内尾英一：感染性角結膜炎，今日の治療指針 2013 年版. 1255-1257, 医学書院，2013

6 . 研究組織

(1)研究代表者

内尾 英一 (UCHIO Eiichi)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：70232840