

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10911

研究課題名(和文) アデノウイルス眼感染症の治療薬剤の開発と臨床への導入法に関する研究

研究課題名(英文) Research for the development of medical treatment of adenoviral ocular infection and its introduction in clinical practice

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アデノウイルスは流行性角結膜炎の原因ウイルスであり、毎年流行を繰り返している。近年新型が出現し、その眼科的臨床像が変化してきている。複数の新型アデノウイルス臨床株に対して、スタブジンの増殖抑制作用をin vitroで検討した。既知の4型、64型と同様に、53型、54型および56型に対して、スタブジンは濃度依存的抑制作用がみられた。現在わが国で流行を生じているアデノウイルスに対してもスタブジンは有効であることが示された。54型アデノウイルス結膜炎の臨床所見を解析したところ、若年齢群の臨床スコアは成人群よりも有意に高く、年齢的な相違が認められ、臨床的に注意を要する。

研究成果の概要(英文)：Adenovirus causes epidemic keratoconjunctivitis and it has induced large epidemic every year. New types have appeared recently, and ocular manifestations have changed. Antiviral activity of stavudine was evaluated in several types in vitro. It was shown that stavudine had dose-dependent inhibitory effect on novel types 53, 54 and 56 similarly with type 4 and 64 of conventional types indicating that stavudine is effective against novel adenovirus types that are currently causing epidemics. From the clinical analysis of adenoviral conjunctivitis caused by type 54, it was shown that clinical score of younger cases was significantly more serious than that of adult cases, indicating age specific clinical characteristics leading to clinical insight.

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 遺伝子系統解析 流行性角結膜炎

1. 研究開始当初の背景

ウイルス感染症に対する治療薬はエイズ、インフルエンザ、ヘルペス感染症などのいくつかの疾患で、特に生命予後に影響し、大規模な流行を来すために、公衆衛生学的に重要な疾患についてはこれまで研究が進められ、臨床応用されている治療薬もある。しかしアデノウイルスについては、わが国では毎年約100万人が罹患することが感染症サーベイランスから知られている伝染力の強い疾患であるが、薬物治療へのアプローチは十分進展していなかった。その理由として、アデノウイルスによる咽頭、上気道および結膜などの粘膜組織に生じる急性感染症は、通常約2週間以内で自然治癒することがあげられる。しかし発症者は治癒するまでに、感染症法上から自宅療養や児童生徒も学校感染症上の制限を受けることを余儀なくされる。したがって特異的抗アデノウイルス薬が臨床応用されれば、治療期間を短縮し、感染の伝播を減少させ、罹患者とその周囲の地域住民の Quality of life の向上が期待される。また骨髄移植など免疫抑制状態の症例にアデノウイルスが感染すると、肺炎、出血性膀胱炎などの重症ウイルス感染症から死に至ることがある。

これらの症例については、抗ウイルス薬が確立できれば、生命予後の改善も可能になる。このように、抗アデノウイルス薬は将来の医療のさらなる高度化の状況では、眼感染症だけでなく、その開発・確立の臨床的及び医学的な意義は大きいといえる。さらに、適切な診断のための方法として、イムノクロマト法による迅速診断が行われているが、侵襲の大きい点があり、感度の改良とともに、臨床的な課題となっている。そして、近年の新型アデノウイルス感染症の増加により、アデノウイルス結膜炎の臨床像の変化が著しく、その実態をウイルス学的なら鼻に臨床的に解析することの必要性が高まっていた。

2. 研究の目的

アデノウイルスは、流行性角結膜炎(epidemic keratoconjunctivitis; EKC)及び咽頭結膜熱(pharyngoconjunctival fever; PCF)などのウイルス性結膜炎を生じるが、眼科領域以外にも呼吸器系の上気道炎を生じ、特に7型は市中および院内感染肺炎の原因ともなり、死亡例もあるため臨床的に重要である。現在までアデノウイルスに対する特異的抗ウイルス治療薬は十分に確立されていない。そこで、本研究ではアデノウイルス治療薬の臨床応用を進めるために、ウイルス薬の抗アデノウイルス作用の解析、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増殖抑制作用の検討及び点眼剤の安定性の研究などを総合的に行っていくことを計画し、以下の研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 抗アデノウイルス薬の新型アデノウイルスにおける解析

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、スタブジンを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を測定した。指標としては細胞毒性のCC₅₀(50% cytotoxic concentration)とEC₅₀(50% effective concentration)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有用性を評価した。

(2) 結膜滲出液を含む涙液を用いたアデノウイルス検出増感キットの評価

2016年7月～11月の期間中に福岡大学病院およびみぎた眼科を受診し、流行性角結膜炎の臨床症状がみられ、アデノウイルス抗原検査が必要と考えられた患者で、本試験への同意が得られた患者93例を対象とした。これらの症例に、以下の2種類のアデノウイルス迅速診断キットを用いて検査した。ひとつは結膜ぬぐい液を用いる従来のIC法キット(対照キット)で、クイックナビ™ アデノ(大塚製薬)を用いた。結膜ぬぐい液は点眼麻酔下で結膜を綿棒で強く擦過し採取した。もうひとつのキット(評価キット)はクイックチェイサー® Auto Adeno 眼(株)ミズホメディー)および富士ドライケム Immuno AG カートリッジ Adeno OPH(富士フイルム(株))であった。両キットは同一製品である。評価キット用の検体として、シルマー試験紙を加工した検体採取具を結膜に5秒ほど付着させて結膜滲出液を含む涙液を採取し、抽出容器中で検体採取具のろ紙部を引きちぎって内壁でしごいた後、抽出液をテストカートリッジに滴下し、それを同一の専用測定器であるクイックチェイサー® Immuno Reader(株)ミズホメディー)にセットして、銀増幅反応を行い、15分後に自動判定した。銀増幅反応の原理は簡略にはIC反応の後、銀イオンと還元剤を供給することにより、標識粒子である金コロイドの周囲に銀を析出させ、標識粒子を約100倍に拡大することで、従来のIC法キットより高感度でアデノウイルス抗原を検出することができる。検体採取の順序はまず点眼麻酔を行わずに、結膜滲出液を含む涙液を採取し、その後点眼麻酔を行って、結膜を擦過し、結膜ぬぐい液を採取した。

全症例について、それぞれの診断キットの測定試料残液を-30℃で凍結保存し、アデノウイルスDNA検査を行った。QIAamp DNA Mini kit(QIAGEN)でDNAを抽出し、プライマーを加えて Thermal Cycler Dice Real Time System TP800(タカラバイオ株式会社)によりアデノウイルス遺伝子の増幅および検出を行った。プライ

マーおよび反応条件は既報に従った。Real-time PCR法で陽性となった検体のDNAに対して、ヘキソンC4領域のPCRを行い、ダイレクトシーケンス法によって塩基配列を決定した。塩基配列をBLAST(Basic Local Alignment Search Tool)によって型別判定を行った。PCRのプライマーおよび反応条件は既報に従って行った。本研究は福岡大学臨床研究審査委員会において承認されて行われた(16-2-15)。

(3) 新型アデノウイルス54(HAdV-54)型による流行性角結膜炎の臨床的ならびにウイルス学的解析

2016年6月16日～8月29日までの期間に臨床的にEKCと診断され、結膜ぬぐい液からHAdV-54型検出された連続症例55例(男:女=23:32、平均年齢21.7歳)を対象とした。初診時の結膜、角膜所見及び耳前リンパ節腫脹をそれぞれスコア化して合計を臨床スコアとした。両眼例は重症眼を対象とした。Real time PCR法によって型別判定およびウイルスDNAを定量した。臨床症状の重症度は角膜、結膜所見はそれぞれ0～3にスコア化し、耳前リンパ節腫脹はありを1なしを0として、その合計スコアを臨床スコアとして解析した。

4. 研究成果

(1) 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。

(2) 全93眼のうち対照キットおよび評価キットのそれぞれの陽性率は57.0%(53/93)および62.4%(58/93)であった。2施設で検体が採取されたが、うち1施設(福岡大学病院)からの検体は全てアデノウイルス陰性の3例であった。なおReal-time PCR法でAdV陽性となった症例は63.4%(59/93)であり、PCR陽性例59例はいずれのキット測定試料残液でもPCR陽性であった。また各キットの陽性例はすべてReal-time PCR法でも陽性であった。34症例(36.6%)ではアデノウイルスが検出されなかった。型別では、AdV54型が55眼(93.2%)、3型および19/64型がそれぞれ2眼(3.4%)に検出され、ほとんどの症例が54型であった。対照キットおよび評価キットのそれぞれのReal-time PCR法に対する感度は89.8%、98.3%であり、特異度はいずれも100%であった(表1)。2種のIC法のReal-time PCR法陽性例における感度の差には有意差が見られ、評価キットの感度が有意に高値であった($P<0.01$ (カイ二乗検定))。対照キットと評価キットの陽性一致率は100%、陰性一致率は87.5%、全体一致率は

94.6%であった(表2)。

本試験を通して、評価キットの検体採取時に点眼麻酔は行わなかったが、疼痛を生じて採取できない症例はなかった。

表 1. 2種類のアデノウイルス迅速診断キットのReal-time PCR法に対する感度と特異度

		評価キット (結膜滲出液を含む涙液)		対照キット (結膜ぬぐい液)		計
		陽性	陰性	陽性	陰性	
Real-time PCR法	陽性	58	1	53	6	59
	陰性	0	34	0	34	34
合計		58	35	53	40	93
感度		98.3%		89.8%		$P<0.01$
特異度		100%		100%		
全体一致率		98.9%		93.5%		

表 2. 2種類のキット間の結果の相関

		評価キット		計
		陽性	陰性	
対照キット	陽性	53	0	53
	陰性	5	35	40
計		58	35	93
陽性一致率		100.0%		
陰性一致率		87.5%		
全体一致率		94.6%		

これらの結果から、涙液を検体とした評価キットは結膜擦過が不要で、患者への負担が少なかった。専用機器で増感を行い、対照キットに比較して感度が高かった。評価キットは客観的で有用であると考えられた。

(3) この研究の母集団の構成は表3に示すとおりであった。

表 3. アデノウイルス結膜炎症例の疫学的特徴

		範囲
性別		
男性	23(42%)	
女性	32(58%)	
年齢 (中央値 ± 標準偏差)	21.7 ± 22.7	0 ~ 68 歳
発症後日数	1.69 ± 1.52	0 ~ 6 日
HAAdV の DNA 対数値 (対数値 ± 標準誤差)	8.50 ± 0.93	5.0 ~ 10.1

角膜所見は 98.2%とほとんどの症例が軽症であった。結膜所見は軽症 3.6%, 中等症 94.6%, 重症 1.8%とほとんどが中等症であった。耳前リンパ節腫脹は 49%にみられた。角膜上皮下混濁は 77%遠くの症例に見られ、重症な傾向を示していた。

臨床スコアと患者群における相関は次の通りであった。

表 4. 臨床スコアと各要因の解析

	臨床スコア	統計学的有意差
発症後日数	2.52 ± 0.59	有意差なし
< 2 日	2.38 ± 0.49	
3 日		
性別	2.61 ± 2.41	有意差なし
男性 (23 人)	28.9 ± 0.61	
女性 (32 人)		
HAAdV の対数値	2.41 ± 0.56	有意差なし
8.6 (29 人)	2.58 ± 0.57	
> 8.6 (26 人)		
年齢	2.69 ± 0.53	P<0.01
< 23 歳 (32 人)	2.22 ± 0.51	
23 (23 人)		

結果をまとめると以下の通りであった。

平均年齢は 21.7 歳で、18 歳未満が 32 人 (58.2%) であった。偽膜性結膜炎は認めず、結膜炎は中等症が 94.6% であった。初診時に角膜所見を認めないにもかかわらず、多数の角膜上皮下混濁症例がみられた。23 歳未満群と以上群の臨床症状スコアのみ有意差をみとめ、若年者がより重篤だった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 16 件)

Matsumura N, Goto S, Uchio E, Nakajima K, Fujita T, Kadonosono K. Cytokine profiles of tear fluid from patients with pediatric lacrimal duct obstruction. Invest Ophthalmol Vis Sci 58: 252-256, 2017(査読あり) 10.1167/iops.16-20717

Saeki Y, Kadonosono K, Uchio E. Clinical and allergological analysis of ocular manifestations of sick building syndrome. Clin Ophthalmol 11: 517-522, 2017(査読あり) 10.2147/OPHTH.S124500. eCollection 2017

Suzuki S, Kawamura T, Saeki Y, Okubo M, Konagaya M, Hanaoka N, Arashiro T, Fujimoto T, Uchio E. A case of type 54 human mastadenovirus keratoconjunctivitis causing severe broad epithelial defect ten years after LASIK surgery. Jpn J Infect Dis 70: 597-598, 2017(査読あり) 10.7883/yoken.JJID.2017.062

Miyazaki D, Fukushima A, Ohashi Y, Ebihara N, Uchio E, Okamoto S, Shoji J, Takamura E, Nakagawa Y, Namba K, Fujishima H. Steroid-sparing effect of 0.1% tacrolimus eye drop for treatment of shield ulcer and corneal epitheliopathy in refractory allergic ocular diseases. Ophthalmology 124: 287-294, 2017(査読あり) 10.1016/j.ophtha.2016.11.002

高良太, 佐伯有祐, 川村朋子, 内尾英一. インフリキシマブ投与中, 自己抗体陽性化後に関節痛と皮疹が出現したベーチェット病の 1 例. 臨床眼科 71: 1401-1406, 2017(査読あり)

Ko R, Hayashi M, Hayashi H, Hayashi K, Kato H, Kurata Y, Fuchino Y, Nakamichi T, Migita H, Yano H, Sakata T, Uchio E. A correlation between acute conjunctivitis and Asian dust on ocular surfaces. J Toxicol Environ Health 79: 367-375, 2016(査読あり) 10.1080/15287394.2016

Kondo H, Matsushita I, Tahira T, Uchio E, Kusaka S. Novel mutations in the COL2A1 gene in Japanese patients with Stickler syndrome. Human Genome Var 3: 16018, 2016(査読あり) 10.1038/hgv.2016.18

Kondo H, Matsushita I, Tahira T, Uchio E, Kusaka S. Mutations in ATOH7 gene in patients with nonsyndromic congenital retinal nonattachment and familial exudative vitreoretinopathy. Ophthalmic Genet 37: 462-464, 2016(査読あり)

高良太, 岡村寛能, 内尾英一. 両眼に同時発症した非動脈炎性虚血性視神経症の 1 例. 臨床眼科 70: 1493-1497, 2016(査読あり)

正木沙織, 立川量子, 内尾英一, 今福信一. IgG4 関連涙腺炎の 1 例. 西日本皮膚科 78: 239-242, 2016(査読あり)

Harada K, Fujimoto T, Asato Y, Uchio E. Virological and epidemiological analysis of coxsackievirus A24 variant epidemic of acute hemorrhagic conjunctivitis in Okinawa, Japan, in 2011. Clin Ophthalmol 9: 1085-1092, 2015(査読あり) 10.2147/OPTH.S81386

Huang J, Uchio E, Goto S. Simulation of airbag impact on eyes with different axial lengths after transsclerally fixated posterior chamber intraocular lens by using finite element analysis. Clin Ophthalmol 9: 263-270, 2015(査読あり) 10.2147/OPTH.S75180

Kadonosono K, Arakawa A, Yamane S, Inoue M, Yamakawa T, Uchio E, Yanagi Y. Displacement of submacular hemorrhages in age-related macular degeneration with subretinal tissue plasminogen activator and air. Ophthalmology 122: 123-128, 2015(査読あり) 10.1016/j.ophtha.2014.07.027

Fuchigami A, Huang J, Nakajima K, Kozawa M, Yoshinaga K, Uchio E. Impact of a case series of corneal transplant rejection on the kinetics of cytokine concentrations in human tears after keratoplasty. Int J Ophthalmol 1: 59-65, 2015(査読あり) URL: <http://www.ghrnet.org/index.php/ijor/article/view/1288>

梅田尚靖, 外尾恒一, 塚原朋子, 岡村寛能, 内尾英一. 無治療加齢黄斑変性に対するアフリベルセプトとラニビズマブ維持期必要時投与における12カ月成績. 日本眼科学会雑誌 119: 839-845, 2015(査読あり)

尾崎弘明, ファン・ジェーン, 松本 拓, 内尾英一. 重粒子線治療後に発症した放射線網膜症および血管新生緑内障の1例. 臨床眼科 69: 749-754, 2015(査読あり)

(学会発表)(計14件)

上村貴志, 上野智弘, 川村朋子, 佐伯有祐, 右田博敬, 内尾英一. 新型アデノウイルス54型による流行性角結膜炎の最近の流行と臨床所見の解析. 第71回日本臨床眼科学会. 2017年10月14日, 東京都, 東京国際フォーラム

内尾英一. 結膜炎 - 感染 & アレルギー -. 眼科診療実践講座2017. 2017年8月20日, 東京都, ベルサール日本橋

内尾英一. 最近のアデノウイルス感染症研究の現状と課題. 第18回日本アデノウイルス研究会. 2017年7月15日, 大阪市, リーガロイヤルNCB

上野智弘, 川村朋子, 佐伯有祐, 右田博敬, 内尾英一. 涙液検体を用いたアデノウイルス検出キットの感度の評価. 第54回日本眼感染症学会. 2017年7月14日, 大阪市, 大阪国際会議場

内尾英一. アデノウイルス角結膜炎の臨床と分子疫学および抗ウイルス治療の現状. 第31回ヘルペスウイルス研究会. 2017年6月16日, 松江市, ホテル一畑

内尾英一. 眼科院内感染に関する諸問題.

第121回日本眼科学会総会. 2017年4月8日, 東京都, 東京国際フォーラム

川村朋子, 藤本嗣人, 小長谷昌未, 花岡希, 佐伯有祐, 内尾英一. 流行性角結膜炎の経過と予後の予測に有用と考えられたアデノウイルスの型別判定. 第121回日本眼科学会総会. 2017年4月7日, 東京都, 東京国際フォーラム

鈴木脩司, 川村朋子, 佐伯有祐, 内尾英一. LASIK後に広範な角膜上皮欠損を生じた新型アデノウイルス角結膜炎の1例. 第70回日本臨床眼科学会. 2016年11月4日, 京都市, 国立京都国際会館

川村朋子, 内尾英一, 佐伯有祐, 藤本嗣人, 花岡希, 小長谷昌未. 最近の新型AdVによる重症角結膜炎の臨床とウイルス学的解析. 第17回日本アデノウイルス研究会. 2016年7月2日, 東京都, TKP有楽町会議室

内尾英一. 眼科医にとっての感染症サーベイランス - その意義とこれまでの成果 -. 第17回日本アデノウイルス研究会. 2016年7月2日, 東京都, TKP有楽町会議室

音田香代子, 佐伯有祐, 川村朋子, 高良太, 内尾英一. 流行性角結膜炎罹患後に細菌性角膜潰瘍を発症した1例. 第53回日本眼感染症学会. 2016年7月1日, 東京都, 東京国際フォーラム

内尾英一. オキュラーサーフェス炎症性疾患の薬物および外科的治療の現状. 佐世保眼科医会学術講演会. 2016年4月14日, 佐世保市, セントラルホテル佐世保

内尾英一. オキュラーサーフェス炎症性疾患の薬物および外科的治療の現状. 第95回福島眼科集談会. 2016年3月19日, 郡山市, ホテルプリシード郡山

内尾英一. アデノウイルス結膜炎. 第119回日本眼科学会総会. 2015年4月17日, 札幌市, ロイトン札幌

(図書)(計18件)

内尾英一. F眼感染症. 感染症専門医テキスト第1部解説編, 日本感染症学会編, 624-631, 2017

内尾英一. 眼科・その他. Pocket Drugs2017, 716-777, 2017

内尾英一. アレルギー性結膜疾患. JMEDIJ治療法便覧 2017-2018年版 ~ 私の治療 ~, 1260-1262, 2017

内尾英一. アデノウイルス, AHC ウイルス. 眼科検査ガイド 第2版, 根木昭監修, 697-699, 2016

内尾英一. 点眼薬処方時の注意. 内科医が知っておきたいアレルギー性鼻炎, 太田健編, 41-44, 2016

内尾英一. コンタクトレンズ使用時は点眼は避けるべき?. 内科医が知っておきたいアレルギー性鼻炎, 太田健編, 45-46, 2016

内尾英一. 眼科・その他. Pocket Drugs2016, 754-770, 2016

内尾英一. 眼瞼, 結膜, 涙器. 標準眼科学, 第13版, 木下茂, 中澤満, 村上晶編集,

184-195, 2016

内尾英一. 眼感染症. 感染症 最新の治療
2016-2018, 南江堂, 133-136, 2016

内尾英一. アデノウイルス結膜炎. 今日の
眼疾患治療指針, 第3版, 283-284, 2016

内尾英一. 急性出血性結膜炎. 今日の眼
疾患治療指針, 第3版, 284-285, 2016

内尾英一. アデノウイルス結膜炎(流行性角
結膜炎). 一目でわかる眼疾患の見分け方.
46-47, 2016

内尾英一. アデノウイルス結膜炎(咽頭結膜
熱). 一目でわかる眼疾患の見分け方. 45, 2016

内尾英一. 感染症と予防衛生法規. 眼科診
療と関連法規. 眼科診療クオリファイ 23,
163-167, 2015

内尾英一. 眼疾患で届出が必要な疾患に
ついて教えて下さい. 眼科診療と関連法規. 眼
科診療クオリファイ 23, 168-171, 2015

内尾英一. 第6章 結膜疾患. 現代の眼科
学, 第12版, 吉田晃敏, 谷原秀信編, 84-97,
2015

内尾英一. 眼科・その他. Pocket Drugs2015,
868-888, 2015

内尾英一. 涙液総 IgE. 臨床検査ガイド
2015年改訂版, 769-770, 2015

〔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

<http://www.med.fukuoka-u.ac.jp/opththa/>

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