

平成21年5月29日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591944
 研究課題名（和文） アデノウイルス眼感染症のウイルス学的病態解析に基づく新しい薬物治療の開発
 研究課題名（英文） Development of novel agent for adenoviral ocular infection based on virological analysis
 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

研究成果の概要：抗アデノウイルス作用を持っている可能性のある薬物のアデノウイルス増殖抑制作用を *in vitro* で解析した。アデノウイルス増殖抑制効果が見られた薬剤はザルシタピン、スタブジンおよび GRGDSP ペプチドであった。抗ヒト免疫不全ウイルス薬では核酸系逆転写酵素阻害薬のみが有効であった。GRGDSP ペプチドは吸着阻害作用による効果を示した。これらの薬剤がヒトのアデノウイルス結膜炎への安全な治療点眼薬である可能性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	660,000	4,060,000

研究分野：臨床医学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：アデノウイルス、抗ウイルス薬、逆転写酵素阻害薬、抗 HIV 薬、レセプター阻害薬

1. 研究開始当初の背景

(1) アデノウイルス眼感染症

アデノウイルスは流行性角結膜炎 (epidemic keratoconjunctivitis; EKC) を引き起こす原因ウイルスであり、特に日本を含む東および東南アジア地域は、高温多湿の気象条件や地理的要因からウイルス性結膜炎の患者数が世界的にも多い地域である。特にわが国においては患者数が毎年100万人前後と多く、その一方で、眼科や小児科領域ではアデノウイルスによる院内感染がしばしば発生し、社会的問題として近年高い注目を集

めている。骨髄移植後やエイズなどの免疫抑制状態では、呼吸器をはじめとする播種性感染症や急性出血性膀胱炎がアデノウイルスによって引き起こされ、致命的な側面もある。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かった。

(2) これまでの研究の概要

私及び研究グループはウイルス性結膜炎の臨床、診断および治療の各方面からウイルス学・分子遺伝学的研究を継続的および総合的に進めてきた。臨床面では、地域感染にお

いては、サーベイランスデータの時系列分析により、地域による頻度差があることも報告した(内尾英一, 他: 眼紀 47: 597-601, 1996)。ウイルス学的にはウイルスゲノムの制限酵素切断解析によって、アデノウイルス 7 型, 34 型, 8 型変異型などの結膜炎起炎性に関する新興・再興感染症の側面を解析した(Saitoh-Inagawa W, et al: J Clin Microbiol 39: 4187-4189, 2001)。免疫抑制状態の症例のからのみ分離されていたアデノウイルス 34 型を健常成人の結膜から分離し、ヘキソン超可変領域アミノ酸配列の解析から、結膜炎発症の要因として細胞接着部位であるファイバー領域に変異が生じている可能性を報告した(Uchio E, et al: Am J Ophthalmol 128: 680-686, 1999)。DNA ウイルスであるアデノウイルスは変異が遅いが、わが国における流行株の変遷を解析するために、各地の結膜炎由来検体のゲノムタイピングをアデノウイルス 3, 4, 7, 8, 11, 19 および 37 型について継続的に行い、新しいゲノムタイプを報告するとともに、年により流行する血清型が変化するわが国の血清疫学的特徴との関連も検討した(Tanaka K, et al: J Med Virol 65: 530-533, 2001)。診断面では、PCR 法に基づいた同定法として PCR-RFLP 法(Saitoh W, et al: J Clin Microbiol 34: 2113-2116, 1996)および PCR-sequence 法(Takeuchi S, et al: J Clin Microbiol 37: 1839-1845, 1999)によるアデノウイルスおよびエンテロウイルスの同定法(Uchio E, et al: Am J Ophthalmol 122: 273-275, 1996)を確立した。一方、実際の臨床レベルで実施可能な迅速診断法については、免疫クロマトグラフィー法キットを新たに開発し(Uchio E, et al: Ophthalmology 104: 1294-1297, 1997)、現在臨床的に広く使用され、小児科をはじめとする臨床各科でも用いられるようになった。治療薬に関しては、現在、主としてエイズ症例のサイトメガロウイルス網膜炎などに用いられているシチジル酸アナログのシドフォビル培養細胞に対する *in vitro* の抗アデノウイルス作用を解析し、わが国に頻度の高い、アデノウイルス 8 型, 37 型などの D 亜属に対する抗ウイルス作用が高く、選択毒性も優れていることを報告した(中嶋治彦, 他: 日眼会誌 104: 77-81, 2000)。

(3) 研究開発の方向性

これらの研究成果から、アデノウイルス治療薬はウイルス感染の特徴から、細胞核内のウイルスタンパク増殖を抑制する薬剤が中心となるが、このいわゆる狭義の抗ウイルス薬以外に、宿主細胞への接着抑制、接着後のエンドサイトーシスによる進入などの、感染抑制による治療効果や、ウイルス表面タンパク破壊などの非特異的抗ウイルス作用など多様なメカニズムによる抗アデノウイル

ス作用の可能性が考えられる。そこで、われわれは新しいアデノウイルス治療薬の開発を 3 年間の研究期間内に、多方面のアプローチから進める研究を計画し、結膜炎など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、安全な治療応用まで解明していくことを計画した

2. 研究の目的

アデノウイルス結膜炎は症例によっては角膜びらんや結膜偽膜などの重症の経過をたどることもあり、しばしば見られる角膜上皮下混濁は長期間にわたって視力障害をもたらすことも臨床的な大きな問題である。しかし、本症に対する特異的な治療法は今までに積極的に追求されてきていなかった。近年の抗ウイルス薬分野における研究の進展により、アデノウイルスに対する特異的な抗ウイルス作用が期待される薬物がいくつか報告されてきている。この研究では、さまざまな薬物を対象として、アデノウイルス結膜炎に対する抗ウイルス作用を評価し、治療薬としての可能性を検討した。

(1) 抗ウイルス薬の抗アデノウイルス作用の検討

ウイルス性結膜炎の新しい治療薬の探索的研究を目的として、抗 HIV 薬として臨床応用されている種々の薬物のアデノウイルスに対する *in vitro* の増殖抑制作用をウイルス学的に検討した。

(2) 抗アデノウイルス薬剤の生体への作用の解析

点眼薬として使用する際の生体への影響を確認するために、ウサギ実験モデルに対して治療候補薬を点眼することによって、生体とりわけ眼球付属器への影響を *in vivo* で解析した。

(3) アデノウイルス接着阻害薬の抗ウイルス作用の *in vitro* における検討

アデノウイルス結膜炎はウイルス粒子のファイバーが結膜上皮細胞へ接着することによって開始するが、これはアデノウイルスレセプターが関与する。 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンレセプターリガンドである GRGDSP-peptide はその配列の中に、arginine-glycine-aspartate (RGD)-結合モチーフを有しており、これは CAR (コクサッキーアデノウイルスレセプター)とも共通である。そこで、GRGDSP-peptide がアデノウイルス接着抑制効果を有するかどうかを *in vitro* で検討した。

3. 研究の方法

(1) 抗ウイルス薬の抗アデノウイルス作用の検討

スクリーニングのウイルス増殖試験には A549 細胞 (ヒト肺癌細胞) を用いた。使用

したウイルスはアデノウイルス 3 型, 4 型, 8 型および 37 型であり, American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, 米国) から入手した。維持培地には 2%ウシ胎児血清加 Eagle's minimum essential medium (MEM)(日水製薬)を使用した。

検討した薬剤は, ザルシタピン, スタブジン, ネビラピン, インジナビル及びアンブレナビルであった。各薬剤の報告されている有効濃度の 1,000 倍もしくは 1mg/ml から, 維持培地で 5 倍階段希釈して 5 濃度の薬剤濃度を使用した。また, 一部の薬剤は 2 倍階段希釈して 5 濃度の薬剤濃度を使用した。次に, 設定濃度の 4 倍の濃度に維持培地で希釈した各薬剤溶液を作製した。維持培地を 50 μ l ずつ 96 ウェルプレートの各ウェルに加えた, 1×10^5 cell/ml に調整した A549 細胞を各ウェルに 100 μ l ずつ加えた。ここに, 作製した各濃度の薬剤を 50 μ l ずつ各ウェルに加えた。1 濃度は 3 ウェルとした。対照のウェルには薬剤の代わりに維持培地を 50 μ l 加えた。5%CO₂ 存在下, 37°C で 3 日間培養した。なお, 接着阻害作用のあると考えられる抗オステオポンチンペプチドは 5%CO₂ 存在下で 37°C の培養を行う前に 4°C で 90 分間培養した。3 日目に各ウェル内の培地と薬剤を除去し, 細胞を 100 μ l のリン酸緩衝液(PBS)で 5 回洗浄後, 新たに維持培地 150 μ l と各濃度の薬剤を 50 μ l ずつ各ウェルに加えた。5%CO₂ 存在下 37°C で 3 日間培養した。3 日後に CellTiter96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, 米国) を使用し, MTS(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)法で 50%細胞障害濃度(CC50)を算出した。

算出した CC₅₀ の約 1/5 および 1/10 (または 1/20) 濃度になるように, 維持培地で希釈して各薬剤溶液を作製した。 1×10^5 cell/ml に調整した A549 細胞を 100 μ l ずつ 96 ウェルプレートの各ウェルに加えた (1×10^4 cell/ウェルとなる)。5%CO₂ 存在下, 37°C 3 日間培養した。3 日後に, 各ウェル内の培地を除去して, 細胞を 100 μ l の PBS で 3 回洗浄後, 上記で作製した各濃度の薬剤を 100 μ l ずつ各ウェルに加えた。1 濃度は 3 ウェルとした。ウイルス対照用のウェルには薬剤の代わりに維持培地を 100 μ l 加えた。各血清型アデノウイルスを 1×10^7 copy/ml に調整したウイルス液を作製し, 100 μ l ずつ 96 ウェルプレートの各ウェルに加えた (1×10^6 copy/ウェルとなる)。5%CO₂ 存在下, 37°C で 1 日間培養した。翌日, 各ウェル内のウイルス液と薬剤を除去し, 細胞を 100 μ l の PBS で 5 回洗浄後, 新たに維持培地 100 μ l と各濃度の薬剤を 100 μ l ずつ各ウェルに加えた。5%CO₂ 存在下,

さらに 37°C で 6 日間培養した。6 日後, 各ウェルの上清と細胞を回収し, 凍結融解を 3 回行った。4°C, 5,000rpm で 5 分間遠心し, 上清をウイルス液として 50 μ l を DNA 抽出キットのスマイテスト EX-R&D (ゲノムサイエンス研究所) で抽出後, 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。薬剤を加えていないウェルのアデノウイルス量と薬剤を添加したウェ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た。

スクリーニング試験において抗ウイルス効果が認められたザルシタピンとスタブジンについてさらに詳細な抗アデノウイルス効果を検討した。ザルシタピン (ddC) : 10 μ g, 2 μ g, 400ng, 80ng および 16ng/ml, (それぞれ 47.3 μ M, 9.5 μ M, 1.9 μ M, 378.4nM および 75.7nM), スタブジン (d4T) : 60 μ g, 12 μ g, 2.4 μ g, 480ng および 96ng/ml, (それぞれ 270 μ M, 54 μ M, 18.0 μ M, 2.2 μ M および 432nM) とした。上述の抗ウイルス効果スクリーニング試験と同様の方法でウイルス増殖抑制試験を行った。

(2) 抗アデノウイルス薬剤の生体への作用の解析

体重 1.0~1.5kg のメス白色家兔を用いた。点眼薬はシドフォビル, ザルシタピン, スタブジンおよび対照の BSS(balanced salt solution)を, BSS を除く薬剤はそれぞれ原末を蒸留水で溶解した 1%溶液として作成したものを使用した。点眼スケジュールは各点眼液を 1 日 4 回, 片眼に 2 週間点眼した。薬剤濃度及び点眼回数は Gordon らがシドフォビルを New Zealand white rabbit に投与した報告に準じて行った。白色家兔は各群 5 匹ずつ, 合計 25 匹を用いた。結膜, 眼瞼および涙液の臨床所見と涙点からの通水試験を行った。これらの結果は結膜充血, 眼瞼発赤および流涙に関して, スコア化した。臨床所見は各群の 5 匹の家兔のスコアの平均を比較した。超音波 B モードによる涙小管径測定は, Tost らが行った方法に準じて, 超音波測定装置 UD-6000®(10MHz)(トーマー)に 20MHz モードプローブの UD-1050® (トーマー)を装着して描画した画像における涙小管直径を測定した。涙小管直径も臨床所見と同様に, 各群の家兔の測定値の平均値を群間で比較した。統計学的解析には Mann-Whitney 検定を用いた。さらに, シドフォビル点眼群について, 点眼終了時に眼球および周囲組織を摘出し, 病理組織学的検索を行った。

(3) アデノウイルス接着阻害薬の抗ウイルス作用の *in vitro* における検討

GRGDSP peptide は既報にもとづいて合成したものを用いた。ウイルス増殖抑制作用

の解析は実験(1)と同様に行った。

4. 研究成果

(1) 抗ウイルス薬の抗アデノウイルス作用の検討

アデノウイルス増殖抑制スクリーニングの結果は表 1 に示したが、ザルシタピンおよびスタブジンは濃度依存的にウイルスコピー数が減少しており、抗アデノウイルス効果があると考えられたが、ネビラピン、インジ

薬剤	濃度 (μg/ml)				
	10	2	0.2	0.02	0.002
ザルシタピン	100000	10000	1000	100	10
スタブジン	100000	10000	1000	100	10
ネビラピン	100000	10000	1000	100	10
インジナビル	100000	10000	1000	100	10

表 1. 抗 HIV 薬のアデノウイルス増殖抑制効果のスクリーニング

ナビル、アンプレナビルには明らかな抗ウイルス効果は認められなかった。

各薬剤の薬物濃度とウイルスコピー数の変化を表 2 に示した。ザルシタピンは 10μg/ml で約 1/10,000~100,000 に、2μg/ml でも約 1/100~1,000 にアデノウイルス増殖を抑制し、いずれの血清型にも強い効果が見られた。ザルニブジンは 60μg/ml で約 1/100~1,000 に、12μg/ml では約 1/5~100 にウイルス増殖を抑制し、いずれの血清型にも有効であったが、中でも 3 型、4 型に特に有効であった。

(2) 抗アデノウイルス薬剤の生体への作用の解析

結膜充血の経時的変化では、薬剤点眼群で

軽度の充血の出現が見られたが、対照(BSS)との間に有意差があったのは、シドフォビルの 14 日目だけであった。眼瞼の所見では、点眼開始 4 日後から発赤が薬剤点眼群で見られ、シドフォビルに加えて、ザルシタピン、ザルニブジンの投与群でも 14 日点眼後に、

有意な発赤が見られた(表 3)。

薬剤	濃度 (μg/ml)				
	10	2	0.2	0.02	0.002
ザルシタピン	100000	10000	1000	100	10
スタブジン	100000	10000	1000	100	10
ネビラピン	100000	10000	1000	100	10
インジナビル	100000	10000	1000	100	10

表 2. ザルシタピン、スタブジンの抗アデノウイルス作用

薬剤	濃度 (μg/ml)				
	10	2	0.2	0.02	0.002
ザルシタピン	100000	10000	1000	100	10
スタブジン	100000	10000	1000	100	10
ネビラピン	100000	10000	1000	100	10
インジナビル	100000	10000	1000	100	10

表 3. 眼瞼発赤の経時的変化

流涙は経過観察中どの投与群にも何らかの

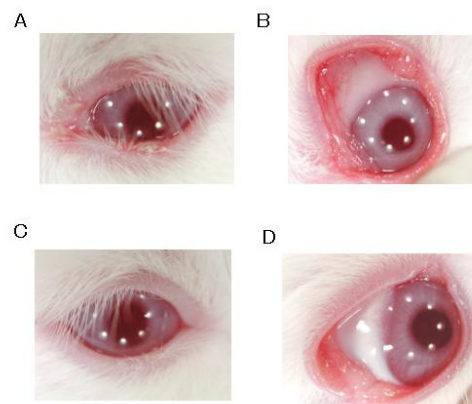


図 1. シドフォビル及び対照点眼による結膜、眼瞼の変化

A, B はシドフォビル群, C, D は対照群を示

A, Bはシドフォビル群, C, Dは対照群を示す。A, Cは結膜, B, Dは涙小管を示す。ヘマトキシリンエオジン染色。

変化は肉眼的には認められなかった。シドフォビル点眼群について、点眼開始前および14日後の眼瞼および角結膜所見の写真を図1に示すが、涙道の通水試験は経過観察中、全ての動物において通過障害は見られなかった。一方、涙小管直径の2週間の変化を経時的に見ると、対照のBSS群とザルシタピン、ザニルブジン群は大きな変化はなく、経過したのに対し、シドフォビル群では10日および14日目の涙小管直径がBSS群に対して、有意な縮小が見られた(表4)。病理組織学的に

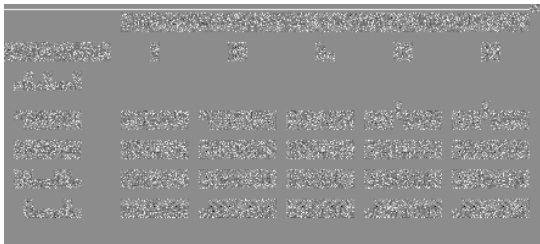


表4. 涙小管直径の経時的な変化

シドフォビル点眼群とBSS群を、結膜と涙小管で比較検討したが、シドフォビル点眼群では、結膜上皮細胞および結膜杯細胞の減少や、好酸球の浸潤などのアレルギー性炎症を示唆する所見が見られたが、毒性による壊死性変化は認められなかった(図2)。

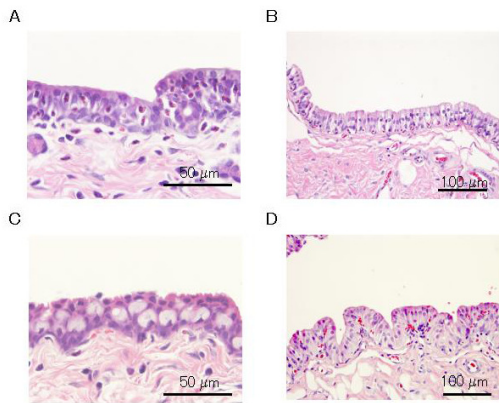


図2. シドフォビル及び対照点眼による結膜、眼瞼の変化

(3) アデノウイルス接着阻害薬の抗ウイルス作用の*in vitro*における検討
GRGDSP peptideのCC₅₀は2318 μg/mlであった。そこで、予備実験で抑制効果を認められた1000 μg/mlおよび500 μg/mlの2濃度で各種アデノウイルス血清型に対する増殖抑制効果をreal time PCR法で検討し

たところ、これらの濃度のいずれにおいても対象と比較して有効性が見られた(表5)。GRGDSP peptideのEC₅₀は0.04から1.35 μMの間に分布していたが、血清型の中では特に3型に対して有効で、対照的に4型には無効であった。

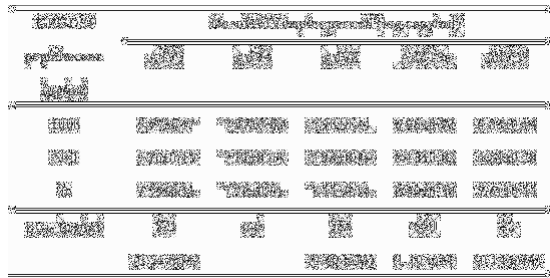


表5. GRGDSP peptideの抗アデノウイルス効果

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9件)

1. ファン・ジェーン, 瀧本峰洋, 林英之, 内尾英一: 両眼に発症した海外でのLASIK後の感染性角膜炎の1例. 臨床眼科 62: 179-183, 2008 査読有
2. 梶原 淳, 小沢昌彦, 野田美登利, 内尾英一: 潰瘍性大腸炎に併発したカンジダ角膜炎の1例. 臨床眼科 62: 1285-1288, 2008 査読有
3. Uchio E, Kimura R, Huang Y-H, et al: Anti-adenoviral effect of α5β1 integrin receptor ligand, GRGDSP peptide, in serotypes that cause acute keratoconjunctivitis. Ophthalmologica 221: 326-330, 2007 査読有
4. Uchio E, Fuchigami A, Kadonosono K, et al: Anti-adenoviral effect of anti-HIV agents in vitro in serotypes inducing keratoconjunctivitis. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 245: 1319-1325, 2007 査読有
5. 井上浩利, 門之園一明, 内尾英一, 他: 沖縄における流行性角結膜炎の長期時系列分析: 日本眼科学会雑誌 111: 711-715, 2007 査読有
6. 内尾英一: 新感染症学(下) 流行性角結膜炎. 日本臨床 65(増): 321-325, 2007 査読有
7. 内尾英一: 新感染症学(下) 急性出血性結膜炎. 日本臨床 65(増): 374-379, 2007 査読有
8. 内尾英一: アデノウイルス結膜炎の研究における最近の進歩. 日本眼科学会雑誌 111: 929-930, 2007 査読有

9. Kimura R, Uchio E, Kadonosono K, et al: Antiviral activity of nucleoside reverse transcriptase inhibitors in adenovirus in vitro. Med Bull Fukuoka Univ 33: 277-282, 2007

[学会発表] (計 15 件)

1. 内尾英一: アデノウイルス. ビジョンケアセミナー2008. 2008年11月22日, 東京都
2. 内尾英一: ウイルス性眼感染症の治療の現状. 第8回群馬臨床ウイルス研究会. 2008年11月13日, 前橋市
3. 井上浩利, 安里良盛, 松井孝明, 内尾英一: アデノウイルス結膜炎の免疫クロマトグラフィ法における偽陽性反応の検討. 第62回日本臨床眼科学会総会. 2008年10月9日, 東京都
4. 内尾英一: ウイルス性結膜炎の最近の話題. 第7回宮城県セミナー. 2008年7月20日, 仙台市
5. Inoue H, Kimura R, Migita H, Uchio E: Is it possible to detect the presence of adenovirus in conjunctiva before the onset of conjunctivitis? 79th ARVO. 2008年5月1日, Ft. Lauderdale, FL, USA
6. 井上浩利, 木村亮二, 内尾英一, 他: アデノウイルス結膜炎潜伏期におけるアデノウイルス検出の可能性の検討. 第112回日本眼科学会総会. 2008年4月16日, 横浜市
7. 内尾英一: ウイルス性結膜炎はなぜ流行し続けるのかー臨床と研究の接点からー. 第63回徳島眼科研究会. 2008年2月23日, 徳島市
8. 井上浩利, 園田康平, 内尾英一, 他: 抗HIV薬の実験動物における眼局所毒性の評価. 第8回日本アデノウイルス研究会. 2007年10月21日, 札幌市
9. Inoue H, Ishikawa M, Sonoda K-H, Uchio E: Evaluation of local ocular toxicity in candidate anti-adenoviral agents in vivo. 78th ARVO. 2007年5月7日, Ft. Lauderdale, FL, USA
10. 井上浩利, 熊野祐司, 内尾英一, 他: 福岡における流行性角結膜炎のアデノウイルス遺伝子解析. 第111回日本眼科学会総会. 2007年4月20日, 大阪市
11. Huang JY, Uchio E, Hayashi A, et al: Anti-adenoviral effect of adenoviral receptor antagonists. 77th ARVO. 2006年5月6日, Ft. Lauderdale, FL, USA
12. Fuchigami A, Uchio E, Hayashi A, et al: Evaluation of anti-adenoviral effect of anti-HIV agents in vitro. 77th ARVO. 2006年5月6日, Ft. Lauderdale, FL, USA
13. 井上浩利, 門之園一明, 内尾英一, 他: 沖縄における流行性角結膜炎の長期時系列分析. 第110回日本眼科学会総会. 2006

- 年4月20日, 大阪市
14. 内尾英一: アデノウイルス研究の成果と展望ー結膜炎から分子生物学へー. 関西眼疾患研究会. 2006年3月9日, 京都市
 15. 内尾英一: アデノウイルス性結膜炎のすべて. 筑豊ブロック眼科医会講演会. 2006年1月15日, 飯塚市

[図書] (計 6 件)

1. 内尾英一: 文光堂. 眼科プラクティス 22巻, 超高齢者の眼感染症の特徴. 2008, 84-87
2. 内尾英一: 中山書店. 看護のための最新医学, 第20巻眼科疾患, 改訂版, 抗菌薬, 抗ウイルス薬, 抗真菌薬および抗アメーバ薬. 2008, 220-224
3. 内尾英一: 南山堂. 結膜疾患, TEXT眼科学第2版, 坪田一男, 大鹿哲郎編. 2007, 134-139
4. 内尾英一: 文光堂. 今日の眼疾患治療指針 第2版, アデノウイルス結膜炎. 2007, 102-103
5. 内尾英一: 文光堂. 眼科プラクティス, 前眼部アトラス大鹿哲郎編, アデノウイルス結膜炎. 2007, 35-39
6. 内尾英一: メジカルビュー社. 眼科インストラクションコース, ウイルス性結膜炎. 2006, 177

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし