

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592269

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開発と臨床応用に関する研究

研究課題名（英文） Research on the development of the new medical treatment and its clinical use in adenoviral ocular infection

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（和文）：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。インターフェロンではインターフェロン b および g のいずれもアデノウイルス増殖抑制効果が見られた。抗菌ペプチドである LL-37 にも抗アデノウイルス作用が見られたが、4 型には無効であった。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薬となる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：We evaluated anti-adenoviral activity of candidate agents *in vitro*. Among interferons, both interferon beta and gamma showed significant antiviral effect on adenovirus. LL-37, an antimicrobial peptide, also had antiadenoviral activity on all types except for type 4. These results suggest that these agents might be used safely for treatment of human adenoviral conjunctivitis in the near future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：臨床医学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・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

アデノウイルスは眼科領域においては、流行性角結膜炎 (epidemic keratoconjunctivitis; EKC) 及び咽頭結膜熱 (pharyngoconjunctival fever; PCF) などの感染症の原因ウイルスであり、日本を含む東および東南アジア地域は、気象要因などからこれらアデノウイルス結膜炎の発症数が世界的にも多い。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。その一方、眼科、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、社会的問題となっている。免疫抑制状態では、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生じ、致命的な側面もあるが、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。そこで、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, アデノウイルスレセプターと薬物作用部位の関連の解析などを総合的に行っていく研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は, 抗アデノウイルス作用が存在する可能性のある薬物を *in vitro* の実験系における選択から包括的, 網羅的に行うことがあげられる。対象薬物としては, 核酸系および非核酸系逆転写酵素阻害薬, プロテアーゼ阻害薬などの抗 HIV 薬, シドフォビル, ガンシクロビルなどの核酸アナログ誘導体などの既存の抗ウイルス薬がある。また化学合成物質として, アデノウイルス吸着阻害作用を持つ酸化シアリリピッド(NMSO₃)や生理活性物質である内因性殺菌性オキシダントや抗菌ペプチドの中から hCAP-18, N-chlorotaurine などが候補薬として対象になる。またアデノウイルスレセプター阻害物質として, $\alpha 5\beta 1$ インテグリンアンタゴニストや, インターフェロン γ および β などが検討の対象になる。このような広範囲の網羅的な薬物を対象とした探索的なアデノウイルス治療薬研究が本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 動物肺炎モデルにおける抗アデノウイルス効果の比較

動物としてはGuinea pigを用いた。感染ウイルスには呼吸器感染ではB種ないしC種が主となり, 臨床的にも重篤であるが, これはわが国では結膜炎をほとんど起こさないという特徴があるため, C種のアデノウイルス5型および8, 37型の複数血清型の感染モデルとした。A549細胞で培養して, 十分な力価となったウイルス液を, 経鼻的に肺へ吸入させる。In vitroの抗アデノウイルス作用が確認されたザルシタピン, スタブジンおよびシドフォビルを投与開始日を感染前後でいくつかのパターンとした治療スケジュールで全身投与し, 発症が抑制されるかどうかを, 血中のアデノウイルスDNA量を採血しながらモニタリングし, real-time PCR法で経時的に解析した。

(2) インターフェロンのアデノウイルス増殖抑制作用の検討

AdV3, 4, 8, 19a および 37 型株を用い, A549 細胞を使用した。19a 型以外は標準株である。濃度の異なる IFN- β および IFN- γ を作用させた後, 7 時間培養し, ウイルス DNA 量をリアルタイム PCR 法で測定した。

(3) LL-37 の抗アデノウイルス作用の解析

A549 細胞をウイルス培養に使用し, 3, 4, 8, 19a および 37 型を用いた。既報と同様に, LL-37 の種々の濃度で作用させたアデ

ノウイルスを 24 時間経過後に, 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。

4. 研究成果

(1) いずれの血清型も無治療の状態では全身感染が成立した。抗ウイルス薬の予防的投与を行った場合, いずれの薬剤でも有意なウイルスDNAの抑制がみられた。また感染後からの投与ではザルシタピン, スタブジンは全ての血清型でウイルスDNAコピー数の減少がみられたが, シドフォビル投与では有意な減少は8および37型ではみられなかった。

(2) IFN- β は濃度依存性の抑制効果を全ての型に示した。IFN- β の EC₅₀は 211~843 IU/ml であった(表 1)。IFN- γ にも同様の傾向が見られ, EC₅₀は 133~9130 IU/ml に分布していた(表 2)。型の中では IFN- γ は AdV37 に対して最も効果が強く見られた。一方, AdV4 に対する IFN- γ の効果は最も小さかった。統計学的に有意な濃度依存性はいくつかの型に対していずれの薬剤も見られた。

表 1. インターフェロン β の各アデノウイルス型に対する増殖抑制効果

IFN- β conc. (IU/ml)	No. of AdV copies per cell \pm standard deviation (log copies/ml)				
	AdV3	AdV4	AdV8	AdV19a	AdV37
30,000	3.91 \pm 0.06*	7.52 \pm 0.08*	6.23 \pm 0.10*	8.67 \pm 0.35*	8.24 \pm 0.28*
10,000	4.65 \pm 0.30*	7.93 \pm 0.13*	6.29 \pm 0.06*	9.18 \pm 0.15*	8.30 \pm 0.11*
1000	4.84 \pm 0.11*	8.43 \pm 0.15*	6.54 \pm 0.40*	9.44 \pm 0.54*	8.29 \pm 0.23*
0	5.54 \pm 0.18	9.55 \pm 0.13	7.90 \pm 0.19	9.96 \pm 0.07	9.01 \pm 0.29
EC ₅₀ (IU/ml)	720	211	462	843	674
Selectivity index	433	1479	675	370	463

表 2. インターフェロン γ の各アデノウイルス型に対する増殖抑制効果

IFN- γ conc. (IU/ml)	No. of AdV copies per cell \pm standard deviation (log copies/ml)				
	AdV3	AdV4	AdV8	AdV19a	AdV37
15,000	9.87 \pm 0.17*	9.79 \pm 0.55*	7.89 \pm 0.94*	10.37 \pm 0.47*	9.82 \pm 0.66*
3000	10.34 \pm 0.05*	10.38 \pm 0.01	8.11 \pm 0.76	10.48 \pm 0.06*	10.20 \pm 0.55*
750	10.55 \pm 0.05*	10.44 \pm 0.03	8.66 \pm 0.76	10.72 \pm 0.07*	10.40 \pm 0.09*
0	10.83 \pm 0.07	10.52 \pm 0.21	9.12 \pm 0.15	11.28 \pm 0.04	11.02 \pm 0.09

EC ₅₀					
(IU/ml)	920	9130	514	204	133
Selectivity					
index	159	16	284	717	1100

(3) LL-37 の 50%有効濃度(EC₅₀) は型により異なるが、118 から 270 μM であった。LL-37 はいずれの型にも濃度依存性の増殖抑制作用が見られたが、4 型には無効であった (表 3)。

表 3. LL-37 の各アデノウイルス血清型に対する抑制作用

LL-37 concentration (μg/ml)	No. of HAdV copies per cell (log copies/ml; mean±standard error of the mean)				
	HAdV type	HAdV4	HAdV8	HAdV19a	HAdV37
3 (HAdV3)					
Control	5.81±0.17	9.44±0.35	8.29±0.17	10.1±0.018	9.96±0.059
55	5.72±0.014	9.80±0.43	8.29±0.78	10.0±0.13	9.89±0.63
110	5.65±0.19	9.52±0.19	8.18±0.76	9.90±0.63	9.71±0.007
220	5.56±0.16	9.81±0.063	7.41±0.94	9.24±0.31*	9.57±0.81
440	5.15±0.68*	9.90±0.093	6.28±0.19*	8.96±0.12*	9.44±0.50
EC ₅₀ (μg/ml)	270	n.d.	144	118	172
Selectivity index	16.3	n.d.	30.6	37.3	25.6

これらの結果から、特異的抗アデノウイルス作用を有する薬剤が、動物実験でその有効性を確認され、さらにはヒトへの治験を経て臨床応用が可能になれば、アデノウイルス結膜炎のみならず上気道感染症としてのアデノウイルス感染症にも治療機会が広がっていくと考えられる。治療期間の短縮が得られれば、社会的、公衆衛生学的にも意義の大きな成果となると考えられる。また罹患者の Quality of life の面でも大きな利益をもたらすことができる。また、骨髄移植や免疫抑制状態の症例にアデノウイルス感染症が発症すると、肺炎、出血性膀胱炎などウイルス血症を背景に致死的な転機を取ることから、臨床の現場では、既存のいくつかの抗ウイルス薬が全身投与されて、治療効果が報告されている。このような観点から、本研究の成果は抗アデノウイルス薬における今後の新しい治療アプローチの一つとして重要であり、臨床的な意義も大きいといえる。

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 11 件)

- Ishikawa M, Kubo M, Maeda S, Sawada Y, Uchio E, Yoshitomi T: Structural changes in the lacrimal sac epithelium and associated lymphoid tissue during experimental dacryocystitis. *Cin Ophthalmol* 5: 1567-1574, 2011 査読あり
- Uchio E, Inoue H, Fuchigami A, Kadonosono K: Anti-adenoviral effect of interferon-beta and interferon-gamma in serotypes that cause acute keratoconjunctivitis. *Clin Exp Ophthalmol* 39: 358-363, 2011 査読あり
- 内尾英一, 大野重昭: 感染症—眼科. 総合臨床: 59, 871-874, 2010 査読なし
- 内尾英一: ウイルス性結膜炎の治療. 日本医事新報 4473: 75-76, 2010 査読なし
- 内尾英一: アデノウイルスに対する治療薬に関する最近の研究について教えてください. あたらしい眼科 26(臨増): 229-231, 2010 査読なし
- 塚原朋子, ファン・ジェーン, 小山田剛, 内尾英一: 細菌性角膜炎に対する深層層状角膜移植後に生じたヘルペス性角膜内皮炎の 1 例. *臨床眼科* 64: 1287-1291, 2010 査読あり
- Uchio E, Inoue H, Kadonosono K, Ishiko H: Antiviral effect of N-chlorotaurine against adenovirus in vitro in serotypes causing keratoconjunctivitis. *Clin Ophthalmol* 4: 1325-1329, 2010 査読あり
- 塩田 洋, 大野重昭, 青木功喜, 安積淳, 石子博昭, 井上幸次, 薄井紀夫, 内尾英一, 金子久俊, 熊倉重人, 田川義継, 谷藤泰寛, 中川尚, 日隈陸太郎, 山崎修道, 横井則彦: アデノウイルス結膜炎院内感染対策ガイドライン. *日本眼科学会雑誌* 113: 25-46, 2009 査読あり
- 内尾英一, 大野重昭: ウイルス性結膜炎ガイドライン. あたらしい眼科 26: 869-873, 2009 査読あり
- Kimura R, Migita N, Kadonosono K, Uchio E: Is it possible to detect the presence of adenovirus in conjunctiva before the onset of conjunctivitis? *Acta Ophthalmologica Scand* 87: 44-47, 2009 査読あり
- Inoue H, Sonoda K, Ishikawa M, Kadonosono K, Uchio E: Clinical evaluation of local ocular toxicity in candidate anti-adenoviral agents in vivo.

Ophthalmologica 223: 233-238, 2009 査読あり

[学会発表] (計 20 件)

1. 内尾英一: 新型アデノウイルスと結膜炎に関する新しい知見について. 第 28 回鳥取県眼科学術講演会. 2011 年 12 月 8 日. 米子市. 特別講演
2. Fujita H, Huang J, Kozawa M, Yoshidomi S, Sera N, Oniki S, Hanaoka N, Okabe N, Fujimoto T, Uchio E: A case of epidemic keratoconjunctivitis detected adenovirus type 56. 4th China-Korea-Japan Joint Meeting of Ophthalmologists. 2011 年 11 月 2 日. Seoul (韓国) 展示
3. 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. 第 65 回日本臨床眼科学会総会. 2011 年 10 月 9 日. 東京都. 展示
4. Uchio E, Huang J, Fuchigami A, Inoue H. Possibilities of the treatment of adenoviral infection and survey of candidate agents. 2nd Workshop on Human Adenovirus. 2011 年 9 月 13 日. 札幌市. シンポジウム
5. 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. 第 49 回六大学眼科研究会. 2011 年 9 月 6 日. 福岡市. 口演
6. 内尾英一: 新型アデノウイルスと結膜炎に関する新しい知見について. 第 81 回九州眼科学会. 2011 年 5 月 26 日. 那覇市. 教育講演
7. 内尾英一: 結膜診療のコツ. 第 115 回日本眼科学会総会. 2011 年 5 月 13 日. 東京都. シンポジウム
8. Kadonosono K, Uchio E: Anti-adenoviral Effect of Interferon-beta And Interferon-gamma In Serotypes That Cause Acute Keratoconjunctivitis. 82nd ARVO. 2011 年 5 月 4 日. Ft Lauderdale (米国). 展示
9. 内尾英一: 新型アデノウイルスとは何か. 第 5 回西日本オキュラーサーフェスクラブ. 2011 年 4 月 14 日. 福岡市. 講演
10. 内尾英一: ウイルス性結膜炎の最近のトピックス. 第 157 回大分県眼科集談会. 2010 年 9 月 11 日. 大分市. 特別講演
11. 内尾英一: 治療と感染予防. 第 11 回日本アデノウイルス研究会. 2010 年 7 月 8 日. 東京都. シンポジウム
12. Tsukahara T Inoue H, Huang J, Ozaki H, Kadonosono K, Ishiko H, Uchio

E: Antiadenovirus Activities of the Hcap-18, Antimicrobial Peptide, in vitro in Serotypes Inducing Keratoconjunctivitis. 81st ARVO. 2010 年 5 月 7 日. Ft. Lauderdale (米国). 展示

13. Huang JY, Uchio E, Inoue H, Kadonosono K, Ishiko H: Antiviral Effect of N-Chlorotaurine Against Adenovirus in vitro in Serotypes Inducing Keratoconjunctivitis. 81st ARVO. 2010 年 5 月 6 日. Ft. Lauderdale (米国). 展示
14. ファン・ジェーン, 内尾英一, 井上浩利, 門之園一明, 石古博昭: N-chlorotaurine のヒトアデノウイルス増殖抑制作用. 第 114 回日本眼科学会総会. 2010 年 4 月 12 日. 名古屋市. 展示
15. 内尾英一: ウイルス性結膜炎の最近のトピックス. 瀬戸内眼科コロシウム. 2009 年 9 月 15 日. 岡山市. 教育講演
16. 内尾英一: ウイルス性結膜炎の最近の話題. 第 6 回兵庫県オキュラーサーフェス研究会. 2009 年 9 月 8 日. 神戸市. 特別講演
17. 井上浩利, 門之園一明, 青木功喜, 大野重昭, 内尾英一: 抗菌ペプチド hCAP-18 のヒトアデノウイルス増殖抑制作用. 第 113 回日本眼科学会総会. 2009 年 4 月 6 日. 東京都. 口演
18. 内尾英一: 消毒薬と院内感染. 第 113 回日本眼科学会総会. 2009 年 4 月 5 日. 東京都. シンポジウム
19. 井上浩利, 門之園一明, 青木功喜, 大野重昭, 内尾英一: 抗菌ペプチド hCAP-18 のヒトアデノウイルス増殖抑制作用. 第 166 回九州大学眼科研究会. 2009 年 2 月 6 日. 福岡市. 口演
20. 内尾英一: ウイルス性結膜炎の最近の話題. 第 1 回神奈川県眼科ウイークエンドセミナー. 2009 年 1 月 21 日. 横浜市. 特別講演

[図書] (計 14 件)

1. 内尾英一: VIII. 基礎的知識, D. 微生物学, 1. 眼疾患の病原微生物の種類. 眼科学, 第 2 版, 丸尾敏夫, 本田孔士, 本田孔士, 臼井正彦監修. 文光堂. 1588-1591, 2011
2. 内尾英一: IX. 社会的知識, A. 予防医学・産業医学, 1. 眼科予防医学, 2. 疫学. 眼科学, 第 2 版, 丸尾敏夫, 本田孔士, 本田孔士, 臼井正彦監修. 文光堂. 1624-1626, 2011
3. 内尾英一: I. 構造とその病態, C. 結膜, 2. 結膜の病態, 1) 結膜の炎症. 眼科学, 第 2 版, 丸尾敏夫, 本田孔士, 本田孔士, 臼井正彦監修. 文光堂. 48-52, 2011
4. 内尾英一: アデノウイルス結膜炎 PCF. 眼科診療クオリファイ, 大橋裕一編. 中山

書店. 2, 38-41, 2010

5. 内尾英一: アデノウイルス結膜炎 EKC. 眼科診療クオリファイ, 大橋裕一編. 中山書店. 2, 42-45, 2010

6. 内尾英一: クリニカルクエスション アデノウイルス結膜炎にステロイドを使用しますか?. 眼科診療クオリファイ, 大橋裕一編. 中山書店. 2, 63-65, 2010

7. 内尾英一: アデノウイルスはなぜ特定の型だけが結膜炎を起こすのか. 視覚のサイエンス, 根木昭編. 文光堂. 50-51, 2010

8. 内尾英一: 眼瞼の感染症. 今日の診断指針, 第6版, 金澤一郎, 永井良三総編集. 医学書院. 1606-1607, 2010

9. 内尾英一: 眼瞼, 結膜, 涙器. 標準眼科学, 第11版, 木下茂, 中澤満編, 医学書院. 174-184, 2010

10. 内尾英一: ウイルス学的検査. 眼の感染症, 下村嘉一編. 金芳堂. 124-128, 2010

11. 内尾英一: 第5章 結膜疾患. 現代の眼科学, 改訂第10版, 吉田晃敏, 谷原秀信編. 金原出版. 76-87, 2009

12. 内尾英一: 免疫クロマトグラフィー. 眼科プラクティス, 眼感染症の謎を解く、大橋裕一編. 文光堂. 28, 246-247, 2009

13. 内尾英一: 伝染性結膜炎の対処. 眼科プラクティス, 眼感染症の謎を解く、大橋裕一編. 文光堂. 28, 258-259, 2009

14. 内尾英一: 伝染性病原体 a.アデノウイルス, b.エンテロウイルス, コクサッキーウイルス. 眼科プラクティス, 眼感染症の謎を解く、大橋裕一編. 文光堂. 28, 378-379, 2009

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