

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08502

研究課題名(和文) 小児の急性致死性脳炎の原因ウイルスに対する治療薬候補のマウスモデルを用いた評価

研究課題名(英文) Evaluation of potential therapeutic agents against the virus causing acute fatal encephalitis in children using a mouse model.

研究代表者

伊藤 睦代(高山睦代)(Mutsuyo, Ito)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・室長

研究者番号：70392313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Chandipura virus (CHPV) はインドで致死率50-70%を示す小児の急性脳炎の原因ウイルスであるが、有効な治療法や動物モデルは確立されていない。本研究ではCHPVに対する抗ウイルス薬治療の開発を目的とする。

CHPVは免疫不全マウスであるSCIDマウスで致死感染を起こす。そこで、In vitroで増殖阻害効果を示す Favipiravirについて調べたところ、優れた生存期間の延長と各臓器および血中のウイルス力価の低下が見られた。また、スクリーニングにより新たにCHPVにin vitroで効果を示す4つの薬剤を発見し、このうち2剤が併用により相乗効果を持つことを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CHPVは致死率が極めて高い感染症であり、有効な治療法は確立されていない。これまでに、数種類の薬剤等がin vitroで効果を示すことが報告されているが、in vivoで効果を検証したものはない。本研究では新たに開発したSCIDマウスのモデルが抗ウイルス薬の薬効評価に有用であることを明らかとした。今後の候補薬剤の評価に使用されることが期待される。また、本研究で新たな治療薬候補とその併用による相乗効果が証明され、治療法の構築に向けた重要な知見を提供できたと考えている。

研究成果の概要(英文)：Chandipura virus (CHPV) causes acute encephalitis in children, with a fatality rate of 50-70% in India. However, no effective treatment or animal model has been established to date. This study aimed to develop antivirals against CHPV.

We previously reported that CHPV causes lethal infection in immunocompromised SCID mice. Using SCID mice, we demonstrated that favipiravir inhibited the propagation of CHPV in vitro and that treatment with favipiravir significantly prolonged the survival of CHPV-infected mice and reduced viral titers in various organs, including the blood. In addition, drug screening revealed four new drugs that were effective against CHPV in vitro, two of which showed synergistic effects when used in combination.

研究分野：Virology

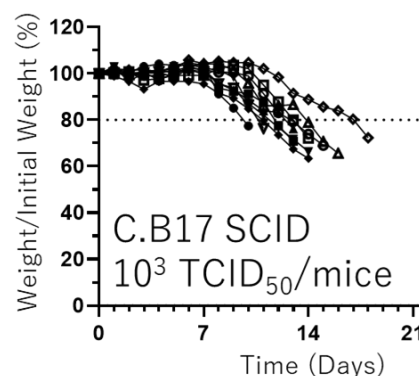
キーワード：急性脳炎 治療薬 動物モデル SCIDマウス スクリーニング

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ラブドウイルス属に属する Chandipura virus (CHPV) は小児の急性脳炎を起こす。致死率は 50-70%と極めて高いが、有効な治療法は確立されていない。in vitro で CHPV に効果を示す薬剤が数種類報告されているが、in vivo での効果は検証されていない。これは、適当な動物実験モデルがなかったことが一因である。申これまで、発症致死に至る動物モデルは“10 日齢の哺乳マウスへの腹腔内接種”と“成熟マウスへの脳内接種”しかなかった。請者らは薬効評価のため、免疫不全マウスを用いることを試みた。ガンなどの研究で汎用されている高度免疫不全マウス (SCID マウス) は B および T 細胞機能を欠如している。易感染性となっていることから、アデノウイルス(Lenaerts L et al. Am Soc Microbiol, 2005)、エンテロウイルス 71 型(Liao CC et al. J Virol, 2014)およびインフルエンザウイルス (Pascua PNQ et al. J Antimicrob Chemother, 2019)のモデルとしても使用されている。

CHPV を SCID マウスに眼窩静脈叢から静脈内投与すると、右図に示すように 1 週間程度の潜伏期を経て体重減少を示した。さらに数日後から神経症状を呈して、死亡(または安楽殺)した。このことから、宿主の免疫系を介して効果を示す薬剤には使用できないものの、通常の薬剤の評価においては有用なモデルであると考えられた。



2. 研究の目的

本研究では CHPV に対する効果的な治療法の開発に資することを目的とし、favipiravir を含む選択された薬剤の in vitro および in vivo での薬効評価を行う。

3. 研究の方法

① Favipiravirのin vivo での薬効評価

広範な RNA ウイルスに対して効果があることが報告されている。核酸アナログの favipiravir について、CHPV についても in vitro でウイルス増殖抑制効果が見られた。そこで、SCID マウスに CHPV を接種し、発症前もしくは発症後から 10 日間、300 mg/kg/day の favipiravir を経口投与した。体重と症状を毎日観察し、非投与群と比較して症状や生存率に違いが見られるかについて確認した。経時的に各臓器を採取し、臓器中のウイルス力価を測定した。

② 候補薬剤の in vitro での薬効評価

候補薬剤について、まず in vitro での薬効を評価するため、50%および 90%阻害濃度 (薬剤非存在下でのウイルス力価を 100%とした場合に、ウイルス力価を 50%および 90%以上低下させる濃度) を算出した。

③ 候補薬剤の in vitro での併用効果

②において候補となった薬剤について、論文や薬剤の情報を検索して候補となる併用剤を選出した。in vivo で到達可能な濃度で高い増殖阻害効果を示した抗 HIV 薬である Nelfinavir と抗蠕虫薬である Niclosamide について、in vitro での併用による相乗効果を評価した。

④ハムスターモデルの開発

我々の開発した SCID マウスのモデルは favipiravir のような核酸アナログやインヒビターなどの評価には有用である一方、Immunomodulator として働く薬剤の評価において、T 細胞及び B 細胞が機能不全であるため評価が難しいという弱点がある。そこで、免疫システムが正常に機能しているモデル動物として、エボラウイルスや SARS-CoV-2 でも用いられているハムスターを候補としてモデル開発を試みた。

4. 研究成果

① 我々が開発した SCID マウスモデルでは約 1 週間後から体重減少や神経症状を示す。そこで、CHPV 接種後 5~14 日（発症前投与群）および 9~18 日間 Favipiravir を経口投与した。その結果、どちらのグループも優位な生存期間の延長と各臓器および血中のウイルス力価の低下が見られた。

これらのことから、Favipiravir は CHPV 感染における治療薬候補となることが示唆された。また、SCID マウスモデルは薬剤効果判定において有用であることが示された。

② 選択された 4 つの薬剤(Digitoxin, Nelfinavir, iclosamide, Ponatinib)について Vero、BHK および SK-N-SH 細胞を用いて解析を行った。その結果、これら薬剤は容量依存的な CHPV の増殖阻害効果を示した。各薬剤の Selectivity Index (SI)は 50 以上となり高い効果が示された。各薬剤は 48 時間以上の監査により Cell toxicity が現れることにより、が減少する傾向にあったものの、SI は 1.0 以上を保持していた。特に Niclosamide と Nelfinavir は in vivo で到達可能な濃度で高い増殖阻害効果を示した。

これらのことから、CHPV に対する抗ウイルス薬候補として、新たに Niclosamide と Nelfinavir を見つけることが出来た。

Selectivity Index; Vero cell

	50%, 90%, 99% Inhibitory Concentrations			Selectivity Index (SI) = 50% Cytotoxic Concentration / IC50		
	IC50* (μ M)	IC90* (μ M)	IC99* (μ M)	24 hours	48 hours	72 hours
Digitoxin	0.11	0.18	0.25	>910	2.28	1.63
Nelfinavir	1.70	3.97	6.78	>59	14.07	10.33
Niclosamide	0.09	0.15	0.21	>110	1.26	1.06
Ponatinib	0.18	1.72	2.95	>56	31.70	29.61

*IC₅₀, IC₉₀, IC₉₉ measured at 24 hrs

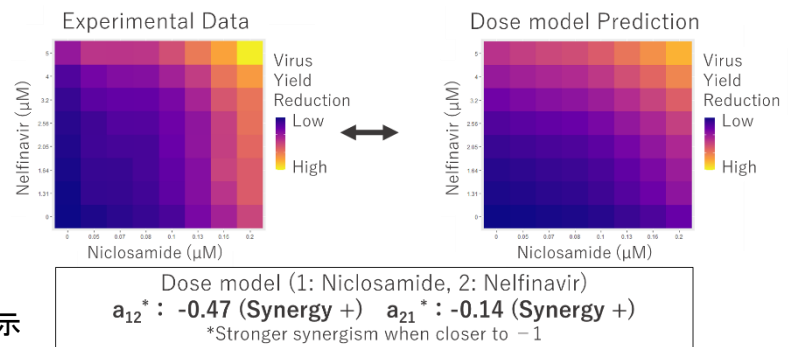
**CC₅₀ measured at 24, 48, 72 hrs

③ Niclosamide と Nelfinavir について in vitro での併用効果を解析した。単剤での効果や細胞毒性の結果から適当な希釈段階を算出した。Niclosamide では 0.20~0.05 μ M、Nelfinavir では 5.0~1.3 μ M の範囲で両薬剤の段階希釈液を作製した。Vero 細胞に CHPV を moi=0.01 で感染させ、薬剤混合液を添加した培養液を加え培養した。2 日後に培養上清を回収し、ウイルス力価をプラーク法で測定した。両薬剤の単剤および併用によるウイルス増殖抑制効果について R 及び RStudio を用いて解析を行った。Bliss 独立性モデルにより解析した結果、これら 2 つの薬剤は幅広い濃度領域において 1.1~3.3 倍の相乗効果を示すことが明らかとなった。さらに dose モデルによる解析の結果、A = Niclosamide、B = Nelfinavir としたとき、 $\alpha_{AB} = -0.47$ 、 $\alpha_{BA} = -0.14$ となり、両薬剤が双方向性に相乗効果

を示すことが分かった。Niclosamide は駆虫薬として知られており、抗炎症作用、アポトーシス阻害作用を持ち、広範囲のウイルスに対して抗ウイルス作用を示すことが報告されている。また、抗 HIV 薬である Nelfinavir は、HIV のウイルスプロテアーゼ阻害薬とされている。しかし、近年 SARS-CoV-2 に対する抗ウイルス効果が報告されており、動物モデルにおいて、ウイルス量の減少がな

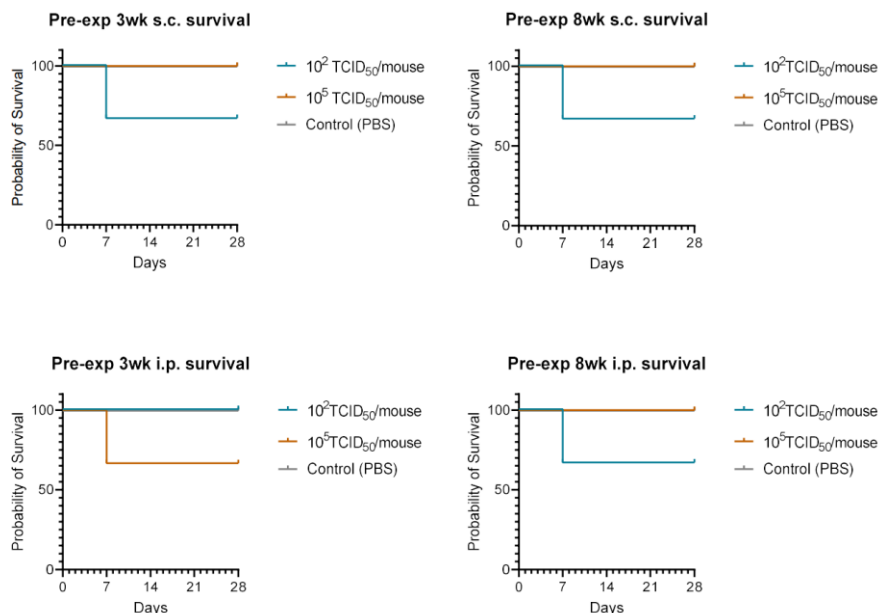
いにも関わらず、肺への好中球の浸潤増加と症状の軽減が見られており、immunomodulator としての働きが示唆されている。

これらのことから、両薬剤が *in vitro* で正の相乗効果を示すことが明らかとなった。



④ 両薬剤の特性から *in vivo* での効果解析には、免疫システムが正常に機能しているモデル動物が必要だと考え、ハムスターを候補として実験を行った。その結果、CHPV を腹腔内及び皮下に接種した場合、12 匹中 2 匹の成熟ハムスターで致死感染が観察された。CHPV は通常成熟げっ歯類で致死性を示さないため、ハムスターは有望なモデルであると考えられた。一方、他個体は体重減少後回復しており、CHPV のげっ歯類への順化が必要であると示唆された。

ハムスターは正常な免疫を持つ成熟げっ歯類として、CHPV 感染により致死感染を示す初めてのモデルとなる。一方致死率は低く、さらなる改良が必要であることが分かった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kitaura Satoshi, Tobiume Minoru, Kawahara Madoka, Satoh Masaaki, Kato Hirofumi, Nakayama Noriko, Nakajima Nozomi, Komeno Takashi, Furuta Yousuke, Suzuki Tadaki, Moriya Kyoji, Saijo Masayuki, Ebihara Hideki, Takayama-Ito Mutsuyo	4. 巻 213
2. 論文標題 Evaluation of a novel severe combined immunodeficiency mouse model for antiviral drug evaluation against Chandipura virus infection	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Antiviral Research	6. 最初と最後の頁 105582 ~ 105582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.antiviral.2023.105582	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北浦 慧, 河原円香, 佐藤正明, 加藤博史, 仲山紀子, 伊藤 (高山) 睦代, 西條政幸, 森屋恭爾
2. 発表標題 2.High-throughput screening of drug compound library identifies antiviral compounds against Chandipura virus in vitro.
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------