

重症エンテロウイルス脳炎患者から EV71 分離の試み

分担研究者：米山徹夫 国立感染症研究所ウイルス 2 部

共同研究者：田野良夫、清水博之 国立感染症研究所ウイルス 2 部

研究要旨

重症の神経症状を伴った手足口病感染患者の検体のウイルス分離を行い、その解析を行った。13 例から採取された検体のうち 2 例よりウイルスを分離し、中和抗体によりエンテロウイルス 71(EV71)と同定した。さらに、分離ウイルスのウイルスゲノム上の VP4 領域の塩基配列の解析により、A-2 genotype に属することが判明した。

A. 研究目的

ヒトエンテロウイルスのウイルス学的解析においては分離されたウイルスの解析、とくに、軽症患者ならびに重症患者から分離されたウイルスのウイルス学的解析が重要である。本研究においては重症脳炎患者からのウイルス分離と分離されたウイルスの解析を行う。

B. 研究方法

EV71 感染が疑われた患者の便、咽頭拭い液、血清等からウイルスの分離を行った。使用した細胞は RD-A, Vero, MRC-5 細胞である。検体を 24 穴のプレートに接種後、36 度で 14 日間観察した。分離されたウイルスは標準株 BrCr に対する抗 EV71 の血清で中和して同定した。EV71 のゲノタイプを調べるために RNA を Roche の High Pure Viral RNA Kit で抽出した後、EVP-4 と OL68-1 のプライマーを用い、Promega の Access RT-PCR System で VP4/VP2 領域 320bp の塩基配列を決めて解析した。

C. 研究結果

手足口病感染が疑われた 13 人の患者の検体から、EV71 ウイルスの分離を試みた。2 人の患者の咽頭拭い液あるいは便から EV71 が分離できた (表 1)。血清や髄液からの検体からはウイルス分離はできなかった。分離された EV71 は VP4 領域の塩基配列を調べて A-2 ゲノタイプに属することが判明した。A-2 ゲノタイプはマレーシアで 1997 年に流行した手足口病から分離された EV71 と同じグループである。

D. 考察

EV71 の病原性を明らかにするために、今後も重症患者からのウイルス分離を続けていくことが必要と思われるが、咽頭拭い液か便検体などのウイルス分離が期待できる検体の入手に力をいれていきたい。髄液も直接病因との関係が明らかになるので興味ある検体である。McMinn P ら (Clin Infectious Diseases, 32: 236-242, 2001) は EV71 感染の神経病変は宿主の免疫反応の結果が主因であると報告している。エンテロウイルス感染がもたらす重病化のメカニズム

の解明には感染に対する宿主反応の分析も必要と思われる。

E. 結論

重症患者からのウイルス分離の例数を増やすことが病原性の解析に必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

○Yoneyama T, Karoji Y, Watanabe K, Tsuchiya

M, Nakano M and Miyamura T: Surveillance of poliovirus-isolates in Japan, 1999. Jpn J Infect Dis 53:90-91, 2000.

○Shimizu H, Agoh M, Agoh Y, Yoshida H, Yoshii K, Yoneyama T, Hagiwara A, and Miyamura T: Mutations in the 2C region of poliovirus responsible for altered sensitivity to benzimidazole derivatives. J.Virol. 74: 4146-4154, 2000.

H 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. エンテロウイルス感染が疑われた重症患者からEV71分離の試み

病院	患者数	陽性例	年齢	性	症状	材料	分離	ゲノタイプ
A	1	0	4歳	女	脳炎	血清、髄液、咽頭	陰性	
B	9	1	3ヶ月	女	HFMD+髄膜炎	*咽頭、血清、髄液	EV71	A-2
			7歳	男	脳炎	血清、髄液	陰性	
			1歳	女	HFMD+失調	血清	陰性	
			4歳	男	HFMD+髄膜炎	血清、髄液	陰性	
			3歳	男	髄膜炎 (Mumps vac)	血清、髄液、咽頭	陰性	
			1歳	男	小脳失調	血清	陰性	
			1歳	女	HFMD+小脳失調	血清	陰性	
			新生児		心筋炎 (死亡)	血清	陰性	
	母親	発熱、帝王切開	血清	陰性				
C	1	1	2ヶ月	男	ウイルス性髄膜脳炎	*便、咽頭、髄液	EV71	A-2
D	1	0	5歳	男	HFMD心筋炎、 肺水腫 (死亡)	血清	陰性	
E	1	0	3歳	男	HFMD + 髄膜脳炎	便、咽頭、髄液	陰性	
計	13	2						

*: 下線はEV71陽性検体

エンテロウイルス 71(EV71)感染または手足口病に合併した 脳幹部脳炎・肺水腫の 4 例の臨床解析

分担研究者 塩見 正司 大阪市立総合医療センター 小児救急科

研究要旨

以前より EV71 による手足口病には無菌性髄膜炎および小脳症状を中心とした予後良好な限局性脳炎が知られていた。しかし、EV71 によると考えられる肺水腫を合併した脳幹脳炎による急死例が、1997 年マレーシア・サラワク (30 例余)と大阪(3 例)でみられ、98 年には台湾(72 例)で多発し、注目を集めている。臨床的には手足口病あるいは単なる発熱で発症し、3-4 日後に急変し、急変後 24 時間以内死亡するという激しい経過が特徴である。99 年に EV71 感染による脳幹脳炎に肺水腫が合併した 1 例を経験し、頸動脈と頸静脈からの人工肺(ECMO)により救命することができた。MRI で延髄吻側背側部に小病変が描出され、延髄由来の神経性肺水腫の責任病巣と考えられた。また、ECMO の使用により、短期間で肺水腫が改善したこと、血清中のフェリチン、ネオプテリンが高値であったことは、肺水腫が可逆的であり、サイトカンなどの液性因子と関連があることを示唆しており、今後、本疾患の治療法、病態解明への重要な知見であると考えられた。また、手足口病やヘルパンギーナの症状が乏しく、発熱と急性肺水腫で発症した場合は EV71 感染との関連性が不明のままに、急死している可能性があり、今後、原因不明の乳幼児急性肺水腫という視点での疫学調査が必要と思われる。

A. 研究目的

1996 年以来マレーシア、大阪、台湾¹に発生した手足口病に合併した脳幹脳炎に伴う肺水腫 (以下便宜的に enterovirus brainstem/pulmonary syndrome EBPS と略) は、手足口病あるいはヘルパンギーナに罹患した乳幼児が発熱後 2-4 日で突然に肺水腫をきたして、呼吸困難となり、心エコーで左室収縮率の著しい低下、白血球数増多、高血糖、髄液細胞増多がみられ、剖検では心肺に感染はなく、脳幹神経細胞へのエンテ

ロウイルス 71 (EV71) 感染がみられる、などの特徴がある²。肺水腫出現後は 24 時間以内の急激な経過で死亡し、救命が困難である。我々は頸静脈-頸動脈経路の膜型人工肺 (VA-ECMO) により、救命された EBPS を経験したので、その臨床経過と EBPS の有効性について解析する。

B & C. 臨床

【症例】

患者は 5 歳、男で、弟が 2 日前からヘルパン

ギーナを発症していた。患児は 39℃台の発熱が 3 日間持続、口内炎、嘔吐、経口摂取不良のため、近医へ入院となり、点滴などの治療を受けた。運動失調などは明かではなかった。入院後 6 時間で突然呼吸困難が出現し、泡沫状の血性痰、胸部レ線上両側上肺野に浸潤影を認め、当院 ICU へ転院となった。

来院時、ショック状態で血圧測定不能、意識は傾眠状態、酸素マスク下 pH 7.12, pCO₂ 50, PaO₂ 40, BE -10, SpO₂ はで 80%で、無尿であった。気管内挿管後も血性泡沫痰は著明で急性肺水腫と診断され、心エコーで左室機能の低下(左室駆出率 LVEF 0.22)がみられたので、入院 3 時間後に VA-ECMO を開始、ショックを離脱し、排尿がみられた。翌日には肺水腫が消失、LVEF は 5 日後 0.48 に回復した。ショック期を除き意識は清明であった。この間、メチルプレドニンパルス治療 3 日間とガンマグロブリン 1g/kg/日を 2 日間投与した。第 8 病日に抜管を試みたが咳嗽が弱く、無気肺を来して再挿管となり、12 日目に抜管に成功した。嚥下障害・無声などの球麻痺症状がみられたが回復し、8 カ月後の現在、一側声帯の不全麻痺による軽度の嚙声の球麻痺症状を残すのみで、神経機能・心機能は正常となっている。

【主要な検査結果】

WBC32900/mm³, Hb 13.6g/dL, CRP 0.1mg/dL, 血糖 339mg/dL, AST 60IU/L, LDH430IU/L, 血小板 420000/mm³、フェリチン 8142ng/ml であった。髄液は細胞数 32/mm² (M 81% PMN 19%)、蛋白 45mg/dL。ネオプテリンは血清 179.5ng/ml(正常は 40>)、髄液 281.3(正常は 40>)であった。

【画像所見】

MRI では吻側延髄背側部にのみ小病変が描出された(図 1)。3 カ月後の検査でもほとんど変化がみられなかった。また、胸部 CT(図 2)で肺水腫が明瞭であった。肺水腫は上肺野に始まり、CT では重力によって、背側に分布するのが特

徴である。

【ウイルス学的検査】

患児(便、髄液)および弟(便)のウイルス分離は陰性であった。患児の血清中和抗体価の検査で EV71 (Br 株)に対して有意の抗体上昇がみられた。台湾の流行では咽頭から 95%で EV71 が分離されたが、便からは 40%、髄液からは分離されなかったと報告されている³⁾。

【大阪市における EV71 あるいは手足口病に関連した重症例】

大阪では 1997 年に手足口病あるいは EV71 に関連した急死例が 3 例あり、いずれも肺水腫を伴っていた²⁾。表 1、2 には今回の救命例とともに示す。高血糖、白血球数増多、髄液細胞数増多、フェリチン、血清と髄液のネオプテリンの高値が共通している。エンテロウイルスが原因と思われる他の無菌性髄膜炎では血清ネオプテリン 32±23 (n=12)、髄液ネオプテリン 204±102 (n=13)であったことと比較すると EBPS では血清ネオプテリンが高値であった。

D. 考察

手足口病に合併した脳幹脳炎に伴う肺水腫(EBPS)の肺水腫の病態は、EV71 ウイルス感染が心臓や肺にはみられず、脳幹神経細胞のみにみられることから、神経性の肺水腫と考えられている⁴⁾。肺水腫を合併した症例の救命例は極めてまれであり³⁾、今回の症例は貴重な救命例である。以下に本例で重要と思われる点を考察する。

(1) 脳幹病変部位について

EBPS の症例は全身状態が不良であり、MRI 検査が困難であり、肺水腫と関連した脳幹病変が明らかになった例は少ない。肺水腫を合併しない EV71 の脳幹脳炎の報告では延髄、橋、小脳歯状核、中脳に炎症性と思われる病変が描出され、後遺症を残さず軽快した症例では画像上の病変も消失する⁵⁾。一方、中枢性無呼吸で呼吸器依存などの重度後遺症の例では脳幹病変が

嚢胞性変化をきたしていることが報告されている⁵。EBPSの肺水腫と関連する病巣部位は、多数の延髄型ポリオの検索で背側延髄が病巣と指摘されていること⁶、EBPSの解剖例でも同部位に病変がみられることから、背側延髄と考えられている⁴。また、多発性硬化症で背側延髄に病変を生じ、肺水腫を来した症例が報告されているが⁷、今回報告例と酷似した病変部位である。一方、EV71感染で肺水腫を来していない症例においても延髄背側に病変が見られている⁸。したがって、延髄背側部の網様体や迷走神経背側核などが責任病巣である可能性が高いが、病変が形成される速度などの要因により肺水腫をきたすか、どうか異なるように思われる。本症例では延髄の病変は画像上持続しているが後遺症は軽度であった。

(2) Hantavirus pulmonary syndrome (HPS) との比較

肺水腫、左室機能低下は Hantavirus pulmonary syndrome (HPS) に類似しており、HPS でも同様に短期間の VA ECMO による救命例の報告がある⁹。HPS では肺血管内皮へのウイルスの感染とある種のサイトカイン (特に $\text{TNF}\alpha$) が肺水腫の原因と考えられている¹⁰。サイトカインによる肺毛細血管の透過性亢進が生じ、肺水腫を引き起こすと考えられており、剖検例では肺の血管内皮は正常構造であり、HPS が可逆的なことを示唆している。すなわち、サイトカインにより、血管内皮間の間隙が広がり、血液成分が血管腔から肺胞内へ滲出したものと考えられる。神経性肺水腫の発症機序としては、神経病変が形成されたときに、大量のカテコラミンが分泌され、体血管抵抗が上昇し、血液は低圧系である肺循環へシフトし、その結果、肺毛細血管内皮への圧が増し、内皮細胞間隙が拡大し、透過性が亢進、肺胞への血漿成分の濾過が起こる、といわれている。カテコラミンによる体血管抵抗の増大は 20 分程度で終了し、肺毛細血管の透過性亢進がしばらく残ると考えられている。しかし、異論も多い。

今回の報告は EBPS の VA ECMO による初の救命例であるが、3 死亡例ともフェリチン高値、血清・髄液ネオプテリン高値が共通してみられた。このことは EBPS においてもマクロファージの活性化、インターフェロンの高値が肺水腫と関連していることを示唆するものであろう。神経原性肺水腫におけるサイトカインの検討が必要である。

(3) EBPS という呼称の提案

本症は発熱中に突然出現する呼吸困難、泡沫状の血性痰が特徴で、胸部レントゲン、CT で肺水腫がみられるが、臨床現場でエンテロウイルス 71 による脳幹脳炎が背景にあることを把握しなければ、「原因不明の呼吸困難」として、あるいは「原因不明の突然死」として扱われかねない。実際、小児急死例の剖検率の低いわが国では、本症が診断されまいままに原因不明の死亡とされているのではないであろうか。本症の診断には口内炎や手足の発疹を見いだす努力、髄液細胞の増多、心エコーで駆出率の低下、ウイルス分離などから本症を診断することが重要である。また、駆出率の低下は救命例でみられるように、数日で改善するものであり、心筋炎による肺水腫と誤診してはいけない。原因が見いだせない急性肺水腫は小児では稀であるが、第一に本症の可能性を考えることが大切であろう。「enterovirus brainstem pulmonary syndrome (EBPS)」などの呼称を用いることで、臨床の現場で本症を認識が広がることが望まれる。

本症の救命には肺水腫の管理が最も重要であり、早期に VA ECMO を開始することが必要と考えられる。この点に関しては多数例での検討が必要であるが、本症がまれであることから対照比較研究は困難であろう。臨床の現場でさらに本症の認識が進み、ECMO などによる救命例が増えることを期待したい。

E. 結論

EV71 に合併した肺水腫を伴う脳幹脳炎の 1 例を経験し、頸動脈と頸静脈からの ECMO に

より救命することができた。MRI で延髄吻側背側部に小病変が描出され、延髄由来の神経性肺水腫の責任病巣と考えられた。また、ECMO の使用により、短期間で肺水腫が改善したこと、血清中のフェリチン、ネオプテリンが高値であったことは、肺水腫が可逆的であり、サイトカンなどの液性因子と関連がある可能性を示唆しており、今後、本疾患の治療法、病態解明への重要な知見であると考えられた。

参考文献

- 1 Ho M, Chen E-R, Hsu K-H, et al. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. *N Engl J Med* 341: 929-35, 1999.
2. 塩見 正司、外川正生手足口病の最近の話題 - エンテロウイルス 71 による神経合併症 - . *小児科診療* 62:366-374,1999.
3. Chang LY, Lin TY, Hsu KH, et al. Clinical features and risk factors of pulmonary oedema after enterovirus-71-related hand, foot, and mouth disease. *Lancet*. 354: 1682-1686, 1999.
- 4) Lum, L C S. Wong, K T. Lam, S K. et al. Fatal enterovirus 71 encephalomyelitis. *J Pediatr* 133: 795-798, 1998.
- 5) Shen, W C. Chiu, H H. Chow, et al. MR imaging findings of enteroviral encephalomyelitis: an outbreak in Taiwan *Am J Neuroradiol* 20: 1889-1895, 1999.
- 6) Baker AB. Poliomyelitis 16: a study of pulmonary edema. *Neurology* 7: 743-751, 1957.
- 7) Simon, R P. Gean-Marton, A D. Sander, J E.

Medullary lesion inducing pulmonary edema: a magnetic resonance imaging study. *Ann Neurol* 30: 727-730, 1991.

- 8) Komatsu, H. Shimizu, Y. Takeuchi, et al. Outbreak of severe neurologic involvement associated with enterovirus 71 infection. *Pediatr Neurol* 20: 17-23, 1999.
- 9) Crowley, M R. Katz, R W. Kessler, et al. Successful treatment of adults with severe Hantavirus pulmonary syndrome with extracorporeal membrane oxygenation. *Crit Care Med* 26: 409-414, 1998.
- 10) Mori, M. Rothman, A L. Kurane I, et al. High levels of cytokine-producing cells in the lung tissues of patients with fatal hantavirus pulmonary syndrome. *J Infect Dis* 179: 295-302, 1999

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表

Shiomi M, Miyawaki H, Togawa M, Shimaoka H, Atagi K: Effective Treatment of Fulminant Pulmonary Edema Associated with Enterovirus 71 Brainstem Encephalitis. In APEC Enteroviral Watch Program for Children Symposium -EV-71 Epidemic in Asia Pacific Area. Taipei March, 2000

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

图 1 脑干部 MRI

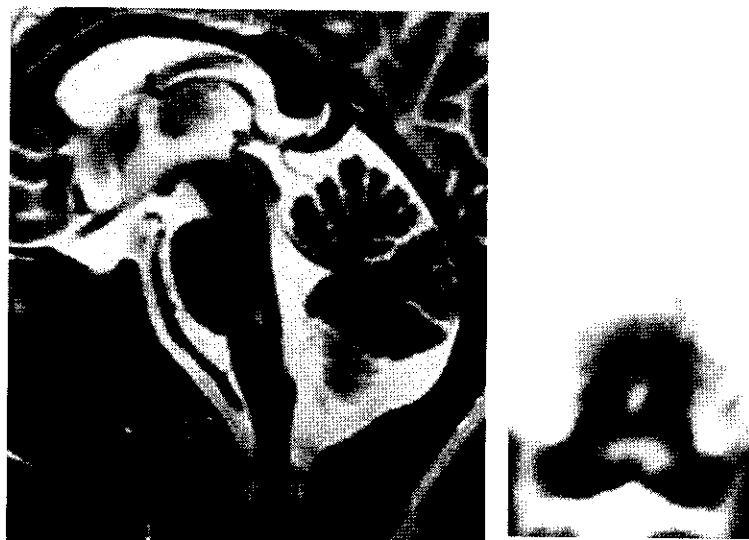


图 2 胸部 CT

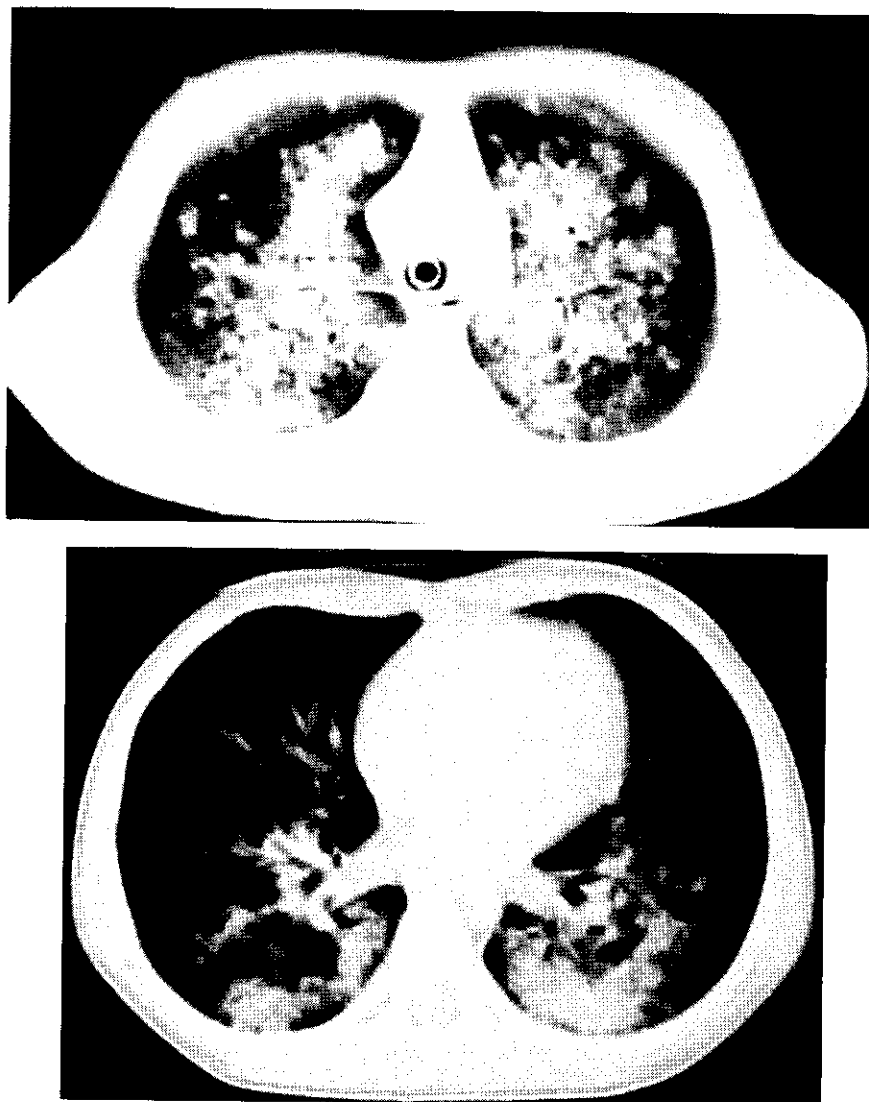


表1 手足口病または Enterovirus71 感染にともなって 急死した乳幼児の3 症例と ECMO† による救命例

	症例1	症例2	症例3	症例4
年月	1997.7	1997.8	1997.9	1999.6
年齢	9ヵ月	1歳3ヵ月	5ヵ月	5歳
性	女	男	男	男
先行疾患	手足口病	手足口病	不明	ヘルパンギーナ
分離ウイルス	-	-	EV71	-
EV71(BrCr)中和抗体価*	N.D.	N.D.	N.D.	1:128/1:1024
初発症状	発疹	発疹	下痢	発熱・口内炎
急変症状	意識障害	嘔吐,CPA	痙攣	呼吸困難
急変病日	第4病日	第5病日	第4病日	第3病日
死亡までの時間	9時間	CPA	14時間	生存(ECMO)
急変後発熱	40.5°	39.0°	39.0°	39.0°
ショック	+	CPA	+	+

* 国立感染症研究所清水博之氏による測定

† :ECMO:extracorporeal membranous oxygenation

表2 主な検査成績

	症例1	症例2	症例3	症例4
白血球数	9,100	12,270	50,600	32,900
血小板数(103)	457	523	577	420
血糖(mg/dl)	101	95	496	339
LDH(IU/L)	1,740	2,978	743_3,208	430_908
CK(IU/L)	1,224	3,820	2,126	430_1,064
CKB(IU/L)	32	N.T.	8	47
フェリチン	N.D.	1,593	11,284	8,142
髄液細胞数(/μL)	N.D.	35/440	407	32
肺水腫	+	+	+	+
頭部CT	異常なし	N.D.	異常なし	異常なし
頭部CT	N.D.	N.D.	N.D.	延髄吻側背側
血清チアミン(nmol/L)	271.2	264.1	693.3	179.5
髄液チアミン(nmol/L)	N.D.	685.6	1255.8	281.3

サルを用いた実験感染モデルの開発：エンテロウイルス 71 のカニクイザル脊髄内接種による錐体路と錐体外路への病原性

分担研究者	岩崎琢也	国立感染症研究所	感染病理部
	網 康至	国立感染症研究所	動物管理室
	清水康之	国立感染症研究所	ウイルス第二部
研究協力者	永田典代	国立感染症研究所	感染病理部

研究要旨

エンテロウイルス 71 (EV71) 感染により手足口病、無菌性髄膜炎、ポリオ様弛緩性麻痺や脳炎症状など種々の臨床症状がひき起こされる。1970 年代と 90 年代に分離された EV71 の神経病原性の違いを明らかにするため、患者分離株 5 株（手足口病由来の Nagoya 株/1973 年、Shiga 株/1997 年。無菌性髄膜炎由来の BrCr 標準株/1974 年。脳炎由来の C7 株,1997 年、と SK 株,マレーシア/1997 年）をカニクイザルの脊髄に接種し、ウイルス学的、神経学的、病理学的に検索した。その結果、全ての群で接種後 1 - 6 日目に神経症状が発症した。弛緩性麻痺のような錐体路症状以外に、振戦や運動失調のような錐体外路症状も認められた。全頭とも手足口病を示唆する皮膚ならびに粘膜症状は確認できず、また、肺水腫も示さなかった。病理組織学的検索により、中枢神経病変は錐体路ならびに錐体外路の両者に存在し、大脳、小脳、脳幹と脊髄にウイルス感染が証明された。以上より、手足口病を含むいずれの患者由来の株もサルの脊髄内接種において神経病原性を発揮する可能性があることが明らかとなった。

A. 研究目的

EV71 は 1969 年から 1972 年の間にカリフォルニアで脳炎、無菌性髄膜炎や心筋炎を発症した 20 名の患者の便、咽頭拭い液、脳から分離された最も新しいエンテロウイルスである。その後、北米、南米、ヨーロッパ、オーストラリア、東アジアにおいて様々な EV71 感染アウトブレイクが報告されてきた。EV71 感染は小児早期に流行し、主に手足口病 (HFMD) の原因となり、稀に脳炎や急性弛緩性麻痺のような重

篤な感染が合併症もしくは単独で見られる。神経症状関連の発症率はそれぞれの年代のアウトブレイクで様々である。1998 年に台湾で起きた大きなアウトブレイクでは HFMD やヘルパンギーナを示した 129,106 名の患者のうち 405 名が脳炎、無菌性髄膜炎、肺水腫・出血、急性弛緩性麻痺、心筋炎などの重篤な疾患を示した。一方、1973 年から 1978 年に日本で起きた HFMD の大きなアウトブレイクでは約 30,000 名の患者が発生したが、一名の脳炎患者と 1 名の滑車神

経麻痺患者が報告されただけであった。

これまでにウイルス感染の重症度とウイルスの遺伝子的系統間には何の関連性も見つっていない。この疾患の臨床症状経過と病理学的変化を解析するために、サルの実験が行われた。カニクイザル、アカゲザル、アフリカミドリザルが皮下、脊髄内もしくは脳内接種において感受性があることが明らかとなり、完全な弛緩性麻痺が観察され、中枢神経系にウイルス関連性の病変が確認された。

本研究では EV71 の 5 つの分離株をカニクイザル脊髄内に接種し、臨床、病理学的変化を決定した。接種後の動物は錐体路症状だけでなく錐体外路症状も示し、これは患者症例で確認されたものと同様であった。また、感染動物の中枢神経系の病理学的変化は経口生ワクチン神経毒力試験法に準じてスコアリングによる定量分析を行った。更に EV71 殻蛋白に対するウサギ血清を用いて免疫組織化学法により錐体路および錐体外路におけるウイルス感染細胞の局在を明らかにした。

B. 材料と方法

動物: 21 頭の 5 - 13 年齢、雌のカニクイザル (筑波霊長類センターで SPF 管理下で育成) を用いた。いずれの動物も血清学的に EV71 感染陰性であることを確認した。動物飼育、繁殖、感染実験については国立感染症研究所の動物管理規定およびバイオセーフティ委員会規定に従って行った。

ウイルス: EV71 の 5 つの感染患者分離株 C7 株、SK 株、Nagoya 株、Shiga 株、BrCr 株を用いた (表 1)。一部の塩基配列解析によってこれらの株は系統発生的にプロトタイプと遺伝子型 A および B の 3 つに分類できることが示された (Shimizu et al 1999)。BrCr 株はプロトタイプとして分類されている。Nagoya, C7, SK 株は遺伝子型 A である一方、Shiga 株は遺伝子型 B に属

する。BrCr と Nagoya 株は Vero 細胞で 10 代以上継代してある。ウイルス量は Vero 細胞で測定し、接種ウイルスは Eagle's minimal essential medium (EMEM) で $10^{6.5}$ CCID₅₀/100 μ l となるように調整した。

in vitro 表現型マーカー試験: in vitro におけるウイルス株の表現型を決定するために温度感受性試験 rct-marker 試験を行った。Hagiwara et al 1984 の方法に準じ、Vero 細胞に各株を接種後、35°C と 39.5°C で 5 日間培養し、各温度での接種ウイルスのプラーク数を測定、PFU/ml を算出した。

抗体: 変性ウイルス粒子でウサギに免疫を行い、EV71 の殻タンパクを認識するウサギ血清を作製した。ウイルス感染 Vero 細胞の上清からシクロロース勾配遠心によりウイルス粒子を分離した。ネガティブ染色による成熟ウイルス粒子の存在を確認し、0.5% SDS 0.1M リン酸緩衝液 (PBS) 中で 80°C 10 分間変性処理を行った。変性ウイルス粒子溶液を PBS で 4 倍希釈し、完全および不完全アジュバンドと混合し、それぞれ初回免疫、ブースター免疫として New Zealand ウサギに皮下接種した。その後回収した血清の免疫活性の確認には、EV71 感染細胞のパラフィン切片を用いた。Shiga および C7 の 2 つの株を Vero 細胞に各々 MOI10 で接種し 72 時間後、4%ホルマリン緩衝液で固定した。その後細胞を採取し、パラフィン包埋を行った。陰性コントロールとして非感染細胞を用いた。

感染実験: ケタラール・キシラジン混合液を用い麻酔した後、 10^6 CCID₅₀/0.1ml に調整したウイルス液を経口生ポリオワクチン神経毒力試験法に準じカニクイザルに脊髄内接種を行った。接種部位は第 3-5 腰髄前角とした。接種後の動物は 10 日間臨床症状、特に神経症状についての観察を行った。接種後 10 日目に過麻酔殺を行った。また、麻痺症状が進んで横臥し瀕死となった動物はその時点で過麻酔殺後心臓採血を行

い解剖した。エンテロウイルス感染による臨床症状の変化は次のようにスコア化した；0,無症状 1,麻痺もしくは振戦の神経症状 2,瀕死もしくは死亡。

組織学的検査：ケタラールによる過麻酔殺後、脳・脊髄を採取し 10%ホルマリン緩衝液に浸漬固定し常法どおりパラフィン包埋を行った。中枢神経系の病理組織学的検索は主に前、運動、感覚、頭頂、側頭、後頭皮質、海馬、基底核、前障 視床、視床下域、黒質、脳幹、脊髄を行った。6 μ m のパラフィン切片を作製しヘマトキシリン・エオジン染色およびクリューバー・バレラ染色を行った。

免疫組織化学：EV71 抗原の免疫組織化学的検出はパラフィン切片上で行った。切片はキシレンで脱パラフィン後、エタノールで親水化し 0.5%CaCl₂ を含む 0.25%トリプシン処理を 37°C 30 分を行った。その後、0.3%H₂O₂/メタノール溶液中で室温 30 分、内因性ペルオキシダーゼ活性を不活化し正常やぎ血清と室温 5 分間反応後、一定な濃度に希釈した抗エンテロウイルス 71 高度免疫ウサギ血清と一晚 4°C にて反応させた。PBS 洗浄後、ビオチン標識抗ウサギ免疫グロブリン抗体と反応、更に洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと反応させた。結合した抗体の局在は DAB を基質として酵素反応を行うことにより可視化した。更にヘマトキシリンで対比染色を行った。

神経毒力試験法：カニクイザルの脳・脊髄組織病変の評価方法は経口生ポリオウイルスワクチン神経毒力試験法の WHO 基準に準拠して行った。ただし評価部位は腰髄 12 箇所、頸髄 10 箇所、延髄 2 箇所、橋、小脳、中脳、大脳皮質、視床とした。組織病変は WHO 基準と同様に 0：組織病変無し、1：炎症反応のみ。神経細胞の病変無し。2：神経細胞における軽度の変化、3：神経細胞における顕著な変化。4：神経細胞の消失。とした。各株間の組織病変数につい

て student-t 検定を行い、比較した。

ウイルス量の測定：EV71 接種後カニクイザルの解剖に際しウイルス分離材料として心臓採血後の血清、髄液、中枢神経各部位を採取し、検査まで - 80°C に保存した。この材料を用いて Vero 細胞における CPE の発現からウイルス量を測定した。接種材料は EMEM で希釈した 10% 組織すりつぶし材料を遠心 3000 回転後の上清を回収し作製した。この材料を 10 倍ごとに適宜希釈して培養細胞に 100 μ l 接種し、CPE の発現を 7 日間観察、感染価は 50%感染率で表した。

C. 結果

接種ウイルス株の in vitro 表現型：Vero 細胞における 35°C と 39.5°C での各株ウイルス複製能は Shiga 株が温度感受性があり、他の 4 株は温度耐性であった（表 1）。

患者分離ウイルス各株感染後のカニクイザル臨床症状：5 株のウイルスを各々 3 頭ずつのカニクイザルに接種した。神経症状の発現は接種後 2 から 7 日目であり、弛緩性麻痺、振戦あるいは運動失調が見られた。また、これらの症状の発現後 2 日から 6 日目に瀕死となった（図 1）。

3 頭の動物のみが神経症状の発現にかかわらず生残した。

1) Nagoya 株接種群：全 3 頭とも接種後 3 日以内に後肢から始まる弛緩性麻痺を発症した。そのうち 2 頭で 3 日目以降に強い企図振戦、運動失調を認めた。1 頭は 5 日目に前肢の弛緩性麻痺をしめした。そして 5 日目にはいずれの動物も嗜眠、瀕死となった。

2) Shiga 株接種群：2 頭が第 4,5 日以内に後肢の弛緩性麻痺と錐体外路の症状をそれぞれ示した。それらの 1 頭は 9 日目に四肢の麻痺で瀕死となった。第 7 日目には 3 頭目が錐体外路症状を示し 9 日目に瀕死となった。

3) BrCr 株接種群：3 頭は Nagoya 株接種後のサ

ルと同様の臨床症状を示した。

4) C7/Osaka 株接種群：3 頭のうち 1 頭のみが 7 日目に麻痺を示した。残りの 2 頭は 7 日目に錐体外路障害を示し、10 日目まで生残した。

5) SK 接種群：3 頭は接種後 3-7 日目に麻痺を発症し錐体外路障害は同日もしくは麻痺発症の 1 日後に発現した。

神経病理学的変化：接種後のサルは組織学的検索を行い、神経病変は経口生ポリオワクチンの神経毒力試験にしたがって数値化した。また、病変と病変部位の確認、ウイルス抗原の検出をあわせて行った。

1) 組織病変度：接種株に関係なく、脊髄内接種による接種傷害のある腰髄を除き、小脳核（歯状核）はもっとも強い病変を認めた（図 2）。この領域では神経細胞の変性、壊死とそれに伴う炎症変化が観察された（図 3）。時に神経消失がみられた。血管周囲性細胞浸潤、微小出血、クモ膜下腔の炎症細胞浸潤は小脳核だけではなく大脳を含めたほかの領域でもみられた。頭頂葉は大脳で他の用よりも病変が顕著であった。頸髄での神経病変は弱かった。接種株間での病変度は有意な差が見られなかった。

2) EV71 株間の中枢神経組織病変の相違：中枢神経病変は株による小脳皮質病変の相違以外、中枢神経では特に相違が見られなかった。小脳皮質病変は BrCr 株 (No.4183, 3984, 4185)、Nagoya 株 (No.4195, 4196, 4184) および C7 株 (No.4191) 接種群でみとめられた。

3) 生残サルの組織病変の特徴：接種後 1 週間以上生残したサルは神経好性の細胞浸潤が血管周囲とクモ膜下腔で顕著であった。

4) EV71 抗原の検出のための免疫組織化学：まず、EV71 感染した Vero 細胞のパラフィン切片で抗 EV71 抗体の活性を確認した。この抗体は C7 もしくは Shiga 株感染細胞の細胞質内で抗原を検出した。希釈率は 800 倍であった（図 4）。非感染細胞では非特異反応は見られなかった。

5) EV71 の殻タンパク抗原検出：まず非感染サルでこの抗体の非特異反応がないことを確認した。そして感染サルの中枢神経で EV71 陽性細胞の存在を確認した。ウイルス抗原は神経細胞の細胞質内にのみ検出された（図 4）これら抗原陽性細胞の多くは細胞変性を示していたが、時に一見正常の神経細胞にもみられた。ウイルス抗原陽性細胞は Nagoya 株と BrCr 株接種群全 6 頭で検出された。これらのサルはすべて接種後 4-5 日目に解剖した。また、8-10 日目に解剖し検索した 7 頭の動物ではウイルス抗原陽性細胞は見られなかった。C7 株接種群のうち 7 日目に解剖検索を行った 1 頭は陽性であったが、その他の動物と SK 株接種群は陰性であった。中枢神経以外の臓器では抗原は検出されなかった。

6) 抗原陽性細胞の局在：抗原陽性細胞は免疫組織化学的解析で陽性の 7 頭の視床に局在し、歯状核と脳幹にも多く見られた。

中枢神経におけるウイルス量：中枢神経の各部位でウイルス量を測定した。接種後 4-5 日目に検索したサルではウイルス量は高く、8-10 日目に検索したサルでは低かった（表 2）しかしながら、C7 株を接種し 7 日目に解剖したサルではウイルス量は高かった。とくに小脳で共通してウイルス量は高かった。

D. 考察

エンテロウイルス 71 感染患者から分離した 5 種類の株を脊髄内接種したサルはいずれも神経症状と神経組織病変を示した。興味深いことに Nagoya 株や BrCr 株のように組織培養で何代も継代した株を接種したサルは神経症状発症後 2-3 日以内に瀕死となり、一方、野生株（Shiga と SK 株）接種群ではもっと長く生残した。神経症状は株が分離された患者の症状には関係なかった。サル腎細胞由来の培養細胞に継代する間にサル中枢神経に適応したのであろう。この

実験室株にみられる「固定現象」は狂犬病などの神経好性ウイルスでよく知られている。

神経症状の発現と死亡までの時間は接種株間で様々であった（図 1）。しかしながら、組織病変度と病変局在に株間で相違はみられなかった。組織病変度はおもに脳幹と小脳で高かった（図 2）。これらの小脳病変は歯状核が主座であった（図 4）。対称的に、小脳皮質病変は 15 頭中 2 匹でしかみられなかった。これらの EV71 感染局在様式は EV71 患者の解剖報告にみられるものと非常によく類似していた。これらのことは EV71 の中枢神経感受性がヒトとサルで類似していることを示している。加えて、サルの神経症状は患者でみられる錐体路および錐体外路障害の症状に類似している。これは EV71 がポリオウイルスの運動神経特異的な感受性よりもさらに広範囲な感受性を有することを示唆している。

EV71 の温度感受性株と温度耐性株を用いた研究から神経毒力と温度感受性が相関することがすでに示された。本実験ではこの相関性は見られなかった。この理由の一つとして、分離株のウイルスが単一クローンではないことが起因すると考えた。この相関を確認するために、感染性 cDNA クローンをを用いたほうがよいかもしれない。

感染サルの組織学的解析から、EV71 による早期変化は核および細胞質におこることがわかった。そしてこれらの細胞の細胞質内は EV71 抗原陽性であった。これらの早期神経病変には炎症変化がほとんどみられなかった。その後、神経食現象、血管周囲細胞浸潤などの神経好性炎症が見られる。これらの細胞変化はポリオウイルス感染で引き起こされるものとよく類似している。

免疫組織学的に、ウイルス抗原は接種後 5 日以内に解剖を行った、動物の中枢神経で検出され、また 7 日目に解剖を行った 2 頭中 1 頭で

のみ検出された。そして接種後 8 日目以降に検索したサルでは検出されなかった。これらのウイルス抗原陰性サルは神経症状発現後 4-7 日目に検索された。ウイルス量はウイルス感染早期で、神経症状を発現した動物で高く、神経病変を発症して後比較的遅く検索した動物ではウイルス量は低いもしくは検出されなかった。この所見は臨床経過が比較的長い患者でウイルス分離やウイルス抗原の検出が困難なこととよく一致している。炎症性反応はウイルス接種した腰髄を除いて急性期に解剖された動物では乏しかった。一方で急性期後に検索した動物では炎症性反応がみられた。中枢神経でのウイルス量の減少は炎症性変化に関係しており、これは宿主の免疫反応がウイルス除去に重要であることが伺えた。

肺水腫は小児の EV71 感染における死亡原因にしばしば関係する。脳幹の障害は肺水腫の病理発生において重要な役割を演じていると考えられている。しかしながら、本研究において脳幹病変を有するサルでは肺水腫を発症しなかった。患児の生命を脅かす EV71 感染による肺水腫を防ぐために、この病原性について更なる研究が必要である。

E. 結論

サルの脊髄内接種において EV71 は手足口病患者由来を含むいずれの患者由来の株でも中枢神経系に対し病原性を発揮する可能性があることが明らかとなった。この非自然経路はサル中枢神経における EV71 の神経好性の決定と EV71 が神経細胞で効率的に増殖することを明らかにするために有用であった。一方で自然感染では腸もしくは呼吸粘膜で最初に増殖し、その後血行性および神経行性に中枢神経を含む様々な臓器に広がると考えられ、EV71 感染の病原性を明らかにするために、さまざまな接種経路を用いた研究が必要であろう。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shimizu H, Utama A, Yoshii K, Yoshida H, Yoneyama T, Sinniah M, Yusof MAB, Okuno Y, Okabe N, Shih S, Chen H, Wang G, Kao C, Chang KS, Miyamura T, Hagiwara A. 1999. EV71 from fatal and nonfatal cases of hand, foot and mouth disease epidemics in Malaysia, Japan and Taiwan in 1997-1998. *Jpn J Infect Dis* 52:12-15

Iwasaki T, Nagata N, Hatano I, Harashima A, Horiuchi Y, Koike S, Nomoto A, Kurata T. 2000. Transgenic mice bearing human poliovirus receptor for quality control. *Pharmeuropa Special Issue-Proceedings- Biological Beyond 2000*: 59-68.

Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Harashima A, Hatano I, Suzaki Y, Yoshii K, Yoshii T, Nomoto A, Kurata T. 2001. Comparison of neuropathogenicity of poliovirus type 3 in transgenic mice bearing the poliovirus receptor gene and cynomolgus monkeys. *Vaccine* (in press).

2. 学会発表

永田典代、岩崎琢也、清水博之、網 康至、原嶋綾子、波多野いく持、佐藤由子、長谷川秀樹、須崎百合子、倉田毅：エンテロウイルス 71 の神経病原性についてのカニクイザルを用いた解析—ポリオウイルスの病原性との比較—。第 47 回日本ウイルス学会、1999 年横浜

永田典代、清水博之、岩崎琢也、網 康至、原嶋綾子、波多野いく持、佐藤由子、長谷川秀樹、須崎百合子、倉田毅：エンテロウイルス 71 の神経病原性についてカニクイザル感染実験による解析。第 48 回日本ウイルス学会 2000 年津

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1. Characterization of enterovirus 71 strains used in this study

Strain	Isolated from a patient with	Year	Nation	Isolated sample	Geno-type	Phenotype	
						rct*	
Nagoya	HFMD	1973	Japan	feces	A	0.75	tr**
1095	HFMD	1997	Japan	throat swab	B	3.25	ts***
BrCr	Meningitis	1970	USA	feces	BrCr	1.25	tr
C7	Encephalitis	1997	Japan	feces	A	-0.25	tr
SK	Encephalitis	1997	Malaysia	rectal swab	A	1.00	tr

HFMD: hand,foot and mouth disease

*rct: logarithmic differences of virus titers at 35.5 and 39.5C (TCID₅₀)

tr**:temperature-resistant phenotype; and ts***: temperature-sensitive

Table 2. Titration and antigen detection of enterovirus 71 in the central nervous system of cynomolgus monkeys after intraspinal inoculation

EV71 strain	Animal No.	Days	Spinal cord				Brainstem				Thalamus		Cerebellum		Cerebrum			
			lumbar titer*	lumbar Ag**	cervical titer	cervical Ag	Medulla titer	Medulla Ag	Pons titer	Pons Ag	Midbrain titer	Midbrain Ag	titer	Ag	titer	Ag	titer	Ag
Nagoya	4195	4	3.75	+	4.00	+	3.50	+	4.00	+	4.25	+	NE***	+	1.50	+	4.75	+
	4184	5	2.25	+	1.00	+	NE	+	NE	+	NE	+	NE	+	NE	-	NE	+
	4196	5	3.25	+	3.00	+	2.00	+	4.75	+	3.50	+	NE	+	1.25	+	3.75	+
Shiga	4194	9	<0.5	-	<0.5	-	<0.5	-	<0.5	-	<0.5	-	NE	-	<0.5	-	<0.5	-
	4192	9	<0.5	-	<0.5	-	0.75	-	2.00	-	<0.5	-	NE	-	<0.5	-	0.75	-
	4193	10	0.75	-	<0.5	-	<0.5	-	<0.5	-	<0.5	-	NE	-	<0.5	-	<0.5	-
BrCr	4183	4	2.00	-	<0.5	-	3.25	-	1.50	+	1.25	-	NE	+	<0.5	+	3.00	+
	3984	4	2.75	-	2.00	-	3.00	+	3.50	+	3.00	+	NE	+	0.75	+	3.50	+
	4185	5	2.50	-	1.50	-	NE	-	NE	-	NE	-	NE	+	NE	+	NE	-
C7	4190	7	3.00	+	4.25	+	4.00	+	2.50	+	4.50	+	NE	+	NE	+	4.00	+
	4189	10	0.75	-	<0.5	-	<0.5	-	<0.5	-	<0.5	-	NE	-	<0.5	-	<0.5	-
	4191	10	<0.5	-	<0.5	-	NE	-	NE	-	NE	-	NE	-	NE	-	NE	-
SK	4186	7	1.5	-	<0.5	-	<0.5	-	<0.5	-	0.75	-	NE	-	<0.5	-	<0.5	-
	4187	8	0.75	-	<0.5	-	<0.5	-	<0.5	-	0.75	-	NE	-	<0.5	-	<0.5	-
	4188	9	1.25	-	<0.5	-	NE	-	NE	-	NE	-	NE	-	NE	-	NE	-

Days post-inoculation at analysis

titer* was expressed in log CCID₅₀

Ag**: Immunohistochemical detection of the EV71 capsid antigen on paraffin sections

NE***: not examined

图 1

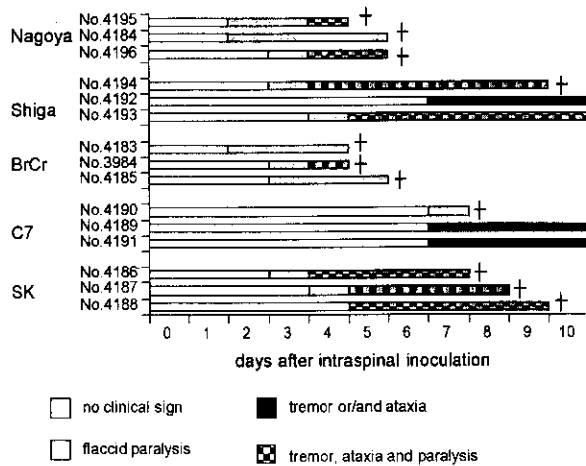


图 2

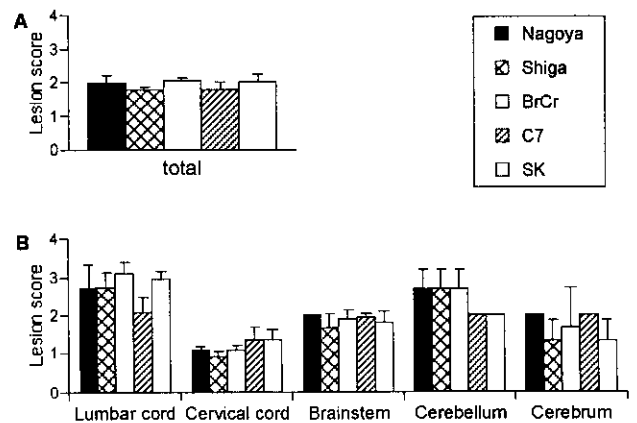


图 3

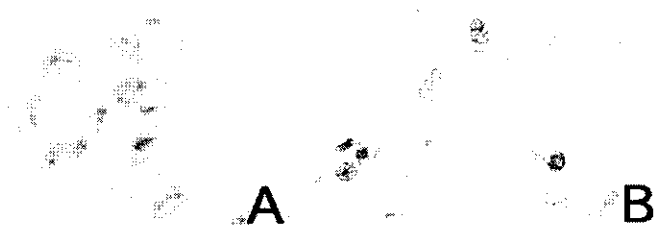
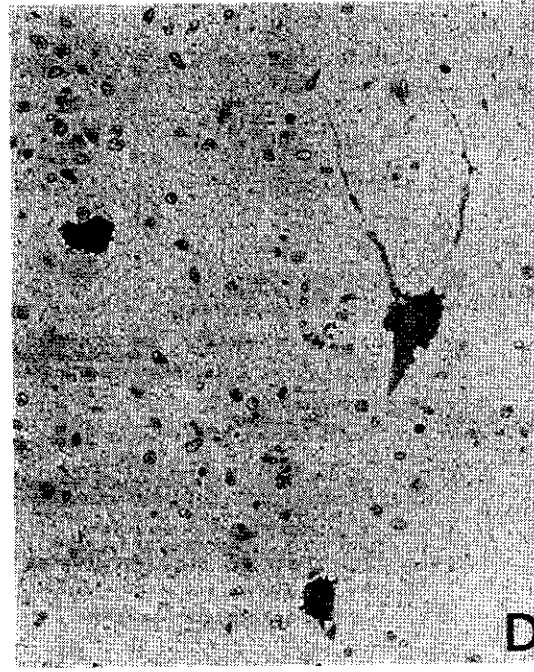
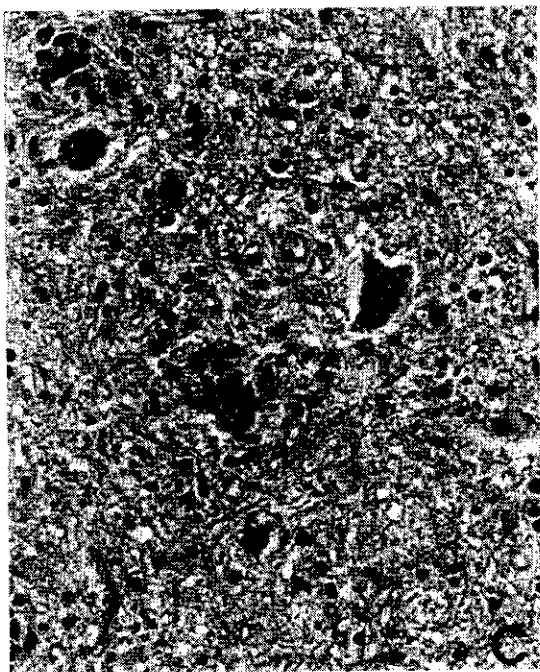
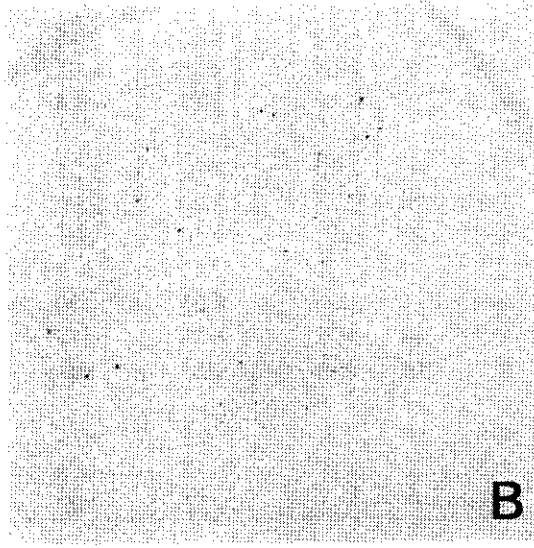


图 4



エンテロウイルスの分子ウイルス学的研究

分担研究者 小池智

(財) 東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・微生物研究部門

研究要旨

エンテロウイルス 71 (EV71) は手足口病の原因ウイルスとして知られていたが、近年重篤な脳炎の原因ともなりうることが明らかにされてきた。ポリオウイルスをはじめとするエンテロウイルス属のウイルスは感染性 cDNA クローンを用いた分子遺伝学的な手法によって大きく進展し、病原性の強弱などがどのように支配されているか明らかになってきている。ところが EV71 に関してはいくつかの分離株について塩基配列が報告されているに留まっている。今年度我々は EV71 に感染し脳炎を発症した死亡例からの分離株をもとに感染性 cDNA クローンの構築を行った。

A. 研究目的

EV71 の分子遺伝学的な解析を可能とするために感染性 cDNA クローンを構築する。

B. 研究方法

1997 年に Malaysia で EV71 の流行があった際に死亡例から分離された株、SK/EV006/Malaysia 株を感染研・清水博之博士から分与していただき、F-vero 細胞で一度培養し、感染性 cDNA クローンの方法とした。ウイルス液から RNA を調整し、清水博士の解読した塩基配列をもとにプライマーを設計し、RT-PCR 法によって cDNA フラグメントを増幅した。増幅したフラグメントがもとのウイルスの塩基配列と同一であるか確認した後に EV71 の 5' 末端に T7 RNA polymerase のプロモーター配列を付加し、プラスミドベクター内にクローニングした。得られたクローンから *in vitro* で RNA を合成、F-vero 細胞にトランスフェクションし、ウイルスを回収する。

C. 研究結果

PCR で増幅した cDNA フラグメントを direct sequencing を行い正確な SK/EV006/Malaysia 株の全長の塩基配列が得られた。このウイルスは polyA 部分を除いて 7410 塩基からなる。745 塩基の 5'-noncoding region、6579 塩基の大きなオープンリーディングフレーム、86 塩基の 3'-noncoding region からなっている。すでに報告されている EV71BrCr 株とは核酸で 80% の相同性が認められた。ポリオウイルス 1 型 Mahoney 株との比較においては 5'-noncoding region で最も相同性が高く 71.5% の相同性が認められ、coding region では領域によってことなるものの 50~60% 程度アミノ酸の相同性が認められた。

3 つの部分に分割して増幅した EV71cDNA フラグメントをプラスミドベクターにクローニングし、塩基配列を決定して PCR 増幅時のエラーのないフラグメントを選択した。この DNA の 5' 末端に T7 RNA polymerase のプロモーターを付加し全長のクローンを得た。全長 cDNA から *in vitro* RNA 合成を行い、F-vero 細胞にト

ランスフェクトした。トランスフェクション後約5日で細胞変性効果が観察された。この培養上清を新たな F-vero 細胞に加えたところ元の EV71 の感染によるものと同様な細胞変性効果が観察されたところから、構築した cDNA クローンは確かに感染性をもつ cDNA であると断定した。

D. 考察

SK/EV006/Malaysia 株は部分的な塩基配列の決定により genotype A-2 に属するが、今回の塩基配列の決定により、全長の配列が正確に決定された。流行時期のことなる BrCr 株とは全体で 80%の塩基配列の相同性が見られたにとどまりこれまでの分子系統樹が正しいことを示している。

cDNA から得られたウイルス株の抗原性、ブランクサイズ、1段増殖速度などは現在詳細に検討中であるが、予備的な実験段階で得られた印象ではもとのウイルスと同様である。

E. 結論

SK/EV006/Malaysia 株の感染性 cDNA クローンを構築することに成功した。得られたクローンをを用いて EV71 の分子ウイルス学的な研究を強力に押し進めることが可能となった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

*小池智、細沼美樹、李継芬、岩崎琢也、佐藤由子、永田典代、多屋長治、米川博通：ポリオウイルスレセプターを全細胞で発現するトランスジェニックマウスの神経病変の解析。第48回日本ウイルス学会、三重

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

新規抗エンテロウイルス剤（ベンズイミダゾール誘導体）の 抗エンテロウイルス作用

分担研究者 吾郷昌信 (丸石製薬中央研究所)
協力研究者 吾郷由美、山村睦朗、岩田玲英子、水野隆廣 (丸石製薬中央研究所)
清水博之 (国立感染症研究所ウイルス二部)

研究要旨

MRL-1237 およびその誘導体 MRL-1217, MRL-1243 は *in vitro* において供試した EV71 をはじめとする 26 血清型のエンテロウイルスの増殖を選択的かつ強力に阻害した。特に、MRL-1237 の供試ウイルスに対する平均 IC_{50} 値は $0.35 \mu\text{g/ml}$ ($0.032-2.4 \mu\text{g/ml}$) で、宿主細胞には $100 \mu\text{g/ml}$ の濃度でも毒性は認められなかった。これらの化合物は *in vitro* 同様、CA9 感染幼若マウス、CB4 感染成熟マウスを用いた異なる病態系においても強力な抗ウイルス作用を示し、予防効果に加えて治療効果も発揮した。したがって、MRL-1237 およびその誘導体はエンテロウイルス感染症に対する抗ウイルス剤として使用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

60 以上にも上る血清型が存在するエンテロウイルスは、毎年何れかの血清型のウイルスが流行を繰り返す常在ウイルスであり、上気道炎、ヘルパンギーナ、手足口病、重篤化する無菌性髄膜炎、脳炎等多彩な疾患の原因となる。これまでに臨床応用された抗エンテロウイルス剤はなく、ポリオウイルス(PV)以外には有効なワクチンも開発されていないことから、特に、重症化し、時に死亡例も報告されているエンテロウイルス脳炎等の重症性エンテロウイルス疾患に対する抗ウイルス剤の開発は極めて重要である。

これまでに我々はベンズイミダゾール誘導体を多数合成し、その中から極めて選択性の高い抗エンテロウイルス活性を示す MRL-1237 をはじめとする誘導体を見出した。今回、*in vitro* および *in vivo* における MRL-1237 およびその誘導体の抗エンテロウイルス活性について調べ、抗

エンテロウイルス剤としての可能性について検討した。

B. 研究方法

供試化合物

丸石製薬株式会社中央研究所において合成されたベンズイミダゾール誘導体 MRL-1217, MRL-1237 および MRL-1243 を使用した。何れの化合物も 1 mg/ml になるように PBS または Eagle MEM に溶解させ、ストック液として使用するまで 4°C で保存した。

細胞とウイルス

ポリオウイルス 1 型(Polio 1, SP769-82)、Polio 2 (SP744-78)、Polio 3 (SP24-82)、エコーウイルス 5 型(Echo 5, Noyce)、Echo 6 (SP-72)、Echo 9 (Hill)、Echo 11 (Gregory)、Echo 18 (SP1572-82)、Echo 20 (11847)、Echo 25、Echo 30 (SP2447-83)、コクサッキーウイルス A4 型 (CA4, High Point)、CA6

(SP1776-86)、CA7 (AB-IV)、CA9 (Bozek)、CA10 (Kowalik)、CA16 (G-10)、CB1 (SP2119-86)、CB2、CB3(Nancy)、CB4 (JVB)、CB5 (Faulkner)、CB6 (Schmidt)、エンテロウイルス 70 型(EV70, J670/71)、EV71 (BrCr)およびヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎等の患者から分離後、細胞での継代歴が 3 代以内の CB4 新鮮分離株 509、637、688、974、976、982、1180、3106 の 5 株を用いた。宿主細胞には HeLa 細胞、HeLa-S3 細胞、RD 細胞および FL 細胞を使用した。

抗ウイルス活性の測定

抗ウイルス活性は plaque reduction assay または Yield reduction assay により測定した。

a)Plaque reduction assay : 6-ウエルマルチプレートに単層を形成させた細胞に 50 PFU のウイルス液 0.1 ml を接種して 1 時間吸着させた後、所定濃度の化合物、2%非働化牛胎児血清および 0.9%寒天を含む維持メディウム 2 ml を重層して 37°C、炭酸ガス培養器で 2~5 日間培養した。培養後、クリスタルバイオレットで染色して出現したプラーク数を算定し、プラーク数をウイルス対照(薬剤を含まない)の 50%に減少させる薬剤濃度を IC₅₀ とした。

b)Yield reduction assay : 35 mm プラスチックシャーレに単層を形成させた細胞に moi 5-15 PFU/cell でウイルスを感染させ、37°C、1 時間吸着させ、種々の濃度薬剤を含む維持メディウム(2%非働化牛胎児血清加 MEM)を加えて 37°C、炭酸ガス培養器内で 7-8 時間培養させ、一段増殖後のウイルス量を plaque 法により測定した。

細胞毒性の測定

35 mm プラスチックシャーレに 2-3 x 10⁵ 個の細胞を播き込み、24 時間炭酸ガス培養器で培養した後、所定濃度の化合物を含む増殖用メディウム(MEM/10%FCS)に交換し、さらに 48 時間培養した。培養後、血球計算版を用いて細胞数を測定し、化合物で処理していない時の細胞数の 50%に増殖を抑制する化合物の濃度を CC₅₀ とした。また、CC₅₀/IC₅₀ (plaque reduction assay により求めた値)の値を化学療法係数(CI)として選択毒性の指標とした。

in vivo 抗ウイルス作用

CB4 感染死に対する効果 : 1 群 10 匹の BALB/c マウス (7, 8 週齢、雌)に 5 または 420 LD₅₀ (420 LD₅₀=10³ PFU)の CB4 637 株を腹腔内(ip)に接種し、感染後 2 時間より薬剤投与を開始し、5 または 9 日間 ip 投与した。マウスは、感染後 20 日まで観察した。

CA9 感染死および麻痺に対する効果 : 生後 48 時間以内の乳呑みマウス (CD-1)に 5 LD₅₀(10⁴ PFU)の CA9 を皮下(sc)接種し、感染 24 時間目から薬剤を 1 日 2 回、5 日間 sc 投与し、感染後 20 日まで観察した。

C. 研究結果

in vitro 抗ウイルス作用

26 血清型のエンテロウイルスに対するベンズイミダゾール誘導体の抗ウイルス活性について plaque reduction assay により検討した (Table 1) と、何れの化合物も供試した全てのウイルスに対して強力な抗ウイルス作用を示した。特に、MRL-1237 の IC₅₀ 値は供試ウイルス中最も強い効果を示した Echo 22 に対して 0.032 μg/ml、最も低感受性を示した Polio1 でも 2.4 μg/ml、供試 26 血清型のウイルスに対する平均 IC₅₀ 値は 0.35 μg/ml と極めて強力な抗ウイルス効果を示した。さらに、MRL-1237 はヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎等の患者から分離して培養細胞で継代 3 代以内の CB4 新鮮分離株に対しても実験室継代株 JVB 株と同程度の効果を示し、これら 8 株のウイルスに対する IC₅₀ 値は 0.11-0.24 μg/ml であった (Table 2)。MRL-1237 の誘導体 MRL-1243 は一部のウイルスに対しては MRL-1237 以上の効果を示した。また、これらのベンズイミダゾール誘導体は高 moi で一段増殖させた CA9、CB4、Echo25 および EV70 のウイルス複製を濃度依存的に減少させ、1 μg/ml の濃度では 99.9%以上阻害した。一方、宿主細胞として用いた HeLa、HeLa-S3、FL、RD 細胞に対する MRL-1237 の CC₅₀ 値はそれぞれ 304、182、207 および 305 μg/ml で、化学療法係数 (CC₅₀/IC₅₀) は 74 から 9,530 と極めて優れた選択性を示した。

以上の結果より、MRL-1237 およびその誘導体は in vitro において極めて強力な抗ウイルス作用と優れた選択性を有する化合物であることが示唆