

された。

in vivo 抗ウイルス作用

CB4 637 株を BALB/c マウスに接種すると成熟したマウスでも全身感染して死亡する。この全身感染系における MRL-1237 の効果を検討した結果を Table 3 に示す。420LD₅₀ の CB4 637 株を ip 接種し、ウイルス感染後 2 時間より 1 日 1 回、5 日間（計 5 回）MRL-1237 を ip 投与して感染後 20 日目まで観察したところ、placebo 群では感染後 9 日までに全てのマウスが死亡したが、40 mg/kg 投与群では全てのマウスが生存し（ $p < 0.001$ ）、20 mg/kg 投与群では 80%（ $p < 0.0025$ ）、10 mg/kg 投与群でも 70%（ $p < 0.005$ ）のマウスが生存し、有意に生存率を上昇させた。感染ウイルス量を 5LD₅₀ に減じ、1 日あたりの投与回数を 2 回に増やして計 10 回の投与を行うと、2.5 mg/kg 投与群でも 90% のマウスが生存し（ $p < 0.001$ ）、さらに投与期間を 9 日間に延長して計 18 回の投与を行うと、1.25 mg/kg 投与群において 60% のマウスが生存した（ $p < 0.0025$ ）。また、生存日数も有意に延長させた。

生後 48 時間以内の CD-1 乳呑みマウスに 5LD₅₀ の CA9 を sc 接種し、感染後 24 時間から MRL-1237 を 1 日 2 回、5 日間、計 10 回 sc 投与して感染後 20 日まで観察した。その結果を Table 4 に示す。Placebo 群ではウイルス感染後 3 日より四肢、躯幹に弛緩性麻痺を発症して感染後 10 日までに全てのマウスが死亡したのに対し、薬剤投与群では容量依存的に生存率および生存日数の増加、麻痺の発症阻止および麻痺症状を軽減させた。すなわち、1 mg/kg 以上の投与群では全例が生存し（ $p < 0.001$ ）、0.5 mg/kg 投与群でも 76% のマウスが生存した（ $p < 0.005$ ）。0.25 mg/kg 投与群では延命効果が認められた（ $p < 0.005$ ）。さらに、薬剤の投与開始を遅らせた際の効果を検討したところ、Fig. 1 に示すように CA9 感染後 48 時間から開始した場合は 83.3% のマウスが生存し（ $p < 0.001$ ）、麻痺が観察される感染後 72 時間より投与（2 mg/kg, sc, 1 日 2 回、5 日間）を開始しても 46% のマウスが生存し（ $p < 0.0025$ ）、MRL-1237 は治療効果をも

有することが明らかとなった。また、結果には示していないが、CB4 感染 SJL/J マウスに惹起される低血糖症状に対して何れの化合物も容量依存的な効果を示し、低血糖発症後の感染後 48 時間から薬剤投与を開始しても有意に血糖値の回復を促進した。

エンテロウイルス感染症は、感冒症状等の軽微なものから無菌性髄膜炎、脳炎などの重症化するものまで極めて多彩である。近年、マレーシアや台湾で EV71 感染による大規模な手足口病の流行と平行して急性死症例が多発したことが報告されている。しかしながら、これらのエンテロウイルス感染症に有効な抗ウイルス剤は現在までのところ開発されていない。今回、我々が見出した MRL-1237 をはじめとする誘導体は、*in vitro* において供試した 26 血清型のエンテロウイルスに対してプラーク形成およびウイルス複製を強力に阻害し、宿主細胞には極めて低い毒性を示した。また、*in vitro* 同様、幼若、成熟何れのマウス感染系においても低容量で抗ウイルス作用が認められ、予防的効果のみならず、治療効果をも発揮した。

E. 結論

MRL-1237 およびその誘導体はエンテロウイルス感染症に対して有効な抗ウイルス剤の候補物質として有望であると考えられる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

○Shimizu H, Agoh M, Agoh Y, Yoshida H, Yoshii K, Yoneyama T, Hagiwara A, 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

Table 1. Effect of Benzimidazole derivatives on the plaque formation of human enteroviruses

Virus	Cell	IC ₅₀ (µg/ml)			
		MRL-1217	MRL-1237	MRL-1243	
Poliovirus	1 (Sabin)	HeLa-S ₃	NT	2.4	NT
	2 (Sabin)	HeLa-S ₃	1.6	0.84	1.3
	3 (Sabin)	HeLa-S ₃	1.4	0.88	1.1
Echovirus	5 (Noyce)	HeLa-S ₃	0.11	0.066	0.068
	6 (SP-72)	HeLa-S ₃	0.15	0.15	0.10
	9 (Hill)	HeLa-S ₃	0.11	0.076	0.063
	11 (Gregory)	RD	NT	0.061	NT
	18 (SP1572-82)	HeLa-S ₃	0.15	0.11	0.094
	20 (11847)	HeLa-S ₃	0.15	0.090	0.073
	22 (SP550-72)	RD	NT	0.032	NT
	25 (SP1774-90)	HeLa-S ₃	0.073	0.064	0.044
	30 (SP2447-83)	HeLa-S ₃	0.17	0.12	0.080
	Coxsackievirus	A4 (High point)	RD	NT	0.18
A6 (SP1776-86)		RD	NT	0.41	NT
A7 (AB-IV)		RD	0.97	0.78	NT
A9 (Bozek)		RD	0.26	0.16	0.043
A10 (Kowalik)		RD	NT	0.63	NT
A16 (G-10)		RD	NT	0.94	NT
B1 (SP2119-86)		HeLa	0.15	0.084	0.12
B2 (clin. iso.)		HeLa	0.15	0.12	0.13
B3 (Nancy)		FL	NT	0.14	0.11
B4 (JVB)		HeLa	0.22	0.14	0.16
Enterovirus	B5 (Faulkner)	FL	NT	0.15	0.15
	B6 (Schmidt)	HeLa	0.29	0.21	0.21
	70 (J670/71)	RD	0.17	0.036	0.030
	71 (BrCr)	RD	NT	0.24	NT

NT: not tested

Table 2. Effect of MRL-1237 on the plaque formation of CB4 freshly clinical isolates

Virus	IC ₅₀ (µg/ml)
prototype (JVB)	0.14
509	0.11
637	0.16
688	0.15
974	0.17
976	0.16
982	0.19
1180	0.24
3106	0.20

Table 3. Effect of MRL-1237 on CVB4-induced death in BALB/c mice

Regimen	Treatment	Inoculum dose (LD ₅₀)	Survival rate ¹⁾		Mean survival time	
	Dose (mg/kg)		Survivors per total	P ²⁾	Day ± SD	P ³⁾
once daily for 5 days	placebo (PBS)	420	0/10	NS ⁴⁾	6.8 ± 2.0	NS
	5		0/10		8.1 ± 1.2	
	10		7/10		17.2 ± 4.3	
	20		8/10		17.9 ± 4.2	
	40		10/10		20.0 ± 0.0	
twice daily for 5 days	placebo (PBS)	5	0/10	NS	7.7 ± 1.3	NS
	5		3/10		11.5 ± 5.3	
	1.25		0/10		8.3 ± 2.1	
twice daily for 9 days	placebo	5	0/10	NS	8.2 ± 0.9	NS
	0.625		0/10		8.6 ± 0.8	
	1.25		6/10		15.3 ± 6.1	
	2.5	9/10	<0.001	19.2 ± 2.4	<0.001	

Groups of 10 female BALB/c mice (7 to 8-week old) were infected i.p. CVB4(637) and medicated i.p. with MRL-1237 beginning 2 h after infection.

1) At 20 days after infection 2) χ^2 -test with Yates' correctin 3) Student's *t*-test 4) Not significant

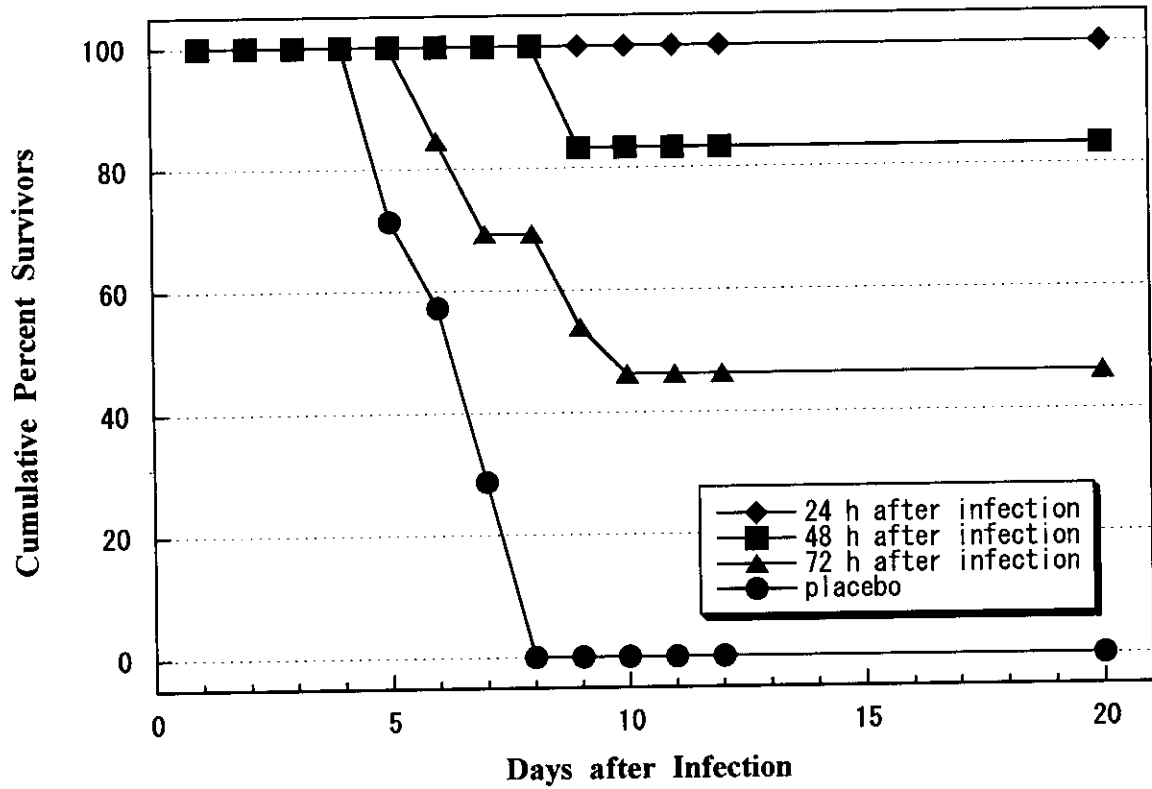
Table 4. Effect of MRL-1237 on CVA9-induced paralysis and death in suckling mice

Dose (mg/kg)	Mean paralysis score ¹⁾													Cumulative No. of paralyzed per total	Mean survival time (Days ± SD)	
	Days after infection															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	20			
placebo (PBS)	0	0	0.13	2.07	2.90	2.88	2.86	2.50	3.00						30/30	5.6 ± 1.3
	(0/30)	(0/30)	(4/30)	(26/30)	(21/21)	(16/16)	(7/7)	(2/2)	(1/1)	(0/0)	(0/0)	(0/0)	(0/0)			
0.25	0	0	0	1.41	2.19	2.15	1.94	1.75	1.60	1.56	0.50	0	0	29/29	10.0 ± 6.3	
	(0/29)	(0/29)	(0/29)	(19/29)	(26/26)	(20/20)	(14/26)	(10/12)	(8/10)	(6/9)	(4/8)	(0/8)	(0/8)	NS	P<0.005	
0.5	0	0	0	0.12	0.64	0.84	1.04	1.13	0.60	0.21	0.05	0	0	17/25	17.0 ± 5.3	
	(0/25)	(0/25)	(0/25)	(2/25)	(10/25)	(16/25)	(16/24)	(12/23)	(7/20)	(5/19)	(3/19)	(0/19)	(0/19)	P<0.005	P<0.001	
1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/20	20.0 ± 0.0	
	(0/20)	(0/20)	(0/20)	(0/20)	(0/20)	(0/20)	(0/20)	(0/20)	(0/20)	(0/20)	(0/20)	(0/20)	(0/20)	P<0.001	P<0.001	
2.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/21	20.0 ± 0.0	
	(0/21)	(0/21)	(0/21)	(0/21)	(0/21)	(0/21)	(0/21)	(0/21)	(0/21)	(0/21)	(0/21)	(0/21)	(0/21)	P<0.001	P<0.001	

Mice were infected s.c. with 5 LD₅₀ of CVA9 and treated s.c. with MRL-1237 twice daily beginning 24 h after infection for 5 days. Numbers in parentheses are number of paralyzed mice per survived mice.

1) Scores: 0, no symptoms; 1, paralysis in shoulder and foreleg; 2, addition of paralysis in hind limb; 3, systemic paralysis and necrosis of straightened muscle
2) Not significant 3) χ^2 -test 4) Student's *t*-test

Fig.1 Therapeutic effect of MRL-1237 on CVA9-induced paralysis and death in suckling mice



Mice were infected s.c. with 5 LD₅₀ of CA9 and medicated s.c. with dose of 2 mg/kg twice daily for 5 days.

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Harashima A, Hatano I, Suzuki Y, Yoshii K, Yoshii T, Nomoto A, Kurata T	Comparison of neuropathogenicity of poliovirus type 3 in transgenic mice bearing the poliovirus receptor gene and cynomolgus monkeys.	Vaccine			印刷中
Iwasaki T, Nagata N, Hatano I, Harashima A, Horiuchi A, Konishi K, Koike S, Nomoto A, Kurata T	Transgenic mice bearing human poliovirus receptor for quality control.	Pharmeuropa, Special Issue:		59-68	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
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.
清水博之	エンテロウイルス 71 による脳炎	化学療法の領域	16	46-50	2000
Inouye S, Yamashita K, Yamadera S, Yoshikawa M, Kato N and Okabe N	Surveillance of viral gastroenteritis in Japan: Pediatric cases and outbreak incidents	J Infect Dis	181	S270-274	2000
岡部信彦:	脳炎・脳症をめぐる最近の話題. 疫学-サーベイランス情報	-脳と発達	32	137-141	2000
岡部信彦	経皮接種による不活化ポリオワクチン導入の意義	医学のあゆみ	193	650-651	2000
山崎謙治、左近直美、奥野良信	エンテロウイルス 71 の血清疫学.	臨床とウイルス.	28.	151-154	2000
塩見正司	ウイルス感染に関連する急性脳炎と急性脳症	小児神経学の進歩	28	365-375	2000
Hosoya M, Sato M, Honzumi K, Katayose M, Kawasaki Y, Sakuma H, Kato K, Shimada Y, Ishiko H, Suzuki H:	Association of nonpolio enteroviral infection in the central nervous system of children with febrile seizures.	Pediatrics			印刷中
細矢光亮、他	PCR 法により診断した非定型的経過をとったエンテロウイルス脳炎の 2 症例	日小児会誌	104	856-861	2000