

2. また吾郷らによって開発された抗ウイルス剤 MRL-1237 はエンテロウイルス一般に有効であることが示されているが、本研究で用いている SK/EV006/Malaysia 株についてはウイルス増殖抑制に必要な薬剤濃度が高く、効力が低下していた。そこで MRL-1237 が作用すると考えられる 2C 領域の配列を他のエンテロウイルス 71 と比較すると SK/EV006/Malaysia 株だけが塩基番号 4,748 番に G から T への変異 (2C のアミノ酸番号 244 が Ala から Ser に変異している) が存在することが判明したので、これが薬剤有効性に変化を与えていると推測された。そこでこの塩基 (アミノ酸) を他のエンテロウイルス型に戻したウイルスを作成した。

B. 研究方法

一昨年度作成した SK/EV006/Malaysia 株の感染性 cDNA クローンを材料とした。この感染性 cDNA の 5' noncoding region をポリオウイルス強毒 Mahoney 株や弱毒 Sabin 1 株のものと組換えた。組み換え体から RNA を合成した後 F-Vero 細胞にトランスフェクションし、組み換えウイルスを得た。これらのウイルスの一段増殖速度の測定を行った。また、新たにこの領域をヒトライノウイルス 2 型、コクサッキーウイルス A16 の 5' noncoding region と組み換えたウイルスの作成を試みた。

また、この感染性 cDNA クローンの 4,748 番の塩基を T から G に変異を PCR 法により導入した。この変異体 cDNA から *in vitro* で RNA を合成し、RD-A 細胞にトランスフェクションしてウイルスを回収した。

C. 研究結果

SK/EV006/Malaysia 株の感染性 cDNA ク

ローンの 745 塩基からなる 5'-noncoding region を Poliovirus 1 型 Mahoney 株、Sabin 1 株野 5'-noncoding region 742 塩基と置換した (pSVA-Mah/EV, pSVA-Sab/EV)。これら 2 つの cDNA クローンから *in vitro* RNA 合成を行い、F-vero 細胞にトランスフェクトしてウイルスを回収した (Mah/EV, Sab/EV)。トランスフェクションならびに培養は 37°C と 33.5°C で行った。トランスフェクション後数日でどちらの感染性クローンをトランスフェクションした細胞からも細胞変性効果が観察された。ウイルス回収時に温度による大きな差は認められなかった。この培養上清を新たな F-vero 細胞で 2 代培養したウイルスの 37°C での 1 段増殖速度を調べた。親株 EV71、感染性 cDNA クローンから回収した株、Mah/EV、Sab/EV はどれも 10 から 12 時間程度で 1 ラウンドの増殖がみられ、増殖速度には大きな差がみられなかった (図 1)。

また 5' noncoding region をヒトライノウイルスやコクサッキー A16 と置換したウイルスは現在作成中であるが、ウイルスを回収するにいたっていない。

SK/EV006/Malaysia 株の塩基番号 4,748 番を T から G に変異させたウイルスを回収することに成功した。もとの cDNA から回収されたウイルス、変異体 cDNA から回収されたウイルスは現在薬剤有効性に関する検討を進めている最中である。

D. 考察

EV71 はポリオウイルス (約 6 時間) と比較して F-vero 細胞での増殖速度ははるかに遅い (10-12 時間)。増殖速度を規定しているのは 5' noncoding region の遺伝情報であればこの部分を poliovirus Mahoney 株や Sabin 1 株に入れ換えれば poliovirus と同様の表現型を示すと考えられたが、増殖

速度は親株とほぼ同様であった。従って EV71 の増殖速度は coding region 上の遺伝情報によって律速されていると思われる。EV/Sab が親株や Mah/EV と比較し増殖速度が遅いということもなかったため、このウイルスが弱毒化している可能性についても判定できなかった。

E. 結論

SK/EV006/Malaysia 株の感染性 cDNA クローンを元に 5'-noncoding region をポリオウイルス Sabin 1 株と入れ替えた弱毒候補株を作成した。培養細胞のレベルでは毒力に変化があるかどうか判定することが不可能であったので、サルなどの動物モデルを用いて毒力を検定する必要がある。さらにヒトライノウイルスやコクサッキーウイルス A16 の 5' noncoding region をもつウイルスも回収を成功させサルなどで実験を行うべきであると考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Miki Ida-Hosonuma, Takuya Iwasaki, Choji Taya, Yuko Sato, Jifen Li, Noriyo Nagata, Hiromichi Yonekawa, & Satoshi Koike (2002) Comparison of neuropathogenicity of poliovirus in two transgenic mouse strains expressing human poliovirus receptor with different distribution patterns. *J. Gen. Virol.* 83 : 1095-1105.

2. Miki Ida-Hosonuma, Yukari Sasaki, Haruka Toyoda, Akio Nomoto, Osamu Gotoh, Hiromichi Yonekawa & Satoshi Koike (2003) Host range of poliovirus is restricted to simians because of a rapid sequence change of the poliovirus receptor gene during evolution. *Arch. Virol.* 148: 29-44.

2. 学会発表

第 50 回日本ウイルス学会 細沼美樹、岩崎琢也、多屋長治、米川博通、小池智、「ポリオウイルスの組織特異的感染に対する 1 型インターフェロンレセプター欠損の影響」

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

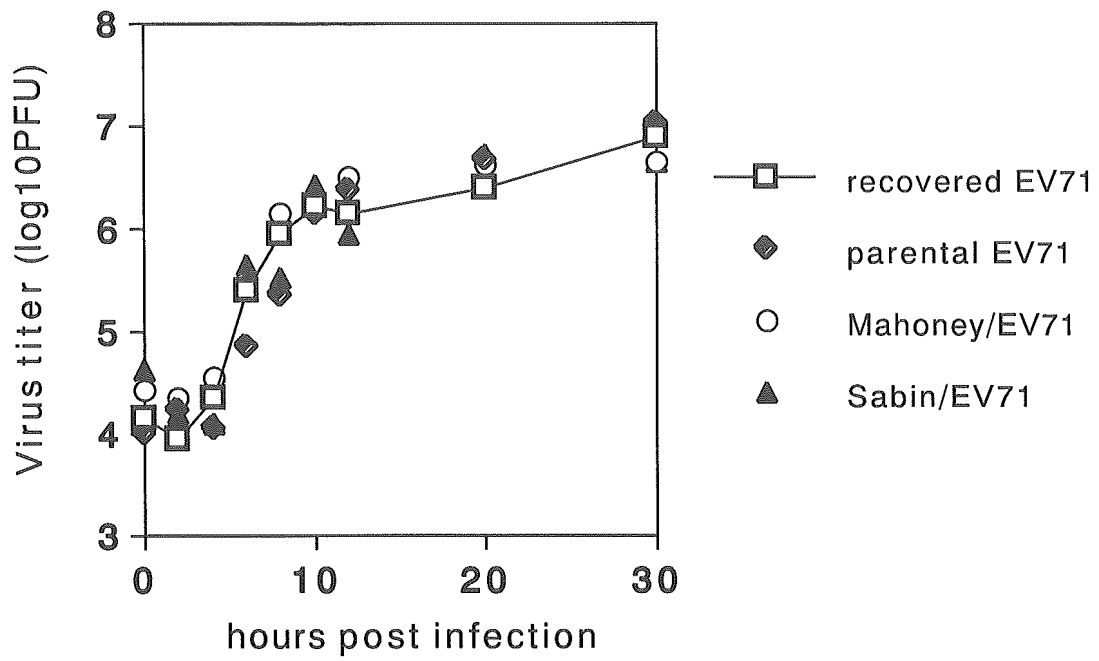


図1. EV71の一段増殖速度

平成 14 年度
厚生労働省科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担 研究報告書

エンテロウイルス 71 実験感染モデルの開発
マウス感受性解析

分担研究者 岩崎琢也
国立感染症研究所感染病理部・長崎大学熱帯医学研究所
網 康至
国立感染症研究所動物管理室
清水博之
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) は手足口病の病原体であるが、ときに重篤な神経症状を引き起こす。この神経病原性がウイルスならびに宿主のどちらが重要な要因となっているかは十分に解明されていない。EV71 の感染実験において種々の動物が感受性を有していると報告されているが、病理学的に確認されているのは霊長類のみである。わたしたちは、これまで、カニクイザルが EV71 の神経病原性の解析に適している動物であることを明らかにしてきた。しかし、霊長類の感染実験が非常に煩雑な操作を必要とし、かつ動物倫理ならびに研究費的にも多くの問題点を抱えている。一方、齧歯類の感染実験は非常に簡便ではあるが感受性、感染病理像については十分に解明されていない。本年度は齧歯類の EV71 の感受性を解析するため、乳のみマウスに EV71 を脳内ルートで接種し、接種後の病態観察と病理学的解析を行った。生後 24 時間以内のマウスにおいて、EV71 を脳内に接種したところ、生後 4-6 日目に哺乳が悪くなり、脱水症状を伴い、死亡した。死亡したマウスを病理組織学的に解析したところ、舌筋をはじめとする横紋筋の破壊が確認され、舌筋の機能不全から哺乳障害が引き起こされ、死亡したと推定された。脳病変ははっきりとは確認できず、マウスにおいては EV71 は横紋筋を標的とした急性炎症を引き起こし、これが死因となっていることが明らかにされた。また、生後 24 時間以降に接種したマウスでは致死的転帰は認められなかった。以上より、マウスに

おける EV71 感染はヒトの病態とは非常に異なっており、実験モデルとして神経病原性を対象とした解析には不適である。ただし、横紋筋感染モデルとしては有用である。

A. 研究目的

手足口病に罹患した小児が時に重篤な神経症状を引き起こす。手足口病の病原体としてコクサッキーウイルス A16, A10 ならびにエンテロウイルス 71(EV71)などがあげられるが、重症例からは EV71 が分離されている。また、手足口病の臨床症状がなくとも、神経学的に重篤な症状を呈した例より EV71 が分離されることがある。この EV71 がどのように神経病原性を引き起こしているのか十分に解明されていない。1970 年代はじめに EV71 が発見されてい以来、カニクイザル、乳のみマウス、乳のみラットを用いた動物実験が報告されている。われわれはカニクイザルを用いて EV71 の神経病原性について解析し、このサルが EV71 に非経口的に感受性を有し、かつ接種後の神経学的症状が人体感染に類似していることを報告してきた (Nagata 2002)。しかし、サルを用いた感染実験は多くの研究費と人員を要求し、非常に煩雑な操作を必要ことから、汎用化することは非常に困難である。そこで、小動物を用いた感染実験モデルの可能性を探索する目的で、今年度は乳のみマウスの感染実験を行い、接種後の経過を観察し、病理組織学的解析を行うこととした。なお、今までにも EV71 は乳のみマウスを用いた論文が過去に報告されているが、その詳細な病理学的解析は殆どなされていない。

B. 研究方法

1) ウイルス

1998 年におきたマレーシアでの EV71

のアウトブレイクの際に、小児脳炎患者の直腸拭い液から分離された SK/EV006/Malaysia 97 株を用いた。この株は分離後 Vero 細胞で 36°C で継代されているが、継代数は 5 回以内である。ウイルス価は Vero 細胞で Kärber formula (WHO 1997) に基づき cell culture infectious dose (CCID₅₀) を算定した。なお、温度感受性株ではない。

2) 感染実験

実験動物中央研究所より購入した ICR 系マウスを用いた。妊娠 14 日目の親マウスを入荷し、出産後 48 時間以内 (2 日齢とする) あるいは 24 時間以内 (1 日齢) のマウスの脳内にウイルス液を 10 μ l 接種した。ウイルス接種量は一匹あたり 10⁶CCID₅₀ 量とした。接種後、14 日間観察した。脳内接種にはマウス脊髄内接種用マイクロシリンジ (ISP 用イトローマイクロシリンジ) を用いた。

3) 病理組織学的解析

脳内接種した各群 (1 日齢と 2 日齢) のマウスのうち、接種後 3 日目に各 3 匹ずつ病理学的検索を行った。また、8 日目に発症を確認したマウス 3 匹を病理学的に解析した。エーテル過麻酔殺後、解剖し、ホルマリン固定は注射針を用いて心臓から 10%ホルマリン緩衝液を還流した。その後、頭部を含め全身を前額断あるいは水平断に 5 ミリ間隔で細切後、10%ホルマリン緩衝液中の浸漬による再固定を行った。固定組織は 70%エタノール中で脱脂し、EDTA-4NA 液で脱灰し、常法どおりパラフィン包埋し、

薄切切片を作成した。連続切片において hematoxylin-eosin 染色および Klüver-Barrera 染色を行い、光学顕微鏡下で観察した。

4) 免疫組織化学染色

パラフィン切片上で EV71 のウイルスカプシド抗原の局在を解析する免疫組織学的解析には、アルカリ変性した EV71 ウイルス粒子をウサギに免疫することにより作製した抗 EV71 血清を使用した。この抗体の作製法とその染色方法はすでに報告してある (Nagata et al., 2002)。以下にその概略を記す。

パラフィン切片を脱パラフィン、親水化し、トリプシン (37°C 30 分間) 処理後、0.3% 過酸化水素水/メタノール (室温 30 分間) による内因性ペルオキシダーゼを不活化した。燐酸緩衝液 (PBS) で洗浄後、ヤギ正常血清と 5 分間反応し、その後、予め希釈決定した一次抗体ウサギ血清と 4°C 一晩反応させた。PBS 洗浄後、ビオチン化抗ウサギ抗体ヤギ血清と室温 30 分反応させ、洗浄後にストレプトアビジンペルオキシダーゼと室温で 30 分間反応させた。さらに洗浄後、diaminobenzidine による可視化をおこない、ヘマトキシリンで核染色した。さらに DAKO GenPoint System (DAKO) を用いた超高感度法による検出も試みた。

C. 研究結果

乳のみマウス感染実験結果

1) 臨床症状

1 日齢のマウスにおいて、脳内接種後、4-6 日目に哺乳が低下し、脱水状態となり、全身状態も悪化し、死亡した。一部のマウスでは半身麻痺が見られたものもあった (図 1)。1 日齢のマウスの感染実験は 2 度行ったが、この臨床症状の発症には殆ど差がなく、再現性を確認することができた。

これに対し、2 日齢のマウスの接種実験では接種後、臨床症状は観察されず、接種 5 週間後にも何らの異常所見を認めず、健康であった。

2) 病理学的・ウイルス病理学的解析

1 日齢にウイルスを脳内接種し、接種 3 日後に解析した組織では、光学顕微鏡下で組織病変が確認できたのは舌の横紋筋組織のみであり、同日齢の正常マウス (図 1 A,B) に比較し、筋細胞の空胞変性と筋組織全体の浮腫が観察された (図 1 C,D)。免疫組織学的解析では、この病変部に一致しウイルスカプシド抗原が検出された (図 1 E,F)。この抗原陽性部位において、横紋筋細胞以外に抗原陽性となる細胞は確認できなかった。舌の横紋筋細胞以外に、頭部表層の横紋筋にもウイルス抗原を検出したが、この抗原陽性細胞の組織形態の変化ははっきりしなかった。

一方、ウイルスを接種した大脳・視床では注射針による接種痕を確認したが、ウイルスカプシド抗原が陽性となる細胞は確認することは出来なかった。超高感度法を用いた解析において、脳幹部の三叉神経運動核 (Mo5) の神経細胞にのみウイルス抗原が検出された (図 3 A, B)。この抗原陽性細胞は神経細胞であり、また、周囲には炎症性反応もなく、血管周囲細胞浸潤 (perivascular cuffing) もみられず、光顕レベルでは病変部位の特定は困難であった。

接種 8 日後に瀕死となったマウスを解析したところ、は全身の横紋筋細胞に舌筋と同様の所見が認められ、さらに心筋にも極く少数の抗原陽性細胞の存在が確認できた。

D. 考察

乳のみマウスにおける EV71 に対する感受性は生後 24 時間以内のみに存在する。感受性を有している組織は横紋筋細胞、心

筋細胞ならびに神経細胞であった。横紋筋細胞がより高い感受性を有しており、マウスにおける EV71 感染による死因として横紋筋細胞の機能不全、とくに舌筋の運動障害による哺乳障害が挙げられる。感染 3 日目、8 日目における明らかな神経細胞の感染は脳幹の舌咽神経および脊髄神経にのみ認められ、腰髄や頸髄には波及しておらず、カニクイザルで観察されたような錘体路ならびに錘体外路の障害はマウスでは生じていないと推定される。したがって、臨床的に観察された麻痺様症状は全身の横紋筋細胞の感染が拡大したことにより発症してきたと推定する。

心筋細胞にもウイルス感染が確認されたことは、このウイルスによる心筋炎発症の可能性も示唆され、興味を持たれる点であり、今後解析していく必要がある。

また、生後 1 日齢と 2 日齢の EV71 に対する感受性の違いが免疫系あるいは細胞レセプターの発育レベルの違いによるのか興味をもたれる。さらに検討する予定である。

E. 結論

カニクイザルは前年度報告したように、神経細胞が主たる感受性細胞であり、ウイルスの神経病原性を反映していた。一方、乳のみマウスでは横紋筋細胞の感染が主となり、神経病原性を反映しない可能性が高い。分離したウイルス等の病原性を調べる場合この点に留意する必要がある。

図の説明

図 1 縦軸は発症した動物の数、横軸は接種後の日数を示した。▲および○は生後 24 時間以内に脳内接種を実施した群 (Exp.1:n=8, Exp.2:n=7)。×は生後 48 時間以内に脳内接種を実施した群(n=10)。

図 2 横紋筋組織内のウイルス抗原検索：
A, B：生後 3 日目の乳のみマウスの舌筋組織を示した。HE 染色。

C,D：生後 24 時間以内に EV71 を脳内接種した動物。接種後 3 日目の舌筋組織を示した。組織の走行は乱れ、空胞変性に陥った細胞も認められる。炎症性反応は見られない。HE 染色。

E,F：同部位。LSAB 染色によるウイルス抗原の検出を行った。病変に一致してウイルス抗原が検出された。

図 3 中枢神経組織内のウイルス抗原検索：

A：生後 24 時間以内に EV71 を脳内接種した動物。接種後 3 日目の三叉神経運動核 (Mo5) を示した。わずかであるが神経細胞の細胞質内に空胞がみられ、染色性に変化が見られる細胞が存在する。

B：ほぼ同部位の神経細胞の細胞質内にウイルス抗原が検出された。DAKO Gene point system をもちいた超高感度法によるウイルス抗原の検出による。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ida-Hosonuma M, Iwasaki T, Taya C, Sato Y, Li J, Nagata N, Yonekawa H, Koike S: Comparison of neuropathogenicity of poliovirus in two transgenic mouse strains expressing human poliovirus receptor with different distribution patterns. J. Gen. Virol. 83 : 1095-1105, 2002,.

Hasegawa H, Kadowaki S, Watanabe I, Aizawa H, Takahashi H, Iwasaki T, Tamura S, Kurata T, Sata T. Persistent infection of influenza virus in irradiated mice and its prevention by intranasal vaccination. Vaccine. 20: 1050-7, 2002.

Asahi Y, Yoshikawa T, Watanabe I, Iwasaki T, Hasegawa H, Sato Y, Shimada S, Nanno M,

Matsuoka Y, Ohwaki M, Iwakura Y, Suzuki Y, Aizawa C, Sata T, Kurata T, Tamura S. Protection against influenza virus infection in polymeric Ig receptor knockout mice immunized intranasally with adjuvant-combined vaccines. *J Immunol*. 168:2930-8, 2002

Yoshikawa T, Asano Y, Akimoto S, Ozaki T, Iwasaki T, Kurata T, Goshima F, Nishiyama Y. Latent infection of human herpesvirus 6 in astrocytoma cell line and alteration of cytokine synthesis. *J Med Virol*. 66:497-505, 2002

Ando Y, Terao K, Narita M, Oguchi Y, Sata T, Iwasaki T: Quantitative analyses of cytomegalovirus genome in aqueous humor of patients with cytomegalovirus retinitis. *Jpn J Ophthalmol* 46: 254-260, 2002,

Ishikawa K, Ando Y, Narita M, Shinjoh M, Iwasaki T: Cytomegalovirus retinitis during immunotherapy for common variable immunodeficiency. *J Infect* 44: 55-56, 2002,

Nagata N, Shimizu H, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y, Sato Y, Miyamura T, Sata T, Iwasaki T: Pyramidal and extrapyramidal involvement in experimental infection of cynomolgus monkeys with enterovirus 71. *J Med Virol* 67: 207-216, 2002,

Nakamura H, Tamura S, Watanabe I, Iwasaki T, Yodoi J: Enhanced resistancy of thioredoxin-transgenic mice against influenza virus-induced pneumonia. *Immunol Lett* 82: 165-170, 2002,

Lokugamage K, Kariwa H, Hayasaka D, Cui BZ, Iwasaki T, Lokugamage N, Ivanov LI, Volkov VI, Demenev VA, Slonova R, Kompanets G, Kushnaryova T, Kurata T, Maeda K, Araki K, Mizutani T, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I. Genetic characterization of hantaviruses transmitted by the Korean field mouse (*Apodemus peninsulae*), Far East Russia. *Emerg Infect Dis* 8 :768-76, 2002,

Hasegawa H, Tatsumi M, Ogawa-Goto K, Takahashi H, Kojima A, Iwasaki T, Kurata T, Sata T, Takeuchi T, Sheehy N, Sawa H, Nagashima K, Hall WW. Processing of the HTLV-II envelope precursor glycoprotein gp63 by furin is essential for cell fusion activity. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18: 1253-60,

2002,

Mitsushima H, Oishi K, Nagao T, Ichinose A, Senba M, Iwasaki T, Nagatake T. Acid aspiration induces bacterial pneumonia by enhanced bacterial adherence in mice. *Microb Pathog* 33: 203-10, , 2002,

2. 学会発表

Iwasaki T., Nagata N., Shimizu H., Ami Y., Miyamura T., Sata T., Kurata T. : Pathology of experimental infection of enterovirus 71 in cynomolgus monkeys in comparison with that of poliovirus. 39th Joint Working Conference on Viral Diseases, Matsumoto, July 2002

細沼美樹、岩崎琢也、多屋長治、米川博通、小池 智：ポリオウイルスの組織特異的感染に対する1型インターフェロンレセプター欠損の影響。第50会日本ウイルス学会、2002,10,16、札幌

永田典代、清水博之、網 康至、波多野いく持、原島綾子、佐藤由子、須崎百合子、佐多徹太郎、倉田 毅、野本明男、岩崎琢也：ポリオウイルスレセプター導入トランスジェニックマウスTgPVR21の粘膜感染モデル。第50会日本ウイルス学会、2002,10,16、札幌

岩崎琢也、井上 智、早坂大輔、佐藤由子、松尾恵子、小野哲朗、佐多徹太郎、神山恒夫、山田章雄、倉田 毅：Oita rhabdovirus 296/1972の病原性とウイルス学的特徴。第50会日本ウイルス学会、2002,10,16、札幌

長谷川秀樹、門脇信悦、田村慎一、岩崎琢也、高橋秀宗、倉田 毅、佐多徹太郎：放射線照射とインフルエンザ感染により起こるマウスの alveolar tumor の解析。第50会日本ウイルス学会、2002,10,17、札幌

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

図1

▲ 1day old, Exp.1 ○ 1day old, Exp.2 × 2 days old

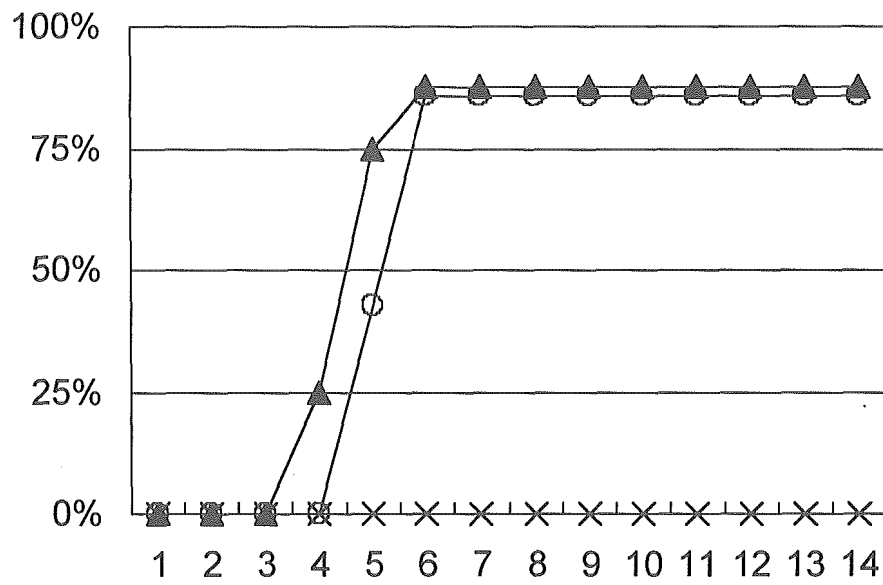


图2

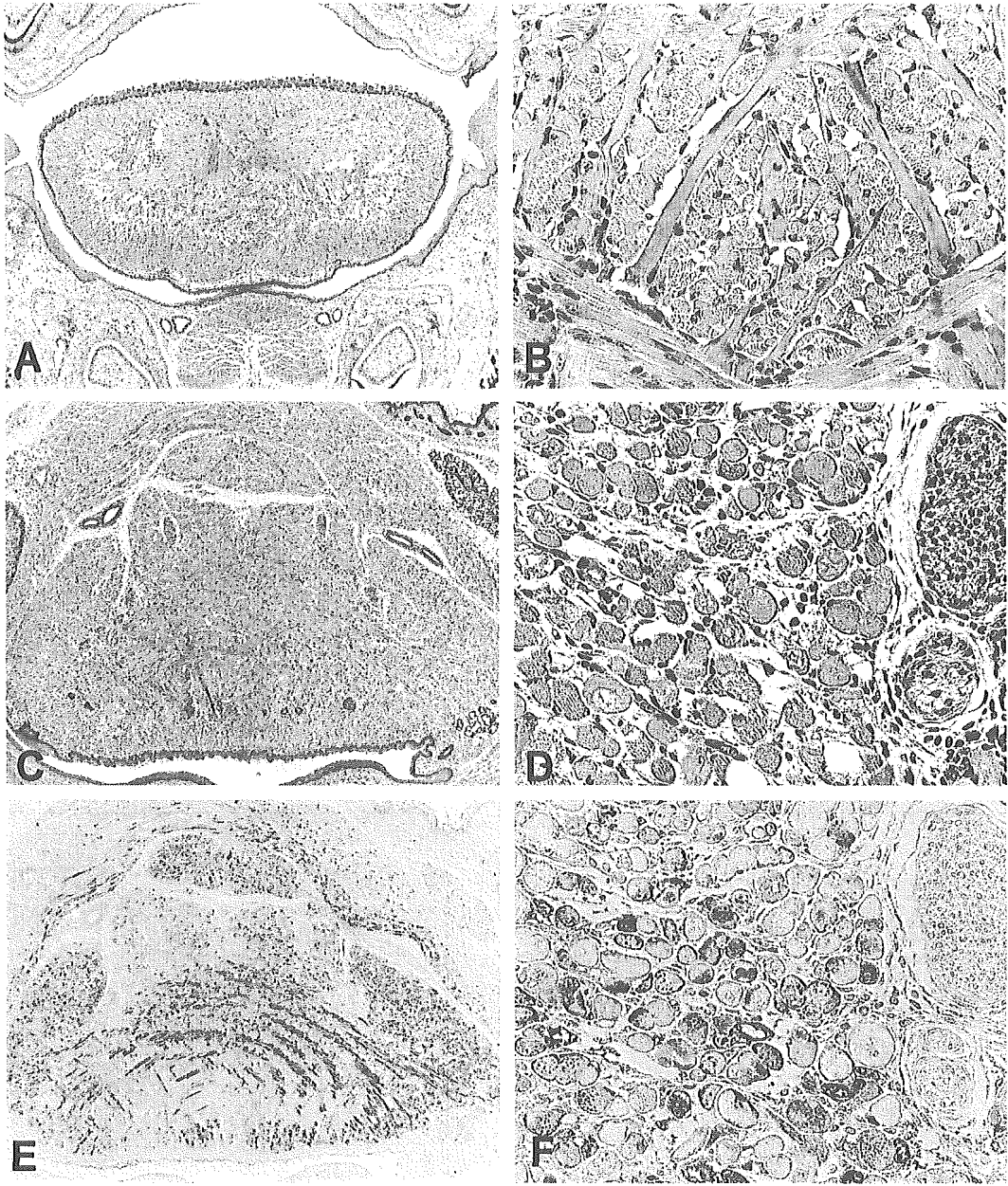
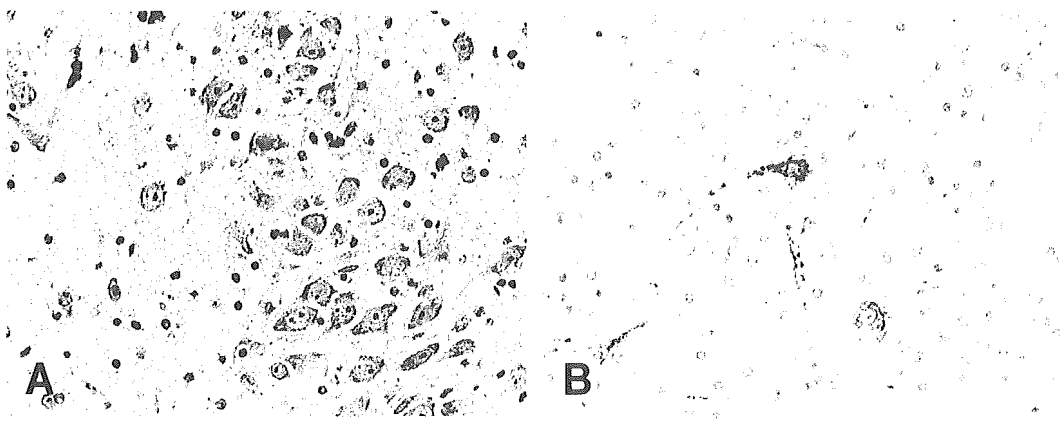


图3



平成14年度
厚生労働省科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担 研究報告書

新規抗エンテロウイルス剤 MRL-1237 の
エンテロウイルス 71 型に対する抗ウイルス作用

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、筒井正樹、岡本孝史
丸石製薬中央研究所

清水博之、アンディ ウタマ
国立感染症研究所ウイルス二部

小池 智
東京都神経科学研究所・微生物学部門

研究要旨

脳炎を発症した患者等からの分離株を含む 10 株のエンテロウイルス 71 型 (EV71) に対する新規抗エンテロウイルス剤 MRL-1237 の *in vitro* における抗ウイルス効果について CPE inhibition assay により検討した。RD-A 細胞を宿主細胞として使用した場合には供試した 10 株の EV71 すべての増殖を阻害し、MRL-1237 の供試ウイルスに対する平均 IC₅₀ 値は 2.2 µg/ml (0.86 - 7.0 µg/ml) であった。さらに、RD-18S 細胞を用いて本細胞で唯一増殖可能な BrCr(M)株に対する効果を確認したところ、IC₅₀ 値は 0.24 µg/ml で、RD-A 細胞を用いて測定した値 (1.1 µg/ml) より 4 倍以上強力な抗ウイルス作用が認められた。また、RD-18S 細胞に対する CC₅₀ 値は 305 µg/ml と極めて高い選択性 (CI=1,271) を示した。したがって、*in vivo* において有効性が認められたコクサッキーウイルス A9 と RD-18S 細胞における効果 (IC₅₀ = 0.16 µg/ml) がほぼ同程度であることから、MRL-1237 は EV71 による重症感染症に対する治療薬として十分期待できるものと推察される。

【研究目的】

エンテロウイルス(EV)には現在 64 の血清型が存在し、EV 感染により上気道炎、

ヘルパンギーナ、手足口病、下痢、急性出血性結膜炎など比較的軽微なものから重篤な新生児心筋炎、若年型糖尿病、無菌性髄

膜炎、脳炎、麻痺、急性灰白髄炎等多彩な病状を呈する。このうち、手足口病の原因ウイルスの一つである EV71 は中枢神経親和性を示し、脳炎や急性弛緩性麻痺を引き起こすこともある。近年、マレーシア、台湾における重症 EV71 感染の流行では 100 人以上の小児が死亡し、我が国でも一昨年の手足口病流行時に重症感染例が多発している。

MRL-1237 は、多数合成したベンズイミダゾール誘導体の中から見出した極めて選択性の高い抗 EV 活性と *in vivo* で予防効果のみならず治療効果も発揮する新規抗 EV 剤である。

MRL-1237 は EV の非構造タンパク質で helicase motif を有する 2C に特異的に作用してその ATPase 活性を強力に阻害し、結果的にウイルス RNA 複製阻害に導く。すなわち、MRL-1237 は 2C^{ATPase} の特異的阻害剤である。本薬剤は、2C の ATP 結合ポケットに可逆的に結合して 2C^{ATPase} 活性を阻害するものと考えられるが、2C との結合には ATP 結合ポケットの C 末端側、すなわち helicase domain の motif-C 近傍の 220 - 230 番目までのアミノ酸が深く関与しており、中でも 227 番目と 229 番目のアミノ酸が薬剤感受性の主要決定基である。したがって、MRL-1237 の抗ピコルナウイルススペクトルは 227 番目、229 番目およびその近接するアミノ酸によって決定されるものと推定されている。

今回、*in vitro* における EV71 の種々の株に対する MRL-1237 の抗ウイルス活性について調べ、EV71 による重症感染に使用できる可能性について検討した。

【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 MRL-1237 を使用した。MRL-1237 は 1 mg/ml になるように PBS または Eagle MEM に溶解させ、ウイルス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

宿主細胞には Vero 細胞、RD18S 細胞および RD-A 細胞を使用した。

EV71 は手足口病、無菌性髄膜炎、脳炎等を発症した患者から分離した 10 株 (Table 1.) を使用した。これらのウイルスはそれぞれ Vero 細胞で増殖させ、CPE が細胞全体に広がった時点で harvest して凍結融解を 3 回行った後の遠心上清をウイルスストック液として使用するまで -80°C で保存した。これらのストックウイルスは、plaque 法により感染価を測定し、薬剤の抗ウイルス活性測定に用いた。

抗ウイルス活性の測定

抗ウイルス活性は CPE inhibition assay により測定した。96 ウェルマイクロプレートに細胞の単層を形成させた後、増殖用メディウム (10%FCS 加 Eagle MEM) を除去し、段階希釈した MRL-1237 を含む維持メディウム (非働化 2%FCS 加 Eagle MEM)、あるいは含まない維持メディウムを 50 μ l/well 添加後、維持メディウムで希釈して 2×10^4 PFU/ml に調整したウイルス液を 50 μ l/well (10^3 PFU/well) 接種して攪拌後 37°C で培養した。MRL-2471 を含まないメディウムを加えたウェルの細胞が 90%以上 CPE を示した時点 (感染後 3 - 5 日) で、薬剤によるウイルス増殖 (細胞死) の阻害を MTT 法により測定し、ウイルス非感染細胞の吸光度 (A_{600}) を阻害 100%、薬剤非存在下のウイルス感染細胞の吸光度を阻害 0% として、50% 増殖阻害濃度 (IC_{50} 値) を求めた。同時に MRL-1237 の宿主細胞に対する毒性 (CC_{50} 値) を同様の方法で算出した。 CC_{50}/IC_{50} の値を化学療法係数 (CI) とし

て選択毒性の指標とした。

遺伝子解析

ウイルスストック液 0.25 ml から Isogen-LS(ニッポンジーン)を用いて genomic RNA を抽出し、2C 領域を含む約 1,000 塩基を RT-PCR で増幅した。PCR 産物を ABI 310 genetic analyser で解析し、2C 領域の全塩基配列を決定した。

【結果および考察】

10 株の EV71 に対する MRL-1237 の抗ウイルス活性について、CPE inhibition assay により検討した (Table 2.)。まず、ストックウイルスの調製に用いた Vero 細胞を宿主細胞として抗ウイルス活性を測定したところ、供試した全てのウイルスに対して供試最高濃度の 30 $\mu\text{g/ml}$ でも著明な抗ウイルス活性は認められず、僅かに BrCr/ts 株の増殖を 30%程度阻害した程度であった。本薬剤は、これまでサル由来の株化細胞を宿主細胞として使用した場合、ヒト由来の細胞を用いた際に得られた IC_{50} 値と比較して高値を示す傾向が認められている。また、一般に抗ウイルス剤の評価においてサル由来の細胞を使用した際にはほとんど有効性が認められないものでもヒト由来の細胞を用いて評価することにより強力な抗ウイルス作用を示す化合物が数多く報告されている。したがって、この現象はおそらくサル由来の細胞においては MRL-1237 の膜透過性がヒト由来の細胞に比べて低いため、薬剤の細胞内濃度が上昇しないことに起因するものと考えられたことからヒト由来の RD-A 細胞を使用して抗ウイルス活性の測定を行った。その結果、何れの EV71 株に対しても明らかな抗ウイルス作用が認められ、 IC_{50} 値は 0.86 - 7.0 $\mu\text{g/ml}$ であった。供試した 10 株の EV71 のうち、SK-EV006 株を除く 9 株については IC_{50} 値が 0.86 - 2.5

$\mu\text{g/ml}$ で感受性に大差は認められなかった。しかしながら、SK-EV006 株に対する IC_{50} 値は 7.0 $\mu\text{g/ml}$ で、この株は他の 9 株と比較して明らかに MRL-1237 に低感受性を示した。

MRL-1237 の作用部位についてコクサッキーウイルス B4 型 (CB4) を用いて詳細に検討したこれまでの結果から本薬剤に対するウイルスの感受性は標的タンパク質である helicase 様タンパク質 2C の motif C の C 末端側近傍に存在する 220-230 番目までに存在するアミノ酸によって決定され、特に 227 番目および 229 番目に位置するアミノ酸が最も重要な薬剤感受性決定基であることを明らかにした。したがって、SK-EV006 株と他の株の薬剤感受性差がこの領域のアミノ酸配列に反映している可能性を確認するために、これら 10 株の EV71 の 2C 領域の全塩基配列を決定し、アミノ酸配列の比較を行った。その結果、株間の heterogeneity が最も多く認められたのは、N 末端側 70 残基と C 末端側 20 残基の領域であったが、薬剤感受性に関与すると考えられる helicase domain 内に存在し、SK-EV003 株のみに見出されるアミノ酸置換は唯一 motif C 直後の 224 番目のアミノ酸であった (Table 3.)。224 番目のアミノ酸は、他の 9 株では全て Ala であったのに対して、SK-EV003 株では Ser であった。以上の結果より、224 番目のアミノ酸の違いが MRL-1237 に対する感受性差を反映していることが強く示唆された。現在、SK-EV006 株 cDNA クローンに部位突然変異 (T4,748G; 2C/Ser224 Ala) を導入して薬剤感受性の変化を検証中である。

また、今回使用した RD 細胞の内、RD18S 細胞で増殖が認められたのは BrCr(M)株のみであった。この RD-18S 細胞を用いて BrCr(M)株に対する MRL-1237 の IC_{50} 値を

測定したところ、BrCr(M)株は RD-A 細胞を用いた時より約 4 倍高感受性を示し、MRL-1237 の BrCr(M)株に対する IC₅₀ 値は 0.24 µg/ml であった(Table 2)。以上の結果より、今回供試した 10 株の EV71 の本薬剤に対する感受性は、これまでに RD-18S 細胞を宿主細胞として用いて測定したコクサッキーウイルス A 群(CA) の IC₅₀ 値と相対的に比較して (0.16 – 0.94 µg/ml) と同程度と推定される。

今回、MRL-1237 の EV71 に対する効果の検討において 3 種類の細胞株を使用し、それぞれの細胞で測定した IC₅₀ 値には同じウイルスでも著しい差が認められた。RD-18S 細胞と RD-A 細胞は同じ RD 細胞に由来するものの、EV71 株間の増殖許容性の違いだけでなく本薬剤の膜透過性にも差があり、細胞内薬剤濃度の差が IC₅₀ 値に違いになって表れたものと思われる。抗ヘルペス作用を有するヌクレオチドアナログでは今回の場合のようにヒト由来の細胞を宿主細胞として使用した場合には強力な抗ウイルス作用が認められてもサル由来の細胞では全く効果が認められないことが以前から報告されている。エンテロウイルスのように多数の血清型が存在し、細胞への感染の足掛かりとして使用するレセプターが多様なウイルスの *in vitro* における抗ウイルス活性を 1 種類の細胞を使って相対的に評価することは極めて困難であり、また、そのような細胞があったとしても前述した細胞内薬剤濃度の問題を考えなければならない。

EV71 に対する薬剤の効果を実質的かつ相対的評価をするためには、*in vitro* のレベルでは臨床分離株の大半に加えて EV71 以外の他エンテロウイルスもできるだけ多くの血清型の増殖が可能でかつ薬剤の膜透過性に優れた宿主細胞が存在し、*in vivo* ではマウスレベルで簡便に評価が行える系が存

在することが望ましいが、現時点では満足できるものを見出すことは困難である。この問題点を少なからず克服できる方法の一つとしてキメラウイルスを用いた評価系を考案した。すなわち、本薬剤の標的タンパク質が 2C であることに着目し、比較的ウイルススペクトルが広く細胞内薬剤濃度が比較的高濃度に達すると考えられるヒト由来 HeLa 細胞を宿主細胞とし、なおかつマウスに明確な病原性を示す CB4 637 株の 2C 領域を EV71 の 2C をコードする遺伝子に入れ換えたキメラウイルスを作製中である (Fig. 1)。2C 領域はマウスに対する病原性にほとんど関与しないものと考えられることから、このキメラウイルスが完成すれば *in vitro* および *in vivo* における MRL-1237 の EV71 に対する実質的な効果を相対的に評価できるものと思われる。しかしながら、現時点では特定の血清型のウイルスに対する有効性を相対的に評価する場合には少なくとも *in vitro* および *in vivo* で有効性が確認されたウイルスと同じ宿主細胞を用いて得られた IC₅₀ 値を比較して間接的に推定評価することしかできない。EV71 の場合、MRL-1237 の *in vivo* における有効性が確認されている CA 9 の RD-18S 細胞における IC₅₀ 値 (0.16 µg/ml) と比較できるのは本細胞で増殖可能な BrCr(M)株に対する IC₅₀ 値 (0.24 µg/ml, Table 2.) のみであるが、両者に対する効果はほぼ同程度であり、しかも RD-18S 細胞に対する CC₅₀ 値は 305 µg/ml と極めて低毒性で 1,000 倍以上の選択性を示したことから、本薬剤は EV71 の重症感染に対する治療薬として十分期待できるものとする。

【結 論】

新規抗エンテロウイルス剤 MRL-1237 は EV71 による重症感染の治療に有効性を発

揮するものと推定される。

【健康危惧情報】

なし

【研究発表】

1. 学会発表

Agoh, M., Agoh, Y., Yamamura, Y., Iwata, R., Tamura, T., Kurimura, T. and Ichimura, H.: Characterization of purified non-structural protein 2C with ssRNA-stimulated and MRL-1237 sensitive ATPase activity from virus-infected cell. The XIIth Meeting of the European Study Group for the Molecular Biology of Picornaviruses. 2002. Boston

Yamamura, Y., Agoh, Y., Iwata, R., Utama, A., Tsutsui, M., Tamura, T., Kurimura, T., Ichimura, H. and Agoh, M.: Native form coxsackievirus B4 recombinant 2C protein shows ATPase activity which stimulated by ssRNA. The XIIth Meeting of the European Study Group for the Molecular Biology of Picornaviruses. 2002. Boston

吾郷昌信、吾郷由美、山村睦朗、田村隆、板垣朝夫、栗村敬、市村宏：新規抗エンテロウイルス剤 MRL-1237. 第 43 回日本臨床ウイルス学会 2002 年 秋田

【知的財産権の出願・登録状況】

なし

Table 1. Enterovirus 71 tested

Virus	Area	Year	Origin	Genotype
				(VP4/VP2)
C7/Osaka	Japan	1997	fatal encephalitis	A-2
SK-EV006	Malaysia	1997	fatal encephalitis	A-2
1095/Shiga	Japan	1997	HFMD	B
SI/Isehara	Japan	1999	HFMD	B
Hungary	Hungary	1978	fatal encephalitis	A-1
Nagoya	Japan	1973	HFMD	A-1
258Bulgaria	Bulgaria	1975	fatal encephalitis	A-1
BrCr (M)				
BrCr/ts	USA	1970	meningitis	BrCr
BrCr/tr				

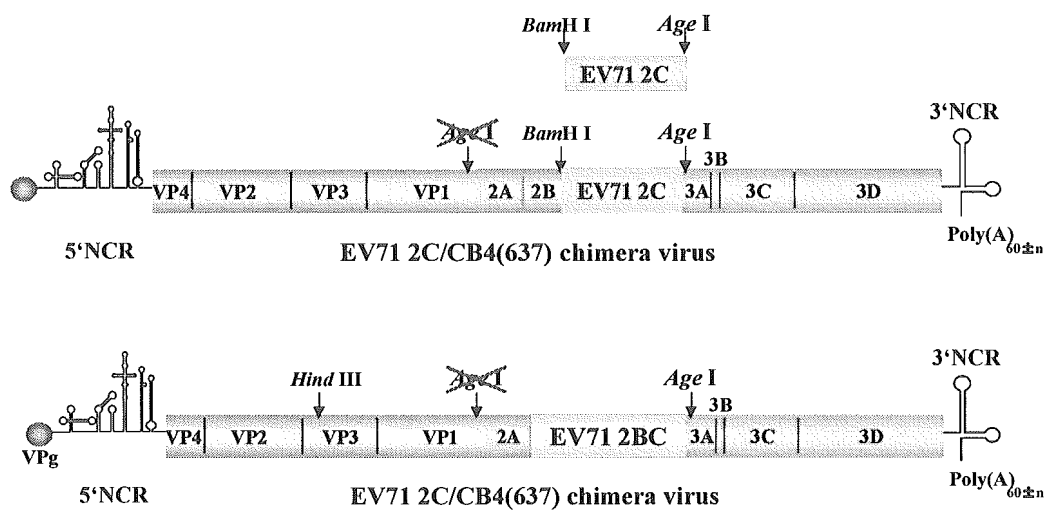
Table 2. Effect of MRL-1237 on the replication of enterovirus 71

EV71	Origin	IC50 (μ g/ml)		
		Vero	RD-A	RD-18S
258Bulgaria	fatal encephalitis	>30	2.5	
SK-EV006	fatal encephalitis	>30	7.0	
C7/Osaka	fatal encephalitis	>30	2.5	
Hungary	fatal encephalitis	>30	1.8	
1095/Shiga	HFMD	>30	2.3	
SI/Isehara	HFMD	>30	1.5	
Nagoya	HFMD	>30	1.5	
BrCr (M)	meningitis	>30	1.1	0.24
BrCr/tr	meningitis	>30	1.0	
BrCr/ts	meningitis	>30	0.86	

Table 3. Amino acid sequence alignment of 2C of enterovirus 71

Strain	Amino acid #								
	222	223	224	225	226	227	228	229	230
258Bulgaria	T	N	A	S	N	I	I	V	P
SK-EV006	T	N	S	S	N	I	I	V	P
C7/Osaka	T	N	A	S	N	I	I	V	P
Hungary	T	N	A	S	N	I	I	V	P
1095/Shiga	T	N	A	S	N	I	I	V	P
SI/Isehara	T	N	A	S	N	I	I	V	P
Nagoya	T	N	A	S	N	I	I	V	P
BrCr (M)	T	N	A	S	N	I	I	V	P
BrCr/tr	T	N	A	S	N	I	I	V	P
BrCr/ts	T	N	A	S	N	I	I	V	P

Fig. 1 Construction of CB4(637)/ EV71 2B or 2BC chimera virus



平成14年度
厚生労働省科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担 研究報告書

抗エンテロウイルス剤 MRL-1237 の作用部位に関する分子解析

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、筒井正樹、岡本孝史
丸石製薬中央研究所

清水博之、アンディ ウタマ（国立感染症研究所ウイルス二部）
小池 智（東京都神経科学研究所・微生物学部門）

研究要旨

MRL-1237 の作用部位を同定するために、RNA helicase consensus motif 内あるいはその近傍に変異を導入した CB4 cDNA クローン及び組換え 2C タンパク質（r2C）を作製し、ウイルスレベル、酵素レベルで reverse genetics を行った。薬剤耐性ウイルスで見いだされた 2C の motif A 内に存在する A133T、motif C 直後に存在する I227V あるいは I227V/A229V の変異を導入したウイルスは、同じ部位に変異を有する薬剤耐性ウイルスと同等の薬剤感受性を示した。また、I227V あるいは I227V/A229V の変異を導入した r2C は薬剤感受性に関して変異導入ウイルスと同様の挙動を示した。ところが、A229V 単独の変異を導入した cDNA クローンからはウイルスとして回収されなかったものの、r2C では正常な ATPase 活性を示し、MRL-1237 および塩酸グアニジンに耐性を示したことから 2C は ATPase 以外にもウイルス複製に必須な機能を有することが示唆された。

以上の結果及びこれまでのポリオウイルスの結果（Shimizu, H. et al., J. Virol.74: 4146-4154, 2000）から、MRL-1237 はエンテロウイルスの 2C 内に存在する 3 つの consensus motif によって形成される ATP 結合ポケットの少なくとも 133, 168, 179, 227 及び 229 番目のアミノ酸を介して結合し、MRL-1237 に対する感受性の主要決定基は 227 及び 229 番目のアミノ酸であることが判明した。また、MRL-1237 の抗ピコルナウイルススペクトラムは、主として 227,229 番目に相当する部位あるいはその周辺のアミノ酸によって決定されている可能性が示唆された。

【研究目的】

MRL-1237 はこれまでの作用機序に関する研究から、ピコルナウイルスの非構造タンパク質 2C に作用し、2C の有する ATPase 活性を特異的に阻害することによってウイルス RNA 合成を阻害し、抗ウイルス作用を発揮するものと考えられている。また、コクサッキーウイルス B4 型 (CB4) を用いて MRL-1237 耐性ウイルスを単離して、遺伝子解析を行った結果、アミノ酸置換を伴う変異がいずれも 2C 内に見いだされたことから、MRL-1237 の標的タンパク質として 2C が推定された。これらのうち、MRL-1237 に耐性程度の低いものはすべて 227 番目の Ile が Val に置換しており、2C に作用する事が知られている塩酸グアニジン(Gua)には野生株よりやや強い感受性を示し、さらに、MRL-1237 に高度耐性を示すウイルスはすべて 227 番目の同様の変異に加えて 229 番目の Ala が Val に変異しており、Gua には交叉耐性を示す。また、Gua 耐性ウイルスからは MRL-1237 に交叉耐性を示すものは得られなかったが、これらのうち 133 番目の Ala が Thr に変異したウイルスは MRL-1237 に対して強感受性を示すことがこれまでに確認されている。

2C は、ATPase 活性を有し、一次構造上の特徴から helicase super family III に分類される。耐性ウイルスから見いだされた MRL1237 に感受性変化を伴うこれらの変異部位を 2C 上に配置 (Fig. 1) すると、133 番目の変異は motif A 内部に、227,229 番目は motif C の直後に位置する。また、ポリオウイルス(PV)の MRL1237 耐性変異部位として、motif B 前後に位置する 164 番目及び 179 番目のアミノ酸が関与していることが見いだされた。したがって、MRL1237 は 2C 内に存在するすべての helicase consensus motif 内、もしくは近傍のアミノ

酸と相互作用して、これらの motif から形成されるヌクレオチド結合ポケット内に結合するものと推定されている。

今回、CB4 の感染性クローンおよび組換え 2C (r2C) を作製し、motif A 内および motif C 近傍に部位特異的変異を導入してウイルスレベル、酵素レベルで reverse genetics を行い、2C 内の MRL-1237 作用部位を同定した。

【研究方法】

CB4 cDNA クローンの構築

CB4 (JVB 株)のゲノム RNA を鋳型として、RT-PCR によりゲノム全長を fragment I (1 - 699 b.)、fragment II (529 - 3,626 b.)、fragment III (3,235 - 5,334 b.)、fragment IV (4,716 - 6,562 b.)および fragment V (5,796 - 7,395 b.)の 5 つの断片に分けて増幅した。ただし、5'末端側の配列を含む fragment I にはその上流に T7 プロモーター配列と Sac I サイト、3'-末端側の配列を含む fragment IV (4,189 - 6,562 b.)には poly(A)配列の下流に Xho I サイトを付加できるように設計したプライマーを用いて増幅した。得られた fragment をそれぞれサブクローニングした後、クローニングベクター pHSG396 にクローニングして CB4 cDNA クローン、pHCB4 を構築した (Fig. 2)。

In vitro transcription とウイルスの回収

pHCB4 を Xho I で切断した後、これを鋳型として MEGAscript T7 kit(Ambion)を用いて感染性 RNA を合成した。得られた感染性 RNA をリポフェクトアミン(GIBCO BRL)を用いて HeLa 細胞にトランスフェクト後、CPE が十分確認された時点でハーベストしてウイルスを回収した。回収したウイルスはプラーク純化を二回行った後、HeLa 細胞で増殖させた。得られたウイルスは塩基配列を解析して、cDNA クローン

と同じ配列であることを確認し、iCB4 とした。

発現プラスミド pET3a/CB4A2C の構築及び r2C の発現、精製

大腸菌の汎用コドンに置換した CB4 2C 遺伝子を挿入し、N 末端にメチオニンを付加した CB4 2C を発現する plasmid、pET3a/CB4A2C を構築した。pET3a/CB4A2C を大腸菌 BL21(DE3) にトランスフェクトして組換え体を作製し、常法に従って r2C の大量発現を行った。菌体内に封入体として大量に産生された r2C は塩酸グアニジンで可溶化し、変性条件下でゲル濾過を行って約 37 kDa 位置に溶出される粗画分として単離した。これを還元処理後、透析によって refolding させ、さらに陽イオン交換クロマトグラフィー、HPLC によるゲル濾過を行って精製した。精製後の r2C は、SDS-PAGE により単一バンドであることを確認した。

部位突然変異

目的の部位に変異を入れた相補的な一組の合成オリゴヌクレオチドをプライマーとし、QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE) を用いて cDNA クローン、pHCB4 および r2C 発現 plasmid、pET3a/CB4A2C に変異を導入した。

NTPase 活性の測定

2C タンパク質の NTPase 活性は、微量リソ酸比色定量法により測定した。

【結果および考察】

cDNA クローン pHCB4 に、CB4 を薬剤存在下で継代して得られた耐性ウイルスに見いだされた変異を導入した 4 種類の変異株 (Fig. 3) から調製した感染性 RNA を HeLa 細胞にトランスフェクトして変異導入ウイルスの回収を行った。helicase motif A 内に見出された Ala133Thr (A133T)、motif C 下

流に見出された Ile227Val (I227V) の単独変異およびこれに加えて Ala229Val (A229V) の変異を導入した 3 種類の感染性クローンからは、何れも野生株と同様にウイルスが回収された。これらのウイルスのゲノム RNA は、導入した変異以外は野生株と同一の塩基配列であった。ところが、薬剤存在下で継代して得られた耐性ウイルスには存在しなかった A229V の単独変異を導入した感染性クローンからは、通常の条件下ではウイルスを回収することができなかった。しかしながら、100 µg/ml の Gua 存在下ではじめてウイルスが回収された。回収したウイルスの感染力価を Gua 存在下および非存在下で測定したところ、それぞれ 1.6×10^8 PFU/ml、 6.4×10^4 PFU/ml であった。塩基配列を解析したところ、本ウイルスには野生株と比較して導入した以外の変異は見いだされなかった。したがって、Gua 存在下では非存在下の 2,500 倍もの力価を示し、A229V 単独の変異を導入しただけでウイルスは Gua 依存性を獲得することが明らかとなった。

Gua 依存性を示した A229V 単独変異導入ウイルス以外のウイルスの薬剤感受性を CPE inhibition assay により比較検討した。親ウイルスである CB4 JVB 株に対するそれぞれの薬剤の IC₅₀ 値を 1 とした時の各ウイルスの薬剤感受性程度を Table 1. に示す。cDNA クローン由来の野生株は親ウイルスとほぼ同等の IC₅₀ 値を示した。A133T は分離ウイルスと同様、Gua に高度耐性を示し、MRL-1237 に強感受性を示した。また、I227V は MRL-1237 に対して親ウイルスの 3.5 倍耐性を示し、さらに 227,229 番目のアミノ酸両方に変異を導入した I227V/A229V では約 20 倍もの高度耐性を獲得しており、それぞれの薬剤耐性ウイルスの結果とも一致していた。以上の結果より、耐性ウイル