

第 109 回 日本眼科学会総会 宿題報告 II

新しい眼薬物療法

ウイルス性結膜炎の新しい薬物治療

内尾 英一

福岡大学医学部眼科学教室

要 約

アデノウイルス結膜炎は、我が国において患者数が毎年約 100 万人発症する疾患であり、院内感染の原因としても認識されている。症例によっては角膜びらんや結膜偽膜などの合併症がみられ、角膜上皮下混濁が視力障害をもたらすこともある。しかし、現在まで特異的なアデノウイルスに対する治療薬はなく、有効な薬物治療法は確立されていない。我々は最近のアデノウイルス結膜炎に関する研究成果をもとにして、ウイルス性結膜炎の新しい薬物治療法の研究を行った。

まず、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。対象薬剤は、抗ウイルス薬、アデノウイルスレセプター阻害薬、生理活性物質および消炎薬などから選ばれた、ザルシタビン、インターフェロン- β をはじめとする 12 の薬剤とした。アデノウイルス増殖抑制効果がみられた薬剤はザルシタビン、サニルブジン、インターフェロン- β および抗オステオポンチンペプチドであった。抗アデノウイルス作用のある抗ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus, HIV) 薬の 2 薬剤、ザルシタビンおよびサニルブジンは核酸系逆転写酵素阻害薬であり、一方、非核酸系逆転写酵素阻害薬、プロテアーゼ阻害薬はアデノウイルスには無効であった。インターフェロン- β および抗オステオポンチンペ

プチドは吸着阻害作用による抗アデノウイルス効果を示した。次に、抗アデノウイルス作用のある薬物が点眼された際の眼球および付属器への副作用を、開発が中断されたシドフォビルを含めて、白色家兎を使って検討した。シドフォビルが点眼された家兎では、涙小管の有意な狭窄と眼瞼の発赤、結膜充血がみられたが、涙道の閉塞はみられなかった。ザルシタビン、ザニルブジンでも点眼による眼瞼発赤がみられたが、涙小管、結膜には変化は見られなかった。シドフォビル点眼投与動物では、組織学的にアレルギー性変化を主体とすることが示唆される炎症所見がみられた。

これらの結果から、4 薬剤がヒトのアデノウイルス結膜炎への安全な治療点眼薬である可能性が示された。これら 4 薬剤は作用機序によって、増殖抑制薬 (ザルシタビン、ザニルブジン) と感染抑制薬 (インターフェロン- β 、抗オステオポンチンペプチド) とに分類される。今後は、アデノウイルス感染動物における治療効果の検討やヒトにおける治験を経て、アデノウイルス結膜炎治療点眼薬が近い将来に、臨床応用されることが期待される。(日眼会誌 109: 962-985, 2005)

キーワード：ウイルス性結膜炎、アデノウイルス、抗ウイルス薬、レセプター、逆転写酵素阻害薬

A Review

New Medical Treatment of Viral Conjunctivitis

Eiichi Uchio

Department of Ophthalmology, Fukuoka University School of Medicine

Abstract

Around one million people in Japan are suffering from adenoviral conjunctivitis every year and it is recognized as one of the major pathogens of

nosocomial infection. Several complications, such as corneal erosion and conjunctival pseudomembrane, are observed in some of the cases and corneal sube-

別刷請求先：814-0180 福岡市城南区七隈 7-45-1 福岡大学医学部眼科学教室 内尾 英一

(平成 17 年 8 月 11 日受付, 平成 17 年 10 月 3 日改訂受理)

Reprint requests to: Eiichi Uchio, M. D. Department of Ophthalmology, Fukuoka University School of Medicine. 7-45-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

(Received August 11, 2005 and accepted in revised form October 3, 2005)

pithelial opacity may bring visual impairment. Moreover, no specific anti-adenoviral agent has been discovered and an effective treatment has not been established for adenoviral infection. We have researched new medical treatment for viral conjunctivitis based on recent findings in adenoviral conjunctivitis.

Firstly, anti-adenoviral activity was evaluated *in vitro* in agents which could possibly act as anti-adenoviral drugs. Twelve candidates, such as zalcitabin, interferon beta, etc., were selected among antiviral drugs, adenoviral receptor inhibitors, natural products and anti-inflammatory drugs. Remarkable anti-adenoviral effect was observed in zalcitabin, sanilbudine, interferon beta and anti-osteopontin peptide. Two anti-human immunodeficiency virus (HIV) drugs with anti-adenoviral activity, zalcitabin and sanilbudine, are nucleoside reverse transcriptase inhibitors, but, in contrast, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors and protease inhibitors were ineffective against adenovirus. Interferon beta and anti-osteopontin peptide displayed anti-adenoviral effects by absorption inhibition. Secondly, side effects caused by possible anti-adenoviral eye drops, including cidofovir whose development as eye drops against eyeball and ocular adnexa had been suspended, were

analyzed in a white rabbit model. In animals given cidofovir locally, significant narrowing of lacrimal canaliculus, redness of eyelid and conjunctival injection was observed, but obstruction of the lacrimal duct was not found. Although zalcitabin and sanilbudine eye drops induced eyelid redness, no change was observed in the lacrimal route and conjunctiva. In animals treated by cidofovir, inflammation histologically suggesting mainly allergic change was observed.

These results indicate that these four drugs are possible candidate for safe eye drops against adenoviral conjunctivitis. These four agents are divided into two categories, inhibitors of adenoviral replication, zalcitabin and sanilbudine; and suppressors of adenoviral infection, interferon beta and anti-osteopontin peptide. It is expected that eye drops for specific treatment of adenoviral conjunctivitis are going to be available in the near future following investigation of therapeutic effect in adenoviral infected animals and clinical trials in humans.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 109 : 962–985, 2005)

Key words : Viral conjunctivitis, Adenovirus, Antiviral drugs, Receptor, Reverse transcriptase inhibitor

I はじめに

ウイルス性結膜炎は一般的に自然治癒的傾向はあるが、とりわけアデノウイルス結膜炎は感染力の強い疾患であり、我が国では夏季を中心に患者数が毎年 100 万人前後に達することが厚生労働省感染症サーベイランスから推定されている¹⁾。院内感染についても社会的問題としての観点から注目が高まっている。最近の報告では、全国の大学病院の 79% がアデノウイルス結膜炎の院内感染を経験し、複数回の院内感染があった施設も 21% 見られ、45% が病棟閉鎖などの診療制限を行っている²⁾。アデノウイルス結膜炎は症例によっては角膜びらんや結膜偽膜などの重症の経過をたどることもあり、しばしばみられる角膜上皮下混濁は長期間にわたって視力障害をもたらすことも臨床的な大きな問題である。しかし、本症に対する特異的な治療法は今までに積極的に追求されてきていなかった。近年の抗ウイルス薬分野における研究の進展により、アデノウイルスに対する特異的な抗ウイルス作用が期待される薬物がいくつか報告されてきている。今回我々はさまざまな薬物を対象として、アデノウイルス結膜炎に対する抗ウイルス作用を評価し、治療薬としての可能性を検討したので報告する。

II アデノウイルスの生物学的性質

1. 形態と一般的性質

ヒトアデノウイルスは Rowe や Hilleman らによって発見された。アデノウイルス科 (Adenoviridae) の共通の特徴として、ウイルス粒子は正 20 面体 (直径 70~90 nm) で、ゲノムは 2 本鎖 deoxyribonucleic acid (DNA) (分子量 20~25×10⁶) で、両末端に 100~160 塩基の逆向きの反復配列 (inverted repeated sequence, ITR) を持つ。55 kD の末端蛋白質 (terminal protein) の構成アミノ酸残基の中のセリン残基とゲノムの 5' 末端塩基の dC とがホスホジエステル結合している。DNA を細胞に導入しても、感染性を示し、宿主細胞の核内で増殖できる。

アデノウイルス科は Mastadenovirus 属と Aviadenovirus 属とがあり、前者にはほ乳動物、後者にはトリのアデノウイルスが含まれる。現在、エイズ患者から分離された新しい血清型を加えると 51 型に及ぶ。ゲノムの相同性、群内の組み換え能などの指標により 6 群 (亜属) に分けられている (表 1)。ビリオンはエンベロープを持たないが、ゲノムを蛋白質のキャプシド (capsid) が囲み、キャプシド外面は、240 個のヘキソン (hexon) が 20

表 1 ヒトアデノウイルスの分類

亜属	種
A	12, 18, 31
B	3, 7, 11, 14 , 16, 21, 34, 35, 50
C	1, 2, 5, 6
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19 , 20, 22-30, 32, 33, 36, 37 , 38, 39, 42-49, 51
E	4
F	40, 41

主要なヒトにおける結膜炎起炎血清型を太字で示す。

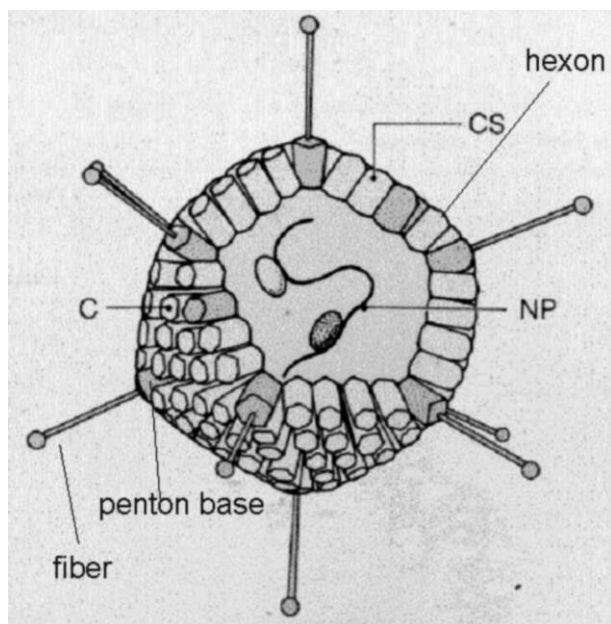


図 1 アデノウイルスの構造。

C : Capsid キャプシド, CS : Capsomer キャプソメア,
NP : Nuclear protein 核蛋白。

面体の面を構成し、12個のペントン(penton)が12個の頂点に位置する。各々のペントンの基部から、各1本のファイバーが出ている。主要キャプシド構成蛋白質と他の構成蛋白質の模式図を図1に示す。ウイルスゲノムはコア蛋白質と結合して、キャプシド内に存在し、コアcoreを形成する。

2. 増殖様式・伝播形式

アデノウイルスは宿主細胞に感染すると、まず細胞質内でキャプシド構成蛋白質が除かれ、コアが核内に移動する。核内で種々のウイルス遺伝子が所定の時間的順序で発現される。培養細胞を用いた実験室的な増殖サイクルでは、ウイルス合成開始期(感染後6~8時間)を境に、初期と後期に区別できる。初期には5個の転写単位(転写開始点から転写終結点に及び、その間に入るエクソンやイントロンのすべてを含む区域)から約20種類の messenger ribonucleic acid(mRNA)が合成される。初期転写単位にはE(early)1A, E1B, E2, E3, E4があり(図2)、それぞれに固有のプロモーターが存在す

る。感染後、まず最初に転写開始されるのがE1Aで、次にE4, E1B, E3と続き、最も遅れてE2が転写される。この発現の時間的なずれは発現制御様式がそれぞれの転写単位で異なっていることによる。エンハンサー依存性の転写抑制機能はE1A遺伝子産物にあり、この機能が細胞を半永久的継代培養可能にしている。E2遺伝子産物はDNAポリメラーゼや末端蛋白質や単鎖DNA結合性蛋白質があり、これらはウイルスDNA合成に必須である。後期に発現する転写単位は主要後期転写単位と呼ばれ、ゲノム上の16.4地図単位(m.u.)から98.2~100 m.u.まで及ぶ。後期mRNAはRNAスプライシングにより20種類にも及び、L1~L5の5つのグループに分けられる。これら後期mRNAには図1に示す多種のポリオン構成蛋白質がコードされている。

3. 感染病理

アデノウイルス感染症は、呼吸器感染、角結膜炎、出血性膀胱炎、関節炎、腸重積などの疾患が知られているが(表2)、これらには致死性であるものはまれで、十分な病理学的検索はされていない。感染細胞は多少腫大するが、細胞質に封入体が見られることはない。また、多核細胞も生じない。このような形態学的な差異により組織切片からアデノウイルス感染を推定できる。電子顕微鏡でも六角形粒子の結晶状格子様配列から成る核内封入体が観察される。クロマチンは核膜寄りに圧排され、一部の核膜は消失し、細胞質にも同様の粒子を認める細胞もある。これらの粒子の直径は60~80 nmである。ヒトアデノウイルスの疾患の剖検例で共通してみられる病理組織所見は実質性の壊死性病変で、主として上皮細胞に感染が生じる。結膜では上皮細胞がアデノウイルスに親和性のあるレセプターを有し、これにアデノウイルスのファイバーが接着して感染が始まる。結膜上皮細胞は多層のため、その最上層の上皮細胞が感染後脱落しても、それより下層の細胞にもウイルスが移行して核内で増殖し、ウイルス粒子が充満すると遊離ウイルス粒子を放出するという経過をたどって感染を拡大していく。結膜病変の免疫組織学的所見ではウイルスが分離しにくくなる発症後7日目以降の結膜濾泡にはT細胞が見られ、アデノウイルス抗原は結膜上皮層からも検出されるので抗原抗体反応はかなり広い範囲で起こっていると考え

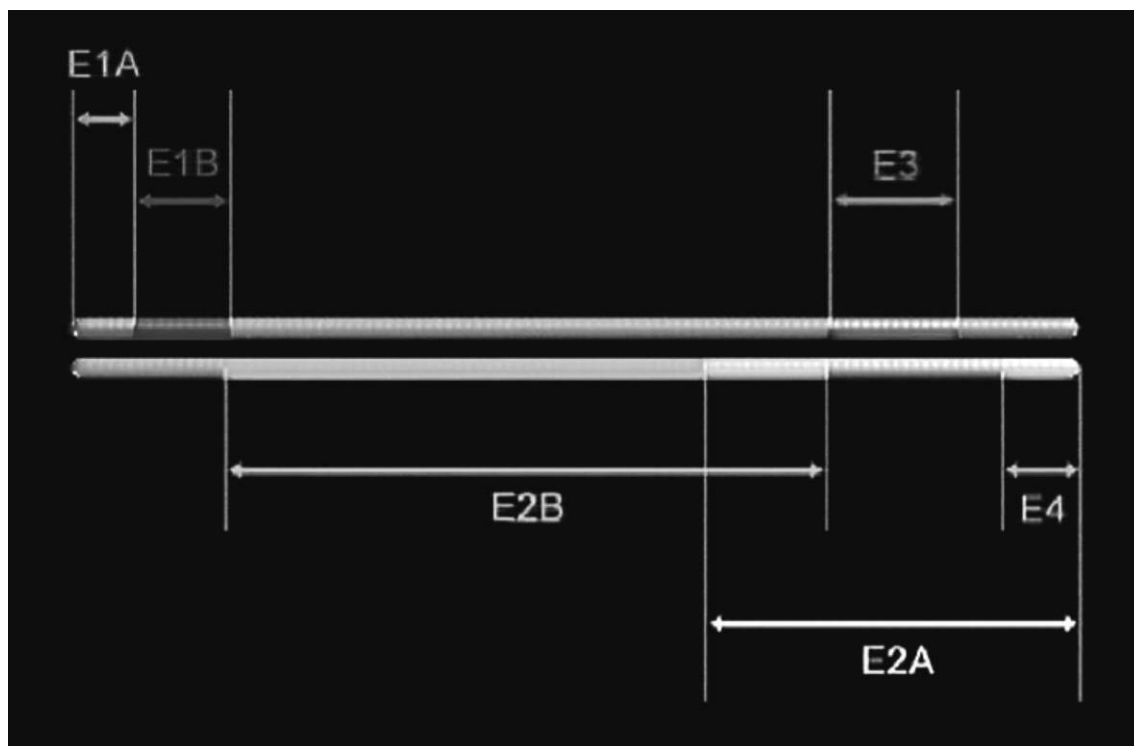


図 2 アデノウイルス初期転写因子。

表 2 血清型と疾患

疾患	血清型	好発年齢、背景
急性熱性咽頭炎	1, 2, 3, 5, 6, 7	幼児
咽頭結膜熱	1, 2, 3, 4, 6, 7, 14	小児
流行性角結膜炎	3, 4, 7, 8, 11, 19, 37	全年齢層
急性出血性結膜炎	11	成人
急性出血性膀胱炎	11, 21	幼児
子宮頸管炎, 尿道炎	37	成人
播種性疾患	4, 7, 34~35, 43~51	免疫抑制状態

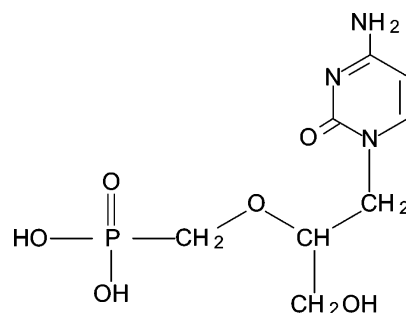


図 3 シドフォビルの構造式。

られる。上皮細胞と実質の間のいわゆるアデノイド層 adenoid layer には形質細胞が多数みられ、分泌型 Ig (immunoglobulin) A を産生している。網膜芽細胞腫の発病とアデノウイルスの関連はいくつかの報告がある。

III 抗ウイルス治療とアデノウイルス

1. アデノウイルス結膜炎治療薬に立ちはだかる壁

アデノウイルス結膜炎は、本邦で診療されるウイルス性結膜炎の中では最も頻度が高い¹⁾。院内感染の重要な病原体であるにもかかわらず、特異的な治療薬が開発されてこなかった壁が存在している。

一つには、前述のように感染症としての自然治癒性がある。確かに、結膜偽膜の形成や角膜上皮合併症がアトピー性皮膚炎合併例や比較的高年齢での初感染などにみられるが、決して頻度は高くない。ただ、2 ないし 3 週間という治癒までの期間を抗生物質やステロイド点眼薬によって自宅安静させ、実質的に積極的治療を行わない

のが現状である。ウイルスに対する治療薬はアデノウイルスに限らず非常に限定されている。現状で臨床応用されている抗ウイルス薬はヘルペスウイルス科(単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus, HSV), 水痘帯状疱疹ウイルス, サイトメガロウイルス (cytomegalovirus, CMV) などに対するものと、ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus, HIV), B 型および C 型肝炎ウイルス, そしてインフルエンザウイルスの治療薬だけである。これらのウイルスは免疫不全状態で発症するウイルスや生命予後の不良な感染症、さらに、悪性腫瘍との関連が大きなウイルスであり、アデノウイルス結膜炎はそのいずれにも該当しない。しかし、アデノウイルス感染症は眼領域以外に、肺炎、肝炎、脳炎、出血性膀胱炎、胃腸炎など全身に涉っており、特に骨髄移植による免疫抑制状態で感染すると生命予後が不良な症例が多いことから、後述するように、1980 年代後半から

表 3 各薬剤の CC₅₀

ザルシタピン (ddC)	4,282 $\mu\text{g/ml}$ (20.3 mM)
サニルプジン (d 4 T)	547 $\mu\text{g/ml}$ (2.5 mM)
ネビラピン (NVP)	1,030 $\mu\text{g/ml}$ (3.9 mM)
インジナビル (IDN)	>400 $\mu\text{g/ml}$ (>0.5 mM)
アンブレナビル	361 $\mu\text{g/ml}$ (0.7 mM)
抗オステオポンチンペプチド	2,318 $\mu\text{g/ml}$ (3.9 mM)
hCAP(human cationic antimicrobial protein)-18	2,200 $\mu\text{g/ml}$ (0.9 mM)
N-chlorotaurine(NCT)	485 $\mu\text{g/ml}$ (2.7 mM)
ジクロフェナックナトリウム	62 $\mu\text{g/ml}$ (201.5 μM)
プロムフェナックナトリウム	212 $\mu\text{g/ml}$ (551.2 μM)
アンレキサノクス	197 $\mu\text{g/ml}$ (669.8 μM)

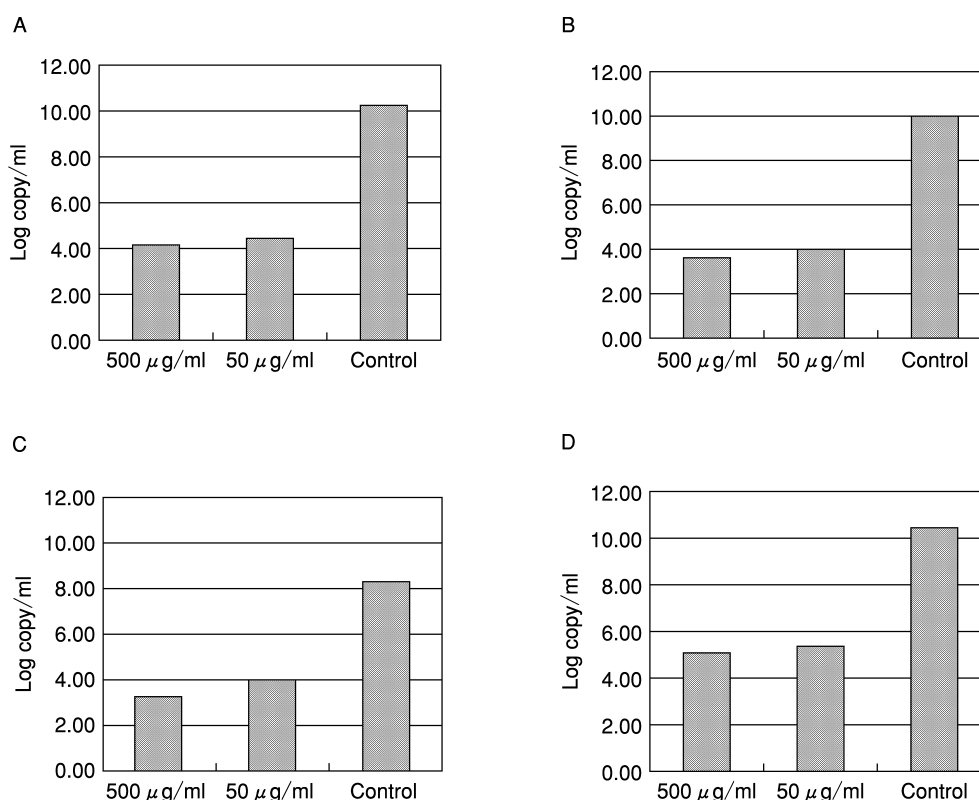


図 4 ザルシタピンのウイルス増殖抑制効果スクリーニング結果。

アデノウイルス 3(A), 4(B), 8(C)および 37(D)血清型の結果を示す。横軸に薬剤濃度, 縦軸にウイルス DNA(deoxyribonucleic acid)コピー数の対数表示を示す。

アデノウイルスに対する治療薬の研究は徐々に進んでいる³⁾。

薬物の効果を正確に判定するためには, 動物モデル特にアデノウイルスの眼感染動物モデルが必要であるが, 後述するように安定したものがないことも点眼薬開発の妨げとなっている。ただし, アデノウイルス感染モデルは臓器によっては可能であり, 呼吸器感染モデルは十分安定していることが知られている⁴⁾。

抗ウイルス治療の中心になるのは抗ウイルス薬であり, 現在臨床で使用されている薬剤の多くが核酸合成阻害薬である。これはウイルス核酸合成を阻害するが, ウイルスは単独では生存できないため, 宿主細胞の代謝・

増殖機構を利用している。そのため, 核酸合成阻害薬では宿主細胞も同時に障害されることが多い。これが細胞毒性として出現し, 眼科領域では角膜などの眼表面や眼球付属器への副作用となることがある。中でも涙小管閉塞や角膜びらんの高危険性と考えられ, 点眼薬開発の一つの障壁となっている。

診断法が確立されていないと, 治験が困難になるが, アデノウイルス結膜炎では, 免疫クロマトグラフィ法が一般診療レベルで定着しているものの, その感度は約 60% と十分に高くない⁵⁾。標準的な分離・中和法には 2 週間以上の日数が必要であり, polymerase chain reaction(PCR)法は一般臨床レベルでは行いにくい方法で

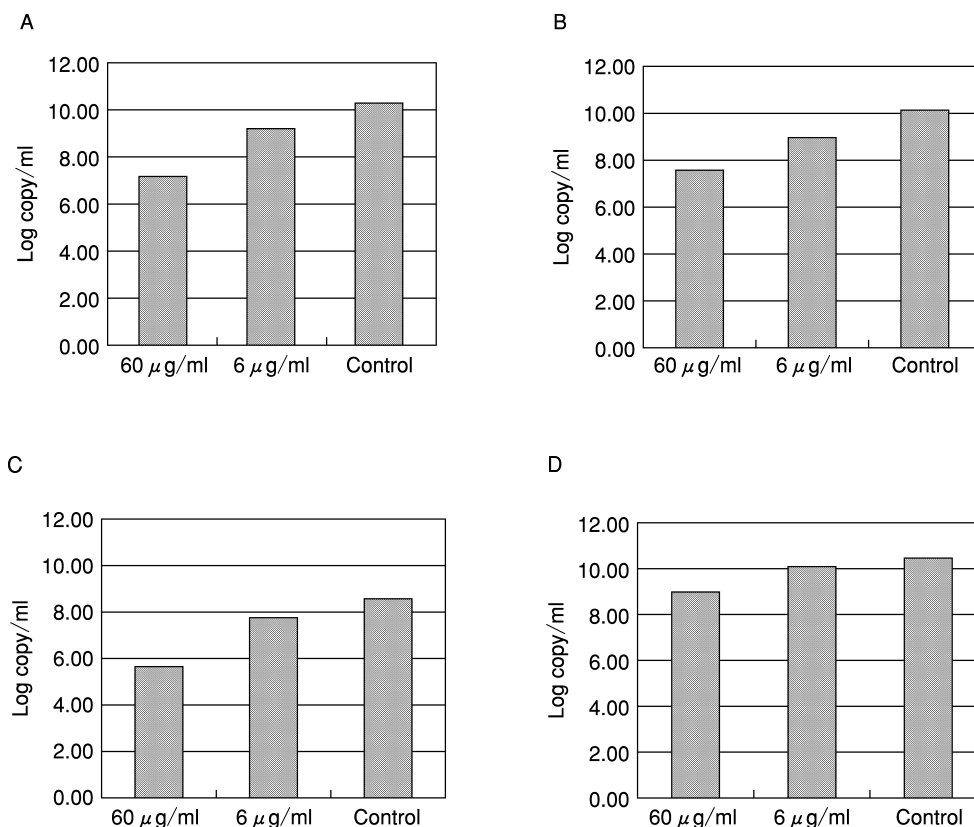


図 5 ザニルブジンのウイルス増殖抑制効果スクリーニング結果。
記号，グラフ軸は図 4 に同じ。

ある。このような診断法の限界もアデノウイルス結膜炎治療薬の開発における問題点である。

2. アデノウイルス結膜炎治療の現状

特異的な抗ウイルス薬がないため、アデノウイルス結膜炎の治療は、細菌⁶⁾、クラミジア⁷⁾などの重複感染を防ぐために、抗菌点眼薬を投与し、重症例にはステロイド点眼薬を消炎を目的に使用するのが現状の基本である。角膜上皮混濁は発症後約 2 週間後頃から生じるが、免疫反応によるものと考えられている。異なった血清型のアデノウイルスへの再感染によって、結膜炎を伴わない角膜上皮混濁が生じることが報告⁸⁾されており、T リンパ球などを介する現象であることを示唆するといえる。そのために、ステロイド点眼薬が角膜上皮混濁の治療に用いられることがある。ただ、急性期も含めてステロイド点眼薬には抗アデノウイルス作用はなく⁹⁾、他の感染を誘発する可能性もあるため、特に角膜ヘルペス、アカントアメーバ角膜炎との鑑別診断が重要である。

3. アデノウイルス結膜炎治療薬開発のプロセス

アデノウイルス結膜炎の新しい治療薬を開発するに当たっては、これまで述べてきたアデノウイルスの生物学的な特徴から、その増殖サイクルのどの部分を障害するかによって、いくつかの候補薬剤があげられる。既存の抗ウイルス薬でない場合はそれを合成することになる。

そして、*in vitro* におけるアデノウイルスへの効果検定を培養細胞におけるアデノウイルス増殖をどこまで抑制できるかを指標にして検討する。さらに、*in vivo* (動物モデル) でのアデノウイルス治療効果を解析し、実際の臨床的な効果を評価する。結膜炎に対する効果であるので、結膜や眼球付属器への影響についても検討する必要がある。そして、最終的にヒトへの治験を実施して、臨床応用に至る、という段階を経ることになるが、今回の我々の検討でも、この過程を基本とした。治療薬の開発を研究した結果を以下に述べていきたい。

IV 種々の薬物の抗アデノウイルス作用の探索

1. アデノウイルス治療薬の候補と可能性

この研究では、アデノウイルス結膜炎の新しい治療薬として可能性のある薬剤をなるべく広範囲から選び出した。それらは、① 既存の抗ウイルス薬(核酸合成阻害薬およびプロテアーゼ阻害薬など)、② 生理活性物質、③ アデノウイルスレセプター阻害あるいは吸着阻害物質、④ その他(抗炎症薬、抗アレルギー薬など)の 4 種類に大別できる。これらの薬剤はまずアデノウイルスに対する *in vitro* の治療効果の有無を検討する必要があるが、① に属する抗ウイルス薬のいくつかは過去にアデノウイルスに対する抗ウイルス作用が検討されている。まず、それらを振り返って、今回の解析方法を検討するこ

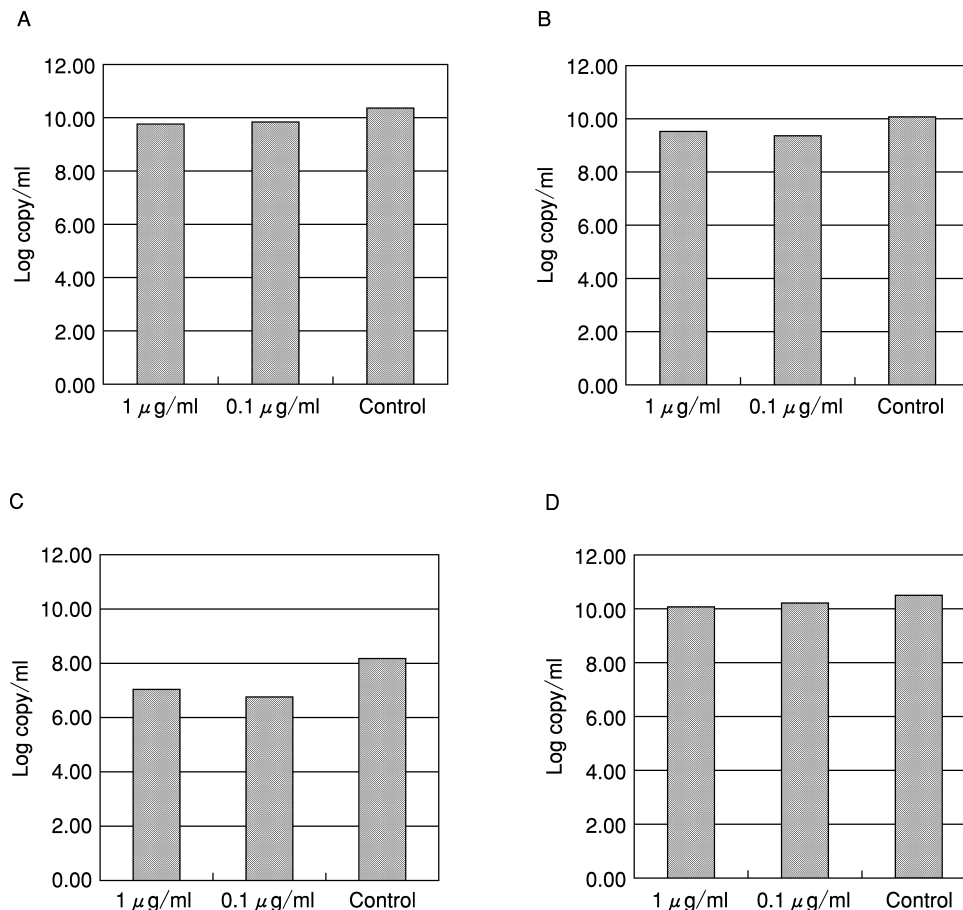


図 6 ネビラピンのウイルス増殖抑制効果スクリーニング結果。
記号，グラフ軸は図 4 に同じ。

とにした。

2. 抗アデノウイルス作用が検討された薬物

1) リバビリン

リバビリン(Ribavirin)はグアノシンアナログであり，RNA ポリメラーゼに作用し，RNA 複製を阻害することにより抗ウイルス作用を生じる．本薬物は内服投与では無効で，エアゾールでインフルエンザ A, B 両型に有効であることや，経静脈投与でインフルエンザ，ラッサ熱に有効であることがわかっている．抗アデノウイルス作用は骨髄移植，エイズ患者のアデノウイルス諸感染症における経静脈投与や出血性膀胱炎¹⁰⁾¹¹⁾，胃腸炎¹²⁾および肺炎¹³⁾に対する有効性が報告されている．しかし，結膜炎に対する報告はない．すでに本薬剤に対する耐性株(11 型)が報告¹⁴⁾されている．

2) トリフルリジン

トリフルリジン(Trifluridine), 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine(TFT)はハロゲン化チミジンであり，DNA ポリメラーゼに作用し DNA の複製を阻害する．アシクロビル耐性株による角膜ヘルペス症例に，点眼薬として自家調剤により使用されている薬物であるが，抗アデノウイルス作用も報告されている．アデノウイルス

結膜炎による遷延性角膜上皮下混濁に対し，点眼によって有効であること¹⁵⁾，8, 19, 37 型に *in vitro* で有効であること¹⁶⁾などが報告されている．しかし，アデノウイルス 3 型結膜炎の急性期に点眼では無効であること¹⁷⁾，点眼ではアデノウイルス 8, 19 型結膜炎の治癒日数においてデキサメタゾン，人工涙液と差がないことなども報告¹⁸⁾されている．

3) ガンシクロビル

ガンシクロビル(Ganciclovir), DHPG(9-(1, 3-dihydroxy-2-proxymethyl) guanine) (デノシン®)はデオキシグアノシン類似体で，DNA ポリメラーゼに作用し DNA 複製阻害作用を発揮する．CMV に対する感受性が高いことから，CMV 網膜炎に広く用いられている．本薬剤の抗アデノウイルス作用(臨床症状および抗体産生抑制)は動物モデルで示されているが，このモデルは結膜炎臨床症状を欠くモデルであり¹⁹⁾，この結果をヒトの結膜炎に応用することには疑問がある．

4) シドフォビル

1), 2), 3) の薬物に対し，シドフォビル(Cidofovir, HPMPIC), ((S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl) cytosine)はシチジル酸類似体であり，そ

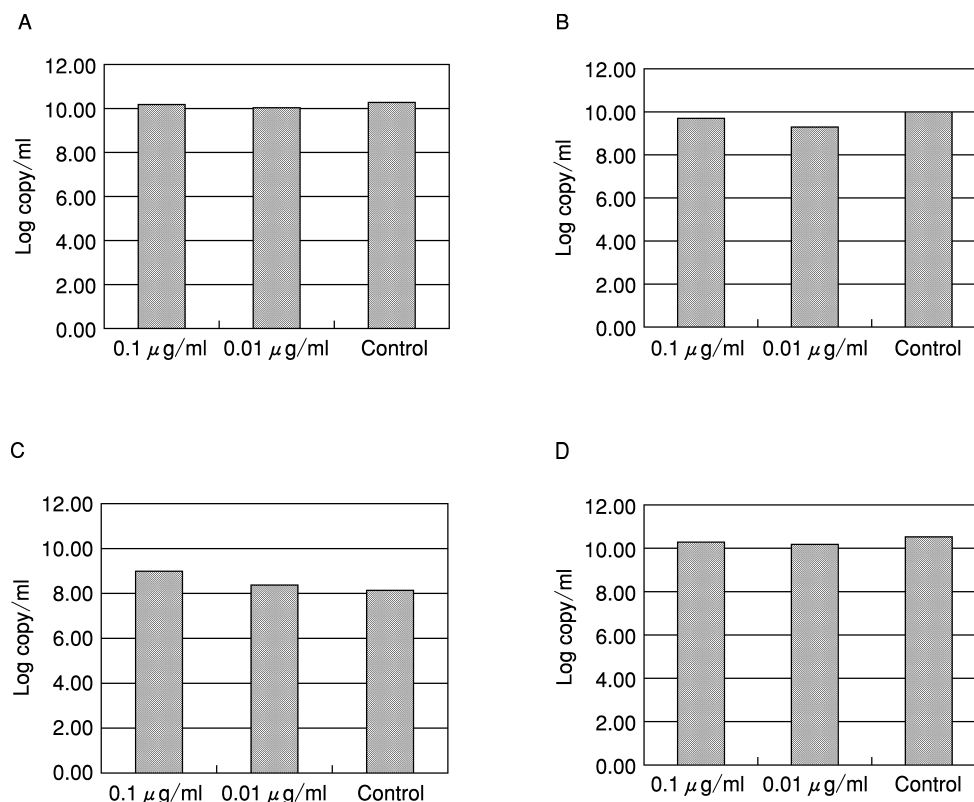


図 7 インジナビルのウイルス増殖抑制効果スクリーニング結果。
記号, グラフ軸は図 4 に同じ。

の作用機序はガンシクロビルに類似している。構造的には非環側鎖を有する(図 3)ことから、チミジンキナーゼを持たない DNA ウィルスにも有効とされている。ほとんど宿主細胞のキナーゼのみによって活性化され DNA ポリメラーゼを阻害する。HSV, CMV, アデノウィルス, パピローマウィルスに有効である。アデノウィルス結膜炎ではウサギ実験モデルで治療効果があることや²⁰⁾, 予防的投与によってアデノウィルス 5 型結膜炎を予防し得ることが, ウサギ実験モデルによって示されている²¹⁾。シドフォビルの選択毒性は D 亜属の 19 型や 37 型に対しては 100 を超えており, 十分臨床的な効果が期待できるものである。ただ, ステロイド点眼併用による作用減弱が動物モデルで示されており²¹⁾, 培養継代数を重ねることによって耐性株が出現することも *in vitro* で報告²²⁾されているが, シドフォビルの各アデノウィルス血清型に対するプラーク減少曲線では, 19, 5 および 37 型への抑制作用が強く, 上記の血清型に対する増殖抑制効果が, 3 および 4 型より優れていることを我々は報告²³⁾している。シドフォビルが現時点では抗アデノウィルス作用が最も詳細に検討された抗ウィルス薬であるといえる。

3. アデノウィルス治療効果の *in vitro* における予備検討

1) 対象薬剤

今回は 12 種類の薬剤を対象とした。まず抗 HIV 薬の中から, 核酸系逆転写酵素阻害薬のザルシタビン (Zalcitabin(ddC)) とザニルブジン (Sanilbudine(d 4 T)), 非核酸系逆転写酵素阻害薬のネビラピン (Nevirapine), プロテアーゼ阻害薬のインジナビル (Indinavir) およびアンブレナビル (Amprenavir) の 5 種類を対象とした。生理活性物質からは内因性殺菌性オキシダントの N-chlorotaurine(NCT)と抗菌ペプチドの human cationic antimicrobial protein(hCAP)-18 の 2 薬剤を対象に含めた。また, レセプター関連薬物では抗ウィルス薬としても知られるインターフェロン-β と抗オステオポンチンペプチドの 2 種類を用いた。さらに, その他の薬物の中から抗炎症薬, 抗アレルギー薬の 3 薬剤, ジクロフェナクナトリウム (Diclofenac sodium), ブロムフェナクナトリウム (Bromfenac sodium) およびアンレキサノクス (Amlexanox) について検討した。以上のうち, ネビラピンは日本ベーリンガー・インゲルハイム社, インジナビルは萬有製薬株式会社, アンブレナビルはキッセイ薬品工業株式会社, ブロムフェナクナトリウムは千寿製薬薬品株式会社, アンレキサノクスは武田薬品工業株式会社からそれぞれ分与された。NCT は

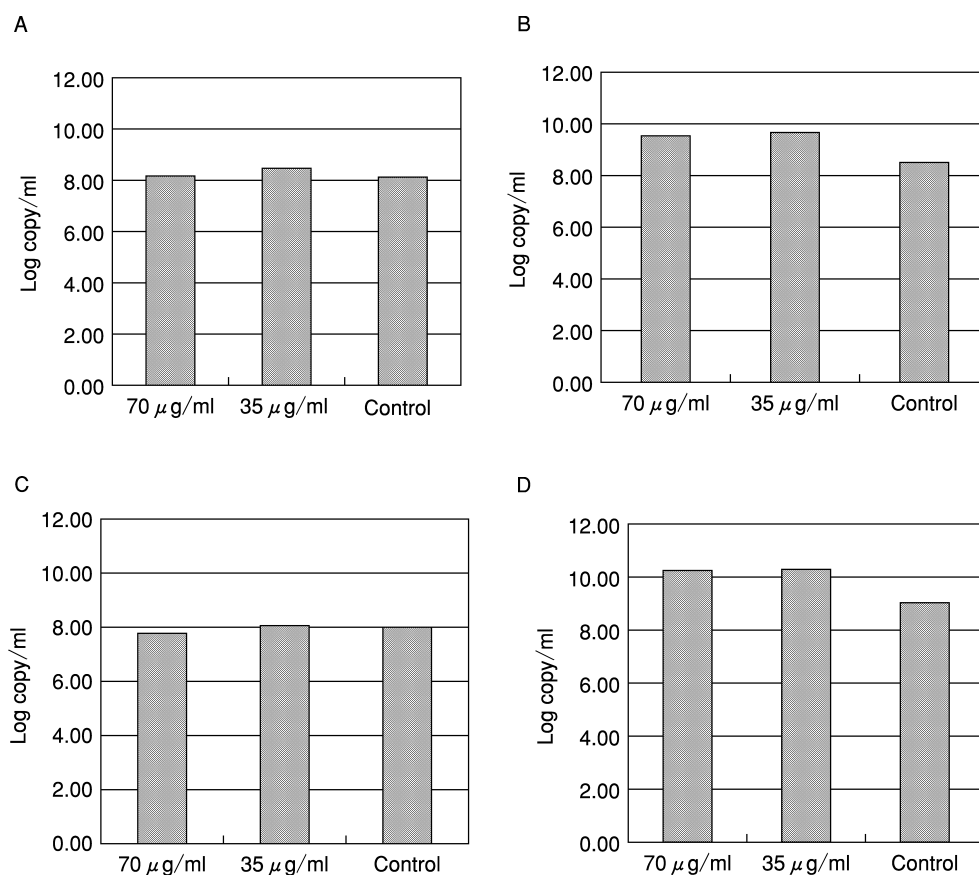


図 8 アンブレナビルのウイルス増殖抑制効果スクリーニング結果。
記号, グラフ軸は図 4 に同じ。

インスブルック大学の Nagl 博士より分与を受けた。hCAP-18 および抗オステオポンチンペプチドはアミノ酸配列をもとに合成された。それ以外の薬剤は市販されているものを用いた。

2) 方法

(1) 培養細胞系

スクリーニングのウイルス増殖試験には A 549 細胞 (ヒト肺癌細胞) を用いた。使用したウイルスはアデノウイルス 3, 4, 8 型および 37 型であり, American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, 米国) から入手した。維持培地には 2% ウシ胎児血清加 Eagle's minimum essential medium (MEM) (日水製薬) を使用した。

(2) CC_{50} の算出

各薬剤の報告されている有効濃度の 1,000 倍もしくは 1 mg/ml から, 維持培地で 5 倍階段希釈して 5 濃度の薬剤濃度を使用した。また, 一部の薬剤は 2 倍階段希釈して 5 濃度の薬剤濃度を使用した。薬剤量が少量の以下の薬剤は, それぞれ, ネビラピン 10 µg/ml, インジナビル 1 µg/ml, hCAP-18 100 µg/ml, アンレキサノクス 100 µg/ml を最も高い濃度として行った。次に, 設定濃度の 4 倍の濃度に維持培地で希釈した各薬剤溶液を作製した。維持培地を 50 µl ずつ 96 ウェルプレートの各ウ

エルに加えた, 1×10^5 cell/ml に調整した A 549 細胞を各ウェルに 100 µl ずつ加えた。ここに, 作製した各濃度の薬剤を 50 µl ずつ各ウェルに加えた。1 濃度は 3 ウェルとした。対照のウェルには薬剤の代わりに維持培地を 50 µl 加えた。5% CO_2 存在下, 37°C で 3 日間培養した。なお, 接着阻害作用のあると考えられる抗オステオポンチンペプチドは 5% CO_2 存在下で 37°C の培養を行う前に 4°C で 90 分間培養した。3 日目に各ウェル内の培地と薬剤を除去し, 細胞を 100 µl のリン酸緩衝液 (PBS) で 5 回洗浄後, 新たに維持培地 150 µl と各濃度の薬剤を 50 µl ずつ各ウェルに加えた。5% CO_2 存在下 37°C で 3 日間培養した。3 日後に CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, 米国) を使用した 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2 H-tetrazolium (MTS) 法²⁴⁾ で 50% 細胞障害濃度 (CC_{50}) を算出した。

(3) ウイルス増殖抑制スクリーニング

算出した CC_{50} の約 1/5 および 1/10 (または 1/20) 濃度になるように, 維持培地で希釈して各薬剤溶液を作製した。 1×10^5 cell/ml に調整した A 549 細胞を 100 µl ずつ 96 ウェルプレートの各ウェルに加えた (1×10^4 cell/ウェルとなる)。5% CO_2 存在下, 37°C で 3 日間培養した。3

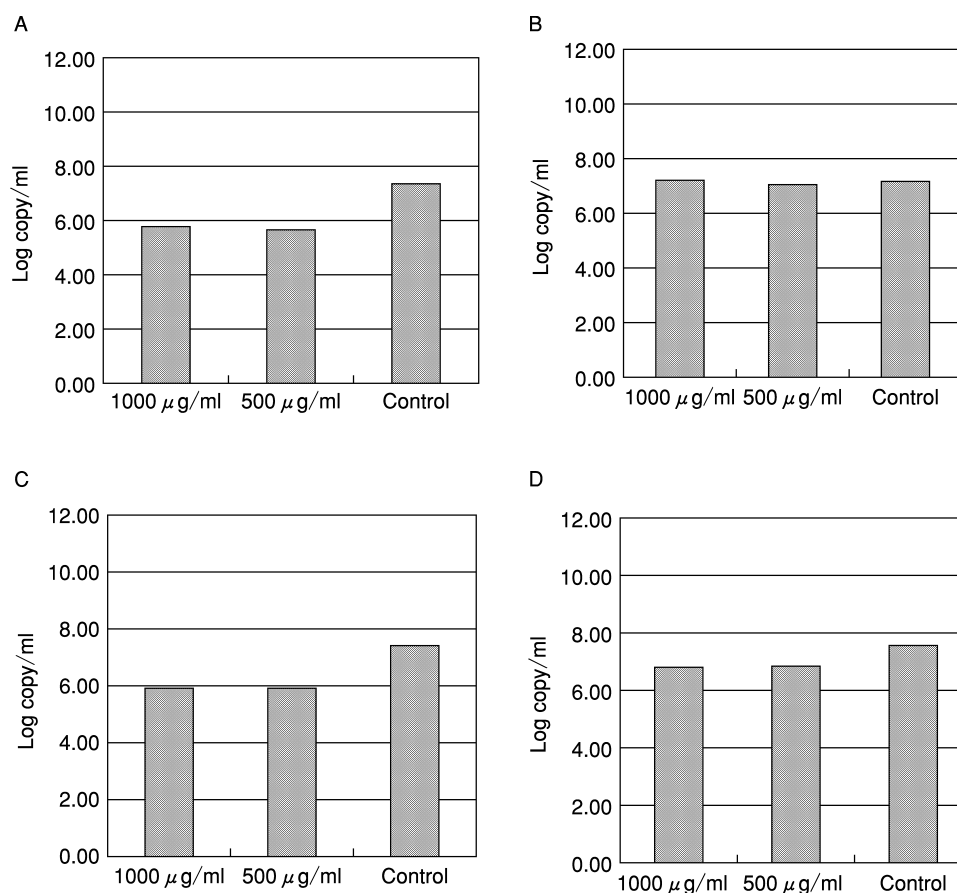


図 9 N-chlorotaurine のウイルス増殖抑制効果スクリーニング結果.

記号, グラフ軸は図 4 に同じ.

日後に, 各ウェル内の培地を除去して, 細胞を 100 µl の PBS で 3 回洗浄後, 上記で作製した各濃度の薬剤を 100 µl ずつ各ウェルに加えた. 1 濃度は 3 ウェルとした. ウイルス対照用のウェルには薬剤の代わりに維持培地を 100 µl 加えた. なお, インターフェロン-β は既報で抗アデノウイルス効果が報告²⁵⁾されているために, スクリーニングは行わなかった. 各血清型アデノウイルスを 1×10^7 copy/ml に調整したウイルス液を作製し, 100 µl ずつ 96 ウェルプレートの各ウェルに加えた (1×10^6 copy/ウェルとなる). 5 % CO₂ 存在下, 37°C で 1 日間培養した. 接着阻害作用のあると考えられる抗オステオポンチンペプチドは 5 % CO₂ 存在下, 37°C 培養を行う前に 4°C で 90 分間培養した後, 各ウェル内のウイルス液と薬剤を除去して, 細胞を 100 µl の PBS で 5 回洗浄後, 新たに維持培地 200 µl を添加し, 以降の操作を行った. 翌日, 各ウェル内のウイルス液と薬剤を除去し, 細胞を 100 µl の PBS で 5 回洗浄後, 新たに維持培地 100 µl と各濃度の薬剤を 100 µl ずつ各ウェルに加えた. 5 % CO₂ 存在下, さらに 37°C で 6 日間培養した. 6 日後, 各ウェルの上清と細胞を回収し, 凍結融解を 3 回行った. 4°C, 5,000 rpm で 5 分間遠心し, 上清をウイルス液として 50 µl を DNA 抽出キットのスマイテスト

EX-R & D (ゲノムサイエンス研究所) で抽出後, Light-Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics, 米国) でアデノウイルス DNA 量を測定した. 薬剤を加えていないウェルのアデノウイルス量と薬剤を添加したウェルのアデノウイルス量を比較し, アデノウイルス各血清型に対する各薬剤の抗ウイルス効果を求めた.

3) 結果

各薬剤の CC₅₀ を表 3 に示した. インジナビルを除いて, CC₅₀ を算出できたが, インジナビルは薬剤量の限界のために, 400 µg/ml 以上に CC₅₀ があるものと推定された.

アデノウイルス増殖抑制スクリーニングの結果は図 4~14 に示したが, 抗 HIV 薬ではザルシタビンおよび, ザニルブジンは濃度依存的にウイルスコピー数が減少しており, 抗アデノウイルス効果があると考えられたが, ネビラピン, インジナビル, アンプレナビルには明らかな抗ウイルス効果は認められなかった. 生理活性物質の NCT と hCAP-18 の 2 薬剤は, いずれもどの血清型に対しても増殖抑制効果はみられなかった. レセプター関連薬物の抗オステオポンチンペプチドは, 4 型を除いて, 対照よりも薬剤添加群でウイルス増殖抑制効果がみ

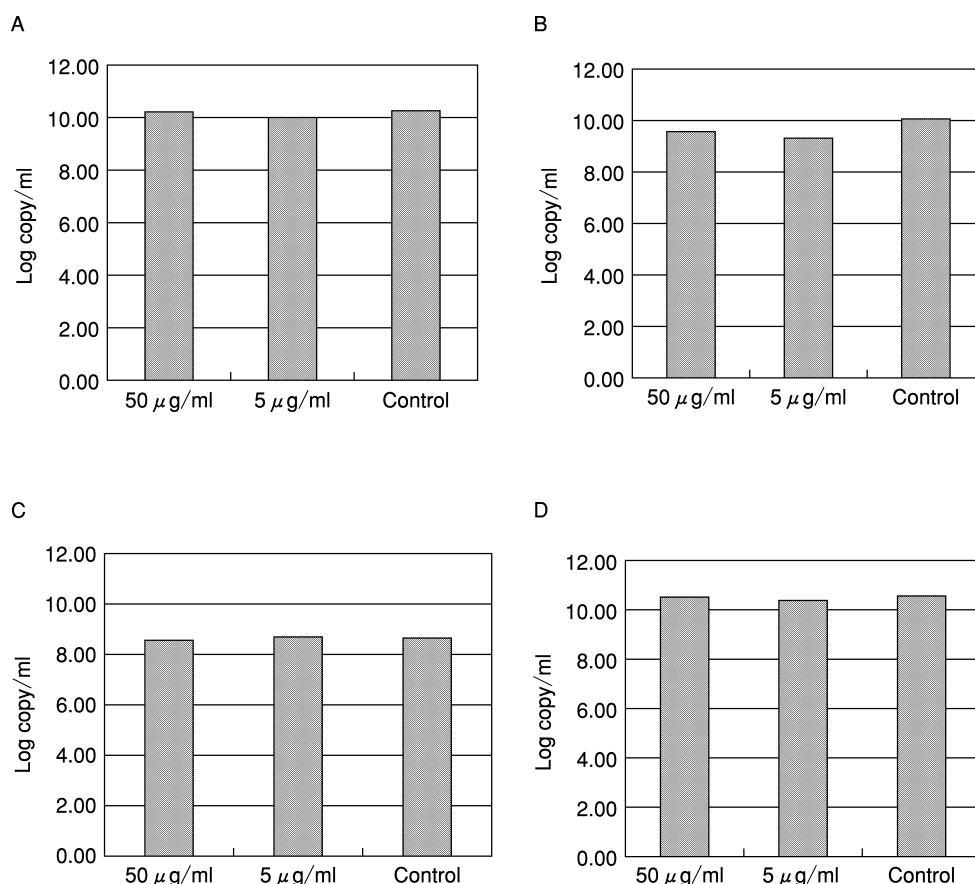


図 10 hCAP(human cationic antimicrobial protein)-18のウイルス増殖抑制効果スクリーニング結果。
記号, グラフ軸は図4に同じ。

られた(図11)。その他の薬剤であるジクロフェナックナトリウム, プロムフェナックナトリウムおよびアンレキサノクスにはいずれも抗アデノウイルス効果はみられなかった(表4)。

4. 抗アデノウイルス効果の定量的解析

1) 対象薬剤

スクリーニング試験において抗ウイルス効果が認められた3薬剤, ギルシタビン, ギルブジンおよびインターフェロン-βについて検討した。抗オステオポンチンペプチドは抗アデノウイルス効果がスクリーニングで認められたが, 薬剤量不足のために, 定量的解析は行わなかった。

2) 方法

各薬剤について, 以下の濃度を用意した。ギルシタビン(ddC): 10, 2 µg, 400, 80 ng および 16 ng/ml(それぞれ 47.3, 9.5, 1.9 µM, 378.4 nM および 75.7 nM), ギルブジン(d4T): 60, 12, 2.4 µg, 480 ng および 96 ng/ml(それぞれ 270, 54 µM, 18.0, 2.2 および 432 nM), インターフェロン-β: 30,000 U, 10,000 U および 1,000 U/ml。以下は, 抗ウイルス効果スクリーニング試験と同様の方法で行った。

表 4 抗ウイルス効果スクリーニングの結果

ギルシタビン(ddC)	効果あり
ギルブジン(d4T)	効果あり
ネビラビン(NVP)	効果なし
インジナビル(IDN)	効果なし
アンプレナビル	効果なし
抗オステオポンチンペプチド	効果なし
hCAP-18	効果なし
N-chlorotaurine(NCT)	効果あり
ジクロフェナックナトリウム	効果なし
プロムフェナックナトリウム	効果なし
アンレキサノクス	効果なし

3) 結果

各薬剤の薬物濃度とウイルスコピー数の変化を図15~17に示した。ギルシタビンは10 µg/mlで約1/10,000~100,000に, 2 µg/mlでも約1/100~1,000にアデノウイルス増殖を抑制し, いずれの血清型にも強い効果がみられた(図15)。ギルブジンは60 µg/mlで約1/100~1,000に, 12 µg/mlでは約1/5~100にウイルス増殖を抑制し, いずれの血清型にも有効であったが, 中でも3, 4型に特に有効であった(図16)。インターフェロン-βは30,000 U/mlで約1/10~100, 10,000 U/

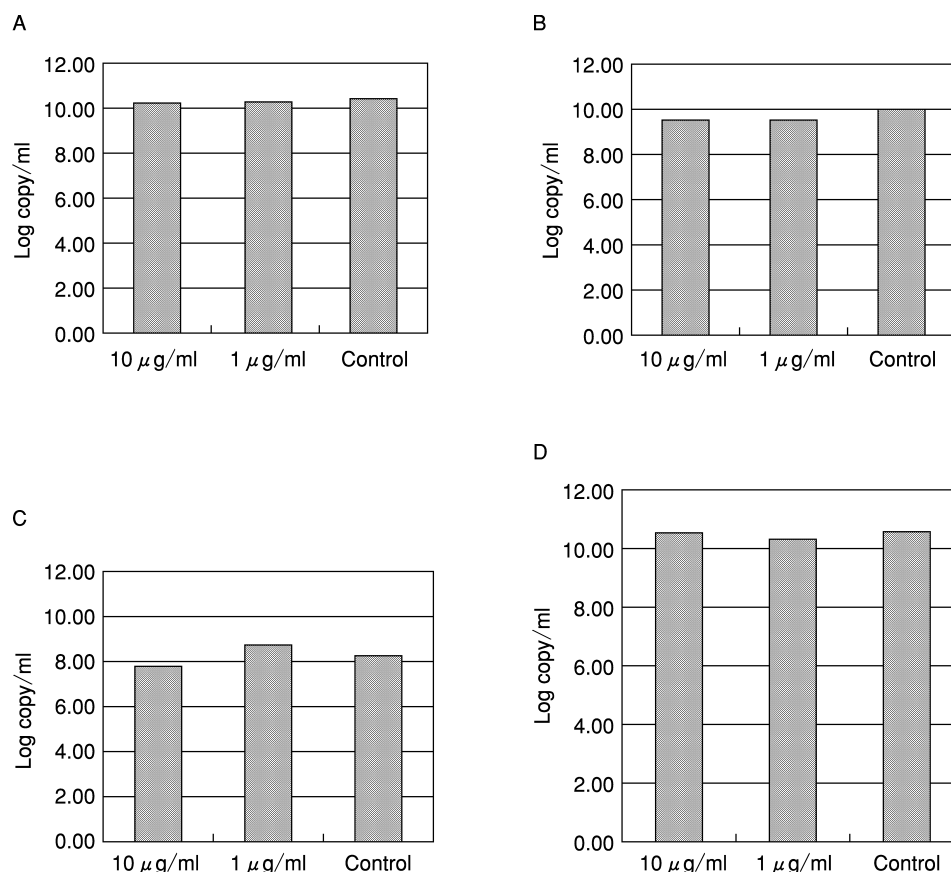


図 11 抗オステオポンチンペプチドのウイルス増殖抑制効果スクリーニング結果。
記号，グラフ軸は図 4 に同じ。

ml で約 1/5～50 にウイルス増殖を抑制し，血清型別では 4, 8 型に特に有効であった(図 17)．抗オステオポンチンペプチドを含めこれら 4 薬剤の増殖抑制効果は，検討した濃度の範囲内で，単純に比較すると，抗オステオポンチンペプチドを 1 として，インターフェロン- β が 5，ザニルブジンは 10，ザルシタビンは 10,000 という増殖抑制効果の差がみられ，ザルシタビンの抑制効果がきわめて強いことが示された。

V 抗アデノウイルス点眼薬の生体への影響の評価

1. アデノウイルス感染動物モデル

抗アデノウイルス薬の候補となる薬剤が *in vitro* の検討で選ばれたので，次に必要な段階は生体における抗ウイルス作用の検討になる．まず，動物実験モデルで抗アデノウイルス作用が実際にあるか否かを解析することになるが，アデノウイルス結膜炎の感染動物モデルは現在まで後述の 2 系統が知られているのみである．Gordon ら²⁰⁾が報告しているのは New Zealand white rabbit のモデルである．これは，C 群の 5 型の感染モデルとして提唱され，接種感染後，結膜擦過により，ウイルス量の変化を見るシステムである．家兎を用いるために，ス

ペースや費用がかかることや，モデルとしての再現性などの問題から，広く使われていない．その後，5 型以外の血清型(1, 3, 4, 7, 9, 11 および 14)にも感染することが示されているが，我が国に多い 8, 19 および 37 型などの主要な D 群血清型のモデルとして使用できるかについては不明である²⁶⁾．もう一つのモデルは Kaneko ら²⁷⁾の cotton rat のモデルである．種々の血清型に対応しており，角膜におけるアデノウイルス量を角膜を摘出して比較するものである．小動物を用い，飼育管理は容易であるものの，結膜炎症状が出ないところに短所がある．これらの動物モデルの問題点は，動物にヒトアデノウイルスを接種しているところから，種の相違に基づく病原性の問題や結膜におけるアデノウイルスレセプターの相違が結膜炎モデルとする上での大きな障害になっていることがあると考えられる。

Gordon らは前述のモデルを用いて，シドフォビルについて検討し，*in vitro* レベルでは十分な抗アデノウイルス効果があり，New Zealand white rabbit のモデルによる *in vivo* の検討でも有効とされた^{20)～22)26)}．ところが，その後，米国でヒトのアデノウイルス結膜炎を対象に点眼投与の治験が行われたが，詳細は明らかになっていないものの，鼻涙管閉塞，眼瞼発赤，結膜充血などの

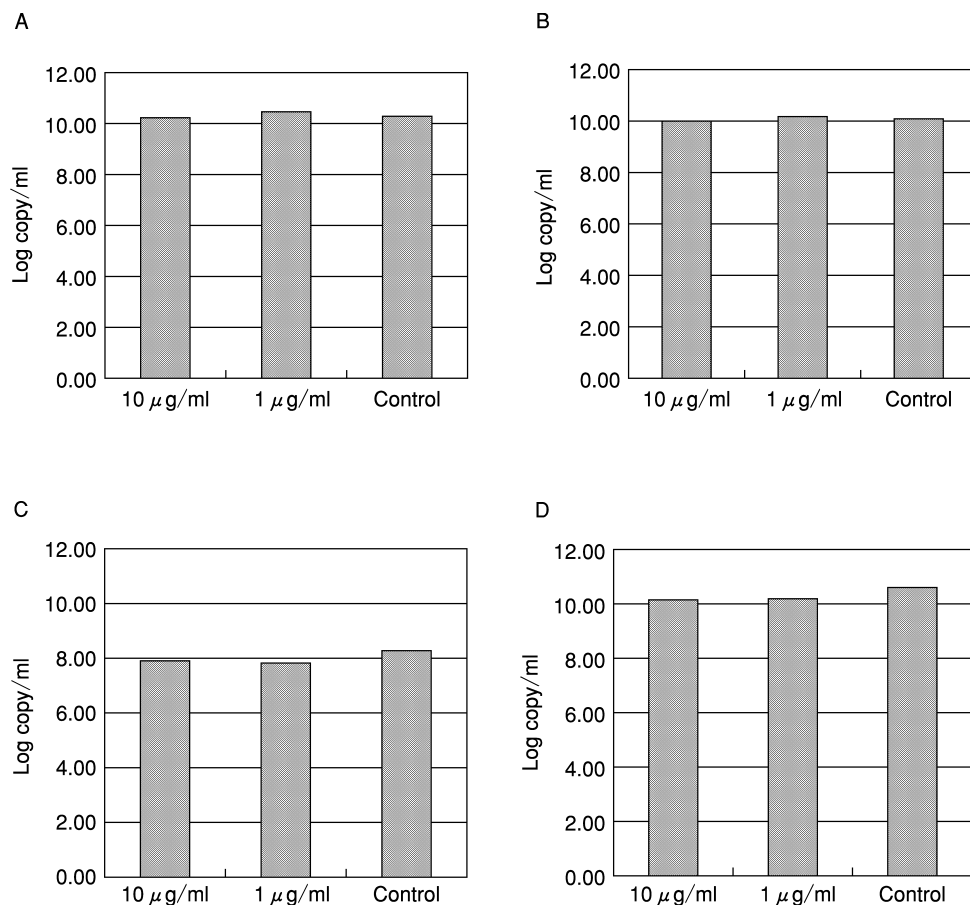


図 12 ジクロフェナックナトリウムのウイルス増殖抑制効果スクリーニング結果。
記号, グラフ軸は図 4 に同じ。

副作用と思われる症状が出現し、シドフォビル点眼薬は開発が中止された。この開発中止の経緯は論文などによって報告されていないために、原因は明らかではないが、核酸誘導体としてのシドフォビルの持つ細胞毒性が、特に涙小管のように、管腔の小さい部位で臨床症状として出現したと推測された。ただ、これ以外の抗ウイルス薬については、動物モデルでも点眼の効果の検討は行われておらず、作用機序の異なるザルシタビン、ザニルブジンなどの逆転写酵素阻害薬の毒性については不明である。そこで、シドフォビルに加えて、抗アデノウイルス作用が *in vitro* で確認されたザルシタビン、ザニルブジン、インターフェロン- β および抗オステオポンチンペプチドの 4 薬剤について、アデノウイルス感染は行わず、点眼薬のみの影響を白色家兎を用いて検討することにした。この実験は健常者あるいは健常動物を対象に行われる第一相試験と位置づけられ得るものでもある。

2. 方 法

体重 1.0~1.5 kg のメス白色家兎を用いた。点眼薬はシドフォビル、ザルシタビン、ザニルブジン、インターフェロン- β および対照の balanced salt solution (BSS) を、BSS を除く薬剤はそれぞれ原末を蒸留水で溶解した 1% 溶液として作製したものを使用した。点眼スケ

表 5 点眼による臨床所見

結膜充血	1: 正常 2: 限局性の結膜充血 3: 結膜全体の充血
眼瞼発赤	1: 正常 2: 瞼縁部の軽度の発赤 3: 瞼縁部の重度の発赤
流涙	1: 正常の涙液三角 2: 軽度の涙液三角の上昇 3: 高度の流涙

ジュールは各点眼液を 1 日 4 回、片眼に 2 週間点眼した。薬剤濃度および点眼回数は Gordon ら²⁰⁾がシドフォビルを New Zealand white rabbit に投与した報告に準じて行った。白色家兎は各群 5 匹ずつ、合計 25 匹を用いた。結膜、眼瞼および涙液の臨床所見と涙点からの通水試験を行った。これらの結果は、結膜充血、眼瞼発赤および流涙に関して、表 5 に示したスコアによって記載した。臨床所見は各群の 5 匹の家兎のスコアの平均を比較した。超音波 B モードによる涙小管径測定は、Tost

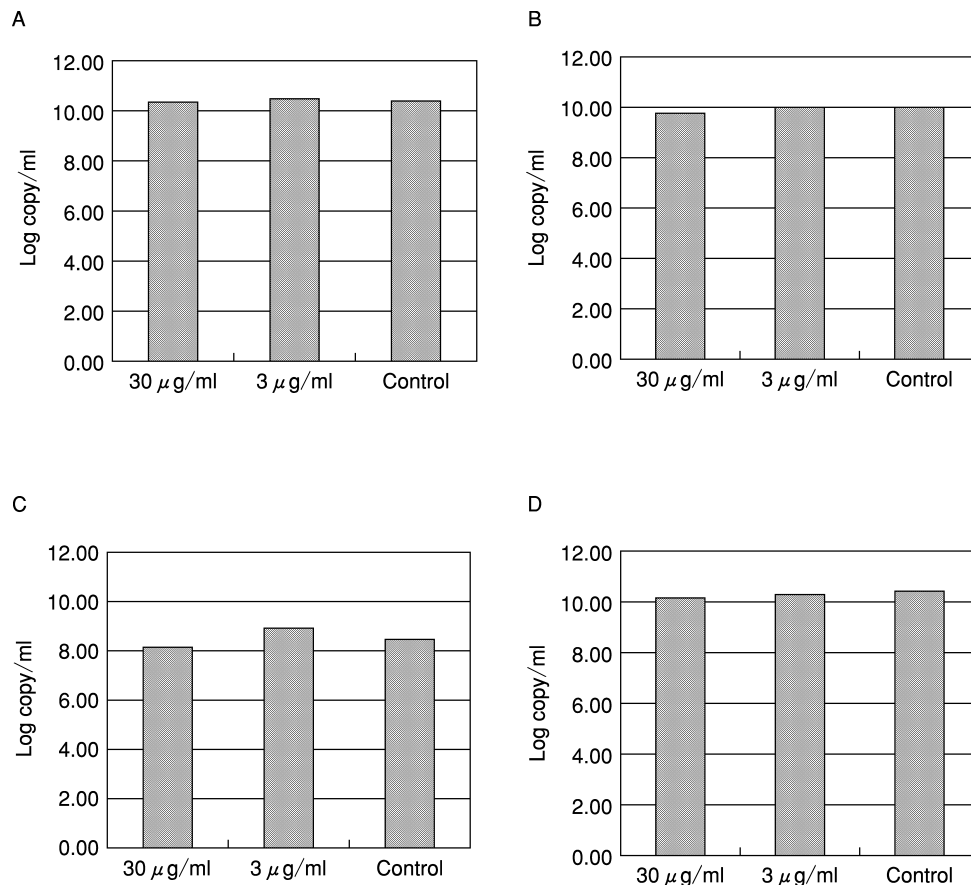


図 13 ブロムフェナックナトリウムのウイルス増殖抑制効果スクリーニング結果。
記号，グラフ軸は図 4 に同じ。

表 6 結膜充血の経時的変化

点眼開始後日数	臨床スコア(平均値±標準偏差)				
	0	1	4	10	14
シドフォビル	1	1.11±0.33	1.22±0.44	1.22±0.44	1.67*±0.50
ザルシタビン	1	1.20±0.45	1.20±0.45	1.40±0.55	1.20±0.45
ザニルブジン	1	1.20±0.45	1	1.40±0.55	1.40±0.55
インターフェロン-β	1	0.40±0.04	1	1	1.40±0.55
BSS	1	1	1	1	1

*: $p < 0.05$ (BSS: balanced salt solution に対し)

平均値±標準偏差

ら²⁸⁾が行った方法に準じて，超音波測定装置UD-6000® (10 MHz) (トーマー) に 20 MHz モードプローブの UD-1050® (トーマー) を装着して描画した画像における涙小管直径を測定した。涙小管直径も臨床所見と同様に，各群の家兎の測定値の平均値を群間で比較した。統計学的解析には Mann-Whitney 検定を用いた。さらに，シドフォビル点眼群について，点眼終了時に眼球および周囲組織を摘出し，病理組織学的検索を行った。

3. 結 果

結膜充血の経時的変化では，薬剤点眼群で軽度の充血の出現が見られたが，対照(BSS)との間に有意差があったのは，シドフォビルの 14 日目だけであった(表

6)。眼瞼の所見では，点眼開始 4 日後から発赤が薬剤点眼群でみられ，シドフォビルに加えて，ザルシタビン，ザニルブジンの投与群でも 14 日点眼後に，有意な発赤がみられた(表 7)。いずれの所見もインターフェロン-βについては対照との間には差が見られなかった。流涙は経過観察中どの投与群にも何らかの変化は肉眼的には認められなかった。シドフォビル点眼群について，点眼開始前および 14 日後の眼瞼および角結膜所見の写真を図 18 に示すが，涙道の通水試験は経過観察中，すべての動物において通過障害は見られなかった。一方，涙小管直径の 2 週間の変化を経時的に見ると，対照の BSS 群とザルシタビン，ザニルブジン群は大きな変化はなく経

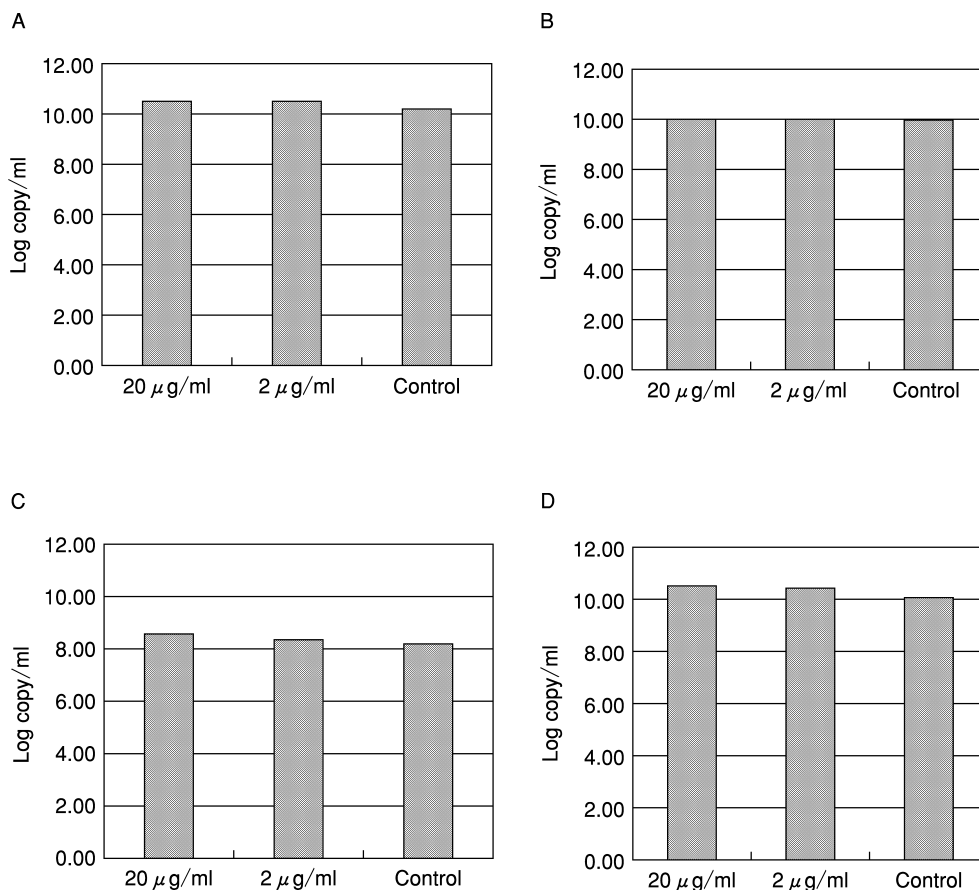


図 14 アンレキサノクスのウイルス増殖抑制効果スクリーニング結果。
記号, グラフ軸は図 4 に同じ。

表 7 眼瞼発赤の経時的変化

点眼開始後日数	臨床スコア (平均値±標準偏差)				
	0	1	4	10	14
シドフォビル	1	1.11±0.33	1.33±0.50	1.22±0.44	1.89*±0.33
ザルシタビン	1	1.20±0.05	1.40±0.55	1.40±0.55	1.80*±0.45
ザニルブジン	1	1	1.20±0.45	1.20±0.45	1.60*±0.55
インターフェロン-β	1	1	1	1.20±0.45	1.20±0.55
BSS	1	1	1	1	1

* : $p < 0.05$ (BSS に対し)

表 8 涙小管直径の経時的変化

点眼開始後日数	涙小管直径 (mm : 平均値±標準偏差)				
	0	1	4	10	14
シドフォビル	0.37±0.03	0.36±0.03	0.32±0.02	0.31*±0.03	0.31*±0.03
ザルシタビン	0.39±0.04	0.37±0.05	0.37±0.02	0.35±0.03	0.35±0.02
ザニルブジン	0.39±0.03	0.36±0.04	0.36±0.02	0.34±0.02	0.35±0.04
インターフェロン-β	0.40±0.06	0.40±0.04	0.38±0.04	0.36±0.05	0.37±0.05
BSS	0.36±0.03	0.36±0.02	0.36±0.02	0.36±0.03	0.36±0.02

* : $p < 0.05$ (BSS に対し)

過したのに対し, シドフォビル群では 10 日および 14 日の涙小管直径が BSS 群に対して, 有意な縮小がみられた(表 8)。病理組織学的にシドフォビル点眼群と

BSS 群を, 結膜と涙小管で比較検討したが, シドフォビル点眼群では, 結膜上皮細胞および結膜杯細胞の減少や, 好酸球の浸潤などのアレルギー性炎症を示唆する所

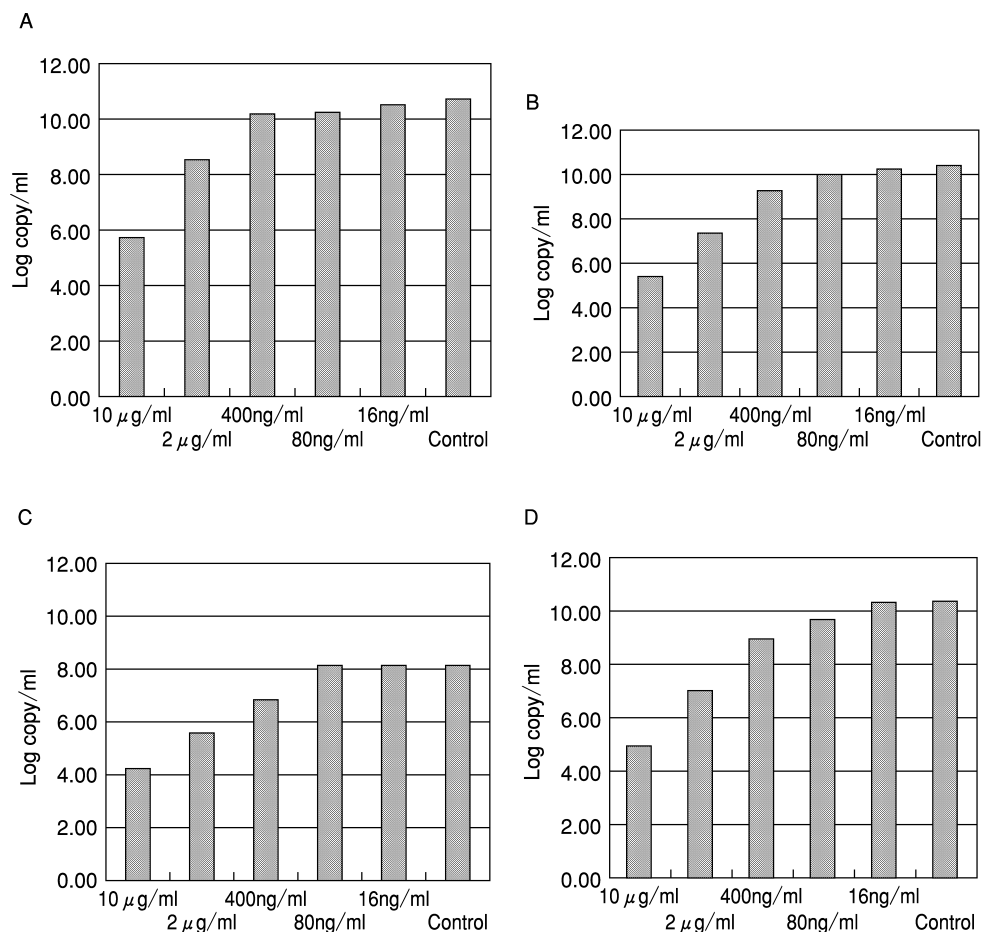


図 15 ザルシタビンのウイルス増殖抑制試験結果。
記号，グラフ軸は図 4 に同じ。

見がみられたが，毒性による壊死性変化は認められなかった(図 19)。

VI 抗アデノウイルス点眼薬の可能性と今後の方向

1. 抗アデノウイルス効果の認められた薬剤

1) ザルシタビン

抗ウイルス薬の中でも抗 HIV 薬はウイルス mRNA からの蛋白合成やプロテアーゼによるプロセッシングなどの過程に作用することによって，抗アデノウイルス作用を示すと考えられる。ザルシタビン(図 20)は，ピリミジンヌクレオチドであり，シチジル酸誘導体(非チミジン系)の構造を持つ。HIV 治療薬の中では，核酸系逆転写酵素阻害薬(nucleoside reverse transcriptase inhibitor, NRTI)に位置づけられている。NRTI の代表的な薬剤には以前にアジドチミジンと呼ばれていたジドブジン(ZDV)やジダノシン(DDI)などがあり，HIV 感染症における併用投薬プログラム(highly active antiretroviral therapy, HAART)の基盤薬としてしばしば使用されている。ザルシタビン(ハイビット®)は，内服薬としては高い経口有効性を持つが，投与量依存性の末梢

神経障害を生じる他，肺炎，食道潰瘍，口内炎などが副作用として知られている。金子ら²⁹⁾はザルシタビンがシドフォビルよりも低濃度で抗アデノウイルス作用，細胞毒性も低い *in vitro* の結果を報告している。金子らの報告では EC₅₀ (50% effective concentration) で，3，4，8，19 および 37 型いずれの血清型にもシドフォビルに比して EC₅₀ が小さく，今回行った real time PCR 法とは解析法が異なるが，どの血清型にも強い増殖抑制効果がみられたことは，同様の結果であったと思われる。ただ，ザルシタビンの持つ強い全身副作用などから点眼薬として毒性が強いと考えられたが，白色家兎の点眼投与実験では投与終盤に眼瞼発赤がみられたが，それ以外には結膜，涙道の明らかな異常はみられず，点眼薬として使用した場合でも，涙小管径の有意な狭窄がみられたシドフォビルとは異なる性質を有しており，点眼薬として使用できる可能性は大きいと考えられた。

2) ザニルブジン

ザニルブジン(ゼリット®)はスタブジン(2',3'-dideohydro-3'-deoxythymidine, d4 T)(図 21)とも呼ばれることがある，チミジンアナログの NRTI である。ザルシタビンと同様に HAART 投薬プログラムで使用さ

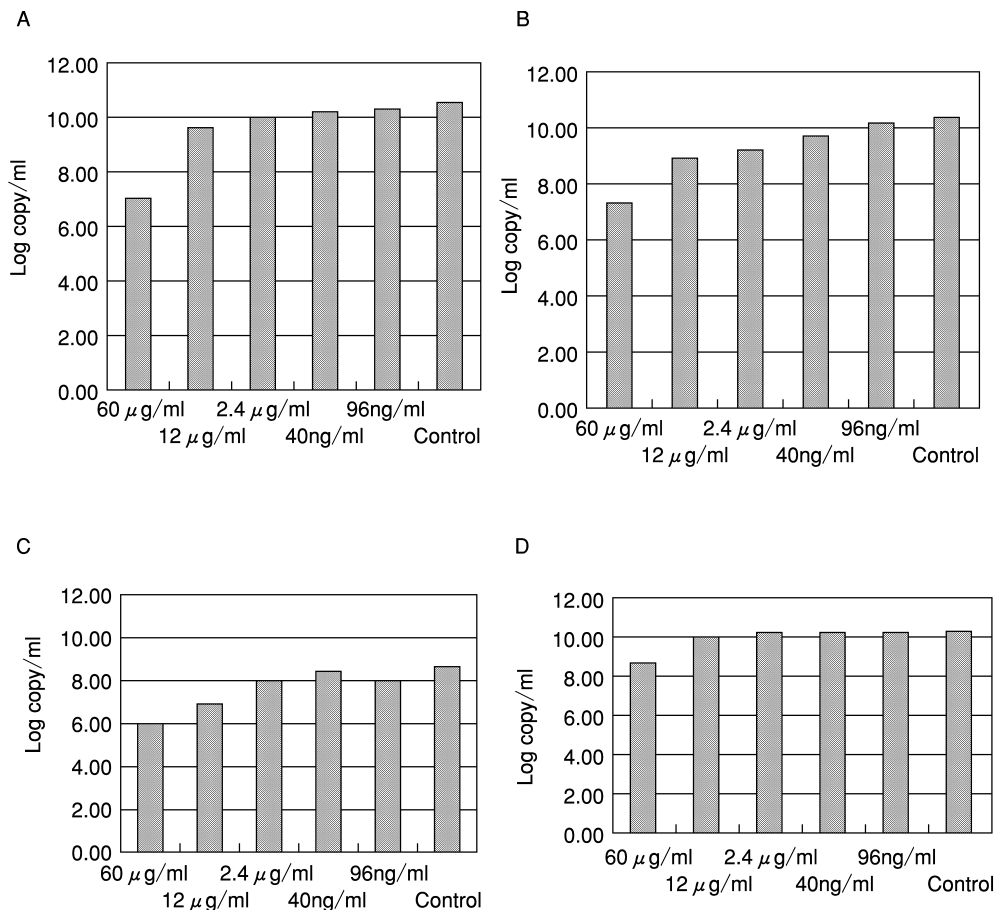


図 16 ザルニブジンのウイルス増殖抑制試験結果。
記号, グラフ軸は図 4 に同じ。

れ, よい経口有効性のために, 中枢神経系を含むほとんどの組織への浸透性が高い。腎機能不全では投薬量の調整が必要である。今まで抗アデノウイルス作用は報告されていなかったが, ザルシタビンよりやや劣るが, すべての血清型, 特に 3, 4 型という PCF タイプの血清型に有効であることが示された。点眼薬の影響に関してもザルシタビンと同様の傾向を示しており, アデノウイルス結膜炎の点眼薬として使用できる可能性が示されたといえる。

3) インターフェロン- β

インターフェロン- β は線維芽細胞由来の糖蛋白質で, テノン囊線維芽細胞から産生されることが報告されているように, 自然にも眼球に存在することが考えられている³⁰⁾。抗ウイルス作用の機序は, 転写開始を阻止する因子をリン酸化するプロテインキナーゼ, transfer ribonucleic acid (tRNA) の末端ヌクレオチドを分解するホスホジエステラーゼなどのさまざまな酵素の産生を誘発することによって考えられているが, はっきりしない面も多い。抗アデノウイルス作用はすでに 1980 年代に報告²⁵⁾されており, 点眼薬によるアデノウイルス結膜炎に対する治験も我が国で行われている。しかし, この結果

は臨床効果が確認できないというものであった³¹⁾。今回の研究では, インターフェロン- β のアデノウイルス増殖抑制効果は濃度依存に認められ, 血清型別では 4, 8 型に特に有効であると考えられたが, ザルシタビン, ザルニブジンに比較してその効果は弱く, NRTI とは作用機序が大きく異なることが背景にあると考えられた。

4) 抗オステオポンチンペプチド

アデノウイルス結膜炎では, まずアデノウイルスに親和性のあるレセプターを有する結膜上皮細胞にアデノウイルスのファイバーが接着して感染が始まる。近年, 種々の蛋白質に対するモノクローナル抗体が得られるようになり, アデノウイルス各血清型のレセプターの研究が大きく進展した。蛋白質の RGD 配列がレセプターとして重要視されているが, この配列を有しているインテグリン, ビトロネクチンやフィブロネクチンがアデノウイルスのレセプターであることが示されている。このような性質を持つレセプターとしてコクサッキーウイルスと共通の coxackie-adenovirus receptor (CAR) が多くの血清型のアデノウイルスレセプターであり, 結膜炎と病因ウイルスの関係を示す重要なキーとして注目されている³²⁾。しかし, 37 型を含む D 群の血清型はシアル酸

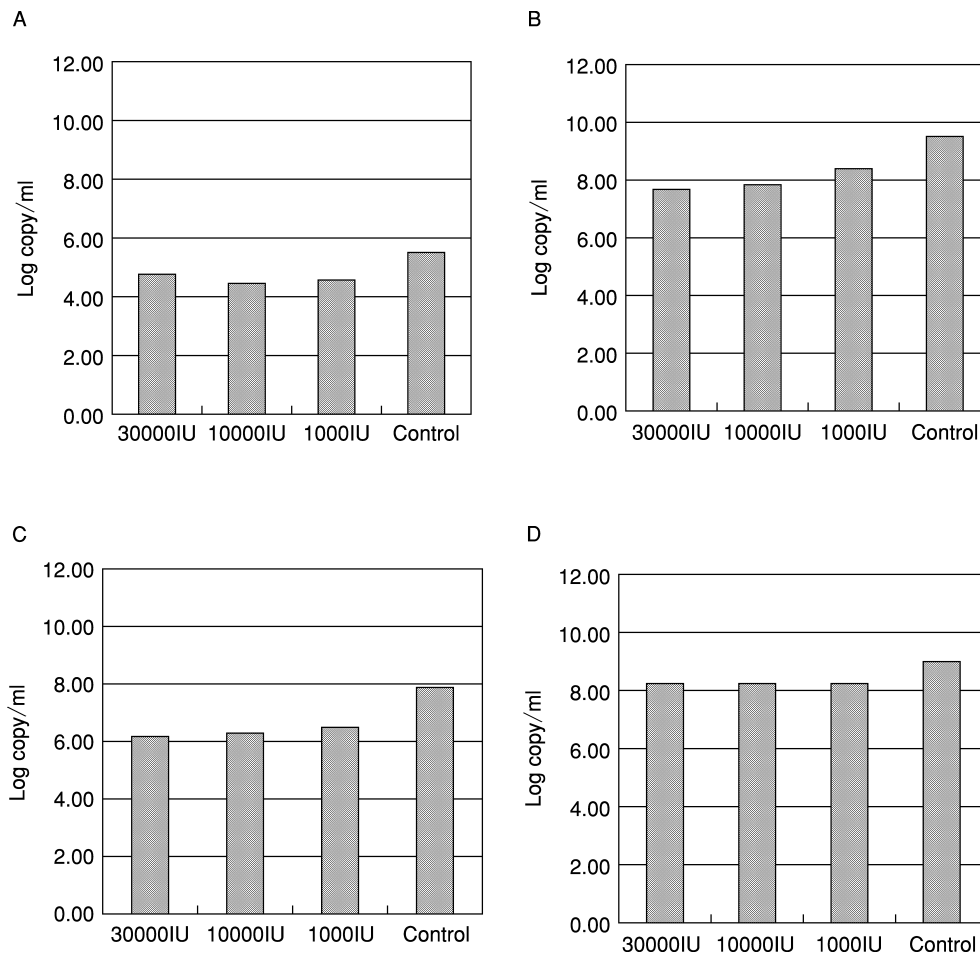


図 17 インターフェロン-βのウイルス増殖抑制試験結果。
記号，グラフ軸は図 4 に同じ。

をレセプターとして主に使用している³³⁾。すなわち，D 群アデノウイルスも CAR への結合部位をファイバーに持っているが，ファイバーの長さや柔軟性が異なり，レセプターとして機能していないというものである³⁴⁾。レセプター阻害薬はファイバーのレセプターへの接着を阻害する薬剤である。

オステオポンチンとは，分子の中央に RGD のアミノ酸配列を持ち，これがアデノウイルスのレセプターと共通の構造となっている。その他，腫瘍転移や血管新生，好酸球，アレルギー性結膜疾患と関連があることが知られている³⁵⁾。抗オステオポンチンペプチドはフィブロネクチンペプチドとして，GRGDSP (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro) のアミノ酸配列で合成したものを用いた。CAR とインテグリンの両者を阻害する作用が考えられるが，今まで抗アデノウイルス作用は特に報告されていなかった。レセプター阻害薬としての性格から，抗オステオポンチンペプチドの吸着阻害効果を確認するために，アデノウイルスが 4℃で細胞に付着するが，35℃になって細胞内に侵入するという温度特異性を再現する実験を行い，抗オステオポンチンペプチドはどの血清型に

対してもある程度の増殖抑制効果があることがわかった。ただ，抗アデノウイルス作用はザルシタビンの約 1 万分の 1 であり，他の薬剤に比しても弱く，細胞毒性が少なくかわりに，吸着阻害による作用機序からは発症後の効果はあまり期待できず，初発眼発症後の反対眼への予防的投与に適している薬剤と推測される。

2. 抗アデノウイルス効果がみられなかった薬剤

1) 抗 HIV 薬

ネビラピンは非核酸系逆転写酵素阻害薬 (non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, NNRTI) で，HIV の母子垂直感染防止に用いられることの多い薬剤であり，NRTI とは作用部位が異なっている。NNRTI は活性化のためのリン酸化の必要がなく，ヌクレオシド三リン酸と競合しない。抗アデノウイルス作用が見られなかったが，NRTI のザルシタビン，ザニルブジンとは対照的な結果であった。

プロテアーゼ阻害薬ではインジナビルとアンブレナビルについて検討をした。インジナビル (クリキシバン®) は HIV-1 プロテアーゼを阻害し，ウイルス前駆体蛋白質を切断し，成熟感染性ビリオンの産生を抑制する。全

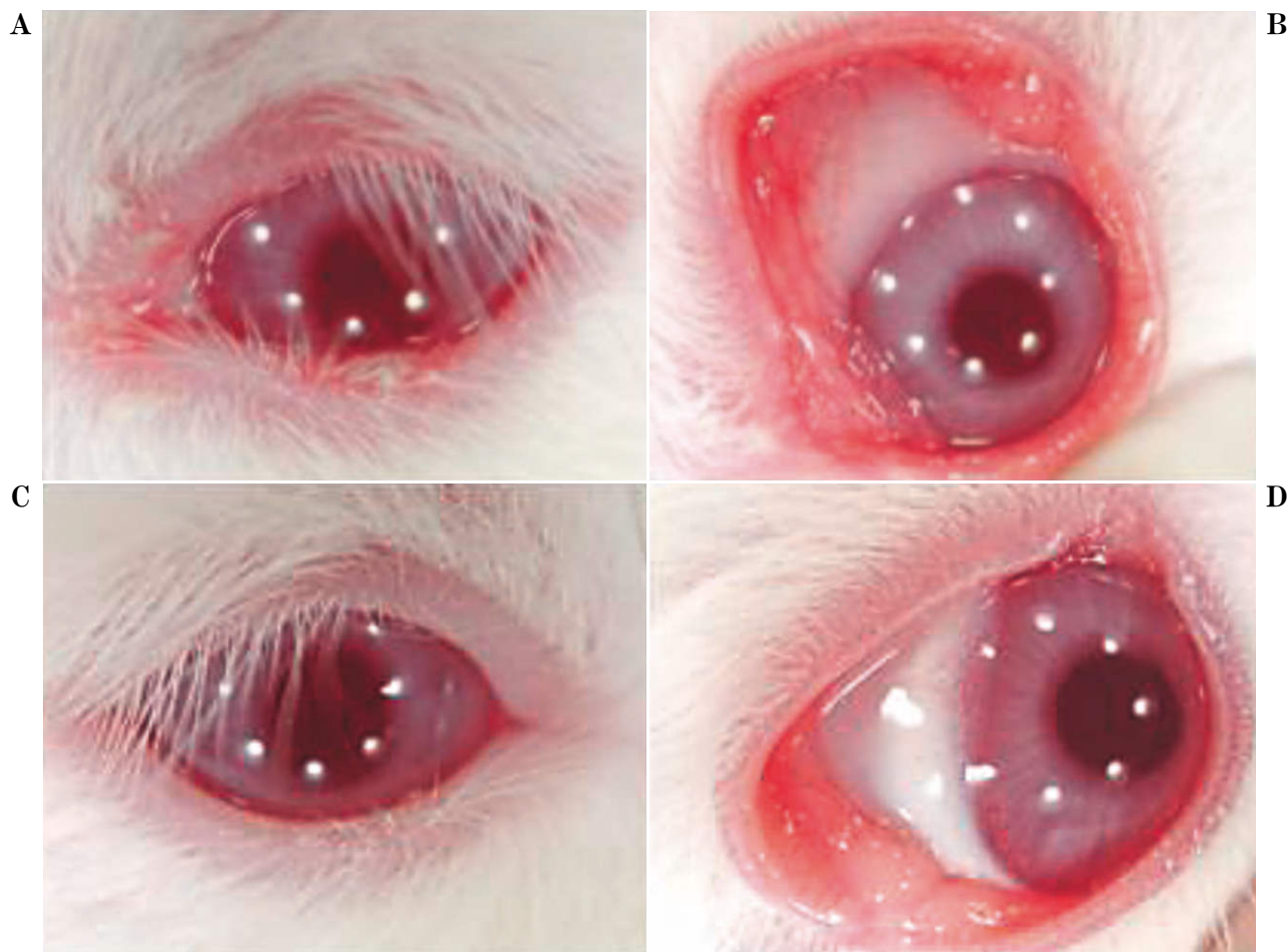


図 18 シドフォビル点眼群の眼瞼および角結膜所見.

シドフォビル点眼群の眼瞼(A)および角結膜(B), 対照(BSS(balanced salt solution))点眼群の眼瞼(C)および角結膜(D)所見を示す. いずれも点眼開始後 14 日目である.

身副作用では腎障害が強く, 抗アデノウイルス作用の報告はなかったが, いずれの血清型にも対照以上の増殖抑制効果は認められなかった. アンブレナビル(プロゼ®)は新しいプロテアーゼ阻害薬で, 肝チトクロム P 450 阻害薬でもある. 通常は他の薬剤と併用投与されるものであり, インジナビルと同様に増殖抑制効果はみられなかった.

2) 生理活性物質

近年, 多種多様な生理活性物質が, 構造や生体への影響が明確なものからいわゆるサプリメントまで知られるようになっている. その中で, 今回抗アデノウイルス作用を検討した NCT(Cl-HN-CH₂-CH₂-SO₃-Na⁺)は白血球から産生される内因性オキシダントであり, *in vitro* の抗ウイルス作用は Nagl ら³⁶⁾が単純ヘルペスウイルスやアデノウイルスに有効であることを報告している. Nagl ら³⁷⁾はさらにアデノウイルス結膜炎の治験を少数例に実施し, 有効であったと報告している. しかし, 今回の研究ではどの血清型に対しても, 抗ウイルス効果は認められず, 異なる結果となった. この理由は明らかではないが, Nagl らの *in vitro* の抗アデノウイルス効果

の検討が 5 型のみを対象にしていること, CC₅₀など細胞毒性についての検討がされていないことなど, 実験条件が今回とかなり異なっていることがまず考えられる. 一方, *in vivo* の研究は実際に結膜炎患者を対象にしているが, アデノウイルス結膜炎とされている症例も, ウイルス学的に診断されたものではなく, わずか 2 症例であるために, 有効であったと確実にいえる結果ではなかったとすべきであろう.

hCAP-18 は顆粒球の産生する抗菌ペプチドである. そのペプチドの中で, 今回は抗菌作用の強い C 末端側の 37 アミノ酸ペプチド LL-37 を使用した. hCAP-18 は顆粒球産生性抗菌ペプチドであり, 体表面にも分布しているが, lipopolysaccharide(LPS)結合性から, エンドトキシン誘発性実験的ぶどう膜炎を抑制することが報告³⁸⁾されている. しかし, アデノウイルスを含めた抗ウイルス薬としての効果は不明であった. スクリーニングの結果からは抗アデノウイルス作用は見られなかった. これらの結果から, 明らかな抗ウイルス作用点がなく, 炎症細胞などに主として作用する生理活性物質には, アデノウイルス結膜炎への有意な治療効果は期待できない

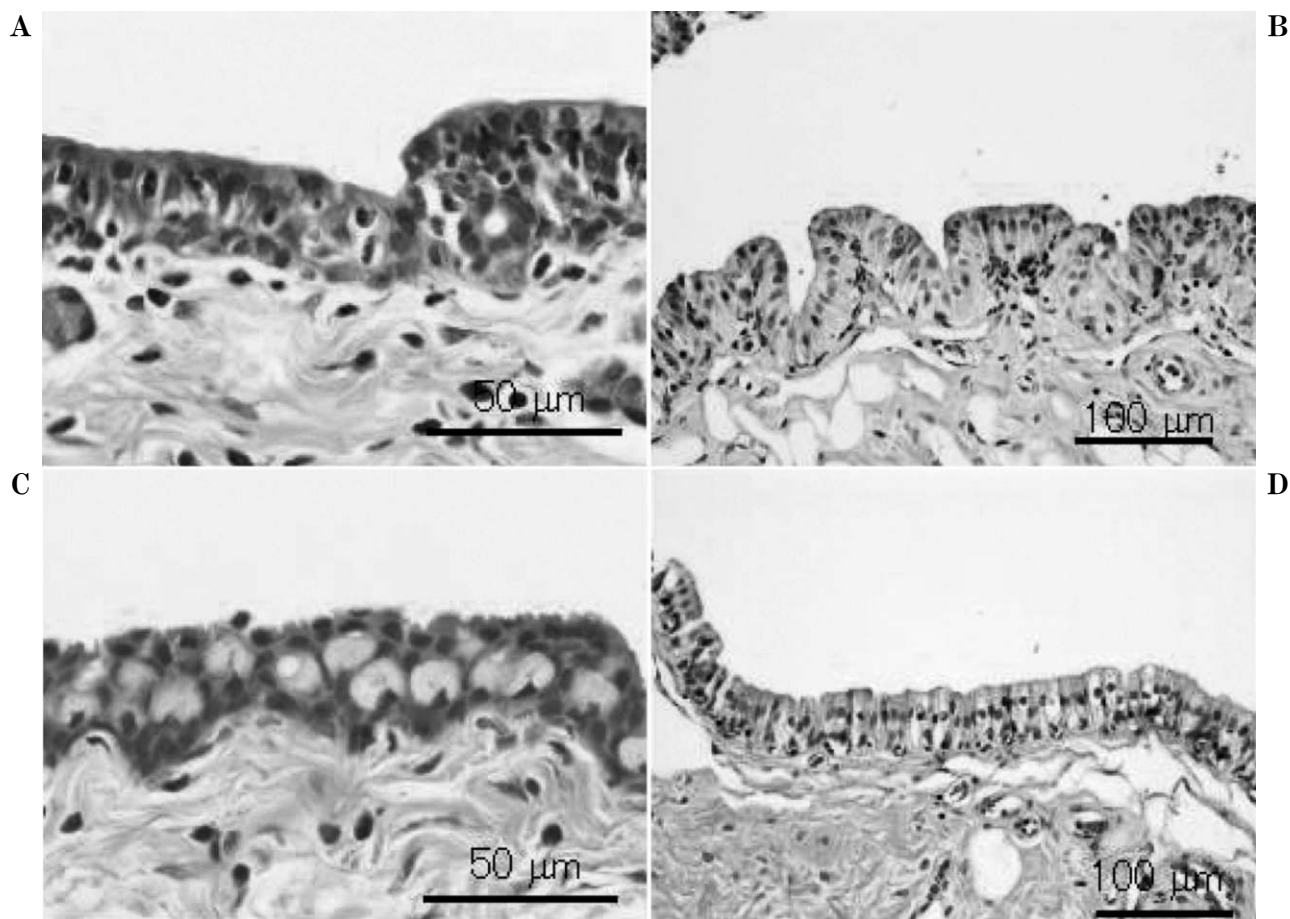


図 19 シドフォビル点眼後の病理組織学的所見.

シドフォビル点眼群の結膜(A)および涙小管(B), 対照(BSS)点眼群の結膜(C)および涙小管(D)所見を示す. ヘマトキシリン・エオジン染色.

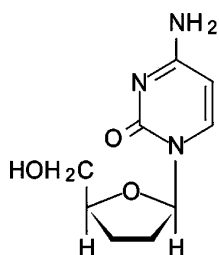


図 20 ザルシタピンの構造式.

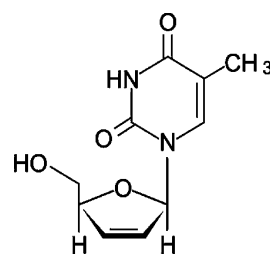


図 21 ザニルブジンの構造式.

ことがわかった.

3) その他の薬剤

最近, 抗アレルギー薬であるクロモグリク酸ナトリウム (disodium cromoglycate, DSCG) に抗ウイルス作用があることが報告³⁹⁾されている. これはアデノウイルスに限った作用ではないが, 接着因子の intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) 阻害作用に基づく, ウイルス接着阻害効果によると考えられている. そこで, 今回は同じあるいは類似の系統薬であるジクロフェナックナトリウム, アンレキサノクス, ブロムフェナックナトリウムについて抗アデノウイルス作用を検討した. ジク

ロフェナックナトリウムにも DSCG と同様の抗 ICAM-1 作用があることは知られていた⁴⁰⁾. また, アンレキサノクスには fibroblast growth factor 1 (FGF 1) を介しての細胞接着阻害作用があるが⁴¹⁾, これらの薬剤の抗ウイルス作用の報告は今までではなく, ジクロフェナックのアデノウイルス増殖抑制作用は 5 型についてはすでに否定されていた⁴²⁾. スクリーニング試験の結果でも, ジクロフェナックナトリウム, ブロムフェナックナトリウムおよびアンレキサノクスには, アデノウイルス増殖抑制効果は認められなかった. 作用機序や DSCG の報告から, レセプター阻害作用に基づくものであることから,

抗オステオポンチンペプチドで行ったような接着阻害実験を行えば、*in vitro* の抗アデノウイルス作用が見られた可能性は残るが、少なくともウイルス増殖の強い状態への点眼による治療効果はきわめて少ないのではないかと考えられる。

VII おわりに

—抗アデノウイルス点眼薬開発のこれから—

アデノウイルスに対する現時点で増殖抑制効果が期待されるほとんどの薬剤を対象に行った今回の研究で、4 薬剤にその効果が確認され、点眼による眼周囲局所への影響は副作用があると考えられているシドフォビルよりも弱いものであったことから、これらの薬剤がヒトへの臨床的なアデノウイルス結膜炎治療点眼薬として検討に値することが示された。ただ、4 つの薬剤は作用機序も異なり、増殖抑制薬(ザルシタピン、ザニルブジン)と感染抑制薬(インターフェロン- β 、抗オステオポンチンペプチド)とに役割が分担されるべきである。今後は、感染動物への治療効果判定試験が必要であるが、適当な実験モデルが準備できない状況が続く場合は、健康成人への第一相試験を行い、さらにアデノウイルス結膜炎症例への治療へと進めていく方向を検討していくことになるのではないかと考えられる。さらに、製品としての抗ウイルス点眼薬の化学的性状、投与方法、製造コストの検討を行う数多くの段階を経て、アデノウイルス結膜炎治療薬が臨床応用される日は遠くないのではないかと考えている。また、アデノウイルス結膜炎の結膜局所における炎症の病理学およびウイルス学的解析を進め、治療後に生じると考えられている潜伏感染⁴³⁾の病態を研究することによって、抗アデノウイルス治療を行うことの生体への影響、とりわけ免疫系への影響を評価することも重要であると思われる。発症予防としてのワクチンなどの研究も、アデノウイルスのこれからの臨床を考えていく上での大きなテーマであろう。

下記の先生方に、この研究のご協力いただきました。本文中の協力いただいた分担領域を示し、深く謝意を表します。

門之園一明(横浜市立大学市民総合医療センター眼科)

IV, V

林 明男, 石古博昭(三菱化学ビーシーエル株式会社) IV

金子久俊, 飯田知弘(福島県立医科大学眼科) IV

石川 誠, 吉富健志(秋田大学眼科) V

坂本雄二, 池田雅晴(千寿製薬株式会社) IV

園田康平, 石橋達朗(九州大学眼科) V

大野重昭, 青木功喜(北海道大学眼科) II, IV

文 献

- 1) 内尾英一, 日隈陸太郎, 青木功喜, 大野重昭: わが国における眼感染症サーベイランスの現状. 臨眼

- 51: 1505—1508, 1997.
- 2) 大口剛司, 青木功喜, 有賀俊英, 石古博昭, 田川義継, 大野重昭: ウイルス性結膜炎の大学病院院内感染のアンケート調査. 日本の眼科 75: 689—692, 2004.
- 3) Naesens L, Lenaerts L, Andrei G, Snoeck R, Van Beers D, Holy A, et al: Antiadenovirus activities of several classes of nucleoside and nucleotide analogues. Antimicrob Agents Chemother 49: 1010—1016, 2005.
- 4) Stampfli MR, Ritz SA, Neigh GS, Sime PJ, Lei XF, Xing Z, et al: Adenoviral infection inhibits allergic airways inflammation in mice. Clin Exp Allergy 28: 1581—1590, 1998.
- 5) Uchio E, Aoki K, Saitoh W, Itoh N, Ohno S: Rapid diagnosis of adenoviral conjunctivitis on conjunctival swabs by 10 minute immunochromatography. Ophthalmology 104: 1294—1297, 1997.
- 6) 渡辺洋一郎, 内尾英一, 伊藤典彦, 薄井紀夫, 中川 尚, 井上幸次, 他: アデノウイルス結膜炎患者結膜における細菌感染. 日眼会誌 104: 555—558, 2000.
- 7) 溝口晋弘, 内尾英一, 伊藤典彦, 大野重昭, 青木功喜: アデノウイルス・クラミジアの重複感染による急性濾胞性結膜炎の 2 例. 臨眼 53: 153—156, 1999.
- 8) 伊藤恵子, 松浦範子, 内尾英一, 青木功喜, 大野重昭: 再発性角膜上皮下混濁 sine adenovirus の一例. 臨眼 54: 1823—1828, 2000.
- 9) Romanowski EG, Yates KA, Gordon YJ: Short-term treatment with a potent topical corticosteroid of an acute ocular adenoviral infection in the New Zealand white rabbit. Cornea 20: 657—660, 2001.
- 10) Kaelushnik J, Or R, Delukina M, Nagler A, Livni N, Engelhard D: Intravenous ribavirin therapy for adenovirus gastroenteritis after bone marrow transplantation. J Pediatr Gastroenterol Nutr 21: 110—112, 1995.
- 11) Cassano WF: Intravenous ribavirin therapy for adenovirus cystitis after allogeneic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 7: 247—248, 1991.
- 12) Murphy GF, Wood DP, McRoberts JW, Henslee-Downey PJ: Adenovirus-associated hemorrhagic cystitis treated with intravenous ribavirin. J Urol 149: 565—566, 1993.
- 13) Maslo C, Girard P, Urban T, Guessant S, Rozenbaum W: Ribavirin therapy for adenovirus pneumonia in an AIDS patient. Am J Crit Care Med 156: 1263—1264, 1997.
- 14) Hromas R, Clark C, Blanke C, Tricot G, Cornetta K, Hedderman A, et al: Failure of ribavirin to clear adenovirus infections in T cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 14: 663—666, 1994.

- 15) **Kana JS** : Delayed trifluridine treatment of sub-epithelial corneal infiltrates. *Am J Ophthalmol* 113 : 212—214, 1992.
- 16) **Lenette DA, Eiferman RA** : Inhibition of adenovirus replication *in vitro* by trifluridine. *Arch Ophthalmol* 96 : 1662, 1978.
- 17) **Little JM, Lorenzetti DWC, Brown DC, Schweem HH, Jone BR, Kaufman HE** : Studies of adenovirus type III infection treated with methisazone and trifluorothymidine. *Proc Soc Exp Biol Med* 127 : 1028, 1968.
- 18) **Ward JB, Siojo LG, Waller SG** : A prospective, masked clinical trial of trifluridine, dexamethasone, and artificial tears in the treatment of epidemic keratoconjunctivitis. *Cornea* 12 : 216—221, 1993.
- 19) **Trousdale MD, Goldschmidt PL, Nobrega R** : Activity of ganciclovir against human adenovirus type-5 infection in cell culture and cotton rat eyes. *Cornea* 13 : 435—439, 1994.
- 20) **Gordon YJ, Romanowski EG, Arullo-Cruz T** : Topical HPMPC inhibits adenovirus type 5 in the New Zealand rabbit ocular replication model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 : 4135—4143, 1994.
- 21) **Romanowski EG, Araullo-Cruz T, Gordon YJ** : Topical corticosteroids reverse the antiviral effect of topical cidofovir in the Ad 5-inoculated New Zealand rabbit ocular model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38 : 253—257, 1997.
- 22) **Gordon YJ, Araullo-Cruz TP, Johnson YF, Romanowski EG, Kinchington PR** : Isolation of human adenovirus type 5 variants resistant to the antiviral cidofovir. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 : 2774—2778, 1996.
- 23) 中嶋治彦, 後藤聖樹, 島田有希子, 永本洋子, 石古博昭, 伊奈川和香, 他 : (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl) cytosine のアデノウイルスに対する抗ウイルス効果. *日眼会誌* 104 : 77—81, 2000.
- 24) **Buttke TM, McCubrey JA, Owen TC** : Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. *J Immunol Methods* 157 : 233—240, 1993.
- 25) 伊藤真理子 : 天然型及び遺伝子組み換えインターフェロン- β , γ の Adeno virus 増殖抑制効果について. *日眼会誌* 90 : 1617—1621, 1986.
- 26) **Gordon YJ, Romanowski EG, Arullo-Cruz T** : HPMPC, a broad-spectrum topical antiviral agent, inhibits herpes simplex type 1 replication and promotes healing of dendritic keratitis in the New Zealand rabbit ocular model. *Cornea* 13 : 516—520, 1994.
- 27) **Kaneko H, Mori S, Suzuki O, Iida T, Shigeta S, Abe M, et al** : The cotton rat model for adenovirus ocular infection : Antiviral activity of cidofovir. *Antiviral Res* 61 : 63—66, 2004.
- 28) **Tost F, Bruder R, Clemens S** : Clinical diagnosis of chronic canaliculitis by 20-MHz ultrasound. *Ophthalmologica* 214 : 433—436, 2000.
- 29) 金子久俊, 森 修一, 茂田士郎, 大野重昭, 青木功喜 : アデノウイルス臨床分離株に対する sulfated sialyl lipid の抗ウイルス効果. *日眼会誌* 107 : 196—201, 2003.
- 30) **Chang L, Siriwardena D, Wilkins MR, Crowston JG, Akbar AN, Khaw PT** : *In vivo* production of interferon beta by human Tenon's fibroblasts : A possible mediator for the development of chronic conjunctival inflammation. *Br J Ophthalmol* 86 : 611—615, 2002.
- 31) 金子行子 : アデノウイルス結膜炎に対するヒト線維芽細胞インターフェロンの効果. *東京女子医大誌* 53 : 355—364, 1983.
- 32) **Bewley MC, Springer K, Zhang YB, Freimuth P, Flanagan JM** : Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR. *Science* 286 : 1579—1583, 1999.
- 33) **Arnberg N, Edlund K, Kid AH, Wadell G** : Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor. *J Virol* 74 : 42—48, 2000.
- 34) **Wu E, Pache L, Von Seggern DJ, Mullen TM, Mikiyas Y, Stewart PL, et al** : Flexibility of the adenovirus fiber is required for efficient receptor interaction. *J Virol* 77 : 7225—7235, 2003.
- 35) **Katagiri YU, Murakami M, Mori K, Iizuka J, Hara T, Tanaka K, et al** : Non-RGD domains of osteopontin promote cell adhesion without involving αv integrins. *Cell Biochem* 62 : 123—131, 1996.
- 36) **Nagl M, Larcher C, Gottardi W** : Activity of N-chlorotaurine against herpes simplex-and adenoviruses. *Antiviral Res* 38 : 25—30, 1998.
- 37) **Nagl M, Teuchner B, Pottinger E, Ulmer H, Gottardi W** : Tolerance of N-chlorotaurine, a new antimicrobial agent, in infectious conjunctivitis-A phase II pilot study. *Ophthalmologica* 214 : 111—114, 2000.
- 38) **Ohgami K, Ilieva IB, Shiratori K, Isogai E, Yoshida K, Kotake S, et al** : Effect of human cationic antimicrobial protein 18 Peptide on endotoxin-induced uveitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 4412—4418, 2003.
- 39) **Butler CC, Robling M, Prout H, Hood K, Kinnersley P** : Management of suspected acute viral upper respiratory tract infection in children with intranasal sodium cromoglycate : A randomized controlled trial. *Lancet* 359 : 2153—2158, 2002.
- 40) **Sakai A** : Diclofenac inhibits endothelial cell adhesion molecule expression induced with lipopolysaccharide. *Life Sci* 58 : 2377—87, 1996.
- 41) **Landiriscina M, et al** : Amlexanox reversibly inhibits cell migration and proliferation and induces the Src-dependent disassembly of actin

- stress fibers *in vitro*. J Biol Chem 275 : 32753—32762, 2000.
- 42) **Romanowski EG, Gordon YJ** : Effects of diclofenac or ketorolac on the inhibitory activity of cidofovir in the Ad 5/NZW rabbit model. Invest Ophthalmol Vis Sci 42 : 158—162, 2001.
- 43) **Garnett CT, Erdman D, Xu W, Gooding LR** : Prevalence and quantitation of species C adenovirus. J Virol 76 : 10608—10616, 2002.
-

Comment：沖坂 重邦

アデノウイルス結膜炎は眼科臨床だけでなく公衆衛生の面でも重要な疾患であるが、特異的な治療薬がなく有効な薬物療法が確立されていないので、対症療法を施行せざるを得ないのが現状である。

第 109 回日本眼科学会総会宿題報告「ウイルス性結膜炎の新しい薬物治療」の演者である内尾英一教授は、アデノウイルス、エンテロウイルスおよび単純ヘルペスウイルスが原因となる結膜炎の臨床、診断および治療のウイルス学・分子遺伝学的研究を長年にわたって行ってこられた。今回の宿題報告において、内尾教授はアデノウイルスに感染・増殖作用を持つ可能性のある 12 の薬剤を選択し、それらの薬剤の持つアデノウイルス増殖抑制作用を *in vitro* で比較検討し、増殖抑制薬（ザルシタビン、サニルブジン）および感染抑制薬（インターフェロン- β 、抗オステオポンチンペプチド）の 4 種の薬剤が臨床使用の可能性のあることを示された。次いで *in vivo* 実験として 4 種の薬剤を家兎眼に点眼し、以前に副作用の出現により開発が中断されたシドフォビルと比較し、結膜、涙小管などへの組織障害が軽度であることを明らかにされ、臨床使用への扉を大きく開かれた。

次のステップは感染動物への治療効果判定試験である。適切な実験モデルが開発されていない現状であるが、内尾教授はじめ多くの研究者の協力を得て是非とも早急に実験モデルを確立されることを期待している。内尾教授は健常成人への第一相試験を行い、さらにアデノウイルス結膜炎の症例の治験へと進めてゆく方向を検討して行くことになるのではないかと考えておられるが、感染動物への治療効果判定試験を踏まえて慎重に治験を立案実行して行かれることを望んでいる。抗ウイルス点眼薬としての化学的性状、投与方法、製造コストなど製薬企業の努力も勿論あるが、我々眼科医も協力してアデノウイルス結膜炎の治療薬の臨床使用されることがそれほど遠くないことを期待している。