

学 位 論 文 題 名

Studies on the antiviral activity of lactoferrin
and ribavirin upon hantavirus

(ハンタウイルスに対するラクトフェリンとリバビリンの
抗ウイルス活性に関する研究)

学位論文内容の要旨

ハンタウイルスは世界各国に分布し、ヒトの腎症候性出血熱 (HFRS) またはハンタウイルス性肺症候群 (HPS) の原因となる。ウイルスは病原巣動物であるげっ歯類に持続感染し、無症候で排泄物中に長期間にわたって排出される。ヒトは感染動物の排泄物を吸引することにより感染する。げっ歯類は広範な地域に分布しているために、予防対策として野生げっ歯類を根絶することは不可能である。そのうえ現行のワクチンは防御効果が完全ではないために、げっ歯類との接触機会を減らしたり、感染動物の分布域に立ち入らないといった消極的な予防対策しか存在しない。また、一旦患者が発生した場合には対症療法しか治療法がないのが現状である。従って、ハンタウイルス感染症の治療法の確立のために、化学療法について検討する必要がある。そこで、本研究では他のウイルスに対して有効とされているラクトフェリンまたはリバビリンのような抗ウイルス薬のハンタウイルスへの効果を *in vitro* と *in vivo* で評価する事を試みた。

牛由来ラクトフェリン (LF) とリバビリン (Rbv) を Seoul 型ハンタウイルスを感染させた Vero E6 細胞に作用させて *in vitro* の抗ウイルス活性を測定した。LF をウイルス感染時に培地に加えて 5 日間培養したところ、ウイルスのフォーカスを 50% 減少させる最小濃度 (ED_{50}) は $2,500 \mu\text{g/ml}$ であり、低い抗ウイルス活性しか示さなかった。ところが、LF を感染前に培地に加えて 37°C で 1 時間前処理すると ED_{50} は $39 \mu\text{g/ml}$ となり、強い抗ウイルス活性が認められた。これに対し、Rbv を感染時に加えて 5 日間培養すると ED_{50} が $10 \mu\text{g/ml}$ となり、強い抗ウイルス活性が見られたが、Rbv の前処理はウイルスのフォーカス形成を全く阻害しなかった。ウイルス感染 5 日目の Vero E6 細胞の培養上清中へのウイルス粒子の放出に与える影響を両薬剤について調べたところ、未処理の対照では 1.3×10^5 FFU/ml のウイルスが放出されたのに対し、 $100 \mu\text{g/ml}$ の LF 前処理では 3.8×10^4 FFU/ml と弱い阻害効果しか見られなかった。 $100 \mu\text{g/ml}$ の Rbv の後処理では 3.4×10^3 FFU/ml と対照に比べ約 37 分の一にウイルス量を低下させた。LF 前処理と Rbv 後処理をともに行うとウイルス放出量は 20 FFU/ml 未満へと激減したことから、両薬剤の併用により、相乗的な効果が得られることが明らかになった。ウイルスと LF を混合して 37°C で

1時間保温した後に細胞に接種したところ、LFのED₅₀は312.5 $\mu\text{g/ml}$ であった。これに対し、LFを細胞に前処理した後、PBSで3回洗浄するとフォーカス阻害効果は全く見られなくなった。従って、LFは細胞に弱く結合して抗ウイルス活性を示すものと考えられる。これらの結果はLFはハンタウイルスの感染を明らかに阻害し、ウイルスの細胞への吸着を抑制することによって抗ウイルス活性を示すことが示唆された。

両薬剤の抗ウイルス作用の機序をさらに明らかにするために、より詳細なin vitroの実験を実施した。400 $\mu\text{g/ml}$ のLFを前処理し、ウイルスのフォーカス形成を経時的に観察したところ、処理細胞中のフォーカス数は未処理のものに比べ15%にまで低下した。同様に100 $\mu\text{g/ml}$ のRbv後処理では対照の2.5%にまで低下した。両薬剤の併用ではウイルスのフォーカスは全く形成されなかった。ウイルスの糖蛋白 (G2)とヌクレオキャプシド蛋白 (NP) の合成、およびウイルスの培地中への放出はLFの前処理によって、感染24時間目までは阻害されたが、48時間目には対照と同じレベルまでに到達した。しかし、Rbvの後処理はウイルスのプラス鎖とマイナス鎖RNAの合成、G2、およびNPの合成およびウイルスの培地中への放出は感染24時間後から120時間後まで抑制された。これらの成績はLFが細胞への吸着を阻害するのに対し、RbvがウイルスRNAの合成を阻害することを示唆しているものと考えられる。

ハンタウイルス感染哺乳マウスのモデルを用いて両薬剤の抗ハンタウイルス活性の評価を行った。ハンタウイルスを皮下接種した対照マウスにおける致死率は93%であった。LFの40と160mg/kgの感染前1回投与は、それぞれ生存率を15%と70%に上昇させ、濃度依存的な抗ウイルス作用が認められた。LFの40と160mg/kgの2回投与では生存率はさらに上昇し、それぞれ85%と94%となった。Rbvの25と50mg/kgの感染直後1回投与は生存率をそれぞれ68%と81%に上昇させた。これらの成績はLFとRbvはin vivoでもハンタウイルスの感染に有効であることを示唆している。

これらの成績により、LFとRbvは単独または併用でハンタウイルス感染を阻止するのに有効であることが示された。今後、これら薬剤のヒトにおけるハンタウイルス感染症の効果的な治療法としての応用が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 島 邦 夫
副 査 教 授 喜 田 宏
副 査 教 授 小 沼 操
副 査 助 教 授 荻 和 宏 明

学 位 論 文 題 名

Studies on the antiviral activity of lactoferrin and ribavirin upon hantavirus

(ハンタウイルスに対するラクトフェリンとリバビリンの
抗ウイルス活性に関する研究)

ハンタウイルスは病原巣動物であるげっ歯類に持続感染し、ヒトの腎症候性出血熱またはハンタウイルス性肺症候群の原因となる。一旦患者が発生した場合には対症療法しか治療法がないのが現状であるため、化学療法を開発する必要がある。そこで、本研究では他のウイルスに対して有効とされているウシのラクトフェリン(LF)またはリバビリン(Rbv)のハンタウイルスへの効果を*in vitro*と*in vivo*で評価することを試みた。

LFとRbvをSeoul型ハンタウイルスに感染させたVero E6細胞に作用させて*in vitro*の抗ウイルス活性を測定した。LFを感染前に培地に加えて37Cで1時間前処理すると強い抗ウイルス活性が認められた。これに対し、Rbvを感染時に加えて培養すると強い抗ウイルス活性が見られたが、Rbvの前処理はウイルスのフォーカス形成を全く阻害しなかった。またLF前処理とRbv後処理による両薬剤の併用により、相乗的な効果が得られることが明らかになった。

両薬剤の抗ウイルス作用の機序をさらに明らかにするために、より詳細な*in vitro*の実験を実施した。LFを前処理すると、処理細胞中のフォーカス数は未処理のものと比べ15%にまで低下した。同様にRbv後処理では対照の2.5%にまで低下した。両薬剤の併用ではウイルスのフォーカスは全く形成されなかった。LFの前処理によってウイルス蛋白の合成、およびウイルスの培地中への放出は、感染24時間目までは阻害された。Rbvの後処理によりウイルスのRNAの合成は感染24時間後から120時間後まで抑制された。さらにハンタウイルス感染哺乳マウスのモデルを用いて両薬剤の抗ハンタウイルス活性の評価を行ったところLFとRbvは*in vivo*においてもハンタウイルスの感染に抑制効果があることが判明した。

以上の成績から、LFとRbvは単独または併用でハンタウイルス感染を阻止するのに有

効であることが示され、今後ヒトにおけるハンタウイルス感染症の効果的な治療薬として期待されるものである。よって審査員一同は、上記学位論文提出者マーフィ、マイケル ユジン氏が博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。