

インフルエンザ及び単純ヘルペスウイルス感染症の克服に
寄与する新規候補物質の作用特性に関する研究

富山大学大学院 医学薬学教育部
博士後期課程 薬科学専攻
薬用生物資源学研究室

佐々木 宏平

目次

	頁
序論	1
本論	9
第一章 MFPT による IAV の病原性低下メカニズムの解明	9
第一節 MFPT 耐性ウイルスの作製及び <i>in vitro</i> における増殖能の評価	9
第二節 <i>In vivo</i> における MFPT 耐性ウイルスの病原性の評価	11
第三節 MFPT 耐性ウイルスの変異部位の解析	14
第四節 MFPT 耐性ウイルス感染時の細胞における機能変化の評価	33
第五節 IAV に対する MFPT の作用機序の検討	37
第六節 考察	39
第二章 MFPT の抗 HSV 活性の評価	42
第一節 <i>In vitro</i> における MFPT の抗 HSV 活性の評価	42
第二節 <i>In vivo</i> における MFPT の抗 HSV 活性の評価	44
第三節 考察	49
第三章 ポリエチレンイミン SP-012 の抗 HSV 活性の評価	51
第一節 <i>In vitro</i> における SP-012 の抗 HSV 活性の評価	51
第二節 SP-012 の抗 HSV 作用標的の検討	53
第三節 HSV 感染動物モデルにおける SP-012 の治療効果	58
第四節 考察	61
結論	64
実験の部	65
参考文献	78
謝辞	84

序 論

医療が発展した今日においても、依然として感染症が世界中で大きな問題となっている。感染症の中でも特にインフルエンザは、流行を繰り返して多くの人が罹患する重大なウイルス感染症である。毎年世界中で 3~5 億人が罹患し、25~50 万人もの人々が死亡している [1]。2009 年に発生したブタ由来新型インフルエンザウイルス [世界保健機関 (World Health Organization; WHO) により A(H1N1)pdm09 と表記] によるパンデミックはまだ記憶に新しいが、その後もトリインフルエンザウイルスのヒトへの感染例が相次いで報告されているなど、新たなパンデミックの発生が懸念されている。

インフルエンザウイルスは、オルソミキソウイルス科 (*Orthomyxoviridae*) に属するウイルスで、内部タンパク質の抗原性の違いにより A、B 及び C 型に分類される。また、ヒトへの影響は不明なもの、最近では C 型インフルエンザウイルスとの相同性が 50% しかない D 型インフルエンザウイルスも確認された [2-4]。これらの中で、A 型インフルエンザウイルス (influenza A virus; IAV) は宿主域が非常に広く、1918 年のスペイン風邪を初めとし過去 4 回のパンデミックを引き起こしていることから [5]、最も注意すべきウイルスである。B 型インフルエンザウイルスは季節性インフルエンザの起因ウイルスの 1 つとして知られてはいるが、その宿主域は狭いため、パンデミックを起こす危険性は低い。また、C 型インフルエンザウイルスに感染するケースは稀である。

IAV のゲノムは 8 分節の一本鎖マイナスセンス RNA から成る。各分節は長い順に PB2 (polymerase basic 2), PB1 (polymerase basic 1), PA (polymerase acid), HA (hemagglutinin), NP (nucleo-protein), NA (neuraminidase), M (matrix protein), NS (nonstructural protein) と呼ばれ、それぞれ 1 個または 2 個のタンパク質遺伝子をコードしている。ウイルス粒子の模式図及び個々のタンパク質の特徴を、それぞれ Fig. 1 及び Table 1 に示した [6]。IAV の遺伝子産物の中でも HA と NA はウイルス抗原として特に重要であり、HA には 17 種類の亜型 (H1~H17), NA には 10 種類の亜型 (N1~N10) がそれぞれ存在する。HA と NA の組み合わせによりさらに多数の亜型が存在し、それらのほとんどが野生の水鳥に保有されていると考えられている [5]。現在、ヒトの間で流行している季節性インフルエンザウイルスは、A(H1N1)pdm09, A(H3N2) 及び B 型ウイルスである。

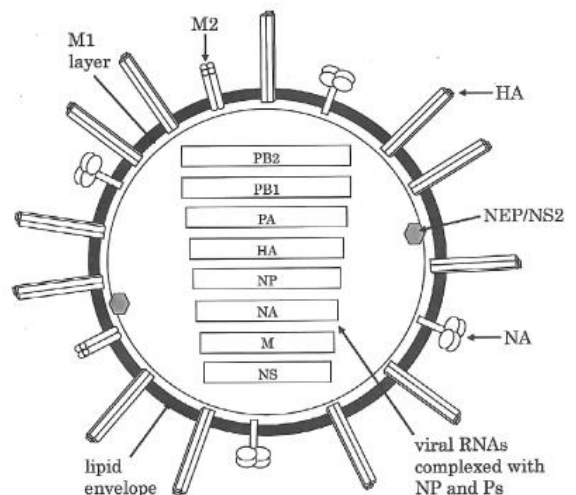


Fig. 1. Schematic diagram of an IAV particle [6]

Table 1. Characteristics of IAV proteins [6]

Protein	Total length (aa)	Major characteristics
PB2	759	component of RNA polymerase, cap recognition
PB1	757	component of RNA polymerase, elongation
PB1-F2 ^{*1}	90	pro-apoptotic activity, IFN antagonist
PA	716	component of RNA polymerase, endonuclease activity, protease
HA	566	surface glycoprotein, receptor binding, fusion activity, major antigen, assembly and budding
NP	498	RNA binding, RNA synthesis, RNA nuclear import
NA	453	surface glycoprotein, neuraminidase activity
M1	252	matrix protein, interactions with vRNPs and glycoproteins, vRNP nuclear export, assembly and budding
M2	97	membrane protein, ion channel activity, assembly and budding
NS1	230	multi-functional protein, IFN antagonist activity
NEP/NS2	121	vRNP nuclear export, regulation of RNA synthesis

aa: amino acid, IFN: interferon, vRNP (viral ribonucleoprotein): complex of a viral RNA segment, polymerase complex (PB2, PB1, PA) and NP

^{*1} Since PB1-F2 of A(H1N1)pdm09 virus is truncated, this viral PB1-F2 does not seem to be functioning [7].

季節性インフルエンザだけでなく、トリインフルエンザウイルスのヒトへの感染例の報告が後を絶たないことから、憂慮すべき問題となっている。特に、高病原性 (highly pathogenic avian influenza: HPAI) の A(H5N1) ウイルスは、非常に高い死亡率 (53.1%) を示していることから、最も警戒すべきウイルスとなっている [8]。また、2013 年以降、主に中国において 662 例もの A(H7N9) トリインフルエンザウイルスのヒトへの感染例が報告されており、大きな問題となっている。現時点では、哺乳類で増殖効率が良好となる新たな変異は A(H7N9) ウイルスには確認されていないが、高い死亡率 (39.6%) と報告頻度の高さから警戒すべきウイルスの 1 つと考えられる [9]。さらに、2014 ~ 2015 年にかけて、A(H5N6) 及び A(H9N2) トリインフルエンザウイルスのヒトへの感染例も報告されている [9]。このように、トリインフルエンザウイルスのヒトへの感染例が増加していることから、トリインフルエンザウイルスによるパンデミックもまた懸念される。

現在、日本国内では 6 種類の抗インフルエンザウイルス薬の使用が認可されている。IAV の M2 イオンチャネルを阻害するシンメトレル (一般名: アマンタジン塩酸塩, Fig. 2A), A 型及び B 型インフルエンザウイルスの NA を阻害し、ウイルスが細胞から細胞へと伝播するのを防ぐタミフル (一般名: オセルタミビルリン酸塩, Fig. 2B), リレンザ (一般名: ザナミビル水和物, Fig. 2C), ラピアクタ (一般名: ペラミビル水和物, Fig. 2D), イナビル (一般名: ラニナミビルオクタン酸エステル

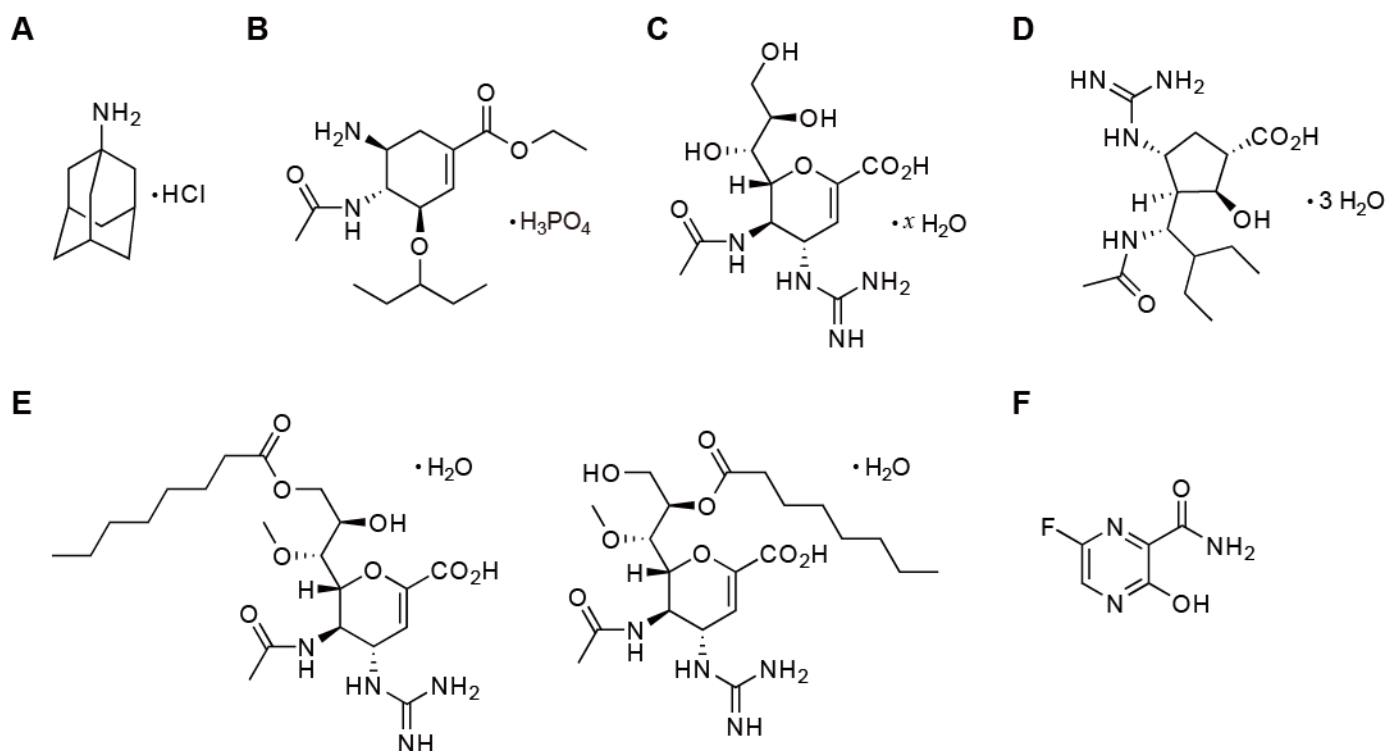


Fig. 2. Structures of amantadine hydrochloride (A), oseltamivir phosphate (B), zanamivir hydrate (C), peramivir hydrate (D), laninamivir octanoate hydrate (E) and favipiravir (F)

水和物, Fig. 2E) と、ウイルスの RNA ポリメラーゼを阻害するアビガン (一般名: ファビピラビル, Fig. 2F) である。現在では、流行しているほとんど全ての IAV がアマンタジン塩酸塩に対する感受性が低下する変異を獲得していることから、NA 阻害薬が第一選択薬として使用されている [1]。しかしながら、NA 阻害薬にも、発症後 48 時間以内の投与が望ましいとされているため、治療開始が遅れると十分な効果が得られないという欠点がある。また、ウイルスの RNA ポリメラーゼを阻害するという新しい作用機序を有したファビピラビル (Fig. 2F) が 2014 年 3 月に日本において製造販売が承認されたが、その催奇形性の可能性から「新型又は再興型インフルエンザウイルス感染症 (ただし、他の抗インフルエンザウイルス薬が無効又は効果不十分なものに限る)」と適応が制限されているため、通常のインフルエンザウイルス感染症に対してこれを使用することはできない [10]。したがって、インフルエンザの治療においては専ら NA 阻害薬が使用されるという状況が続いている。

抗インフルエンザウイルス薬は、その多くがウイルス特異的タンパク質 (酵素) を阻害することによってウイルスの増殖過程を抑制することから、耐性ウイルスの出現は避けられない。特にインフルエンザウイルスは RNA ウイルスでありその変異速度は極めて早いため [11]、耐性変異株が容易に出現すると考えられる。2009 年に発生したパンデミック以降、日本における A(H1N1)pdm09, A(H3N2) 及び B 型ウイルスのオセルタミビル・ペラミビル交叉耐性株の割合はそれぞれ 0~4.1%, 0~0.7% 及び 0% となっていて、幸いなことに低い割合が続いている [12]。しかし、2013/2014 シ

一ズンに、北海道で短期間に 6 検体の耐性株の報告 (いずれの検体も、NA 阻害薬が投与されたことのない患者から分離されたもの) が相次いだことを考慮すると [13], いつ耐性株が蔓延しても不思議ではない。耐性ウイルスの監視は世界的にも行われており、2013 年 3 月 ~ 2014 年 3 月において、総解析数の約 2% のインフルエンザウイルスが少なくともいずれかの NA 阻害薬に対する感受性の低下を示したことが報告されている [14]。抗インフルエンザウイルス薬は紛れもなく有効な治療薬ではあるが、このまま使用を続ければ耐性ウイルスが増加していくことが予想されることから、インフルエンザの薬物治療には限界が見えつつある。

薬物治療とは別に、ワクチンの予防接種がインフルエンザ対策のもう 1 つの大きな柱である。近年のインフルエンザの流行の状況から、米国よりも 2 シーズン遅れたものの、本邦でも 2015/2016 シーズンから 4 価のインフルエンザ HA ワクチン (A(H1N1)pdm09, A(H3N2), B/Yamagata 系統及び B/Victoria 系統のそれぞれの HA を混合したワクチン) を導入することとなり [15], 効果の向上が期待される。しかしながら、現在日本で認可されているインフルエンザ HA ワクチンは、インフルエンザウイルスの表面抗原 (HA) に対する抗体の産生を目的としているため、流行を予測して選定されたワクチン株と実際に流行したウイルスが一致しない、あるいは実際に流行したウイルスがワクチン株と似ていたとしてもその表面抗原が変異していた場合には、ワクチン接種によって作られた抗体が有効に作用しない可能性がある。また、従来行われている皮下・皮内あるいは筋肉内注射によるワクチン接種では、血清中に抗原特異的 IgG を産生させることを主体とした全身性免疫応答を誘導する能力は高いが、初発感染防御を担うとされる抗原特異的分泌型 IgA を産生させることを主体とした粘膜免疫応答を誘導する能力には乏しい。したがって、ワクチンの接種により肺炎等の重症化を防ぐことはできても、粘膜組織での感染自体を防御することは困難である [16]。

また、インフルエンザ HA ワクチンは、その製造方法にも問題点がある。すなわち、発育鶏卵を用いてインフルエンザウイルスを増殖させる従来の方法では生産性が悪いため、パンデミック発生時に迅速に対応できない。このことは、2009 年にパンデミックが起きた時、国内でのワクチン生産が間に合わず、海外からの輸入に依存したことから明らかである。そこで、日本でも従来法とは異なる鶏卵を使わない新しい製造方法を採用したワクチンの開発が進められている。例えば、ウイルスを細胞に感染させて、増殖後に抗原となる HA を精製して製造するワクチンが製造販売承認されている。他にも、HA 遺伝子を組み込んだバキュロウイルスを昆虫細胞に感染させて、発現した HA を用いて製造するワクチンの製造販売承認の申請が行われている。これらの製造方法によりワクチンを迅速かつ大量に製造することができるとされているが、接種方法が従来ワクチンと同じであるため、これらのワクチンもウイルスの感染自体を防ぐことは難しいという欠点を抱えている。

これらの諸問題を克服するために、経鼻吸収型ワクチンの研究・開発が世界各国で進められている。経鼻吸収型ワクチンは、インフルエンザウイルスが感染する粘膜組織に抗原を接種するため、局所での抗原特異的分泌型 IgA の産生誘導が効率よく行われる。また、局所のみならず、血清中の

抗体価の上昇やさらには細胞性免疫の誘導も可能であることから [17], 従来の接種ルートよりも感染防御能が高いと考えられる。経鼻吸収型ワクチンは, 米国ではアメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration; FDA) が, EU (欧州連合) では欧州医薬品庁 (European Medicines Agency; EMA) が, 経鼻吸収型の弱毒生ワクチンである FluMist 及び Fluenz の使用をそれぞれ許可している。しかし, 小児では不活化ワクチンよりも効果があるものの, 成人に対しては効果が弱く, また 2 歳未満の乳幼児に接種すると入院のリスクや喘鳴が増加することから, 米国では 2~49 歳, EU では 2~18 歳と, それぞれ年齢制限が設けられている [17,18]。また, 日本では一部臨床試験が進んでいるものの, 今のところ承認されている経鼻吸収型ワクチンは存在しない。したがって, 現在許可を受けている FluMist も効果や安全性で改良の余地があり, 後続する同種のワクチンがないことから, 経鼻吸収型ワクチンのさらなる開発が必要と考えられる。

その他のウイルス感染症に目を向けると, ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus; HIV) の蔓延も問題となっている。WHO によると, 2014 年には約 200 万人が新たに HIV に感染し, 2014 年末の時点で約 3,690 万人が HIV に感染していると推定されている [19]。また, HIV の感染リスクは単純ヘルペスウイルス 2 型 (herpes simplex virus type-2; HSV-2) に感染した患者において約 3 倍増加すると報告されていることから [20], HSV-2 の増殖抑制が HIV 感染のリスクを低下させる 1 つの方策として有効であると考えられている [21]。

単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus; HSV) はヘルペスウイルス科 (*Herpesviridae*) アルファヘルペスウイルス亜科 (*Alphaherpesvirinae*) に属するヒトヘルペスウイルスで, 血清型の違いから 1 型 (HSV-1) と 2 型 (HSV-2) に分類される。HSV-1 は主に口唇ヘルペス, HSV-2 は主に性器ヘルペスの起因ウイルスとして知られているが, その棲み分けは厳密ではなく, 近年では HSV-1 による性器ヘルペスも増加している [22]。HSV-1 及び HSV-2 のゲノムはいずれも二本鎖 DNA で, そのサイズはそれぞれ約 152 kbp (base pair) 及び約 155 kbp であり, open reading frame (ORF) はいずれも 80 以上存在する [23]。また, HSV-1 と HSV-2 のゲノム全体の相同性は, 一部例外はあるものの約 83% である [24]。HSV のウイルス粒子の構造は, ゲノム DNA を含む中心部のコアの周りを正二十面体のカプシドが囲み, カプシドとエンペロープの間にはテグメントと呼ばれる空間がある。一番外側のエンペロープには 10 種類以上の糖タンパク質が存在し, 細胞表面にあるレセプターへの吸着などに関わる (Fig. 3) [23]。

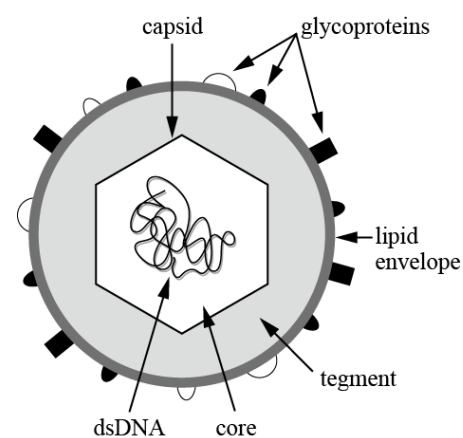


Fig. 3. Schematic diagram of an HSV particle [23]

HSV の特徴として, 一度感染すると生涯にわたり潜伏感染することが挙げられる。HSV は初感染した組織において増殖し, 軸索の末端と融合することで知覚神経細胞に侵入し, ヌクレオカプシ

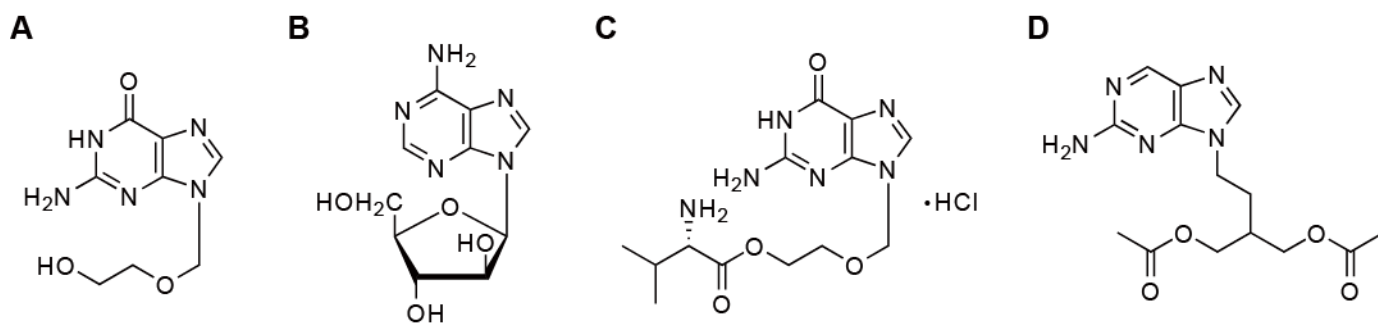


Fig. 4. Structure of aciclovir (A), vidarabine (B), valaciclovir hydrochloride (C) and famciclovir (D)

ド (ウイルス DNA を含んだカプシド) が神経細胞の細胞体にある核に輸送され、そこで潜伏感染する [23]。感染部位によって潜伏感染する神経節は異なり、HSV が口腔周辺に感染した場合は三叉神経節に、性器周辺に感染した場合は仙骨神経節にそれぞれ潜伏感染する。潜伏感染している間は、非翻訳 RNA の LATs (latency-associated transcripts) は大量に発現しているが増殖性のウイルスは検出されない。そして、潜伏感染したウイルスは定期的にもしくはストレス等の刺激によって再活性化されて、初感染した部位やその近傍に運ばれて回帰発症する [23]。HSV-2 の再活性化は無症状の場合であってもしばしば性器分泌物にウイルスが排泄されるため [25]、これが若年層を中心とした性感染症の拡大を助長していると考えられる。

日本で使用が許可されている抗ヘルペスウイルス (単純疱疹) 薬は、医療用医薬品としてゾビラックス (一般名: アシクロビル, Fig. 4A), アラセナ-A (一般名: ビダラビン, Fig. 4B), バルトレックス (一般名: バラシクロビル塩酸塩, Fig. 4C), ファムビル (一般名: ファムシクロビル, Fig. 4D) がある。また、口唇ヘルペスの再発治療を目的とした、アシクロビルもしくはビダラビンを含んだ一般用医薬品も市販されている。いずれの薬剤も全て核酸アナログであり、その作用機序はウイルス特異的 DNA ポリメラーゼ活性の阻害によるウイルス DNA 鎖の複製停止である。また、新たな治療薬の候補として、ウイルス DNA 合成に必須であるヘリカーゼ・プライマーゼ複合体を阻害する ASP2151 (アメナメビル) が、2015 年現在日本で第 III 相臨床試験中である。抗ヘルペスウイルス (単純疱疹) 薬はウイルスに特異的に作用するが、既に潜伏感染しているウイルスには全く効果を示さない。さらに、免疫機能が低下している患者には長期連用が必要であるため、薬剤耐性ウイルスを誘導する可能性がある。実際、薬剤耐性ウイルスは免疫機能が正常な患者よりも免疫機能が低下した患者から検出される割合が高いことが報告されている [26]。また、宿主の免疫機能に依らず耐性ウイルスも潜伏感染や再活性化を起こすことから [27,28]、開発中の ASP2151 以外にも新たな治療薬、もしくは治療戦略が必要と考えられる。

インフルエンザウイルス感染症とは異なり、現時点で HSV 感染症に対する有効なワクチンは開発されてない。しかしながら、(1) 複製能力を有する生ワクチン、(2) 複製能力がなく、かつ潜伏感染を起こさない生ワクチン、(3) 不活化ワクチン、(4) 弱毒生ワクチン、(5) 組換え糖タンパク質を使ったサブユニットワクチン、(6) ペプチドワクチン、(7) DNA ワクチン、(8) アデノウイルスなど

を使ったベクターワクチンなど様々な HSV ワクチンの研究、あるいは開発が進められており、既に海外では過去 5 年間で 40 種類以上のワクチン候補について前臨床試験が行われ、そのうちの 4 種類が現在第 I 相または第 II 相臨床試験中である [29]。しかし、ワクチン接種により回帰発症時の症状を抑制することができても、初感染、さらには潜伏感染を防ぐことが可能な HSV ワクチンの開発は非常に困難である。したがって、ワクチン接種による HSV の感染制御には、まだまだ時間を要すると考えられる。

上述したように、IAV と HSV のいずれに対して、既存の抗ウイルス薬やワクチンに頼るだけでは新たな感染症の局面に対応することは難しくなっている。このような状況の中、著者の所属する研究室で行われたスクリーニング試験で、放線菌 *Streptomyces* sp. strain FV60 から単離されたスフィドロフラン誘導体 (1*R*,2*R*)-1-(5'-methylful-3'-yl)propane-1,2,3-triol (MFPT) が、*in vitro* において HSV-1 の増殖阻害効果を示すことが報告された [30]。この MFPT は放線菌によって作られる二次代謝物の 1 つで、スフィドロフランが酸性条件下で開環し、生成する安定したフラン誘導体であることが 1971 年に報告されている (Fig. 5) [31]。

MFPT は、培養細胞を用いた *in vitro* 評価系では抗 IAV 活性は強くなかったものの、本物質で IAV を処理 (MFPT 存在下で継代培養) すると、IAV のマウスに対する病原性が低下することがわかった。また、継代して得られたウイルスの増殖も良好であったことから、これを応用することによって簡単かつ短期間で弱毒生ワクチンを得ることが可能であることが示唆された。したがって、本研究では MFPT 処理による IAV の病原性低下メカニズムの解明を目的の 1 つとした。また、MFPT の抗 HSV-1 活性をこれまで *in vitro* 評価系でしか検討していなかったことと、HSV-2 による感染症の重大性を踏まえて、MFPT の *in vivo* における抗 HSV-1 活性と、抗 HSV-2 活性 (*in vitro* 及び *in vivo*) の評価も本研究の目的の 1 つとした。

ポリエチレンイミン (polyethylenimine; PEI) はエチレンイミンが重合した非常に強いカチオン性を示す水溶性ポリマーであり、強い DNA 結合能と特殊な分子構造を有することから、最も効率の良い遺伝子キャリアーとして広く受け入れられている [32,33]。PEI の 1 つである *N,N*-dodecyl, methyl-PEI をガラススライドやラテックス製コンドームにコーティングしておくと、それぞれがインフルエンザウイルスや HSV を不活化することが報告されている [34,35]。この他にも、PEI は HIV-1 が細胞に結合するのを抑制することや [36]、別の直鎖状の PEI は *in vitro* においてヒトパピローマウイルスやサイトメガロウイルスに対して抗ウイルス活性を示すことが報告されている [37]。しかしながら、動物モデルを用いた PEI の抗ヘルペスウイルス活性はこれまで報告されていない。

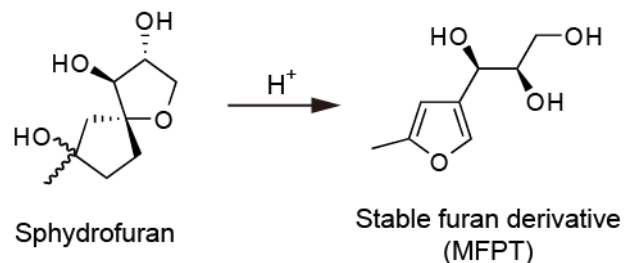


Fig. 5. MFPT was obtained by acid treatment of sphydrofuran isolated from *Streptomyces* [31].

HSV のエンベロープには糖タンパク質が存在し、この糖タンパク質には負電荷を帯びた側鎖を有するアミノ酸が含まれていることから、正電荷を帯びた PEI が糖タンパク質と相互作用することによって HSV を抑制する可能性が考えられた。そこで本研究では、Epomin SP-012[®] という、一級アミン、二級アミン、三級アミンを様々なレベルで含んでいる分岐型 PEI (Fig. 6) の *in vitro* 及び *in vivo* における抗 HSV 活性について評価することにした。

本研究は、著者が研究材料である MFPT と SP-012 を使って、ウイルス感染症に苦しむ多くの人々の一助となることを大きな目的として取り組んだものである。

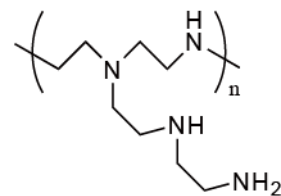


Fig. 6. Structure of a PEI, Epomin SP-012

本 論

第一章 MFPT による IAV の病原性低下メカニズムの解明

第一節 MFPT 耐性ウイルスの作製及び *in vitro* における増殖能の評価

予備実験の結果、IAV を MFPT 存在下で 10 回継代培養するとマウスに対する病原性が低下することがわかった。この結果を参考に、著者も同様に IAV を MFPT 存在下で 10 回継代培養し、MFPT 耐性ウイルスの作製を試みた。

MDCK 細胞に NWS 株 [A/NWS/33 (H1N1)] を感染後、終濃度が 2 mM になるように MFPT を加えた培地で 24 時間培養し、その培養上清を P1 ウイルス液とした。新たに調製した MDCK 細胞に、P1 ウイルス液の 10 倍希釈液を加えて感染させた後、先と同様に終濃度が 2 mM になるように MFPT を加えた培地で 24 時間培養し、その培養上清を P2 ウイルス液とした。この操作を最終的に計 10 回繰り返す、MFPT 存在下で 10 代培養したウイルス液 (P10) を得た。P10 ウイルス液から、plaque purification 法により顕微鏡下でプラークを 1 個ずつ採取することによって、20 個のウイルスクローンを得た。そのうちの 10 クローン (cl.1 ~ cl.10) をそれぞれ MDCK 細胞に感染させて、増殖させた後、培養上清を保存し、これをウイルスストック液とした。各クローンのストック液のウイルス量は、MDCK 細胞を用いたプラークアッセイ法により定量した。これ以降は、これらのクローンの中でも主に cl.1 を用いて MFPT 耐性ウイルス (MFPT-resistant virus; MFPT^r virus) の特性について調べた。

得られた MFPT 耐性ウイルスの *in vitro* における増殖能を調べるために、親株である A/NWS/33 (H1N1) を野生型 (WT) ウイルス (wild type virus; WT virus) として、WT ウイルス及び MFPT 耐性ウイルスについて、それぞれのプラークサイズ及び MDCK 細胞における子孫ウイルス放出量を比較した。

プラークサイズの比較には、MDCK 細胞と同時に、AX-4 細胞も宿主細胞として用いた。AX-4 細胞は、human β -galactoside α -2,6-sialyltransferase I がコードされた ST6Gal-I 遺伝子を含んだプラスミドで形質転換した MDCK 細胞で、IAV が吸着する細胞表面レセプターが高発現している細胞である [38,39]。すなわち、AX-4 細胞は MDCK 細胞よりも IAV の感受性が高い細胞株である。

MDCK 細胞または AX-4 細胞に、WT ウイルスまたは MFPT 耐性ウイルス (cl.1) をそれぞれ感染させた後、寒天培地を重層して、37 °C で 72 時間インキュベートした。寒天培地を除去後、クリスタルバイオレットにより生細胞を染色し、プラークの形態を撮影した。

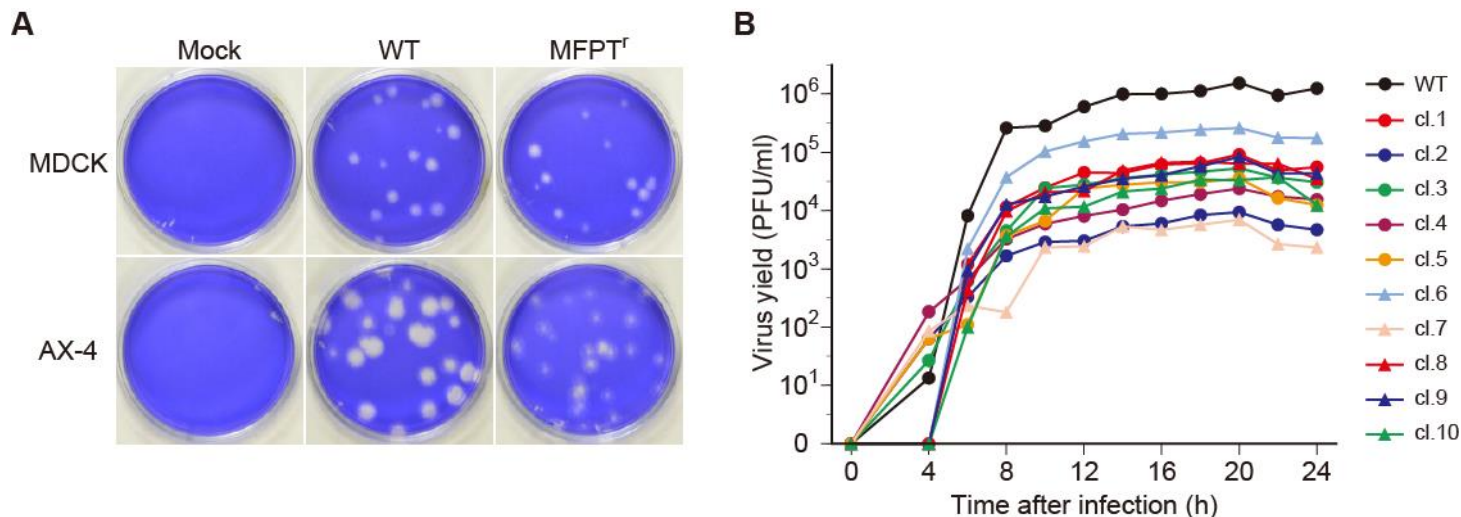


Fig. 7. (A) Plaque phenotypes of the WT virus and MFPT^r virus (cl.1) were characterized in MDCK and AX-4 cells. (B) Growth kinetics of the WT virus and MFPT^r viruses in MDCK cells. Data were expressed as the mean of triplicate assays.

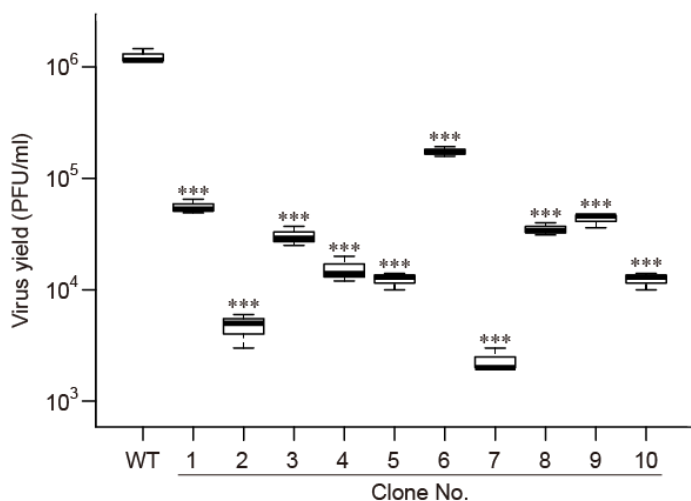


Fig. 8. Virus yields of the WT virus and MFPT^r viruses at 24 h post-infection. *** $p < 0.001$ vs. WT virus.

MDCK 細胞において cl.1 が形成したプラークサイズは WT ウイルスのものよりもわずかに小さかった。一方、AX-4 細胞で増殖させた場合、cl.1 は、WT ウイルスが形成したプラークよりも明らかに小さいプラークを形成した (Fig. 7A)。プラークの大きさはウイルスの増殖能を表す指標の 1 つであることから、この結果より cl.1 は WT ウイルスよりも増殖能が低下していることが推察された。

また、WT ウイルスと MFPT 耐性ウイルス (cl.1 ~ cl.10) を 1 PFU (plaque-forming unit)/cell で MDCK 細胞に感染させ、その時の培養上清中に放出された子孫ウイルス量を 24 時間に渡って経時的に定量したところ、MFPT 耐性ウイルスは WT ウイルスと比べて子孫ウイルスの放出量が減少していた (Fig. 7B)。感染 24 時間後における子孫ウイルスの放出量を比較すると、WT ウイルスでは 1.24×10^6 PFU/ml だったのに対して、cl.1 は 5.56×10^4 PFU/ml であり、有意な減少が見られた (Fig. 8)。他の MFPT 耐性ウイルスも、クローン間で差は見られたものの、cl.1 と同様に子孫ウイルスの放出量が有意に減少していた (Fig. 8)。

以上の結果から、MFPT 耐性ウイルスは *in vitro* において増殖能が低下していることが確認された。

第二節 *In vivo* における MFPT 耐性ウイルスの病原性の評価

IAV を MFPT 存在下で 10 回継代培養するとマウスに対する病原性が低下することが予備実験により示されていたことから、今回作製した MFPT 耐性ウイルスも同様に *in vivo* においてその病原性が低下している可能性が推測された。そこで、マウス感染モデルを用いて、WT ウイルスと MFPT 耐性ウイルスの病原性について調べた。

IAV の病原性を確かめるために、WT ウイルスまたは MFPT 耐性ウイルス (cl.1 ~ cl.7) を同一ウイルス量に調製後、麻酔処置した BALB/c マウスに経鼻接種した (1×10^5 PFU/50 μ l/mouse, n=10)。各群の半数のマウスから感染 3 日後に肺及び気管・気管支洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluids; BALF) を採取し、プラークアッセイによりウイルス量を測定した。残りの半数のマウスについては、IAV 感染による発症の程度の指標となるマウスの体重及び死亡例を、感染 14 日後まで記録した。

その結果、WT ウイルス接種群は感染 9 日後に最大で 36% の体重減少が観察された。一方、cl.1 接種群では感染 8 日後に最大で 20% 程度の体重減少であった。また、観察期間を通じて WT ウイルス接種群よりも体重減少が抑制された (Fig. 9A)。また、他の MFPT 耐性ウイルスを接種した群でも、cl.1 接種群と同程度の体重減少を示した。さらに、WT ウイルス接種群では死亡率が 60% だったのに対し、cl.1 接種群では死亡例が確認されなかった (Fig. 9B)。他のクローンでもほぼ同様の病原性の低下が観察されたが、cl.4 接種群のみは、死亡率が 20% (5 匹中 1 匹死亡) となり、WT ウイルス接種群とその他の MFPT 耐性ウイルス接種群との中間的な病原性を示した。なお、感染 15 日後以降は、いずれの群においても死亡例は観察されなかった。

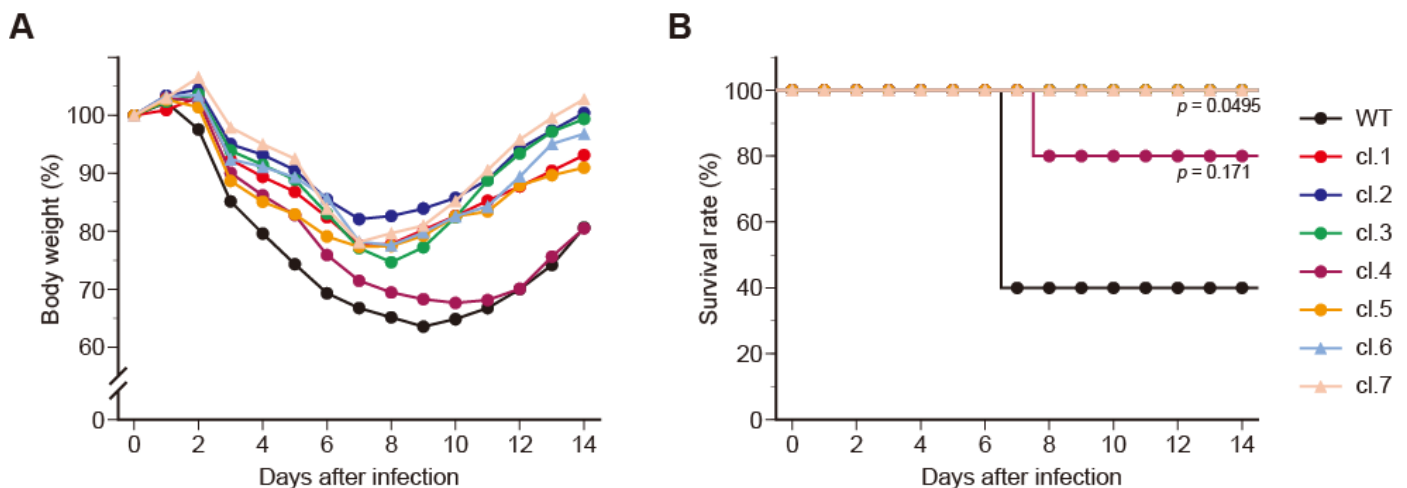


Fig. 9. (A) Body weight changes of mice infected with the WT virus or MFPT^r virus. Data were expressed as the mean. (B) Survival rates of mice infected with the WT virus or MFPT^r virus.

感染 3 日後における肺及び BALF のウイルス量を測定した結果、いずれの部位においても cl.1 接種群では WT ウイルス接種群よりもウイルス量が減少していた (Fig. 10)。他の MFPT 耐性ウイルス接種群でも、cl.1 と同様に各部位でウイルス量が減少していた。しかしながら、cl.2 接種群のみ、BALF 中のウイルス量は増加していた (Fig. 10B)。

以上の結果から、クローン間で若干の差は見られたものの、MFPT 耐性ウイルスは、マウスに対する病原性が低下していて、弱毒化していることが確認された。そして、この病原性の低下は、宿主細胞における増殖能の低下を反映しているものと推察された。

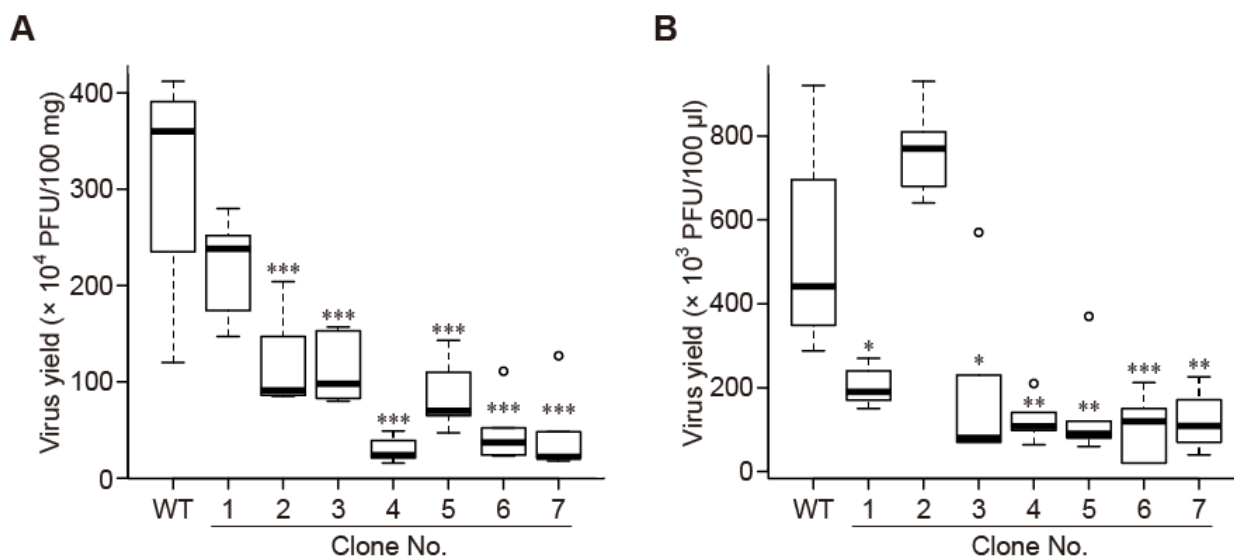


Fig. 10. Virus yields in the lungs (A) and BALF (B) of the WT virus and MFPT^r viruses determined at 3 days post-infection. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. WT virus.

マウスに対する病原性が低下していたことから、MFPT 耐性ウイルスは弱毒生ワクチンとして利用できる可能性が示唆された。そこでさらに、ワクチンとしての機能を検証するために、MFPT 耐性ウイルスの前接種によってその後の致死量のウイルス接種にマウスが耐えられるかどうかを調べることにした。

上述の実験で生存したマウス (Fig. 9B) に、初感染から 32 日後に致死量の WT ウイルス (1.0×10^6 PFU/50 μl/mouse) を麻酔下で経鼻接種した。同時に、比較対象として IAV に未感染のマウス (n=3) を新たに追加して、同量のウイルスを接種した。その後、再感染 14 日後まで、マウスの体重及び死亡例を記録した。

その結果、既に WT ウイルスまたは MFPT 耐性ウイルスを接種されていたマウスでは、致死量のウイルスを接種しても体重減少は見られなかった。その一方で、ウイルスの前接種がなかった対照群では、致死量のウイルス接種後に体重が徐々に減少し、感染 8 日後には 66% まで体重が減少し、感染 9 日後には全例が死亡した (Fig. 11A)。このことから、MFPT 耐性ウイルスの前接種により、WT ウイルスの再感染による症状を顕著に緩和することが確認された。

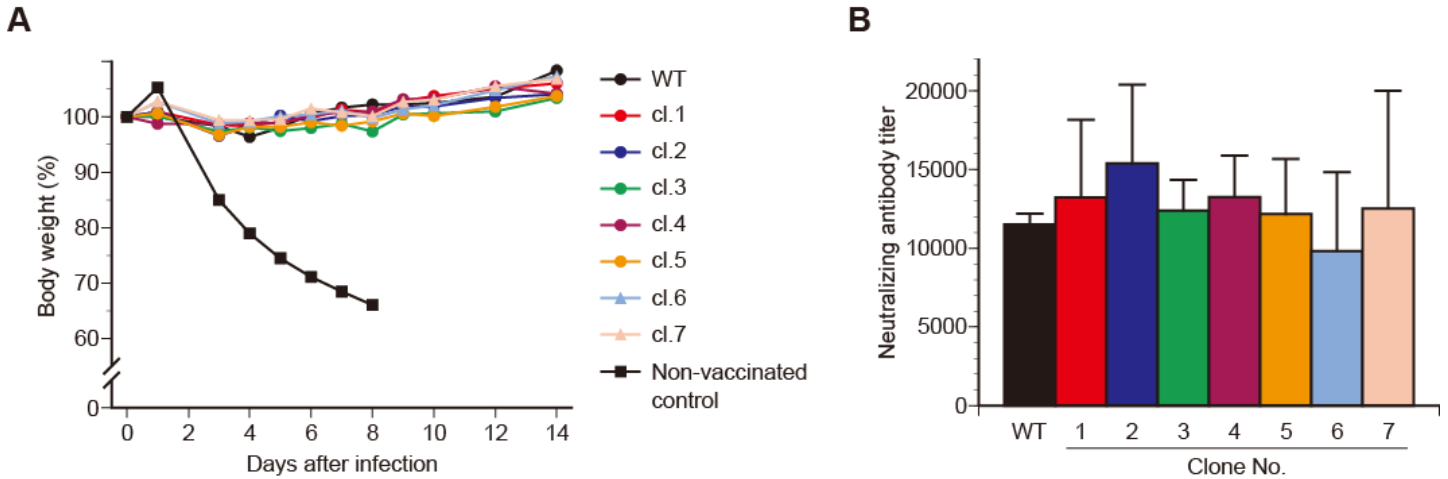


Fig. 11. (A) Body weight changes of mice re-challenged with the WT virus in the lethal condition. The WT virus or MFPT^r virus-inoculated mice were infected with the WT virus (1.0×10^6 PFU). In addition, non-vaccinated control mice (n=3) were also treated under the same condition. Data were expressed as the mean. (B) Neutralizing antibody titer against the WT virus in sera from the WT virus or MFPT^r virus-inoculated mice at 3 weeks post-infection. Data were expressed as the mean \pm SD.

また、今回の再感染を実施する前に、感染 3 週間後のマウスの尾静脈から血清を得て、WT ウイルスに対する中和抗体価を測定したところ、MFPT 耐性ウイルス接種群は WT ウイルス接種群に匹敵する中和抗体価に達していた (Fig. 11B)。このような中和抗体価の上昇が、ウイルス再感染時における感染防御に寄与したと考えられる。

以上の結果から、MFPT 耐性ウイルスは、マウスに対する病原性の低下を示しながら、一方では WT ウイルスに匹敵する免疫誘導能を維持していたことから、弱毒生ワクチンとして利用できる条件を備えていると考えられた。

第三節 MFPT 耐性ウイルスの変異部位の解析

これまでの結果から、MFPT 耐性ウイルスにはそのゲノムに増殖能の低下に関わる何らかの変異が導入されている可能性が考えられた。そこで、IAV 臨床分離株の変異部位の特定法として用いられているダイレクトシーケンス法を用いて、WT ウイルスと MFPT 耐性ウイルスのゲノムの塩基配列を決定し、変異部位の検出を試みた。

WT ウイルスまたは MFPT 耐性ウイルス (cl.1 ~ cl.10) を MDCK 細胞に感染後、培養上清中の子孫ウイルスからウイルス RNA (viral RNA; vRNA) を得た。得られた vRNA を鋳型に、全セグメントの 3' 末端の非翻訳領域に共通に存在する塩基配列を基に作製したプライマー (Uni12) (Fig. 12) を用いて逆転写し、相補的 DNA (complementary DNA; cDNA) を得た。得られた cDNA を鋳型に、5' 末端にシーケンスタグを付加した各セグメントに特異的な配列を基に設計したプライマー (Table 2) を用いて PCR で増幅後、ダイレクトシーケンス法によって各セグメントの塩基配列を決定した (Fig. 12)。以下、ダイレクトシーケンス法の結果は遺伝子毎に示す。

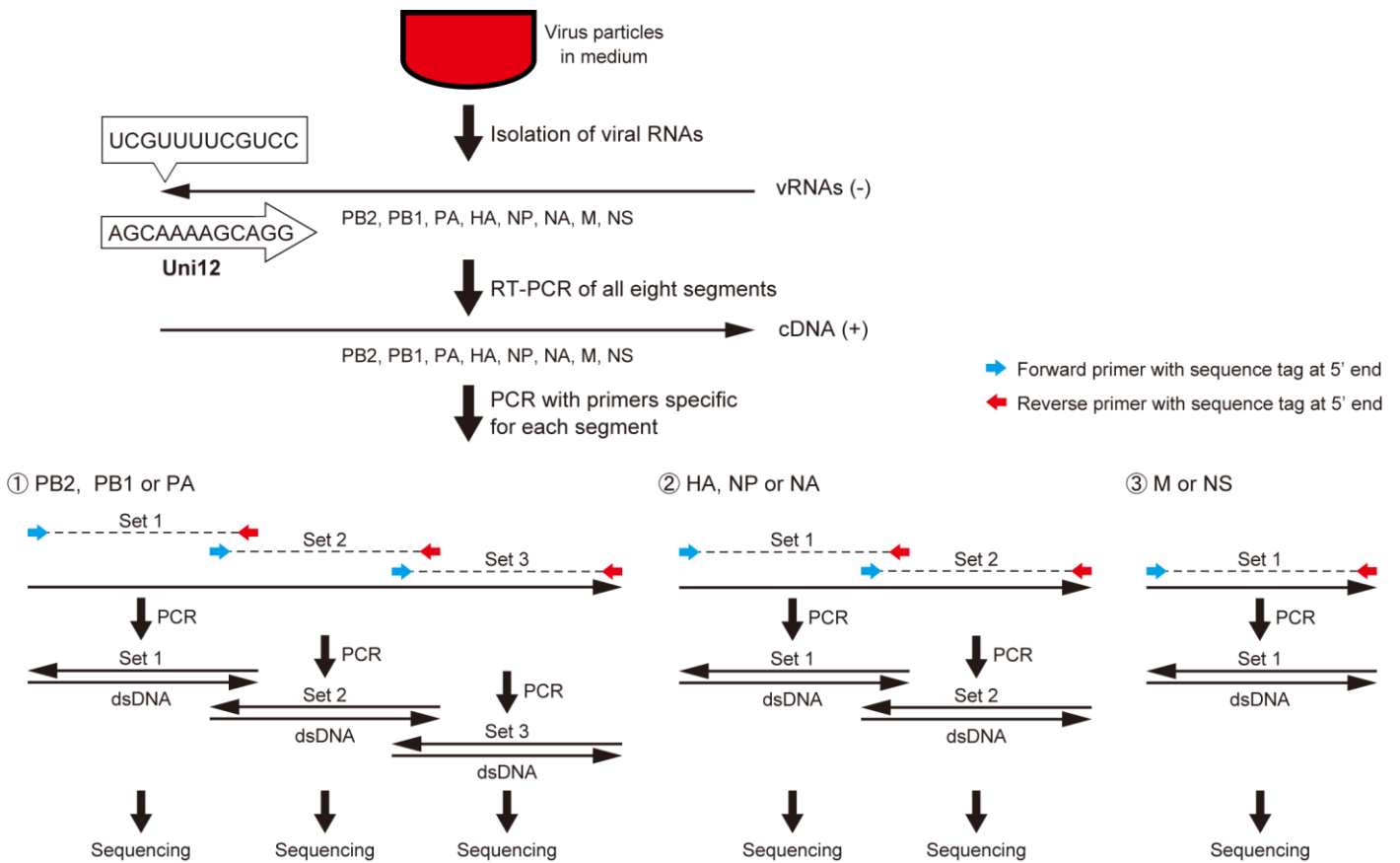


Fig. 12. Schematic representation of direct sequencing of IAV genome. Viral RNAs isolated from virus particles were reverse transcribed to synthesize cDNA using Uni12 primer, and the cDNA was amplified by PCR using segment specific primers. After purification, each PCR product was sequenced [40–42].

Table 2. Primers for direct sequencing of IAV genome

Target gene	Primer set number	Primer name	Primer sequence (5'-3') (S: sense, A: anti sense)
PB2	1	PB2_1F	S: tgtaaacgacggccagtCTCGAGCAAAAGCAGGTCAA
		PB2_816R	A: caggaaacagctatgaccGCTTTGRTCAAYATCRTCATT
	2	PB2_713F	S: tgtaaacgacggccagtCAAGCAGTRTRTACATTGAAGT
		PB2_1509R	A: caggaaacagctatgaccGGARTATTCATCYACMCCCAT
	3	PB2_1447F	S: tgtaaacgacggccagtCCAAGYACMGAGATGTCAATGAGA
		PB2_2341R	A: caggaaacagctatgaccTAGTAGAAACAAGGTCGTT
PB1	1	PB1_22F	S: tgtaaacgacggccagtAGCAAAAGCAGGCAAACCAT
		PB1_843R	A: caggaaacagctatgaccGTTCAAGYTTCTCRCAWATA
	2	PB1_711F	S: tgtaaacgacggccagtTGAACACRATGACCAARGA
		PB1_1566R	A: caggaaacagctatgaccAGCTCCATGCTRAAATTRGC
	3	PB1_1489F	S: tgtaaacgacggccagtATGAGYAAAAAGAAGTCYTA
		PB1_2321R	A: caggaaacagctatgaccAGTAGAAACAAGGCATTT
PA	1	PA0F	S: tgtaaacgacggccagtAGCAAAAGCAGGTACTGAT
		PA989R	A: caggaaacagctatgaccGGTTCYTTCCATCCAAAGAATGTT
	2	PA894F	S: tgtaaacgacggccagtAAATTRAGCATTGARGAYCCA
		PA1662R	A: caggaaacagctatgaccTCWAGTCTYGGGTCAGTGAG
	3	PA1444F	S: tgtaaacgacggccagtAATGCATCCTGTGCAGCAATGGA
		PA2233R	A: caggaaacagctatgaccAGTAGAAACAAGGTACCTTTT
HA	1	HA1F	S: tgtaaacgacggccagtATACGACTAGCAAAAGCAGGGG
		HA943R	A: caggaaacagctatgaccGAAAGGGGAGACTGCTGTTTA
	2	HA736F	S: tgtaaacgacggccagtAGGATGAACTATTACTGGAC
		HA1778R	A: caggaaacagctatgaccGTGTCAGTAGAAACAAGGGTGTTT
NP	1	NP1F	S: tgtaaacgacggccagtCAGGGTAGATAATCACTCAC
		NP1042R	A: caggaaacagctatgaccCTGRCTCTTGTGTGCDGG
	2	NP872F	S: tgtaaacgacggccagtTATTGAGRGGRTCAGTTGCTC
		NP1565R	A: caggaaacagctatgaccAGTAGAAACAAGGGTATTTTC
NA	1	NA1F	S: tgtaaacgacggccagtAGCAAAAGCAGGAGT
		NA1063R	A: caggaaacagctatgaccCATATYTGATGAAAACC
	2	NA536F	S: tgtaaacgacggccagtGGTCAGCAAGCGCATGYCATGA
		NA1452R	A: caggaaacagctatgaccAGTAGAAACAAGGAG

Table 2. Primers for direct sequencing of IAV genome (continued)

Target gene	Primer set number	Primer name	Primer sequence (5'-3') (S: sense, A: anti sense)
M	1	MP1F	S: tgtaaacgacggccagtAGCAAAAGCAGGTAG
		MP1027R	A: caggaaacagctatgaccAGTAGMAACAAGGTAGT
NS	1	NS24F	S: tgtaaacgacggccagtAGCAAAAGCAGGGTGACAAAGACA
		NS890R	A: caggaaacagctatgaccAGTAGAAACAAGGGTGTTTTTTAT

第一項 PB2 のゲノム配列の解析

PB2 遺伝子の全長は 2341 bp で、このセグメントには PB2 がコードされている。ORF は 2280 bp で、タンパク質の全長は 759 アミノ酸残基である (Fig. 13)。PB2 は PB1 及び PA とヘテロ三量体を形成し、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとして機能する。また、PB2 は宿主細胞の pre-mRNA の 5' キャップに結合する機能を持つことから、pre-mRNA を利用することで開始される vRNA の転写の初期段階に関与する [6]。

全クローンの PB2 遺伝子の塩基配列を解析した結果、推定されるアミノ酸配列は Fig. 14 のようになった。WT ウイルスと比較したところ、変異が認められたのは cl.1 (G682C) と cl.5 (K627Q) だけであった。それ以外のクローンに変異は認められなかった。

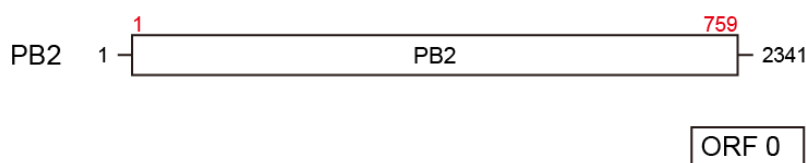


Fig. 13. Schematic illustration of PB2 gene structure of A/NWS/33 (H1N1). RNA segment (positive sense) and its encoded protein (amino acid) were indicated in black and red, respectively. The lines at 5' and 3' termini represent the noncoding region.

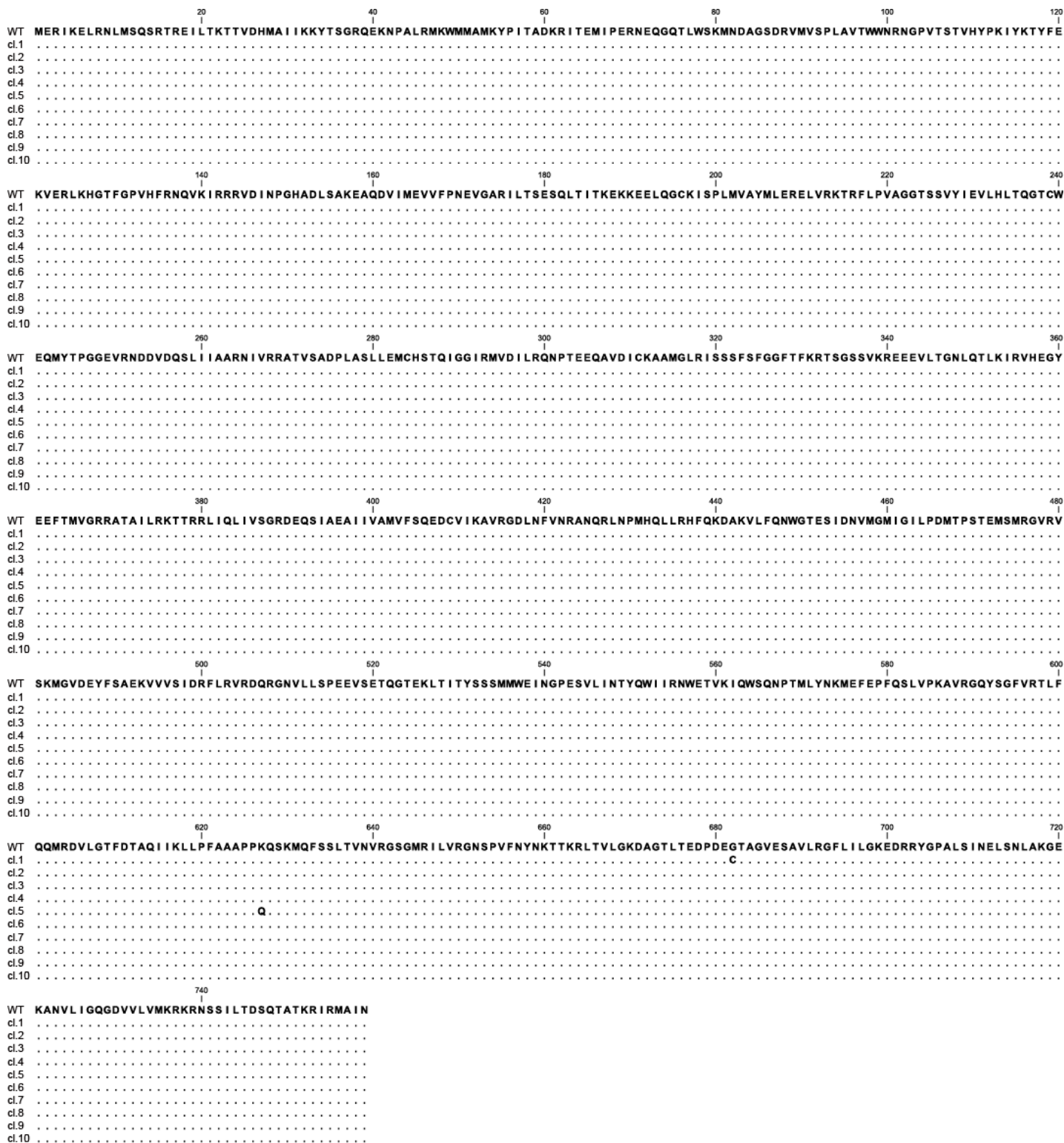


Fig. 14. Alignment of putative amino acid sequence of PB2 in the WT virus and MFPT^r viruses. The identical residues were represented as dots when compared with that of WT virus.

第二項 PB1 のゲノム配列の解析

PB1 遺伝子の全長は 2341 bp で、このセグメントには PB1-F2 及び PB1 がコードされている。PB1-F2 及び PB1 の ORF はそれぞれ 273 bp 及び 2274 bp で、タンパク質の全長はそれぞれ 90 アミノ酸残基及び 757 アミノ酸残基である (Fig. 15)。PB1-F2 は宿主細胞のミトコンドリアに作用することで、感染細胞のアポトーシスを誘導する。一方、PB1 は PB2 及び PA とヘテロ三量体を形成し、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとして機能する。PB1 は、主に転写や複製時の RNA の伸長に関与する [6]。

全クローンの PB1 遺伝子の塩基配列を解析した結果、推定される PB1-F2 及び PB1 のアミノ酸配列はそれぞれ Fig. 16 及び Fig. 17 のようになった。WT ウイルスと比較したところ、PB1-F2 は全てのクローンで変異は認められなかった。一方で PB1 は、WT ウイルスと比較したところ複数の MFPT 耐性ウイルスに変異が認められた。cl.2 には G101S 変異が、cl.3 には K578N 変異が認められた。また、cl.4, cl.5, cl.7 及び cl.8 の 578 番目のアミノ酸残基は、Lys と Asn が混在 (K578K/N) していた。cl.1, cl.6, cl.9 及び cl.10 に変異は認められなかった。

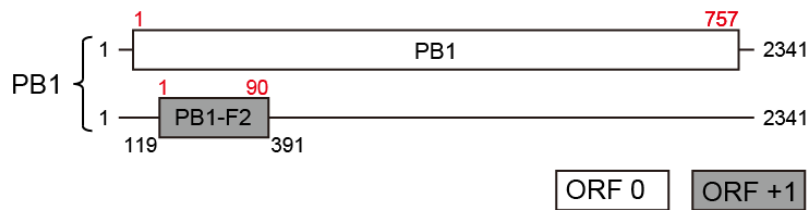


Fig. 15. Schematic illustration of PB1 gene structure of A/NWS/33 (H1N1). RNA segment (positive sense) and its encoded protein (amino acid) were indicated in black and red, respectively. The lines at 5' and 3' termini represent the noncoding region. PB1 segment contains a second ORF in the +1 frame resulting in the PB1-F2 protein.

	20	40	60	80
WT	MGQEQDTPWILSTGHI	STQKGEDGQQTAKLEH	HNSTRLMGHCQKTMNQ	VVMPKQIVYWKQWPSLR
cl.1
cl.2
cl.3
cl.4
cl.5
cl.6
cl.7
cl.8
cl.9
cl.10

Fig. 16. Alignment of putative amino acid sequence of PB1-F2 in the WT virus and MFPT^r viruses. The identical residues were represented as dots when compared with that of WT virus.

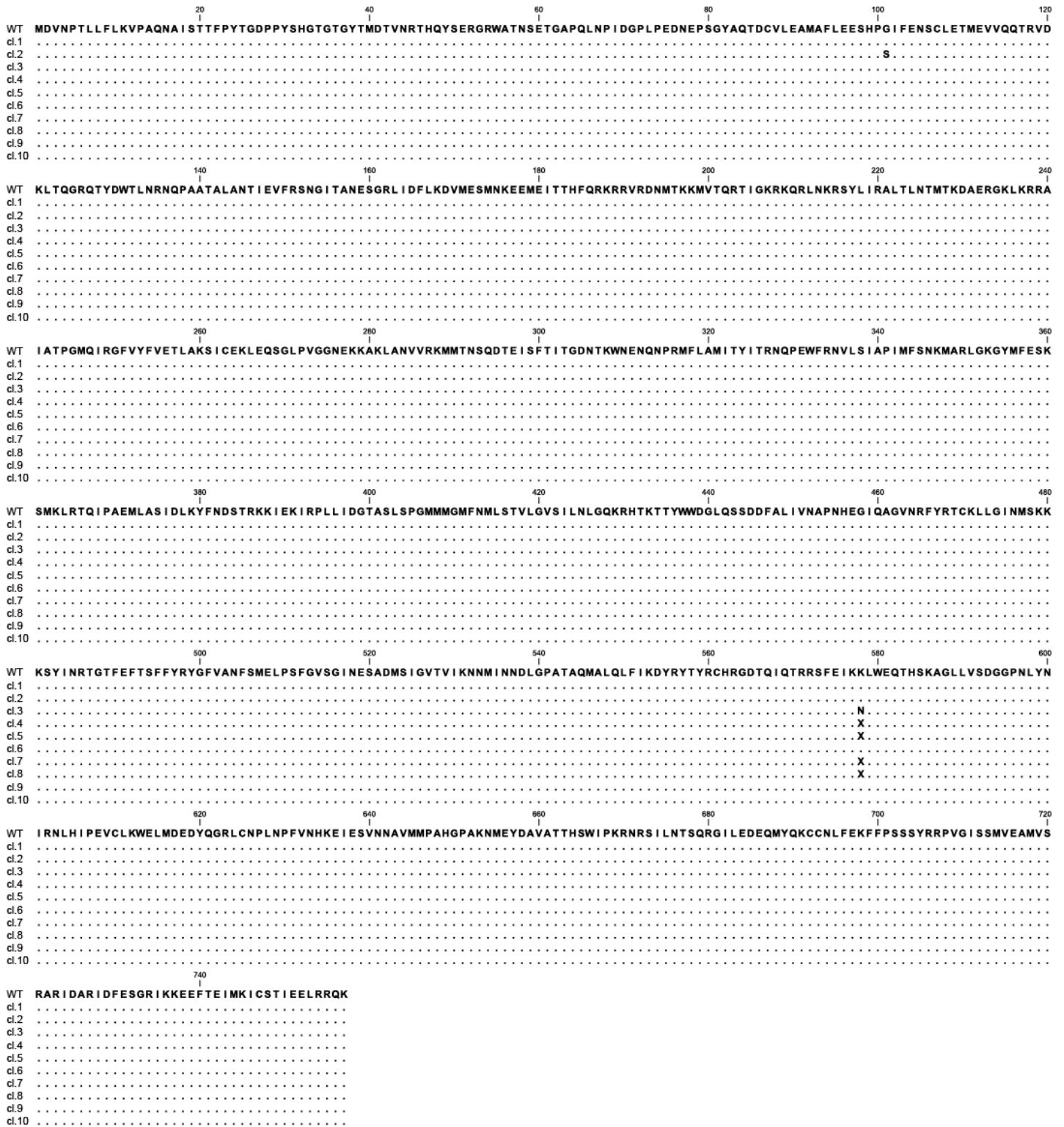


Fig. 17. Alignment of putative amino acid sequence of PB1 in the WT virus and MFPT^r viruses. The identical residues were represented as dots when compared with that of WT virus.

第三項 PA のゲノム配列の解析

PA 遺伝子の全長は 2233 bp で、このセグメントには PA がコードされている。ORF は 2151 bp で、タンパク質の全長は 716 アミノ酸残基である (Fig. 18)。PA は PB2 及び PB1 とヘテロ三量体を形成し、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとして機能する。また、PA は宿主細胞の pre-mRNA を切断するエンドヌクレアーゼ活性を持つことから、pre-mRNA を利用することで開始される vRNA の転写の初期段階に関与する [6]。

全クローンの PA 遺伝子の塩基配列を解析した結果、推定されるアミノ酸配列は Fig. 19 のようになった。WT ウイルスと比較したところ、全てのクローンで変異は認められなかった。

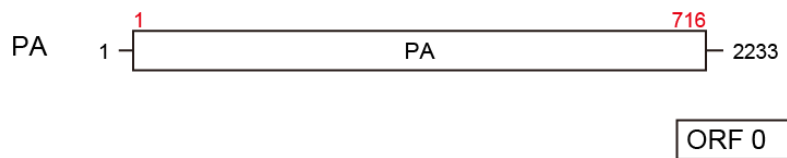


Fig. 18. Schematic illustration of PA gene structure of A/NWS/33 (H1N1). RNA segment (positive sense) and its encoded protein (amino acid) were indicated in black and red, respectively. The lines at 5' and 3' termini represent the noncoding region.



Fig.19. Alignment of putative amino acid sequence of PA in the WT virus and MFPT^r viruses. The identical residues were represented as dots when compared with that of WT virus.

第四項 HA のゲノム配列の解析

HA 遺伝子の全長は 1778 bp で、このセグメントには HA がコードされている。ORF は 1701 bp で、タンパク質の全長は 566 アミノ酸残基である (Fig. 20)。HA はホモ三量体を形成し、エンベロープに存在する糖タンパク質で、宿主細胞の表面にあるシアル糖鎖を認識してウイルス粒子を細胞表面に吸着させる。細胞内に侵入後、後期エンドソームにて HA は HA1 と HA2 に開裂し、ウイルスのエンベロープとエンドソーム膜を融合させて穴を開け、細胞質への vRNPs の移動を可能にする (脱殻) [6]。

全クローンの HA 遺伝子の塩基配列を解析した結果、推定されるアミノ酸配列は Fig. 21 のようになった。また、WT ウイルスと比較し、アミノ酸残基が異なるものを Table 3 にまとめた。

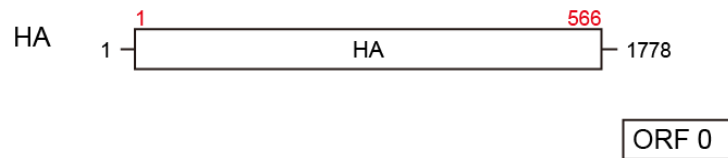


Fig. 20. Schematic illustration of HA gene structure of A/NWS/33 (H1N1). RNA segment (positive sense) and its encoded protein (amino acid) were indicated in black and red, respectively. The lines at 5' and 3' termini represent the noncoding region.

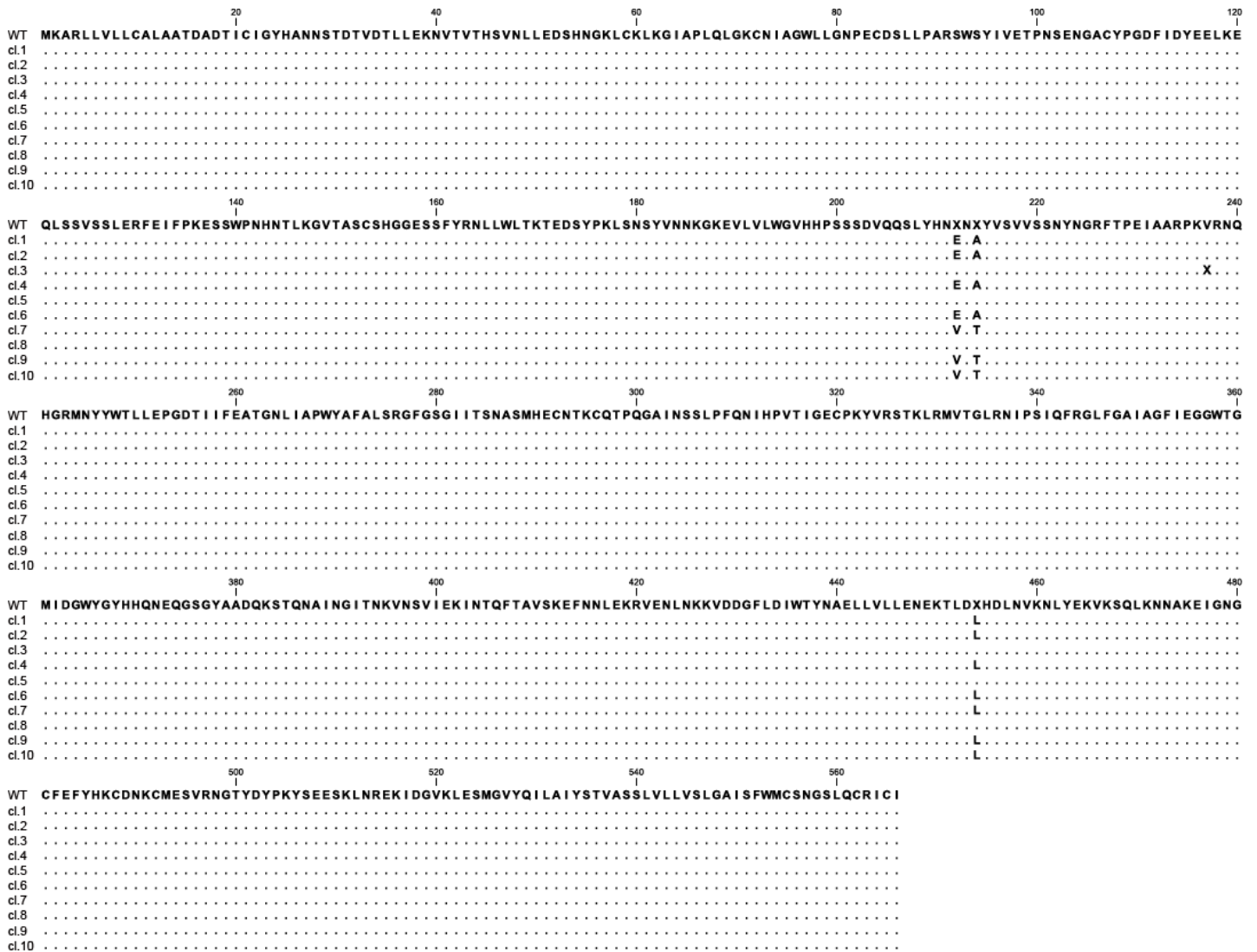


Fig. 21. Alignment of putative amino acid sequence of HA in the WT virus and MFPT^r viruses. The identical residues were represented as dots when compared with that of WT virus.

Table 3. Amino acid substitutions in HA of the WT virus and MFPT^r viruses

	Residue at 212	Residue at 214	Residue at 237	Residue at 454
WT	E / V	A / T	V	L / F
cl.1	E	A	V	L
cl.2	E	A	V	L
cl.3	E / V	A / T	V / I	L / F
cl.4	E	A	V	L
cl.5	E / V	A / T	V	L / F
cl.6	E	A	V	L
cl.7	V	T	V	L
cl.8	E / V	A / T	V	L / F
cl.9	V	T	V	L
cl.10	V	T	V	L

第五項 NP のゲノム配列の解析

NP 遺伝子の全長は 1565 bp で、このセグメントには NP がコードされている。ORF は 1497 bp で、タンパク質の全長は 498 アミノ酸残基である (Fig. 22)。NP はホモオリゴマーを形成し、vRNA やポリメラーゼ複合体 (PB2, PB1 及び PA で形成されるヘテロ三量体) と結合して vRNP を形成する。また、vRNA の転写や複製、vRNP の核内・核外への輸送に関与する [6]。

全クローンの NP 遺伝子の塩基配列を解析した結果、推定されるアミノ酸配列は Fig. 23 のようになった。また、WT ウイルスと比較し、アミノ酸残基が異なるものを Table 4 にまとめた。

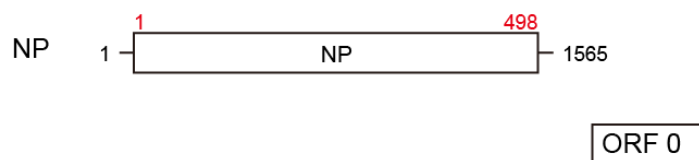


Fig. 22. Schematic illustration of NP gene structure of A/NWS/33 (H1N1). RNA segment (positive sense) and its encoded protein (amino acid) were indicated in black and red, respectively. The lines at 5' and 3' termini represent the noncoding region.

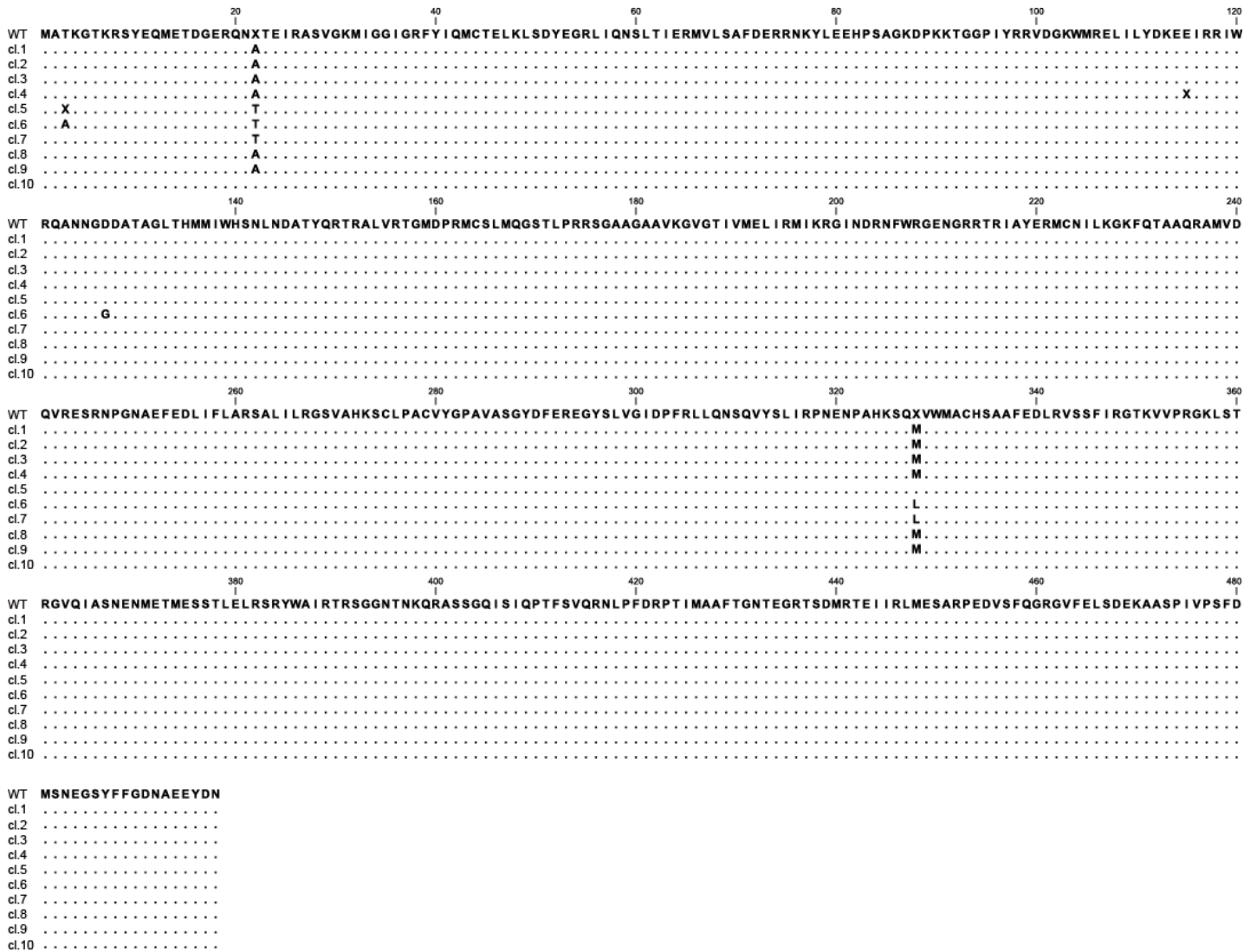


Fig. 23. Alignment of putative amino acid sequence of NP in the WT virus and MFPT^r viruses. The identical residues were represented as dots when compared with that of WT virus.

Table 4. Amino acid substitutions in NP of the WT virus and MFPT^r viruses

	Residue at 3	Residue at 22	Residue at 115	Residue at 127	Residue at 328
WT	T	A / T	E	D	M / L
cl.1	T	A	E	D	M
cl.2	T	A	E	D	M
cl.3	T	A	E	D	M
cl.4	T	A	E / G	D	M
cl.5	A / T	T	E	D	M / L
cl.6	A	T	E	G	L
cl.7	T	T	E	D	L
cl.8	T	A	E	D	M
cl.9	T	A	E	D	M
cl.10	T	A / T	E	D	M / L

第六項 NA のゲノム配列の解析

NA 遺伝子の全長は 1409 bp で、このセグメントには NA がコードされている。ORF は 1362 bp で、タンパク質の全長は 453 アミノ酸残基である (Fig. 24)。NA はホモ四量体を形成する糖タンパク質で、エンベロープに存在する。シアリダーゼ活性を持ち、宿主細胞からの子孫ウイルスの放出に関与する [6]。

全クローンの NA 遺伝子の塩基配列を解析した結果、推定されるアミノ酸配列は Fig. 25 のようになった。WT ウイルスと比較したところ、変異が認められたのは cl.4, cl.6 及び cl.8 であった。cl.4 及び cl.6 の 133 番目のアミノ酸残基は、Phe と Ser が混在していた (F133F/S)。cl.8 の 273 番目のアミノ酸残基は、Met と Ile が混在していた (M273M/I)。

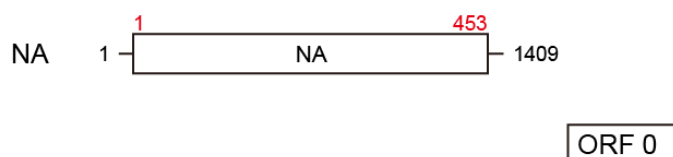


Fig. 24. Schematic illustration of NA gene structure of A/NWS/33 (H1N1). RNA segment (positive sense) and its encoded protein (amino acid) were indicated in black and red, respectively. The lines at 5' and 3' termini represent the noncoding region.

```

      20          40          60          80          100          120
WT  MNPNQKI I I T I G S I C M V V G I I S L I L Q I G N I I S I W I S H S I Q T G N Q N H T G I C N Q G I I N Y N V V A G Q D S T S V I L T G N S S L C P I R G W A I H S K D N G I R I G S K G D V F V I R E P F I S C S H L E C R T F F L T Q
cl.1 .....
cl.2 .....
cl.3 .....
cl.4 .....
cl.5 .....
cl.6 .....
cl.7 .....
cl.8 .....
cl.9 .....
cl.10 .....

      140          160          180          200          220          240
WT  G A L L N D K H S Y G T F K D R S P Y R A L M S C P V G E A P S P Y N S R F E S V A W S A S A C H D G M G W L T I G I S G P D N G A V A V L K Y N G I I T E T I K S W R K K I L R T Q E S E C T C I N G S C F T I M T D G P S D G L A S Y K I F
cl.1 .....
cl.2 .....
cl.3 .....
cl.4 ..... X .....
cl.5 .....
cl.6 ..... X .....
cl.7 .....
cl.8 .....
cl.9 .....
cl.10 .....

      260          280          300          320          340          360
WT  K I E K G K V T K S I E L N A P N S H Y E E C S C Y P D T G K V M C A C R D N W H G S N R P W V S F D Q N L D Y Q I G Y I C S G V F G D N P R P K D G T G S C G P V S A D G A N G V K G F S Y R Y G N G W W I G R T K S D S S R H G F E M I W D
cl.1 .....
cl.2 .....
cl.3 .....
cl.4 .....
cl.5 .....
cl.6 .....
cl.7 .....
cl.8 ..... X .....
cl.9 .....
cl.10 .....

      380          400          420          440
WT  P N G W T E T D S G F S V R Q D V V A I T D R S G Y S G S F V Q H P E L T G L D C I R P C F W V E L I R G Q P E E N T I W T S G S I I S F C G V N S D T V D W S W P D G A E L P F T I D K
cl.1 .....
cl.2 .....
cl.3 .....
cl.4 .....
cl.5 .....
cl.6 .....
cl.7 .....
cl.8 .....
cl.9 .....
cl.10 .....

```

Fig. 25. Alignment of putative amino acid sequence of NA in the WT virus and MFPT^r viruses. The identical residues were represented as dots when compared with that of WT virus.

第七項 M のゲノム配列の解析

M 遺伝子の全長は 1027 bp で、このセグメントには M1 (matrix protein 1) 及び M2 (matrix protein 2) がコードされている。M1 及び M2 の ORF はそれぞれ 759 bp 及び 294 bp で、タンパク質の全長はそれぞれ 252 アミノ酸残基及び 97 アミノ酸残基である。また、M2 は mRNA のスプライシングを経て翻訳される (Fig. 26)。M1 はウイルス粒子の中に最も多く含まれているタンパク質であり、エンベロープのすぐ真下に層を成している (Fig. 1)。M1 は、ウイルス粒子内で vRNPs やエンベロープに存在するタンパク質の細胞内 (ウイルス粒子内) ドメインと相互作用する。また、感染後期では vRNP の核外への輸送に関与する。一方、M2 はホモ四量体を形成し、エンベロープに存在するタンパク質である。また、M2 のプロトンチャネル活性は、細胞に侵入後の後期エンドソームで起こる脱殻段階に関与する [6]。

全クローンの M 遺伝子の塩基配列を解析した結果、推定される M1 と M2 のアミノ酸配列はそれぞれ Fig. 27 及び Fig. 28 のようになった。WT ウイルスと比較したところ、M1, M2 ともに全てのクローンで変異は認められなかった。

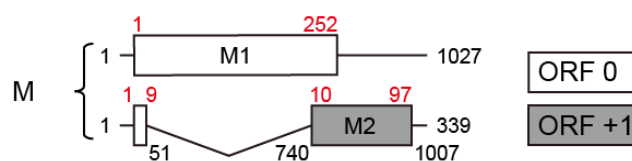


Fig. 26. Schematic illustration of M gene structure of A/NWS/33 (H1N1). RNA segment (positive sense) and its encoded protein (amino acid) were indicated in black and red, respectively. The lines at 5' and 3' termini represent the noncoding region. The M2 protein is encoded by spliced mRNA (the intron are indicated by the V-shaped lines).

```

      20          40          60          80          100          120
WT  M S L L T E V E T Y V L S I V P S G P L K A E I A Q R L E D V F A G K N T D L E V L M E W L K T R P I L S P L T K G I L G F V F T L T V P S E Q G L Q R R R F V Q N A L N G N G D P N N M D K A V K L Y R K L K R E I T F H G A K E I A L S Y S
cl.1 .....
cl.2 .....
cl.3 .....
cl.4 .....
cl.5 .....
cl.6 .....
cl.7 .....
cl.8 .....
cl.9 .....
cl.10 .....

      140          160          180          200          220          240
WT  A G A L A S C M G L I Y N R M G A V A T E V A F G L V C A T C E Q I A D S Q H R S H R Q M V T T T N P L I R H E N R M V L A S T T A K A M E Q M A G S S E Q A E E A M D I A S Q A R Q M V Q A M R T I G T H P S S S T G L K D D L L E N L Q A Y
cl.1 .....
cl.2 .....
cl.3 .....
cl.4 .....
cl.5 .....
cl.6 .....
cl.7 .....
cl.8 .....
cl.9 .....
cl.10 .....

WT  Q K R M G V Q M Q R F K
cl.1 .....
cl.2 .....
cl.3 .....
cl.4 .....
cl.5 .....
cl.6 .....
cl.7 .....
cl.8 .....
cl.9 .....
cl.10 .....

```

Fig. 27. Alignment of putative amino acid sequence of M1 in the WT virus and MFPT^r viruses. The identical residues were represented as dots when compared with that of WT virus.

```

      20          40          60          80
WT  M S L L T E V E T P I R N E W G C R C N D S S D P L V I A A N I I G I L H L I L W I L D R L F F K C I Y R R F K Y G L K R G P S T E G V P E S M R E E Y R K E Q Q N A V D V D D G H F V N I E L E
cl.1 .....
cl.2 .....
cl.3 .....
cl.4 .....
cl.5 .....
cl.6 .....
cl.7 .....
cl.8 .....
cl.9 .....
cl.10 .....

```

Fig. 28. Alignment of putative amino acid sequence of M2 in the WT virus and MFPT^r viruses. The identical residues were represented as dots when compared with that of WT virus.

第八項 NS のゲノム配列の解析

NS 遺伝子の全長は 890 bp で、このセグメントには NS1 (nonstructural protein 1) 及び NEP/NS2 (nuclear export protein/nonstructural protein 2) がコードされている。NS1 及び NEP/NS2 の ORF はそれぞれ 693 bp 及び 366 bp で、タンパク質の全長はそれぞれ 230 アミノ酸残基及び 121 アミノ酸残基である。また、NEP/NS2 は mRNA のスプライシングを経て翻訳される (Fig. 29)。NS1 はウイルス粒子に含まれない非構造タンパク質で、宿主細胞の IFN の産生を抑制することから、IFN アンタゴニストと呼ばれている。NS1 は vRNA や宿主細胞の多数のタンパク質と相互作用することで、ウイルスの増殖効率を高めている。また、NEP/NS2 も基本的にはウイルス粒子に含まれない非構造タンパク質であり、M1 と協力して vRNP の核外への輸送に関与する [6]。

全クローンの NS 遺伝子の塩基配列を解析した結果、推定される NS1 及び NEP/NS2 のアミノ酸配列はそれぞれ Fig. 30 及び Fig. 31 のようになった。NS1 について WT ウイルスと比較したところ、全ての MFPT 耐性ウイルス (cl.1 ~ cl.10) に、共通して P164S 変異が見られた。ただし、cl.10 は Pro と Ser が混在していた (P164P/S)。一方で NEP/NS2 は、全てのクローンで変異は認められなかった。

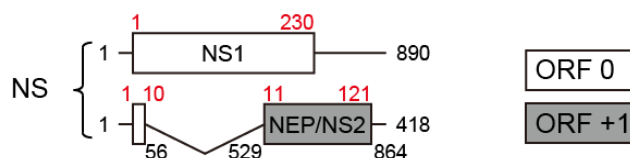


Fig. 29. Schematic illustration of NS gene structure of A/NWS/33 (H1N1). RNA segment (positive sense) and its encoded protein (amino acid) were indicated in black and red, respectively. The lines at 5' and 3' termini represent the noncoding region. The NEP/NS2 protein is encoded by spliced mRNA (the intron are indicated by the V-shaped lines).


```

      20          40          60          80          100          120
WT  MDPNTVSSSFQVDCFLWVHRKRVADQELGDSPFLLDRRLRDQKSLRGRGSTLGLD IETATRAGKQ IVER I LKEESDEALKMTMASVPASRYL TDMTLEEMSRHWFLMPKQKVAGPLC I RMD
cl.1 .....
cl.2 .....
cl.3 .....
cl.4 .....
cl.5 .....
cl.6 .....
cl.7 .....
cl.8 .....
cl.9 .....
cl.10 .....

      140          160          180          200          220
WT  QA I MDKN I I LKANFSV I FDRLETL I LLRAFTEEGT I VGE I SPLPSLPGHTDEDVKNAVGV L I GGLEWNNNTVRVSET I QRFawkSSNENGRPPLTPKQKRKMAGT I RSEV
cl.1 ..... S .....
cl.2 ..... S .....
cl.3 ..... S .....
cl.4 ..... S .....
cl.5 ..... S .....
cl.6 ..... S .....
cl.7 ..... S .....
cl.8 ..... S .....
cl.9 ..... S .....
cl.10 ..... X .....

```

Fig. 30. Alignment of putative amino acid sequence of NS1 in the WT virus and MFPT^r viruses. The identical residues were represented as dots when compared with that of WT virus.

```

      20          40          60          80          100          120
WT  MDPNTVSSSFQD I LMRMSKMQLGSSSEDLNG I I TQFESLKLRYRDSL GKAVMRMGDLHSLQNRNGKWRQELGQKFEE I RWL I EEVRHRLK I TENSFEQ I TFMQALQLLLEVEQE I RTFSFQL
cl.1 .....
cl.2 .....
cl.3 .....
cl.4 .....
cl.5 .....
cl.6 .....
cl.7 .....
cl.8 .....
cl.9 .....
cl.10 .....

WT  I
cl.1 .
cl.2 .
cl.3 .
cl.4 .
cl.5 .
cl.6 .
cl.7 .
cl.8 .
cl.9 .
cl.10 .

```

Fig. 31. Alignment of putative amino acid sequence of NEP/NS2 in the WT virus and MFPT^r viruses. The identical residues were represented as dots when compared with that of WT virus.

第九項 IAV ゲノム解析の小括

MFPT 耐性ウイルス (cl.1 ~ cl.10) のゲノムを WT ウイルスのものと比較した結果を Table 5 にまとめた。クローン毎に導入された変異に多少の違いが見られたものの、NS1 の P164S 変異は全クローンに共通して確認された。したがって、MFPT は NS1 を主な作用ターゲットとしている可能性が考えられた。

Table 5. Mutations in MFPT^r viruses

	PB2	PB1	HA	NP	NA	NS1
cl.1	G682C					P164S
cl.2		G101S				P164S
cl.3		K578N	V237V/I			P164S
cl.4		K578K/N		E115E/G	F133F/S	P164S
cl.5	K627Q	K578K/N		T3T/A		P164S
cl.6				T3A, D127G	F133F/S	P164S
cl.7		K578K/N				P164S
cl.8		K578K/N			M273M/I	P164S
cl.9						P164S
cl.10						P164P/S

第四節 MFPT 耐性ウイルス感染時の細胞における機能変化の評価

MFPT 耐性ウイルスには共通して NS1 の 164 番目の Pro が Ser に変異 (P164S 変異) していたことから、この変異が MFPT 耐性ウイルスの増殖能や病原性の低下に寄与していると考えられた。そこで、NS1 の機能に対する P164S 変異がもたらす影響を解析した。

NS1 はウイルス粒子には含まれないが、感染細胞内で大量に発現されて、宿主の様々なタンパク質と相互作用することで、ウイルスの増殖をサポートしている [43]。その機能の 1 つとして、NS1 が phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) と相互作用し、PI3K/Akt シグナル伝達経路を活性化することが挙げられる [44]。この際、NS1 の ¹⁶⁴Pro は PI3K との相互作用に重要なアミノ酸残基の 1 つであることが報告されている [45–48]。そこで、MFPT 耐性ウイルスが保有する NS1 の P164S 変異が感染細胞内での PI3K/Akt シグナル伝達経路の活性化にどう影響するのか、Western blotting により調べた。

MDCK 細胞に WT ウイルスまたは MFPT 耐性ウイルス (cl.1) を 1 PFU/cell で感染させ、感染 0, 5, 10 または 15 時間後に感染細胞を収穫し、その細胞溶解液を SDS-PAGE に付した後、Western blotting により各種タンパク質を検出した。

活性化した PI3K は phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) から phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP₃) を産生し、PIP₃ と 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1/2 (PDK1/2) によって、Akt は活性化体であるリン酸化 Akt (phospho-Akt; p-Akt) となる [49,50]。WT ウイルスを感染させた細胞では、p-Akt は感染 5 時間後には検出され、その後増加していた。一方、cl.1 感染細胞では、p-Akt はいずれの時間においても WT ウイルス感染細胞のそれよりも発現量が少なかった (Fig. 32)。したがって、cl.1 を感染させた細胞では、PI3K/Akt シグナル伝達経路の活性化が抑制されていることが確認された。またこの時、両ウイルス感染細胞において、IAV のタンパク質である NS1 と M1 の発現量には大きな差は見られなかった (Fig. 32)。

PI3K/Akt シグナル伝達経路の活性化は、細胞の生存や抗ウイルス反応などの様々な細胞の生命現象を調節している [44]。そこで、WT ウイルスと MFPT 耐性ウイルス (cl.1) の NS1 の機能の違いを明らかにするために、宿主細胞のアポトーシスに関わる cleaved caspase-3 (cCasp-3) 及び cleaved poly(ADP-ribose)polymerase-1 (cPARP-1) の発現量を調べた。

WT ウイルス感染細胞では、感染 10 時間後から cCasp-3 及び cPARP-1 の発現が見られ、経時的に増加した。一方 cl.1 感染細胞では、感染 10 時間後及び 15 時間後において、これらの発現量は WT ウイルス感染細胞のそれよりも少なかった (Fig. 32)。したがって、cl.1 感染細胞では、WT ウイルス感染細胞よりもアポトーシスの進行が抑制されていることが示唆された。

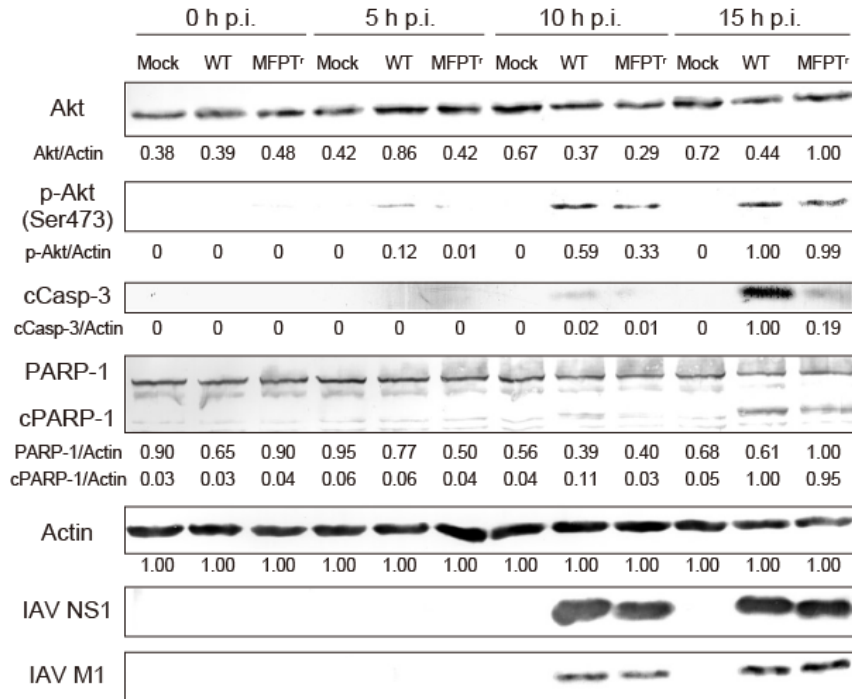


Fig. 32. Comparison of activation of Akt, proteins related to apoptosis and viral proteins in virus-infected cells. MDCK cells were infected with the WT virus or MFPT^r virus (cl.1) or mock infected with PBS (phosphate-buffered saline). After incubation for the indicated periods, Akt, phospho-Akt (p-Akt), cleaved caspase-3 (cCasp-3), PARP-1 and cleaved PARP-1 (cPARP-1) were detected by Western blotting. Expression levels of NS1 and M1 were also checked. Semi-quantified expression levels normalized against value for actin were indicated. p.i.: post-infection.

感染後期における宿主細胞のアポトーシスの進行は、核内で新たに作られた vRNPs が細胞質へ移行するのを補助し、結果として子孫ウイルス量を増加させるということが報告されている [51–53]。また、NEP/NS2 が関わる vRNP の能動的輸送メカニズムが別個に存在はするものの [6,54]、アポトーシスによって vRNPs が細胞質へ移行することが子孫ウイルスの効率的な産生に必要であるとされている (Fig. 33)。そこで、感染細胞内での vRNPs の局在を、IAV の NP を免疫染色することで調べた。

MDCK 細胞に 1 PFU/cell で感染させた時、WT ウイルス感染細胞では、感染 5 時間後に NP は核内のみに局在していたが、感染 10 時間後及び 15 時間後に NP は核内と細胞質の両方において検出された。一方で MFPT 耐性ウイルス (cl.1) 感染細胞では、観察したいずれの時間においても NP は核内でのみ検出され、細胞質ではほとんど検出されなかった (Fig. 34)。感染細胞内において、NP はそのほとんどが vRNP を形成している [55]。したがって、今回の結果から cl.1 感染細胞では vRNPs の核外への移行が抑制されていることが示唆され、このことが子孫ウイルス放出を抑制し、増殖能の低下をもたらしたと考えられた。

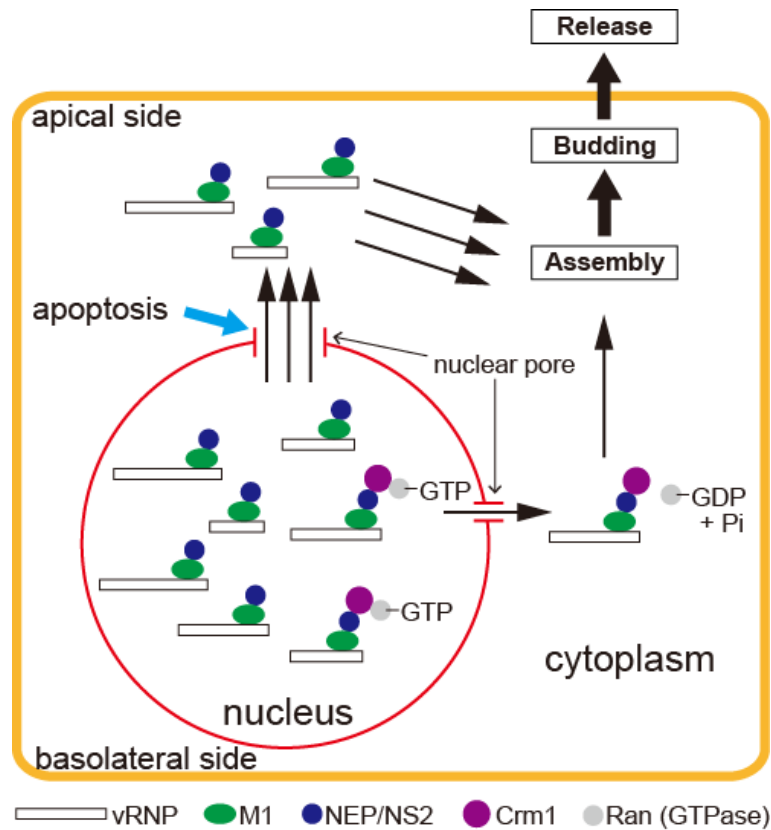


Fig. 33. Schematic representation of vRNP nuclear export at late stage of infection. In IAV-infected cell, the vRNP newly synthesized in nucleus was interacted with M1 and NEP/NS2, and the vRNP-M1-NEP/NS2 complex was recognized by the chromosome region maintenance 1 (Crm1) which mediates the nuclear export. Thereafter the vRNP-M1-NEP/NS2-Crm1 complex was exported to cytoplasm to produce progeny virus. At late stage of infection, it was suggested that the vRNPs were also exported to cytoplasm by another mechanism, which induced by apoptosis, since the vRNPs were retained in the nucleus by inhibition of apoptosis [51,52,54,56,57].

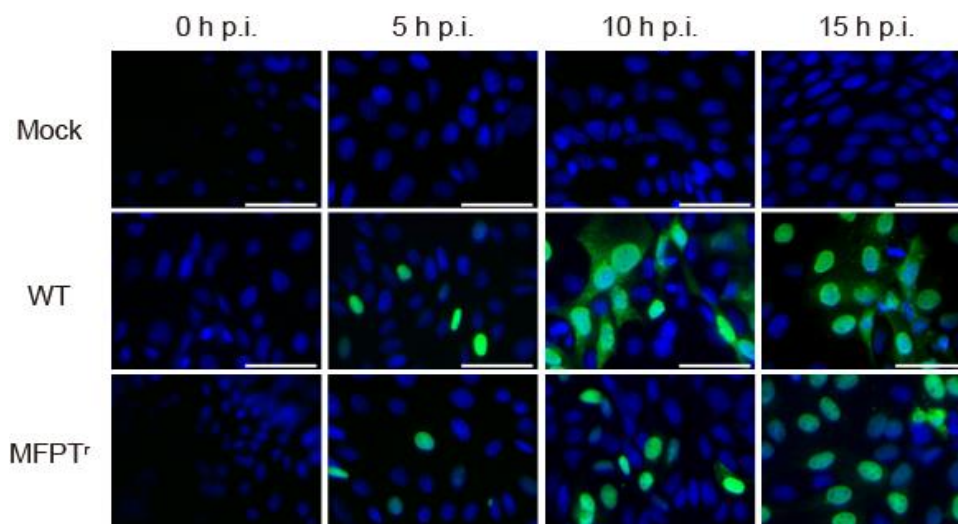


Fig. 34. Localization of IAV NP in virus-infected cells. MDCK cells were infected with the WT virus or MFPT^r virus (cl.1) or mock infected with PBS. After incubation for the indicated periods, IAV NP in the cells was stained with FITC-labeled anti-NP antibody and detected by using fluorescence microscopy. Nuclei of cells were counterstained by DAPI. Scale bar = 50 μ m. p.i.: post-infection.

PI3K/Akt シグナル伝達経路の活性化は、アポトーシスのみならず、抗ウイルスタンパク質である IFN- β の産生誘導を含めた、宿主細胞の免疫応答にも関与する。そこで、1 PFU/cell でウイルスを感染させた時の MDCK 細胞における IFN- β の mRNA の発現量を定量 PCR (quantitative PCR; qPCR) によって比較した。

その結果、非感染細胞 (mock) では IFN- β の mRNA の発現はほとんど認められず、その一方で WT ウイルス感染細胞では、感染 10 時間後及び 15 時間後に IFN- β の mRNA の発現が明らかに誘導されていることが確認された。また、感染 10 時間後よりも 15 時間後の方が mRNA 発現量が多かった (Fig. 35)。それに対して cl.1 感染細胞では、IFN- β の mRNA の発現は誘導されているものの、感染 10 時間後及び 15 時間後のいずれにおいても WT ウイルスと比べて発現量が有意に減少していた。他の MFPT 耐性ウイルス感染細胞でも、cl.1 と同様の結果が得られた (Fig. 35)。また、MFPT 耐性ウイルス感染細胞における IFN- β の mRNA の発現量は、感染 10 時間後と 15 時間後でほとんど差がない、あるいは感染 15 時間後の方が感染 10 時間後よりも少ないという傾向が多く見られた。

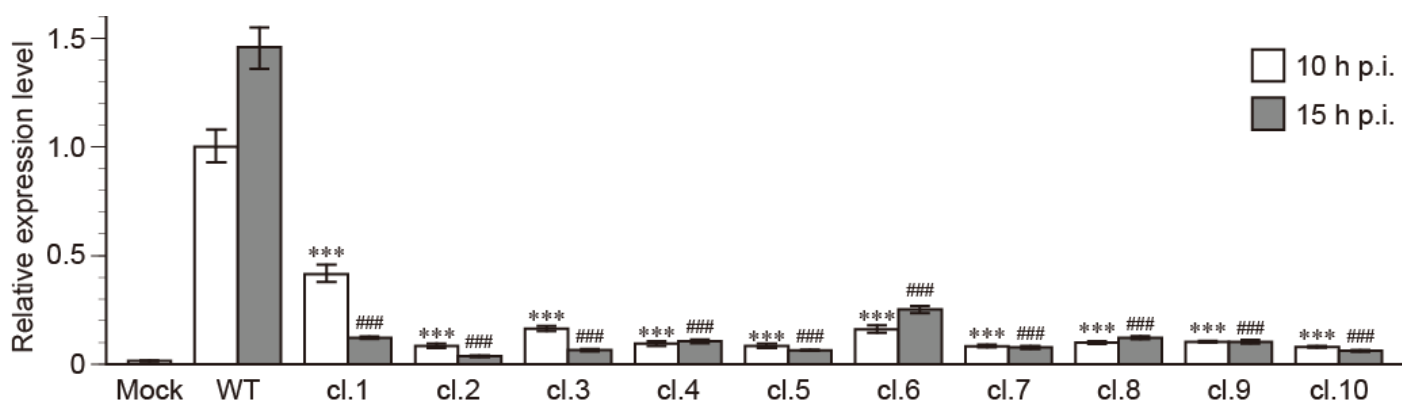


Fig. 35. Relative expression level of IFN- β mRNA. MDCK cells were infected with the WT virus or MFPT^r virus or mock infected with PBS. At 10 and 15 hours post-infection, the infected cells were collected, and the total RNA was isolated followed by RT-PCR to synthesis cDNA. Gene expression level of IFN- β mRNA was quantified by qPCR. Data were expressed as the mean \pm SE. *** $p < 0.001$ vs. the level in WT virus-infected cells at 10 h p.i., ### $p < 0.001$ vs. the level in WT virus-infected cells at 15 h p.i. p.i.: post-infection.

第五節 IAV に対する MFPT の作用機序の検討

一般的に、薬剤耐性ウイルスは抗ウイルス薬の作用部位に変異を導入することにより、抗ウイルス薬に対する耐性を獲得する。したがって、MFPT 耐性ウイルスには共通して NS1 の ¹⁶⁴Pro に変異が導入されていたことから、MFPT はこの部位に作用することで、抗 IAV 活性を示すと考えられた。これを確かめるために、WT ウイルスを MDCK 細胞に感染させた際に MFPT を加えると、感染細胞内でどのような変化が生じるのかを Western blotting によって調べることにした。

MDCK 細胞に WT ウイルスを 1 PFU/cell で感染後、培地または終濃度が 2 mM となるように MFPT を加えた培地でインキュベートした。感染 0, 10 または 15 時間に感染細胞を収穫し、その細胞溶解液を SDS-PAGE に付した後、抗体を用いて各種タンパク質を検出した。

その結果、WT ウイルスを感染させた時、感染 10 時間後及び 15 時間後において、MFPT 添加時では p-Akt の量が減少していた (Fig. 36)。また、アポトーシスのマーカーである cCasp-3 及び cPARP-1 の量も、MFPT 添加時では減少していた。一方で、NS1 や M1 の発現量に大きな差は見られなかった。また、非感染細胞に MFPT を添加しても変化はほとんど見られなかった (Fig. 36)。

これらの結果より、MFPT がウイルスの増殖をサポートする PI3K/Akt シグナル伝達経路の活性化を抑制し、その結果感染細胞のアポトーシスの進行を抑制することが確認された。そしてこのアポトーシス進行の抑制が、MFPT 耐性ウイルスと同様に、子孫ウイルス放出量の低下につながったと考えられた。

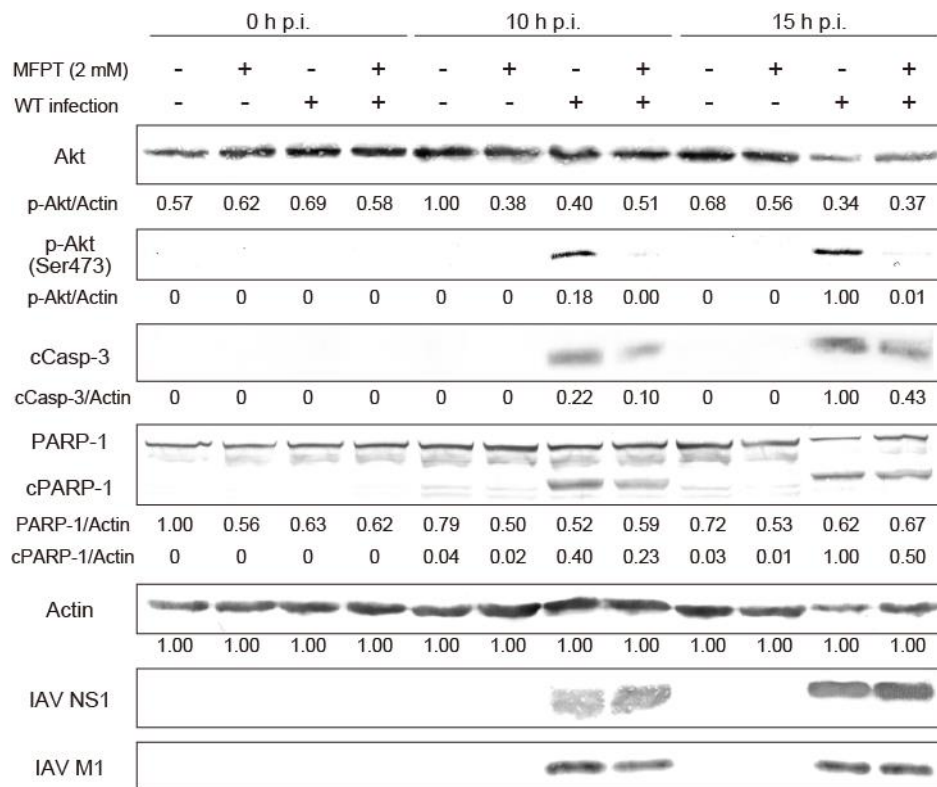


Fig. 36. The action of MFPT against IAV. MDCK cells were infected with the WT virus or mock infected with PBS. MFPT (final concentration = 2 mM) was added to the medium immediately after infection. After incubation for the indicated periods, Akt, phospho-Akt (p-Akt), cleaved caspase-3 (cCasp-3), PARP-1 and cleaved PARP-1 (cPARP-1) were detected by Western blotting. Expression levels of NS1 and M1 were also checked. Semi-quantified expression levels normalized against value for actin were indicated. p.i.: post-infection.

第六節 考察

IAV (NWS 株) を MFPT で処理することで得られた MFPT 耐性ウイルスは, *in vitro* で増殖能が低下し, マウス感染モデルにおいて病原性が低下していた。また, MFPT 耐性ウイルスをマウスに接種することによって, 親株である WT ウイルスに対する中和抗体が産生されたことから, MFPT 耐性ウイルスを弱毒生ワクチンとして利用できる可能性が考えられた。ワクチンを製造するためには, まずワクチン株となるウイルスを大量に増殖させる必要がある。MFPT 耐性ウイルスは WT ウイルスよりは低下していたものの宿主細胞においてある程度の増殖能を示したことから, ワクチン株ウイルスとして大量増殖させる上で支障はないと考えられた。さらに, 人工的にインフルエンザウイルスを作製する reverse genetics 技術などを必要とせず, 弱毒化ウイルスを容易に, かつ比較的短期間 (最短で約 2 週間程度) で作製することができる点は, MFPT 耐性ウイルスの利点と考えられる。また, MFPT 耐性ウイルスをそのままワクチン株ウイルスとして利用しないとしても, 今回確認された変異 (NS1 の P164S 変異) を増殖能に関わる他の変異と組み合わせることで, 弱毒生ワクチンの安全性及び優位性を高めることも可能であると考えられた。

MFPT 耐性ウイルスのゲノムを WT ウイルスと比較したところ, クローン毎に複数の変異が認められた。これらの変異の中で, NS1 の P164S 変異のみが全クローンに共通して認められたことから, MFPT 処理による IAV の増殖能の低下はこの変異に依存するものと推察された。また, クローン間で増殖能や病原性の低下の程度に若干の差が見られたのは, NS1 の P164S 変異以外の変異が関与しているためではないかと考えられた。

この仮説を確かめるために, 引き続き NS1 の P164S 変異がどのようにして IAV の増殖能の低下をもたらしているのか検討した。第四節で述べたように, NS1 は感染細胞内で大量に発現されて宿主由来の様々なタンパク質と相互作用し, ウイルスの増殖効率を高めている [43]。その機能の 1 つとして, NS1 は PI3K と相互作用してこれを活性化し, Akt のリン酸化を経て, PI3K/Akt シグナル伝達経路を活性化する [44,49,50]。しかも, 変異が見られた NS1 の ¹⁶⁴Pro は PI3K との相互作用に重要なアミノ酸残基の 1 つであることが報告されている [45–48]。

これらの情報に基づいて, MFPT 耐性ウイルスである cl.1 を使って, 感染細胞内における p-Akt の量を調べたところ, cl.1 感染細胞内では Akt のリン酸化が WT ウイルス感染時よりも抑制されていた。このことから, cl.1 感染細胞では PI3K/Akt シグナル伝達経路の活性化が抑制されていることが示唆された。また, これは P164S 変異によって NS1 と PI3K との間の相互作用が減弱したためと推察された。実際, NS1 が PI3K の p85 β サブユニットにある i-SH2 ドメインと相互作用する時, ¹⁶⁴Pro はちょうどエッジの部分に位置しており, 複合体を形成する上で重要なアミノ酸残基と考えられるため [45,47], このアミノ酸残基が変異することで PI3K との相互作用が減弱する可

能性が考えられた。

cl.1 感染細胞において Akt のリン酸化は抑制されていたものの、一方で IAV の NS1 及び M1 の発現量は WT ウイルスと比べて差は見られなかった。このことから、NS1 の P164S 変異や p-Akt の減少はウイルスタンパク質の発現にはほとんど影響しないことが示唆された。また、cl.1 のウイルスポリメラーゼ活性は、cl.1 に認められたもう 1 つの変異である PB2 の G682C 変異による影響を受けていないということも考えられた。PB2 の ⁶⁸²Gly は、vRNP 形成のために PB1 や NP と結合する領域に含まれていることは報告されているものの [54]、PB2 の機能におけるこのアミノ酸残基の重要性は明らかにされていない。したがって、PB2 の G682C 変異による cl.1 の弱毒化への影響を完全に排除することはできないものの、その影響の程度は少ないと考えられる。

PI3K/Akt シグナル伝達経路の活性化は、細胞の生存や抗ウイルス反応などの様々な細胞の生命現象を制御している [44]。そこで、MFPT 耐性ウイルス感染細胞におけるアポトーシスの進行の程度と IFN-β の mRNA の発現量を、それぞれ Western blotting と qPCR により調べ、WT ウイルスと比較した。その結果、cl.1 感染細胞でアポトーシス関連タンパク質 (cCasp-3 及び cPARP-1) の発現量が減少し、全ての MFPT 耐性ウイルス感染細胞で IFN-β の mRNA の発現量が減少していた。これらは、PI3K/Akt シグナル伝達経路の活性化が抑制された結果起きたものと考えられた。

感染細胞内における IFN-β の mRNA の発現量を評価した際、MFPT 耐性ウイルス感染細胞では、感染 10 時間後と 15 時間後ではほとんど差がない、あるいは感染 15 時間後の方が感染 10 時間後より抑制されているという、WT ウイルスとは異なるパターンが観察された。宿主タンパク質の protein kinase R (PKR) と retinoic acid inducible gene I (RIG-I) は細胞質中の vRNA を認識して抗ウイルス反応を活性化することから [55]、これらのタンパク質は vRNP 中の vRNA を認識していると推察される。また、IAV 感染細胞において RIG-I は IFN-β の産生を誘導するのに必須のタンパク質であることが報告されている [58–60]。したがって、MFPT 耐性ウイルス感染細胞において、細胞質に運ばれる vRNPs が減少したことで RIG-I による vRNA の認識が減少し、その結果 IFN-β の mRNA の発現を含めた RIG-I によって誘導される抗ウイルス反応が抑制されたことが、WT ウイルス感染細胞と異なる発現パターンを示したことに寄与していると考えられた。

MFPT 耐性ウイルス感染細胞でアポトーシスの進行が抑制されていることは、アポトーシスの進行によって促進される IAV の vRNPs の核外への移行が cl.1 感染細胞で抑制されていたことから確認された。さらに、IFN-β はオートクリンまたはパラクリン作用によって宿主細胞のアポトーシスを誘導することから、IFN-β の mRNA の発現が減少していたことも、アポトーシス進行の抑制に寄与していると考えられた。感染後期における宿主細胞のアポトーシスの進行は、核内で新たに作られた vRNP が細胞質へ移行するのを補助し、子孫ウイルス量を増加させることが報告されている [51–53]。また、NEP/NS2 が関わる vRNP の能動的輸送メカニズムが別に存在するものの [6,54]、アポトーシスによって vRNPs が細胞質へ移行されることは子孫ウイルスの効率よい産生に

必要であるとされている。したがって、MFPT 耐性ウイルスの増殖能の低下は、NS1 の P164S 変異によって PI3K/Akt シグナル伝達経路の活性化が抑制されたことで、感染後期におけるアポトーシスの進行が抑制され、そのために核内で新しく作られた vRNPs の核外への移行が減少し、効率よい子孫ウイルスの産生が抑制された結果生じたものであると推察された。

最後に、IAV に対する MFPT の作用機序について確認を行った。MFPT 耐性ウイルスの特性から、MFPT の IAV に対する作用メカニズムは NS1 と PI3K の相互作用の阻害であることが予想されたため、MFPT 存在下で WT ウイルスを感染させて、p-Akt の量を比較した。その結果、MFPT 存在下では p-Akt の量が減少し、さらにアポトーシス関連タンパク質の量が減少していた。したがって、MFPT は NS1 が PI3K/Akt シグナル伝達経路を活性化するのを抑制することで抗 IAV 活性を示すことが示唆された。また、この結果から、IAV を MFPT で処理した際に PI3K との相互作用に関わる重要なアミノ酸残基に変異 (NS1 の P164S 変異) が生じたのは、MFPT 存在下で増殖するために、すなわち MFPT が存在する環境に順応するために生じたものと推察された。一般的に、薬剤耐性ウイルスは薬剤耐性を獲得するために変異を生じるが、その変異によって増殖能が低下することが知られている。MFPT についても、抗 IAV 活性は高くないものの (50% ウイルス増殖阻止濃度 = 2.8 mM)、このことが当てはまり、その結果 MFPT 耐性ウイルスの増殖能や病原性が低下したと考えられた。

第二章 MFPT の抗 HSV 活性の評価

第一節 *In vitro* における MFPT の抗 HSV 活性の評価

はじめに、MFPT の *in vitro* における抗 HSV 活性を調べた。本研究では、抗 HSV-1 活性が既に確認されている HF 株に加えて、HSV-1 の標準株の 1 つである KOS 株、チミジンキナーゼに変異を有するアシクロビル (aciclovir; ACV) 耐性株の A4-3 株 [61] 及び HSV-2 である UW 268 株を対象ウイルスとした。また、既存の抗ヘルペスウイルス薬である ACV を対照とした。

抗 HSV 活性の評価は、Vero 細胞の増殖に対する 50% 細胞増殖阻止濃度 (50% cytotoxic concentration; CC_{50}) と、50% ウイルス増殖阻止濃度 (50% inhibitory concentration; IC_{50}) の比、すなわち選択指数 (selectivity index, CC_{50}/IC_{50}) を算出して行った。一般的に選択指数が 10 以上であれば抗ウイルス活性があるとされている。ACV は、KOS 株及び HF 株に対する選択指数はそれぞれ 1100, 450 と高かった。しかし、ACV 耐性株である A4-3 株に対する選択指数は 75 であり、抗ウイルス活性は有するものの、他の ACV 感受性 HSV-1 よりも相対的に低かった。また、ACV は、HSV-2 に対しては 1900 という高い選択指数を示した。一方、MFPT は HSV-1 である KOS 株、A4-3 株及び HF 株に対する選択指数がそれぞれ 410, 340 及び 530 であった。特に A4-3 株については、MFPT の方が ACV よりも高い選択指数を示した。また、HSV-2 の UW 268 株に対する選択指数は 310 であった (Table 6)。

以上の結果から、MFPT は *in vitro* において、ACV 耐性株も含めた抗 HSV-1 活性及び抗 HSV-2 活性があると判定できた。

Table 6. *In vitro* antiherpetic activities of MFPT

Virus	Strain	Sample	Cytotoxicity (CC ₅₀ , μM)	Antiviral activity (IC ₅₀ , μM)	Selectivity index (CC ₅₀ /IC ₅₀)
HSV-1	KOS	MFPT	890 ± 160	2.2 ± 0.42	410 ± 12
		ACV	2600 ± 250	2.5 ± 0.64	1100 ± 200
	A4-3	MFPT	890 ± 160	2.7 ± 0.82	340 ± 50
		ACV	2600 ± 250	36 ± 4.5	75 ± 8.6
	HF	MFPT	890 ± 160	1.7 ± 0.49	530 ± 100
		ACV	2600 ± 250	6.0 ± 1.7	450 ± 72
HSV-2	UW 268	MFPT	890 ± 160	3.0 ± 0.91	310 ± 93
		ACV	2600 ± 250	1.4 ± 0.20	1900 ± 260

Each value was the mean ± SD from triplicate assays.

第二節 *In vivo* における MFPT の抗 HSV 活性の評価

前節で、MFPT は *in vitro* において、HSV-1 及び HSV-2 に対して抗ウイルス活性を有することが確認された。引き続き、マウスに HSV を感染させる性器ヘルペスモデルを用いて、*in vivo* における MFPT の抗 HSV 活性を検討した。

BALB/c マウスに medroxyprogesterone 17-acetate を感染 6 日前及び 1 日前に皮下投与して、ウイルスに対するマウスの感受性を高めた [62]。その後、HSV-1 (KOS 株, A4-3 株または HF 株) または HSV-2 (UW 268 株) を膣内接種した (HSV-1: 5×10^5 PFU/20 μ l/mouse, HSV-2: 2×10^4 PFU/20 μ l/mouse)。各種濃度の MFPT または ACV は、感染 1 時間前から感染 7 日後まで、1 日 2 回経膣投与した (20 μ l/mouse \times 2 回, n=5)。対照群には、同じスケジュールで PBS を経膣投与した。感染 1, 3, 5 及び 7 日後に膣内洗浄液を採取し、感染 14 日後まで死亡例・死亡日及び発症の程度を表す発症スコアを記録した。発症スコアは、0: 無症状, 1: 生殖器に軽度の発赤が見られる, 2: 生殖器に中程度の発赤と腫脹が見られる, 3: 生殖器に重度の炎症が生じ浸出液が認められる, 4: 後肢が麻痺する, 5: 死亡, と定義した (Fig. 37)。

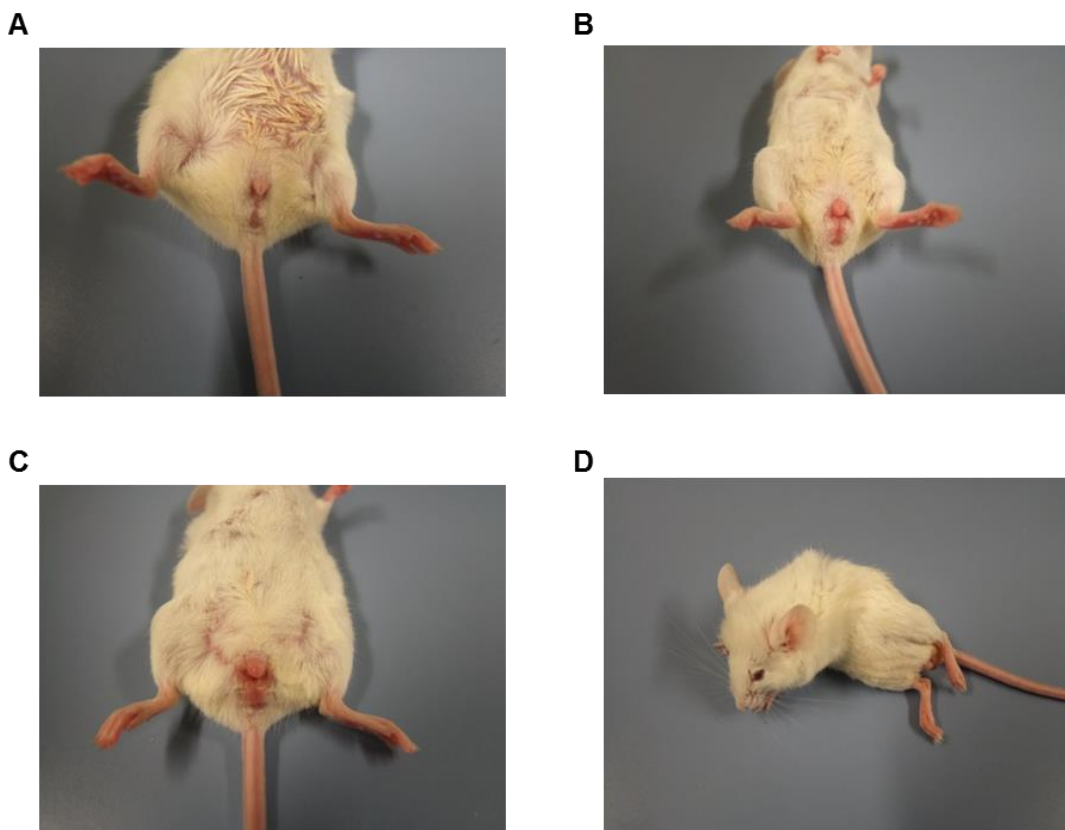


Fig. 37. Images of lesion score in mice infected with HSV. Clinical signs of infection were scored based on disease severity as follows: 0 = no signs; 1 = slight genital erythema and edema (A); 2 = moderate genital inflammation (B); 3 = severe exudative genital lesions (C); 4 = hind limb paralysis (D); and 5 = death.

3 種類の HSV-1 を感染させた時の腔内洗浄液中のウイルス量をプラークアッセイで測定した結果を Fig. 38 に示した。MFPT を経腔投与した時、KOS 株接種時のウイルス量は濃度依存的に減少し、特に MFPT を 1.0 mg/day で投与した時の感染 1 日後におけるウイルス量は対照群の約 49% であり、有意に減少していた (Fig. 38A)。また、MFPT を 1.0 mg/day で投与した時の感染 3 日後のウイルス量は対照群の約 19% であり、さらに感染 5 日後にはウイルスが検出されなかった。いずれの群においても感染 7 日後において腔内洗浄液中にウイルスは検出されなかった (Fig. 38A)。

ACV 耐性 A4-3 株接種時のウイルス量も MFPT の投与によって濃度依存的に減少し、MFPT を 1.0 mg/day で投与した時の感染 1 日後におけるウイルス量は対照群の約 52% であり、有意に減少していた (Fig. 38B)。また、MFPT を 1.0 mg/day で投与した時の感染 3 日後及び 5 日後のウイルス量は、それぞれ対照群の約 19% 及び約 6% であり、ACV 投与群のものと同程度だった。いずれの群においても感染 7 日後において腔内洗浄液中にウイルスは検出されなかった (Fig. 38B)。

HF 株接種時のウイルス量も MFPT の投与によって濃度依存的に減少し、MFPT を 1.0 mg/day で投与した時の感染 1 日後におけるウイルス量は対照群の約 40% であり、有意に減少した (Fig. 38C)。また、対照群では感染 3 日後において腔内洗浄液中にウイルスが検出されたが、他の群では感染 3 日後からウイルスが検出されなかった (Fig. 38C)。

HSV-2 の UW 268 株を接種した時の腔内洗浄液中のウイルス量を測定したところ、各サンプリングポイントにおいて、MFPT 投与群では濃度依存的にウイルス量が減少した。また、MFPT を 0.5 または 1.0 mg/day 投与した時は、全サンプリングポイントで対照群よりもウイルス量が有意に減少した。ACV 投与群では、ウイルス量が最も減少していて、感染 7 日後に採取した腔内洗浄液中にウイルスは検出されなかった (Fig. 39)。

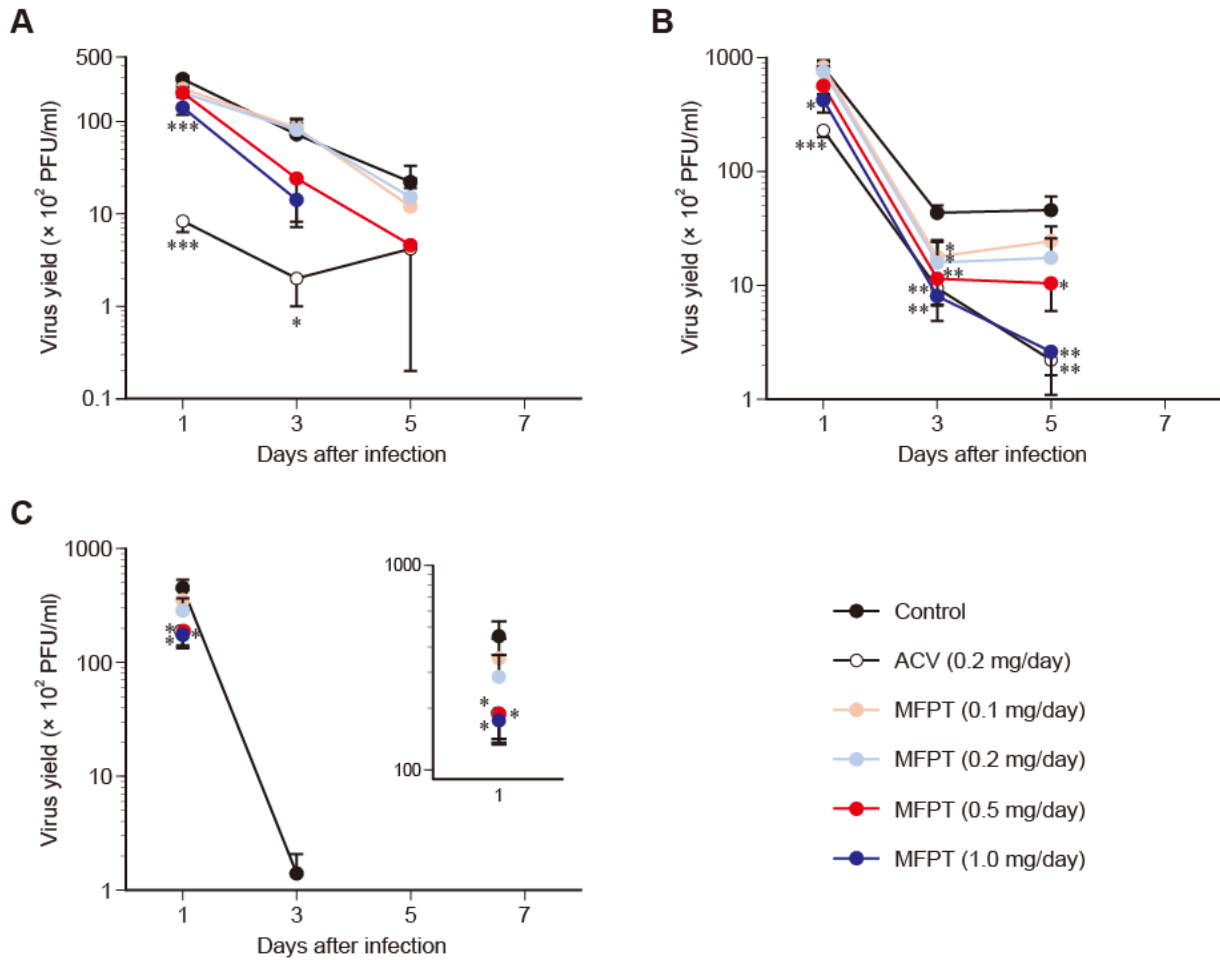


Fig. 38. Virus yields on day 1 to day 7 in HSV-1-infected mice treated with MFPT or ACV. Mice pretreated with medroxyprogesterone 17-acetate were inoculated intravaginally with ACV-sensitive KOS strain (A), ACV-resistant A4-3 strain (B) or ACV-sensitive HF strain (C) of HSV-1. Data were expressed as the mean \pm SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control group.

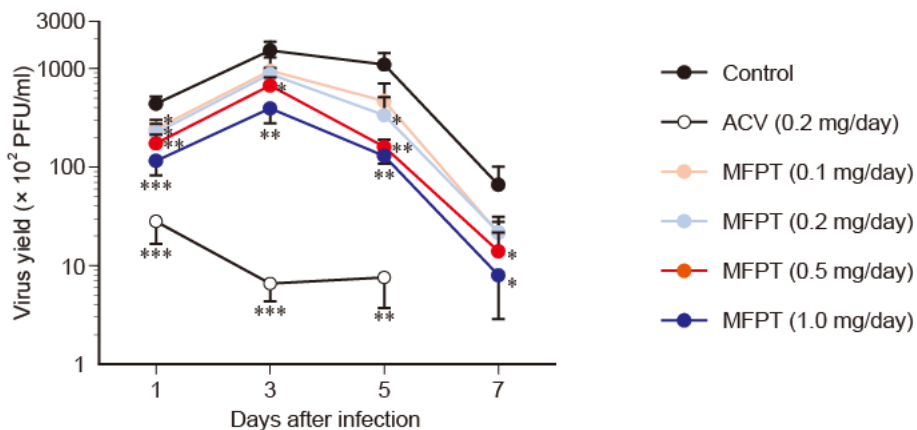


Fig. 39. Virus yields on day 1 to day 7 in HSV-2-infected mice treated with MFPT or ACV. Mice pretreated with medroxyprogesterone 17-acetate were inoculated intravaginally with UW 268 strain of HSV-2. Data were expressed as the mean \pm SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control group.

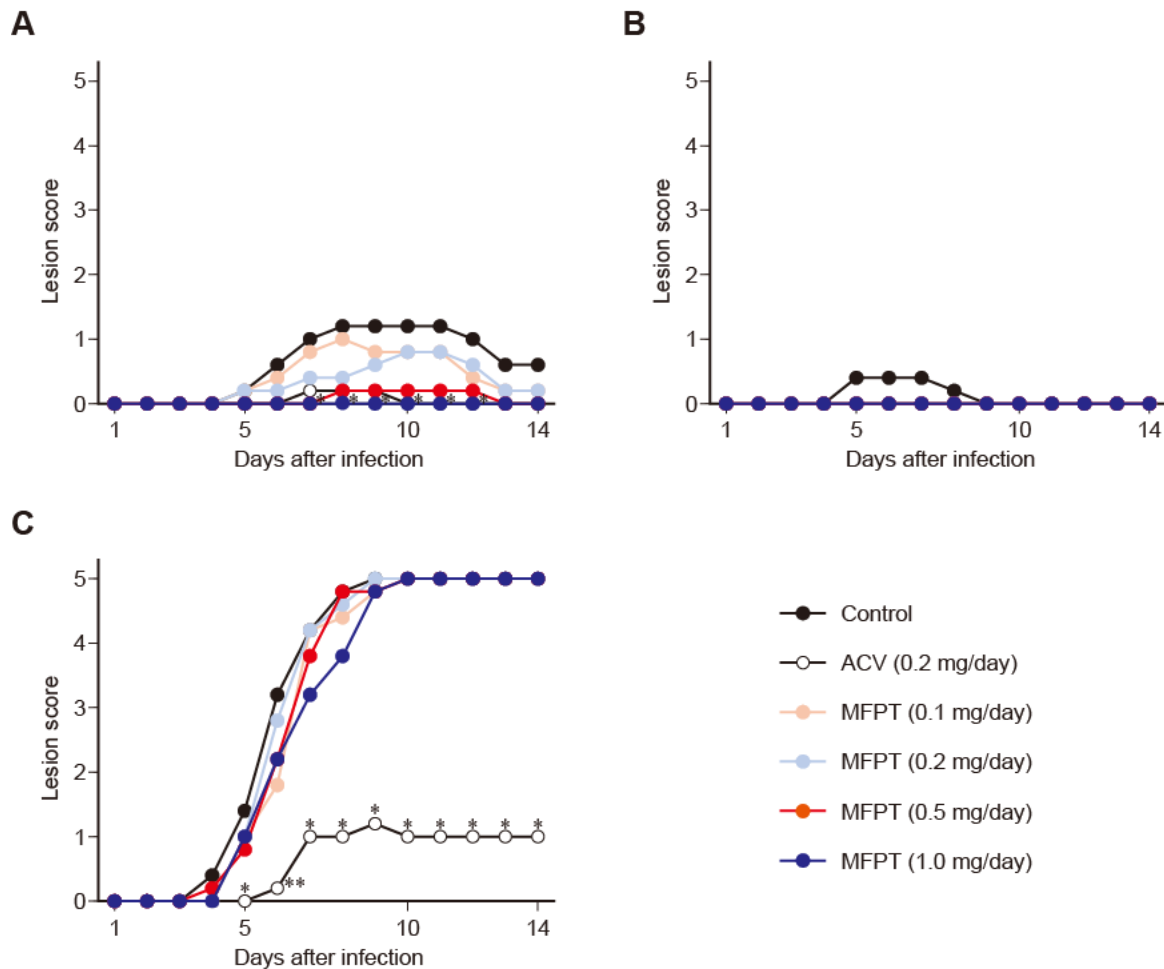


Fig. 40. Herpetic lesion scores in (A) KOS strain (HSV-1), (B) A4-3 strain (HSV-1) or (C) UW 268 (HSV-2)-infected mice. Each value was expressed as the mean. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control group.

HSV の感染によるマウスの発症の程度を発症スコアとして記録したところ、HSV-1 の KOS 株を感染させた時、対照群では感染 4 日後に発症スコアが増加し始めた。MFPT 投与群では、観察していた期間において対照群よりも発症スコアが低く、また発症する時期も遅かった。なお、1 mg/day で MFPT を投与した時は、観察期間を通じて無症状であった。ACV 投与群でも、80% (5 匹中 4 匹) のマウスが無症状であった (Fig. 40A)。

A4-3 株を感染させた場合は、対照群では感染 5~8 日後にわずかな発症スコアの上昇が見られたものの、その他の群では症状が見られなかった (Fig. 40B)。また、HF 株を感染させた場合は、いずれの群においても症状は見られなかった (data not shown)。

HSV-2 を接種した場合、対照群では感染 3 日後から発症スコアが上昇し始め、感染 9 日後には全例死亡した。MFPT 投与群では、対照群に比べて発症スコアの上昇はわずかに抑制されたものの、感染 10 日後までに全例死亡した。一方で ACV 投与群では、性器ヘルペスの症状は有意に抑制され、死亡したのは 5 匹中 1 匹のみだった (Fig. 40C)。

各ウイルス株を接種した時のマウスの死亡例ならびに死亡日を記録したところ、HSV-1 接種群ではいずれのウイルス株でも死亡例は観測されなかった (data not shown)。しかしながら、HSV-2 を接種した時は、Table 7 に示したような結果となった。対照群と MFPT 投与群はいずれも全例死亡しているものの、MFPT の投与によって生存期間はわずかに延長していた。しかし、濃度依存的な効果は見られなかった。

Table 7. Effects of topical application of MFPT or ACV on the survival rates in mice infected with HSV-2 (n=5 for each group)

	Survivors/total (%)	Day of death
Control	0/5 (0)	7, 7, 7, 8, 9
ACV	4/5 (80)	9
MFPT		
0.1 mg/day	0/5 (0)	7, 8, 9, 9, 10
0.2 mg/day	0/5 (0)	7, 8, 8, 9, 9
0.5 mg/day	0/5 (0)	7, 8, 8, 9, 10
1.0 mg/day	0/5 (0)	7, 8, 9, 9, 10

第三節 考察

以前の報告では、MFPT は *in vitro* において抗 HSV-1 活性 (HF 株) を有しており、その作用標的は、(1) ウイルス侵入の中程度の抑制、(2) 感染細胞におけるウイルス産生の抑制及び (3) 感染細胞からの子孫ウイルス放出の抑制に関わる、と報告していた。本研究で、MFPT は HF 株 (HSV-1) だけでなく、KOS 株 (HSV-1)、ACV 耐性株である A4-3 株 (HSV-1) 及び UW 268 株 (HSV-2) に対しても、*in vitro* における抗ウイルス活性試験において高い選択指数を示した。また、ACV 感受性株 (HF 株) と ACV 耐性株 (A4-3 株) の選択指数に大きな差がなく、かついずれのウイルス株も HSV-1 に属していることから、ACV 耐性株に対する作用標的は HF 株に対する作用標的と同じであると推察された。

MFPT が *in vitro* で様々な株に対して抗 HSV 活性を有することが確認できたので、次に *in vivo* における抗 HSV 活性を、性器ヘルペスモデルを用いて評価した。MFPT は ACV 耐性株も含めた 3 種の HSV-1 に対して、局所のウイルス量を濃度依存的に減少させ、特に 1 mg/day で経膈投与した時は対照群と比べてウイルス量を有意に減少させた。一方、HSV-2 に対しては、HSV-1 と比べると効果は低下していたものの、MFPT は濃度依存的に局所のウイルス量を減少させた。

感染部位である膈内に直接 MFPT を投与していることから、*in vivo* における 3 種の HSV-1 に対する作用メカニズムのほとんどは *in vitro* のそれと同様である可能性が考えられた。しかしながら、*in vitro* に比べて *in vivo* における抗 HSV 活性が弱かったことから、MFPT の作用メカニズムについてさらに検討する必要がある。

HSV-1 または HSV-2 を経膈接種すると、接種部位で炎症が誘導される。KOS 株を接種した時の発症スコアを見ると、PBS 投与群では、死亡したマウスはいなかったものの、マウスはわずかに炎症を起こしていた。一方で MFPT (1 mg/day) を投与した時の発症スコアは観察期間中を通してゼロであり、0.5 mg/day で MFPT を投与した場合でも 1 匹だけが炎症を起こすに留まった。したがって、MFPT は HSV-1 感染によって生じる炎症を広く抑制したと言える。

HSV-1 の接種に比べて、HSV-2 を接種した時は対照群において非常に重篤な症状が見られ、感染 9 日後までに全てのマウスが死亡した。一方で ACV 投与群では、感染 9 日後に 1 匹のマウスが死亡するに留まった。HSV-1 と HSV-2 の病原性は、本研究でも見られたようになりに異なることが報告されている [63]。そのため、少ない接種量 (2×10^4 PFU) にも関わらず HSV-2 は致死的な症状を示し、多い接種量 (5×10^5 PFU) にも関わらず HSV-1 は非常に穏やかな症状しか示さなかったと考えられる。

MFPT は、選択指数より判断すると *in vitro* では HSV-1 と HSV-2 に同程度の抗ウイルス活性を有していた。しかし、*in vivo* において MFPT は、HSV-1 に対してはウイルス量や発症を抑制した

が、HSV-2 に対しては治療効果が弱かった。この違いは、性器ヘルペスモデルにおける HSV-1 と HSV-2 の病原性の違いが主な原因と推察された。

結論として、MFPT は *in vitro* と *in vivo* の両方において ACV 感受性株及び ACV 耐性株の両方に対して阻害作用を示した。MFPT の HSV に対する作用メカニズムの更なる検討は必要であるものの、MFPT は ACV 耐性 HSV に対しても使用できる治療薬を開発するのに役立つと推察された。

第三章 ポリエチレンイミン SP-012 の抗 HSV 活性の評価

第一節 *In vitro* における SP-012 の抗 HSV 活性の評価

はじめに、HSV-1 (KOS 株) と HSV-2 (UW 268 株) を用いて、SP-012 の *in vitro* における抗 HSV 活性を評価した。抗 HSV 活性の評価は、 CC_{50} と IC_{50} の比、すなわち選択指数 (selectivity index, CC_{50}/IC_{50}) を算出して行った。

また、試料をウイルス感染と同時に加えた場合 (A 区) と、感染直後から加えた場合 (B 区) のそれぞれに対して、選択指数を求めた。A 区の場合にはウイルスの吸着・侵入段階から試料が存在するのに対して、B 区の場合には吸着後の増殖段階から試料が存在することになる。したがって、A 区における効果が B 区における効果よりも高い場合、試料はウイルスの吸着・侵入段階に少なくとも部分的に作用していると考えられる。一方、B 区における効果が A 区における効果と同等である場合、試料は宿主細胞内におけるウイルスの増殖過程に主として作用している可能性がある。

SP-012 は、宿主細胞である Vero 細胞に対して 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までは比較的毒性が低く、 CC_{50} は 310 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となった (Fig. 41, Table 8)。一方、 IC_{50} は、HSV-1 及び HSV-2 のそれぞれに対して、A 区では 2.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及び 2.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、B 区では 210 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及び 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、A 区と B 区で大きな差が見られた (Table 8)。その結果として、選択指数にも大きな差が見られ、SP-012 は B 区においては抗 HSV 活性が低く、A 区においては強い抗 HSV 活性があると判定した。このことから SP-012 はウイルスが細胞に吸着・侵入するのを阻害していることが示唆された。

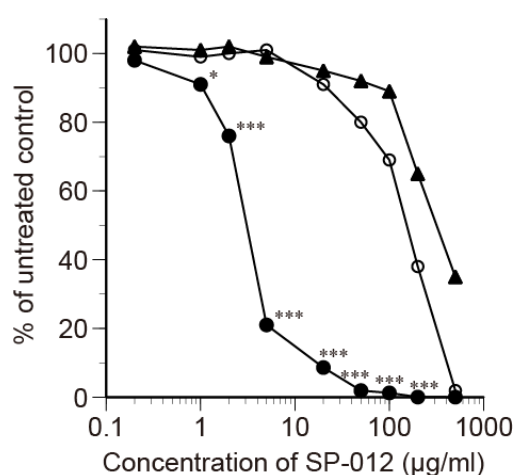


Fig. 41. Cytotoxic and antiviral activities of SP-012. Closed triangle, cytotoxicity was determined by culturing Vero cells for 3 days in the presence of different concentrations of SP-012, and the CC_{50} was calculated. The antiviral activity was determined by plaque yield reduction assay after HSV-2-infected Vero cells were treated with SP-012 from the virus infection (closed circle) or immediately after infection (open circle), and the IC_{50} was calculated. Data were expressed as the mean of triplicate assays. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. the IC_{50} of drug treatment immediately after infection.

Table 8. Anti-HSV-1 and -HSV-2 activities of SP-012

Virus	Cytotoxicity (CC ₅₀ , µg/ml)	Antiviral activity (IC ₅₀ , µg/ml)		Selectivity index (CC ₅₀ /IC ₅₀)	
		A ¹⁾	B ²⁾	A	B
HSV-1	310	2.6	210	119	1.5
HSV-2	310	2.9	150	107	2.1

Each value was the mean of triplicate assays.

¹⁾ SP-012 was added to the medium during viral infection and throughout the incubation thereafter.

²⁾ SP-012 was added to the medium immediately after infection.

第二節 SP-012 の抗 HSV 作用標的の検討

続いて、HSV-2 の増殖段階に対する SP-012 の作用標的を推定するために、SP-012 の添加時期を変えて行う、time-of-addition 実験を行った。本実験では Vero 細胞に HSV-2 を 10 PFU/cell で感染させた [この条件では全ての細胞にウイルス感染が起こる (data not shown)]。この時、SP-012 を感染 6 時間前から感染前まで、感染 3 時間前から感染前まで、感染中のみ、感染直後 (感染 0 時間後) から、または感染 6 時間後から加えた。感染 20 時間後に培養上清を収穫し、プラークアッセイによりウイルス量を求めた。この時、SP-012 無添加時のウイルス量を 100% として、SP-012 のウイルス増殖抑制効果を評価した。

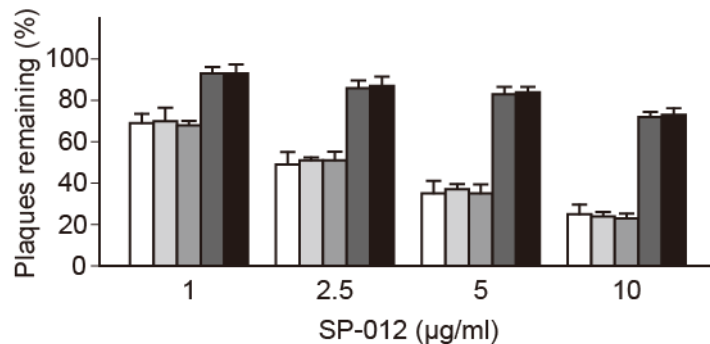


Fig. 42. The effects of time-of-addition of SP-012 on HSV-2 replication. SP-012 was added at 6 h (open column) or 3 h (light grey column) prior to infection, during infection (grey column), immediately after infection (dark grey column) or 6 h post-infection (closed column).

その結果、宿主細胞を SP-012 で前処理した場合と、SP-012 を感染中に加えた場合は濃度依存的にウイルス量が抑制された。しかし、感染後 (感染 0 及び 6 時間後) に SP-012 を添加した場合は、ウイルス増殖はほとんど抑制されず、強い抗 HSV-2 活性を示さなかった (Fig. 42)。このことから、SP-012 はウイルスの吸着・侵入段階に関与するだけでなく、宿主細胞との相互作用や宿主細胞内に取り込まれることによって抗 HSV-2 活性をもたらすことが示唆された。

SP-012 は、ウイルス感染中のみ存在した場合に抗 HSV-2 活性を示したことから、少なくともウイルスの吸着・侵入段階に干渉すると考えられる。そこで、宿主細胞へのウイルス吸着と、その後起こる細胞内へのウイルス侵入に及ぼす SP-012 の効果を検討した。

吸着阻害試験では、冷却した Vero 細胞に HSV-2 及び SP-012 (いずれも冷却済み) を加えて、4 °C で感染させた。感染後、未吸着のウイルス及び SP-012 を除去して、プラークアッセイに供した。4 °C に保つことで、ウイルスの吸着は起こるが侵入は起こらないため、試料の吸着阻害効果を評価することができる。SP-012 無添加区のプラーク数を 100% として、SP-012 添加区のプラークの % を計算した。その結果、SP-012 は濃度依存的に吸着阻害効果を示した (Fig. 43A)。

侵入阻害試験では、4 °C で Vero 細胞に HSV-2 を感染 (吸着) させた後、未吸着のウイルスを除去し、SP-012 含有培地を加えて、ただちに 37 °C に移してウイルスの侵入を開始させた。37 °C に移して一定時間後、クエン酸緩衝液で処理して未侵入のウイルスを不活化し、侵入したウイルスをプラークアッセイで定量した。その結果、SP-012 はその濃度に関わらず、顕著なウイルス侵入阻害効果を示さなかった (Fig. 43B)。

以上の結果から、SP-012 の作用標的は、宿主細胞表面へのウイルスの吸着段階であることが推察された。

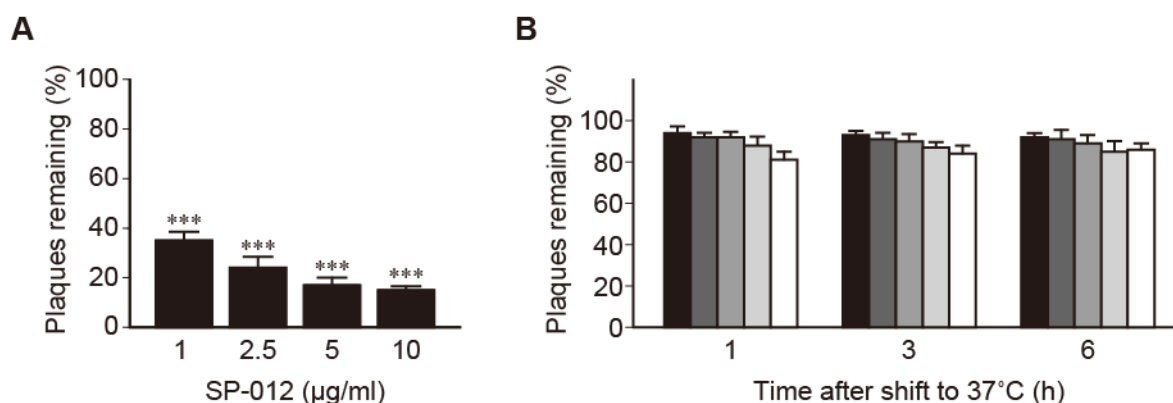


Fig. 43. The effects of SP-012 on early events in HSV-2 replication. (A) Effects of SP-012 on HSV-2 adsorption to Vero cells were determined by an infectious center assay. *** $p < 0.001$. (B) Effects of SP-012 on HSV-2 entry were determined by plaque assay. SP-012 was added at the concentration of 0 (closed column), 1 (dark grey column), 2.5 (grey column), 5 (light grey column) or 10 µg/ml (open column).

続いて、SP-012 の殺ウイルス活性を調べた。殺ウイルス活性とは、試料がウイルスに直接作用して、その感染力を消失させる作用のことである。カチオン性の SP-012 がウイルスのエンベロープに存在する負電荷を帯びた糖タンパク質とイオンの結合すると、このような殺ウイルス効果が生じることが期待できる。

殺ウイルス活性試験では、HSV-2 と SP-012 を混合し、37 °C または 4 °C で一定時間処理した。その後、混合液を希釈することによって、残存する被験物質 (SP-012) の濃度をウイルスの増殖に影響しない濃度にまで低下させ、その後この希釈液をプラークアッセイに供した。

その結果、SP-012 を加えなくても、37 °C で処理した場合には、HSV-2 は時間依存的に不活化されていた。一方、4 °C で処理した場合は、顕著なウイルスの不活化は見られなかった。SP-012 で処理した場合は、37 °C 及び 4 °C のいずれにおいても、濃度依存的かつ処理時間依存的に HSV-2 を不活化した (Fig. 44)。

したがって、SP-012 はウイルスの吸着段階を阻害するとともに、ウイルスを不活化することで抗 HSV-2 活性を示すと考えられた。

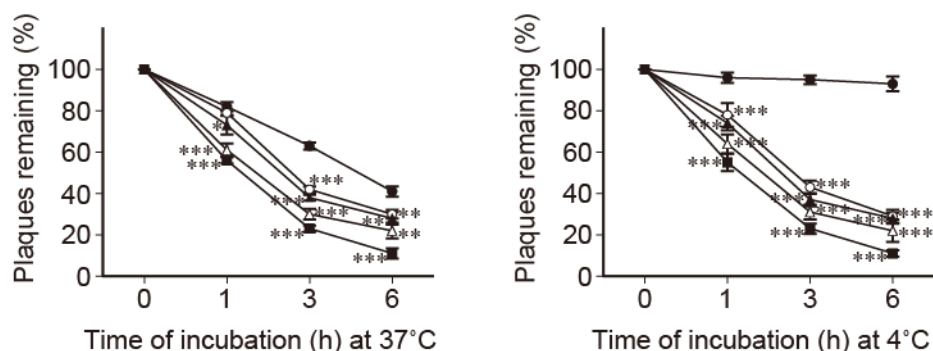


Fig. 44. The virucidal activity of SP-012 was evaluated by incubation of HSV-2 in the presence of 0 (closed circle), 1 (open circle), 2.5 (closed triangle), 5 (open triangle) or 10 µg/ml (closed square) of the compound at 37 °C (A) or 4 °C (B) for the times indicated. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. no-drug control.

次に、HSV-2 が感染細胞から隣接する非感染細胞へと伝播する方法の 1 つである cell-to-cell spread に対して、SP-012 が阻害的に作用するかどうかを、plaque size-reduction assay によって検討した。具体的には、Vero 細胞に HSV-2 を感染させて、種々の濃度の SP-012 を加えたプラークアッセイ用培地を重層してインキュベートし、2 日後にプラークを固定して、プラークの直径を測定した。本実験では、各濃度において 20 個のプラークの直径を測定した。その結果、Table 9 に示したように、SP-012 は濃度依存的に HSV-2 のプラークの直径を減少させた。

したがって、SP-012 は、吸着阻害効果と殺ウイルス活性に加えて、HSV-2 の cell-to-cell spread も抑制することが示唆された。

Table 9. The inhibitory effect of SP-012 on cell-to-cell spread of HSV-2 infection

	Concentration of SP-012 (µg/ml)	Plaque size (mm)	
		Range	Mean ± SD
#1	0	1.22 – 1.70	1.50 ± 0.16
#2	1	1.01 – 1.33	1.13 ± 0.088 ^a
#3	2.5	0.83 – 1.09	0.95 ± 0.096 ^{a,b}
#4	5	0.77 – 1.11	0.94 ± 0.11 ^{a,b}
#5	10	0.76 – 1.02	0.90 ± 0.087 ^{a,b}

^a $p < 0.001$ vs. #1, ^b $p < 0.001$ vs. #2

SP-012 がどのようにして抗 HSV-2 活性を示すのかをさらに明らかにするために、宿主細胞における SP-012 の挙動を経時的に観察することにした。具体的には、Alexa Fluor 488 で標識した SP-012 (FI-SP-012) で Vero 細胞を 5 分間処理後、FI-SP-012 を含まない培地に交換して一定時間インキュベートし、細胞を固定処理した。その後、蛍光顕微鏡下で FI-SP-012 の細胞内での挙動を観察した。さらに、FI-SP-012 の抗 HSV-2 活性を調べた。

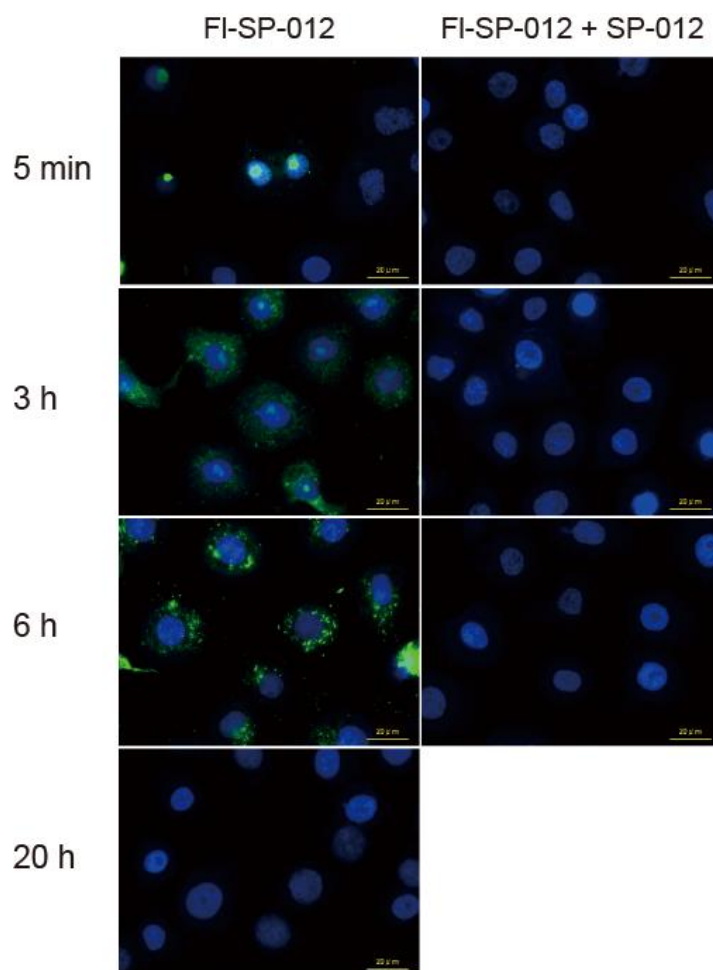


Fig. 45. Microscopic images of fluorescent SP-012. FI-SP-012 (10 $\mu\text{g/ml}$) was added to Vero cells for 5 min alone or in the presence of a tenfold excess of unlabeled SP-012 (100 $\mu\text{g/ml}$). After removal of FI-SP-012, the cells were further incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ in the absence of SP-012, fixed at 5 min, 3 h, 6 h and 20 h after addition of SP-012, counterstained with DAPI, and examined by fluorescence. Scale bar = 20 μm .

その結果、FI-SP-012 添加 5 分後に、FI-SP-012 由来の緑色蛍光が宿主細胞の核内で確認された (Fig. 45)。したがって、FI-SP-012 は細胞内に迅速に取り込まれることが示唆された。添加 3 時間後には核内と細胞質の両方で蛍光が見られ、6 時間後には蛍光が細胞質に局限していた。添加 20 時間後には、細胞内に蛍光は観察されなかった (Fig. 45)。また、FI-SP-012 で処理する際に過剰な SP-012 を加えた時に緑色蛍光が全く観察されなかったことから、観察された緑色蛍光は非特異的なものではなく、FI-SP-012 由来の蛍光であることが確認された (Fig. 45, 右列)。

以上の結果より、SP-012 は細胞表面に結合してそこに保持されるのではなく、細胞内に迅速に取り込まれて核内に移動し、時間の経過とともに核外へと移動していくことが示唆された。また、FI-SP-012 はラベルしていない SP-012 とほぼ同程度の抗 HSV-2 活性を有していた (data not shown)。

既存の抗ヘルペスウイルス薬である ACV は耐性ウイルスの出現が問題となっている。そこで、SP-012 による耐性ウイルス出現の可能性を検討するために、SP-012 に長期曝露させたウイルスを作製し、そのウイルスの SP-012 に対する感受性を評価した。その際に、ACV を対照とした。

具体的には、SP-012 または ACV 存在下で HSV-2 を Vero 細胞に感染させて 10 回継代し、plaque purification 法によってそれぞれ 10 個のウイルスクローンを分離後、これらのクローンについて IC₅₀ を算出し、野生型ウイルスのものと比較した。

その結果、ACV については、野生型ウイルスの IC₅₀ (0.74 µg/ml) と比べると、試験した全てのウイルスクローンの IC₅₀ はその 100 倍以上であった。したがって、ACV 存在下で継代することで ACV 耐性ウイルスが生じた。一方、SP-012 については、野生型ウイルスの IC₅₀ (4.1 µg/ml) とウイルスクローンの IC₅₀ は同程度であり、感受性の低下は見られなかった (Fig. 46)。

したがって、SP-012 の長期投与による耐性ウイルス出現の可能性は低いことが示唆された。

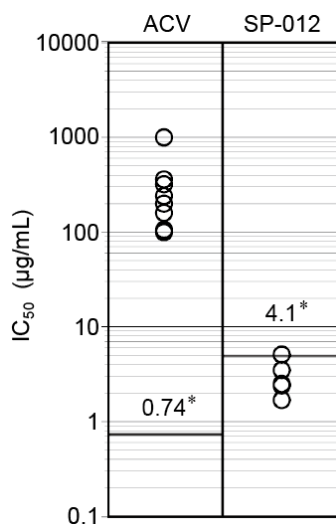


Fig. 46. Sensitivity test of drug-treated virus clones. Ten virus clones recovered from 10 passages in the presence of SP-012 or ACV were tested for sensitivity to the corresponding drugs. Data points represent the IC₅₀ value of each virus clone. *, IC₅₀ value of wild-type virus without drug treatment.

第三節 HSV 感染動物モデルにおける SP-012 の治療効果

SP-012 は *in vitro* で抗 HSV 活性を示したので、続いて性器ヘルペスモデルマウスを用いて、SP-012 の *in vivo* における抗 HSV 活性を調べた。

まず、局所での SP-012 の効果持続時間を確かめるために、マウスに SP-012 を経膣投与し (0.2 mg/20 μ l), 一定時間後に膣内洗浄液を採取して、これを HSV-2 を感染させた Vero 細胞に加えてインキュベートした。24 時間後の培養上清をプラークアッセイに供し、洗浄液の HSV-2 増殖抑制効果を求めた。その結果、SP-012 投与 9 時間後には抗ウイルス活性が約 50% となり、15 時間後には抗ウイルス活性がほとんどなくなることが確認された (data not shown)。したがって、SP-012 の影響を避けるために、ウイルス量測定のための膣内洗浄液を採取する時期は、SP-012 の投与から 15 時間以上経過後に行うことにした。

性器ヘルペスモデルマウスに対する SP-012 の効果を調べるために、BALB/c マウスに medroxyprogesterone 17-acetate を感染 6 日前及び 1 日前に皮下投与して、マウスのウイルスに対する感受性を高めた [62]。マウスに HSV-1 (KOS 株) または HSV-2 (UW 268 株) を膣内接種し (いずれも 1×10^4 PFU/20 μ l/mouse), SP-012 または ACV を 1 日 2 回、感染 1 時間後から 7 日後まで、または感染 24 時間後から 7 日後まで経膣投与した。SP-012 と ACV の投与量は、いずれも 10 mg/kg/day (20 μ l/mouse \times 2 回) とした。対照群には、同じスケジュールで生理食塩水を経膣投与した。感染 3 日後に膣内洗浄液を採取し、プラークアッセイによりウイルス量を測定した。また、2 週間に渡って死亡例及び発症の程度を表す発症スコア (Fig. 37) を記録した。

HSV-1 をマウスに感染させた時、SP-012 を感染 1 時間後から投与すると感染 3 日後におけるウイルス量は有意に減少し、ACV を投与した時とほとんど同じであった (Fig. 47A)。また、SP-012 投与群の発症スコアは、対照群及び ACV 投与群よりも低く (Fig. 47B), 生存率も 100% であった (Table 10)。しかしながら、SP-012 を感染 24 時間後から投与すると治療効果が低下し、感染 1 時間後から投与した場合と比べて感染 3 日後の膣内のウイルス量は多く (Fig. 47A), 発症スコアも高くなり (Fig. 47C), 生存率も減少した (Table 10)。

HSV-1 と同じウイルス量の HSV-2 をマウスに感染させた時は、マウスはより重篤な性器ヘルペスの症状を示した。対照群では、投与開始時期が異なるいずれの実験群でも、感染 8 日後までに全てのマウスが死亡した (Fig. 47E ~ F, Table 10)。一方、SP-012 を感染 1 時間後から投与することで、感染 3 日後のウイルス量は対照群と比べて有意に減少し、また発症スコアも低く、その生存率は 80% であった (Fig. 47D ~ F, Table 10)。しかしながら、SP-012 を感染 24 時間後から投与すると、HSV-1 を接種した時と同様に治療効果は低下した。

したがって、SP-012 は HSV-1 と HSV-2 の両ウイルスによる性器ヘルペスに対する治療効果を

有しているものの、十分な効果を得るには、感染後、早期に投与を開始する必要があることが明らかとなった。

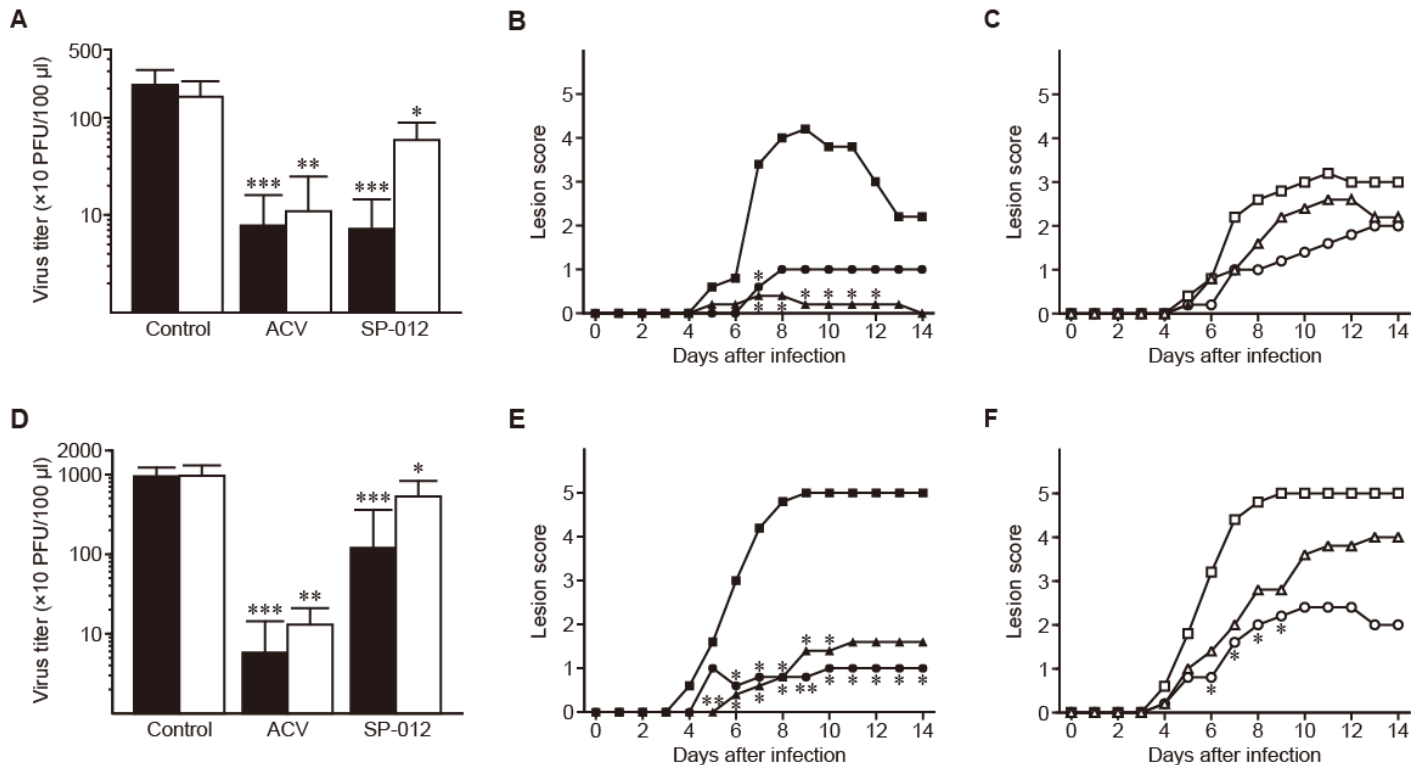


Fig. 47. Therapeutic effects of SP-012 in mice. BALB/c mice were given SP-012 or ACV intravaginally twice a day starting from 1 h post-infection (p.i.) or 24 h p.i. with 1×10^4 PFU HSV-1 or HSV-2 until 7 days p.i. (A) Effects of SP-012 and ACV on HSV-1 shedding from mouse vaginal mucosa were determined by plaque assay at 3 days p.i. The compounds were administered from 1 h (closed column) or 24 h p.i. (open column). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control group. (B) Herpetic lesion scores in HSV-1-infected mice. Saline (closed square), SP-012 (closed triangle) and ACV (closed circle) were given from 1 h p.i. Each value was the mean for five animals. * $p < 0.05$ vs. control group. (C) Herpetic lesion scores in HSV-1 infected mice. Saline (open square), SP-012 (open triangle) and ACV (open circle) were given from 24 h p.i. Each value was the mean for five animals. (D) Effects of SP-012 and ACV on HSV-2 shedding were determined at 3 days p.i. The compounds were administered from 1 h (closed column) or 24 h p.i. (open column). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control group. (E) Herpetic lesion scores in HSV-2-infected mice. Saline (closed square), SP-012 (closed triangle) and ACV (closed circle) were given from 1 h p.i. Each value was the mean for five animals. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control group. (F) Herpetic lesion scores in HSV-2-infected mice. Saline (open square), SP-012 (open triangle) and ACV (open circle) were given from 24 h p.i. Each value was the mean for five animals. * $p < 0.05$ vs. control group.

Table 10. Survival rates of mice infected with HSV-1 or HSV-2

Treatment	Time of application (post-infection)	Survivors/total (%)	
		HSV-1	HSV-2
Control	1 h – 7 d	3 / 5 (60)	0 / 5 (0)
SP-012	1 h – 7 d	5 / 5 (100)	4 / 5 (80)
ACV	1 h – 7 d	4 / 5 (80)	4 / 5 (80)
Control	24 h – 7 d	2 / 5 (40)	0 / 5 (0)
SP-012	24 h – 7 d	3 / 5 (60)	1 / 5 (20)
ACV	24 h – 7 d	3 / 5 (60)	3 / 5 (60)

また、HSV-2 に感染し、SP-012 を投与されて生き残ったマウスから腰仙部の後根神経節を採取して DNA を抽出し、PCR によって HSV-2 に特異的な *tk* 遺伝子がこの DNA 中に含まれているかどうか確認した。結果、*tk* 遺伝子に由来する PCR 産物 (バンド) が検出されなかったことから (data not shown), HSV-2 は仙骨神経節に到達していないことが示唆された。また、このことから SP-012 投与群では潜伏感染が起きていないものと考えられた。

第四節 考察

本研究では分岐型の PEI である SP-012 の抗 HSV 活性を評価した。In vitro において SP-012 をウイルス感染と同時に添加した時、HSV-1 及び HSV-2 に対する SP-012 の選択指数はそれぞれ 119 及び 107 であった。Spoden らにより、SP-012 とは異なる別の直鎖状の PEI (25 kDa) のヒトサイトメガロウイルス及びヒトパピローマウイルスに対する選択指数はそれぞれ 32.4 及び 212 であり、その作用メカニズムは SP-012 と同様に細胞表面へのウイルスの吸着阻害であったことが報告されている [37]。一般的に、PEI を含めたポリカチオン性の物質は細胞表面にあるヘパラン硫酸プロテオグリカン (heparan sulfate proteoglycans; HSPGs) と結合能を有することから、PEI と HSPG 分子との相互作用が PEI の抗ウイルス活性の発現に重要と考えられる [64]。これは、SP-012 の選択指数が抗ウイルス活性試験の B 区において非常に低下したことから、SP-012 が宿主細胞へのウイルスの侵入を阻害しなかったことから支持される結果であった。

症状の有無に関わらず HSV-2 による性器ヘルペスでは、局所において持続的な炎症や免疫細胞の浸潤が促進されており、これが HSV-2 血清陽性患者における HIV の感染成立と伝播の亢進につながっていると考えられる [20,65]。実際、抗ヘルペスウイルス薬を投与することで血漿中の HIV-1 の量と、性器における HIV-1 の放出の頻度と量が低下したことが報告されている [66]。しかしながら、アフリカとペルーで行われた大規模な臨床試験では、HSV-2 血清陽性患者に ACV を投与しても、HIV-1 の感染成立と伝播が減少しなかったことが示された [67-69]。この結果は、少なくとも一部は、殺ウイルス活性を持たない ACV が HSV-2 の感染を完全に防ぐことができなかったことに起因すると考えられる。したがって、局所でウイルスを不活化する抗ウイルス薬の開発は重要であり、そのような薬剤は HSV-2 を含めた性感染症の治療において非常に有益と考えられる [70]。本研究において、SP-012 は HSV-2 に対して殺ウイルス活性を示した。37 °C という高い温度では、SP-012 で処理していないウイルスも自然と不活化されていった。これは、ウイルスのタンパク質と核酸の変化が病原体の不活化をもたらしたと推察される [71]。同じ条件で SP-012 を添加すると、無添加時よりもウイルスはより迅速に不活化されていった。したがって、ウイルス粒子が存在する局所に SP-012 を投与することによって治療効果が高まる可能性が考えられた。

ACV を使った HSV の治療における問題の 1 つとして薬剤耐性ウイルスの出現が挙げられ、これは特に免疫機能が低下した患者において深刻な問題となる [26]。抗がん剤化学療法や臓器移植例の増加によって免疫機能が低下した患者の数が増えており、このような患者においては HSV の回帰発症をコントロールするために ACV 等を用いた治療が長期的になることが予想される。そうなれば、薬剤耐性ウイルスが出現し、回帰発症をコントロールする上で懸念が生じる。本研究においても、in vitro において ACV 耐性ウイルスが容易に得られた。Fig. 46 では、ACV 存在下で 10 回

継代して得られたウイルスクローンの ACV に対する感受性の低下を示したが、5 回の継代で既に ACV に対する感受性が低下していたことも確認している (data not shown)。したがって、ACV と作用メカニズムが異なり、かつ薬剤耐性が生じにくい治療薬の開発が求められている。SP-012 は ACV と作用メカニズムが異なり、かつ薬剤耐性ウイルスが出現しにくいことから、非常に有望な HSV の治療薬の候補となると推察された。

ウイルス粒子の不活化、宿主細胞へのウイルスの吸着阻害及び cell-to-cell spread の抑制をもたらしたことから、SP-012 は、宿主細胞の外側または細胞表面で起こるイベントを標的としていることが明らかとなった。この時、細胞表面において HSPGs は PEI と相互作用する因子であり、また HSV-2 の糖タンパク質 D (glycoprotein D; gD) は cell-to-cell spread に必要であることがそれぞれ報告されている [64,72]。これらのことから、SP-012 と、HSPGs 及び gD の両方またはいずれか一方との相互作用が、HSV-2 の cell-to-cell spread の抑制に寄与していると推察される。また、HSV-2 のウイルス粒子の表面は gD を含めた糖タンパク質によって負電荷を帯びていることから、カチオン性の SP-012 がウイルスの糖タンパク質と静電的に相互作用したことにより、ウイルス粒子が細胞表面に結合するのが妨害され、その結果ウイルス粒子の不活化をもたらしたと考えられた。PEI の一種でコーティングしたポリエチレン製スライドにインフルエンザウイルスを接触させると、ウイルス粒子が PEI に不可逆的に接着し、その構造にダメージが生じて不活化され、その後ウイルス RNA が放出されることが報告されていることから [73]、SP-012 で処理した HSV においてもこれと同様の現象が起きた可能性がある。

Fig. 45 で示したように、SP-012 は迅速に Vero 細胞の核内に取り込まれた。これは、PEI に共通する強力な DNA 結合能に依るものと考えられる [32,33]。Seib らは、分岐型の PEI が主にコレステロール依存的な経路によって細胞内に取り込まれ、その後 60 分間は明らかな細胞外への放出が見られなかったことを報告している [74]。SP-012 も分岐型の PEI であることから、これと同じ経路で細胞内に取り込まれたと考えられる。そして、今回の実験結果から、SP-012 も 1 時間以上細胞内に留まることが観察された。

Time-of-addition 実験や Table 8 の B 区の結果から、SP-012 は HSV-2 が感染した細胞内で起こる増殖過程にはほとんど効果がないことが示された。したがって、SP-012 は経口的に投与するよりも、ウイルス粒子が存在する局所に投与する方が有利と考えられる。また、局所投与であれば必要とされる濃度の SP-012 を維持するのが容易であるという点でも有利と考えられる。

In vitro での PEI の抗ウイルス活性は既にいくつか報告されているが、動物モデルで PEI の効果を評価した報告は我々の知る限りではないようである。しかしながら、治療薬の開発において動物モデルで試料の効果を評価することは重要である。したがって、本研究では *in vitro* 試験だけでなく、HSV-1 や HSV-2 による性器ヘルペスモデルを用いて SP-012 の治療効果を検討した。その結果、SP-012 を ACV と同量で感染 1 時間後からマウスに局所投与した時、局所におけるウイルス

量は減少し、生存率は上昇した。一方、感染 24 時間後から SP-012 を投与した時は、治療効果はかなり減少した。これは、ウイルス感染の初期段階、すなわち局所粘膜にウイルスが結合するのを阻害するには投与するタイミングが遅すぎたことが原因と考えられる。

本研究では、非常に強いカチオン性を有する SP-012 の局所投与が、HSV-1 及び HSV-2 による性器ヘルペスに対して ACV に匹敵する治療効果を示すという結果が得られた。SP-012 は多様な化学修飾の過程を持っており、製造業者の情報によると安全性も確かめられている。また、SP-012 が水溶性であることを考慮すると、局所においてより長く留まることができるような媒体と組み合わせることでさらに治療効果が高まることが期待できる。

結 論

1. MFPT 耐性ウイルスは, *in vitro* で増殖能が低下し, マウス感染モデルで病原性が低下していた。また, MFPT 耐性ウイルスを接種されたマウスでは野生型ウイルスに対する抗体が十分に産生されていたことから, MFPT 耐性ウイルスを弱毒生ワクチンとして使用できる可能性が示された。
2. MFPT 耐性ウイルスには共通して NS1 に P164S 変異が導入されていた。そして, MFPT 耐性ウイルス感染細胞で PI3K/Akt シグナル伝達経路の活性化が抑制されていたのは, この変異によって NS1 と PI3K との相互作用が減弱したためと推察された。
3. MFPT 耐性ウイルス感染細胞ではアポトーシスの進行が抑制されていた。感染後期におけるアポトーシスの進行は子孫ウイルスの効率よい産生に必要であることから, MFPT 耐性ウイルスの増殖能の低下はこれに依るものと考えられた。
4. IAV 感染時に MFPT を添加すると PI3K/Akt シグナル伝達経路の活性化が抑制され, 感染細胞のアポトーシスが抑制されていたことから, MFPT は, NS1 がこのシグナル伝達経路を活性化するのを阻害することで抗 IAV 活性を示すことが示唆された。また, MFPT 耐性ウイルスに導入された変異 (NS1 の P164S 変異) は, IAV が MFPT 存在下の環境に順応するために生じたものと推察された。
5. MFPT は, *in vitro* において, ACV 耐性株を含めた抗 HSV-1 活性及び抗 HSV-2 活性を示した。
6. MFPT は, 性器ヘルペスモデルマウスにおいて, ACV 耐性株を含めた HSV-1 の局所におけるウイルス量を濃度依存的に減少させた。一方, HSV-2 に対しては, HSV-1 よりも効果は低下していたものの, 濃度依存的に局所におけるウイルス量を減少させた。
7. SP-012 は, *in vitro* において, HSV-1 及び HSV-2 に対して強い抗ウイルス活性を示した。また, 種々の実験の結果から, SP-012 はウイルスの吸着段階及び cell-to-cell spread に阻害的に作用するとともに, ウイルスを不活化することで抗 HSV 活性を示すと考えられた。
8. SP-012 は, ACV とは異なり, 長期投与時にも薬剤耐性ウイルスが生じにくいことが示唆された。
9. SP-012 は, 性器ヘルペスモデルマウスにおいて, HSV-1 と HSV-2 のいずれに対しても治療効果を示した。しかしながら, 十分な治療効果を得るには感染後できる限り早期に投与する必要があることが明らかになった。また, SP-012 投与群では HSV-2 の潜伏感染が起きていないものと考えられた。

実験の部

使用した機器

- 1) CO₂ インキュベータ: CO₂ INCUBATOR MCO-17AIC (SANYO),
CO₂ INCUBATOR MCO-175 (SANYO)
- 2) 吸光度測定: UV-1800 spectrometer (HITACHI)
- 3) Thermal cycler: icycler (BIO-RAD)
- 4) 塩基配列解読装置: ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems),
Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
- 5) リアルタイム定量 PCR システム: Mx3005P (Agilent Technologies)
- 6) 蛍光顕微鏡: BZ-8000 (Keyence), HSBZ-9000 (Keyence)

実験材料

- 1) 細胞 (IAV 実験用): MDCK 細胞 (Madin-Darby canine kidney cell: イヌ正常腎細胞由来)
- 2) 細胞 (IAV 実験用): AX-4 細胞 [38,39]
Human β -galactoside α -2,6-sialyltransferase I がコードされた ST6Gal-I 遺伝子を含んだプラスミドで形質転換した MDCK 細胞で、細胞増殖用培地に puromycin (7.5 μ g/ml) を加えることでプラスミドのセレクションをかけた。
- 3) 細胞 (HSV 実験用): Vero 細胞 (Africa green monkey kidney cell: アフリカミドリザル腎細胞由来)
- 4) (1R,2R)-1-(5'-methylfur-3'-yl)propane-1,2,3-triol (MFPT):
Streptomyces sp. strain FV60 の培養上清から単離されたもの及び有機合成されたもの (松谷先生らにより合成・供与された)。
- 5) ポリエチレンイミン: 日本触媒社製 Epomin SP-012[®]
Epomin SP-012[®] (平均分子量: 3610, ゲル浸透クロマトグラフィーにより決定された [75]) は株式会社日本触媒より提供していただいた。
- 6) A 型インフルエンザウイルス: NWS 株 [A/NWS/33 (H1N1)]
- 7) 単純ヘルペスウイルス 1 型 (herpes simplex virus type-1; HSV-1):
KOS 株 (ACV 感受性株), A4-3 株 (ACV 耐性株) [61], HF 株 (ACV 感受性株)
- 8) 単純ヘルペスウイルス 2 型 (herpes simplex virus type-2; HSV-2): UW 268 株

使用した培地

基本培地: MEM + 0.15% NaHCO₃ + 0.3 mg/ml L-glutamine +
0.057 mg/ml ペニシリン G カリウム + 2.5 µg/ml ファンギゾン

細胞増殖用培地: 基本培地 + 5% 牛胎児血清

IAV プラークアッセイ用寒天培地:

100 ml = [2 × MEM + 0.15% NaHCO₃ + 0.3 mg/ml L-glutamine + 0.5% BSA (bovine serum, albumin) +
0.5 µg/ml ファンギゾン + 1 µg/ml アセチルトリプシン] 50 ml +
[1.6% 寒天水溶液] 50 ml

HSV プラークアッセイ用培地:

MEM + 0.8% メチルセルロース + 2% 牛胎児血清

MFPT 耐性ウイルスの作製

NWS 株を PBS (phosphate-buffered saline) で 2×10^5 PFU (plaque-forming unit)/ml に調製し、48 well plate に培養した MDCK 細胞に室温で感染させた (50 µl/well)。1 時間後、ウイルス液を除去した後、終濃度が 2 mM となるように MFPT を加えた細胞増殖用培地を 200 µl/well で加えて、CO₂ インキュベータ (37 °C, 5% CO₂) で 1 日培養した。その培養上清を P1 ウイルス液として、-80 °C に保存した。48 well plate に新たに調製した MDCK 細胞に、P1 ウイルス液を PBS で 10 倍希釈し、室温で感染させた (100 µl/well)。1 時間後、先と同様に終濃度が 2 mM となるように MFPT を加えた細胞増殖用培地で 1 日培養し、得られた培養上清を P2 ウイルス液とした。この操作を最終的に計 10 回繰り返す、MFPT 存在下で 10 代培養したウイルス液 (P10) を得た。

P10 ウイルスのクローニング (plaque purification 法)

P10 ウイルス液を PBS で $10^1 \sim 10^5$ 倍希釈し、35 mm dishes に培養した MDCK 細胞に室温で感染させた (100 µl/dish)。1 時間後、IAV プラークアッセイ用寒天培地を重層し (2 ml/dish)、CO₂ インキュベータで 2 日間培養した。形成されたプラークから顕微鏡下でウイルスクローンを 20 個 (cl.1 ~ cl.20 とした) 採取後、細胞増殖用培地を入れたマイクロチューブに移し、-80 °C に保存した。

MFPT 耐性ウイルスクローンのストック液の調製とプラークアッセイ

100 mm dishes 培養した MDCK 細胞に、MFPT 耐性ウイルス (cl.1 ~ cl.10) を室温で感染させた (500 µl/dish, 2 dishes/clone)。1 時間後、細胞増殖用培地を 5 ml/dish 加えて、CO₂ インキュベータに置いた。1 ~ 2 日間培養して、十分な CPE (cytopathic effect, 細胞変性効果) を確認後、各クローンの培養上清を収穫し、-80 °C で保存し、ウイルスストック液とした。

上記ウイルスストック液の一部を PBS で $10^2 \sim 10^5$ 倍希釈してプラークアッセイを行った。すなわち、35 mm dishes に単層状に培養しておいた MDCK 細胞に 1 時間以上室温で感染 (100 μ l/dish) させた後、IAV プラークアッセイ用寒天培地を重層し (2 ml/dish), CO₂ インキュベータに入れ、培養した。2~3 日後にプラークの出現を確認した上で、培地を除去し、クリスタルバイオレット溶液 (20% エタノール 500 ml にクリスタルバイオレット 300 mg を加えたもの) で固定・染色後、顕微鏡下でプラークを数え、各クローンのストック液のウイルス量を測定した。

IAV のプラークサイズの比較

35 mm dishes に培養した MDCK 細胞または AX-4 細胞に、野生型 (WT) ウイルス (wild type virus: NWS 株) または MFPT 耐性ウイルス (cl.1) を 1×10^5 PFU/cell で感染させた (100 μ l/dish, 室温)。同時に、非感染細胞 (mock) には PBS を 100 μ l/dish 加えた。1 時間後、IAV プラークアッセイ用寒天培地を重層し (2 ml/dish), CO₂ インキュベータに入れて培養した。培養 72 時間後に培地を除去し、クリスタルバイオレット溶液 (20% エタノール 500 ml にクリスタルバイオレット 300 mg を加えたもの) で細胞を固定・染色後、プラークの形態を撮影した。

In vitro における IAV の増殖能の検討

48 well plates に培養した MDCK 細胞に、WT ウイルスまたは MFPT 耐性ウイルス (cl.1 ~ cl.10) を室温で感染させた (1 PFU/cell)。1 時間後、ウイルス液を除去し、PBS を加えて 1 回洗浄後、細胞増殖用培地を加えて CO₂ インキュベータに入れ 30 分間インキュベートした。細胞増殖用培地を除去後、40 mM クエン酸緩衝液 (pH 3.0) を加え室温で 1 分間処理して、未侵入のウイルスを不活化した。この緩衝液を除去し、細胞増殖用培地で 1 回洗浄した後、新しい細胞増殖用培地を加えて (200 μ l/well), CO₂ インキュベータ中で培養した。0, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 時間後に培養上清を採取した。この上清を PBS で適宜希釈し、プラークアッセイ法によりウイルス量を測定した。

In vivo における IAV の病原性の評価

この動物実験は、富山大学動物実験取扱規程に従って実施した。

(1) IAV の接種

WT ウイルス及び MFPT 耐性ウイルス (cl.1 ~ cl.7) を、PBS を用いて 2.0×10^6 PFU/ml に調製し、麻酔下で BALB/c マウス (♀, 5~6 週齢) (n=10) に、各ウイルス液を経鼻接種した (50 μ l/mouse)。

(2) 肺及び気管・気管支洗浄液中のウイルス量の測定

感染 3 日後、各群につき 5 匹のマウスから肺及び気管・気管支洗浄液 (bronchoalveolar lavage

fluids; BALF) を採取した。ウイルスの定量はプラークアッセイ法で行った。肺の場合は、1 mg に対して PBS を 1 μ l 加えてソニケーション処理後 10 分間遠心 (4 °C, 3000 rpm) し、その上清を $10^1 \sim 10^5$ 倍希釈してプラークアッセイに供した。BALF の場合は PBS で $10^1 \sim 10^4$ 倍希釈したものを使用した。

(3) 体重の測定と生存率の記録

ウイルス接種日を 0 日目として、14 日目までのマウスの体重を、各群 5 匹ずつ毎日測定した。また、同時にマウスの生死を 14 日目まで観察した。

致死量 IAV の再感染と中和抗体価の測定

(1) 致死量の WT ウイルスの再感染

先の実験で生存したマウスに対して、感染 32 日後に 1.0×10^6 PFU/50 μ l/mouse の WT ウイルスを麻酔下で経鼻接種した (初感染時の 10 倍量)。同時に、IAV に未感染のマウス (n=3) を新たに追加して、同様に経鼻接種した。

(2) 体重の測定と生存率の記録

再感染させた日を 0 日目として、14 日目までのマウスの体重を測定した。また、同時にマウスの生死を 14 日目まで観察した。

(3) 中和抗体価の測定

初感染から 3 週間後に、生存したマウスの尾静脈から採血して、そこから血清を分離した。中和抗体価は 50% plaque reduction assay によって測定した。すなわち、200 PFU/100 μ l に調製した WT ウイルス液と、PBS で段階的に希釈した血清を 1:1 で混合し、37 °C で 1 時間インキュベートした。対照として、WT ウイルス液と PBS を 1:1 で混合したものも同様に操作した。その後、35 mm dishes に単層状に培養した MDCK 細胞にその混合液 100 μ l を加えて、室温に 1 時間置いて感染させた後、IAV プラークアッセイ用寒天培地を加えてインキュベートし、2 日後にプラークをカウントした。WT ウイルスに対する中和抗体価は、PBS と混合させた時に見られたプラーク数を 100% として、プラーク数が 50% となる時の血清の希釈倍率で表した。

Direct sequencing による MFPT 耐性ウイルスのゲノム解析

(1) インフルエンザウイルス RNA の抽出

35 mm dishes に培養した MDCK 細胞に、WT ウイルスまたは MFPT 耐性ウイルス (cl.1 ~ cl.10) を室温で感染 (100 μ l/dish) 後、細胞増殖用培地を加え、1 日培養した。細胞培養上清 (140 μ l)

から、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN K.K.) を用いてウイルス RNA 溶出液を得た。

(2) RT-PCR による cDNA の合成

SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Life Technologies) を用いて、RNA 溶出液 (8 μ l) から相補的な DNA (complementary DNA; cDNA) を合成した。反応条件は、NITE/NIID のプロトコールを参考にした [40]。プライマーは、全遺伝子の 3' 末端の非翻訳領域に共通に存在する配列を基に作成した [41]。その詳細は Fig. 12 の通りである。

(3) インフルエンザウイルス遺伝子の PCR

cDNA 溶液 (1 μ l) から、GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega KK) を用いて PCR を行い、目的遺伝子の増幅を行った。PCR 反応条件は最初の熱変性の時間だけ 4 分長くとり、熱変性 (96 $^{\circ}$ C, 30 秒), アニーリング (40~50 $^{\circ}$ C, 30 秒), 伸長反応 (72 $^{\circ}$ C, 1.5 分) を 1 サイクルとした。30~40 サイクル後、72 $^{\circ}$ C で 5 分間処理し、4 $^{\circ}$ C に置いた。プライマーは、各遺伝子に特異的な配列を基に設計し、さらに 5' 末端にシークエンシングタグを付加した [42]。プライマーの詳細は Table 2 の通りである。PCR 反応後溶液は 1.2% アガロースゲルを用いて電気泳動し (100 V), エチジウムブロマイドまたは GelRed (Biotium) で染色した後、トランスイルミネーターを用いて PCR 産物の検出を行った。

(4-1) ゲルからの PCR 産物の抽出

PCR 反応後溶液 (約 100 μ l) を 2% アガロースゲルを用いて電気泳動し (100 V), エチジウムブロマイドで染色した後、トランスイルミネーターで PCR 産物のバンドを確認した。目的の PCR 産物のバンドが含まれているゲルの部分をナイフでカットし、細かく刻んだ後、SUPREC-01 (TaKaRa Bio) を用いてゲルから PCR 産物溶出液を得た。溶出液は、Dr. GenTLE precipitation carrier (TaKaRa Bio) を用いてエタノール沈殿させ、乾燥後、TE バッファー (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) を加えて溶解し、PCR 産物を得た。

(4-2) PCR 反応後溶液の酵素処理

PCR 反応後溶液 (20 μ l) を ExoSAP-IT (GE Healthcare) で処理した。すなわち、PCR 反応後溶液 (20 μ l) と、diethyl pyrocarbonate (DEPC) 処理水で 41 倍希釈した ExoSAP-IT (4 μ l) を混合し、37 $^{\circ}$ C で 30 分、80 $^{\circ}$ C で 15 分インキュベートした後 4 $^{\circ}$ C に置き、精製 PCR 溶液を得た。

(5) 精製 PCR 溶液の DNA 濃度と純度の測定

精製 PCR 溶液 (10 μ l) を 10 mM Tris-HCl (pH 8.5) で約 30 倍希釈し、260 nm, 280 nm 及び 320

nm における吸光度を測定した。精製 PCR 溶液の DNA 濃度及び純度は以下の数式に従って求めた。

$$\text{DNA 濃度} = (A_{260} - A_{320}) \times 30 \times 50 \text{ [ng/}\mu\text{l]}$$

$$\text{純度} = (A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$$

A_{260} : 260 nm における吸光度

A_{280} : 280 nm における吸光度

A_{320} : 320 nm における吸光度

(6) シークエンス反応

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてシークエンス反応を行った。精製 PCR 溶液は、キット付属のプロトコールに従って DEPC 処理水で適宜希釈して反応に使用した。反応条件は最初の熱変性の時間だけ 1 分長くとり、熱変性 (96 °C, 10 秒), アニールリング (50 °C, 5 秒), 伸長反応 (60 °C, 4 分) を 1 サイクルとし, 25 サイクル後, 4 °C に置いた。プライマーの詳細は下記の Table 11 の通りである。

Table 11. Primers for sequencing reaction

Primer name	Target primer	Sequence of primer (5'-3')
m13F	forward primers (F)	tgtaaacgacggccagt
m13R	reverse primers (R)	caggaaacagctatgacc

(7) シークエンス反応後溶液の精製

シークエンス反応後溶液 (20 μ l) を Agencourt CleanSEQ (Beckman Coulter) を用いて精製した。キット付属のプロトコールに従って精製後, 50 μ l の DEPC 処理水を加えてシークエンス反応物を溶出し, 4 °C に一時保存した。

(8) 塩基配列の決定と変異部位の特定

精製後の溶出液の上清 (40 μ l) を 96 well Reaction Plate (Applied Biosystems) に移し, 塩基配列解読装置を用いてシークエンス反応物の塩基配列を調べた。4 peaks 及び CLC Sequence Viewer によりデータの処理を行い, 塩基配列を決定した。また, 推定されるアミノ酸配列から MFPT 耐性ウイルスの変異部位を特定した。

得られた MFPT 耐性ウイルス (cl.1) の pb2 及び ns の cRNA 配列は, それぞれ DDBJ (DNA Data Bank of Japan) に登録した (accession numbers: pb2, AB981587; ns, AB981588)。

定量 PCR による IFN- β mRNA の発現量の比較

6 well plates に培養した MDCK 細胞に, WT ウイルスまたは MFPT 耐性ウイルス (cl.1 ~ cl.10) を 1 PFU/cell で感染させた。同時に, 非感染細胞 (mock) には PBS を 100 μ l/dish 加えた。感染 10 時間後及び 15 時間後に, 培養上清を除去して PBS で感染細胞を洗浄し, 感染細胞を -80°C に保存した。RNeasy Mini Kit (QIAGEN K.K.) を用いて感染細胞内の total RNA を抽出後, 260 nm, 280 nm 及び 320 nm における吸光度を測定することにより, 各試料の RNA 濃度と純度を測定した。1 μ g の total RNA を鋳型にして, Oligo(dT) プライマーと SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Life Technologies) を用いて, total RNA 中に含まれる mRNA を逆転写した。得られた cDNA 溶液 (1 μ l) を鋳型にして, GoTaq qPCR Master Mix (Promega KK) を用いて quantitative PCR (qPCR) を行った (最終溶液量: 20 μ l/sample)。qPCR の反応条件は, 95°C で 2 分を 1 サイクル, 95°C で 30 秒, 56°C で 30 秒を 45 サイクル, $55^{\circ}\text{C} \sim 95^{\circ}\text{C}$ を 1 サイクル (dissociation curve の作成) とした。IFN- β の遺伝子発現量は, 18s rRNA を normalizer, WT ウイルス感染時 (感染 10 時間後) を calibrator として, efficiently corrected $\Delta\Delta\text{Ct}$ method を用いて算出した [76]。使用したプライマーの配列は Table 12 に示した通りである [77,78]。

Table 12. Primer sequence for qPCR

Target mRNA	Primer name	Sequence of primer (5'-3') (S: sense, A: anti sense)
IFN- β	IFN- β _FOR	S: CCAGTTCCAGAAGGAGGACA
	IFN- β _REV	A: TGTCCCAGGTGAAGTTTTCC
18s rRNA	18s rRNA_FOR	S: CGGACAGGATTGACAGATTG
	18s rRNA_REV	A: CAAATCGCTCCACCAACTAA

Western blotting (①)

35 mm dishes に培養した MDCK 細胞に, WT ウイルスまたは MFPT 耐性ウイルス (cl.1) を 1 PFU/cell で感染させた。同時に, 非感染細胞 (mock) には PBS を 100 μ l/dish 加えた。感染 0, 5, 10 及び 15 時間後に培養上清を除去して, PBS で細胞を 3 回洗浄した後, 感染細胞を -80°C に保存した。

Lysis buffer (0.05 M Tris-HCl pH 7.0, 0.15 M NaCl, 1% SDS, 1% Triton X-100) を 200 μ l/dish 加えて, スクレイパーで細胞溶解液を回収後, 等量の 2 倍濃度の sample buffer (0.125 M Tris-HCl, 4% SDS, 20% glycerol, 0.2% bromophenol blue, 10% 2-mercaptoethanol) を加えて混合した。この混合液を 100°C で 4 分間煮沸処理した後, 10% SDS-PAGE に付した。

泳動後, ゲル中のタンパク質を PVDF 膜 (Immobilon-P Transfer Membrane, Merck Millipore) に転

写して、転写後の PVDF 膜を 2% BSA in TBS (Tris buffered-saline) 中で振とうしてブロッキング処理した (室温, 1 時間)。

各種タンパク質を検出するために, rabbit anti-Akt antibody (Cell Signaling Technology), anti-phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP Rabbit mAb (Cell Signaling Technology), anti-cleaved caspase 3 antibody (Cell Signaling Technology), anti-PARP-1 antibody (Santa Cruz Biotechnology), anti-Actin (C-2) antibody (Santa Cruz Biotechnology), anti-influenza A m1 antibody (Santa Cruz Biotechnology) または anti-influenza A ns1 antibody (Santa Cruz Biotechnology) を, 一次抗体として反応させた (4 °C, overnight または室温, 1 時間)。その後, horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology) または HRP-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology) を二次抗体として反応させた (室温, 1 時間)。

TMB Stabilized Substrate for HRP (Promega KK) を使って各種タンパク質を検出し, その様子をスキャンした後, Image J ソフトウェア [79] を用いて semi-quantifying を行った。

免疫染色による感染細胞内の IAV NP の検出

Glass base dishes (IWAKI, Asahi Glass Co. Ltd.) に培養した MDCK 細胞 (7.6×10^5 cells/dish) に, WT ウイルスまたは MFPT 耐性ウイルス (cl.1) を 1 PFU/cell で感染させた。同時に, 非感染細胞 (mock) には PBS を 100 μ l/dish 加えた。感染 0, 5, 10 及び 15 時間後に培養上清を除去して, 4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液を加えて細胞を固定した後, 0.2% Triton X-100 を加えて細胞膜の透過処理を行った。透過処理した細胞を 1% BSA in PBS でブロッキング処理した後, FITC-conjugated mouse anti-influenza A virus nucleoprotein (431) antibody (Abcam PLC) で反応させてから, 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (Nacalai Tesque) を使ってカウンター染色した。染色した細胞は, 蛍光顕微鏡で観察・画像撮影をした後, Image J ソフトウェア [79] を用いて画像解析した。

Western blotting (②)

35 mm dishes に培養した MDCK 細胞に, WT ウイルスを 1 PFU/cell で感染させた。同時に, 非感染細胞 (mock) には PBS を 100 μ l/dish 加えた。その後, 細胞増殖用培地または終濃度が 2 mM となるように MFPT を加えた細胞増殖用培地でインキュベートした (37 °C)。感染 0, 10 及び 15 時間後に培養上清を除去して, 細胞を PBS で 3 回洗浄した後, -80 °C に保存した。

その後は上述した Western blotting (①) と同様の操作を経て各種タンパク質を検出し, その様子をスキャンした後, Image J ソフトウェア [79] を用いて semi-quantifying を行った。

細胞毒性試験

(1) MDCK 細胞 (試料: MFPT)

MDCK 細胞を, MFPT を添加した培地中で 72 時間培養後 (37 °C), トリパンプルー染色をして生細胞を計数した。MFPT 無添加対照区の細胞を 100% とした時のそれぞれの増殖率を求め, グラフ上で 50% 細胞増殖阻止濃度 (50% cytotoxic concentration; CC₅₀) を算出した。

(2) Vero 細胞 (試料: MFPT)

Vero 細胞を, MFPT を添加した培地中で 72 時間培養後 (37 °C), トリパンプルー染色をして生細胞を計数した。MFPT 無添加対照区の細胞を 100% とした時のそれぞれの増殖率を求め, グラフ上で CC₅₀ を算出した。

(3) Vero 細胞 (試料: SP-012)

96 well plates に培養した Vero 細胞 (1×10^3 cells/well) を, SP-012 添加培地中で 3 日間培養した。SP-012 の細胞毒性は Cell Count Reagent SF (Nacalai Tesque) を使った MTT 試験により測定した。SP-012 無添加対照区の細胞を 100% とした時のそれぞれの増殖率を求め, グラフ上で CC₅₀ を算出した。

抗ウイルス活性試験

(1) IAV (試料: MFPT)

MDCK 細胞に NWS 株 (WT ウイルス) を 0.1 PFU/cell で感染させた後 (室温, 1 時間), PBS で洗浄し, 新鮮な培地を加えて 37 °C で培養した。この時, MFPT を添加した培地を感染直後に加えた。24 時間後に培養上清を収穫し, MDCK 細胞を使ったプラークアッセイ法によりウイルス量を測定した。MFPT 無添加対照区のプラーク数を 100% とし, MFPT 添加区のプラークの % を計算後, グラフ上で 50% ウイルス増殖阻止濃度 (50% inhibitory concentration; IC₅₀) を求めた。また, CC₅₀ 値と IC₅₀ 値から選択指数 (selectivity index, CC₅₀/IC₅₀) を求めた。

(2) HSV-1 (KOS 株, A4-3 株, HF 株), HSV-2 (UW 268 株) (試料: MFPT)

Vero 細胞に各ウイルスを 0.1 PFU/cell で感染させた後 (室温, 1 時間), PBS で洗浄し, 新鮮な培地を加えて 37 °C で培養した。この時, MFPT を添加した培地を感染直後に加えた。24 時間後, 培養物を収穫して 3 回の凍結融解処理を行った後, Vero 細胞を使ったプラークアッセイ法によりウイルス量を測定した。MFPT 無添加対照区のプラーク数を 100% とし, MFPT 添加区のプラークの % を計算後, グラフ上で IC₅₀ を求めた。また, CC₅₀ 値と IC₅₀ 値から選択指数を求めた。

(3) HSV-1 (KOS 株), HSV-2 (UW 268 株) (試料: SP-012)

Vero 細胞に各ウイルスを 0.1 PFU/cell で感染させた後 (室温, 1 時間), PBS で洗浄し, 新鮮な培地を加えて 37 °C で培養した。SP-012 は, ウイルス感染と同時に加えて感染後も添加して培養する (A 区) か, またはウイルス感染直後から添加した (B 区)。24 時間後, 培養物を収穫して 3 回の凍結融解処理を行った後, Vero 細胞を使ったプラークアッセイ法によりウイルス量を測定した。SP-012 無添加対照区のプラーク数を 100% として, SP-012 添加区のプラークの % を計算後, グラフ上で IC₅₀ を求めた。また, CC₅₀ 値と IC₅₀ 値から選択指数を求めた。

Time-of-addition 実験

Vero 細胞に HSV-2 (UW 268 株) を室温で 1 時間感染させた (10 PFU/cell)。この時, SP-012 (1, 2.5, 5 または 10 µg/ml) を, 感染 6 時間前 (前処理), 感染 3 時間前 (前処理), 感染中のみ, 感染直後 (感染 0 時間後), または感染 6 時間後に添加した。感染 20 時間後に培養上清を収穫し, プラークアッセイによりウイルス量を測定した。SP-012 無添加対照区のプラーク数を 100% として, SP-012 添加区のプラークの % を計算した。

吸着阻害試験

吸着阻害試験は, infectious center assay により行った [80]。まず単層状に培養した Vero 細胞, HSV-2 (UW 268 株) (1 PFU/cell) 及び SP-012 (1, 2.5, 5 または 10 µg/ml) を 4 °C で 3 時間冷却した。SP-012 存在下で Vero 細胞に HSV-2 を加えて 4 °C に 1 時間置いた後, 未吸着のウイルス及び SP-012 を除去するために, 冷却した MEM で 3 回洗浄した。その後, プラークアッセイ用培地を重層して, 37 °C で 2 日間培養した。SP-012 無添加対照区のプラーク数を 100% として, SP-012 添加区のプラークの % を計算した。

また, 上記の 4 °C の処理が, 細胞へのウイルス吸着は可能にする一方で細胞へのウイルス侵入は阻止することを確認するために, ウイルス液を加えて 4 °C で 1 時間処理した Vero 細胞について, 40 mM クエン酸緩衝液 (pH 3.0) で 1 分間処理して, 吸着したウイルスを不活化した。その後, 同様にプラークアッセイ用培地を重層し, プラークの出現の有無を検討した。

侵入阻害試験 [81]

Vero 細胞を 4 °C で 3 時間冷却した後, 冷却した HSV-2 (UW 268 株, 100 PFU) を加えて 4 °C で 1 時間吸着させた。未吸着のウイルスを除去するために冷却した MEM で 3 回洗浄した後, SP-012 (0, 1, 2.5, 5 または 10 µg/ml) を添加した培地を加えて, Vero 細胞を 37 °C で培養した。37 °C にシフトしてから一定時間経過後 (1, 3 または 6 時間後) に, 室温で Vero 細胞を 40 mM クエン酸緩衝液 (pH 3.0) で 1 分間処理して未侵入のウイルスを不活化した。MEM で 1 回洗浄後,

ただちにプラークアッセイ用培地を重層し、プラークを検出した。SP-012 無添加対照区のプラーク数を 100% とし、SP-012 添加区のプラークの % を計算した。

殺ウイルス活性試験

HSV-2 (UW 268 株) (2×10^4 PFU/100 μ l) と SP-012 (0, 2, 5, 10 または 20 μ g/ml) を等量で混合して、4 $^{\circ}$ C または 37 $^{\circ}$ C で、0, 1, 3 または 6 時間処理した。混合液を培地で 100 倍希釈した (SP-012 が抗ウイルス活性を示さない濃度以下に希釈した) 後、この希釈液を単層状に培養した Vero 細胞に加えてプラークアッセイに供した。この時、感染 0 時間後 (混合直後) におけるプラーク数を 100% とした。

Plaque size-reduction 実験

HSV-2 (UW 268 株, 200 PFU) を 1 時間感染させた Vero 細胞に、SP-012 (0, 1, 2.5, 5 または 10 μ g/ml) を含んだプラークアッセイ用培地を重層し、37 $^{\circ}$ C に置いた。2 日後、クリスタルバイオレット溶液 (20% エタノール 500 ml にクリスタルバイオレット 300 mg を加えたもの) で生細胞を染色してプラークを固定・染色後、20 個のプラークの直径を測定してその大きさを算出した。

SP-012 の細胞内取り込み実験

SP-012 を Alexa Fluor 488 NHS (Invitrogen) と 1:1 (モル比) で室温で 1 時間混合させることで、蛍光標識された SP-012, すなわち Alexa Fluor 488-conjugated SP-012 (FI-SP-012) を得た。

Glass base dishes (IWAKI, Asahi Glass Co. Ltd.) に培養した Vero 細胞を、10 μ g/ml の FI-SP-012 で 5 分間処理、または FI-SP-012 の 10 倍量の SP-012 を添加された FI-SP-012 で 5 分間処理した。その後、PBS で 3 回洗浄し、FI-SP-012 を含まない培地を加えて 37 $^{\circ}$ C に置いた。5 分後、3 時間後、6 時間後または 20 時間後に、4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で 5 分間処理して Vero 細胞を固定し、DAPI (Nacalai Tesque) でカウンター染色した後、蛍光顕微鏡 (HSBZ-9000, Keyence) と HSBZ-II analysis application (Keyence) を用いて FI-SP-012 を検出した (露光時間: 1 s)。また、FI-SP-012 が抗 HSV-2 活性を維持しているか否かを確認するために、プラークアッセイによる活性試験を行い、非標識 SP-012 の場合と比較した。

薬剤耐性ウイルスの作製と感受性試験

Vero 細胞を用いて、HSV-2 (UW 268 株) を 100 μ g/ml の SP-012 または 30 μ g/ml の ACV 存在下で 3 回継代培養した (P1 ~ P3)。その後、200 μ g/ml の SP-012 または 60 μ g/ml の ACV で続けて 7 回継代培養した (P4 ~ P10)。この時、HSV-2 は 0.01 ~ 0.1 PFU/cell で感染させた。Vero 細胞を用いた plaque purification 法によって、P10 ウイルス液から SP-012 処理または ACV 処理した

HSV-2 のウイルスクローンを得た後、それぞれのクローンについて、SP-012 または ACV に対する感受性をプラークアッセイにより調べ、 IC_{50} を算出した。

性器ヘルペスモデル動物への MFPT の局所投与実験

この動物実験は、中部大学動物実験取扱規程に従って実施した。

BALB/c マウス (♀, 5~6 週齢) に medroxyprogesterone 17-acetate (3 mg/mouse) をウイルス感染 6 日前と 1 日前に皮下投与し、マウスのウイルス感受性を高めた [62]。その後、HSV-1 (KOS 株, A4-3 株, HF 株) (5×10^5 PFU/20 μ l/mouse) または HSV-2 (UW 268 株) (2×10^4 PFU/20 μ l/mouse) を臍内接種した。各種濃度の MFPT (0.05, 0.1, 0.25 または 0.5 mg/20 μ l/mouse) または ACV (0.1 mg/20 μ l/mouse) を、感染 1 時間前から感染 7 日後まで、1 日 2 回 (9:00 及び 18:00)、経臍投与した (n=5)。対照群には、同じスケジュールで PBS (20 μ l/mouse) を経臍投与した。感染 1, 3, 5 及び 7 日後に各群のマウスから臍内洗浄液 (100 μ l) を採取し、そのウイルス量を Vero 細胞を使ったプラークアッセイにより決定した。また、感染 14 日後まで死亡例及び発症の程度を記録した。発症の程度を表すスコアは、0: 無症状, 1: 生殖器に軽度の発赤が見られる, 2: 生殖器に中程度の発赤と腫脹が見られる, 3: 生殖器に重度の炎症が生じ浸出液が認められる, 4: 後肢が麻痺する, 5: 死亡, と定義した。

性器ヘルペスモデル動物への SP-012 の局所投与実験

この動物実験は、富山大学動物実験取扱規程に従って実施した。

SP-012 の効果持続時間を確かめるために、SP-012 (0.2 mg/20 μ l の生理食塩水) を BALB/c マウス (♀, 5~6 週齢) に経臍投与した (n=5)。投与 1, 3, 6, 9, 15, 20, 24 時間後に、臍内を 100 μ l の生理食塩水で洗浄し、これを培地で 10 倍希釈した後、HSV-2 (0.1 PFU/cell) を感染させた Vero 細胞に感染 1 時間前から加えた。24 時間後、培養上清を収穫し、ウイルス量をプラークアッセイにより測定した。無添加対照区 (洗浄液の代わりに培地を加えたもの) のプラーク数を 100% として、洗浄液添加区のプラークの % を計算した。

BALB/c マウス (♀, 5~6 週齢) に medroxyprogesterone 17-acetate (3 mg/mouse) をウイルス感染 6 日前と 1 日前に皮下投与し、マウスのウイルス感受性を高めた [62]。その後、 1×10^4 PFU の HSV-1 (KOS 株) または HSV-2 (UW 268 株) を臍内接種した。SP-012 または ACV は、10 mg/kg/day (20 μ l/mouse) で、経臍投与した (n=10)。試料の投与は 1 日 2 回 (9:00 及び 18:00) とし、感染 1 時間後から 7 日後まで、または感染 24 時間後から 7 日後まで投与した。対照群には、同じスケジュールで生理食塩水 (20 μ l/mouse) を経臍投与した。感染 3 日後、前回の試料投与後 15 時間経過してから、各群のマウスから臍内洗浄液 (100 μ l) を採取し、そのウイルス量を Vero 細胞を用いたプラークアッセイにより決定した。また、感染 14 日後まで死亡例及び発症の程度を記録した。発症

の程度を表すスコアは、0: 無症状, 1: 生殖器に軽度の発赤が見られる, 2: 生殖器に中程度の発赤と腫脹が見られる, 3: 生殖器に重度の炎症が生じ浸出液が認められる, 4: 後肢が麻痺する, 5: 死亡, と定義した。

後根神経節における HSV-2 特異的チミジンキナーゼをコードした DNA の検出

初感染後のウイルスの潜伏感染の有無を検討するため, HSV-2 感染 28 日後の各マウス (SP-012 投与群) の腰仙部の後根神経節を, 解剖により採取した。各検体について, 50 °C で 4 時間, 0.2% SDS 及び 0.8 mg の proteinase K で処理した。DNA は, phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) を用いて抽出後, Dr. GenTLE precipitation carrier (Takara Bio) によりエタノール沈殿させた。得られた DNA を鋳型にし, GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega KK) と primers を用いて, *tk* 遺伝子の PCR を行った。PCR 反応条件は最初の熱変性の時間だけ 2 分長くとり, 熱変性 (96 °C, 30 秒), アニールリング (60 °C, 30 秒), 伸長反応 (72 °C, 2 分) を 1 サイクルとした。30 サイクル後, 72 °C で 5 分間処理し, 4 °C に置いた。プライマーの配列は Table 13 に示した。PCR 産物は, 2% アガロースゲルを用いて電気泳動し (100V), エチジウムブロマイドで染色した後, トランスイルミネーターで PCR 産物のバンドを確認した。

Table 13. Primers for detecting of *tk* gene (HSV-2)

Primer name	Target gene	Sequence of primer (5'-3')
Forward primer	<i>tk</i> gene	tgtaaacgacggccagtTGGCGTKRAACTCCCGCACCT
Reverse primer		caggaaacagctatgaccGGCCTTCCGTTCGGGCTTCC

統計処理

(1) IAV に関わる実験

動物実験におけるマウスの生存率については, log-rank test を用いて統計解析を行った。その他の実験では, Dunnet test を用いて統計解析を行った。

(2) HSV-1 及び HSV-2 に関わる実験 (試料: MFPT)

動物実験において, 膣内洗浄液中のウイルス量については Dunnet test (vs. PBS-treated group) を用いて, 発症スコアについては Mann-Whitney U test を用いて統計解析を行った。

(3) HSV-1 及び HSV-2 に関わる実験 (試料: SP-012)

一元配置分散分析後, Dunnett test を用いて統計解析を行った。

参考文献

1. World Health Organization. Influenza (Seasonal). World Health Organization: 2014. [cited 4 Jan 2016]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>
2. Hause BM, Collin EA, Liu R, Huang B, Sheng Z, Lu W, *et al.* Characterization of a novel influenza virus in cattle and swine: proposal for a new genus in the *Orthomyxoviridae* family. *MBio*. 2014;**5**: 1–10.
3. Collin EA, Sheng Z, Lang Y, Ma W, Hause BM, Li F. Cocirculation of two distinct genetic and antigenic lineages of proposed influenza D virus in cattle. *J Virol*. 2015;**89**: 1036–1042.
4. Ducatez MF, Pelletier C, Meyer G. Influenza D virus in cattle, France, 2011–2014. *Emerg Infect Dis*. 2015;**21**: 368–371.
5. Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology* 6th ed. Philadelphia, PA, USA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2013. pp. 1186–1243.
6. Shaw ML, Palese P. *Orthomyxoviridae*. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology* 6th ed. Philadelphia, PA, USA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2013. pp. 1151–1185.
7. Arias CF, Escalera-Zamudio M, de los Dolores Soto-Del Río M, Georgina Cobián-Güemes A, Isa P, López S. Molecular anatomy of 2009 influenza virus A (H1N1). *Arch Med Res*. 2009;**40**: 643–654.
8. World Health Organization. Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003–2016. World Health Organization: 2016. [cited 30 Jan 2016]. Available: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/2016_01_20_tableH5N1.pdf?ua=1
9. World Health Organization. *Weekly epidemiological record*. 2015;**90**: 349–364.
10. アビガン(AVIGAN) 添付文書 (第 1 版). 製造販売: 富山化学工業株式会社.
11. Chen R, Holmes EC. Avian influenza virus exhibits rapid evolutionary dynamics. *Mol Biol Evol*. 2006;**23**: 2336–2341.
12. National Institute of Infectious Diseases (国立感染症研究所). 抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス. 2009/2010 - 2015/2016 シーズン. [cited 2 Feb 2016]. Available: <http://www.nih.go.jp/niid/ja/flu-m/flutoppage/2068-flu/flu-dr/6235-flu-dr20160201.html>
13. Takashita E, Ejima M, Itoh R, Miura M, Ohnishi A, Nishimura H, *et al.* A community cluster of influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013. *Eurosurveillance*. 2014;**19**: 1–6.
14. Takashita E, Meijer A, Lackenby A, Gubareva L, Rebelo-de-Andrade H, Besselaar T, *et al.* Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2013–2014. *Antiviral Res*. 2015;**117**: 27–38.

15. 厚生労働省 第 10 回厚生科学審議会予防接種・ワクチン分科会研究開発及び生産・流通部会 配布資料: 2015. [cited 7 Sep 2015]. Available: <http://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10601000-Daijinkanboukouseikagakuka-Kouseikagakuka/0000087674.pdf>
16. 谷本武史. 経鼻吸収型インフルエンザワクチンの開発. *Drug Deliv Syst.* 2010;**25**: 15–21.
17. Kang SM, Song JM, Compans RW. Novel vaccines against influenza viruses. *Virus Res.* 2011;**162**: 31–38.
18. FluMist. Product Information (2014-2015 formulation). Manufacture: MedImmune, LLC.
19. World Health Organization. HIV/AIDS. World Health Organization: 2015. [cited 4 Jan 2016]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/>
20. Freeman EE, Weiss HA, Glynn JR, Cross PL, Whitworth JA, Hayes RJ. Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *AIDS.* 2006;**20**: 73–83.
21. Celum C, Levine R, Weaver M, Wald A. Genital herpes and human immunodeficiency virus: double trouble. *Bull World Health Organ.* 2004;**82**: 447–453.
22. Xu F, Sternberg MR, Kottiri BJ, McQuillan GM, Lee FK, Nahmias AJ, *et al.* Trends in herpes simplex virus type 1 and type 2 seroprevalence in the United States. *JAMA.* 2006;**296**: 964–973.
23. Roizman B, Knipe DM, Whitley RJ. Herpes Simplex Viruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology* 6th ed. Philadelphia, PA, USA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2013. pp. 1823–1897.
24. Dolan A, Jamieson FE, Cunningham C, Barnett BC, McGeoch DJ. The genome sequence of herpes simplex virus type 2. *J Virol.* 1998;**72**: 2010–2021.
25. Tronstein E, Johnston C, Huang M-L, Selke S, Magaret A, Warren T, *et al.* Genital shedding of herpes simplex virus among symptomatic and asymptomatic persons with HSV-2 infection. *JAMA.* 2011;**305**: 1441–1449.
26. Piret J, Boivin G. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;**55**: 459–472.
27. Van Velzen M, Van Loenen FB, Meesters RJW, De Graaf M, Remeijer L, Luijckx TM, *et al.* Latent acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 in trigeminal ganglia of immunocompetent individuals. *J Infect Dis.* 2012;**205**: 1539–1543.
28. Wang K, Mahalingam G, Hoover SE, Mont EK, Holland SM, Cohen JI, *et al.* Diverse herpes simplex virus type 1 thymidine kinase mutants in individual human neurons and ganglia. *J Virol.* 2007;**81**: 6817–6826.

29. Stanfield B, Kousoulas KG. Herpes simplex vaccines: prospects of live-attenuated HSV vaccines to combat genital and ocular infections. *Curr Clin Microbiol Reports*. 2015;**2**: 125–136.
30. Hayashi K, Kawahara K, Nakai C, Sankawa U, Seto H, Hayashi T. Evaluation of (1*R*,2*R*)-1-(5'-methylfur-3'-yl)propane-1,2,3-triol, a sphydrofuran derivative isolated from a *Streptomyces* species, as an anti-herpesvirus drug. *J Antimicrob Chemother*. 2000;**46**: 181–189.
31. Umezawa S, Usui T, Umezawa H, Tsuchiya T, Takeuchi T. A new microbial metabolite, sphydrofuran. I. Isolation and the structure of a hydrolysis product. *J Antibiot*. 1971;**24**: 85–92.
32. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, *et al*. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;**92**: 7297–7301.
33. Baker A, Saltik M, Lehrmann H, Killisch I, Mautner V, Lamm G, *et al*. Polyethylenimine (PEI) is a simple, inexpensive and effective reagent for condensing and linking plasmid DNA to adenovirus for gene delivery. *Gene Ther*. 1997;**4**: 773–782.
34. Haldar J, Chen J, Tumpey TM, Gubareva LV, Klimanov AM. Hydrophobic polycationic coatings inactivate wild-type and zanamivir- and/or oseltamivir-resistant human and avian influenza viruses. *Biotechnol Lett*. 2008;**30**: 475–479.
35. Larson AM, Oh HS, Knipe DM, Klimanov AM. Decreasing herpes simplex viral infectivity in solution by surface-immobilized and suspended *N,N*-dodecylmethyl-polyethylenimine. *Pharm Res*. 2013;**30**: 25–31.
36. Owada T, Miyashita Y, Motomura T, Onishi M, Yamashita S, Yamamoto N. Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection via increased membrane fluidity by a cationic polymer. *Microbiol Immunol*. 1998;**42**: 97–107.
37. Spoden GA, Besold K, Krauter S, Plachter B, Hanik N, Kilbinger AFM, *et al*. Polyethylenimine is a strong inhibitor of human papillomavirus and cytomegalovirus infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;**56**: 75–82.
38. Hatakeyama S, Sakai-tagawa Y, Kiso M, Goto H, Kawakami C, Mitamura K, *et al*. Enhanced expression of an α 2,6-linked sialic acid on MDCK cells improves isolation of human influenza viruses and evaluation of their sensitivity to a neuraminidase inhibitor. *J Clin Microbiol*. 2005;**43**: 4139–4146.
39. Lindsay SM, Timm A, Yin J. A quantitative comet infection assay for influenza virus. *J Virol Methods*. 2012;**179**: 351–358.
40. NITE/NIID protocol for sequencing influenza A (H1N1) SWL viral genome segments version 1.2 (30 May 2009). [cited 31 Aug 2015]. Available: <http://www.nite.go.jp/data/000021943.pdf>
41. Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol*. 2001;**146**: 2275–2289.

42. World Health Organization. Sequencing primers and protocol. World Health Organization: 2009. [cited 28 Aug 2015]. Available: http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/GenomePrimers_20090512.pdf
43. Hale BG, Randall RE, Ortín J, Jackson D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol.* 2008;**89**: 2359–2376.
44. Ehrhardt C, Ludwig S. A new player in a deadly game: influenza viruses and the PI3K/Akt signalling pathway. *Cell Microbiol.* 2009;**11**: 863–871.
45. Hale BG, Kerry PS, Jackson D, Precious BL, Gray A, Killip MJ, *et al.* Structural insights into phosphoinositide 3-kinase activation by the influenza A virus NS1 protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;**107**: 1954–1959.
46. Shin Y-K, Liu Q, Tikoo SK, Babiuk LA, Zhou Y. Influenza A virus NS1 protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway by direct interaction with the p85 subunit of PI3K. *J Gen Virol.* 2007;**88**: 13–18.
47. Jackson D, Killip MJ, Galloway CS, Russell RJ, Randall RE. Loss of function of the influenza A virus NS1 protein promotes apoptosis but this is not due to a failure to activate phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). *Virology.* 2010;**396**: 94–105.
48. Shin Y-K, Li Y, Liu Q, Anderson DH, Babiuk LA, Zhou Y. SH3 binding motif 1 in influenza A virus NS1 protein is essential for PI3K/Akt signaling pathway activation. *J Virol.* 2007;**81**: 12730–12739.
49. Franke TF. PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene.* 2008;**27**: 6473–6488.
50. Vara JÁF, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev.* 2004;**30**: 193–204.
51. Wurzer WJ, Planz O, Ehrhardt C, Giner M, Silberzahn T, Pleschka S, *et al.* Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation. *EMBO J.* 2003;**22**: 2717–2728.
52. McLean JE, Datan E, Matassov D, Zakeri ZF. Lack of Bax prevents influenza A virus-induced apoptosis and causes diminished viral replication. *J Virol.* 2009;**83**: 8233–8246.
53. Tran AT, Cortens JP, Du Q, Wilkins JA, Coombs KM. Influenza virus induces apoptosis via BAD-mediated mitochondrial dysregulation. *J Virol.* 2013;**87**: 1049–1060.
54. Boulo S, Akarsu H, Ruijgrok RWH, Baudin F. Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Res.* 2007;**124**: 12–21.
55. Onomoto K, Jogi M, Yoo JS, Narita R, Morimoto S, Takemura A, *et al.* Critical role of an antiviral stress granule containing RIG-I and PKR in viral detection and innate immunity. *PLoS One.* 2012;**7**: e43031.
56. Zheng W, Tao YJ. Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex. *FEBS Lett.* 2013;**587**: 1206–1214.

57. Faleiro L, Lazebnik Y. Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier. *J Cell Biol.* 2000;**151**: 951–959.
58. Rehwinkel J, Tan CP, Goubau D, Schulz O, Pichlmair A, Bier K, *et al.* RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection. *Cell.* 2010;**140**: 397–408.
59. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, *et al.* Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature.* 2006;**441**: 101–105.
60. Le Goffic R, Pothlichet J, Vitour D, Fujita T, Meurs E, Chignard M, *et al.* Cutting edge: influenza A virus activates TLR3-dependent inflammatory and RIG-I-dependent antiviral responses in human lung epithelial cells. *J Immunol.* 2007;**178**: 3368–3372.
61. Hayashi K, Hayashi T, Otsuka H, Takeda Y. Antiviral activity of 5,6,7-trimethoxyflavone and its potentiation of the antiherpes activity of acyclovir. *J Antimicrob Chemother.* 1997;**39**: 821–824.
62. Kaushic C, Ashkar AA, Reid LA, Rosenthal KL. Progesterone increases susceptibility and decreases immune responses to genital herpes infection. *J Virol.* 2003;**77**: 4558–4565.
63. Scriba M, Tatzber F. Pathogenesis of herpes simplex virus infections in guinea pigs. *Infect Immun.* 1981;**34**: 655–661.
64. Payne CK, Jones SA, Chen C, Zhuang X. Internalization and trafficking of cell surface proteoglycans and proteoglycan-binding ligands. *Traffic.* 2007;**8**: 389–401.
65. Tobian AAR, Ssempijja V, Kigozi G, Oliver AE, Serwadda D, Makumbi F, *et al.* Incident HIV and herpes simplex virus type 2 infection among men in Rakai, Uganda. *AIDS.* 2009;**23**: 1589–1594.
66. Nagot N, Ouédraogo A, Foulongne V, Konaté I, Weiss HA, Vergne L, *et al.* Reduction of HIV-1 RNA levels with therapy to suppress herpes simplex virus. *N Engl J Med.* 2007;**356**: 790–799.
67. Celum C, Wald A, Hughes J, Sanchez J, Reid S, Delany-Moretlwe S, *et al.* Effect of aciclovir on HIV-1 acquisition in herpes simplex virus 2 seropositive women and men who have sex with men: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2008;**371**: 2109–2119.
68. Lisco A, Vanpouille C, Tchesnokov EP, Grivel J-C, Biancotto A, Brichacek B, *et al.* Acyclovir is activated into a HIV-1 reverse transcriptase inhibitor in herpesvirus-infected human tissues. *Cell Host Microbe.* 2008;**4**: 260–270.
69. Watson-Jones D, Weiss HA, Rusizoka M, Changalucha J, Baisley K, Mugeye K, *et al.* Effect of herpes simplex suppression on incidence of HIV among women in Tanzania. *N Engl J Med.* 2008;**358**: 1560–1571.
70. Zamora JL. Chemical and microbiologic characteristics and toxicity of povidone-iodine solutions. *Am J Surg.* 1986;**151**: 400–406.
71. Käsermann F, Wyss K, Kempf C. Virus inactivation and protein modifications by ethyleneimines. *Antiviral Res.* 2001;**52**: 33–41.

72. Mettenleiter TC. Initiation and spread of α -herpesvirus infections. *Trends Microbiol.* 1994;**2**: 2–4.
73. Hsu BB, Yinn Wong S, Hammond PT, Chen J, Klibanov AM. Mechanism of inactivation of influenza viruses by immobilized hydrophobic polycations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;**108**: 61–66.
74. Seib FP, Jones AT, Duncan R. Comparison of the endocytic properties of linear and branched PEIs, and cationic PAMAM dendrimers in B16f10 melanoma cells. *J Control Release.* 2007;**117**: 291–300.
75. Engel P, Hein L, Spiess AC. Derivatization-free gel permeation chromatography elucidates enzymatic cellulose hydrolysis. *Biotechnol Biofuels.* 2012;**5**: 77–84.
76. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST[©]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002;**30**: e36.
77. Seitz C, Frensing T, Höper D, Kochs G, Reichl U. High yields of influenza A virus in Madin-Darby canine kidney cells are promoted by an insufficient interferon-induced antiviral state. *J Gen Virol.* 2010;**91**: 1754–1763.
78. Heynisch B, Frensing T, Heinze K, Seitz C, Genzel Y, Reichl U. Differential activation of host cell signalling pathways through infection with two variants of influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) in MDCK cells. *Vaccine.* 2010;**28**: 8210–8218.
79. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;**9**: 671–675.
80. Kanekiyo K, Hayashi K, Takenaka H, Lee J-B, Hayashi T. Anti-herpes simplex virus target of an acidic polysaccharide, nostoflan, from the edible blue-green alga *Nostoc flagelliforme*. *Biol Pharm Bull.* 2007;**30**: 1573–1575.
81. Huang AS, Wagner RR. Penetration of herpes simplex virus into human epidermoid cells. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1964;**116**: 863–869.

謝 辞

本研究に際し、あたたかい御指導と厳しい叱咤激励をいただいた 黒崎 文也 教授に深く感謝し、心より御礼申し上げます。日々直接御指導、御鞭撻を賜りました 李 貞範 先生に心から感謝申し上げます。そして、日々、御協力、激励していただいた、田浦 太志 准教授と、本学医学薬学研究部(薬学)植物機能科学研究室の 山村 良美 先生に深く感謝致します。

研究の初期から関わり数多くの御助言をいただいた、富山大学名誉教授 林 利光 先生と、ウイルス学的な実験を中心に多大なる御指導と御助言を賜りました、中部大学生命健康科学研究所の 林京子 先生に深甚の謝意を表します。

研究材料である MFPT を合成して提供していただきました、本学医学薬学研究部(薬学)薬品製造学研究室の 松谷 裕二 教授、杉本 健士 准教授に感謝申し上げます。

研究材料である Epomin SP-012[®] を提供していただきました、甲斐 敬 氏をはじめとする株式会社日本触媒の皆様感謝申し上げます。また、尾上 裕貴 学士をはじめとする、SP-012 に関する研究に御協力をしてくださった皆様に感謝申し上げます。

そして、このような機会を与えてくださいました 藤田 章夫 博士をはじめとする第一薬品工業株式会社の皆様に心より感謝申し上げます。

また、種々の御協力、激励をいただいた本学医学薬学研究部(薬学)薬用生物資源学研究室の皆様にも厚く御礼申し上げます。最後にこのような機会を与えてくれた両親に心から感謝します。

佐々木 宏平