

審査の結果の要旨

氏名 北浦 慧

本研究は、小児特異的な致死性脳炎を来すチャンディプラウイルス（Chandipura virus;以後 CHPV）に対する治療薬の評価・探索を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. CHPV に対する薬効評価を *in vivo* で行うマウスモデルが確立されておらず、本研究では薬剤評価が可能なマウスモデルの検討を行った。過去文献で主に用いられているマウスモデルは 10-14 日齢の BALB/c マウスであり、小さいサイズ、薬剤投与ルート・量の制限、喰殺による生存曲線への影響の観点から *in vivo* での薬効評価を行う上でデメリットがあった。また、成熟したマウスは感染感受性が低いことが報告されている。そのため、本研究では感染感受性のある免疫不全マウスモデルの確立を試みた。BALB/c-nu、C.B-17 SCID、SCID-Beige、NOD SCID マウスで CHPV に対する感染感受性を検証したところ、SCID マウスでは致死感染に至ることが判明した。その後、B 細胞/T 細胞のみが欠如している C.B-17 SCID マウスを薬効評価モデルとして選択した。CHPV の実験室内感染では  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/mouse で体重減少、ふらつき、後肢麻痺などの症状が出現し、最終的に致死感染に至ることが判明した。また、ウイルス動態としては、ウイルス血症に随伴して脳、副腎・腎臓、脾臓、肝臓、肺でウイルス増殖を指摘した。特に脳と副腎・腎臓でウイルスの増殖が強く、組織学的な評価では脳の脈絡膜・髄膜、脊髓の中心管、副腎の髄質に強い抗原陽性像を認めた。総じて本マウスモデルでは神経系に指向性のある感染病態が推測され、C.B-17 SCID マウスを用いて薬効評価が可能であると推測した。
2. C.B-17 SCID マウスモデルを用いて *in vitro* で抗ウイルス作用を示す薬剤の *in vivo* 薬効評価を行った。ファビピラビル（favipiravir）とリバビリン（ribavirin）を *in vitro* で比較したところ、favipiravir がより強いウイルス抑制効果と低い細胞毒性を示した。そのため、C.B-17 SCID マウスモデルで favipiravir の *in vivo* 薬効評価を行う proof-of-concept 検証を行った。Pre-symptomatic（favipiravir 300 mg/day、Day 5-14 投与）、Post-symptomatic（favipiravir 300 mg/day、Day 9-18 投与）、Control 群（Vehicle Day 5-14 投与）を比較したところ、Pre-および Post-symptomatic 群の両方で Control 群と比較して有意な生存曲線の改善がみられた。また、ウイルス量についても全血、脳、副腎・腎臓で広範なウイルス抑制効果を示した。ただし、脳、副腎・腎臓ではウイルス抑制効果が不十分な個体もあり、単剤での投与だけでなく他薬剤との併用療法の必要性についても類推された。本研究によって C.B-17 SCID マウスモデルが *in vivo* での薬効評価

に用いることが出来ることおよび favipiravir が *in vivo* でも薬効を示すことを明らかにした。

3. CHPV に対する抗ウイルス作用のある候補薬剤が少ないことから、薬効評価動物モデルの開発と並行して *in vitro* での薬剤再開発 (Drug repurposing) を試みた。約 1,600 化合物の薬剤ライブラリから細胞生存、ウイルス抑制効果を指標とした 1 次・2 次スクリーニングを行った。結果的に 4 薬剤、digitoxin、nelfinavir、niclosamide、ponatinib が候補として選出された。
4. スクリーニングで選出された 4 薬剤を抗ウイルス抑制効果および細胞毒性の観点から Vero、BHK、SK-N-SH 細胞で検証した。結果として nelfinavir および niclosamide が再現性のあるウイルス抑制効果を示した。ただし、細胞毒性の観点からはいずれの薬剤も累積する細胞毒性を示し、薬剤選択指数 (Selectivity index) が比較的低かった。Instantaneous inhibitory potential (IIP) の観点からは nelfinavir と niclosamide の両者はヒトで到達可能な血中濃度の範囲内に比較的高い IIP を示していたため、nelfinavir と niclosamide が現実的な候補薬剤と推定された。
5. Nelfinavir と niclosamide の両者は比較的低い薬剤選択指数を示していたため、単剤療法ではなく併用療法の有用性についても検証した。相乗効果を複数濃度の組み合わせで検討することとした。Bliss model および Dose model を用いた相乗効果の検証では、両モデルにおいて nelfinavir と niclosamide は広範囲な濃度域において相乗効果を示すことが判明した。また、Dose model では双方向性の相乗効果があることを明らかにした。以上から、nelfinavir と niclosamide の併用療法が有効である可能性が示唆された。

以上、本論文では CHPV に対する抗ウイルス療法に対する *in vivo* 薬効評価が可能な動物モデルの確立および *in vitro* における候補薬剤の選定を行った。本研究は、薬剤評価が可能な新規動物モデル (C.B-17 SCID マウス) を確立した点、favipiravir が *in vivo* においても抗ウイルス作用を示す点、薬剤再開発の一環として nelfinavir と niclosamide が候補薬剤となりうる点、および nelfinavir と niclosamide の相乗効果・併用療法が期待できることを明らかにした点で新規性がある。総じて、現在明確な治療法がない CHPV 感染症に対する治療法確立に寄与する研究と考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。よって本論文は博士 (医学) の学位請求論文として合格と認められる。