

氏 名	モハメド バハヌール ラハマン Md. Bahanur Rahman
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 489 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 生 命 薬 科 学 専 攻
学位論文題目	Studies on the Antiviral Activity of the Normal Animal Serum (正常動物血清の抗ウイルス活性についての研究)

論文調査委員	(主 査) 教授 河 合 明 彦	教授 川 寄 敏 祐	教授 市 川 厚
--------	---------------------	------------	----------

論 文 内 容 の 要 旨

一般にウイルス性疾患にはウイルスが侵入部位および隣接した組織のみを侵す限局性の場合と侵入局所での一次増殖に留まらず、二次病巣を形成してウイルス血症を伴いながら多くの臓器、組織を侵すことにより病気を進行させる全身性の場合とに大別されるが、特に後者の場合、一次病巣から必ず全身性へ移行するとは限らず、これは生体内の先天性のさまざまな種類の防御因子により感染の拡大が抑制されていることによると考えられている。先天性免疫因子に関する研究はヒト免疫不全ウイルス、インフルエンザウイルスなどのごく限られたウイルスについてのみ活発に行われており、他のウイルスについてはこれらの因子に関するウイルス学的、生物学的意義についての報告は少ない。そこで著者は限局性から全身性感染への移行を阻止する可能性のある感染防御因子を明らかにすべく、特に正常血清中に含まれる抗ウイルス因子の同定を試みた。

第 1 章 正常動物血清中に存在する日本脳炎ウイルスの感染を阻害する因子の同定

まず血液を介して神経系へ伝搬されるウイルスのモデルとして日本脳炎ウイルス (JEV) を用い正常血清中に存在する抗ウイルス因子の検出を試みた。その結果、モルモット血清 4 例中 2 例に抗 JEV 活性が認められた。次に、これら 2 例の血清について熱処理 (56°C, 30分), EDTA 処理を行った。その結果、抗 JEV 活性が減弱したことから、モルモット血清中に認められた抗ウイルス活性の大部分は EDTA 感受性または易熱性因子あるいは両者によるものであることが分かった。古くから動物の正常血清中にはインフルエンザ A ウイルスに対する先天免疫因子として α 型, β 型, γ 型の 3 種類のインヒビターが存在することが知られている。最近、これらのうちの β 型インヒビター (β 因子) はマンナン結合タンパク (MBL) と呼ばれる C 型レクチンであり, γ 型インヒビター (γ 因子) は $\alpha 2$ -マクログロブリン ($\alpha 2$ -M) であることが明らかにされた。MBL はウイルス、細菌などの病原体表面に存在するマンノースや N-アセチルグルコサミンといった糖鎖にカルシウムイオン存在下で特異的に結合しく補体系の活性化を介して微生物感染の初期防御に重要な役割を演じていることが明らかにされてきている。そこで次に、抗 JEV 活性における MBL 関与の可能性を考え、これらの血清から MBL を吸収除去、あるいは抗 MBL 抗体を血清中に添加したところ、抗 JEV 活性が殆ど消失した。さらに精製 MBL を血清中に添加することにより抗 JEV 活性が上昇したが、熱処理した血清ではこのような結果は得られなかった。以上の結果から、抗 JEV 活性の殆どは MBL の関与するものであり、易熱性因子の共存下ではその抗ウイルス活性がさらに増強されることが分かった。生理的濃度の範囲内で $\alpha 2$ -M は JEV に対して抗ウイルス作用を殆ど示さなかった。これらの結果から、個体間でみられる血清中の MBL 濃度の違いはウイルス血症を介した中枢神経へのウイルスの侵入を左右する重要な要素の一つであることを示唆する。

第 2 章 水疱性口内炎ウイルスに対する正常動物血清の抗ウイルス活性に関する研究

次に、感染の程度が比較的に軽度で、通常限局された表面感染を引き起こすウイルスのモデルとして水疱性口内炎ウイルス (VSV) を用い、種々の健常なほ乳動物 (モルモット, ラット, ウサギ, イヌ, ウシ, ウマ) およびヒトの血清中に抗ウイルス因子が存在するか否かについて調べたところ、抗 VSV 活性は調べた全ての動物の血清に検出され、特にモルモット

ト血清に最も強く認められた。また抗 JEV 活性のない血清にも強い抗 VSV 活性が検出された。さらに詳細に検討したところ、抗ウイルス活性は耐熱性因子と易熱性因子から成り、さらに耐熱性因子は EDTA 感受性と EDTA 抵抗性のものに二分されることが分かった。つぎに、抗 VSV 活性における MBL 関与の可能性について調べたところ、MBL はそれ自体では抗 VSV 活性は弱い易熱性因子の共存下ではその抗ウイルス活性がさらに増強された。また、易熱性因子については正常血清から C3 因子を除去することにより抗 VSV 活性が低下したこと、これに C3 因子を添加することにより抗 VSV 活性が回復したことから、補体の関与の可能性が強く示唆された。これまでに報告されている耐熱性因子として、前述の γ 型インヒビター（即ち、血清プロテアーゼインヒビターとして知られている $\alpha 2$ -M）が種々のウイルスに対して抗ウイルス活性を示すことから、抗 VSV 活性における耐熱性因子として $\alpha 2$ -M の関与についても検討した。その結果、 $\alpha 2$ -M 単独でかなり強い抗 VSV 活性を示し、また MBL との共存下において相加的効果が認められた。興味あることに、 $\alpha 2$ -M は補体存在下では MBL との共存下において逆に抗 VSV 活性の阻害が観察された。この阻害のメカニズムの詳細は今のところ不明であるが、熱処理した血清存在下では見られなかったことから、ひとつには糖鎖への MBL の結合が引き金となって MBL と複合体を形成しているセリンプロテアーゼが補体を活性化することにより次々と産生されたプロテアーゼが $\alpha 2$ -M の抗ウイルス作用を阻害したのではないかと考えられる。今回の実験結果から VSV は JEV に比べて血清中の因子によって中和されやすいことが明らかになった。この事実は、VSV が試験管内では非常によく増殖する能力を発揮するにも拘わらず、生体内ではこれらの因子によって抑制されるために深部感染を引き起こさないことを説明しているのではないかと推察される。

第 3 章 種々の向神経性ウイルスに対する正常血清の抗ウイルス活性の比較研究

最後に、種々の向神経性ウイルス（JEV、シンドビスウイルス、ポリオウイルス、単純ヘルペスウイルス I 型 [HSV-1]、狂犬病ウイルスなど）について、抗ウイルス活性における MBL および $\alpha 2$ -M の関与について比較、検討した。その結果、比較の対照として調べた VSV が正常血清の抗ウイルス作用に対して最も感受性が高く、逆にシンドビスウイルス、ポリオウイルスは強く抵抗した。上記のように JEV はやや感受性であり、JEV に対する抗ウイルス活性は主に MBL と補体によるものと考えられる。HSV-1 についても易熱性の抗ウイルス活性が検出されたが、抗 MBL 抗体の影響は見られなかったことから、MBL 以外の易熱性抗ウイルス因子の作用が考えられる。狂犬病ウイルスについては VSV と全く同様の結果が得られ、MBL、補体因子によると思われる易熱性の抗ウイルス活性および耐熱性の抗ウイルス因子として $\alpha 2$ -M の関与が強く示唆された。ポリオウイルスやシンドビスウイルスのように、これらの血清中の抗ウイルス因子に抵抗性の向神経性ウイルスでは血液中に送り込まれても、これらの抗ウイルス性因子に影響されることなく、標的臓器に到達して二次病巣を形成する機会を得ることが推測され、逆に感受性の強い向神経性ウイルスでは血液を介しての二次病巣形成が阻止され、別の伝播経路により神経系に侵入することと理解される。一方、MBL に対してのみ中等度に感受性の JEV では、血液を介しての体内伝播は血液中の MBL の濃度に大きく左右されることが強く示唆された。

総括

以上のように、種々のウイルスについて行った実験結果から、正常血清には性質の異なる複数の抗ウイルス性成分が含まれ、体液を介した体内伝播によるウイルスの感染の拡大を制御する上で重要な役割を担っていることが予測された。従って、このような血清中の抗ウイルス性成分の濃度を適正に維持することは健康維持のための重要な要素の一つと考えられ、今後、高齢化社会における感染症対策を考える上で、栄養状態や高齢化のような変動要因のみならず、感染症を含めたあらゆる疾患に対する薬物の投与も重要な変動要因の一つとして検討しておく必要があり、また自然免疫の役割を考慮に入れた治療法の開拓も期待される。

論文審査の結果の要旨

一般にウイルス性疾患にはウイルスが侵入部位および隣接した組織のみを侵す限局性の場合と侵入局所での一次増殖に留まらず、二次病巣を形成してウイルス血症を伴いながら多くの臓器、組織を侵すことにより病気を進行させる全身性の場合とに大別されるが、特に後者の場合、一次病巣から必ず全身性へ移行するとは限らず、これは生体内の先天性のさまざまな種類の防御因子により感染の拡大が抑制されていることによると考えられている。このような先天性免疫因子に関する研究

はヒト免疫不全ウイルス、インフルエンザウイルスなどのごく限られたウイルスについて行われているが、特に向神経性ウイルスについてはこれらの因子に関するウイルス学的、生物学的意義についての報告はほとんどない。本論文で著者は向神経性ウイルスが限局性から全身性感染へ移行するのを阻止する可能性のある感染防御因子の実体を明らかにすべく、特に正常血清中にも含まれる抗ウイルス因子の同定を試みた。

まず血液を介して神経系へ伝搬されるウイルスのモデルとして日本脳炎ウイルス (JEV) を用い正常血清中に存在する抗ウイルス因子の検出を試みた。その結果、モルモット血清 4 例中 2 例に抗 JEV 活性が認められた。次に、これら 2 例の血清について熱処理 (56°C, 30分), EDTA 処理を行った。その結果、抗 JEV 活性が減弱したことから、モルモット血清中に認められた抗ウイルス活性の大部分は EDTA 感受性または易熱性因子あるいは両者によるものであることが分かった。古くから動物の正常血清中にはインフルエンザ A ウイルスに対する先天免疫因子として α 型, β 型, γ 型の 3 種類のインヒビターが存在することが知られている。最近、これらの内の β 型インヒビター (β 因子) はマンナン結合タンパク (MBL) と呼ばれる C 型レクチンであり, γ 型インヒビター (γ 因子) は $\alpha 2$ -マクログロブリン ($\alpha 2$ -M) であることが明らかにされた。そこで、次に、著者はモルモット血清の示す抗 JEV 活性に MBL が関与する可能性を考え、これらの血清から MBL を吸除除去,あるいは抗 MBL 抗体を血清中に添加したところ、抗 JEV 活性が殆ど消失した。さらに精製 MBL を血清中に添加することにより抗 JEV 活性が上昇したが、熱処理した血清ではこのような結果は得られなかった。以上の結果から、抗 JEV 活性の殆どは MBL の関与するものであり、易熱性因子の共下ではその抗ウイルス活性がさらに増強されることが分かった。一方、 $\alpha 2$ -M は生理的濃度の範囲内では JEV に対して抗ウイルス作用を殆ど示さなかった。これらの結果から、個体間でみられる血清中の MBL 濃度の違いはウイルス血症を介した中枢神経系へのウイルスの侵入を左右する重要な要素の二つであることを示唆する。

次に、感染の程度が比較的に軽度で、通常限局された表面感染を引き起こすが、人為的に深部感染を起こさせると神経系にも侵入し得るウイルスである水疱性口内炎ウイルス (VSV) をモデルとして用い、種々の健常な哺乳動物 (モルモット, ラット, ウサギ, イヌ, ウシ, ウマ) およびヒトの血清中に抗ウイルス因子が存在するか否かを調べた。その結果、調べた全ての動物の血清中に抗 VSV 活性が検出され、特にモルモット血清に高い活性が認められ、また抗 JEV 活性のない血清にも強い抗 VSV 活性が検出された。この抗 VSV 活性について詳細に検討したところ、耐熱性因子と易熱性因子から成り、耐熱性因子はさらに EDTA 感受性と EDTA 抵抗性のものに二分されることが分かった。つぎに、抗 VSV 活性における MBL の関与の可能性について調べたところ、MBL それ自体では抗 VSV 活性は弱い而易熱性因子の共存下ではその抗ウイルス活性がさらに増強された。また、易熱性因子については正常血清から C3 因子を除去することにより抗 VSV 活性が低下したこと、これに C3 因子を添加することにより、抗 VSV 活性が回復したことから、補体の関与の可能性が強く示唆された。これまでに報告されている耐熱性因子として、前述の γ 型インヒビター (即ち、血清プロテアーゼインヒビターとして知られている $\alpha 2$ -M) が種々のウイルスに対して抗ウイルス活性を示すことから抗 VSV 活性における耐熱性因子として $\alpha 2$ -M の関与についても検討した。その結果、 $\alpha 2$ -M 単独でかなり強い抗 VSV 活性を示し、また MBL との共存下において相加的効果が認められた。興味あることに、 $\alpha 2$ -M は補体存在下では MBL との共存下において逆に抗 VSV 活性の阻害が観察された。この阻害のメカニズムの詳細は今のところ不明であるが、熱処理した血清存在下では見られなかったことから、ひとつには糖鎖への MBL の結合が引き金となって MBL 複合体を形成しているセリンプロテアーゼが補体を活性化することにより次々と産生されたプロテアーゼが $\alpha 2$ -M の抗ウイルス作用を阻害したのではないかと推測している。今回の実験結果から VSV は JEV に比べて血清中の因子によって中和されやすいことが明らかになった。この事実は、VSV が試験管内では非常によく増殖する能力を発揮するにも拘わらず、生体内ではこれらの因子によって抑制されるために深部感染を引き起こさないことを説明しているのではないかと推察される。

最後に、種々の向神経性ウイルス (JEV, シンドビスウイルス, ポリオウイルス, 単純ヘルペスウイルス I 型 [HSV-1], 狂犬病ウイルスなど) について、抗ウイルス活性における MBL および $\alpha 2$ -M の関与について比較、検討した。その結果、比較の対照として調べた VSV がモルモットの正常血清の抗ウイルス作用に対して最も感受性が高く、逆にシンドビスウイルス, ポリオウイルスは強く抵抗した。上記のように JEV はやや感受性であり、JEV に対する抗ウイルス活性は主に MBL と補体によるものと考えられる。HSV-1 についても易熱性の抗ウイルス活性が検出されたが、抗 MBL 抗体の影響

は見られなかったことから、MBL 以外の易熱性抗ウイルス因子の作用が考えられる。狂犬病ウイルスについては VSV と全く同様の結果が得られ、MBL、補体因子によると思われる易熱性の抗ウイルス活性および耐熱性の抗ウイルス因子として $\alpha 2$ -M の関与が強く示唆された。ポリオウイルスやシンドビスウイルスのように、これらの血清中の抗ウイルス因子に抵抗性の向神経性ウイルスでは血液中に送り込まれても、これらの抗ウイルス性因子に影響されることなく、標的臓器に到達して二次病巣を形成する機会を得ることが推測され、逆に感受性の強い向神経性ウイルスでは血液を介しての二次病巣形成が阻止され、別の伝播経路により神経系に侵入することと理解される。一方、MBL に対してのみ中等度に感受性の JEV では、血液を介しての体内伝播は血液中の MBL の濃度に大きく左右されることが強く示唆された。

以上、本論文の研究において種々のウイルスについて行った実験結果から、正常血清には性質の異なる複数の抗ウイルス性成分が含まれ、体液を介した体内伝播によるウイルスの感染の拡大を制御する上で重要な役割を担っていることが予測された。従って、このような血清中の抗ウイルス性成分の濃度を適正に維持することは健康維持のための重要な要素の一つと考えられ、今後、高齢化社会における感染症対策を考える上で、栄養状態や高齢化のような変動要因のみならず、感染症を含めたあらゆる疾患に対する薬物の投与も重要な変動要因の一つとして検討しておく必要があり、また自然免疫の役割を考慮に入れた治療法の開拓も期待される。よって、本論文が博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。さらに、平成 14 年 2 月 28 日論文内容とそれに関連した口頭試問をおこなった結果、合格と認めた。