

論文の内容の要旨

論文題目 : Studies on the Chemotherapy with Neuraminidase Inhibitors for Equine Influenza

(ノイラミニダーゼ阻害薬による馬インフルエンザの化学療法に関する研究)

氏名 : 山 中 隆 史

馬インフルエンザ (EI) は馬インフルエンザウイルス (EIV) の感染に起因する馬の急性呼吸器疾患である。典型的な臨床症状は、急性の発熱、咳嗽、鼻漏および沈うつ等であり、しばしば2次的な細菌性肺炎を招来する。EIVは伝染力が極めて強いことから、競馬場等の馬を密集させて繋養している施設に本ウイルスが侵入した場合には、感染が急速に拡大し、大きな経済的被害をもたらす。

本研究の目的は、EIVが属するA型インフルエンザウイルスが増殖するために必要なノイラミニダーゼ (NA) の阻害薬がEIの化学療法剤として有用であるか否かを明らかにすることである。本論文は以下の3章より構成されている。

第1章では、*in vitro*におけるカルボン酸オセルタミビル (OC) およびザナミビル (ZA) のH7N7 (1株) およびH3N8 (11株) のEIVのNA活性および増殖性に対する抑制効果を検討した。OCおよびZAのNA活性に対する抑制効果は、フェツインを基質とする比色定量法により測定し、50%抑制濃度 (IC_{50}) で表した。また、OCおよびZAの増殖性に対する抑制効果は、MDCK細胞を用いた50%プラック減少法により測定し、50%阻害濃度 (EC_{50}) により表した。OCおよびZAの IC_{50} は、それぞれ0.017-0.130 μ M および0.010-0.074 μ M の範囲にあった。両化合物間および株間の IC_{50} に、10倍を越える様な明らかな相違が認め

られなかったことから、OC および ZA は、概ね同程度に EIV 株の NA 活性を阻害することが明らかとなった。また、OC および ZA の EC_{50} は、耐性を示した 1 株 (A/equine 2/Italy/5/91, それぞれ $13.328 \mu\text{M}$ および $6.729 \mu\text{M}$) を除き、それぞれ $0.015\text{--}0.097 \mu\text{M}$ および $0.016\text{--}0.089 \mu\text{M}$ の範囲にあった。両薬物間および株間の EC_{50} に、10 倍を越える様な明らかな相違が認められなかったことから、OC および ZA は、同程度に殆どの EIV 株の増殖性を阻害することが明らかとなった。以上のことから、OC および ZA は、同程度に殆どの EIV 株の NA 活性および増殖性を抑制することが示された。

第 2 章では、EIV を実験的に感染させた馬を用いて、オセルタミビル投与が実際に効果を発現するか否かを検討した。第 1 章において、OC および ZA は、同程度に殆どの EIV 株の NA 活性および増殖性を抑制することが示された。従って、オセルタミビルおよび ZA は、EI に対する予防および治療法に有用と思われた。しかしながら、ZA は気道に直接噴霧する必要があることから、獣医師は、患馬の呼気と投与のタイミングを一致させる必要があり、実際の臨床応用には困難を伴うと予測された。それゆえ、本章では OC のプロドラッグであるオセルタミビルのみを対象とすることとした。9 頭の軽種馬を対照群、治療群 [2mg/kg, 1 日 2 回, 発熱 ($\geq 38.9^\circ\text{C}$) 後 5 日間] および予防群 (2mg/kg, 1 日 1 回, ウイルス接種 1 日前より 5 日間) の 3 群各 3 頭に分け、超音波吸入器を用いてウイルスを接種 (A/equine 2/La Plata/93, 2×10^8 egg infectious dose₅₀/20 ml) した。治療群におけるウイルス排泄および発熱期間 (平均 \pm 標準偏差) は、それぞれ、 2.3 ± 0.6 および 2.0 ± 1.0 日であり、対照群 (それぞれ、 6.0 ± 0.0 および 8.0 ± 1.0 日) に比較して明らかに短縮していた。予防群では、発熱およびウイルス排泄は防ぐことはできなかったものの、ウイルス排泄および発熱期間は、それぞれ、 5.0 ± 0.0 および 4.7 ± 1.5 日であり対照群に比較して短縮していた。また、ウイルス接種 7 日後に採取した全ての馬の気管支肺胞洗浄液から、2 次的な細菌性肺炎の一般的な原因菌として知られる *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* が分離されたが、治療群および予防群の菌数は対照群の菌数よりも有意に少なかった。

治療群のウイルス排泄期間が短縮していたことは、オセルタミビルによる EI の治

療が、他馬へのウイルス拡散のリスクを減少させることを示唆している。したがって、オセルタミビルによるEIの治療は、馬を集団的に飼育管理している施設の衛生管理にとって、有意義なものと考えられた。また、ウイルス接種7日後における気管支肺胞洗浄液中の菌数が治療群および予防群において、対照群よりも減少していたことは、ウイルス増殖が抑制された結果、線毛の損傷が軽減されたことにより、上部気道からの細菌の流入が抑制されたことによると考えられた。EIの後遺症として肺の硬化症が挙げられるが、初期のウイルス感染よりも2次的な細菌性肺炎の方が主に関与していると考えられている。このことから、オセルタミビルによるEIの化学療法は個体管理の観点からも有意義であると考えられた。以上のことから、オセルタミビルの経口投与は、EIV感染によるウイルス排泄および発熱を抑制するだけでなく、2次的な細菌性肺炎の緩和に寄与することが示唆された。

第3章では、人で推奨されているオセルタミビルの1回投与量(2mg/kg体重)を経口投与した後における馬血漿中のオセルタミビルおよび代謝活性体(OC)の薬物動態を調べた。経鼻食道カテーテルを用いて、6頭の軽種馬(1歳)にオセルタミビル(2mg/kg体重)を投与した。オセルタミビル投与後0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18, and 24時間(h)に血漿を採取し、血漿中のオセルタミビルおよびOCの濃度を測定し、それらの値に基づき薬物動態学的パラメーターの算出を行った。また、OCの馬血漿蛋白質との結合について限外濾過法により検討を試みたところ、殆ど結合しなかった(<1%)。さらに、3頭の軽種馬(1歳)に過剰量のオセルタミビル(6mg/kg体重)を1日2回5日間経口投与し、健康状態を観察することによりオセルタミビルの安全性についても検討した。オセルタミビルの吸収速度定数は $4.1 \pm 2.1 \text{ h}^{-1}$ であり、オセルタミビルは、経口投与後速やかに消化管から血液中に吸収されることが示された。また、血液中のオセルタミビルは速やかにOCに変換され、オセルタミビル投与後 $1.7 \pm 0.3 \text{ h}$ で最高血漿中OC濃度($257.9 \pm 0.3 \text{ ng/ml}$)に達した。しかしながら、OCの半減期は極めて短く($2.5 \pm 0.4 \text{ h}$)、血漿中から速やかに消失することが示された。また、過剰量(6mg/kg体重)のオセルタミビルを5日間投与された馬に、異常な臨床所見を伴う健康状態の変化は観察さ

れなかったことから、オセルタミビルは馬に安全に経口投与できることが示された。人医学において、OC は人血漿蛋白質と殆ど結合しないことから、オセルタミビルの投与量および間隔は、血漿中 OC のトラフ濃度が *in vitro* において求められた IC_{50} および EC_{50} を下回らないことを根拠に設定されている。本研究においても、OC は馬血漿蛋白質と殆ど結合しないことが確認されたことから、馬においても、血漿中 OC のトラフ濃度と IC_{50} および EC_{50} の関係に基づいて、投与量および間隔を設定することが可能と考えられた。第 1 章において、著者は 12 株の EIV の IC_{50} および EC_{50} は耐性を示した 1 株を除き、それぞれ 0.017–0.130 μM (4.8–36.9 ng/ml) および 0.015–0.097 μM (4.3–27.5 ng/ml) であることを示した。現在のところ、 IC_{50} あるいは EC_{50} のどちらが、馬体における治療効果とより相関するかは不明であるが、オセルタミビルを馬に投与する場合には、血漿中 OC 濃度を IC_{50} および EC_{50} の最高値である 36.9 ng/ml を下回らないよう維持することが望ましいと考えられる。本研究において、オセルタミビル投与後 10 h および 12 h の血漿中 OC 濃度は、それぞれ 37.2 および 26.6 ng/ml であった。このことから、オセルタミビルの 1 回投与量を 2mg/kg 体重とした場合には、十分な血漿中 OC 濃度を維持するために投与間隔を 10 h 以内にする必要性が示された。

以上の研究は、オセルタミビルの代謝活性体である OC が EIV の NA 活性およびウイルス増殖を抑制することを明らかにし、そのプロドラッグであるオセルタミビルの馬への経口投与が、EIV 感染によるウイルス排泄および発熱を抑制するだけでなく、2 次的な細菌性肺炎の緩和にも寄与することを示した。さらに、本研究はオセルタミビルの経口投与後のオセルタミビルおよび OC の馬血漿中における薬物動態についても検討し、適切な投薬プロトコールの構築の基礎となる知見を提供した。