



Title	魚類病原ウイルスに対する(S)-DHPA [(S)-9-(2,3-dihydroxypropyl)adenine] のin vitroにおける抗ウイルス効果
Author(s)	木村, 喬久; KIMURA, Takahisa; 吉水, 守 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 38(2), 151-155
Issue Date	1987-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23948
Type	departmental bulletin paper
File Information	38(2)_P151-155.pdf



魚類病原ウイルスに対する (S)-DHPA [(S)-9-(2, 3-dihydroxypropyl) adenine] の
in vitro における抗ウイルス効果

木村 喬久*・吉水 守*・西沢 豊彦*

In Vitro Antiviral Effect of (S)-DHPA
[(S)-9-(2, 3-dihydroxypropyl) adenine]
on Fish Pathogenic Viruses

Takahisa KIMURA*, Mamoru YOSHIMIZU*
and Toyohiko NISHIZAWA*

Abstract

The antiviral activity of (S)-DHPA [(S)-9-(2, 3-dihydroxypropyl) adenine], on the fish pathogenic viruses, *Oncorhynchus masou* virus (OMV), *Herpesvirus salmonis*, infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV), was studied *in vitro*. The appearance of CPE induced by 100 TCID₅₀/ml of each of the viruses was delayed with increasing amounts of (S)-DHPA, but those of IHNV and IPNV were unsuppressed by 500 µg/ml of (S)-DHPA, therefore the minimum inhibitory concentration (MIC) was more than 500 µg/ml for both viruses. CPE of OMV and *H. salmonis* were also unsuppressed by 100 µg/ml of (S)-DHPA. In comparison to other antiviral agents such as ACV, BVdU, and Ara-C the effect of (S)-DHPA against fish viruses was very insignificant.

目 的

ウイルス感染症に対する化学療法剤として IUdR (5-iodo-2'-deoxyuridine) が1962年に開発され、単純ヘルペスウイルス眼炎に効果を取めて以来、種々のヌクレオチドアナログが合成され、すぐれた抗ウイルス剤が発見されてきた。著者らは魚類病原ヘルペスウイルスである OMV (*Oncorhynchus masou* virus) および *Herpesvirus salmonis* に対する ACV [9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine] の *in vitro* ならびに *in vivo* での抗ウイルス効果を検討した結果、ACV はすぐれた抗ウイルス効果を示し、OMV 感染症をある程度予防し得ることを明らかにした (Kimura *et al.*, 1983a, b)。またデオキシチミジンのアナログである BVdU [(E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine] の *in vitro* における魚類病原ウイルスに対する抗ウイルス効果を ACV, Ara-A (9-β-D-arabinofuranosyl-adenine), Ara-C (1-β-D-arabinofuranosyl-cytocine) と比較し BVdU が ACV と同程度の優れた抗ウイルス効果を有することも明らかにした (木村・吉水, 1985)。

ところでアデニン誘導体 (S)-DHPA [(S)-9-(2, 3-dihydroxypropyl) adenine] は DNA ウイルスの Vaccinia や Herpes simplex virus に、RNA ウイルスの Vesicular stomatitis や Measles virus に 4~20 µg/ml (ID₅₀) で増殖阻止効果があり (de Clercq *et al.*, 1978), 魚類病原ウイルスの IPNV

* 北海道大学水産学部微生物学講座
(Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

(infectious pancreatic necrosis virus) にも 300 $\mu\text{g/ml}$ で効果があるとの報告がみられる (Bernstain, 1983)。本研究ではこの (S)-DHPA の魚類病原ウイルス IPNV, IHNV (infectious hematopoietic necrosis virus), OMV, *H. salmonis* に対する抗ウイルス効果を *in vitro* で MIC 値から検討し前報までの ACV, BVdU および Ara-C の結果と比較検討した。

実験材料と方法

供試薬剤:

供試薬剤として Erik de CLERCQ 博士 (Rega Institute for Medical Research, Katholike Universiteit Leuven, Belgium) より分与を頂いた (S)-DHPA [(S)-9-(2,3-dihydroxypropyl) adenine] を用い、5,000 $\mu\text{g/ml}$ 濃度の水溶液を調製し、ミリポアフィルター-HA (0.45 μm) 濾過除菌の後、実験に供すまで 0°C に保存した。

供試ウイルス:

魚類病原ウイルスとして IPNV (VR-299), IHNV (ChAb), OMV (OO-7812) および *H. salmonis* を供試した。各々のウイルスは後述の RTG-2 細胞を用いて培養し、同一ロットのものを供試するまで -80°C に保存した。

供試細胞:

ニジマス卵巣由来の RTG-2 細胞 (WOLF and QUIMBY, 1962) を供試し、培養は 10% FBS (Gibco), ペニシリン, ストレプトマイシン (Sigma) 100 I.U., 100 $\mu\text{g/ml}$ 加 EAGLE の MEM (Gibco) で 15°C で行った。ウイルス感染価の測定は常法の 96 well 使用のマイクロプレート法により実施した。

MIC の測定法:

ローラーチューブ (16×25 mm) に 15 万 cell/ml となるように調整した RTG-2 細胞を 0.8 ml ずつ播き、15°C で 3 日間培養後、HANKS' BSS で 1000 TCID₅₀/ml となるように調整したウイルス液を 0.1 ml 宛て接種し、同時に HANKS' BSS で所定の濃度に希釈した抗ウイルス剤を 0.1 ml 加え、全量を 1.0 ml とした。各濃度毎に 4 本のチューブを使用し、*H. salmonis* は 10°C で 14 日間、他は 15°C で 10 日間の培養を行い CPE の出現が完全に阻止される最低濃度を MIC とした。

結 果

(S)-DHPA の IPNV に対する抗ウイルス作用:

(S)-DHPA の IPNV (VR-299) に対する抗ウイルス効果を観察した結果を表-1 に示した。(S)-DHPA の濃度が高くなるにつれ IPNV の CPE 出現は遅れる傾向を示したが、500 $\mu\text{g/ml}$ の (S)-DHPA 添加チューブでも 4 日目に CPE が出現し、MIC は 500 $\mu\text{g/ml}$ 以上と測定された。

(S)-DHPA の IHNV に対する抗ウイルス効果:

(S)-DHPA の IHNV (ChAb) に対する抗ウイルス効果の観察結果を表-2 に示した。IHNV の場合も IPNV と同様 (S)-DHPA の濃度が高くなるにつれ CPE 出現は遅れたが 500 $\mu\text{g/ml}$ 添加チューブでも 5 日目に CPE が観察され、MIC は 500 $\mu\text{g/ml}$ 以上と測定された。

木村ら：(S)-DHPAの魚類病原ウイルスに対する抗ウイルス効果

Table 1. Antiviral effect of (S)-DHPA on IPNV

Days after inocuration	CPE*			
	1	2	3	4
Concentration ($\mu\text{g/ml}$)				
500	0	2	3	4
250	0	4	4	4
125	0	4	4	4
62.5	4	4	4	4
0.0	4	4	4	4

*: Numbers of CPE positive tube per each 4 tubes.

Table 2. Antiviral effect of (S)-DHPA on IHNV.

Days after inocuration	CPE*				
	1	2	3	4	5
Concentration ($\mu\text{g/ml}$)					
500	0	0	0	1	4
250	0	0	0	4	4
125	0	0	3	4	4
62.5	0	3	4	4	4
0.0	0	0	3	4	4

*: Numbers of CPE positive tube per each 4 tubes.

(S)-DHPAのOMVに対する抗ウイルス効果:

OMVに対する(S)-DHPAの抗ウイルス効果の観察結果を同様に表-3に示した。OMVの場合25 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度でCPEの出現が7日目まで阻止されたが、10日目には4本のチューブ共にCPEが観察され、MICは100 $\mu\text{g/ml}$ 以上と測定された。

(S)-DHPAの*H. salmonis*に対する抗ウイルス効果:

*H. salmonis*に対する(S)-DHPAの抗ウイルス効果の観察結果を表-4に示した。*H. salmonis*の場合は10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で6日目までCPEが出現がみられなかったが、100 $\mu\text{g/ml}$ でも10日目に全てのチューブにCPEが出現し、MICは100 $\mu\text{g/ml}$ 以上と測定された。

考 察

本研究ではアデニン誘導体の(S)-DHPA〔(S)-9-(2,3-dihydroxypropyl) adenine〕の魚類病原RNAウイルスIPNV, IHNVおよびDNAウイルスOMV, *H. salmonis*に対する抗ウイルス効果の検討を100 TCID₅₀/mlの各ウイルスに対するMICを測定して行った。前述のように(S)-DHPAはDNAウイルスのHerpes simplex virus type 1, 2やVacciniavirusをはじめ、一部のRNAウイルスにも抗ウイルス効果が認められ(de CLERCQ *et al.*, 1978), 魚類病原ウイルスのIPNVに

Table 3. Antiviral effect of (S)-DHPA on OMV

Days after incuration	CPE*			
	3	5	7	10
concentration ($\mu\text{g/ml}$)				
100	0	0	0	4
50	0	0	0	4
25	0	0	0	4
10	0	1	2	4
5	0	3	3	4
2.5	0	1	4	4
0.0	0	1	2	4

*: Numbers of CPE positive tube per each 4 tubes.

Table 4. Antiviral effect of (S)-DHPA on *H. salmonis*

Days after inocuration	CPE*				
	2	4	6	8	10
Concentration ($\mu\text{g/ml}$)					
100	0	0	0	1	4
50	0	0	0	4	4
50	0	0	0	4	4
0	0	0	3	4	4

*: Numbers of CPE positive tube per each 4 tubes.

対しても 300 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で $10^{5.3}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ の IPNV の CPE 出現を阻止し得るとの報告がみられる (Bernstein, 1983)。しかし今回供試した(S)-DHPA の MIC は 4 種のウイルス共に 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上であるが, ACV, BVdU, Ara-C の OMV や *H. salmonis* に対する MIC; 1.25~3.0 $\mu\text{g/ml}$ (木村・吉水, 1985) に比べると顕著な抗ウイルス効果は認められなかった。ただ OMV と *H. salmonis* に対しては 10~25 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で CPE の出現が 6~7 日目まで観察されず, 薬剤添加時のウイルス増殖曲線より, 感染価を 50% 減少させるに要する量 (ID_{50}) を算定したところ 10~25 $\mu\text{g/ml}$ と測定された。

HASOBE and SANEYOSHI (1985a, b) は (S)-DHPA の IHNV に対する抗ウイルス効果を *in vitro* および *in vivo* で検討し, CPE spot 法による MIC が 32 $\mu\text{g/ml}$ (vs 100~150 PFU/ml), ID_{50} 値は 3.2 $\mu\text{g/ml}$ であること, また 1 $\mu\text{g/ml}$ の (R, S)-DHPA を隔日浸漬投与することにより, 生存率に対照群と比し 10~20% の差が生じることを報告している。

今回用いた TCID_{50} 法ではブランク減少法および HASOBE and SANEYOSHI (1985a, b) の CPE spot 法における 50% 減少値はいわゆる許容誤差範囲に入り, 今後ブランク減少法による ID_{50} を測定比較し, また *in vivo* における効果についても検討する必要があると考える。

要 約

(S)-DHPA [(S)-9-(2, 3-dihydroxypropyl) adenine] の魚類病原ウイルス IPNV, IHNV, OMV および *H. salmonis* に対する抗ウイルス効果を検討し以下の如き結論を得た。

(S)-DHPA の MIC は、供試した 4 種のウイルス共に 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上 (vs 100 TCID₅₀) となり、顕著な抗ウイルス効果は観察されなかった。

謝 辞

本研究の遂行に当たり貴重なる薬剤の分与を頂いた Katholike Universiteit Leuven の Erik de CLERCQ 博士に厚く感謝申し上げる。また本研究の一部は昭和 60 年度日本水産資源保護協会魚病対策技術研究費、防疫技術開発研究：増殖対象サケ科魚類の防疫技術に関する研究によった。ここに記して謝意を表する。

文 献

- BERNSTEIN, J. (1983). The effect of (S)-9-(2, 3-dihydroxypropyl) adenine on the replication of infectious pancreatic necrosis virus in fish cell cultures. The master's thesis submitted to the Faculty of Richard L. College, Long Island University.
- De CLERCQ, E., DESCAMPS, J., de SOMER, P., and HOLY, A. (1978). (S)-9-(2, 3-dihydroxypropyl) adenine: An aliphatic nucleoside analog with broad-spectrum antiviral activity. *Science*, **200**, 563-565.
- HASOBE, M., and SANEYOSHI, M. (1985a). A new method for the evaluation of antiviral agents against infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) on microtiter plates: CPE spot reduction method. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **51**, 1079-1084.
- HASOBE, M., and SANEYOSHI, M. (1985b). On the approach to the viral chemotherapy against infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) *in vitro* and *in vivo* on salmonid fishes. *Fish Pathology*, **20**, 343-351.
- KIMURA, T., SUZUKI, S., and YOSHIMIZU, M. (1983a). *In vitro* antiviral effect of 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine on the fish herpesvirus, *Oncorhynchus masou* virus (OMV). *Antiviral Research*, **3**, 93-101.
- KIMURA, T., SUZUKI, S., and YOSHIMIZU, M. (1983b). *In vivo* antiviral effect of 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine on experimental infection of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) fry with *Oncorhynchus masou* virus (OMV). *Antiviral Research*, **3**, 103-108.
- 木村喬久・吉水 守 (1985). BVdU [(E)-5-2-(bromovinyl)-2'-deoxyuridine] の *in vitro* における OMV に対する抗ウイルス効果 昭和 59 年度魚病対策技術研究結果報告書, 1-6, 日本水産資源保護協会
- WOLF, K. and QUIMBY, M.C. (1962). Established eurythermic line of fish cells *in vitro*. *Science*, **135**, 1065-1066.