

原著

抗ノロウイルス活性を有する天然生理活性物質の探索

小林孝行・吉富秀亮・中村麻子・小木曾俊孝・芦塚由紀・梶原淳睦・上間匡*

ノロウイルス(NoV)の感染予防対策に寄与する化合物の探索を目的に、ネコカリシウイルス(FCV)およびマウスノロウイルス(MNV)を用いた抗NoV活性を有する化合物の活性評価を行った。天然生理活性物質234化合物を対象に抗NoV活性の評価を行った結果、22化合物がFCVまたはMNVに対する抗ウイルス活性を示し、このうちアニソマイシンのみが両ウイルスに対する抗ウイルス活性を示した。次にアニソマイシンについて精査したところ、細胞生存率を指標とする抗ウイルス活性は両ウイルスに対して18 μM で最大を示した。また、24時間の培養でFCVとMNVに対して14.4 μM でそれぞれ4.56 \log_{10} 、5.83 \log_{10} ウイルス感染価が抑制された。以上のことから、アニソマイシンは抗NoV活性を有する可能性が示唆された。

[キーワード: 抗ノロウイルス活性、アニソマイシン、ネコカリシウイルス、マウスノロウイルス]

1 はじめに

ノロウイルス(NoV)は主に冬季に流行するウイルス性急性胃腸炎の主要な原因ウイルスである。厚生労働省の食中毒統計によると、NoVによる食中毒は例年事件数、患者数ともに上位を占めており¹⁾、NoV対策は食品衛生における重要な課題となっている。NoVの感染予防と拡大防止には手指や調理器具の洗浄、あるいは糞便や嘔吐物によって汚染された環境の消毒が重要である。NoVの不活化には次亜塩素酸ナトリウムなどの消毒剤が推奨されている²⁾が、人体への影響から手指等への使用が難しいため、より安全かつ効果の高い消毒剤が望まれている。NoVは培養が困難であることから、NoVに対する薬剤の不活化評価を行うには同じカリシウイルス科に属し培養可能なネコカリシウイルス(FCV)やマウスノロウイルス(MNV)等の代替ウイルスが一般的に使用されている。しかし、薬剤への感受性や性状が必ずしもNoVと一致するものではないことから、不活化評価にあたっては両方の代替ウイルスを使用することが推奨されている³⁾。これまでに、柿や紅茶、ブドウ等の天然素材からの抽出物^{4),5),6)}や2'-C-methylcytidine⁷⁾やfavipiravir⁸⁾等の合成化合物における抗ウイルス活性が確認され研究が進められているが、国に認可されているものは未だない。

そこで本研究では、NoVの感染予防対策に資する化合物の探索を目的として、FCV及びMNVを用いたスクリーニング系により抗NoV活性を有する化合物の探索を行い、その活性評価を行ったので報告する。

2 研究方法

2・1 材料

抗NoV活性を評価する対象の化合物として、天然生理活性物質ライブラリー(Sigma-Aldrich)を購入し、234化合物について評価を行った。NoV代替ウイルスとしてFCV-F9株およびMNVを使用し、それらのウイルスを接種する細胞としてCRFK細胞およびRAW264.7細胞をそれぞれ用いた。

2・2 抗NoV化合物のスクリーニング

抗NoV活性を有する化合物のスクリーニングはOhba⁵⁾らの方法に基づいて行った(図1)。即ち、評価を行う化合物を100 μM 、10 μM 、1 μM および0.1 μM の4段階に細胞培養用培地を用いて希釈調製し、100 TCID₅₀/50 μL に調整したFCVまたはMNVと等量混合し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 %CO₂条件下で30分間静置した。混合液をCRFK細胞またはRAW264.7細胞を播種した96穴プレートに120 μL /wellずつ接種し、同条件下で1時間培養した。培養後、PBS(-)で洗浄し、5 %FBS加EMEM(CRFK細胞)または5 %FBS加DMEM(RAW264.7細胞)を150 μL /wellずつ加えて培養・観察を行った。スクリーニングにおける抗ウイルス活性の評価は細胞変性効果(CPE)の有無により判断し、最小有効濃度(MEC)を求めた(N=2で実施し、低い方の値をその化合物のMECとした)。

2・3 細胞生存率の測定

化合物を360 μM から2.8 μM まで2倍段階希釈で調製後、スクリーニングと同様の手順でウイルス液と反応させ、培養した(図1)。Cell Counting Kit-8(同仁化学研究所)を用いて生細胞数を測定し、細胞生存率(各濃度における生

福岡県保健環境研究所 (〒818-0135 太宰府市大字向佐野39)

* 国立医薬品食品衛生研究所

(〒210-9501 神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-26)

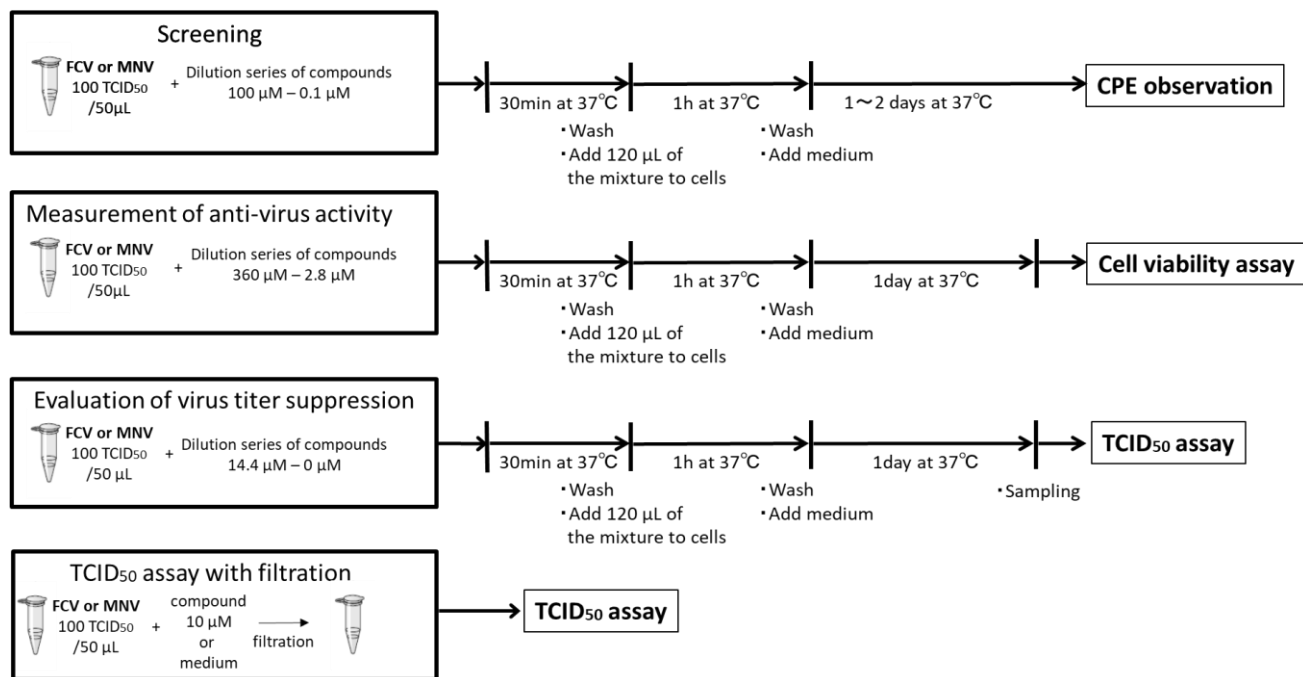


図1 NoV 代替ウイルスを用いた化合物の抗 NoV 活性評価方法

細胞数/化合物およびウイルス液を非接種の生細胞数) を指標として抗NoV活性を評価した。

同時に、各希釈濃度の化合物をCRFK細胞およびRAW264.7細胞に与えた際の細胞生存率を測定し、毒性を評価した(細胞毒性試験)。

2・4 ウイルス感染価抑制効果の測定

化合物がFCV、MNVに与える感染価抑制効果を測定した(図1)。即ち、化合物を14.4 μM、7.2 μM、3.6 μM、0 μM(細胞培養用培地のみ)に希釈調製し、スクリーニングと同様の方法でウイルス液と反応させ、培養を行った。24時間後に培養上清を回収し、TCID₅₀ アッセイによりウイルスの感染価を測定した。

2・5 化合物の作用機序の推定

化合物の作用がウイルス粒子への直接の作用か、または宿主細胞に作用して増殖を抑える作用か検討を行った。即ち、10 μMの化合物または細胞培養用培地のみを、それぞれFCVまたはMNVと1時間反応後、遠心式フィルターAmicon Ultra-0.5(メルクミリポア)で化合物を除去した。回収したウイルス液の感染価をTCID₅₀ アッセイにより測定し、両者の感染価を比較した(図1)。

3 結果

3・1 抗NoV化合物のスクリーニング結果

天然生理活性物質234化合物について評価した結果、22化合物がFCVまたはMNVに対する抗ウイルス活性を示した(表1)。スクリーニングにおけるMECは、19化合物が100 μM、3化合物が10 μM以下の濃度を示した。13化合物がFCV

表1 抗NoV化合物のスクリーニング結果

No.	Compound name	MEC* (μM)	
		FCV	MNV
1	Myricetin	100	-
2	Maslinic acid	-	100
3	Scutellarein	100	-
4	Gallic acid	100	-
5	Diosmetin	100	-
6	Ferulic acid	100	-
7	Ginkgolide B	100	-
8	Shikonin	100	-
9	(+/-)-Gossypol	100	-
10	(-)-Epicatechin	100	-
11	Caffeine	100	-
12	beta-Carotene	100	-
13	Cytisine	-	10
14	Asiatic acid	-	100
15	METHYLENE BLUE	0.1	-
16	Honokiol	-	100
17	Myriocin	100	-
18	Patulin	-	100
19	Anisomycin	10	10
20	Acetovanillone	-	100
21	Tetracycline hydrochloride	-	100
22	(3aR)-(+)-Sclareolide	-	100

* Minimum Effective Concentration

に対して、8化合物がMNVに対して抗ウイルス活性を示し、
 アニソマイシンのみが両ウイルスに対する抗ウイルス活
 性を示した。

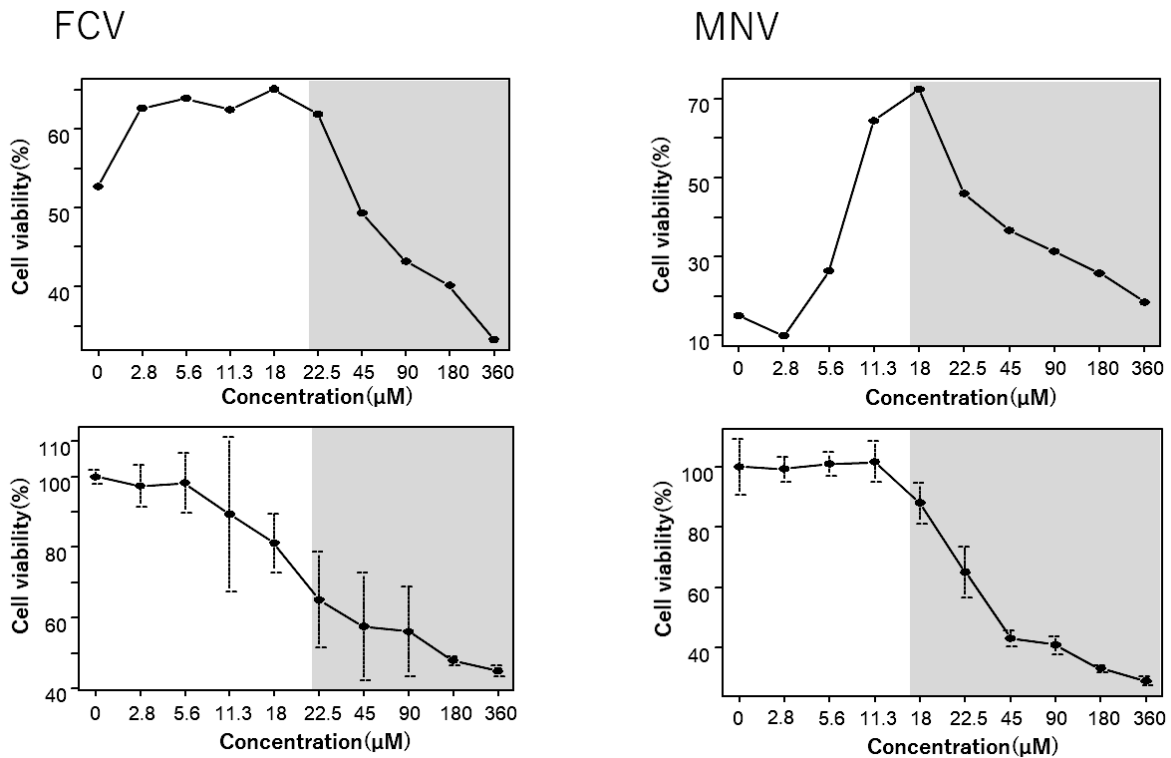


図2 アニソマイシン添加時の細胞生存率の測定
 上：ウイルス+アニソマイシン (0-360 μM) 添加時の細胞生存率
 下：アニソマイシンのみ添加 (細胞毒性試験)
 (細胞毒性試験により毒性がみられた濃度領域を灰色の枠で示した)

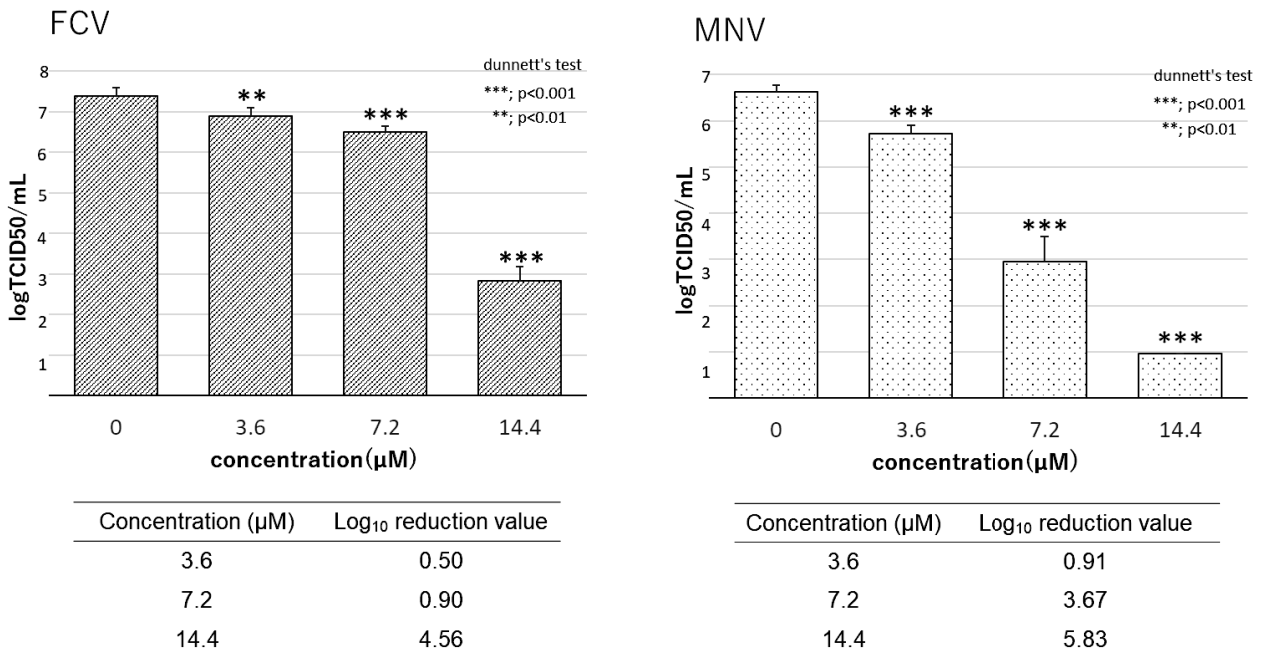


図3 アニソマイシンによるウイルス感染価抑制効果の測定結果

3・2 細胞生存率を指標とする抗NoV活性の評価

アニソマイシンについて細胞生存率を指標とする抗NoV活性の評価を行った。細胞生存率はFCV、MNVそれぞれにおいて18 μM で最大を示したが、それを超える濃度では低下した(図2, 上)。細胞毒性はCRFK細胞に対して18 μM 、RAW264.7細胞に対して11.3 μM を超える濃度でみられた(図2, 下)。

3・3 ウイルス感染価抑制効果の測定結果

アニソマイシンによるウイルス感染価抑制効果の結果を示した(図3)。FCVとMNVそれぞれに対し、アニソマイシンの添加により感染価の抑制がみられた。抑制効果は14.4 μM でFCVに対して4.56 \log_{10} 、MNVに対して5.83 \log_{10} の感染価の抑制がみられた。14.4 μM を超える濃度については細胞毒性の影響が考えられるため実施することができなかった。

3・4 作用機序の推定

遠心式フィルターで化合物を除去後のウイルス感染価を比較したところ、10 μM のアニソマイシンと細胞培養用培地のみ添加時の感染価に差は現れなかった(図4)。

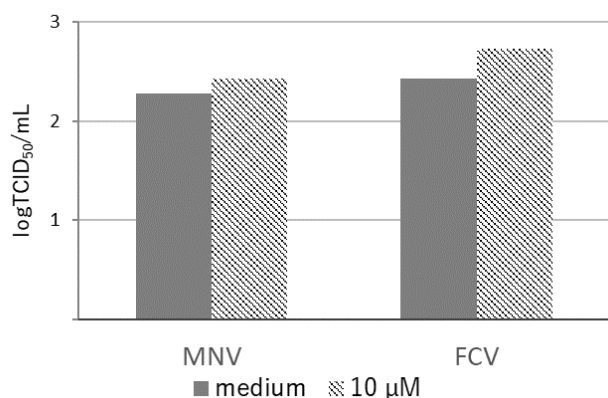


図4 アニソマイシンの作用機序の推定
(フィルター処理後のウイルス感染価の比較)

4 考察

本研究において天然生理活性物質から抗NoV活性を有する化合物の探索を行った結果、22化合物が抗NoV活性を示した。抗NoV活性を有することが報告されている柿や紅茶、ブドウ等の抽出物はポリフェノールが主な作用物質とされている^{4), 5), 6)}。本研究で活性を示したMyricetin、Scutellarein、Diosmetin、(-)-Epicatechinもまたフラボノイド骨格を有するポリフェノールの一種であり、構造的に類似であることから抗活性を示したと推察された。その他種々の細菌や植物から単離される化合物がヒットしており、今後検証が必要である。このうちアニソマイシンのみがFCVおよびMNV両ウイルスに対する抗ウイルス活性を

示した。アニソマイシンはStreptomyces属菌が産生する抗生物質であり、MAPキナーゼのアクチベーターとしての働きやタンパク質合成阻害作用⁹⁾が知られている。細胞生存率を指標とした抗NoV活性を測定したところ、アニソマイシンの添加により細胞生存率の上昇が認められ18 μM で最大を示した。しかし、細胞毒性が付近の濃度(CRFK細胞とRAW264.7細胞それぞれ18 μM 、11.3 μM を超える濃度)でみられた。そこで細胞毒性の影響が及ばない低濃度域におけるアニソマイシンのウイルス感染価抑制効果を検討したところ、FCVおよびMNVに対して有意な感染価の抑制がみられ、アニソマイシンの抗NoV活性が確認された。紅茶に含まれるテアフラビン類の一つであるTheaflavin digallateはFCVに対して25 μM 、MNVに対して50 μM での抗ウイルス効果(最小有効濃度)が報告されている⁴⁾。既報の化合物と同等以上の効果がみられたが、細胞毒性をいかに抑えるか今後検討が必要である。

抗ウイルス活性を有する化合物は消毒剤または治療薬としての活用が期待される。アニソマイシンは遠心式フィルターの処理によっても感染価に差がみられなかったことから、ウイルス粒子への直接的な作用ではなく、宿主細胞に働いてウイルスの増殖を抑える作用(ウイルスの接着、侵入、複製、放出のいずれかのステップに作用)があることが示唆された。よって治療薬のリード化合物としての活用が今後期待されるが、より詳細な作用機序の解明が必要である。

謝辞

本研究を行うにあたり、FCV、MNV、CRFK細胞およびRAW264.7細胞の分与を頂きました国立医薬品食品衛生研究所の野田衛先生に深謝致します。

本研究は、平成30年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究)「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」班(研究代表者:上間匡)において実施された。

文献

- 1) 厚生労働省: 食中毒統計資料 (https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html) .
- 2) 厚生労働省: ノロウイルスに関する Q & A (https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/kanren/yobou/040204-1.html) .
- 3) 食品衛生検査指針 微生物編 2015, 平成 27 年 3 月.
- 4) K. Ueda *et al.*: *PLoS One*, 8, e55343, 2013.
- 5) M. Ohba *et al.*: *J.Antibiotics*, 70, 443-447, 2017.

- 6) X. su *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol*, 77, 3982–3987, 2011.
- 7) Rocha-Pereira.J *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 427, 796–800, 2012.
- 8) Rocha-Pereira.J *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 424, 777–780, 2012.
- 9) Arthur.P.G: *J. Biol. Chem*, 242, 3226–3233, 1967.

(英文要旨)

Screening of anti-norovirus activity in natural biologically active substances

**Takayuki KOBAYASHI, Hideaki YOSHITOMI, Asako NAKAMURA, Toshitaka KOGISO,
Yuki ASHIZUKA, Jumboku KAJIWARA and Masashi UEMA***

Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,

Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan

** National Institute of Health Sciences,*

3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210-9501, Japan

We conducted cytopathic effect-based screening for 234 biologically active substances to evaluate anti-norovirus activity using the human norovirus surrogates feline calicivirus (FCV) and murine norovirus (MNV). A total 22 compounds showed antiviral activity against FCV or MNV, of which only one compound (anisomycin) showed antiviral activity against both viruses. The antiviral effect of anisomycin was evaluated using a cell viability assay and showed a maximum at 18 μM . In a 24-hour culture test, FCV and MNV infectivity titers were suppressed by 4.56 \log_{10} TCID₅₀ and 5.83 \log_{10} TCID₅₀ with 14.4 μM anisomycin, respectively. These results suggest that anisomycin may have antiviral activity against norovirus.

[Key words ; Anti-norovirus activity, Anisomycin, feline calicivirus, murine norovirus]