(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5997702号
(P5997702)

(45)発行日　平成28年9月28日(2016.9.28)　(24)登録日　平成28年9月2日(2016.9.2)

(51)Int.Cl.		F I	
A61K 38/22	(2006.01)	A61K	37/24
A61P 31/12	(2006.01)	A61P	31/12
A61P 31/22	(2006.01)	A61P	31/22
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	45/00
A61K 31/7056	(2006.01)	A61K	31/7056

請求項の数 17　(全 26 頁)

(21)出願番号　特願2013-541202(P2013-541202)
(86)(22)出願日　平成23年11月30日(2011.11.30)
(65)公表番号　特表2013-544262(P2013-544262A)
(43)公表日　平成25年12月12日(2013.12.12)
(86)国際出願番号　PCT/CU2011/000008
(87)国際公開番号　WO2012/072055
(87)国際公開日　平成24年6月7日(2012.6.7)
審査請求日　平成26年5月16日(2014.5.16)
(31)優先権主張番号　2010-0233
(32)優先日　平成22年12月1日(2010.12.1)
(33)優先権主張国　キューバ(CU)

前置審査

(73)特許権者　304012895
セントロ　デ　インジエニエリア　ジエネテイカ　イ　バイオテクノロジア
キューバ国、シウダッド　ド　ラ　ハバナ、プラヤ、キューバナキャン、アベニュー　３１　エントレ　１５８　イ　１９０
(74)代理人　110000855
特許業務法人浅村特許事務所
(72)発明者　エストラーダ　ガルシア、マリオ、パブロ
キューバ国、ラ　ハバナ、プラヤ、カジェ　１８６　ヌメロ　３１１２、エントレ　３１　イ　３３、アパルトミエント　１０

最終頁に続く

(54)【発明の名称】水生生物におけるウイルス感染を処置するためのＰＡＣＡＰの使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

魚、甲殻類又は二枚貝における、ヘルペスウイルス科（Ｈｅｒｐｅｓｖｉｒｉｄａｅ）、パポバウイルス科（Ｐａｐｏｖａｖｉｒｉｄａｅ）、ドガウイルス科（Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅ）、レトロウイルス科（Ｒｅｔｒｏｖｉｒｉｄａｅ）、レオウイルス科（Ｒｅｏｖｉｒｉｄａｅ）、ビルナウイルス科（Ｂｉｒｎａｖｉｒｉｄａｅ）又はピコルナウイルス科（Ｐｉｃｏｒｎａｖｉｒｉｄａｅ）ファミリーのウイルスにより引き起こされるウイルス感染又は感染性疾患の治療のための組成物の製造における「脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド」（ＰＡＣＡＰ）の使用。

【請求項２】

前記ＰＡＣＡＰが、

ａ）それの天然供給源からの単離により、

ｂ）合成的に、又は

ｃ）組換えＤＮＡ技術により

得られるものである、請求項１に記載の使用。

【請求項３】

前記ＰＡＣＡＰが、魚から単離された配列を有するポリペプチドである、請求項２に記載の使用。

【請求項４】

前記ＰＡＣＡＰが、サケ科又はクルマエビ科において使用される、請求項１～３のいず

れか一項に記載の使用。
【請求項５】
「脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド」（ＰＡＣＡＰ）を含む、魚、甲殻類又は二枚貝における、ヘルペスウイルス科（Ｈｅｒｐｅｓｖｉｒｉｄａｅ）、パポバウイルス科（Ｐａｐｏｖａｖｉｒｉｄａｅ）、ドガウイルス科（Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅ）、レトロウイルス科（Ｒｅｔｒｏｖｉｒｉｄａｅ）、レオウイルス科（Ｒｅｏｖｉｒｉｄａｅ）、ビルナウイルス科（Ｂｉｒｎａｖｉｒｉｄａｅ）又はピコルナウイルス科（Ｐｉｃｏｒｎａｖｉｒｉｄａｅ）ファミリーのウイルスにより引き起こされるウイルス性疾患又は感染性疾患の治療のための組成物。
【請求項６】
前記ＰＡＣＡＰが、
ａ）それの天然供給源からの単離により、
ｂ）合成的に、又は
ｃ）組換えＤＮＡ技術により
得られるものである、請求項５に記載の組成物。
【請求項７】
経口的に、注射により、又は浸漬水浴により投与されることにより特徴付けられる、請求項５に記載の組成物。
【請求項８】
前記ＰＡＣＡＰが、魚から単離された配列を有するポリペプチドである、請求項６又は７に記載の組成物。
【請求項９】
「脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド」（ＰＡＣＡＰ）及び抗ウイルス分子を含む、魚、甲殻類又は二枚貝における、ヘルペスウイルス科（Ｈｅｒｐｅｓｖｉｒｉｄａｅ）、パポバウイルス科（Ｐａｐｏｖａｖｉｒｉｄａｅ）、ドガウイルス科（Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅ）、レトロウイルス科（Ｒｅｔｒｏｖｉｒｉｄａｅ）、レオウイルス科（Ｒｅｏｖｉｒｉｄａｅ）、ビルナウイルス科（Ｂｉｒｎａｖｉｒｉｄａｅ）又はピコルナウイルス科（Ｐｉｃｏｒｎａｖｉｒｉｄａｅ）ファミリーのウイルスにより引き起こされるウイルス性疾患又は感染性疾患の治療のためのキット。
【請求項１０】
前記ＰＡＣＡＰが、
ａ）それの天然供給源からの単離により、
ｂ）合成的に、又は
ｃ）組換えＤＮＡ技術により
得られるものである、請求項９に記載のキット。
【請求項１１】
前記抗ウイルス分子が、リバビリン又はリバビリン類似体である、請求項９に記載のキット。
【請求項１２】
前記ＰＡＣＡＰ及び前記抗ウイルス分子が、同じ治療の間で、同時に、別個に又は一連で投与される、請求項９に記載のキット。
【請求項１３】
前記ＰＡＣＡＰ及び前記抗ウイルス分子が、経口的に、注射により又は浸漬水浴により投与される、請求項１２に記載のキット。
【請求項１４】
製剤化された食餌の一部として適用されることにより特徴付けられ、前記ＰＡＣＡＰが、５０～７５０μｇ／ｋｇの食餌の濃度であり、前記抗ウイルス化合物が、１００～２０００ｍｇ／ｋｇの食餌の濃度である、請求項１３に記載のキット。
【請求項１５】
注射により適用されることにより特徴付けられ、前記ＰＡＣＡＰが、体重のグラム（ｇ

ｂｗ）当たり０．１～１０μｇの濃度で適用され、前記抗ウイルス分子が、１～５０μｇ／ｇｂｗの濃度での、請求項１３に記載のキット。

【請求項１６】

浸漬水浴により適用されることにより特徴付けられ、前記ＰＡＣＡＰが、水のリットル当たり５０～１０００μｇの濃度で適用され、前記抗ウイルス分子が、１００～２０００μｇ／Ｌの水の濃度で適用される、請求項１３に記載のキット。

【請求項１７】

ＰＡＣＡＰ又は、ＰＡＣＡＰ及び抗ウイルス分子を含むキットの養殖された魚、甲殻類又は二枚貝への投与を含む、魚、甲殻類又は二枚貝における、ヘルペスウイルス科（Ｈｅｒｐｅｓｖｉｒｉｄａｅ）、パポバウイルス科（Ｐａｐｏｖａｖｉｒｉｄａｅ）、ドガウイルス科（Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅ）、レトロウイルス科（Ｒｅｔｒｏｖｉｒｉｄａｅ）、レオウイルス科（Ｒｅｏｖｉｒｉｄａｅ）、ビルナウイルス科（Ｂｉｒｎａｖｉｒｉｄａｅ）又はピコルナウイルス科（Ｐｉｃｏｒｎａｖｉｒｉｄａｅ）ファミリーのウイルスにより引き起こされるウイルス性疾患又は感染性疾患のコントロールのための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、水生バイオテクノロジーの分野、特に水生生物におけるウイルスにより引き起こされるウイルス感染又は感染症を処置するためのＰＡＣＡＰの使用及びＰＡＣＡＰ含有組成物を伴うものに関する。また、ウイルスにより引き起こされる感染を処置するためのＰＡＣＡＰの抗ウイルス薬と組み合わせての使用にも関する。

【背景技術】

【０００２】

水生種養殖の魚介類の全生産量に対する毎年の貢献が最近増加してきている。しかしながら、より高い密度は、これらの動物がストレス条件中で生きていること、そして一般的に、それらは感染をより受けやすいかかりやすいことを暗示する。水産養殖における病原体により引き起こされる疾患発生は、大規模な経済的損失の結果となり、そして時々特定の領域からとある養殖の除去をすることさえもたらす。

【０００３】

サケ科では、感染性膵臓壊死ウイルス（ＩＰＮＶ）、ウイルス性出血性敗血症ウイルス（ＶＨＳＶ）、感染性サケ貧血ウイルス（ＩＳＡＶ）及び感染性造血器壊死症ウイルス（ＩＨＮＶ）により引き起こされる来襲は、それらの養殖における疾患発生の主要因である（Ｍａｒｒｏｑｕｉら（２００８）Ａｎｔｉｖｉｒａｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　８０：３３２－３３８）。例えば、２０１０年の年末のチリ国のサケ生産が、ＩＳＡＶにより引き起こされる死滅の結果３８．７％（２００９年における４０３０００トンから２０１０年における２４５０００トンまで）落ち込むであろうと見積もられる（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ａｑｕａ．ｃｌ）。

【０００４】

そして、甲殻類は、世界的な水産養殖において最も重要な経済部門の一つであり、毎年１００億超を寄与する。養殖における小エビはウイルスを含む広範種の病原体を受けやすい。９０年代中期と対比して、世界生産（３０億米ドルと等価）の約４０％が疾患の結果として損失したと見積もられる。５つのウイルスが、これらの損失に対する主な寄与物である。ホワイトスポット病ウイルス（ＷＳＳＶ）、イエローヘッドウイルス（ＹＨＶ）、タウラ症候群ウイルス（ＴＳＶ）、感染性造血器壊死症ウイルス（ＩＨＮＮＶ）及びモノドンバキュロウイルス（ＭＢＶ）（Ｊｏｈｎｓｏｎら（２００８）Ｖａｃｃｉｎｅ　２６：４８８５－４９９２によって総説される）。

【０００５】

二枚貝は世界的な甲殻類生産の重要な部分である。これらの生命体は、濾過摂食者であるとの特性を有し、重要なウイルス貯蔵所である。従って、それらの養殖はその生産を脅かす動物間流行に直面し得る。Ｃｒａｓｓｏｓｔｒｅａ　ａｎｇｕｌａｔａのカキの成体

の、イリドウイルスに似たウイルス感染に関連した大量死が報告されてきている。また、ヘルペスウイルス科（Ｈｅｒｐｅｓｖｉｒｉｄａｅ）、パポバウイルス科（Ｐａｐｏｖａｖｉｒｉｄａｅ）、ドガウイルス科（Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅ）、レトロウイルス科（Ｒｅｔｒｏｖｉｒｉｄａｅ）、レオウイルス科（Ｒｅｏｖｉｒｉｄａｅ）、ビルナウイルス科（Ｂｉｒｎａｖｉｒｉｄａｅ）及びピコルナウイルス科（Ｐｉｃｏｒｎａｖｉｒｉｄａｅ）ファミリーの他のウイルスは二枚貝の養殖を感染させる能力を有する。しかしながら、甲殻類に由来した細胞株が存在しないことの欠如及びこれらの生命体ための分子ツールが限定的にしか存在しないことにより、二枚貝のウイルス学は、いまだ主として形態学的研究及び少数の実験的研究に基づいた原始的な科学である（Ｔ．Ｒｅｎａｕｌｔ及びＢ．Ｎｏｖｏａ（２００４）Ａｑｕａｔ．Ｌｉｖｉｎｇ Ｒｅｓｏｕｒ．１７：３９７－４０９によって総説される）。

【０００６】

抗ウイルス薬はウイルスにより引き起こされる感染を処置するために使用される化合物である。最初の実験的抗ウイルス剤は、６０年代初期において発見さた。これらは「試行」及び「錯誤」の方法論に基づいて発展した。しかしながら、８０年代中期の後、場面は劇的に変化し、近年は、多くの新規な抗ウイルス薬が開発され及び登録されてきていて、ほとんどヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）の処置のためのものである。しかしながら、これらの化合物は常に効果的であるとも十分に許容性があるとも限らないので、改善すべき多くの態様が存在する。これらの薬物の設計及び適用を改良するための追加の理由は、それらに関連したウイルス抵抗性又は副作用の出現である（（Ｄｅ Ｃｌｅｒｃｑ（２００２）Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ １：１３－２５）。抗ウイルス薬設計は、主要目標として、ウイルスタンパク質又は宿主細胞タンパク質を伴う。最初の戦略は、より特異的であり及びより毒性が低い化合物へと導くが、抗ウイルス活性のより狭いスペクトル及び耐性発達のより大きな機会を伴う。第２の戦略は、活性のより広範なスペクトルを伴い、耐性が発達する頻度が低く、しかし細胞毒性を産生する蓋然性が高い抗ウイルス性化合物を発見する結果となる。選択の戦略は、ウイルスの性質及びウイルスにおける又は宿主細胞における潜在的な標的に依存する（Ｄｅ Ｃｌｅｒｃｑ（２００２）Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ １：１３－２５）。

【０００７】

リバビリンは、広範囲のＤＮＡ及びＲＮＡウイルスに対抗する活性を伴う広範スペクトル抗ウイルス化合物である。それは、ヌクレオシド類似体であり、細胞内リン酸化後に、グアノシン一リン酸（ＧＭＰ）の合成に関与する細胞性酵素である、イノシン一リン酸デヒドロゲナーゼ（ＩＭＰＤＨ）の拮抗阻害剤へとなる（Ｇｒａｃｉ及びＣａｍｅｒｏｎ，（２００６）Ｒｅｖｉｅｗｓ ｉｎ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ１６：４９－６３；Ｐａｒｋｅｒ，（２００５）Ｖｉｒｕｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １０７：１６５－１７１）。この酵素の阻害に加えて、この化合物の抗ウイルス活性について説明するために提唱されてきた他の３つの機構が存在する。

ウイルスＲＮＡポリメラーゼの直接の阻害（Ｔｏｌｔｚｉｓら（１９８８）Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂｉａｌ Ａｇｅｎｔｓ ａｎｄ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ ３２：４９２－４９７）、ウイルスメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の５’末端でのキャップ付加の阻害（Ｇｏｓｗａｍｉら（１９７９）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ ａｎｄ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ ８９：８３０－８３６）及び変異の蓄積（Ｇｒａｃｉ及びＣａｍｅｒｏｎ，（２００２）Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ２９８：１７５－１８０）による。

【０００８】

現在まで、水生生物におけるウイルス疾患の処置のために承認された具体的な抗ウイルス薬は存在しない。チリでは、Ａｎｄｒｏｍａｃｏという名称のＤｉａｇｎｏｔｅｃ ＳＡの子会社が、魚におけるウイルス疾患の処置のためのＶＩＲＯＴＯＰと呼ばれる新規の抗ウイルス性化合物を開発した。この抗ウイルス剤は、「Ｓｅｒｖｉｃｉｏ Ａｇｒｉｃ

ｏｌａ ｙ Ｇａｎａｄｅｒｏ」（ＳＡＧ）による承認が係属中である（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ａｑｕａ．ｃｌ）。しかしながら、かなりの数の化合物がインビトロ及びインビボで評価されてきていて（Ｈｕｄｓｏｎら（１９８８）Ａｎｔｉｖｉｒａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ９：３７９－３８５；Ｊａｓｈｅｒら（２０００）Ａｎｔｉｖｉｒａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ４５：９－１７；Ｋａｍｅｉ及びＡｏｋｉ ，（２００７）Ａｒｃｈｉｖｅｓ ｏｆ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １５２：８６１－８６９；ＬａＰａｔｒａら（１９９８）Ｆｉｓｈ ａｎｄ Ｓｈｅｌｌｆｉｓｈ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ８：４３５－４４６；Ｍａｓら（２００６）Ａｎｔｉｖｉｒａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ７２：１０７－１１５；Ｍｉｃｏｌら（２００５）Ａｎｔｉｖｉｒａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ６６：１２９－１３６；Ｍｏｙａら（２０００）Ａｎｔｉｖｉｒａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ４８：１２５－１３０）、種々の程度の有効性を示す。

【０００９】

リバビリン類似体、５－エチニル－１－β－Ｄ－リボフラノシルイミダゾール－カルボキサミド（ＥＩＣＡＲ）の投与が、ＩＰＮＶに実験的に感染した、ギンザケ（Ｏｎｃｏｒｈｙｎｃｈｕｓ ｋｉｓｕｔｃｈ）及びニジマス（Ｏｎｃｏｒｈｙｎｃｈｕｓ ｍｙｋｉｓｓ）の稚魚においてインビボで評価されてきている（Ｍｏｙａら（２０００）Ａｎｔｉｖｉｒａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ４８：１２５－１３０）。処置は、２０日の間、２時間の０．４及び０．８μｇ／ｍＬのＥＩＣＡＲの溶液中の毎日の水浴からなるものであった。結果は、感染してかつＥＩＣＡＲで処置された群の生存度がウイルスに感染しない群における生存度と同様であったことを示した。肝臓と脾臓におけるウイルス負荷の分析は、逆転写連鎖反応ポリメラーゼ（ＲＴ－ＰＣＲ）の技術を使用して行なった。この分析は、抗ウイルス剤で処置した動物におけるウイルス負荷の減少を示した。この研究から、ＥＩＣＡＲがＩＰＮＶ複製の阻害剤であり、それによって、ウイルス負荷を低減して魚死滅を防ぐためのそれらの使用は、作物生産性を増加させるための有益なツールであることを結論付けた。しかしながら、抗ウイルス剤処置は選択育種のためには有用ではない。なぜなら、感染してかつ処置された魚はいまだウイルスを保持し、それを子孫に伝達し得るからである。一方で、いくつかのウイルス感染により引き起こされるダメージの１つが、感染した魚における重量損失であることが観察されてきている（Ｗｏｌｆ（１９８６）Ｔｈｅ ｆｉｓｈ ｖｉｒｕｓｅｓ．Ｉｎ：Ｅｓｐｉｎｏｓａ ｄｅ ｌｏｓ Ｍｏｎｔｅｒｏｓ， Ｊ．， Ｌａｂａｒｔａ， Ｕ．（編），Ｐａｔｏｌｏｇｉａ ｅｎ Ａｃｕｉ ｃｕｌｔｕｒａ．Ｉｎｄｕｓｔｒｉａｓ ｇｒａｆｉｃａｓ， Ｅｓｐａｎａ， ＳＬ， ｐｐ．９３－９５；Ｍｏｙａら（２０００）Ａｎｔｉｖｉｒａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ４８：１２５－１３０）。抗ウイルス剤の使用の追加の利点は、この重量損失が処置された魚においてはるかに低いことである。この効果は、ギンザケよりマスにおいて最も明確であった（Ｍｏｙａら（２０００）Ａｎｔｉｖｉｒａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ４８：１２５－１３０）。

【００１０】

ポリペプチド（ＰＡＣＡＰ）を活性化する脳下垂体アデニル酸シクラーゼは、セクレチン／グルカゴン／脈管活性腸管ペプチドのスーパーファミリーに属する。このペプチドは、１９８９年に牛の視床下部から最初に単離された。それの、アデニル酸シクラーゼの活性化及びこれに続くアデノシン一リン酸（ｃＡＭＰ）の生産の刺激を通じて成長ホルモンの分泌を刺激する能力が、示された（Ｍｉｙａｔａら（１９８９）Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ １６４ ５６７－５７４）。ＰＡＣＡＰは、哺乳動物における神経伝達物質、神経調節物質及び血管拡張剤として重要な役割を担う多機能ニューロペプチドである（Ａｒｉｍｕｒａら（１９９８）Ｊａｐａｎｅｓｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ ４８：３０１－３１）。それの、細胞分裂制御、分化及び細胞死における機能が示された（Ｓｈｅｒｗｏｏｄら（２０００）Ｅｎｄｏｃｒｉｎｅ Ｒｅｖｉｅｗ ２１：６１９－６７０）。このペプチドは２つの異なる分子改変体で存在する。２７ａａ（ＰＡＣＡＰ２７）及び３８ａａ（ＰＡＣＡＰ３８）（Ｍｉｙａｔａら（１９９０）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ ａｎｄ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ Ｒｅｓｅａ

ｒｃｈ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ １７０：６４３－８）。ＰＡＣＡＰの効果は、セクレチンＧタンパク質共役受容体に属する３つのＶＩＰ／ＰＡＣＡＰ受容体のファミリーを通じて発揮する。ＶＰＡＣ－１及びＶＰＡＣ－２受容体は、２つのニューロペプチド、ＶＩＰ及びＰＡＣＡＰに対しての同様の親和性を示し、片や、ＰＡＣＡＰ受容体（ＰＡＣ－１）は、ＶＩＰに対してのものよりＰＡＣＡＰへの高い親和性を示す（Ｖａｕｄｒｙら（２０００）Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｒｅｖ ５２：２６９－３２４）。

【００１１】

ＰＡＣＡＰは、哺乳動物の脳において、主として視床下部、視床の傍室核及び背内側核において、隔壁、大脳皮質、扁桃、海馬及び小脳において、広く分布する（Ｍｏｎｔｅｒｏら（２０００）Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ ２５：１５７－１６８）。中枢神経系と末梢組織で最も豊富な改変体は、ＰＡＣＡＰ３８である。哺乳動物において行なわれた研究は、性腺（Ｓｈｉｏｄａら（１９９４）Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ １３５：８１８－８２５）、副腎（Ａｒｉｍｕｒａら（１９９１）Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ １２９：２７８７－２７８９）、上皮小体（Ｖａｕｄｒｙら（２０００）Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｒｅｖ ２０００；５２：２６９－３２４）、膵臓内分泌部（Ａｒｉｍｕｒａ ｙ Ｓｈｉｏｄａ（１９９５）Ｎｅｕｒｏｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ １６：５３－８８）及び胃腸管（Ａｒｉｍｕｒａら（１９９１）Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ １２９：２７８７－２７８９；Ｖａｕｄｒｙら（２０００）Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｒｅｖ ５２：２６９－３２４；Ｈａｎｎｉｂａｌら（１９９８）Ｃｅｌｌ．Ｔｉｓｓｕｅ．Ｒｅｓ．２９１：６５－７９）においてもＰＡＣＡＰが存在することを示した。

【００１２】

免疫細胞におけるＰＡＣＡＰ及びその受容体発現は、部分的にのみ解明されてきている（Ｇａｙｔａｎら（１９９４）Ｃｅｌｌ Ｔｉｓｓｕｅ Ｒｅｓ ２７６：２２３－７；Ａｂａｄら（２００２）ＮｅｕｒｏＩｍｍｕｎｏＭｏｄｕｌａｔｉｏｎ １０：１７７－８６）。哺乳動物では、ヒト及びマウスリンパ球及びマクロファージにおける末梢血リンパ球におけるＶＰＡＣ－１受容体の構成的発現が観察されてきていて、片や、ＶＰＡＣ－２の発現はこれらの細胞において誘導可能である。そして、ラット腹腔マクロファージ及びヒト骨髄単球細胞株ＴＨＰ－１においてＰＡＣ－１受容体の構成的発現が観察されてきている。なお、ラットにおいて胸腺細胞、Ｔ細胞の異なるサブタイプ、Ｂ細胞、脾細胞及びリンパ節におけるＰＡＣＡＰ発現が報告されてきている（Ｄｅｌｇａｄｏら（２００１）Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７６：３６９－８０；Ｐｏｚｏら（２００３）Ｔｒｅｎｄｓ Ｍｏｌ Ｍｅｄ ９：２１１－７）。

【００１３】

魚では、ＰＡＣＡＰは、中枢神経系（特に視床下部、脳及び脊髄）及び末梢神経系において記載されてきていて、目、脳下垂体、呼吸器官、唾液腺、胃腸管、生殖器官、膵臓及び尿路の神経を分布させる（Ｓｈｅｒｗｏｏｄら（２０００）Ｅｎｄｏｃｒｉｎｅ Ｒｅｖｉｅｗ ２１：６１９－６７０）。

【００１４】

ＰＡＣＡＰは、ラットにおいて胸腺細胞の自発的アポトーシスを阻害する（Ｄｅｌｇａｄｏ．（１９９６）Ｂｌｏｏｄ ８７：５１５２－５１６１）。ＰＡＣＡＰが胸腺細胞増殖をコントロールするという事実は、このペプチドが免疫細胞の成熟の重要な制御物質であることを示唆する（Ｄｅｌｇａｄｏ．（１９９６）Ｂｌｏｏｄ ８７：５１５２－５１６１）。

【００１５】

このペプチドは、脳下垂体において濾胞上皮細胞によるインターロイキン６（ＩＬ－６）放出の刺激にを通じてリンパ球成熟に対して間接的な効果を有する。ＩＬ－６は、Ｂ細胞の増殖及び分化を刺激し、これらの細胞による免疫グロブリンの合成及び分泌を促進する（Ｔａｔｓｕｎｏら（１９９１）Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ １２９：１７９７－１８０４；Ｙａｄａら（１９９３）Ｐｅｐｔｉｄｅｓ １４：２３５－２３９）。なお、Ｐ

ＡＣＡＰはＩＬ－６及びＩＬ－１０の制御を通じて炎症反応を活性化及び抑制する（Ｍａｒｔｉｎｅｚら（１９９６）Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １５６（１１）：４１２８－３６；Ｍａｒｔｉｎｅｚら（１９９８）Ｊ Ｎｅｕｒｏｉｍｍｕｎｏｌ ８５（２）：１５５－６７）；Ｍａｒｔｉｎｅｚら（１９９８）Ｊ Ｌｅｕｋｏｃ Ｂｉｏｌ ６３（５）：５９１－６０１）。活性化されたマクロファージでは、ＰＡＣＡＰは向炎症性サイトカインを阻害して抗炎症性サイトカイン産生を刺激し、免疫系のホメオスタシスを可能にする。その上、ＰＡＣＡＰは、共刺激性分子Ｂ７．１／Ｂ７．２の発現及び引き続いてのＴヘルパー細胞（Ｔｈ）の活性化を低減させる。一方で、ＰＡＣＡＰは、活性化マクロファージにおいてその受容体ＰＡＣ－１を通じてＩＬ－６の産生を阻害し、炎症を抑制する（Ｍａｒｔｉｎｅｚら（１９９８）Ｊ Ｎｅｕｒｏｉｍｍｕｎｏｌ ８５（２）：１５５－６７；Ｍａｒｔｉｎｅｚら（１９９８）Ｊ Ｌｅｕｋｏｃ Ｂｉｏｌ．１９９８ Ｍａｙ；６３（５）：５９１－６０１）。激しい炎症性刺激又は興奮（ｉｎｔｏｘｉｃａｔｉｏｎ）に応答してのＩＬ－６転写に関するＰＡＣＡＰの阻害作用は、組織保護及び免疫系ホメオスタシスを援助する（Ｍａｒｔｉｎｅｚら（１９９８）Ｊ Ｎｅｕｒｏｉｍｍｕｎｏｌ ８５（２）：１５５－６７；Ｍａｒｔｉｎｅｚら（１９９８）Ｊ Ｌｅｕｋｏｃ Ｂｉｏｌ．１９９８ Ｍａｙ；６３（５）：５９１－６０１）。対照的に、ＰＡＣＡＰは、Ｂ７．２の発現を誘導して刺激されていないマクロファージにおけるＴｈ２への細胞分化を促進する（Ｄｅｌｇａｄｏ ｙ Ｇａｎｅａ（２００１）Ａｒｃｈ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｔｈｅｒ Ｅｘｐ（Ｗａｒｓｚ）４９（２）：１０１－１０）。

【００１６】

一般に、哺乳動物の免疫系の調整におけるＰＡＣＡＰの機能は、近年部分的にのみ解明されてきている。これらの研究は、ＰＡＣＡＰが先天的な及び適応性免疫系を両方とも制御して向炎症性及び抗炎症性応答を調整することを示した。それにもかかわらず、このペプチドの抗ウイルス性応答に対する効果についての既存情報が不足している。最近、Ｂ型肝炎慢性患者において、一旦ウイルス血症がラミブジン処置の結果として除去されたならば、血漿ＰＡＣＡＰ－３８レベルが増加することが示された（Ｅｌｅｆｓｉｎｉｏｔｉｓら（２００３）Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｈｅｐａｔｏｌｏｇｙ １５：１２０９－１２１６）。この知見は、患者の肝臓における生化学的及び組織学的疾患軽減の結果となるＴ細胞免疫反応に対する効果を示唆する。

【００１７】

魚では、今まで公開されたＰＡＣＡＰの生物学的機能についてのインビボの研究は、生殖（ｒｅｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ）（Ｃａｎｏｓａら（２００８）Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ（Ｒｅｇｕｌ Ｉｎｔｅｇｒ Ｃｏｍｐ Ｐｈｙｓｉｏｌ）２９５：１８１５－２１）、脳発生（Ｓｈｅｒｗｏｏｄら（２００７）Ｐｅｐｔｉｄｅｓ ２８：１６８０－７）及び食欲（ａｐｐｅｔｉｔｅ）（Ｍａｔｓｕｄａら（２００５）Ｐｅｐｔｉｄｅｓ ２６：１６１１－６；Ｍａｒｕｙａｍａら（２００６）Ｐｅｐｔｉｄｅｓ ２７：１８２０－６）で主として関連づけられる。最近、稚魚の真骨魚類種の成長及び発生におけるこのニューロペプチドの生物学的機能が示された（Ｌｕｇｏら（２００８）Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ １９７：５８３－９７）。

【００１８】

魚免疫反応の調整におけるＰＡＣＡＰの機能に関する知識は、我々の研究グループによって行なわれた研究に限定されている。我々は、水浴又は注射による組換えＣｌａｒｉａｓ ｇａｒｉｅｐｉｎｕｓ ＰＡＣＡＰ投与が、処置された稚魚及び若魚（ｊｕｖｅｎｉｌｅｓ）において、成長を促進するだけでなく先天的な免疫パラメータ（リゾチーム、代謝物に由来する一酸化窒素及び酸化防止性防御物質）もまた刺激して免疫性（ＩｇＭ）を獲得することを示した（Ｃａｒｐｉｏら（２００８）Ｆｉｓｈ ａｎｄ Ｓｈｅｌｌｆｉｓｈ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２５：４３９－４５；Ｌｕｇｏら（２０１０）Ｆｉｓｈ ａｎｄ Ｓｈｅｌｌｆｉｓｈ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２９：５１３－５２０）。

これらの新規な特性は、特許出願「Ｎｅｕｒｏｐｅｐｔｉｄｏｓ ｐａｒａ ｅｌ ｃｕｌｔｉｖｏ ｄｅ ｏｒｇａｎｉｓｍｏｓ ａｃｕａｔｉｃｏｓ」（国際公開第２００７／０５９７１４号）に記載した。

【００１９】

脊椎動物では、ウイルス感染に対する最初の防御線のうちの１つはＩ型インターフェロン（ＩＦＮ）システムである。このシステムは、ＪＡＫ－ＳＴＡＴにより媒介されるシグナルトランスダクションの引き金となるＩＦＮ－α／β受容体を通じてＩ型インターフェロン（ＩＦＮα及びＩＦＮβ）のウイルス性誘導によって活性化される。誘導されたサイトカインは、２’５’オリゴアデニル酸シンセターゼ、キナーゼ（ｑｕｉｎａｓｅ）Ｒ及びＧＴＰアーゼＭｘといった抗ウイルス活性を伴うタンパク質の発現を産生する細胞抗ウイルス状態を産出する（Ｇｏｏｄｂｏｕｒｎら（２０００）Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｇｅｎｅｒａｌ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ８１：２３４１－ ２３６４）。最近の証拠は、魚が哺乳動物に似たＩＦＮシステムを有することを確立する（（Ｒｏｂｅｒｔｓｅｎ（２００６）Ｆｉｓｈ ａｎｄ Ｓｈｅｌｌｆｉｓｈ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２０：１７２－１９１；Ｒｏｂｅｒｔｓｅｎ（２００８）Ｆｉｓｈ ａｎｄ Ｓｈｅｌｌｆｉｓｈ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２５：３５１－３５７）。インターフェロンは、ゼブラフィッシュ（Ｄａｎｉｏ ｒｅｒｉｏ）、アメリカナマズ（Ｉｃｔａｌｕｒｕｓ ｐｕｎｃｔａｔｕｓ）及びタイセイヨウサケ（Ｓａｌｍｏ ｓａｌａｒ）のようないくつかの魚類種においてクローン化されてきている（Ａｌｔｍａｎｎら（２００３）Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ７７：１９９２－２００２；Ｌｕｔｆａｌｌａら（２００３）ＢＭＣ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ４：２９；Ｒｏｂｅｒｔｓｅｎら（２００３）Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｎｔｅｒｆｅｒｏｎ ａｎｄ Ｃｉｔｏｋｉｎｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ２３：６０１－６１２；Ｌｏｎｇら（２００６）Ｆｉｓｈ ａｎｄ Ｓｈｅｌｌｆｉｓｈ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２１：４２－５９）。なお、いくつかのＩＦＮ制限因子、ＪＡＫ－ＳＴＡＴシグナル経路の分子、Ｍｘタンパク質、及びＩＦＮにより刺激された他の遺伝子が、異なる魚類種において同定されてきている。Ｓａｌｍｏ ｓａｌａｒ及びＰａｒａｌｉｃｈｔｙｓ ｏｌｉｖａｃｅｕｓにおけるＭｘタンパク質により媒介される抗ウイルス活性が報告された（ｒｅｖｉｅｗｅｄ ｂｙ Ｒｏｂｅｒｔｓｅｎ（２００６）Ｆｉｓｈ ａｎｄ Ｓｈｅｌｌｆｉｓｈ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２０：１７２－１９１）。

【００２０】

甲殻類においてＩＦＮ様の遺伝子はいまだ発見されてはいないという事実にもかかわらず、ＷＳＳＶ伝染の応答においてＳＴＡＴ分子（これらは脊椎動物におけるＩＦＮ応答で活性化される分子である）の陰性制御が観察されてきている。ウイルス感染の間のＳＴＡＴの陰性制御は、哺乳動物におけるＩ型ＩＦＮ応答と拮抗する（Ｏｌｉｃａｒｄａら（２００５）Ａｎｔｉｖｉｒａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ６６（２－３）：１４７－１５２；Ｄｅｆｅｒ ｅｔ ａｌ．，（２００９）Ａｑｕａｃｕｌｔｕｒｅ ２９３（１－２）：１－７）。二枚貝では、抗ウイルス性応答についての知識はさらに少ない。これらの生命体の血リンパに抗ウイルス活性の証拠が存在し、ＩＦＮ様の機構の存在が示唆されてきていた（Ｏｌｉｃａｒｄａら（２００５）Ａｎｔｉｖｉｒａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ６６（２－３）：１４７－１５２；Ｄｅｆｅｒら（２００９）Ａｑｕａｃｕｌｔｕｒｅ ２９３（１－２）：１－７）。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００２１】

水産養殖では、ウイルス感染の制御において用いることができる新規の化合物又は組成物の開発が、それらがこの活動に引き起こすダメージのために、多大な興味となっている。

【課題を解決するための手段】

【００２２】

本発明は、水産養殖におけるウイルス感染を制御する新規な代替物を提供するとの上記

の課題に対する解決を、水生生物におけるウイルスにより引き起こされるウイルス感染及び感染性疾患の処置用のための組成物の製造におけるＰＡＣＡＰの使用によって、提供する。

【発明を実施するための形態】

【００２３】

用語「処置」は、本発明の文脈において疾患開始の後に病理的発達の希薄化、低減又は減少を含む疾患軽減における任意の有益な効果と関連する。

【００２４】

用語「抗ウイルス剤」は、本発明において使用されるときには、従来技術において抗ウイルス剤として定義された任意の分子若しくはその類似体、機能的誘導体又は活性断片を含む。

【００２５】

用語「脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド（ＰＡＣＡＰ）」は、本発明において使用されるときには、この分子であって、任意の改変体（ＰＡＣＡＰ２７又はＰＡＣＡＰ３８）にあるもの、それの自然供給源から単離されたか、又は合成か、又は組換えＤＮＡ技術により産生されたかのいずれかであるものを含む。

【００２６】

本発明の一実施形態では、ニューロペプチドＰＡＣＡＰの改変体は、単独で又は公知の抗ウイルス分子と組み合わせて、魚、甲殻類及び二枚貝へ２－３日の間隔での浸漬水浴によって投与される。飼料添加物として、ＰＡＣＡＰもまた単独で又は公知の抗ウイルス分子と組み合わせて処置される。

【００２７】

本発明では、浸漬水浴、注射又は経口によって投与されたＰＡＣＡＰ含有組成物が、ウイルスにより感染しかつそれらで処置された水生生物の生存度を増加させることに対して効果的であったことが示された。処置された魚の重量の減少は観察されなかった。いくつかの場合には、全体重量増加が、感染しかつ処置されていないものと比較して感染しかつ処置された動物において得られた。

ＲＴ－ＰＣＲによる組織サンプル及び受容しやすい器官の分析は、感染しかつ処置された動物におけるウイルス負荷の減少を示した。

【００２８】

この発明までは、ＰＡＣＡＰが魚、甲殻類及び二枚貝における抗ウイルス性応答及び関与するメカニズムを調整するものであったか否かについての知識は存在しなかった。本発明は、インビトロ及びインビボの両方で、ＰＡＣＡＰと、魚、甲殻類及び二枚貝におけるウイルスに対する応答との関係を初めて示すものである。なお、我々は、Ｍｘタンパク質、インターフェロンγ（ＩＦＮγ）及びｔｏｌｌ様受容体９（ＴＬＲ９）といった抗ウイルス性応答に関与するＰＡＣＡＰ分子に対する予期しない陽性効果、並びに、インビトロ及びインビボの両方で、ウイルス及び／又はポリＩ：Ｃで処置された、魚の免疫系の細胞におけるこのペプチド及びその受容体の分化制御を初めて記載する。

【００２９】

ＰＡＣＡＰ又はＰＡＣＡＰと魚において公知の抗ウイルス作用を伴う分子との組合せの投与による、魚、甲殻類及び二枚貝におけるウイルス感染の処置は、技術常識において従前は明らかにもされず示唆もされてきていなかった。

【００３０】

本発明の文脈では、ＰＡＣＡＰ及び抗ウイルス性分子の投与は同時（単一の製剤で）でも、一連のものでも又は時間にわたって別個であってもよい。製剤は、経口経路、注射又は浸漬水浴によって水生生物に投与される。

【００３１】

本発明では、魚、甲殻類及び二枚貝は、ＰＡＣＡＰ及びＰＡＣＡＰと組み合わされた抗ウイルス性分子を含む製剤で処置される。予期せずして、ニューロペプチドＰＡＣＡＰが魚、甲殻類及び二枚貝において抗ウイルス活性を有することが観察された。一方で、ＰＡ

ＣＡＰと公知の抗ウイルス活性を伴う物質との組合せが、インビトロ及びインビボの両方で、ＰＡＣＡＰ単独と比較してより高い抗ウイルス性応答（相乗効果）を産することが示された。魚では、これまでのところ、抗ウイルス性応答においてＰＡＣＡＰには生物学的機能が何も割り当てられてきていなかった。
そして、今日まで、ＰＡＣＡＰも、セクレチン及びグルカゴンのスーパーファミリーに属する別のペプチドも、いずれも小エビ又は甲殻類においては単離されてきていなかった。これらの分類群におけるこのペプチドの現在の知識は、組換えの魚ＰＡＣＡＰの外因性投与による小エビにおける成長刺激の実験的証拠に基づいているのみである（国際的な特許出願公開番号、国際公開第２００７／０５９７１４号）。それゆえに、本発明までの間は、甲殻類及び二枚貝におけるウイルスに対する応答とのそれの可能となる関係についての知識は、何も存在しなかった。

【００３２】
本発明の別の目的は、「脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド」（ＰＡＣＡＰ）を含む、水生生物におけるウイルスにより引き起こされるウイルス性及び感染性疾患の処置のための組成物である。本発明の一実施形態では、組成物の一部としてのＰＡＣＡＰは、その自然供給源から、合成的に又は組換えＤＮＡ技術によるもののいずれかでの単離により得られる。それは、経口で、注射又は浸漬水浴によってのいずれかで投与される。本発明の一実施形態では、ＰＡＣＡＰは魚から単離されたポリペプチド配列である。

【００３３】
本発明は、「脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド」（ＰＡＣＡＰ）及び抗ウイルス性分子を含む獣医用組合せに関する。本発明の一実施形態では、抗ウイルス性分子はリバビリン又はリバビリン類似体である。組合せの一部である要素である、抗ウイルス性分子及びＰＡＣＡＰは、同じ処置中において、同時に、別々に又は一連で投与される。本発明の一実施形態では、組合せは、水生生物においてウイルスにより引き起こされるウイルス性及び感染性疾患の処置において使用される。これらにおいて、ＰＡＣＡＰ及び抗ウイルス剤は、経口で、注射又は浸漬水浴によって投与される。

【００３４】
本発明の一実施形態では、ＰＡＣＡＰは、製剤化された食餌として、食餌の５０－７５０ｍｇ／ｋｇの濃度で、及び抗ウイルス性分子は食餌の１００～２０００ｍｇ／ｋｇの濃度で、適用される。本発明の第２の実施形態では、ＰＡＣＡＰは、体重のグラム当り０．１－１０μｇの濃度で、及び抗ウイルス性分子は１－５０μｇ／ｇの濃度で、獣医用組合せの一部として、注射により魚に適用される。この組合せにおける本発明の別の実施形態では、ＰＡＣＡＰは水のリットル当りの５０－１０００μｇの濃度で浸漬水浴によって魚又は甲殻類に適用され、及び抗ウイルス剤の濃度は、１００－２０００μｇ／Ｌである。本発明では、ＰＡＣＡＰは、抗ウイルス剤として使用される場合、又は公知の抗ウイルス性分子と組み合わせての両方で、種々の水生生物に適用される。例えば、それらはサケ科、クルマエビ科及び二枚貝を包含する。

【００３５】
ＰＡＣＡＰを含む組成物及び抗ウイルス性分子を伴う組合せは、ヘルペスウイルス科、パポバウイルス科、ドガウイルス科、レトロウイルス科、レオウイルス科、ビルナウイルス科及びピコルナウイルス科ファミリーのウイルスにより引き起こされるウイルス感染の治療的処置に有用である。

【００３６】
本発明では、抗ウイルス剤として使用された時のＰＡＣＡＰ及び抗ウイルス性分子との組合せの両方が、ＩＰＮＶ、ＶＨＳＶ及びＩＳＡＶにより引き起こされる感染を制御するために使用される。それらは、ＷＳＳＶ、ＹＨＶ、ＴＳＶ、ＩＨＮＮＶ及びＭＢＶにより引き起こされるウイルス感染の治療的処置においてもまた使用される。

【００３７】
ＰＡＣＡＰ又はＰＡＣＡＰを含む獣医用組合せの養殖における水生生物への投与を含む水産養殖投与でのウイルス感染のコントロールのための方法もまた、本発明の一部である

。

【図面の簡単な説明】

【００３８】

【図１】ポリＩ：Ｃ（３０μｇ／ｍＬ）で処置されたか又はＩＰＮＶ（０．１の感染多重度（ｍ．ｏ．ｉ））に感染したニジマス（Ｏｎｃｏｒｈｙｎｃｈｕｓ　ｍｙｋｉｓｓ）からの前腎白血球における、実験の開始から４、２４及び４８時間でのＰＡＣ－１受容体のリアルタイムＰＣＲによる発現分析。白血球培養物は２重複で処置されて、発現レベルは３重複においてｑＰＣＲにより分析した。データは、内因性伸長因子ＥＦ１α±標準偏差（ＳＤ）に相対してのＰＡＣ－１の相対的な発現の中間値として表現される。＊（ｐ＜０．０５）。

【図２】ＶＨＳＶ（０．１のｍ．ｏ．ｉ）でインビトロで感染させたＯ．ｍｙｋｉｓｓＲＴＳ－１１からのマクロファージ細胞株における、実験の開始から１、４及び８時間でのＰＡＣ－１受容体のリアルタイムＰＣＲによる発現分析。実験は２重複で行われて、発現レベルは３重複においてｑＰＣＲにより分析した。データは、内因性伸長因子ＥＦ１α±標準偏差（ＳＤ）に相対してのＰＡＣ－１の相対的な発現の中間値として表現される。＊（ｐ＜０．０５）。

【図３】ポリＩ：Ｃ（３０μｇ／ｍＬ）で処置されたか又はＶＨＳＶ（０．１の感染多重度（ｍ．ｏ．ｉ））に感染したニジマス（Ｏｎｃｏｒｈｙｎｃｈｕｓ　ｍｙｋｉｓｓ）からの前腎白血球における、実験の開始から４、２４及び４８時間でのＶＰＡＣ－１受容体のリアルタイムＰＣＲによる発現分析。白血球培養物は２重複で処置されて、発現レベルは３重複においてｑＰＣＲにより分析した。データは、内因性伸長因子ＥＦ１α±標準偏差（ＳＤ）に相対してのＶＰＡＣ－１の相対的な発現の中間値として表現される。＊（ｐ＜０．０５）。

【図４】ＶＨＳＶ（１００μＬの１×１０^{7}ＴＣＩＤ５０（一匹の魚当りの培養上清におけるウイルス力価／ｍＬ）にインビボで実験的に感染したニジマス（Ｏｎｃｏｒｈｙｎｃｈｕｓ　ｍｙｋｉｓｓ）からの前腎白血球（Ａ）及び脾臓（Ｂ）におけるＰＡＣ－１受容体のリアルタイムＰＣＲによる発現分析。５匹の魚の前腎及び脾臓からの全ＲＮＡの５つのプールを、ウイルス感染の３、７及び１０日後でランダムにサンプリングした。発現レベルは３重複においてｑＰＣＲにより分析した。データは、内因性伸長因子ＥＦ１α±標準偏差（ＳＤ）に相対してのＰＡＣ－１の相対的な発現の中間値として表現される。＊（ｐ＜０．０５）。

【図５】ＶＨＳＶ（１００μＬの１×１０^{7}ＴＣＩＤ５０／ｍＬ）にインビボで実験的に感染したニジマス（Ｏｎｃｏｒｈｙｎｃｈｕｓ　ｍｙｋｉｓｓ）からの前腎白血球（Ａ）及び脾臓（Ｂ）におけるＶＰＡＣ－１受容体のリアルタイムＰＣＲによる発現分析。５匹の魚の前腎及び脾臓からの全ＲＮＡの５つのプールを、ウイルス感染の３、７及び１０日後でランダムにサンプリングした。発現レベルは３重複においてｑＰＣＲにより分析した。データは、内因性伸長因子ＥＦ１α±標準偏差（ＳＤ）に相対してのＶＰＡＣ－１の相対的な発現の中間値として表現される。＊（ｐ＜０．０５）。

【図６】ＶＨＳＶ（１００μＬの１×１０^{7}ＴＣＩＤ５０／ｍＬ）にインビボで実験的に感染したニジマス（Ｏｎｃｏｒｈｙｎｃｈｕｓ　ｍｙｋｉｓｓ）からの脾臓白血球におけるＰＡＣＡＰのリアルタイムＰＣＲによる発現分析。５匹の魚の脾臓からの全ＲＮＡの５つのプールを、ウイルス感染の３、７及び１０日後でランダムにサンプリングした。発現レベルは３重複においてｑＰＣＲにより分析した。データは、内因性伸長因子ＥＦ１α±標準偏差（ＳＤ）に相対してのＰＡＣＡＰの相対的な発現の中間値として表現される。＊（ｐ＜０．０５）。

【図７】健康なニジマスの末梢血白血球（Ａ）及び前腎（Ｂ）におけるＭｘタンパク質コーディング遺伝子の転写に対するＰＡＣＡＰ３８のインビトロの効果のリアルタイムＰＣＲによる発現分析。１０$^{-10}$、１０$^{-9}$及び１０$^{-8}$Ｍの濃度におけるＰＡＣＡＰ投与の効果を、４８時間処置後で評価した。実験は、４回繰り返した。白血球培養物は２重複で処置されて、ｑＰＣＲは３重複で行った。データは、内因性伸長因子ＥＦ１α±標準偏

差（ＳＤ）に相対してのＭｘの相対的な発現の中間値として表現される。＊（ｐ＜０．０５）。

【図８】健康なニジマスの末梢血白血球（Ａ）及び前腎（Ｂ）におけるＩＦＮγコーディング遺伝子の転写に対するＰＡＣＡＰ３８のインビトロの効果のリアルタイムＰＣＲによる発現分析。１０$^{-10}$、１０$^{-9}$及び１０$^{-8}$Ｍの濃度におけるＰＡＣＡＰ投与の効果を、４８時間処置後で評価した。実験は、４回繰り返した。白血球培養物は２重複で処置されて、ｑＰＣＲは３重複で行った。データは、内因性伸長因子ＥＦ１α±標準偏差（ＳＤ）に相対してのＩＦＮγの相対的な発現の中間値として表現される。＊（ｐ＜０．０５）。

【図９】健康なニジマスの末梢血白血球（Ａ）及び前腎（Ｂ）におけるＴＬＲ９コーディング遺伝子の転写に対するＰＡＣＡＰ３８のインビトロの効果のリアルタイムＰＣＲによる発現分析。１０$^{-10}$、１０$^{-9}$及び１０$^{-8}$Ｍの濃度におけるＰＡＣＡＰ投与の効果を、４８時間処置後で評価した。実験は、４回繰り返した。白血球培養物は２重複で処置されて、ｑＰＣＲは３重複で行った。データは、内因性伸長因子ＥＦ１α±標準偏差（ＳＤ）に相対してのＴＬＲ９の相対的な発現の中間値として表現される。＊（ｐ＜０．０５）。

【図１０】ＰＡＣＡＰ－リバビリン組合せ（Ｒｉｂ－ＰＡＣＡＰ）の抗ウイルス活性を決定するためのインビトロの分析。ウイルス感染の前２４時間で、細胞を「抗ウイルス剤」又は組合せのＰＡＣＡＰ－抗ウイルス剤で処置した。陽性対照（ｃ＋）：ウイルスに感染し抗ウイルス剤処置のない細胞。陰性対照（ｃ－）：無感染で無処置の細胞。吸着が可能となるように細胞を３０分の間ウイルスに感染させた。後で、それらをＰＢＳで洗浄して、異なる処置を加えた。細胞変性効果（ＣＰＥ）の阻害はクリスタルバイオレット染色（５５０ｎｍの吸光度）を用いて評価した。

【実施例】

【００３９】

例１．ポリＩ：Ｃ及びＩＰＮＶで処置されたニジマス（Ｏ．ｍｙｋｉｓｓ）細胞の前腎からの白血球における、及びインビトロでＶＨＳＶで感染させたニジマス（Ｏ．ｍｙｋｉｓｓ）ＲＴＳ－１１のマクロファージ細胞株におけるＰＡＣ－１受容体発現。

我々は、９～１２グラム及び７箇月の年齢で、ＶＨＳＶ及びＩＰＮＶがない、若い（ｊｕｖｅｎｉｌｅ）ニジマス（Ｏ．ｍｙｋｉｓｓ）を使用した。魚は１４℃で水循環により維持された。食物を一日に二度任意で投与した。ウイルスである、ＶＨＳＶ（株０７７１）及びＩＰＮＶ（株Ｓｐ）を、ニジマス性腺細胞系ＲＴＧ－２（Ｓｅｎａ及びＲｉｏ（１９７５）Ｉｎｆｅｃｔ Ｉｍｍｕｎ １１：８１５－２２）において伝播させた。細胞は、１００ＩＵ／ｍＬのペニシリン及び１００ｕｇ／ｍＬのストレプトマイシンを含有する１０％のウシ胎仔血清（ＦＣＳ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で補充した最小必須培地（ＭＥＭ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、米国）の中で増殖させた。ウイルスを、１４℃で抗生物質及び２％のＦＣＳを伴うＭＥＭの中で増殖したＲＴＧ－２細胞のに接種した。広範囲な細胞変性効果が観察された時に、培養上清を収穫して遠心分離して細胞残屑を除去した。実験のために、我々は清澄化された培養上清を使用した。ウイルス力価は、Ｒｅｅｄ及びＭｕｅｎｃｈ（Ｒｅｅｄ及びＭｕｅｎｃｈ（１９９８）Ｊ Ｈｙｇ ２７：２８０－９）によって報告されるように９６ウェルプレートにおいて決定した。

【００４０】

前腎白血球は、Ｇｒａｈａｍ及びＳｅｃｏｍｂｅ（Ｇｒａｈａｍ及びＳｅｃｏｍｂｅ（１９９８）Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ６５：２９３－７）により記載された方法に従って４匹のマスから分離した。短くいえば、腎臓前部を無菌的に除去し、ペニシリン１００ＩＵ／ｍＬ、ストレプトマイシン（１００ｍｇ／ｍＬ）、ヘパリン（１０ユニット／ｍＬ）及び２％のＦＣＳで補充した培地Ｌｅｉｂｏｖｉｔｚ（Ｌ－１５、Ｇｉｂｃｏ、英国）を使用して、１００μのナイロンメッシュを通して通過させた。結果として生じた細胞浮遊を、５１％までのＰｅｒｃｏｌｌ勾配上に注意深く置いた。白血球に対応する細胞の輪を注意深く除去し、０．１％でＬ－１５を含有するＦＣＳ中で２度洗浄した。細胞を、ｍｌ当

り５×１０^{6}細胞の濃度で５％のＦＣＳを伴うＬ－１５で再懸濁して、２４ウェルプレートにウェル当り１ｍＬで分配した。感染した白血球を、３０μｇ／ｍＬのポリＩ：Ｃ（Ｓｉｇｍａ）に曝露させたか又は０．１のＭＯＩでＩＰＮＶに感染させて、４時間、２４時間及び４８時間の期間の間、１４℃でインキュベートした。

【００４１】

最後に、全ＲＮＡを、Ｃｈｏｍｃｚｙｎｓｋｉ及びＳａｃｃｈｉ（Ｃｈｏｍｃｚｙｎｓｋｉ及びＳａｃｃｈｉ（１９８７）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１６２：１５６－９）により記載された方法を使用して白血球培養物から精製して、ポリＩ：Ｃで処置されていない及び処置された又はウイルスで感染させた白血球上のＰＡＣ－１受容体の発現レベルを評価した。サンプルをＲＱ１　ＲＮａｓｅ非含有ＤＮａｓｅ（Ｐｒｏｍｅｇａ）で処置して、それによってサンプルの中に存在するゲノムＤＮＡを除去した。相補ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）の合成のために、逆転写酵素に基づいて市販の試薬ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＩＩ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用した。定量ＰＣＲ反応（ｑＰＣＲ）のために、市販供給源からのＰＣＲの混合物、Ｐｏｗｅｒ　ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　ＰＣＲ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用した。ｑＰＣＲの結果は、構成的内因性遺伝子発現、具体的には伸長因子１α（ＥＦ　１α）に対して標準化し、３連で行った。結果は、$2^{-\Delta Ct}$として表され、ΔＣｔは、遺伝子Ｃｔ値からＣｔ標準化遺伝子（ＥＦ１α）の評価値を差し引いた残部に等しい。

【００４２】

結果は、ＰＡＣ－１のレベルが、実験の４、２４及び４８時間でポリＩ：Ｃで処置された培養白血球において過剰発現したことであり、ＰＡＣ－１受容体が魚においてウイルスに対する応答に関与することを示唆し、ポリＩ：Ｃが二重らせんＲＮＡと構造上同じ分子であることを考慮に入れれば、ウイルス感染と同様な効果である（多くのウイルスにはＲＮＡゲノムがあります）。これらの結果は図１に示される。

ポリＩ：Ｃは、Ｂ細胞及び樹状細胞の細胞内区画で発現されるｔｏｌｌ様受容体－３（ＴＬＲ３）と相互作用する。ＴＬＲ－３は自然ではウイルスにより刺激される。

【００４３】

そして、ＰＡＣ－１の発現レベルは、無処置の培養物において白血球の検出可能な値から、ＩＰＮＶで感染した白血球の培養物において感染の後４、２４及び４８時間で検出不能なレベルへとなり、魚における抗ウイルス性反応でＰＡＣＡＰに特異的に結合するこの受容体の関与を確認することになった（図１）。ウイルス擬似のポリＩ：Ｃの効果とＩＰＮＶのそれとの間で観察された相違は、感染細胞におけるウイルスの特異的効果、恐らくそれらの有利点に対するものに、関係することができた。

【００４４】

なお、我々は、ＶＨＳＶで感染させたマクロファージ細胞株マス（Ｏ．ｍｙｋｉｓｓ）ＲＴＳ－１１におけるＰＡＣ－１の発現レベルを評価し、株ＲＴＳ－１１のウイルス感染の方法は、ＲＴＧ－２株について上述したものと同様であった。同様に、我々は、ＶＨＳＶによる感染後４及び８日後へのＰＡＣ－１の発現レベルの量のダウンレギュレーションを観察した（図２）。

【００４５】

例２．ポリＩ：Ｃ及びＶＨＳＶで処置されたニジマス（Ｏｎｃｏｒｈｙｎｃｈｕｓ　ｍｙｋｉｓｓ）細胞の腎臓前部からの白血球におけるＶＰＡＣ－１受容体の発現

ＶＰＡＣ－１受容体の発現のレベルを評価するために、例１において記載されていたものと同様な実験設計が行なわれた。

【００４６】

結果は、ＶＰＡＣ－１のレベルがポリＩ：Ｃで処置された培養白血球において実験の４、２４及び４８時間で過剰発現されるというものであり、Ｉ：Ｃはウイルス擬似分子であると考えられることを考慮すれば、ＰＡＣ－１としてＶＰＡＣ－１受容体が、魚においてウイルスへの応答に関与することが示唆された（図３）。

【００４７】

そして、ＶＰＡＣ－１の発現レベルは、ＶＨＳＶに感染させた白血球の培養物において感染後の４、２４及び４８時間で検出不能であり、ＰＡＣＡＰ及びＶＩＰと同じ親和性で結合するこの受容体の、魚における抗ウイルス性応答における関与を確認するものであった（図３）。

【００４８】

ＩＰＮＶに感染させた培養腎臓前部白血球においてＰＡＣ－１受容体とともに観察されたように、ポリＩ：Ｃでインビトロでの白血球の処置によるＶＰＡＣ－１の制御と感染ＶＨＳＶとの観察された相違は、感染した細胞における完全な生物学的存在としてのウイルスの特異的効果、恐らくそれらの有利点に対するものに、関係することができた。

【００４９】

例３．ＶＨＳＶにインビボで感染させたニジマス（Ｏｎｃｏｒｈｙｎｃｈｕｓ　ｍｙｋｉｓｓ）の脾臓及び腎臓前部からの白血球におけるＰＡＣＡＰ及びＰＡＣ－１受容体及びＶＰＡＣ－１の発現

ＶＨＳＶ（株０７７１）を細胞系ＲＴＧ－２において伝播させたＳｅｎａ及びＲｉｏ（１９７５）Ｉｎｆｅｃｔ　Ｉｍｍｕｎ　１１：８１５－２２）。要約すると、ウイルスを、抗生物質（１００ＩＵ／ｍＬペニシリン及び１００ｕｇ／ｍＬストレプトマイシン）及び２％ＦＣＳ伴うＭＥＭ中で１４℃で増殖させたＲＴＧ－２細胞株中に接種した。広範囲な細胞変性効果が観察された時、培養上清を収穫して遠心分離して細胞残屑を除去した。マスの感染のために、清澄化された培養上清を使用した。ウイルス力価を、Ｒｅｅｄ及びＭｕｅｎｃｈ（Ｒｅｅｄ及びＭｕｅｎｃｈ（１９９８）Ｊ　Ｈｙｇ　２７：２８０－９）により報告されるように９６ウェルプレートにおいて決定した。

【００５０】

我々は、９～１２グラムで７か月齢でＶＨＳＶ及びＩＰＮＶ非含有の若魚ニジマス（Ｏ．ｍｙｋｉｓｓ）を使用した。魚を水循環で１４℃で維持した。食物を１日に２度任意に投与した。２つの実験群を各群２０匹のマスから形成し、１つの群は、ウイルス溶液（魚当り１００Ｌの1×10^{7}ＴＣＩＤ５０／ｍＬ）で注射し、他の群（陰性対照として使用した）はＶＨＳＶで感染させていない培養培地ＲＴＧ－２で注射した。

【００５１】

注射後１、３、７及び１０日で、５匹のマスをランダムに取り出し、麻酔性ＭＳ－２２への過度曝露により犠牲にした。引き続いて、腎臓を除去して上記脾臓をＣｈｏｍｃｚｙｎｓｋｉ及びＳａｃｃｈｉ（Ｃｈｏｍｃｚｙｎｓｋｉ及びＳａｃｃｈｉ（１９８７）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１６２：１５６－９）により記載された方法に従って、これらの器官から全ＲＮＡの精製を進行した。ＣＤＮＡ合成及び定量ＰＣＲの反応を例１に記載されるように行なわれた。

【００５２】

逆転写（ＲＴ）の反応のために、実験の１、３、７及び１０日目でのランダムに選択された各実験群からの５匹の個体からの５つの全ＲＮＡをプールした。

【００５３】

結果は、脾臓において、ＰＡＣ－１及びＶＰＡＣ－１受容体が陰性対照と比較して注射後３日目で過剰発現することであった。発現レベルは、注射後１０日目で対照群より低い。腎臓前部では、ＰＡＣ－１及びＶＰＡＣ－１受容体は１及び３日目で対照群において発現レベルがより低く、１０日目へのＶＰＡＣ－１の値は検出不能である。７日目で、両方の受容体は、陰性対照群と比較して、それらの発現のレベルを増加させる。両方の受容体はウイルス感染の後の時間を通じて同様の発現パターンを有していることもまた観察された（図４及び５）。

【００５４】

１日目のＰＡＣＡＰ発現値は、陰性対照と比較してより低い。７日目では、これらの発現値が優位である。これらの結果は、受容体発現のレベルが陰性対照群と比較してより低くなり（１日目）及びより高くなる（７日目）傾向を示したという意味で、それの２つの受容体ＶＰＡＣ－１及びＰＡＣ－１のものと連関する。１０日目で、ＰＡＣＡＰの発現値

は、陰性対照群と比較してより低い（図４、５及び６）。

【００５５】

ＶＨＳＶ及びＩＰＮＶで実験的に感染させた魚の脾臓及び腎臓前部におけるＰＡＣＡＰ及びその受容体ＰＡＣ－１及びＶＰＡＣ－１の発現レベルにおける変化は、両方の受容体のインビボでの魚における抗ウイルス応答への関与を示す。このことは、我々がサケ科における抗ウイルス応答におけるＰＡＣＡＰの、感染した魚の生存性を増加させ、ウイルス感染への免疫応答を増強し及びウイルス複製を行なうための能力を有する器官及び流体から清掃させる、との陽性効果を観察したチャレンジ実験において確認された。

【００５６】

例４．健康なニジマス（Ｏｎｃｏｒｈｙｎｃｈｕｓ　ｍｙｋｉｓｓ）の末梢血白血球及び腎臓前部におけるタンパク質Ｍｘ、ＩＦＮ及びＴＬＲ９の転写に対するＰＡＣＡＰの効果

我々は、ＶＨＳＶ及びＩＰＮＶ非含有の約５０グラムの若魚ニジマス（Ｏ．ｍｙｋｉｓｓ）を使用した。魚（ｎ＝５）はメタンスルホン酸塩（Ｓｉｇｍａ、米国）で麻酔して、尾静脈そして次に腎臓前部からの第１の末梢血を無菌的に除去した。

【００５７】

Ｇｒａｈａｍ及びＳｅｃｏｍｂｅ（Ｇｒａｈａｍ及びＳｅｃｏｍｂｅ（１９９８）Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　６５：２９３－７）により記載された方法に従って、独立して５匹のマスからの腎臓前部から末梢血白血球を分離した。

【００５８】

各魚の末梢血を、ペニシリン１００ＩＵ／ｍＬ、ストレプトマイシン（１００μｇ／ｍＬ）、ヘパリン（１０ユニット／ｍＬ）及び２％ＦＣＳで補充されたＬｅｉｂｏｖｉｔｚ（Ｌ－１５、Ｇｉｂｃｏ、英国）の半分を４倍希釈し、５１％までＰｅｒｃｏｌｌ勾配に注意深く置かれた。白血球に対応する細胞の輪を注意深く除去し、Ｌ－１５含有０．１％ＦＣＳにおいて２度洗浄した。

【００５９】

腎臓前部を、ペニシリン１００ＩＵ／ｍＬ、ストレプトマイシン（１００μｇ／ｍＬ）、ヘパリン（１０ユニット／ｍＬ）及び２％ＦＣＳで補充した１００μｍ　Ｌｅｉｂｏｖｉｔｚ（Ｌ－１５、Ｇｉｂｃｏ、英国）のナイロンメッシュを通じて通過させた。結果として生じる細胞懸濁を、同じ培地で補充されたＬ－１５中で１：４に希釈し、５１％までＰｅｒｃｏｌｌ勾配に注意深く置かれた。白血球に対応する細胞の輪を注意深く除去し、Ｌ－１５含有０．１％ＦＣＳにおいて２度洗浄した。

【００６０】

細胞をｍｌ当り５×１０^{6}細胞の濃度で５％ＦＣＳを伴うＬ－１５で懸濁して２４ウェルプレートにウェル当り１ｍＬで分配した。白血球を、化学合成により得られたＣｌａｒｉａｓ　ｇａｒｉｅｐｉｎｕｓからのＰＡＣＡＰ３８（１０$^{-10}$Ｍ、１０$^{-9}$Ｍ及び１０$^{-8}$Ｍ）の３用量で２連で処置し、陰性対照として２連で分配した無処置の白血球を使用した。

【００６１】

Ｍｘ、ＩＦＮ及びＴＬＲ９のレベルを処置の４８時間後に評価した。そのようにするために、全ＲＮＡを、Ｃｈｏｍｃｚｙｎｓｋｉ及びＳａｃｃｈｉ（Ｃｈｏｍｃｚｙｎｓｋｉ及びＳａｃｃｈｉ（１９８７）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１６２：１５６－９）により記載された方法にりＰＡＣＡＰで処置された白血球培養物から精製した。

【００６２】

Ｍｘ、ＩＦＮγ及びＴＬＲ９を増幅するために設計されたプライマーは、ｃＤＮＡとゲノムＤＮＡとを区別せず、異なる組織からの全ＲＮＡを、サンプルの中に存在し得るゲノムＤＮＡを除去するために、ＤＮＡヌクレアーゼで、具体的にはＲＱ１　ＲＮａｓｅ非含有ＤＮａｓｅ（Ｐｒｏｍｅｇａ）で処置した。

【００６３】

ｃＤＮＡの合成のために、ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＩＩ逆転写酵素（Ｉｎｖｉｔｒ

ｏｇｅｎ）を使用する市販の試薬キットを使用した。最後に、定量ＰＣＲ反応（ｑＰＣＲ）のために、市販の供給源、Ｐｏｗｅｒ　ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　ＰＣＲ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）からのＰＣＲの混合物を使用した。定量ＰＣＲ反応（ｑＰＣＲ）のために、市販供給源からのＰＣＲの混合物、Ｐｏｗｅｒ　ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　ＰＣＲ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用した。ｑＰＣＲの結果は、構成的発現遺伝子、具体的には伸長１α（ＥＦ　１α）に対して標準化し、３連で行った。結果は、$2^{-\Delta Ct}$として表され、ΔＣｔは、遺伝子Ｃｔ値からＣｔ標準化遺伝子ＥＦ１α）の評価値を差し引いた残部に等しい。

【００６４】

Ｍｘタンパク質レベルは、10^{-10}Ｍ　ＰＡＣＡＰ３８で処置された末梢血白血球の培養物における処置の４８時間の後に増加する。10^{-9}Ｍの用量では、陰性対照と対比してＭｘタンパク質の転写に対してＰＡＣＡＰ３８の刺激性作用も存在するが、検出された発現レベルは10^{-10}Ｍの用量で得られたレベルを下回った。10^{-8}Ｍの用量は陰性対照に対してＭｘタンパク質発現のレベルにおいて相違しなかった。これらの結果は、（10^{-9}～10^{-10}Ｍ）の範囲において低濃度でのＭｘタンパク質の転写に対するＰＡＣＡＰ３８の陽性効果を示す（図７Ａ）。前腎白血球では、Ｍｘタンパク質に対するＰＡＣＡＰ　３８の効果が末梢血白血球においてよりも穏やかであり、服量10^{-9}Ｍで刺激性作用を示す（図７Ｂ）。

【００６５】

なお、我々は、範囲（10^{-10}～10^{-8}Ｍ）におけるＰＡＣＡＰ３８で刺激された培養物における検知できるレベルでのＰＡＣＡＰで刺激された培養末梢血白血球における検出不能なレベルのＴＬＲ９から、ＴＬＲ９の発現におけるＰＡＣＡＰ３８の刺激性作用を観察した。最高値は10^{-10}Ｍの用量で得られた（図８Ａ）。前腎白血球において、以前にＭｘタンパク質発現で観察されたように、結果はより穏やかであった。ＴＬＲ９発現レベルは、10^{-9}Ｍの中間用量で、陰性対照より統計的に高かった（図８Ｂ）。

【００６６】

ＩＦＮγレベルは末梢血白血球の無処置培養物において検出不能であった。培養物を３用量のＰＡＣＡＰ３８で処置して、10^{-9}Ｍの中間用量で最高レベルを伴う検知可能なレベル発現の結果となった（図９Ａ）。そして、培養された腎臓前部白血球において、我々は、ＰＡＣＡＰ３８がＩＦＮγの転写を刺激することを観察した。ＩＦＮγの発現レベルは10^{-9}及び10^{-8}Ｍの用量で、対照群より統計的に高く、10^{-9}Ｍの最高用量において最良の結果を得た（図９Ｂ）。

【００６７】

例５．リバビリンと組み合わせてのＰＡＣＡＰ投与のＩＰＮＶ感染に対するインビトロ効果

我々は、単離されたウイルスとしてＩＰＮＶに感染した細胞培養物（株ＡＴＣＣ　ＶＲ－２９９）からの上清を使用した。ウイルスの確認は特異的なＰＣＲを通じてなされた。インビトロ分析のために、我々は細胞株ＣＨＳＥ－２１４（マスノスケ胚）（ＥＣＡＣＣ番号００／Ｆ／０３１）を使用した。これを、Ｅａｇｌｅ塩、１０％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ）、２ｍＭグルタミン及び抗生物質で補充したＭＥＭ培地中で１８℃で維持した。

【００６８】

ウイルス接種原は１５℃及び２％ＦＢＳで増殖させて、分析の前に、培養上清におけるウイルス力価（ＴＣＩＤ　５０）を、Ｒｅｅｄ及びＭｕｅｎｃｈ（Ｒｅｅｄ及びＭｕｅｎｃｈ（１９３８）Ｔｈｅ　Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｈｙｇｉｅｎｅ　２７：４９３－４９７）の技術により決定した。ウイルス接種原から、０．１ｍｏｉの稀釈液を調製した。９６ウェルのプレートに、１０％ＦＢＳ、２ｍＭグルタミン及び抗生物質で補充したＭＥＭ（Ｅａｇｌｅの塩）で１８℃で維持したＣＨＳＥ－２１４で播種した。我々は、異なる濃度のリバビリン及び３つの異なる濃度のＰＡＣＡＰ（０．１、１及び１０ｎＭ）を評価した。感染の前２４時間で、細胞を抗ウイルス剤又はＰＡＣＡＰ－抗ウイルス薬の組合せで処置し、陽性対照（ウイルスに感染させて抗ウイルス性処置のない細

胞）及び陰性（感染させず無処置の細胞、及び抗ウイルス剤又は異なる用量のＰＡＣＡＰで処置された非感染細胞）を確立した。細胞をウイルスの接種原に３０分の期間の吸着で感染させた。次いで、細胞をＰＢＳで洗浄した。これらの処置を２％ＦＢＳ及び抗生物質で補充したＭＥＭで希釈し、再度添加した。いったん我々が陽性対照中で細胞変性効果（ＣＰＥ）を観察したならば、その試験は終結した。その評価は、顕微鏡検査により、及びクリスタルバイオレットで染色すること（５５０ｎｍの吸光度読書）により行なった。陽性対照におけるＣＰＥは伝染後３日で観察した。クリスタルバイオレット染色の吸光度から得られた、処置されず感染させた対照細胞に関してのＣＰＥ阻害の結果を、図１０に示した。リバビリンのＰＡＣＡＰと組み合わせての抗ウイルス活性の分析はＷｉｎｄｏｗｓ（登録商標）のためのプログラムＣａｌｃｕｓｙｎ（Ｂｉｏｓｏｆｔ）を使用して行なった。得られたＣｈｏｕの組合せ指数の値は、試験された濃度値についての両方の薬の間の協調性を示した。

【００６９】

例６．ＰＡＣＡＰ及びＰＡＣＡＰ＋リバビリンの組合せの投与のＩＰＮＶに実験的に感染したニジマス（Ｏ．ｍｙｋｉｓｓ）における効果

実験は、ＰＡＣＡＰ及びＰＡＣＡＰ－リバビリン組合せの投与のＩＰＮＶに実験的に感染したニジマスにおける効果を評価するために行なった。我々は、５０匹の魚の８つの実験群を各々１．６±０．４ｇの体重量に順応させた。水温を１０～１２℃で維持した。

群１：ウイルスに曝露していない無処置の魚

群２：ウイルスに曝露した、無処置の魚

群３：ウイルスに曝露した、４００μｇ／Ｌの水の用量でリバビリンで処置された群

群４：ウイルスに曝露した、８００μｇ／Ｌの水の用量でリバビリンで処置された群

群５：ウイルスに曝露した、１００μｇ／Ｌの水の用量でＰＡＣＡＰで処置された群

群６：ウイルスに曝露した、２００μｇ／Ｌの水の用量でＰＡＣＡＰで処置された群

群７：ウイルスに曝露した、組合せ１（リバビリナ（ｒｉｂａｖｉｒｉｎａ）４００μｇ／Ｌ－ＰＡＣＡＰ　１００μｇ／Ｌ）で処置された群

群８：ウイルスに曝露した、組合せ２（リバビリナ（ｒｉｂａｖｉｒｉｎａ）８００μｇ／Ｌ－ＰＡＣＡＰ　２００μｇ／Ｌ）で処置された群。

【００７０】

動物を、一日に二度、各タンクにおいて全肉体重量の３％と等価な量で食餌した。魚を、約10^5プラーク形成単位（ｐｆｕ）／ｍＬのＩＰＮＶ（ＡＴＣＣ　ＶＲ－２９９を緊張させる）を含有する１０～１２℃の水に２時間それらを置くことによりウイルスに曝露させた。群１及び２における魚を、抗ウイルス性化合物なしで又はＰＡＣＡＰ抗ウイルス組合せなしで、同じストレス処置に供した。群１における魚はウイルスの代わりに細胞培養液と同じ手順を受けた。ウイルス同定は、　Ｌｏｐｅｚ－Ｌａｓｔｒａら（１９９４）Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｆｉｓｈ　Ｄｉｓｅａｓｅｓ　１７：２６９－２８２により記載された方法に従って、腎臓及び脾臓からのＲＴ－ＰＣＲによって行なった。ＰＡＣＡＰによる又はＰＡＣＡＰ抗ウイルス組合せによる処置は、１週に３回、２０日間行なった。最初の処置はウイルス感染の２時間後に行なった。実験観察は、処置の最初の２０日の間及びそれが終えた後２５日間なされた。実験（４５日）の間、魚の死及び異常行動をモニターした。

【００７１】

処置されなかったＩＰＮＶ感染魚は、感染後６日目から感染性膵臓壊死症の特徴的サインを示した。最初の死が、感染後７日に生じ、すべての魚において疾患のサインの悪化が伴い、感染後１１、１２及び１３日目に高い死亡率を伴った。感染してリバビリン又はＰＡＣＡＰで処置された魚では、疾患のサインは８日目で検出された。リバビリン－ＰＡＣＡＰ組合せで処置されてウイルスに曝露した群は、実験の期間の間疾患のサインが存在しなかった。

【００７２】

無処置で感染した魚は、感染後１５日目で食欲を回復した。抗ウイルス剤で処置された

魚は、１３日目で食欲を回復し、片やＰＡＣＡＰ及びＰＡＣＡＰ－リバビリン組合せで処置した魚は、実験の９日目にそれを示した。感染していない魚の対照は正常挙動を示し、この群においては実験の期間中に死は存在しなかった。無処置の魚及びＩＰＮＶ感染魚における累積死亡率は５０匹のうち４０匹の魚（２０％の生存）であった。リバビリンで処置され、感染した魚においては、生存度は群３及び４についてそれぞれ６８及び７０％であった。ＰＡＣＡＰで処置され、感染した魚においては、生存度は群５及び６についてそれぞれ５０及び５５％であった。ＰＡＣＡＰ－リバビリン組合せで処置された群では、生存度は群７及び８についてそれぞれ９７及び９９％であった。死んだ魚の組織サンプルにおいて、ＩＰＮＶの存在が見出された。無処理で感染していない群から得られたサンプルではウイルスが検出されなかった。

【００７３】

表１は感染後４５日目での平均重量を示す。感染して処置されない魚は、感染していない魚と比較してより低い増量を有していた。重量損失を、処置された群で、さらにはＰＡＣＡＰ－リバビリン組合せで処置された群において相殺した。

【表１】

表１．感染後４５日間の若魚ニジマスの体重の増加

実験群	初期重量 (g)	最終重量 (g)	初期重量についての増加 (%)
1	1,6 ± 0,4	4,5 ±1,1 [a]	181
2	1,6 ± 0,4	2,7 ± 1,2 [b]	69
3	1,6 ± 0,4	3,8 ± 1,1 [c]	137
4	1,6 ± 0,4	3,7 ± 1,0 [c]	131
5	1,6 ± 0,4	5,0 ± 0,5 [d]	212
6	1,6 ± 0,4	5,2 ± 0,6 [d]	225
7	1,6 ± 0,4	5,5 ± 0,4 [d]	343
8	1,6 ± 0,4	5,6± 0,5[d]	350

ANOVAに引き続いてTukeyポストテストを行った。異なる文字は、統計学的に有意な相違を表す。

【００７４】

例７．ＰＡＣＡＰ及びポリラクチド酸共グリコール酸において製剤されたＰＡＣＡＰ＋リバビリン組合の投与の、ＩＰＮＶに実験的に感染したニジマス（Ｏ．ｍｙｋｉｓｓ）への効果

実験を、ＰＡＣＡＰ及びポリ乳酸共グリコール酸（ＰＬＧＡ）に含有させたＰＡＣＡＰ－リバビリン組合せのＩＰＮＶに実験的に感染したニジマスへの投与の効果を評価するために行なった。８つの実験群を、各々３０±４ｇの３０匹の魚で行ない、１０～１２℃での水で維持した。

群１：ＰＬＧＡを注射して、ウイルスに曝露しなかった魚

群２：ＰＬＧＡを注射してウイルスに曝露した魚
群３：４μｇ／ｇの魚の用量でリバビリンを注射され、ウイルスに曝露した群
群４：８μｇ／ｇの魚の用量でリバビリンを注射され、ウイルスに曝露した群
群５：０．１μｇ／ｇの魚の用量でＰＡＣＡＰ注射され、ウイルスに曝露した群
群６：０．２μｇ／ｇの魚の用量でＰＡＣＡＰ注射され、ウイルスに曝露した群
群７：組合せ１（リバビリン４μｇ／ｇ－ＰＡＣＡＰ　０．１μｇ／ｇ）を注射され、ウイルスに曝露した群
群８：組合せ２（リバビリン８μｇ／ｇ－ＰＡＣＡＰ　０．２μｇ／ｇ）を注射され、ウイルスに曝露した群

【００７５】
ＰＡＣＡＰ又はＰＡＣＡＰ－リバビリン組合せを含有するナノ粒子を、ウイルス感染の２時間後に腹腔内注射により投与した。実験観察を３０日間行った。例６で記載したものと同様な生存率に関する結果が得られた。

【００７６】
例８．ＰＡＣＡＰ及びＰＡＣＡＰ＋リバビリン組合せの投与のＩＰＮＶに実験的に感染したタイセイヨウサケ（Ｓａｌｍｏ　ｓａｌａｒ）における効果
実験を、ＰＡＣＡＰ及びＰＡＣＡＰ－リバビリン組合せの投与のＩＰＮＶに実験的に感染したサケ（Ｓａｌｍｏ　ｓａｌａｒ）に対する効果を評価するために行なった。８つの実験群を５０匹の魚で各々１．２±０．３ｇのサイズで行ない、１０～１２℃での水で維持した。
群１：ウイルスに曝露していない無処置の魚
群２：ウイルスに曝露した、無処置の魚
群３：４００μｇ／Ｌの水の用量でリバビリンで処置され、ウイルスに曝露した群
群４：８００μｇ／Ｌの水の用量でリバビリンで処置された、ウイルスに曝露した群
群５：１００μｇ／Ｌの水の用量でＰＡＣＡＰで処置された、ウイルスに曝露した群
群６：２００μｇ／Ｌの水の用量でＰＡＣＡＰで処置された、ウイルスに曝露した群
群７：リバビリン４００μｇ／Ｌ－ＰＡＣＡＰ　１００μｇ／Ｌ組合せで処置された、ウイルスに曝露した群
群８：リバビリン８００μｇ／Ｌ－ＰＡＣＡＰ　２００μｇ／Ｌ組合せで処置された、ウイルスに曝露した群。

【００７７】
動物に、一日に二度、各タンクにおいて全肉体重量の３％と等価な量で食餌した。魚を、約10^5ｐｆｕ／ｍＬのＩＰＮＶ（株ＡＴＣＣ　ＶＲ－２９９）を含有する１０～１２℃での水に２時間それらを置くことによりウイルスに曝露した。処置は週当たり３回２０日間行なった。実験観察をこの期間中に及び最後の処置の後２５日目になされた。実験の４５日の間、魚の死及び異常行動をモニターした。群１及び２における魚を、抗ウイルス性化合物又はＰＡＣＡＰ－抗ウイルス剤組合せのない処置によって産生された同じストレスに供した。群１における魚はウイルスの代わりに細胞培養液を伴う手順を受けた。ウイルスの同定は、Ｌｏｐｅｚ－Ｌａｓｔｒａら（１９９４）Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｆｉｓｈ　Ｄｉｓｅａｓｅｓ　１７：２６９－２８２により記載された方法に従って、腎臓及び脾臓からのＲＴ－ＰＣＲにより行なった。

【００７８】
ＩＰＮＶに感染して処置しなかった魚は、感染後６日目から感染性膵臓壊死症の特徴的サインを示した。最初の死が感染後８日目に生じ、すべての魚における疾患のサインの悪化が伴い、及び感染後１１日目及び１５日目の間で高い死亡率を伴った。この群における生存度の百分率は３０％であった。ＰＡＣＡＰ、ＰＡＣＡＰ－リバビリン組合せで処置された群及び感染していない群を除いて、ウイルスに感染したすべての群において、１０及び１１日目で食欲の喪失が存在した。感染して両方の用量のリバビリンで処置された魚において、疾患の初期サインが１０日目で検出され、低用量及び高用量についてそれぞれ７０～７６％生存度になった。感染してＰＡＣＡＰに処置された魚では、生存度は低用量及

び高用量についてそれぞれ５６～６０％であった。リバビリン－ＰＡＣＡＰ組合せで処置されてウイルスに曝露した群では、生存度は９６～９８％であった。感染させず無処置の群では、生存度の百分率は９８％であった。死んだ魚の組織サンプルにおいて、ＩＰＮＶの存在が見出された。

【００７９】

表２は感染後４５日目での平均重量を示す。感染して無処置の魚は、感染していない魚と比較してより低い重量増加であった。この重量損失は、処置された群において、さらにＰＡＣＡＰ及びＰＡＣＡＰ－リバビリン組合せで処置された群において相殺された。

【表２】

表２．感染後４５日の間の若魚タイセイヨウサケの体重の増加

実験群	初期重量 (g)	最終重量 (g)	増加 (%)
1	1,2 ±0,3	2,5 ± 0,8 [a]	108
2	1,2 ± 0,3	2,0 ± 0,4 [b]	67
3	1,2 ± 0,3	2,2 ± 0,4 [c]	83
4	1,2 ± 0,3	2,3 ± 0,5 [c]	92
5	1,2 ± 0,3	2,4 ± 0,3 [a]	200
6	1,2 ± 0,3	2,8 ± 0,3	233
7	1,2 ± 0,3	3,1 ± 0,2	258
8	1,2 ± 0,3	3,4 ± 0,1	283

ANOVAに引き続いてTukeyポストテストを行った。異なる文字は、統計学的に有意な相違を表す。

【００８０】

例９．ＰＡＣＡＰ及びＰＡＣＡＰ＋リバビリン組合せの投与のＩＳＡＶに実験的に感染したタイセイヨウサケ（Ｓａｌｍｏ　ｓａｌａｒ）における効果

実験を、ＰＡＣＡＰ及びＰＡＣＡＰ－リバビリン組合せの投与のＩＳＡＶに実験的に感染したサケ（Ｓａｌｍｏ　ｓａｌａｒ）に対する効果を評価するために行なった。８つの実験群を２５匹の魚で各々５０±１０ｇで行なった。群を１０～１２℃で海水に維持した。

群１：処置されず、ＩＳＡウイルスに曝露していない魚

群２：ＩＳＡウイルスに曝露した、無処置の魚

群３：４００μｇ／Ｌの水の用量でリバビリンで処置され、ウイルスに曝露した群

群４：８００μｇ／Ｌの水の用量でリバビリンで処置され、ウイルスに曝露した群

群５：１００μｇ／Ｌの水の用量でＰＡＣＡＰで処置され、ウイルスに曝露した群

群６：２００μｇ／Ｌの水の用量でＰＡＣＡＰで処置され、ウイルスに曝露した群

群７：リバビリン４００μｇ／Ｌ－ＰＡＣＡＰ　１００μｇ／Ｌの組合せで処置され、ウイルスに曝露した群

群８：リバビリン８００μｇ／Ｌ－ＰＡＣＡＰ　２００μｇ／Ｌの組合せで処置され、

ウイルスに曝露した群

【００８１】

チャレンジ実験のために十分なウイルスを得るために、ＳＨＫ－１細胞を培養し、株Ｇｌｅｓｖａｅｒ（アクセス番号ＡＪ０１２２８５，Ｋｒｏｓｓｏｙら（１９９９）Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　７３：２１３６－２１４２）で１７５ｃｍ^{2}フラスコにおいて５日間感染させた。

【００８２】

魚を、約１０^{4}ｐｆｕ／ｍＬのＩＳＡＶを含有する０．３ｍＬの培地を腹腔内に注射された魚と共同生活させてウイルスに曝露させた。群１：等体積の培地を受けた魚。群１（無処置で、ウイルスＩＳＡに曝露されていない）における死の％は４％であり、群２（ウイルス曝露され、無処置である）は９２％であった。群３及び４では、死はそれぞれ５２及び３６％であり、一方で群５及び６では、それぞれ６０及び７２％であった。ＰＡＣＡＰ－リバビリン組合せで処置された群７及び８では、死の％はそれぞれ８及び４％であった。死んだ魚の組織サンプルにおいて、ＩＳＡＶの存在が見出された。無処置で感染させてない群からのサンプルにおいては、ウイルスが検知されなかった。

【００８３】

例１０．ＰＡＣＡＰ及びＰＡＣＡＰ－アマンタジン組合せの投与のＩＨＮＶに実験的に感染したニジマス（Ｏ．ｍｙｋｉｓｓ）に対する効果

実験を、ＰＡＣＡＰ及びＰＡＣＡＰ－アマンチジン（ａｍａｎｔｉｄｉｎｅ）組合せの投与のＩＨＮＶに実験的に感染したニジマスにおける効果を評価するために行なった。８つの実験群を各々５０±５ｇの５０匹の魚で行ない、１０～１２℃で水中で維持した。

群１：ウイルスに曝露していない無処置の魚

群２：ウイルスに曝露した、無処置の魚

群３：４００μｇ／Ｌの水の用量でアマンタジンで処置され、ウイルスに曝露した群

群４：８００μｇ／Ｌの水の用量でアマンタジンで処置され、ウイルスに曝露した群

群５：１００μｇ／Ｌの水の用量でＰＡＣＡＰで処置され、ウイルスに曝露した群

群６：２００μｇ／Ｌの水の用量でＰＡＣＡＰで処置され、ウイルスに曝露した群

群７：組合せ１（アマンチジナ（ａｍａｎｔｉｄｉｎａ）４００μｇ／Ｌ－ＰＡＣＡＰ１００μｇ／Ｌ）で処置され、ウイルスに曝露した群

群８：組合せ２（アマンチジナ（ａｍａｎｔｉｄｉｎａ）８００μｇ／Ｌ－ＰＡＣＡＰ２００μｇ／Ｌ）で処置され、ウイルスに曝露した群

【００８４】

実験条件は前出の例で記載した実験と同様であった。魚を、２０Ｌの水の中の５．９×１０^{3}ｐｆｕ／ｍｌウイルスで通気を伴って１時間浸漬することにより、チャレンジさせた。実験の結果、２６％の生存度が無処置でＩＨＮＶで感染した魚において観察された。アマンタジンで処置されてＩＨＮＶに感染した魚では、生存度は４６％であった。ＰＡＣＡＰで処置されＩＨＮＶに感染した魚では、生存度は３６％であった。ＰＡＣＡＰ－アマンチジン（ａｍａｎｔｉｄｉｎｅ）組合せで処置された群では、生存度は９６～９８％であった。

【００８５】

例１１．ＰＡＣＡＰ及びＰＡＣＡＰ＋リバビリン組合せの投与の白点症候群（ＷＳＳＶ）のウイルスに実験的に感染した太平洋の白小エビ（Ｌｉｔｏｐｅｎａｅｕｓ　ｖａｎｎａｍｅｉ）に対する効果

実験を、ＰＡＣＡＰ及びＰＡＣＡＰ－リバビリン組合せの投与のＷＳＳＶに実験的に感染した太平洋白小エビＬｉｔｏｐｅｎａｅｕｓ　ｖａｎｎａｍｅｉに対する効果を評価するために行なった。４つの実験群を各々５±０．５ｇの５０匹の小エビから形成し、２８℃で海水中で維持した。

【００８６】

小エビには、日当たり２回、群当たりバイオマスの合計の８％と等価な量で食餌した。実験群は下記のとおりである：

群１：無処置、ウイルスＷＳＳＶに曝露されていない
群２：無処置、ウイルスＷＳＳＶに曝露した
群３：リバビリンで処置され、ウイルスＷＳＳＶに曝露した
群４：ＰＡＣＡＰで処置され、ウイルスＷＳＳＶに曝露した
群５：リバビリン－ＰＡＣＡＰ組合せで処置され、ウイルスＷＳＳＶに曝露した

【００８７】

単離及びウイルス拡散のために、Ｏｒｃｏｎｅｃｔｅｓ　ｌｉｍｏｓｕｓカニを使用した。ＷＳＳＶを、新鮮に抽出されたリンパから、Ｖａｎ　Ｈｕｌｔｅｎ　ｅｔ　ａｌｉｎ　２００１（Ｖａｎ　Ｈｕｌｔｅｎら（２００１）Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　２８５：２２８－３３）により記載されるようにショ糖勾配遠心分離によって精製した。

【００８８】

ウイルスサンプルは、使用まで－８０℃で貯蔵した。

【００８９】

ＷＳＳＶでの感染の自然経路を最小化させ、そして再現可能なプロトコールを達成するために、浸漬を実験的ウイルス感染を誘導するために使用した。ウイルス感染に先立ち、７５％の死を引き起こすために必要とされるウイルス力価及び量を決定した。それをするために、小エビを、異なる稀釈のウイルスで、７時間のインキュベーション期間の間実験的に感染させた。

【００９０】

ウイルス感染に続いて、小エビを、ウイルス非含有の海水で洗浄して、上記された実験群のデザイン従って新しいコンテナーに置いた。

【００９１】

処置は、感染後、週当たり３回で３０日間、（５００μｇ／Ｌの水の抗ウイルス剤）又は（５００μｇの抗ウイルス剤＋ＰＡＣＡＰ　２００μｇ／Ｌの水）の用量で投与した。ＰＡＣＡＰで処置された群については、使用した用量は２００μｇ／Ｌの水であった。群１及び２における小エビを、同じストレスの処置投与に供した。実験の３０日の間に各実験群における死がモニターされた。

【００９２】

群２（無処置、ウイルスに曝露された）における死の％は６０％であり、群１（無処置、ウイルスに曝露していない）における死の％は０％であり、群３（リバビリンで処置、ウイルスに曝露された）における死の％は１６％であり、一方でＰＡＣＡＰ処理群の死は２６％であった。ＰＡＣＡＰ－リバビリン組合せで処置された群では％死が２％であった。死んだ小エビの組織サンプルにおいては、ＷＳＳＶがＲＴ－ＰＣＲにより検出された。

【００９３】

例１２．ＰＡＣＡＰ及びＰＡＣＡＰ＋リバビリン組合せの投与のＩＰＮＶに実験的に感染した種Ｐｅｃｔｅｎ　ｍａｘｉｍｕｓのカキにおける効果

実験を、ＰＡＣＡＰ及びＰＡＣＡＰ－リバビリン組合せの投与のＩＰＮＶに実験的に感染した種Ｐｅｃｔｅｎ　ｍａｘｉｍｕｓのカキにおける効果を評価するために行なった。８つの実験群を各々３０個の成体カキで行ない、２５０Ｌのろ過した海水において１０℃で維持した。ウイルスは、実験の開始に先立って集められた肝膵臓サンプルにおいては検出されなかった。実験群は下記のとおりであった。

群１：無処置、ウイルスに曝露していない
群２：無処置、ウイルスに曝露した
群３：４００μｇ／Ｌの水の用量でリバビリンで処置され、ウイルスに曝露した群
群４：８００μｇ／Ｌの水の用量でリバビリンで処置され、ウイルスに曝露した群
群５：１００μｇ／Ｌの水の用量でＰＡＣＡＰで処置され、ウイルスに曝露した群
群６：２００μｇ／Ｌの水の用量でＰＡＣＡＰで処置され、ウイルスに曝露した群
群７：組合せ１（リバビリナ（ｒｉｂａｖｉｒｉｎａ）４００μｇ／Ｌ－ＰＡＣＡＰ１００μｇ／Ｌ）で処置され、ウイルスに曝露した群
群８：組合せ２（リバビリナ（ｒｉｂａｖｉｒｉｎａ）８００μｇ／Ｌ－ＰＡＣＡＰ

２００μｇ／Ｌ）で処置され、ウイルスに曝露した群

【００９４】

処置は、週当たり３回で２０日間行なった。カキは、１０^{7}ＴＣＩＤ５０ｍＬ$^{-1}$を含有する２５Ｌの水へ８０Ｌのタンクの中で曝露することによりチャレンジさせた。６時間後、水を１Ｌ／分の遅い流量で入れ替え、１２時間で流量を３Ｌ／分へと増加させた。

【００９５】

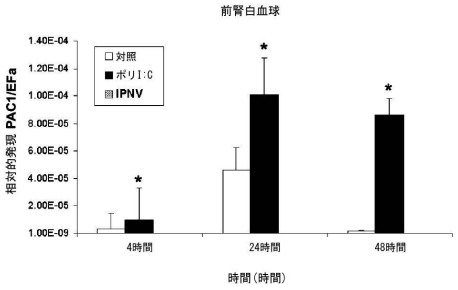
２週間後チャレンジ肝膵臓サンプルを採取し、ウイルス力価を決定した。結果は、リバビリン及びＰＡＣＡＰで処置された動物においてウイルス負荷の減少を示した。この減少は組合せで処置された群においてより大きかった（表３）。

【表３】

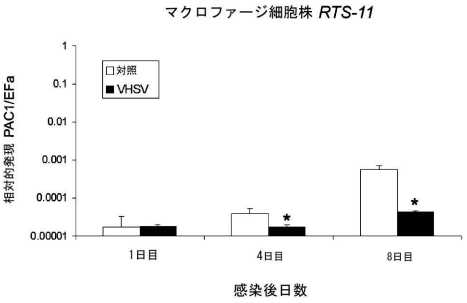
表３．チャレンジの２週間後のカキの肝膵臓におけるＩＰＮＶ平均ウイルス力価（$log_{10}TCID50\ g^{-1}$）。異なる文字は、有意な相違を表す。

群	ウイルス力価
1	0
2	8.1^{a}
3	5.4^{b}
4	4.3^{b}
5	6.5^{c}
6	5.8^{c}
7	2.0^{d}
8	1.5^{d}

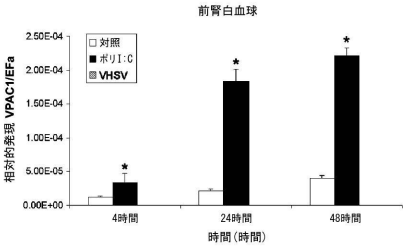
【図１】



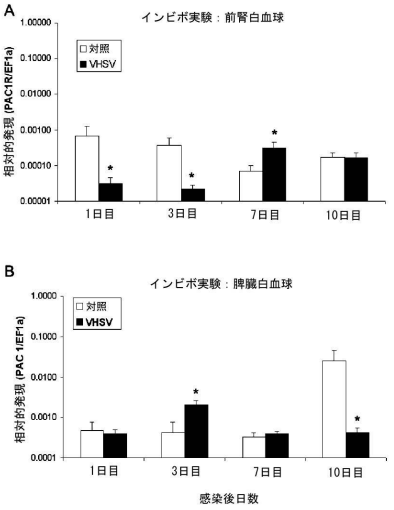
【図２】



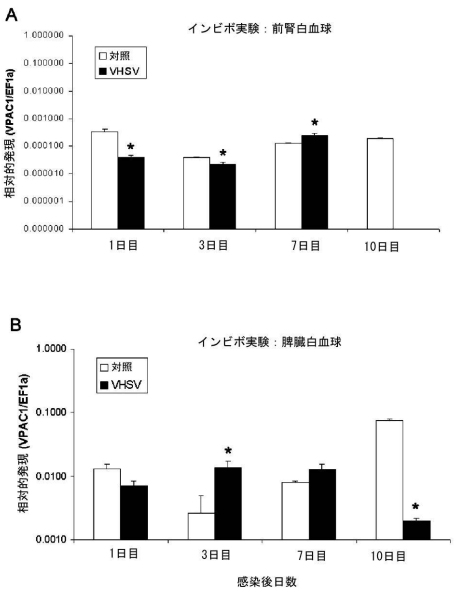
【図３】



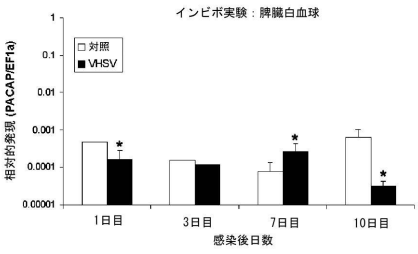
【図４】



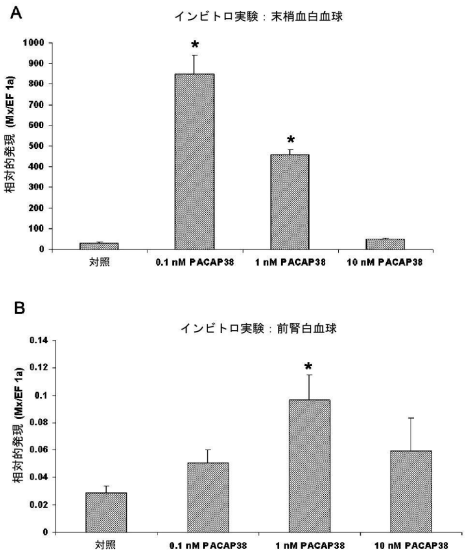
【図５】



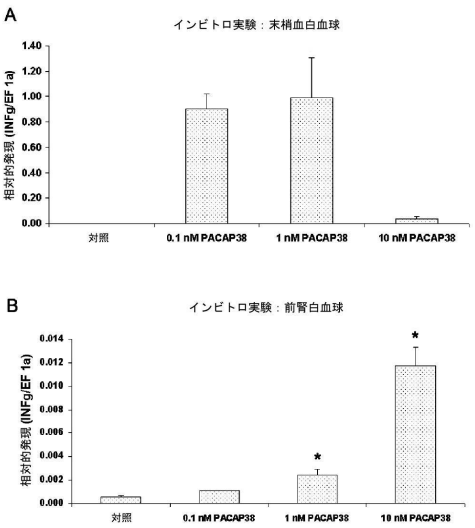
【図６】



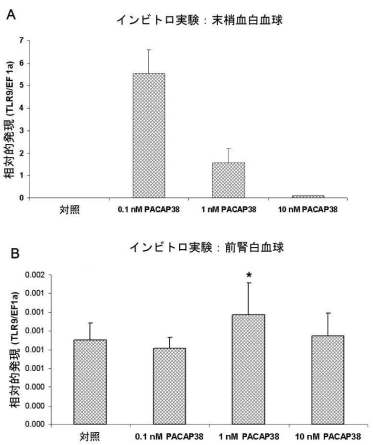
【図７】



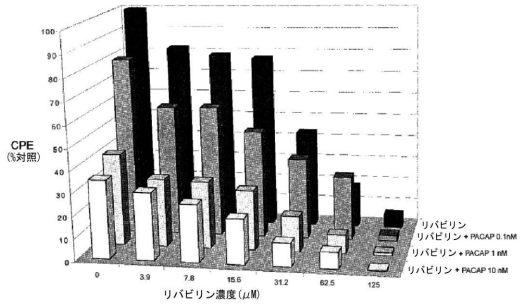
【図８】


A
インビトロ実験：末梢血白血球
相対的発現 (INFg/EF 1a)
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
対照
0.1 nM PACAP38
1 nM PACAP38
10 nM PACAP38
B
インビトロ実験：前腎白血球
相対的発現 (INFg/EF 1a)
0.014
0.012
0.010
0.008
0.006
0.004
0.002
0.000
*
*
対照
0.1 nM PACAP38
1 nM PACAP38
10 nM PACAP38

【図９】


A
インビトロ実験：末梢血白血球
相対的発現 (TLR9/EF 1a)
7
6
5
4
3
2
1
0
対照
0.1 nM PACAP38
1 nM PACAP38
10 nM PACAP38
B
インビトロ実験：前腎白血球
相対的発現 (TLR9/EF1a)
0.002
0.001
0.001
0.001
0.001
0.000
0.000
0.000
*
対照
0.1 nM PACAP38
1 nM PACAP38
10 nM PACAP38

【図１０】


CPE
(%対照)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
3.9
7.8
15.6
31.2
62.5
125
リバビリン濃度(μM)
リバビリン
リバビリン＋PACAP 0.1nM
リバビリン＋PACAP 1 nM
リバビリン＋PACAP 10 nM

フロントページの続き

(72)発明者 ルゴ ゴンザレス、フアナ、マリア
キューバ国、アルテミサ、グイラ デ メレナ、アヴェニダ ７５アー ヌメロ ８４０３、エントレ ８４ イ ８６
(72)発明者 カルピオ ゴンザレス、ヤミラ
キューバ国、ラ ハバナ、プラザ デ ラ レヴォルシオン、カジェ ８ ヌメロ ６６６、エントレ ２７ イ ザパタ、アパルトミエント １
(72)発明者 タファーラ ピネイロ、カロリーナ
スペイン国、マドリード、バヨ アー、モナステリオ デ シロス ２４．ポルタル イー

審査官 中尾 忍

(56)参考文献 特表２００９－５１６５２０（ＪＰ，Ａ）
LUGO, J.M. et al., Fish Shellfish Immunol., ２０１０年 9月, Vol.29, No.3, P.513-520
CARPIO, Y. et al., Fish Shellfish Immunol., ２００８年１０月, Vol.25, No.4, P.439-445
MARUYAMA, K. et al., Zool. Sci., ２００４年１２月２５日, Vol.21, No.12, P.1342
MOYA, J. et al., Antiviral Res., ２０００年１１月, Vol.48, No.2, P.125-130

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ ３８／２２
Ａ６１Ｋ ３１／７０５６
Ａ６１Ｋ ４５／００

ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）