

抗インフルエンザウイルス物質のスクリーニング法

清水当尚・藤本克郎・於勢真輔・吉村嘉男・宇野 準

大日本製薬中央研究所 (所長 筒井 清博士)

(昭和 38 年 6 月 8 日受付)

抗インフルエンザ剤のスクリーニング法の研究に当たり、著者等は確実で、操作が簡単であることと、比較的短時間に相当数の検体をスクリーニングし得ることに目的をおいた。

よく知られている如く、インフルエンザウイルス群は他の培養系に比して、孵化鶏卵漿尿膜で急速に、しかも効率よく増殖し、これまで孵化鶏卵漿尿膜を用いた抗インフルエンザ物質の研究は ACKERMANN 等¹⁻⁴⁾、TAMM 等⁵⁻¹⁰⁾、LIU 等¹¹⁾によつても報告されている。

漿尿膜を用いる方法としては、一定の大きさに漿尿膜を切り取つて用いる方法と、卵殻と共に全漿尿膜を用いる方法¹²⁾の2通りが考えられる。後者の方法は薬物のウイルス増殖抑制の機作の解析に好都合な方法と思われるが、操作が繁雑で、多数の検体につき検討を行なうスクリーニング法としては不適當である。むしろスクリーニングで振り落された物質の解析研究に適している。そこでスクリーニング法としては、前者の漿尿膜を切り取つて使用する方法を採用することにした。

培養法としては、ウイルス増殖の効率の良い振盪培養法を用いることとし、実験条件を検討した。

実験材料及び実験方法

漿尿膜の作製：15 日孵化鶏卵をアルコール綿にてよく拭い、滅菌した鉄で尖端部の卵殻の一部を切り取り、漿尿膜のみを残して胎児その他を取り除く。ついで直径 3.0 cm の円型に漿尿膜を卵殻と共に切り取る。1 コの卵より平均 3 枚得られる。ついで無菌生理食塩水でよく洗滌する。この漿尿膜を内径 1.8 cm の硬質ガラス試験管内に入れ、ウイルス及び検体を含んだ培養液 2 cc を加えゴム栓にて密栓する。以上の操作はすべて無菌的に行なう。

振盪培養法：漿尿膜及び培養液を含んだ試験管を 37°C の恒温槽中の振盪台に取り付け、垂直に 20°, 1 分間 93 回振盪で約 20 時間振盪を続ける。

ウイルス：孵化鶏卵継代 PR-8 株で、感染価 $10^{8.8} \sim 19^{9.3}$ EID₅₀/cc のものを使用した。

感染価の測定：試料をペニシリン 100 u/cc、硫酸ジヒドロストレプトマイシン 100 mcg/cc 及び 10% 馬血清を含むブイオンにて 10 倍段階希釈し、9~11 日孵化鶏卵の漿尿腔中に 0.2 cc 宛接種し、37°C 48 時間孵卵後

各漿尿液の鶏赤血球に対する凝集能の有無をしらべ、REED and MUENCH の方法¹³⁾により EID₅₀ を算出した。各希釈毎に 4 個の卵を用いた。

赤血球凝集価の測定：試料を 2.5% クエン酸ソーダ液 0.5 cc 中に 2 倍段階希釈し、0.25% 新鮮鶏血球の生理食塩水浮遊液 0.5 cc を加え、60~90 分間室温に放置後血球凝集の有無をしらべ、血球を凝集せしめる最高希釈倍数を求めた。

実験結果

I 培養液の検討

培養液を選定する目的で、YLE 液 (0.5% Lactalbumin hydrolysate, 及び 0.1% Yeast extract を含有する EARLE 氏液¹⁴⁾)、HANKS' 氏液¹⁵⁾、Phosphate buffered saline (PBS)¹⁶⁾、ブイオン及び生理食塩水を培養液とし、接種ウイルス量 2×10^{-3} 、20 時間振盪培養を行ない、各培養液中の赤血球凝集価を測定した。その結果を Table 1 に示した。

Table 1 に見られる如く、YLE 液及び HANKS' 氏液では良好なウイルス増殖を認めたが、PBS、ブイオン、生理食塩水では殆んどウイルス増殖を認めることが出来なかつた。

培養液はウイルス増殖に好適でなければならないが、スクリーニング法に使用するためには頻回調整が必要がある。そのため簡単に滅菌調整出来ること、緩衝能のあること、薬物の作用に拮抗する成分の少ないことが望ましい。これらの点及び Table 1 に示したウイルス増殖の結果より、適当な培養液として HANKS' 氏液を選定することにした。

Table 1 Effect of several kinds of media on the production of viral hemagglutinin.

| Medium | HA titer* | |
|--------|-------------------|-------------|
| | -log ₂ | final diln. |
| YLE | 6.5 | 90 |
| HANKS' | 6.0 | 64 |
| PBS | 1.0 | 2 |
| Broth | 0 | 0 |
| Saline | 0 | 0 |

* hemagglutinin titer

つぎにスクリーニングに於ては、各種試料の溶解法がしばしば問題となり、水に難溶な物質は適当な溶解剤を使用しなければならないので、予め溶解剤の影響を検討した。

通常よく使用される塩酸、苛性ソーダ、95% エチルアルコール、界面活性剤 Tween 80 及び Tween 80+苛性ソーダの影響を、培養液を HANKS' 氏液、接種ウイルス量を 2×10^{-3} の条件下で検討した。その結果を Table 2 に示した。

Table 2 の結果より、塩酸は 10^{-3} N、苛性ソーダは 8×10^{-3} N まで影響を認めないが、それ以上の濃度では赤血球凝集素の産生を阻害する。

即ち酸性よりアルカリ性の影響が少ない。このことはインフルエンザウイルスが酸性よりアルカリ性で安定¹⁷⁾であるためと考えられる。95% エチルアルコールは1%まで影響がない。Tween 80 はかなり強い影響を示し、0.01% 以上では全く赤血球凝集素の産生をみない。これは Tween 80 の漿尿膜に対する毒性が強いためと思われる。Tween 80+苛性ソーダでは Tween 80 0.01%、苛性ソーダ 2×10^{-3} N 以下の濃度では影響がない。水に難溶な検体をスクリーニングする場合は、Table 2 の結果より影響を及ぼさない濃度で溶解剤を使用しなければならない。

II 接種ウイルス量の検討

つぎに接種ウイルス量の適量を決める目的で HANKS' 氏液を培養液とし、数段階に希釈したウイルス液を接種して振盪培養後、培養液中の赤血球凝集価を測定した。その結果を Table 3 に示した。

接種ウイルス量が多い程培養後産生される赤血球凝集価は大である。しかし抗ウイルス効果を検討するためには接種ウイルス量は少ないことが望ましい。又多量のウイルスを接種した場合は、培養後も接種ウイルスがそのまま不活化されずに残存する可能性がある。従つて出来るだけ少い接種量で、しかもかなりの赤血球凝集素の産生を示す量が適量である。Table 3 の結果より 2×10^{-3} ウイルス量が適当と考えられ、接種ウイルス量としてこの濃度を選定することにした。

III 漿尿膜の枚数の検討

漿尿膜の枚数による影響を検討すべく、漿尿膜を1枚から5枚まで使用し、培養液を HANKS' 氏液、ウイルス接種量を 2×10^{-3} として振盪培養し、産生される赤血球凝集価を測定した。同一実験を5回繰返しウイルス増

Table 2 Effect of several kinds of solvents on the production of viral hemagglutinin

| HCl | Conc. (N) HA titer* | 5×10^{-3} | 4×10^{-3} | 3×10^{-3} | 2×10^{-3} | 1×10^{-3} | — |
|-----------------|---|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-----|
| | | 0.5 | 2.0 | 2.5 | 3.5 | 4.5 | 5.0 |
| NaOH | Conc. (N) HA titer* | 10×10^{-3} | 8×10^{-3} | 7×10^{-3} | 5×10^{-3} | 2×10^{-3} | — |
| | | 0 | 5.5 | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 |
| Ethanol** | Conc. (V/V %) HA titer* | 2 | 1 | 0.5 | | | — |
| | | 3.0 | 6.0 | 5.5 | | | 6.0 |
| Tween 80 | Conc. (V/V %) HA titer* | 0.08 | 0.05 | 0.03 | 0.01 | 0.005 | — |
| | | 0 | 0 | 0 | 4.5 | 5.5 | 6.0 |
| NaOH + Tween 80 | NaOH (N) Tween 80 (V/V %) HA titer* | 2×10^{-3} | 2×10^{-3} | 2×10^{-3} | 2×10^{-3} | 2×10^{-3} | — |
| | | 0.08 | 0.05 | 0.03 | 0.01 | 0.005 | — |
| | | 0 | 0 | 0 | 5.5 | 5.5 | 6.0 |

* hemagglutinin titer ($-\log_2$)

** 95% ethanol

Table 3 Effect of various inocula of the virus on the production of viral hemagglutinin

| Virus diln. | HA titer* | |
|--------------------|-----------|-------------|
| | $-\log_2$ | final diln. |
| 10^{-1} | 9.0 | 512 |
| 10^{-2} | 8.0 | 256 |
| 5×10^{-3} | 6.5 | 90 |
| 2×10^{-3} | 6.0 | 64 |
| 10^{-3} | 4.0 | 16 |
| 5×10^{-4} | 4.0 | 16 |
| 2×10^{-4} | 3.0 | 8 |
| 10^{-4} | 2.0 | 4 |

* hemagglutinin titer

殖に及ぼす宿主組織量の影響を検討した。その結果を Table 4 に示した。

漿尿膜が1枚から3枚までは、枚数が増すにつれて産生されるウイルス量も増加するが、その増加の割合は僅かである。3枚以上では枚数が増加してもウイルス量は殆んど増加しない。従つて操作の繁雑さ及び原料の節約の点から考えて、1枚の漿尿膜で充分である。

以上の実験結果より、スクリーニング法として適当な培養液、接種ウイルス量及び漿尿膜量を選定することが出来た。

IV 同一実験内の誤差の検討

スクリーニングされた検体の抗ウイルス効果は、培養後対照のウイルス増殖に比較し、有意に増殖を抑制したか否かを吟味することにより判定する。この判定規準を定めるためには、同一スクリーニング内の誤差を検討し

Table 4 Effect of the amounts of host tissue on the production of viral hemagglutinin

| Exp. No. | Number of membrane piece HA titer* | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | |
|----------|---------------------------------------|-------------------|-------------|-------------------|-------------|-------------------|-------------|-------------------|-------------|-------------------|-------------|
| | | -log ₂ | final diln. |
| 1 | | 6.0 | 64 | 7.0 | 128 | 8.0 | 256 | 6.0 | 64 | 7.0 | 128 |
| 2 | | 6.0 | 64 | 6.5 | 90 | 7.0 | 128 | 7.0 | 128 | 7.5 | 181 |
| 3 | | 6.0 | 64 | 6.0 | 64 | 7.5 | 181 | 8.0 | 256 | 8.0 | 256 |
| 4 | | 7.0 | 128 | 8.5 | 362 | 8.5 | 362 | 9.0 | 512 | 8.0 | 256 |
| 5 | | 8.0 | 256 | 7.0 | 128 | 8.0 | 256 | 8.0 | 256 | 8.0 | 256 |
| mean | | 6.6 | 97 | 7.0 | 128 | 7.8 | 223 | 7.6 | 194 | 7.7 | 208 |

* hemagglutinin titer

Table 5 Variation in same experiments

| Tube No. | HA titer* | |
|--------------|-------------------|-------------|
| | -log ₂ | final diln. |
| 1 | 7.0 | 128 |
| 2 | 7.0 | 128 |
| 3 | 7.0 | 128 |
| 4 | 7.0 | 128 |
| 5 | 7.0 | 128 |
| 6 | 7.0 | 128 |
| 7 | 7.0 | 128 |
| 8 | 8.0 | 256 |
| 9 | 6.0 | 64 |
| 10 | 6.5 | 90 |
| mean ± S. D. | 6.95 ± 0.497 | 123 ± 14.1 |

* hemagglutinin titer

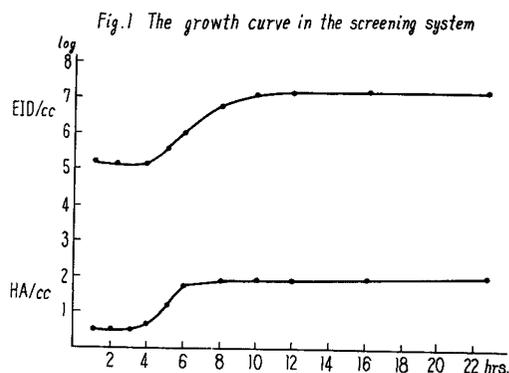
なければならない。この目的のために、培養液 HANKS' 氏液、接種ウイルス量 2×10^{-8} を用い、同一実験条件下で 10 本の培養試験管を使用し、振盪培養後各ウイルス量を測定し、その結果より同一実験内に於ける誤差の範囲をしらべた。その結果を Table 5 に示した。

Table 5 に見られる如く、同一実験内では培養後のウイルス量が 4 倍以上、希釈管数にして 2 管以上の差があれば有意の差と判定し得る。従つてスクリーニングの結果、検体を加えた場合のウイルス量が、対照のウイルス量に比し 4 倍以上少なければ有意にウイルス増殖を抑制したものと考へ得る。

V 増殖曲線の検討

上記培養法に於けるウイルスの増殖曲線をしらべた。即ち HANKS' 氏液を培養液とし、 2×10^{-8} のウイルス量を漿尿膜 1 枚に加えて振盪培養した場合の培養液中のウイルス量を経時的に測定した。その結果を Fig. 1 に示した。

Fig. 1 に見られる如く、培養液中には 4~5 時間目頃よりウイルス量の増加が認められる。又検出されたウイ



ルスの感染価と赤血球凝集価の比 (EID_{50}/HA) は約 5 であり、不完全ウイルスの生成は少く、先づ正常な増殖様式を示すものと考えられる。

VI 検体の漿尿膜に及ぼす毒性の検討

スクリーニングの赤血球凝集価が対照に比し有意に低い場合、その検体が抗ウイルス効果を有するか否かを判定するには、宿主組織たる漿尿膜に対する毒性をしらべなければならない。即ち毒性を示さない濃度で、有意にウイルス増殖を抑制した場合に抗ウイルス効果を示したと考へ得る。

漿尿膜に対する薬剤の毒性の検討には、従来肉眼的所見¹⁰⁾によるか、又はワールブルグ検圧計による酸素吸収の量をしらべるか¹¹⁾のいずれかであった。肉眼的所見は誤差が大きく、しかも各々の検体が同様な形態学的変化を与えるとは限らない。又酸素吸収量の測定は、比較的確実に毒性の有無を知り得るが、多数の検体について行なうスクリーニング法としては実験手技の繁雑さから考へて適当な方法ではない。

そこで種々検討を行なつた結果、トリパン青染色による方法を考案し、この方法により簡単に、しかも確実に漿尿膜に対する毒性の有無を判定することに成功した。即ち 2% トリパン青液 (蒸留水に溶解後 1,500 rpm 10

Table 6 The relationship between stain with trypanblue and oxygen uptake

| Exp. No. | Substance | Conc. (M) | Stain with trypanblue | O ₂ -uptake (2 hrs.) (mL) |
|----------|-----------------------------------|------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| I | 1 phenyl 3 amino pyrazoline | 10 ⁻³ | ± | 20.6 |
| | | 10 ⁻⁴ | — | 53.6 |
| | | — | — | 55.2 |
| II | " | 10 ⁻³ | + | 6.3 |
| | | 10 ⁻⁴ | ± | 22.3 |
| | | — | — | 51.1 |

Exp. I: O₂-uptake was measured in HANKS' solution (omitted NaHCO₃) containing various concentrations of the substance.

Exp. II: After 20 hrs. shaking culture containing various concentrations of the substance, O₂-uptake was measured in HANKS' solution (omitted NaHCO₃) without the substance.

分間遠漬した上清)を生理食塩水で3倍に希釈し、これに検討すべき漿尿膜を入れ、1分間よく振盪後生理食塩水で十分に洗滌する。正常な漿尿膜はトリパン青で染色されないが、毒性を示した漿尿膜はその程度に応じて青く染色される。

この方法による染色性とワールブルグ検圧計による酸素吸収量との関係をしらべた。その結果を Table 6 に示した。

Table 6に見られる如く、トリパン青で+に染色された漿尿膜は殆んど酸素吸収が見られない。±に染色されたものは対照に比較して約1/2の吸収量である。トリパン青に殆んど染色されない—のものは対照と同程度の吸収量を示す。即ちトリパン青による染色の度合は、酸素吸収量と大体比例する。

この方法は簡単でしかも明瞭に毒性の有無をしらべることが出来、スクリーニングに適した方法と云えよう。

総 括

抗インフルエンザ剤の検索を目的としたスクリーニング法を確立するために、2, 3の基礎的実験を行なった。培養法としては孵化鶏卵の漿尿膜を用いる振盪培養法を採用し、この系に於ける培養液、接種ウイルス量、宿主組織量、効果判定基準、検体の毒性の検討法、等につき詳細なる検討を加えた。

その結果、培養液としては HANKS' 氏液、接種ウイルス量としてはインフルエンザウイルス感染漿尿液の 2×10^{-8} 、宿主組織量としては15日卵から直径3cmの円型に切り取った漿尿膜が適当であること、検体の漿尿

膜に対する毒性の検討には著者等の考案したトリパン青染色法が正確でしかも簡単であることを明らかにし、毒性を示さない濃度で培養後4倍以上のウイルス増殖の抑制がみられる場合は抗インフルエンザウイルス効果を有すると判定し得ることを実験的に証明した。以上の結果よりこの方法はインフルエンザウイルスに対するスクリーニング法として使用され得る方法と云えよう。

終りに、御懇篤なる御教示、御鞭達を賜つた京都大学薬学部 鈴木友二教授に深謝するとともに、御激励、御助言を頂いた大日本製薬中央研究所長 筒井清博士に感謝致します。又御助言下された加納晴三郎博士並びに熱心に実験に協力下された当研究所 中西 功氏に謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) ACKERMANN, W. W.: J. Exptl. Med. 93: 337, 1951.
- 2) ACKERMANN, W. W.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 80: 362, 1952.
- 3) ACKERMANN, W. W. & JOHNSON, R. B.: J. Exptl. Med. 97: 315, 1953.
- 4) ACKERMANN, W. W. & MASSAB, H. F.: J. Exptl. Med. 99: 105, 1954.
- 5) TAMM, I., FOLKERS, K. & HORSFALL, F. L.: J. Exptl. Med. 98: 219, 1953.
- 6) TAMM, I., FOLKERS, K. & HORSFALL, F. L.: J. Exptl. Med. 98: 229, 1953.
- 7) TAMM, I., FOLKERS, K., SHUNK, C. H., HEYL, D. & HORSFALL, F. L.: J. Exptl. Med. 98: 245, 1953.
- 8) TAMM, I., FOLKERS, K., SHUNK, C. H. & HORSFALL, F. L.: J. Exptl. Med. 99: 227, 1954.
- 9) TAMM, I. & TYRELL, D. A. J.: J. Exptl. Med. 100: 541, 1954.
- 10) TAMM, I., BARLANIAN, R., NAMES, M. M., SHUNK, C. H. & ROBINSON, F. M.: J. Exptl. Med. 113: 625, 1961.
- 11) LIU, O. C., MALSBERGER, R. G., CARTER, J. E., DESANCTIS, A. N., WIENER, F. P. & HAMPIL: J. Immunol. 78: 214, 1957.
- 12) BERNKOFF, H.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 72: 680, 1949.
- 13) REED, L. T. & MUENCH, H.: Am. J. Hyg. 27: 493, 1938.
- 14) EARLE, W. R.: J. Natl. Cancer Inst. 4: 165, 1943.
- 15) WELLER, T. H., ENDERS, J. F., ROBBINS, F. C. & STODDARD, H. B.: J. Immunol. 69: 645, 1952.
- 16) DULBECCO, R. & VOGT, M.: J. Exptl. Med. 99: 167, 1953.
- 17) MILLER, G. L.: J. Exptl. Med. 80: 507, 1944.