

## 化学療法的活性をもつ生体成分の研究. I

## Antivirin 培養細胞の生産する新しい抗ウィルス性物質について

豊島 滋・瀬戸 淑子  
高奥 昌子・藤田 晴久  
慶応大学薬化学研究所生物薬品化学研究室

(昭和 42 年 1 月 31 日受付)

長野<sup>1)</sup>及び ISAACS<sup>2)</sup>による Interferon 及び Interferon 様ウィルス阻止物質の発見以来、ウィルスを細胞に感染させるか、或いはまた、異種核酸とか、菌体内毒素または Statolon のような多糖類系抗生物質を与えるといったようなウィルス阻止因子誘発作用をもつ物質の刺激により Interferon または Interferon 様物質を生産しようとする試みは数多く行なわれて来た<sup>3)</sup>。我々は Interferon の研究の途中において、ウィルスを感染させない細胞培養液中にもウィルスのブラック発現を阻止する物質の存在することを見出して、1962 年日本ウィルス学会において、報告した<sup>4)</sup>。我々より 1 年おくれて、ソ連においても TSILINSKY 及びその研究者達<sup>5)</sup>はウィルスを感染していない細胞培養液中にウィルス増殖阻止作用を有する物質の存在することを報告した。

TSILINSKY らの報告した物質はその調整した諸条件が比較的我々の調整条件と類似しているが、得た阻止物質は我々の物質より熱安定性が遙かに乏しく、また Trypsin など蛋白質分解酵素で簡単に失活される点よりみて単純蛋白質の性格が我々の阻止物質より強いものと思われる。

我々は細胞が、ただ培養細胞のみでなく、一般にその置かれた条件下で化学療法的活性をもつ各種の物質を生産するものであると考えている。その化学療法的活性はただ、ウィルスに対する抑制効果に留らず、もつと幅広いものであるとも考えている。我々はそのような物質の中で培養細胞より生産される抗ウィルス性物質を Antivirin と名付けた (以下 AV と略す)。

この報告は AV の教種の動物ウィルスに対する抑制効果に関するものである。

## 実験材料及び方法

培養細胞：この実験に用いたのは主として Hep. No. 2 細胞で、この細胞は New York の Sloan Kettering 癌研究所の C. SOUTHAM 博士より送られ、我々の研究室で保持されているものである。増殖培地には 15% 牛血清加 Y. L. A. 培地<sup>6)</sup>を用い、維持培地には 5% 牛血清加 Y. L. A. 培地を用いた。

ウィルス材料：実験に用いたウィルスは、Polio 1 型

MAHONEY 株、2 型 MEF<sub>1</sub> 株、3 型 SAUKETT 株、ECHO-28 型ウィルスの内、GL-2060 株、K-779 株と K-2211 株、Rhino ウィルスの B-632 株、Vaccinia ウィルスの DV-96 株と Adeno ウィルスの 1 型である。Adeno ウィルスの培養のための維持培地には 5% 馬血清加 Y. L. A. を用いたが、それ以外のウィルスの培養には 5% 牛血清加 Y. L. A. を使用した。ECHO-28 型ウィルス及び Rhino ウィルスの培養は 33°C において回転培養法を用いて行なつた。

ウィルス量の測定はブラック測定による PFU の決定と細胞変性効果を観測して TCID<sub>50</sub> を決定する 2 つの方法を用いた。ブラック測定のための寒天上層培地は 10% 牛血清加 2 倍 Y. L. A. を基礎培地として精製 Difco 寒天の 2.2% 液を等量に混合し、更に中性赤を終末濃度 30,000 倍に加えたものを寒天上層培地とした。

粗 Antivirin の調製：実験に用いた粗 AV は次のようにして調整した。25 万/cc の Hep. No. 2 細胞を 25 cc/培養瓶の割合で加え、37°C 4 日間培養する。

細胞は培養瓶のガラス壁一面に単層細胞層を形成している。増殖培地を取り去り、pH 7.4 の Phosphate Buffered Saline (PBS)<sup>6)</sup>で 3 回細胞を洗つてから、AV 生産のための維持培地として 0.8% Polyvinylpyrrolidone (PVP) 加 EAGLE 培地の培地を 25 cc 加える。37°C 10 日間放置したのち、培養液を集め、3,000 r.p.m. 20 分遠心して上清を集める。この上清をセロハンバッグに入れ、Carbowax 6000 により 10 倍に濃縮し、更にこの濃縮液を蒸溜水に対し透析し低分子成分を除去し、ミリポアー濾過により滅菌してから pH を 7.2 に再調整したものを粗 AV として実験に使用した。

個々の実験操作はそれぞれの部分で記述する。

## 実験結果

## 1. 数種の動物ウィルスの増殖に対する Antivirin の抑制効果

始めて我々が AV の存在に気付いた時、我々はその測定系として Polio-1 型 MAHONEY 株~FL 細胞系を用いた。次いで我々は AV の Polio 各型ウィルスに対する抑制効果を検討したが、AV は Polio の 1 型、2 型及

び3型のいずれに対しても殆んど全く同程度に抑制効果を示すことが見出された。このことは、AVの抗ウイルス効果は sero-type に無関係なもので、相当幅広い抗ウイルススペクトルをもつのではないかと考えさせるものであった。

そこで、我々は以下に記すような数種の動物ウイルスの増殖に対するAVの効果を検討した。

実験の結果を表1に示す。

20万/ccの細胞浮遊液を1.0ccずつ培養試験管に加えて、37°C 3日~4日間培養したのち、増殖培地をぬきとり、P. B. S. で洗ったのち、表に示したウイルスを表に示したような m.o.i. (multiplicity of infectivity) で試験管内に加える。Vaccinia ウイルスの場合は37°C 3時間、Adeno ウイルスの場合には37°C 6時間、Rhino ウイルスと ECHO-28 型ウイルスの場合は33°C 1時間、Polio ウイルスの場合は37°C 1時間、それぞれウイルスを細胞に吸着せしめたのち、未吸着ウイルスを完全に洗い去り、AV 0.3 cc と維持培地 0.7 cc の混液を加える。

対照群に対してはAVの代わりに0.3ccのP. B. S. を用いた。ECHO-28 型ウイルスと Rhino ウイルスを除いては37°C 23時間、上記2つのウイルスは33°C で23時間培養し、細胞内の感染性ウイルス量をPFU または TCID<sub>50</sub> の測定により求めた。阻止パーセントは

$$\left( \frac{\text{対照のウイルス量} - \text{AV投与群のウイルス量}}{\text{対照のウイルス量}} \right) \times 100$$

により求めた。

表1で明かなように、AVは sero-type に関係なく、かつまたRNA系ウイルスとDNA系ウイルスのいずれに対しても明かな抑制効果を示している。

## 2. Antivirin による細胞内ウイルス増殖の抑制

次に問題となるのはAVはウイルスの細胞内増殖のどのステップを阻害するのであろうかと言う問題である。まづ考えられる点は、(1) AVがウイルスの宿主細胞への吸着を阻害し、その結果ウイルスの細胞内増殖を抑制する。(2) AVは細胞内のウイルス再生のどこかのステップを阻止し、その結果ウイルスの細胞内増殖を抑制する。(3) AVは宿主細胞からのウイルスの游出を阻止し、その結果ウイルスの細胞内増殖を抑制すると言うことである。これらの点の内どこがAVの作用部位として考えられうるものであるかを明かにするため次の実験を

表1 Antivirin の投与による数種のウイルスの増殖阻止

用いられたウイルス材料		24時間の細胞内ウイルス量			
		接種されたウイルス量 (m. o. i.)	PFU/ml または TCID <sub>50</sub> /ml		阻止パーセント (%)
種類及び型と株	対照		AV投与群		
Polio	1型 MAHONEY	0.4	3×10 <sup>6</sup>	3×10 <sup>4</sup>	99
	2型 MEF <sub>1</sub>	0.3	5.3×10 <sup>5</sup>	2.6×10 <sup>4</sup>	94
	3型 SAUKETT	0.3	1.1×10 <sup>6</sup>	1.5×10 <sup>5</sup>	86
	1型 MAHONEY	3.0	1×10 <sup>7</sup>	1×10 <sup>7</sup>	0
ECHO-28	GL-2060	0.4	10 <sup>2.5</sup>	<10 <sup>*</sup>	>99
	K-779	0.4	10 <sup>1.5</sup>	<10 <sup>°</sup>	>99
	K-2211	0.2	1.2×10 <sup>4</sup>	4×10 <sup>3</sup>	66
Rhino	B-632	0.4	10 <sup>2.5</sup>	<10 <sup>°</sup>	>99
Vaccinia	DV-96	0.6	10 <sup>4.5</sup>	10 <sup>2.5</sup>	99
		6.5	10 <sup>5.5</sup>	10 <sup>5.5</sup>	0
Adeno	1型	0.5	10 <sup>3.5</sup>	10 <sup>1.5</sup>	99

\* 稀釈しない細胞凍結融解原液でも細胞変性効果をおこさない。

表2 Polio 1型 MAHONEY 株ウイルスの Hep. No. 2 細胞への吸着に対する Antivirin の影響

群	接種されたウイルス量 (全 PFU)	未吸着ウイルス量 (全 PFU)	吸着ウイルス量 (全 PFU)	吸着パーセント (%)
対照	7.0×10 <sup>5</sup>	4.48×10 <sup>4</sup>	6.65×10 <sup>5</sup>	93.6
AV 群	7.0×10 <sup>5</sup>	5.32×10 <sup>4</sup>	6.46×10 <sup>5</sup>	92.4

行なつた。

### (A) ウィルス吸着に対する影響

Hep. No. 2 細胞の単層培養の成立した試験管に Polio 1型 MAHONEY 株を m. o. i. が1となるように稀釈してそれぞれの群に加える。AV 処理群ではこのウイルス稀釈液に0.3ccのAV液を加えて1試験管あたりの接種ウイルス液量を1.0ccとなるようにし、対照群ではAVの代わりにPBSを0.3cc加える。37°C 60分置いたのち、細胞外液をとり、PBSで3回洗い、洗液と細胞外液との混合の全PFUを測定し、これを未吸着ウイルス量とする。接種ウイルス量から未吸着ウイルス量を差引いたものが吸着ウイルス量である。実験の結果を表2に示す。

上の表で示されるように、AVを加えても加えなくとも接種ウイルスの90%以上が宿主細胞によつて吸着され、AVがウイルス吸着に作用することはまづないものと言える。

### (B) 宿主細胞よりのウイルス游出に対する作用

次に細胞よりのウイルス游出に対する効果を検討した。

表3 Polio 1 型 MAHONEY 株の Hep. No. 2 細胞よりの遊出に対する Antivirin の作用

群	細胞内ウイルス量		細胞外に遊出したウイルス量	
	全 PFU	阻止パーセント (%)	全 PFU	阻止パーセント (%)
対 照	$1.81 \times 10^4$		$1.20 \times 10^4$	
AV 群	$1.31 \times 10^4$	27.6	$2.63 \times 10^8$	78.3

単層培養の成立した Hep. No. 2 細胞に m. o. i. を 0.1 として Polio 1 型 MAHONEY 株を接種し、37°C 60 分吸着させ、未吸着ウイルスを洗い去つたのち、新しい維持培地を加え更に培養をつづける。ウイルス接種後 4.5 時間目で細胞外液をすてて、PBS で 3 回洗つたのち、AV 群では AV 0.3 cc 含有維持培地を 1.0 cc、対照群では AV の代りに PBS を 0.3 cc 加えた。維持培地 1.0 cc を加え 30 分 37°C 培養し、対照群と AV 群の遊出ウイルス量と細胞内ウイルス量を測定した。

表3に見られるように、ウイルス接種後 4.5 時間から 5 時間の 30 分間 AV を培養液に加えると、ウイルスの細胞よりの遊出は 78.3% 阻止される。同時にその時の細胞内ウイルスを測定すると対照群と AV 処理群の細胞内ウイルス量には有意の差を認めないから、この遊出の抑制は細胞内ウイルスの減少の二次的反應の結果ではないものと思われる。ただ、この AV によるウイルス遊出の抑制が AV 作用の本体と考えるには余りに微弱なものである。

以上の2点が AV 作用の本質ではないと考えると、ウイルス再生機構に対する AV 作用の検討が重要な問題として浮び上がる。

#### (C) ウィルス再生初期過程に対する Antivirin の作用

実験は2群に分けて行なつた。Hep. No. 2 細胞の単層培養の成立した培養試験管に Polio 1 型 MAHONEY 株を m. o. i. を 0.1 で接種して、これを 37°C 60 分吸着させたのち、未吸着ウイルスをとりのぞく。対照群では PBS 0.3 cc を加えた維持培地 1.0 cc を試験管に加える。AV 処理群は2つに分ける。第1群はウイルス接種後1時間より3時間目までの2時間 AV を加えたのち、洗い去り新鮮な維持培地を加えてウイルス接種後6時間目に細胞内及び細胞外ウイルスを定量する。第2群はウイルス接種後3時間までは対照群と同じように処理し、3時間目に AV を加えてそのまま6時間目まで培養して第1群と同じようにウイルスを定量する。この実験で、第1群ではウイルス侵入後からウイルス RNA とウイルスタンパク質の合成を終り RNA とタンパク質の結合を開始するあたりまで AV を作用させたことになり、

表4 Polio 1 型 MAHONEY 株の Hep. No. 2 細胞での再生に対する Antivirin の影響

群	細胞内ウイルス量		細胞外ウイルス量	
	全 PFU	阻止パーセント (%)	全 PFU	阻止パーセント (%)
対 照	$1.33 \times 10^6$		$6.63 \times 10^8$	
AV 処理群	1	$1.22 \times 10^8$	99.0	0*
	2	$1.98 \times 10^4$	84.1	$6.0 \times 10^2$
				99 以上 90.9

\* 稀釈しない原液を接種してブラックの発現をみとめない。

第2群ではウイルス構成成分の集合から感染ウイルス粒子の完成に至る期間 AV を作用させたことになる。

実験の結果を表4に示す。

表4で明かなように、第1群ではウイルス接種後6時間目にウイルス量を定量すると、細胞内と細胞外のいずれのウイルス量も 90% 以上の抑制を示している。これに対して、第2群においては 84% の細胞内ウイルス生産の抑制である。この抑制度は推計学的に有意であるが、第1群の抑制度に比してその抑制は格段に低いものである。

#### 考 察

我々がはじめて AV の存在について報告した時、我々はブラック形成の抑制を指標として研究を進めて来たが、今回の実験の結果で、明かに AV の作用はウイルス増殖の抑制がその作用の本質的なものであることが示されたと言えよう。BALTIMORE ら<sup>7)</sup>によれば、Polio ウィルスは HeLa 細胞において、感染後 60 分以内に RNA 合成を開始し、その RNA は 2 時間までは Polyribosome には見出されるけれどもウイルスの中にはとり込まれず、2.5 時間後に始めて RNA はウイルス粒子の中にくみ込まれ始める。そして、4 時間近くなると合成された RNA の 20% がウイルス中にあると言われている。今回我々の用いた実験条件では、ウイルス接種後1時間目から2時間 AV を作用させた場合に最も明かな阻止効果を得たと言うことは、AV の作用部位がウイルス再生の初期～即ちウイルス核酸とウイルスタンパク質の合成のはじまりからこれら2つのウイルス構成因子のむすびつきまでの過程にあることを示唆している。

今回の実験で示されたように AV の抗ウイルススペクトルは RNA ウィルスと DNA ウィルスの区別なく、また血清学的分類にも関係なく至つて幅広いものである。我々が今回とり上げたウィルスの種類は或る限られた範囲のものであり、実際の病原性動物ウィルスの数はもつともつと多いものである。しかし、今回我々の得た結果から AV がまだ検討していない多くのウィルスにも作用

しうる可能性のあることは理解しうられる。

AV の各種ウィルス感染に対する化学療法的検討は今後更に進めて行きたいと考えている。

#### 要 約

AV の抗ウィルススペクトルを下記のウィルスを用いて検討した。Polio 1, 2 及び 3 型, ECHO-28 型, Rhino, Vaccinia 及び Adeno ウィルス。これらウィルスの宿主細胞への侵入後 AV を加えると著明なウィルス増殖の抑制を来し, その効果は血清学的分類や RNA 系または DNA 系ウィルスの区別なく認められる。AV のウィルスの増殖抑制効果の本質は, 細胞内ウィルス再生機構の初期過程の抑制である。

#### 引用文献

- 1) NAGANO, Y., & KOJIMA, Y.: Pouvoir immunisant du virus vaccinal inactivé par des rayons ultraviolets. *Compt. Rend. Soc. de Biol.* 148 : 1700~1702 (1954)
- 2) ISAACS, A. & LINDENMANN · Virus interference. I Interferon. *Proc. Roy. Soc., London, s. B.* 147 : 258~267 (1957)
- 3) HO, M.: Interferons. *New England J.* 266, 1258~1264 (1962)
- 4) 秋浜澄行, 豊島 滋, 上田武雄 ウィルス非感染細胞培養液中に呈出されるウィルス増殖阻止因子について。ウィルス 13, 42 (1962)
- 5) TSILINSKY, Y. Y.: Inhibitors of viral activity from uninfected culture of stable cell lines. *Act. Virol.* 7, 350~360 (1963)
- 6) 国立予防衛生研究所学友会編: ウィルス実験学 p. 121 (1964)
- 7) BALTIMORE, D., GIRARD, M. & DARNELL, J.: Aspect of the synthesis of poliovirus RNA and the formation of virus particles. *Virology*, 29, 179~189 (1966)

## STUDIES ON THE HIGH MOLECULAR SUBSTANCES POSSESSING CHEMOTHERAPEUTIC ACTIVITY. I

Antivirin, a New Antiviral Inhibitor Produced from Cultured Cells in the Absence of Viral Infection

SHIGESHI TOYOSHIMA, YOSHIKO SETO, MASAKO TAKAOKU  
& HARUHISA FUJITA

Division of Biochemical Pharmacology, Pharmaceutical Institute, Keio Gijuku University

The antiviral spectrum of antivirin, a new antiviral inhibitor produced from cultured cell lines in the absence of such Interferon inducers as viral infection, foreign nucleic acid, bacterial endotoxin and polysaccharides like Statolon was investigated. Antivirin was inhibitory on the intracellular multiplication of polio (types 1, 2 and 3), echo-28, rhino, vaccinia and adeno viruses. The site of action of antivirin was considered to be the inhibition of the replicative step of the intracellular multiplication of susceptible viruses.