

化学療法的活性をもつ生体成分の研究. II

Antivirin の生産条件と力価測定

豊島 滋・瀬戸 淑子・戸根木 尚子

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)

Antivirin (以下 AV と略す)は、前報^{1,2)}において報告したように、Interferon 誘導因子を全く加えることなく培養細胞を維持することによつて生産される抗ウイルス活性物質である。われわれの報告以前には AV のようなウイルス増殖阻止因子についての記述はなく、わずかにわれわれの報告より 1 年おくれて、TSILINSKY が類似の抗ウイルス性高分子物質を報告しているにすぎない³⁾。今回は、AV の生産の諸条件と、その力価測定についての検討の結果を報告する。

実験材料および方法

培養細胞：以下の細胞を使用した。HeLa(野生株と S₃細胞を用いた。前者を HeLa-W、後者を HeLa-S₃と略す)。Hep. No. 2, KB, G₂V, Chang による株化人肝細胞(CHL と略す)。および L などの株化細胞と、人胎児肺細胞(HEL)の初代培養細胞を用いた。

培地：原則として、株化細胞の培養には 15% 牛血清加 Y. L. A. を用いたが、HEL の培養には 0.5% Lactalbumin 加水分解物(LAH と略す)を加えた EAGLE 培地に牛血清を 10% の割合に補充したものを用いている。

AV を生産するための維持培地には 0.8% Polyvinylpyrrolidone (PVP) 加 EAGLE 培地と PVP を含まない EAGLE 培地を使用した。われわれの最初の報告では血清を加えた維持培地を用いたものであるが、血清の中には抗体あるいは非特異的阻止因子などを含んでいるので混乱をさけるために血清を含む培地を使用しなかつた。

ウイルス：Polio 1 型 MAHONEY 株ウイルスを使用した。ウイルスのブラック測定はつぎのようにした。Hep. No. 2 の単層細胞を含む培養期にウイルス希釈液 0.3 cc を加え、37°C 30 分吸着後、10% 牛血清加 2 倍濃度 YLA と 2.2% 精製寒天を 1:1 に加えた寒天上層培地を 1 培養瓶に加え、22°C 15 分放置したのち 37°C に 4 日間培養し plaque 数を算え、plaque forming unit (PFU)/ml を計算した。

AV 力価測定の一般的方式：AV の力価測定条件の検討は別として一般には下記の方法を用いた。25 万/cc の Hep. No. 2 細胞を培養試験管に加えて 37°C 3~4 日培養して単層培養が成立したのち、MAHONEY 株を m. o. i.

0.1 で接種する。37°C 60 分吸着し、未吸着ウイルスを洗い去り、AV 標本を 0.3 cc 加え、更に維持培地 0.7 cc を加えて 37°C 23 時間培養し、細胞外ウイルス量を PFU 測定により定量した。対照では AV の代りに PBS を 0.3 cc 用いた。AV 処理群の PFU と対照の PFU から阻止パーセントを計算する。このため下の式を用いた。

$$\left(\frac{\text{対照の PFU} - \text{AV 処理群の PFU}}{\text{対照の PFU}} \right) \times 100$$

実験結果

1. 各種の培養細胞での Antivirin 生産の検討

まづ AV がある特定の培養細胞でのみ生産されるのか、または培養細胞は一般に AV 生産の能力を有するのか、この点を解明するための検討を行なつた。

中型角瓶に検討する細胞を 200 万個加えて、37°C 4 日間培養し完全な単層を形成させる。増殖培地をすて、PBS で 3 回洗い、10 cc の AV 生産用維持培地を加える。PVP 加 EAGLE 培地と PVP を加えない EAGLE 培地を用いる。37°C で培養し、培養完了後培地をとり、4000 RPM 20 分遠心して、細胞の破片を除き、4°C で Carbowax 6000 を用いて 10 倍に濃縮する。ついで、蒸留水に対して透析を行なう。透析後内液をとり、Milipore 濾紙(HA 型)を用いて滅菌濾過して抗ウイルス活性のテストを行なう。AV 活性の検討は実験材料および方法の章で記述した方法によつた。

実験の結果を表 1 に示す。

表 1 で見られるように、HeLa-S₃, Hep. No. 2, CHL, G₂V あるいは L のような株化培養細胞のみでなく、HEL のような初代培養細胞でも充分な AV の生産を示している。FL や KB 細胞が AV を生産することは既に前報¹⁾で記述した所である。この点よりみると AV はある特定の細胞のみが生産するのではなく、一般細胞に—今の時点では培養細胞と限定するのが妥当と思われるが—共通して認められる現象と思われる。細胞間の AV 生産効率の量的差異は表 1 に示した結果からは判然とせず、寧ろほぼ同程度の生産効率をもっているように見える。生産のための維持培地は PVP 加 EAGLE 培地のほうが PVP を加えない EAGLE 培地よりすぐれているものと思われる。

表1 各種培養細胞による Antivirin の生産

用いた細胞名	生産条件			活性測定	
	培養条件	Polio 1 型 MAHONEY の PFU			
	培地	温度 (°C)	日数 (日)	PFU/ml	阻止パーセント (%)
HeLa-S ₃	*PVP+EAGLE	37	31	$\frac{2.8 \times 10^5}{2.1 \times 10^7}$	98
	PVP+EAGLE	37	37	$\frac{1.1 \times 10^6}{2.1 \times 10^7}$	94
Hep. No. 2	PVP+EAGLE	37	10	$\frac{6.0 \times 10^5}{2.1 \times 10^7}$	97
	PVP+EAGLE	37	10	$\frac{3.6 \times 10^6}{1.5 \times 10^7}$	77
CHL	PVP+EAGLE	37	10	$\frac{2.2 \times 10^6}{1.5 \times 10^7}$	86
	PVP+EAGLE	37	14	$\frac{3.0 \times 10^4}{2.1 \times 10^7}$	99.8
L	PVP-EAGLE	37	3	$\frac{1.1 \times 10^5}{1.3 \times 10^6}$	91
HEL	PVP+EAGLE	37	10	$\frac{3.4 \times 10^6}{9.0 \times 10^7}$	97
G ₂ V	PVP+EAGLE	37	10	$\frac{1.2 \times 10^6}{1.5 \times 10^7}$	98
	PVP-EAGLE	37	3	$\frac{3.5 \times 10^5}{1.3 \times 10^6}$	73

* + は PVP 加 EAGLE, - は PVP を加えない EAGLE を示す

** 分母は対照の PFU, 分子は AV 処理群の PFU を示す

このことは、PVP 加 EAGLE 培地を用いるほうが細胞の維持が良好であるために起因するものと考えられる。

2. Antivirin 生産と細胞維持日数との関係

AV は培養経過と共に細胞培養液中に游出されて来るものである。したがって、培養開始前に細胞を破壊しても AV 活性は認められないことは前報¹⁾で示した所である。そこで、培養の経過日数と AV 生産との関係を検討した。

200 万個の表に示した細胞を中型角瓶に加えて、完全な単層を作る。PBS で洗ったのち、AV 生産のための維持培地を加え 37°C で培養する。

一定間隔で細胞培養液をとり、前章のように操作して

表3 Antivirin 生産の時間経過

生産に用いた細胞	培養日数 (日)	阻止パーセント (%)
HeLa-w	2	69
	4	88
	6	76
	8	80
Hep. No. 2	2	38
	4	50
	6	76
	8	68
	10	78
	14	28
KB	2	14
	4	34
	6	69
	8	80

表2 Hep. No. 2 細胞での Antivirin 生産の時間経過

培養日数 (日)	阻止パーセント (%)
1	69
2	68
3	72
4	80
5	86
6	83
7	76
8	76
9	68
10	76

維持培地として PVP を加えない EAGLE 培地を用いた

表4 Antivirin による細胞内ウイルス量の抑制と細胞外ウイルス量の減少の平行性

用いた Antivirin 材料	Antivirin 活性(PFU/ml)	
	細胞内ウイルス量	細胞外ウイルス量
対 照	7.6×10^7 *	2.1×10^7 *
Hep. No. 2 細胞, 37°C 10 日培養後採取 AV	9.6×10^5 (98%)**	6.0×10^6 (97%)**
HeLa-S ₃ 細胞, 37°C 31 日間培養後採取 AV	6.3×10^5 (99%)	2.8×10^5 (98%)
HeLa-S ₃ 細胞, 37°C 37 日間培養後採取 AV	3.1×10^5 (99.6%)	1.1×10^5 (94%)
Chang の人肝細胞, 37°C 14 日間培養後採取 AV	1.6×10^5 (99.8%)	3.0×10^5 (99.8%)

* 上段の数字は PFU/ml を示す

** 下段の数字は阻止パーセントを示す

AV をとり、その活性を測定した。表2で維持培地に EAGLE 培地を用い、AV 活性の測定を実験方法の部で記述した方法で行なつた結果を示した。表3は PVP 0.8% 加 EAGLE 培地を維持培地として、AV の活性を下のようにならして測定を行なつた結果を示した。即ち、Polio 1 型 MAHONEY 株の稀釈液と被検 AV 材料を加えて 37°C 60 分 Hep. No. 2 単層培養細胞に作用させる。60 分後、培地をぬきとり、3 回洗浄したのち、被検 AV 材料を 0.3 cc 含有する寒天上層 4.0 cc を加え、37°C に 4 日間置いてそのブラック発現をみた。対照においては、被検 AV 材料の代りに PBS と同じ容量加えた。対照のブラック発現数と AV 処理群のそれより阻止パーセントを算出した。

表2で示されるように、維持培地として EAGLE 培地単味を用いた場合、当然のことながら細胞の維持が PVP を加えた EAGLE 培地を用いるより悪く、5 日以後、とくに細胞の破壊が著明である。AV 生産もこの細胞維持と平行し、細胞に維持培地を加えて 5~6 日で最高の活性を示す粗 AV 材料をうる事が出来る。

表3の実験は 0.8% PVP 加 EAGLE 培地を用いた場合で、AV 生産効率率は 8~10 日の間で採取するのが最もよいように思われる。Hep. No. 2 細胞で 14 日目採取材料の AV 活性が低いのは細胞の維持の問題に関係するのであろう。以上の表2と表3の結果よりみて、PVP 加 EAGLE 培地なら 8~10 日、PVP をぬいた場合なら 5~6 日が AV 生産に至適なものこれらが一般的にいつて細胞がよく維持されうる最大公約数的培養日数であるということであり、より維持状態が良好なら更に培養日数を延長すればよいのであろう。

3. Antivirin 活性の測定条件の検討

a: Antivirin による細胞内ウイルス増殖抑制と細胞外ウイルス量減少の平行性

AV の活性を測定するにあつて、日常数多くの AV

標本の活性をみるには、細胞外ウイルス量のみの定量で充分であれば比較的取扱いが簡明である。しかし、もし細胞外ウイルス量の測定が細胞内ウイルス量の反映でないとしたら、このような細胞外ウイルス量の減少で AV 活性の程度を考察するのは危険である。

この点を検討するためつぎの実験を行なつた。

Polio 1 型 MAHONEY 株ウイルスを m.o.i. 0.1 で単層培養の成立した Hep. No. 2 細胞を含む試験管に加え、37°C 60 分吸着させたのち、各種の AV 材料を 0.3 cc と維持培地 0.7 cc を加え、37°C 23 時間さらに培養を行ない、その細胞内ウイルス量と細胞外ウイルス量を測定した。実験の結果を表4に示す。表4で見られるように、いずれの AV 材料を用いても、細胞内ウイルス量の抑制と細胞外ウイルス量の減少は平行する。

以上の結果よりみて、AV 活性の測定に細胞外ウイルス量の減少は充分用いられうる指標である。

b: 接種ウイルス量と Antivirin 活性の関係

化学療法物質の活性はその物質の濃度と対象病原体量の相互関係できまる。この点について AV 活性がウイルスの接種量を変えたとどのように変化するかを検討した。Polio 1 型 MAHONEY 株を m.o.i. 3.0, 0.3, 0.1, および 0.05 でそれぞれ、単層培養 Hep. No. 2 細胞に接種し、37°C 60 分吸着後、Hep. No. 2 細胞 37°C 10 日培養でえた AV 材料 0.3 cc を各群に加え、37°C 23 時間培養し、細胞外ウイルス量を測定した。実験の結果を表5に示す。表5で見られるように、AV の効果は m.o.i. が 0.3 以下の時に著明にみられ、とくに 0.1~0.05 である場合に一層明らかである。

c: Antivirin の最小有効濃度

つぎに検討する必要があるのは AV 活性を現す有効量である。この点を明かにするため、Polio 1 型 MAHONEY 株ウイルスを m.o.i. 0.1 で Hep. No. 2 細胞に接種し、37°C 60 分吸着後、Hep. No. 2 細胞 37°C 10 日培養によ

表5 Antivirin のウイルス増殖抑制効果と接種ウイルス量の関係

接種された Polio 1 型 MAHONEY 株の m.o.i.	AV ₁₀ -Hep. No. 2 の 加えられた量 (ml)	ウイルス接種後 24 時間の細胞外ウイルス量	
		PFu/ml*	阻止パーセント (%)
3.0	0.3	$\frac{3 \times 10^7}{4 \times 10^7}$	0
0.3	0.3	$\frac{2.5 \times 10^6}{1.1 \times 10^7}$	77.3
0.1	0.3	$\frac{4.9 \times 10^5}{3.1 \times 10^7}$	84.2
0.05	0.3	$\frac{2.1 \times 10^5}{2.5 \times 10^6}$	91.6

Antivirin を加えた群の細胞外ウイルス量

* Antivirin を加えない対照群の細胞外ウイルス量

表6 粗 Antivirin の最小有効濃度

加えた Anti-virin の容量 (cc)	加えた Anti-virin 中のタンパク量 (mcg)	抑制効果	
		PFU/ml	阻止パーセント (%)
0	0	1.7×10^6	
0.3	2.5	1.1×10^6	92.4
0.15	12.5	1.8×10^6	89.4
0.075	6.25	1.6×10^6	90.5
0.0325	3.125	9.8×10^6	42.3

り調整された AV をいろいろの容量で加え、37°C 23 時間後の細胞外ウイルス量を測定した。実験の結果を表 6 に示す。粗 AV 標本中のタンパク量は LOWRY の方法⁴⁾により定量した。表から見られるように、粗 AV 標本の最小有効濃度は容量として 0.075 cc、タンパク量として 6.25 mcg/ml であった。

考 察

この報告において我々は AV が各種の細胞培養から生産され、しかもその生産は細胞の維持状態と共に消長を共にすることを示した。したがって AV 生産効率をよくするためには出来る限り細胞を長くよい状態に保つことが必須の条件となってくる。われわれは AV 生産のために PVP 加 EAGLE 培地と PVP を含まない EAGLE 培地を用いたが、もちろん前者の方が細胞の維持に適しているので前者を用いて調整した AV 活性の方が後者を培地として調整した AV の活性よりすぐれている。ただ、精製操作を今後行なつてゆくについて PVP のような高分子物質が存在していないほうが望ましいので、EAGLE 培地単独での AV 調整について検討したのである。

前報²⁾においてわれわれは AV により細胞外ウイルス量の減少することを記述したが、今回の報告でさらにこの点を確認した。AV の一般的活性の測定には細胞外ウ

イルス量を定量することで充分であり、これは細胞内ウイルス量の抑制と細胞外ウイルス量の減少が平行性を保っていることによる。AV の活性はウイルスの接種量と AV の添加量により著るしく影響されるものであるが、粗 AV を用いた今回の実験ではウイルス接種は m. o. i. 0.3 以下、AV 量は 0.075 cc 以上、即ちタンパク量として 6.25 mcg/ml 以上でその効果を現わすことが明かにされた。この AV の効果は抗ウイルス性化学療法薬創製の見地からみると必ずしも高度なものではないが、より精製を加えることによりもつと活性の高い標本をうることが出来るものと思われる。

要 約

AV 生産能を各種の培養細胞について検討した。AV は広く各種の培養細胞により生産されその活性は、ウイルス接種が m. o. i. 0.3 以下で AV 添加量が 0.075 cc、タンパク量として 6.25 mcg/ml の時に現われる。AV は細胞内ウイルス抑制を来し、その結果細胞外ウイルスの減少を来すので、日常には細胞外ウイルス量の減少度の定量で AV 活性を測定しうる。

参 考 文 献

- 1) 秋浜澄行, 豊島滋, 上田武雄: ウイルス非感染細胞培養液中に見出されるウイルス増殖阻止因子について。ウイルス, 13, 42(1962)
- 2) 豊島滋, 瀬戸淑子, 高奥昌子, 藤田晴久: 化学療法的活性をもつ生体成分の研究. 1. Antivirin, 培養細胞の生産する新しい抗ウイルス物質について。Chemotherapy 15(3): 263~266, 1967
- 3) TSILINSKY, Y. Y.: Inhibitors of viral activity from uninfected culture of stable cell lines. Acta Virol. 7, 350~360(1963)
- 4) LOWRY, O. H., ROSENBOUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J.: Protein measurement with the protein phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265~275(1951)

STUDIES ON THE HIGH MOLECULAR SUBSTANCES POSSESSING CHEMOTHERAPEUTIC ACTIVITY. II

The Conditions for the Production of Antivirin and for the Estimation of its Antiviral Activity.

SHIGESHI TOYOSHIMA, YOSHIKO SETO & HISAKO TONEGI

Division of Biochemical Pharmacology, Pharmaceutical Institute, Keio Gijuku University

Antivirin can be produced from many types of cells, either of stable cell-lines or of primary cultured cells. The antiviral effect of Antivirin can be clearly observed when an inoculum size of m. o. i. of 0.3~0.05 susceptible virus is employed. The minimum inhibitory dose of Antivirin is 6.25 mcg/ml as protein content. As the decrease extracellular viral amount of the group treated by Antivirin is clearly the reflection of the inhibition of intracellular viral multiplication, the routine assay of Antivirin activity may be performed by the determination of the decrease of extracellular viral amount.