

化学療法的活性をもつ生体成分の研究. III

部分精製された Antivirin の性状

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)

前報¹⁻³⁾においてわれわれは Interferon 生産促進因子を作用させない細胞培養系でわれわれが Antivirin (以下 AV と略す) と名付けた新しいウイルス増殖阻止因子の生産されること, AV はウイルスの細胞内再生過程に作用して RNA 系ウイルスのみならず DNA 系ウイルスをも抑制し, ウイルス感染後に増殖阻止効果を現すことを見出した。

AV は多くの培養細胞系により生産されるもので, これを普遍すれば一般細胞系のもつ機能的代謝産物であるといえるであろう。

今回は硫酸アンモニウム処理により部分精製せられた AV についてその性状を検討したので, その結果について報告する。

実験材料および方法

使用細胞は全実験を通じ Hep. No. 2 細胞を用いた。細胞の増殖には 15% 牛血清加 Y.L.A. を用い, AV の生産は PVP をぬいた EAGLE 培地を用い, 37°C 10 日間に採取した。AV 活性の測定は Polio 1 型 MAHONEY 株ウイルスを用い, m.o.i. 0.1 で接種し, 24 時間後の細胞外感染ウイルス量を定量した。

AV の硫酸アンモニウム (以下硫酸と略す) 処理, およびこの部分精製 AV に対して加えた色々な処理はそれぞれの章で記述する。

実験結果

1. Antivirin の硫酸アンモニウムによる分画

前報のように 37°C 10 日間培養して調整された Hep. No. 2 細胞以来の AV を表 1 に示すように硫酸分画を行ない, 各分画部を蒸留水に対し完全に硫酸の検討されなくなるまで透析を行ない, その内液を Millipore Filter で滅菌濾過し, 原量に容量を調整してからその活性を測定した。

まづ AV の硫酸分画 AV の活性の測定の前に硫酸が抗ウイルス効果を有するかどうかを検討した。Hep. No. 2 の単層細胞の成立した培養瓶に Polio 1 型 MAHONEY 株ウイルスを接種し, 37°C 60 分後, 硫酸を含む寒天上層を加え, ブラックの発現について 37°C 4 日後に観測を行ない, 阻止パーセントを算出した。硫酸の最終濃度が 10^{-4} M である場合そのブラック阻止パーセントは 99.8% で, 10^{-5} M で 99%, 10^{-6} M で 20% であり, この結果よりみて硫酸それ自体にブラック発現の抑制効果があり, このため硫酸分画後の透析で硫酸の除去が不完全であると結果の判定を間違うことがある。われわれは塩化バリウム法で硫酸イオンの検出を行ない, 検出されなくなつたのち, 更に 2 日間透析を続けて硫酸の除去を行なつた。

表 1 Antivirin の硫酸分画部の Polio 1 型 MAHONEY 株ウイルスに対する抑制効果

分 画 部	PFU/ml*		
	Antivirin 処理群	対 照 群	阻止パーセント (%)
25% 硫酸飽和沈澱	7.66×10^8	1.33×10^8	阻止せず
33% 硫酸飽和沈澱	1.33×10^8		0
50% 硫酸飽和沈澱	1.66×10^4		阻止せず
62% 硫酸飽和沈澱	3.3×10^1		99
68% 硫酸飽和沈澱	2.6×10^8		阻止せず
硫酸安全飽和上清透析内液	1.5×10^2		88

* 0.1 の m.o.i. で MAHONEY 株ウイルスを接種し, 8 時間後の細胞外ウイルス量

表 2 Antivirin の酵素分解の検討

酵 素 分 解 の 条 件				PFU/ml*		
作用した酵素名	量 (rg)	反応温度 (°C)	反応時間 (時)	Antivirin 群	対 照 群	阻止パーセント
Trypsin	2,000	37	4	1.0×10^5	3.9×10^6	94
RNase	10	37	1	2.2×10^6		95
DNase	10	37	1	1.9×10^6		97
Enzyme-free の PBS に溶解した Antivirin	0	37	4	2.2×10^5		94

* 0.1 の m.o.i. で Polio 1 型 MAHONEY 株ウイルスを接種し 24 時間後の細胞外ウイルス量

実験の結果を表1に示す。

MAHONEY 株ウイルスを m.o.i. 0.1 で Hep. No. 2 の単層培養に接種し、37°C 60 分吸着せしめたのち、各検討すべき AV の硫酸分画 0.3 cc を含む維持培地を加え、37°C 8 時間培養後細胞外ウイルス量を測定した。表1でみるように 62% 飽和沈澱部と、硫酸安全飽和後の遠心上清を透析した内液部に増殖抑制効果がみとめられる。後者が 62% 飽和沈澱部の分解したものか、あるいは2種類の活性物質が含有されているものか、現在の所では明かではない。今後詳細に検討する予定であるが、今回の実験には以下 62% 飽和沈澱部分を使用した。

2. Antivirin の酵素分解の検討

この 62% 硫酸沈澱部は紫外線吸収スペクトルを見ると 215 mμ と 280 mμ に最大吸収を有し、各種のタンパク質呈色反応が陽性である。260 mμ には吸収を認めないので、まづタンパク分解酵素処理による AV 活性の失活を検討した。参考のために、RNase と DNase 処理による AV の失活の可能性も検討した。

実験の結果を表2に示した。われわれの予想に反して Trypsin は AV 活性に全く何らの影響をおよぼさなかった。RNase も DNase も AV に失活効果を示していない。AV が Trypsin で失活されないことは極めて興味あることで、今日まで報告せられたすべての Interferon および Interferon 様物質⁴⁾は勿論、TSILINSKY ら⁵⁾により報告せられた新抗ウイルス性物質も、HOLLAND の Receptor⁶⁾ もすべて Trypsin により失活される。AV のこのようなタンパク分解酵素抵抗性は今後更に検討すべき性質であろう。

3. Antivirin の熱処理に対する安定性と pH の変化に対する安定性

Interferon および Interferon 様物質は概して不安定で常温では pH 3.0 から pH 10.0 の間で安定であるが、耐熱性に乏しく、65~85°C 60 分の加熱でその活性を失うと報告されている⁴⁾。前の章で記述した酵素分解の実験で、AV と Interferon の根本的相異を示す結果が得られたので、AV の耐熱性と pH 安定性を検討した。

実験の結果を表3に示した。

表3 Antivirin の熱処理に対する安定性と pH の変化に対する安定性

Antivirin に加えた条件			PFU/ml*		
温 度 (°C)	時 間 (分)	pH	Antivirin 処 理 群	対 照 群	阻止パーセント (%)
熱 安 定 性 の 検 討					
4	60	7.2	2.0×10 ⁵	6.7×10 ⁵	97
25			4.2×10 ⁵		94
37			1.3×10 ⁵		99
56			2.0×10 ⁵		97
76			2.1×10 ⁵		97
100			6.0×10 ⁵		91
pH に対する安定性					
25	60	2.0	1.2×10 ⁵	8.0×10 ⁵	85
		5.0	1.2×10 ⁵		85
		7.0	1.4×10 ⁵		82.5
		9.0	1.4×10 ⁵		82.5
		10.0	1.3×10 ⁵		83.5

* 0.1 の m.o.i. で Polio 1 型 MAHONEY 株ウイルスを接種させて 24 時間後の細胞外ウイルス量

表4 Antivirin の過沃素酸による不活化の検討

被 検 材 料	作用させた過沃素酸の濃度 (M)	Antivirin の効果	
		PFU/ml	阻止パーセント (%)
対 照 I (Antivirin を作用させずウイルスの) みを接種した	0	4.4×10 ⁵	
対 照 II (ウイルスを接種したのち intact An- tivirin を作用させた)	0	5.7×10 ⁴	87
処 置 群 (ウイルスを接種したのち過沃素酸を 反応せしめた Antivirin を作用させ た)	10 ⁻²	7.0×10 ⁴	83

表3で見られるように、AV は 25°C で観察した場合、pH 2.0 から pH 10.0 の間で全く安定であり、なおまた pH を 7.2 として、4°C から 100°C までの任意の温度に 60 分反応せしめても、AV 活性に何らの変化を生じない。ただ、100°C 60 分反応せしめた場合、タンパク変性を暗示する白濁を生ずるのを認めたが、AV の抗ウイルス活性の低下は認められなかった。

4. Antivirin の過沃素酸による不活化の検討

以上の検討。

Interferon 様物質の多くは糖タンパク質で過沃素酸で失活される⁴⁾。上述の実験で AV が Interferon と Trypsin 抵抗性と耐熱性の2点で異なることを明かにした。更にわれわれは AV の過沃素酸による失活の態度が Interferon と異なるかどうかを明かにするため実験を行った。

実験の結果を表4に示す。

表に見られるように、AV は過沃素酸による失活を受けないが、Interferon 標本でも比較的純度の低いものは過沃素酸化耐性であり、AV についても結論は更に精製操作の進行をまつて出したい。

5. Antivirin の紫外線不活化の検討

Antivirin は 260 m μ の波長に特異的吸収を示さないで、核酸を含有しないものと考えられるが、この点を確認するため紫外線不活化の検討を行なった。AV を 4 cm の直径のベトリシャーレに入れ、液相を 1 cm の厚さにする。この AV 相に対して高さ 10 cm より紫外線を照射し、AV 活性に対する影響を検討した。実験の結果を表5に示した。

表でみられるように AV 活性は紫外線照射で失活されない。

考 察

われわれは今回 Hep. No. 2 細胞培養より採取した AV を硫酸により分画し、62% 飽和沈澱部と硫酸全飽和遠心上清に活性の存在するのを認めた。後者は透析すると内液に残ることよりみても高分子状態で存在するものと考えられる。前者が分解するか、タンパク部分が分離したものが後者であるか現在の状態では明かではない。

われわれは今回は前者を用いて AV の性状を検討した。AV は Trypsin で分解せず、RNase と DNase でも分解せず、100°C 60 分、pH 7.2 にして加熱しても失活せず、pH 2.0 から 10.0 の間で安定である。過沃素酸および紫外線で不活化されない。

以上の諸性質よりみると、AV は少なくとも単純タンパク質ではない。しかし、複合タンパク質と考えとしても、今回の実験では糖質の関与も、核酸の関与も示唆しうる結果は得られていない。またかりに、AV が単純タンパク質でも複合タンパク質でもないとしても、280 m μ と 215 m μ に最大吸収を有し、透析されえない高分子物質であることは、酸アミド結合をもち、芳香環の物質をもつ高分子物質であると考えられる。AV の本体はその精製が進むと共に一層明かとなると思われる。しかし、今回の実験で、AV はその産生の型式、作用型式の他に、その性状においても Interferon 様物質と異なる

表 5 Antivirin の紫外線不活化の検討

被 検 材 料	紫 外 線 照射時間 (分)	Antivirin 効果	
		PFU/ml	阻止パーセント (%)
対照 1 (ウイルスを接種したのみで Antivirin を作用させていない)	0	4.2×10^6	
対照 2 (ウイルスを接種したのち intact Antivirin を作用させた)	0	4.2×10^6	90
処置群 (ウイルスを接種したのち紫外線照射した Antivirin を作用させた)			
	1	4.7×10^5	89
	2	2.7×10^5	94
	3	3.1×10^5	93

ものであることが示されたと考える。

要 約

AV を硫酸分画操作すると 62% 飽和沈澱部と全飽和後遠心上清部の透析内液部に活性が認められる。前者についての検討の結果、つぎの性質を有していた。(1) Trypsin で失活されない。(2) RNase と DNase で失活されない。(3) 100°C 60 分 pH 7.2 の加熱で失活されない。(4) 25°C で pH 2.0~pH 10.0 の間で失活されない。(5) 過沃素酸不活化をうけない。(6) 紫外線不活化を受けない。

参 考 文 献

- 1) 秋浜達行, 豊島 滋, 上田武雄: ウイルス非感染細胞培養液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) 豊島 滋, 瀬戸淑子, 戸根木尚子: 化学療法的活性をもつ生体成分の研究。2. Antivirin の生産条件と力価測定。Chemotherapy 15(3): 267~270, 1967.
- 4) ISAACS, A.: Interferon. Ad. in Virus Research. 10, 1~38 (1963)
- 5) TOSILINSKY, Y. Y.: Inhibitors of viral activity from uninfected cultures of stable cell lines. II. Properties of inhibitors. Acta Virol. 7, 437~446 (1963)
- 7) HOLLAND, J. J. & McLAREN, L. C.: The location and nature of enterovirus receptors in susceptible cells. J. Exp. Med. 114, 161~171 (1961)

STUDIES ON THE HIGH MOLECULAR SUBSTANCES POSSESSING CHEMOTHERAPEUTIC ACTIVITY. III

The Properties of Partially Purified Antivirin

SHIGESHI TOYOSHIMA, YOSHIKO SETO & HISAKO TONEGI

Division of Biochemical Pharmacology, Pharmaceutical Institute,
Keio Gijuku University

By using the ammonium sulfate fractionation method, the activity of Antivirin was found to be in the 62% saturated fraction and the inprecipitable fraction. The antiviral activity of the former fraction was not inactivated by the enzyme-digestion such as trypsin, RNase and DNase. Antivirin-activity was very stable in the range of 2~10 of pH and was not inactivated by heating at 100°C for 60 minutes. The activity of Antivirin was not inactivated by the treatment of periodate and of ultraviolet irradiation, too.