

化学療法的活性をもつ生体成分の研究 VI

ウイルス感染細胞における蛋白質及び核酸合成に対する Antivirin の作用

瀬戸 淑子・戸根木尚子・豊島 滋

廣徳義塾大学医学部薬化学研究所生物薬品化学研究室

(昭和 43 年 7 月 11 日受付)

前報において¹⁻³, 我々は Interferon 生産促進因子を作用させない細胞培養系で, Antivirin(以下, AV)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を見出した。AV の作用部位の検討において, 我々は AV はウイルスの細胞内再生過程に作用し, ウイルス感染後に増殖阻止効果を示すことを見出した。

いつぼう, AV がウイルスの宿主細胞への吸着を阻害しないこと, また, ウイルスの細胞よりの游出を阻害するが, これを AV の作用の本質と考えるには余りに微弱であることよりみて, この AV のウイルス再生過程への抑制が, AV の作用部位であると考えられる。そこで, 我々はウイルス感染細胞における蛋白質および核酸合成に及ぼす AV の効果について検討した。

この報告は Antivirin の蛋白質および核酸合成に対する効果に関するものである。

実験材料および方法

培養細胞: 全実験を通じて, Hep. No.2 細胞を使用した。

培地: 細胞の増殖培地には 15% 牛血清加 YLA を用い, 維持培地として 5% 牛血清加 YLA を用い, AV 生産のための維持培地には 0.2% PVP 加 Eagle 培地または PVP を加えない Eagle 培地を使用した。ラベルプレカーサーの取り込み実験においては Eagle 培地を用いた。

ウイルス材料: ポリオ 2 型 MEF₁ 株ウイルスを使用した。粗 AV の調整およびウイルスのブラック測定は前報³の記述のように行なった。

感染性 RNA の抽出法: ウイルス感染細胞からの感染性 RNA の抽出は HOLLAND の方法⁴)に準じて次のように行なった。培養瓶のガラス壁から細胞をラバークリーナーでかき落とし, 1,500 rpm 10 分遠心して上清を集め, この上清にフェノールを加え, 2 分間氷水中で振盪する。再び遠心により集めた上清に等量のエーテルを加え, フェノールを 5 回抽出除去する。そして下層を冷し, 窒素ガスで過剰のエーテルを除去し, ミリポア濾過により滅菌したものを感染性 RNA とした。

感染性 RNA の測定: 抽出した RNA 標本を 2 M 硫

酸マグネシウムで稀釈し, Hep. No.2 の単層細胞に接種する。37°C 12~15 分吸着後, PBS で 1 回洗い, 寒天上層培地を加え, PFU/ml を計算する。

カバースリップ法によるラベルプレカーサーの蛋白質および核酸への取り込み実験: 3 枚のカバースリップを入れたシャーレに 253/ml の Hep. No.2 細胞を加えて, 37°C 2 日間培養する。単層培養成立後 Actinomycin D を, 1 μg/シャーレの割合で加えて, 37°C で細胞を 20 分間前処理し, 次いで, MEF₁ 株ウイルスを m. o. i. = 2 で接種する。37°C 60 分吸着後, 未吸着ウイルスを洗いきり, AV を 0.3 ml/シャーレの割に加え, さらに Eagle 培地を 0.7 ml, H³-ウリジンを 1 μc/シャーレ加えて, 37°C で培養する。感染細胞は冷酢酸: エタノール (1:3) で 4°C 15 分固定させ, 冷 70% エタノールで 3 回細胞の表面を洗う。冷 0.5 M 過塩素酸を加え 4°C 30 分放置し, 酸可溶性部を除去する。冷 70% エタノールで 5 回細胞を洗い, さらにエタノール: エチルエーテル (1:1) で 1 回, エチルエーテルで 1 回洗い, 70°C で乾燥する。乾燥したカバースリップをバイアル瓶に入れ, トルエン系シンチレーター (トルエン 1 L 中に 2,5-ジフェニールオキサゾールを 4 g, P-ビス 2-(5-フェニールオキサゾール)-ベンゼンを 100 mg を溶解) 10 ml を加え, スクレア-シカゴ液体シンチレーションカウンタでカウントする。

実験結果

1. Actinomycin D 作用下におけるポリオ 2 型 MEF₁ 株ウイルスの初期増殖に対する Antivirin の抑制作用

ポリオウイルス感染細胞において Actinomycin D はその細胞性 RNA 合成は抑制するが, ウイルス RNA 合成は Actinomycin D により抑制されぬことはすでによく知られたところである⁵)。ラベルプレカーサーの感染細胞での核酸および蛋白質への取り込みの検討を行なうにあたっては, Actinomycin D の使用により, 細胞性 RNA 合成を抑制した条件下で, ウイルス核酸およびウイルス蛋白質への AV の作用を検討する必要がある。

したがって, この検討に先立つてまず Actinomycin

第1表 アクトノマイシン作用下におけるポリオ2型 MEF₁ 株ウイルスの初期増殖に対するアンチビリンの抑制作用

アクトノマイシン 添加量 (mcg/ml)	(細胞内ウイルス量 全 PFU)					
	m. o. i. = 2			m. o. i. = 1		
	対照群	アンチビリン 処理群	抑制 %	対照群	アンチビリン 処理群	抑制 %
0	20×10 ⁸	4.0×10 ⁸	80	11×10 ²	2.1×10 ²	81
5	1.83×10 ⁸	3.3×10 ⁸	82	8.6×10 ²	0.9×10 ²	89
3	16.7×10 ⁸	2.8×10 ⁸	83	8.0×10 ²	1.3×10 ²	84
1	18×10 ⁸	4.2×10 ⁸	80	11.3×10 ²	1.6×10 ²	85

Hep. No. 2 細胞の単層培養成立後、上記の量のアクトノマイシンD作用下で MEF₁ 株ウイルスを接種する。37°C 60分吸着後、未吸着ウイルスを洗い去り、AV または対照として PBS を加え、37°C 2時間培養し、細胞内ウイルス量を PFU 測定により定量した

によつて AV 活性がどのような影響を受けるかを明らかにする必要がある。この点の検討を行なつた。25万/ml の Hep. No. 2 細胞を培養試験管に加えて 37°C 3~4 日間培養して、単層培養が成立した後、種々の量の Actinomycin D 作用下で MEF₁ 株ウイルスを接種する。37°C 60分吸着後、未吸着ウイルスを洗い去り、AV を 0.3 ml 加えさらに維持培地 0.7 ml を加えて、37°C 2時間培養し、細胞内ウイルス量を PFU 測定により定量した。対照では AV の代りに PBS 0.3 ml を用いた。阻止パーセントは次の計算によつた。

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

実験の結果を表1に示す。

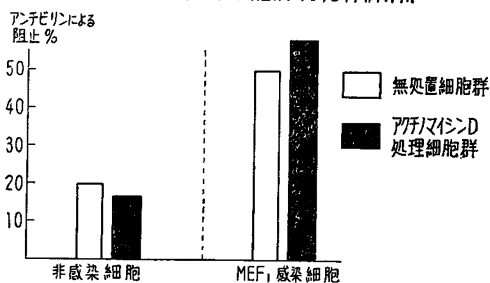
表1にみられるように、AV を感染後1時間目から4時間目まで加えて、細胞内ウイルス量を測定した場合、強い阻止作用を示す。この作用は 5 μg/ml の Actinomycin D 存在下でも同程度に現われ、Actinomycin による AV 効果の干渉は認められなかつた。したがつて、Actinomycin D の存在下で AV はその効果を干渉されない。したがつて、ラベルプレカーサーの取り込み実験を Actinomycin D 存在下に行ないることが示された。いま一つ、この実験で見出されたことは Interferon の効果が Actinomycin D により打ち消されるのに対し⁶⁾、今回得られた我々の結果は AV の活性が全く Actinomycin により、影響を受けぬことである。このことは AV が Interferon とその作用態度が異なることを示すものである。

2. Actinomycin 作用下におけるポリオ2型 MEF₁ 株ウイルス感染細胞での H³-ウリジンの取り込みに対する Antivirin の抑制作用

以上の検討に引きつづき、ウイルス感染細胞におけるウイルス核酸の合成に対する AV の効果を検討した。

実験の結果は図1に示される。

図1にみられるように、非感染細胞では AV は H³-

図1 7アチノマイシン作用下におけるアンチビリンのポリオ2型 MEF₁ 株ウイルス感染細胞への H³-ウリジン取り込みに対する抑制作用

加フスラフ法により単層培養成立後7アチノマイシン0.1 μg/ml を加え37°Cで細胞を20分間前処理する。次にMEF₁株ウイルスを m. o. i. = 2 で接種し、37°C 60分吸着後、未吸着ウイルスを洗い去り AV を加え更に Eagle 培地、H³-ウリジン 1 μc を加え、37°C 感染後 5.5 時間培養する。

ウリジンの取り込みに対し有意の抑制を示していないが、MEF₁ 株ウイルス感染細胞では、AV は H³-ウリジンの取り込みを 50% 以上阻止している。

3. 種々のウイルス量で感染された細胞での H³-ウリジン及び H³-パリンの取り込みに対する Antivirin の抑制作用

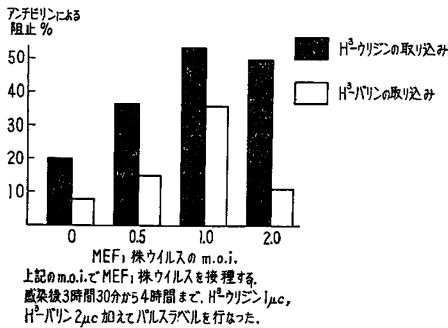
以上の実験により、AV がウイルス感染細胞でのウイルス RNA の合成を阻止することが明らかにされた。そこで、次の段階として、AV のウイルス感染細胞における蛋白質合成に対する抑制効果について検討を行なつた。さらにまた、前章において、AV がウイルス核酸の合成を抑制することが示されたので、ウイルス感染量を変えた場合のウイルス核酸合成に対する AV の作用についても検討を行なつた。

実験条件は実験方法の章で記述したものと同一であるが、ラベルプレカーサーとして H³-パリンおよび H³-ウリジンを用い、これらのラベルプレカーサーをウイルス感染後 3.5 時間目から 4 時間目まで加えて、パルスラベルを行なつた。

実験結果は図2に示される。

図2に示されるように、m. o. i. = 1 でウイルスを接種

表2 2回 ポリオウイルス感染細胞のH³-ウリジンとH³-パリンの取り込みに対する
アンチビリンの抑制作用



した場合、AVはH³-ウリジンとH³-パリンの取り込みを最も強く阻止する。ウイルス接種量をm.o.i.=2にした時はm.o.i.=1の場合にくらべて阻止効果は少ない。m.o.i.=0.5の場合はm.o.i.=1の場合より阻止効果が劣っているように一見みられるが、これはm.o.i.が低いためにウイルス再生過程の活動が充分でなく、したがって、ウイルス特異的核酸および蛋白質の合成が充分に行なわれていないのであろう。このために、ウイルス特異的に作用するAVの効果は充分に発揮されないのであると考えられる。AVのウイルス核酸合成抑制は蛋白質合成の抑制より強く、このことから考えて、AVはまず核酸合成に作用し、次いでその2次的現象として蛋白質合成に作用するものと考えられる。

4. 感染性RNAの生成に対するAntivirineの作用

以上の検討によつて、AVはウイルス感染細胞におけるウイルス特異的RNAの合成を抑制するが、細胞性RNAの合成は抑制しないことが明らかになった。そこで、AVのウイルスRNA合成に対する影響をさらに明らかにする目的で、感染性RNAの生成に対するAVの影響を検討した。

培養瓶にHep. No. 2細胞の単層細胞を成立させる。1μg/mlのActinomycin D作用下で、MEF₁株ウイルスをm.o.i.=2で接種する。37°C 60分吸着後、未吸着ウイルスを洗い去り、AV 0.3 mlを加え、さらに維持培地として2%牛血清加YLAを加え37°C一定期間培養する。ウイルス感染後各時間に細胞をかきとり、実験方法の章で記述した方法にしたがい感染性RNAを抽出する。

実験結果は表2に示される。

表2に示されるように、ウイルス感染後1時間から5時間目までは、感染性RNAは検出されなかつたが、感染後6時間では、対照では 2×10^8 PFU/ml、AV処理群

第2表 アンチビリンの感染性RNAの形成に対する作用

*RNA抽出時間(時間)	対照群(PFU)	アンチビリン処理群(PFU)	阻止%
1	$<10^1$		
2	$<10^1$	$<10^1$	
3	$<10^1$	$<10^1$	
4	$<10^1$	$<10^1$	
5	$<10^1$	$<10^1$	
6	2×10^8	$<10^1$	>99.5
18	1.54×10^8	8.0×10^4	48.1

* ウイルス感染後の時間

単層細胞の成立したHep. No. 2細胞に1μg/mlのアクチノマイシンD作用下でMEF₁株ウイルスをm.o.i.=2で接種する。37°C 60分吸着後、未吸着ウイルスを洗い去り、アンチビリンを加え37°Cで一定期間培養する。ウイルス感染後、各時間に細胞をかきとり、感染性RNAを抽出する

は 10^1 PFU/ml以下で、AVは99.5%以上の阻止作用を示し、感染後18時間では、対照が 1.54×10^8 PFU/ml、AV処理群は 8.0×10^4 PFU/mlで48.1%の阻止作用を示している。これらの結果と前章における結果とを総合すると、AVはウイルス感染細胞におけるウイルス特異的核酸の生成に対し、抑制効果を示すものであると言える。

考 察

この報告において、我々はAVがポリオウイルス感染細胞において、ウイルス再生の初期に最も強い阻止作用を示し、しかもその阻止効果はInterferonと異なり、Actinomycin D作用下でも発現されることを明らかにした。このことは、AVの効果はウイルス特異的素材の生成の阻止作用にあるのであり、しかも細胞性核酸合成には作用しないものであることを示唆している。AVは感染性RNAの生成とH³-ウリジンおよびH³-パリンのウイルス核酸およびウイルス蛋白質への取り込みをすべて抑制したが、その抑制効果は感染性核酸およびウイルス核酸に対して最も強く、ウイルス蛋白質に対する阻止効果は最も強く、ウイルス蛋白質に対する阻止効果は最も弱く、したがって、この効果はむしろ核酸合成阻止の2次的現象であると思われる。AVはウイルスを感染させない細胞においては、その核酸および蛋白質の双方の合成に対し、有意の抑制を示さない。これらの点より考察して、AVはウイルス特異的核酸の合成にまず作用するものと考えられる。AVがウイルスあるいは感染性RNAの生成に対し、80%以上の阻止効果を示すのに対し、H³-ウリジンのウイルス核酸への取り込みは僅かに50%程度しか阻止作用を示さないことから、AVの作用機

作として次のようなことが考えられる。

(1) AV の存在により不完全なウイルス核酸が生産されていて、その結果、感染性ウイルスとして成熟しない。

(2) AV はまずウイルス核酸合成に作用し、次いで、さらにウイルス核酸とウイルス蛋白の集約のステップに抑制効果を示し、その結果、ウイルスの成熟を抑制する。

(3) AV はウイルス特異的核酸の合成を阻止し、その2次的現象としてウイルス特異的機能蛋白質の合成を抑制する。その結果として、感染性 RNA の形成の抑制及びウイルス粒子の形成を阻止する。

これらの諸点については、今後さらに検討した上で、AV の作用機作の主要部位を明らかにしたいと考える。

要 約

AV は Actinomycin D の存在下においてもウイルスの再生初期の段階に阻止作用を示し、 H^3 -ウリジンのウイルス特異的核酸へのとりこみ、および感染性 RNA の生成を抑制した。しかし、 H^3 -ウリジンの非感染性細胞の RNA へのとりこみには有意の抑制を示さなかつた。 H^3 -パリンのウイルス特異的蛋白質へのとりこみに対する AV の抑制効果はウイルス核酸に対する作用より弱

いものであつた。

参 考 文 献

- 1) 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: 263~266, 1967
- 2) 豊島 滋, 瀬戸淑子, 戸根木尚子: 同上. 2. Antivirin の生産条件と力価測定. *Chemotherapy* 15: 267~270, 1967
- 3) 豊島 滋, 瀬戸淑子, 戸根木尚子: 同上. 3. 部分精製された Antivirin の性状. *Chemotherapy* 15: 271~274, 1967
- 4) HOLLAND, J. J., HOYER, B. H., MCLAREN, L. C. & SYVERTON, J. T.: Enteroviral ribonucleic acid. 1. Recovery from virus and assimilation by cells. *J. Exp. Med.*, **112**, 821, 1960
- 5) FREDERICK L. SCHAFFER & MARJORIE GORDON: Differential inhibitory effects of actinomycin D among strains of poliovirus. *J. Bact.* **91**, 2309~2316, 1966
- 6) PHILIPS I. MARCUS & TESSE M. SALB: Molecular basis of interferon action: Inhibition of viral RNA translation. *Virology* **30**, 502~516, 1966

STUDIES ON THE HIGH MOLECULAR SUBSTANCES POSSESSING CHEMOTHERAPEUTIC ACTIVITY. VI

The Effect of Antivirin on Poliovirus Ribonucleic Acid and Protein
Synthesis in Infected Cells

YOSHIKO SETO, HISAKO TONEGI and SHIGESHI TOYOSHIMA

Division of Biochemical Pharmacology, Pharmaceutical Institute, School of Medicine,
Keio Gijuku University

Antivirin depresses the development of infectious poliovirus particles, the incorporation of H^3 -uridine into viral specific RNA and the formation of infectious RNA in the early time of the multiplication-step, even in the presence of actinomycin D.

Antivirin, however, does not depress the incorporation of H^3 -uridine into cellular RNA. The inhibitory effect of A antivirin on the incorporation of H^3 -valin into viral specific protein is lower than that on viral specific RNA-synthesis.