

化学療法的活性をもつ生体成分の研究 VII

Antivirin-E の抗ウイルス性について

藤田 晴久・豊島 滋

慶応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)

Antivirin は前報¹⁻³⁾において報告されたとおり、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。一般に細胞は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と考え、前報⁴⁾に於いて悪性腫瘍を接種したマウスの腹水中に腫瘍抗体と異なる抗腫瘍活性の因子のあることを見出した。我々はこの阻止物質を Antivirin-E (以下、AV-E) と呼んでいる。この報告は AV-E の RNA 系および DNA 系ウイルスの細胞内増殖阻止効果に関するものである。

実験材料および方法

使用細胞：ウイルスの増殖のためには、全実験を通じ Hep. No. 2 細胞を用いた。細胞の増殖培地として、15% 牛血清加 Y. L. A. を、維持培地としては 2% 牛血清加 Y. L. A. を用いた。

ウイルス材料：実験に用いたウイルスは Polio 1 型 MAHONEY 株、2 型 MEF₁ 株、3 型 SAUKETT 株 Vaccinia ウイルス DV-7 株である。ウイルス量はブラック測定による PFU の決定と、細胞変性効果を観察して TCID₅₀ を決定による 2 つの方法を用いて定量した。ブラック測定のための寒天上層培地は 4% 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、さらに中性赤を最終濃度 3 万倍希釈に加えたものを寒天上層培地とした。

粗 Antivirin-E の調整：粗 AV-E は次のようにして調整された。体重 25~30 g のマウスにエーリヒ癌細胞を 300 万~400 万个接種して 10 日後腹水を集める。3,000 rpm 20 分間遠心して沈澱した細胞を除き、さらに 10,000 rpm 60 分間遠心した上清を carbowax #6000 で原液量の約 2 倍に濃縮し、4°C で 1 夜 phosphate buffer saline に対して透析し、3,000 rpm 15 分間遠心した上清を粗 AV-E とした。使用に当つては濾過または 12,000 rpm 60 分間の遠心滅菌を行なう。このようにして調整された粗 AV-E は次のようにして部分精製された。

粗 Antivirin-E の部分精製法：粗 AV-E に活性炭を 5% に加え濾過後、炭末を pH 3.0 のエタノールで溶出

し、減圧濃縮後、pH 7.6 の phosphate buffer saline を加え、さらに pH 7.4 に調整する。使用に当つては前述のとおり滅菌する。

Antivirin-E の酵素分解の実験：1) Trypsin による分解：200 mcg の AV-E と 2,000 mcg の trypsin を混合し 37°C で 2 時間反応させ、直ちに氷冷して反応を止め trypsin inhibitor を加える。対照群は Trypsin free の phosphate buffer saline に同量の AV-E を加え前述の方法で反応させた。2) DNase および RNase による分解：200 mcg の AV-E と 20 mcg の DNase, あるいは RNase を 37°C 1 時間反応させ、直ちに氷冷して pH を酸性にして反応を止め、使用に当つて pH を 7.4 に再修正した。

Antivirin-E の熱安定性の実験：pH 7.4 の AV-E を 4°, 25°, 37°, 56°, 75° および 100°C で 60 分間処理後直ちに氷冷したものの効果を検討した。

Antivirin-E の pH 安定性の実験：AV-E を 4°C 下で pH をそれぞれ 2.0, 5.0, 7.0, 9.0 および 12.0 に調整し、25°C で 60 分間処理後、氷冷中で pH を 7.4 に修正したものの効果を検討した。

実験結果

1. 数種の動物ウイルスの増殖に対する Antivirin-E の抑制効果

まづ数種の動物ウイルスの増殖に対する AV-E の効果を検討した。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、2 型 MEF₁ 株、3 型 SAUKETT 株をそれぞれ m. o. i. = 1 に接種し、37°C で 60 分間吸着させた。吸着時間の終了後、未吸着ウイルスを洗い去り AV-E 0.1 ml 維持培地 0.9 ml 対照群には AV-E の代りに同量の pH 7.6 の phosphate buffer saline を加え 23 時間培養後の細胞外の感染性ウイルス量を測定して AV-E の阻止効果を求めた。Vaccinia ウイルスではウイルス 10 倍希釈液を Hep. No. 2 細胞の単層培養の成立した試験管に接種し、37°C で 3 時間吸着後、未吸着ウイルスを流去し、AV-E を加える。37°C 5 日間培養後 TCID₅₀ を求めた。

表 1 のとおり、AV E は sero-type に関係なく、RNA

表 1 Antivirin-E の投与による数種のウイルスの増殖阻止

種類及び型と株	24 時間後の細胞外ウイルス量		
	PFU/ml		阻止パーセント (%)
	対 照	AV-E 投与群	
Polio 1 型 MAHONEY	1.5×10^7	8.2×10^6	94
2 型 MEF ₁	1.7×10^7	8.4×10^6	93
3 型 SAUKETT	1.5×10^7	8.3×10^6	92
Vaccinia DV-97	5 日後の TCID ₅₀ /ml		>99
	$10^{6.5}$	$10^{8.5}$	

ウイルスである Polio ウイルスにも、DNA 系ウイルスである Vaccinia ウイルスにも増殖抑制効果を示す。

2. Antivirin-E に対する蛋白質及び核酸分解酵素の影響

次に AV-E の性状を知るために蛋白質分解酵素および核酸分解酵素の影響を検討した。まづ部分精製 AV-E の紫外吸収スペクトルをみると、215 mμ と 280 mμ に最大吸収を示し、260 mμ には吸着を認めないので、まづ蛋白質分解酵素による AV-E 活性の失活を検討した。また DNase, RNase 処理による AV-E 失活の可能性を検討した。実験の結果を表 2 に示す。

結果から明かなように、AV-E は Trypsin 処理で完全に失活を受けた。いつばう DNase と RNase では失活は認められなかつた。以上のことから AV-E は蛋白質性のものであると考えられる。

3. Antivirin-E の熱安定性と pH 安定性

Interferon および Interferon 様物質は常温では 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 分間の加熱でその活性を失なうと報告⁹⁾されている。そこで AV-E 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 でみられるとおり、AV-E は 25°C 60 分間で観察した場合 pH 7.0 で安定であり、酸性およびアルカリ性側で失活が認められる。また pH 7.4 60 分間の条件では 56°C で約 50% の失活が認められた。

表 2 Antivirin-E の酵素分解の検討

酵素分解の条件				PFU/ml		
作用した酵素	量 (mcg)	反応温度 (°C)	反応時間 (分)	AV-E 処理群	対 照 群	阻止パーセント (%)
Trypsin	2,000	37	120	2.27×10^6	2.94×10^6	19.4
DNase	20	37	60	0.38×10^6		87.0
RNase	20	37	60	0.31×10^6		89.4
Enzyme-free の PBS に溶解した AV-E	0	37	120	0.42×10^6		85.7

4. Antivirin-E による細胞内ウイルス増殖の抑制

次に AV-E の作用部位を明らかにするために次の点について検討した。

(1) ウイ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 2 型 MEF₁ 株を m. o. i. = 1 で接種する。AV-E 処理群では接種ウイルス稀釈液に 0.1 cc の AV-E 液を加えて 1 試験管当りの液量を 1 cc となるようにし、対照群では AV-E の代りに同量の PBS を加える。37°C 60 分間吸着後、細胞外液を除去し、PBS で 3 回洗い、洗液と細胞外液を合して、その全 PFU を測定する。接種ウイルス量からこの未吸着ウイルス量の差を吸着ウイルス量とする。実験の結果を表 4 に示す。

表で示されるように、AV-E がウイルス吸着に作用することはまづないと言える。

(2) 宿主細胞よりのウイルス游出に対する作用

単層培養の成立した Hep. No. 2 細胞に m. o. i. = 1 と

表 3 Antivirin E の耐熱性と pH 安定性

Antivirin E に加えた条件			PFU/ml*		
温 度 (°C)	時間 (分)	pH	AV-E 処理群	対 照 群	阻止パーセント (%)
熱安定性の検討					
4			0.25×10^6	0.86×10^6	72.3
25			0.30×10^6		65.0
37	60	7.4	0.32×10^6		62.7
56			0.50×10^6		39.4
75			0.65×10^6		21.7
100			0.85×10^6		0
pH に対する安定性					
		2.0	0.48×10^6	0.76×10^6	36.0
		5.0	0.50×10^6		33.0
25	60	7.0	0.17×10^6		77.3
		9.0	0.56×10^6	0.76×10^6	25.0
		12.0	0.70×10^6		7.0

* m. o. i. = 1 で Polio 2 型 MEF₁ 株ウイルスを接種して 24 時間後の細胞外ウイルス量

表4 Polio 2型 MEF₁ 株ウイルスの細胞の Hep. No.2 吸着に対する Antivirin E の影響

群	接種ウイルス量 (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 (%)
対照群	4.45×10 ⁶	1.37×10 ⁴	4.31×10 ⁶	97.0
AV-E 群	4.45×10 ⁶	1.30×10 ⁴	4.32×10 ⁶	96.7

表5 Polio 2型 MEF₁ 株ウイルスの Hep. No.2 細胞よりの游出に対する Antivirin E の作用

群	細胞内ウイルス量		細胞外に游出したウイルス量	
	全 PFU	阻止パーセント (%)	全 PFU	阻止パーセント (%)
対照群	3.5×10 ⁴		6.6×10 ²	
AV-E 群	3.6×10 ⁴	0	6.6×10 ²	0

表6 Polio 2型 MEF₁ 株ウイルスの Hep. No.2 細胞での再生に対する Antivirin E 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 (%)
対照群	4.5×10 ⁴		8.1×10 ⁸	
AV-E 1*	8.1×10 ³	82.0	5.0×10 ²	93.8
AV-E 2**	1.1×10 ⁴	75.5	7.6×10 ²	90.6

* AV-E をウイルス接種後1時間目～3時間目まで加え、6時間目にウイルス量を定量

** AV-E をウイルス接種後3時間目～6時間目まで加え、6時間目にウイルス量を定量

して Polio 2型 MEF₁ 株を接種し、37°C 60分間吸着させ、未吸着ウイルスを洗い去った後新鮮な維持培地を加え、さらに培養を続ける。ウイルス接種後4.5時間で細胞外液をすてて、PBSで3回洗った後、AV-E 群では AV-E 0.1 cc 含有維持培地を 1.0 cc、また対照群では AV-E の代りに PBS を同量加え、37°C で30分間培養し游出ウイルス量と細胞内ウイルス量を測定した。

表5に結果を示す。表にみられるように、AV-E はウイルス游出には影響を及ぼさない。

(3) ウイルス再生初期過程に対する Antivirin-E の作用

以上の検討で AV-E のウイルス吸着と游出に阻止効果を示さないことが明らかであるので、細胞内ウイルス増殖に対する AV-E の効果を検討した。Hep. No.2 細胞の単層培養の成立した試験管に Polio 2型 MEF₁ 株を m.o.i.=1 で接種する。37°C 60分間の吸着後未吸着ウイルスを流去する。対照群では PBS 0.1 cc を含む維持培地 1.0 cc を試験管に加える。AV-E 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-E を加えたのち、培養液を流去し、再び新鮮な維持培地を加えて培養を続け、ウイルス接種後6時間目に細胞内および細胞外ウイルス量を定量する。第2群はウイルス接種後3時間目までは対照群と同様に処理し、3時間目に AV-E を加えて、さらに6時間目まで培養して細胞内および細胞外ウイルスを定量する。実験の結果を表6に示す。

表6で明らかとなり、第1群では細胞外ウイルス量は93.8%、細胞内ウイルスは82%の抑制を示したのに対して、第2群は細胞外が90.6%、細胞内が75%の抑制を示した。第1群の細胞内ウイルス抑制率は第2群の抑制率に対し推計学的に有意であり、このことからウイルス再生の初期過程に AV-E は作用するものと考えられる。

考 察

BALTIMORE⁶⁾ らによれば、Polio ウイルスは 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時間後に初めて RNA はウイルス粒子の中にくみ込まれ始める。そして4時間近くになる合成された RNA の20%がウイルスの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-E を作用させた場合に最も強い阻止効果を得た。このことは AV-E の作用部位が、ウイルス再生の初期、すなわち、ウイルス核酸と蛋白質合成の始まりから、これら2つのウイルス構成因子の結び付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-E は RNA 系ウイルスであるポリオと DNA 系ウイルスであるワクチニアウイルスに血清学的分類に関係なく作用した。このことは AV-E が市販の抗ウイルススペクトルをもつことを示唆している。我々が今回とりあげたウイルスの種類は限られた範囲のものであるが、AV-E の各種病原ウイルス感染に対する化学療法的検討は今後さらに進めて行きたいと考えている。また AV-E はその紫外部吸収スペクトルと蛋白質分解酵素による失活よりみて、蛋白性のものと考えられる。今日まで我々は培養細胞の生産する抗ウイルス因子を見出し、これを Antivirin と呼んで来たが AV-E と AV は熱安定性、pH 安定性、および蛋白質分解酵素による失活のすべての点で異なつた別個のものであると考えられる。また AV-E は熱安定性、蛋白質分解酵素による失活態度は Interferon に類似しているが、その pH 安定性の面で安定領域がせまく、この点で Interferon と異なる物質であると考えられる。

要 約

AV-E は Polio 1 型, 2 型, 3 型 及び Vaccinia ウイルスを著明に抑制する。AV-E は蛋白性のものであり, 細胞内ウイルス再生の初期過程に抑制効果を示す。

引用文献

- 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 (I) Antivirin 培養細胞の生産する新しい抗ウイルス性物質について。Chemotherapy 15, (3), 263~266, 1967
- 2) 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 (II) Antivirin の生産条件と力価測定。Chemotherapy 15, (3), 267~270, 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 (III) 部分精製された Antivirin の性状。Chemotherapy 15, (3), 271~273, 1967
- 4) 豊島 滋, 藤田晴久. 化学療法的活性をもつ生体成分の研究 (IV) 悪性腫瘍をもつたマウスの腹水中の抗腫瘍因子について。Chemotherapy 16, (3), 323~328, 1968
- 5) ISAACS, A.. Interferon. Ad. in Virus Research 10, 1~38 (1963)
- 6) 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. VII

Antivirin-E, an Antiviral Substance found in Ascites of Tumor bearing Mice

HARUHISA FUJITA and SHIGESHI TOYOSHIMA

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

Antivirin-E, an antiviral substance found in ascites of Ehrlich ascites tumor bearing mice, was investigated.

Antivirin-E was inhibitory on the intracellular multiplication of polio (types 1, 2 and 3) and vaccinia viruses. The site of action of antivirin-E was considered to be the inhibition of the replicative step of the intracellular multiplication of susceptible virus. The antiviral activity was inactivated by proteolytic enzyme treatment, but not with both RNase and DNase. Antivirin E's activity was unstable in the pH range of acidic and alkali sites, and was decreased to 50% by heating at 57°C for 60 minutes.