

1,2-Bis [5(or 6)-methoxy-2-benzimidazolyl] 1,2-ethanediol の 抗ポリオウイルス作用¹⁾ (その 2)

秋 浜 澄 行

明治薬科大学

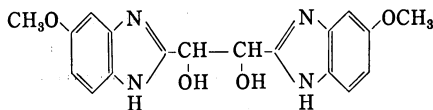
(昭和 46 年 1 月 19 日受付)

1,2-Bis [5(or 6)-methoxy-2-benzimidazolyl] 1,2-ethanediol(BMBID) の抗ポリオウイルス作用機序として、私どもは現在までに、1) BMBID はポリオウイルスを直接不活化しない、2) ウイルスの宿主細胞に対する吸着を阻止しない、3) 細胞内でのウイルス増殖を強く抑制し、ウイルス取量をいちじるしく低下させる、ことなどを明らかにした¹⁾。2-(α -Hydroxybenzyl) benzimidazole(HBB) の抗ポリオウイルス作用はポリオウイルス RNA polymerase の誘導を抑制し、その結果ウイルス RNA の形成が阻止されるためと考えられている²⁾。今回は HBB と比較的類似の構造をもつ BMBID もポリオウイルス RNA の形成を阻止するかどうか、またウイルス RNA に対してどのように作用するかについて検討を加え、BMBID の抗ポリオウイルス作用機序の解析を行なった。

実験材料と実験方法

宿主細胞として HeLa S₃ 細胞を、ウイルスはポリオウイルス 1 型、(MAHONEY 株) と 2 型(MEF₁ 株) を、また増殖培地として 10% 仔牛血清を加えた YLE 培地 (0.1% 酵母エキス、0.5% ラクトアルブミン加水分解物を含む Earle 塩類溶液)、維持培地として 4% 仔牛血清を加えた YLE 培地、寒天培地として 0.9% 寒天(Difco 製) を含む維持培地を使用した。

Actinomycin D はメルク株式会社から供与を受け、¹⁴C-uridine (50 mc C/ml, 58 mC/mM) は日本放射性同位元素協会のもを、また下記の構造式の BMBID は 4-methoxy-*o*-phenylenediamine と DL-酒石酸とから合成して³⁾使用した。



感染性 RNA の抽出

HeLa S₃ 細胞の単層にポリオウイルスを moi 約 100 で接種し 37°C で 1 時間吸着させる。ウイルス接種液を除き細胞は PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2) で洗浄後維持培地を加えて 37°C で培養を続ける。ウイルス接種後適当な時間に維持培地を除き、ラバーポリス

マンで細胞を培養瓶からはがし RNA 抽出液 (1 mM EDTA, 0.14 M NaCl 含有 0.01 M トリス緩衝液, pH 7.2) に懸濁させてから WECKER⁴⁾ らのフェノール法を用いて感染性 RNA を抽出した。また感染性 RNA の定量は CARP⁵⁾ の方法にしたがって行なつた。

¹⁴C-uridine の RNA への取り込み

ウイルス RNA への ¹⁴C-uridine の取り込みは BUCKNALL ら⁶⁾ の方法を利用して行なつた。すなわち培養試験管に HeLa S₃ 細胞の増殖培地懸濁液 (約 1×10⁶ cells/ml) を 1 ml 入れて 37°C で 3 日間静置培養して細胞単層を作る。増殖培地を除き PBS で洗浄後 Eagle 培地 0.45 ml, 50 mcg/ml actinomycin D 0.05 ml を加えて 37°C で 1 時間培養する。つぎにウイルス希釈液 0.1 ml(moi 約 50) を接種して 37°C で 30 分間吸着させる。接種液を除き PBS で洗浄後 Eagle 培地 0.7 ml, 50 mcg/ml actinomycin D 0.1 ml, 400 mcg/ml thymidine 0.05 ml, 354 mcg/ml (10⁻⁸ M) BMBID 0.1 ml, および ¹⁴C-uridine 0.1 ml (0.1 mcC) を加えて全量を 1.0 ml とし 37°C で培養する。ウイルス対照群には BMBID 溶液のかわりに PBS 0.1 ml を使用。ウイルス感染後 3, 4, 5 および 6 時間目に細胞を冷 PBS で 2 回、冷 10% 過塩素酸水溶液で 2 回、再び冷 PBS で 2 回洗浄後 0.25% トリプシン溶液(Difco 製を 1:250) 1 ml 加えて 40°C で 30 分間消化する。後強く振盪して細胞を培養試験管から離し、ジオキサン-PPO-ナフタリンのシンチレータ 8 ml を加えて液体シンチレーションスペクトロメータ(堀場製)でカウントする。

実験結果

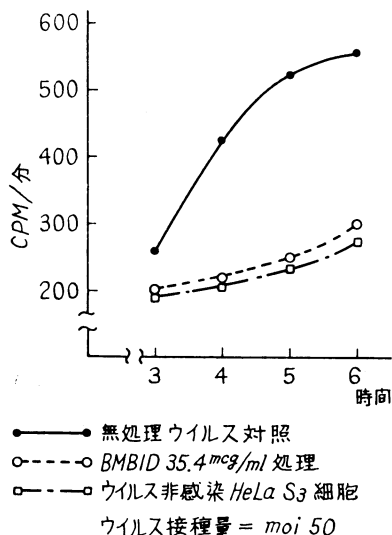
ポリオウイルス RNA 形成に及ぼす影響

BMBID 35.4 mcg/ml (10⁻⁴ M) の存在下 HeLa S₃ 細胞に MAHONEY 株を感染させ、後 6 および 10 時間目に細胞内の感染性 RNA をフェノール法で抽出して測定すると、無処理の対照群では感染 6 時間後で 5×10⁸ PFU/ml, 10 時間目では 1.4×10⁸ PFU/ml の感染性 RNA 形成が見られるのに対し BMBID 処理群では感染性 RNA の形成は確認できなかつた。しかし BMBID 濃度をウイルス増殖阻止効果の低い 0.35 mcg/ml(10⁻⁶

表 1 感染性 RNA 形成に対する BMBID の効果

ウイルス株	培養時間 (hr.)	BMBID 濃度 (mcg/ml)	感染性 RNA 量 (PFU/ml)
MAHONEY	6	35.4	$<5.0 \times 10^1$
		0.35	2.5×10^2
		0.00	5.0×10^3
	10	35.4	$<2.0 \times 10^1$
		0.35	5.0×10^2
		0.00	1.4×10^4
MEF ₁	12	35.4	$<5.0 \times 10^1$
		0.00	3.5×10^3

ウイルス接種量 = moi 100

図 1 ¹⁴C-uridine のポリオウイルス RNA への取り込み

M) にすると感染性 RNA 形成は無処理対照群よりも低いけれど認められる。また接種ウイルス株として MEF₁ 株を使用した時でも 35.4 mcg/ml の BMBID 処理では感染性 RNA の形成は見られなかった。

いつぼう ¹⁴C-uridine のウイルス RNA への取り込みは無処理対照群ではウイルス感染後増加しているのに対し BMBID 処理群ではほとんど ¹⁴C-uridine の特異的な取り込みは見られなかった。したがって BMBID はウイルス RNA 形成を阻止するものと考えられる。

感染性 RNA の宿主細胞感染に及ぼす影響

MEF₁ 株の感染性 RNA を HeLa S₃ 細胞の単層に感染させたのち、種々の濃度の BMBID を含む寒天培地を加えて感染性 RNA 感染によつて起るブラック形成に対する効果を調べてみると、35.4~0.35 mcg/ml 濃度の

表 2 感染性 RNA 感染に及ぼす影響 (1) ブラック形成に対する効果

BMBID 濃度 (mcg/ml)	ブラック数 (PFU/bottle)	抑制率 (%)
35.40	0	100.0
3.54	0	100.0
0.35	0	100.0
0.035	13.75	37.0
0.003	15.50	23.4
0.000(対照)	20.25	—

ブラック数はブラック瓶 4 本の平均値

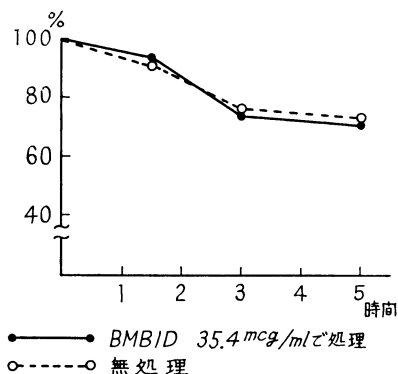
表 3 感染性 RNA 感染に及ぼす影響 (2) ウイルス収量に対する効果

培養時間 (hr.)	ウイルス収量 (PFU/ml)	
	無処理	処理
8	2.00×10^3	$<1.0 \times 10^1$
12	2.75×10^3	$<1.0 \times 10^1$
24	1.02×10^4	$<1.0 \times 10^1$

感染性 RNA 接種量 = moi 0.004

BMBID 濃度 = 35.4 mcg/ml

図 2 感染性 RNA の不活化作用



BMBID 処理では完全にブラック形成を抑制している。

また感染性 RNA を moi 0.004 で HeLa S₃ 細胞に感染させたのち、35.4 mcg/ml の BMBID を含む維持培地を加えて 37°C で培養し感染後 8, 12 および 24 時間目に維持培地を除き、PBS で細胞を洗浄後細胞内のウイルスを凍結融解によつて集め、そのウイルス量をブラック法で測定してみると無処理対照群では培養時間の延長につれて細胞内ウイルス量が増加しているにもかかわらず BMBID 処理群では細胞内ウイルスを確認できなかった。

表 4 Eclipse に及ぼす BMBID の効果

培養時間 (min.)	Eclipse に入らない残余ウイルス量 (%)			
	実 験 1		実 験 2	
	無処理	処 理	無処理	処 理
10	56.6	66.3		
20	67.6	58.3	44.0	53.3
30	51.6	56.0	42.6	38.3
40	56.6	53.6	42.3	43.3

ウイルス接種量 = moi 10
BMBID 濃度 = 35.4 mcg/ml

この感染性 RNA 感染に対する BMBID の阻止効果は BMBID による感染性 RNA の不活化作用によつて起こる可能性が考えられる。この点を明らかにするために 2×10^6 PFU/ml の MEF₁ 株感染性 RNA を 35.4 mcg/ml 濃度の BMBID と混合し 37°C で静置する。対照として BMBID の代わりに PBS を用い、1.5, 3 および 5 時間後に反応混液から少量サンプルとして取り、ブラック法で不活化されていない感染性 RNA 量を測定した。この結果、図 2 に示すとおり、無処理対照群と BMBID 処理群の不活化曲線に有意な差が見られず BMBID には感染性 RNA に対する特異的な直接不活化作用は無いものと考えられ、したがつて BMBID はポリオウイルス RNA の複製を抑制するものと推定される。

考 察

BMBID の抗ポリオウイルス作用機序として前回は BMBID はウイルス不活化作用や吸着阻止作用を示さず細胞内でのウイルス増殖の段階に作用すること、今回の実験で感染性 RNA の形成を抑制することを明らかにした。ウイルスが細胞に吸着し RNA の複製を起こすまでに侵入と脱殻の 2 段階の存在が考えられている。

HeLa S₃ 細胞に moi 10 の MAHONEY 株を BMBID 35.4 mcg/ml の存在下で接種し 37°C で培養、ウイルス接種後 10~40 分に凍結融解を行なつて eclipse に入っていない残余ウイルスを集めブラック法で求めると無処理対照群との間にほとんど差が見られない。したがつて BMBID は eclipse に入る過程は阻害していない

と推定される。また表 2 や 3 に示すように感染性 RNA を HeLa S₃ 細胞に感染させた場合 (脱殻が完了した状態) でも BMBID はウイルス形成を阻止し、この阻止は感染性 RNA の不活化によるものでないことから BMBID は前記の侵入、脱殻の 2 段階には阻止作用を示さず、ポリオウイルス RNA の複製過程に対して阻害的に作用し、その結果ウイルス粒子の形成が阻止されるものと考えられる。

総 括

BMBID はポリオウイルスの感染性 RNA の形成を抑制し、また ¹⁴C-uridine の取り込みをも抑制する。感染性 RNA を HeLa S₃ 細胞に感染させた時でも BMBID はウイルス収量を減少させ、またブラック形成を抑制する。しかし BMBID は感染性 RNA を不活化しない。したがつて BMBID はポリオウイルス RNA の複製を阻止するものと考えられる。

参 考 文 献

- 1) 秋浜澄行, 佐藤勝雄: 1, 2-Bis[5(or 6)-methoxy-2-benzimidazolyl] 1, 2-ethanediol の抗ポリオウイルス作用. *Chemotherapy* 19(2): 125~128, 1971
- 2) BALTIMORE, D.; H. J. EGGERS, R. M. FRANKLIN & I. TAMM: Poliovirus-induced RNA polymerase and the effects of virus-specific inhibitors on its production. *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A.* 49: 843~849, 1963
- 3) AKIHAMA, S.; M. OKUDE, K. SATO & S. IWA-UCHI: Inhibitory effect of 1, 2-bis (2-benzimidazolyl) 1, 2-ethanediol derivatives on poliovirus. *Nature* 217: 562~563, 1968
- 4) WECKER, E.; K. HUMMELER & O. GOETZ: Relationship between viral RNA and viral protein synthesis. *Virology* 17: 110~117, 1962
- 5) CARP, R. I.: Studies on the guanidine character of poliovirus. *Virology* 22: 270~279, 1964
- 6) BUCKNALL, R. A.: The effects of substituted benzimidazoles on the growth of viruses and the nucleic acid metabolism of host cells. *J. Gen. Virol.* 1: 89~99, 1971

ANTIVIRAL ACTION OF 1,2-BIS [5(OR 6)-METHOXY-2-BENZIMIDAZOLYL] 1,2-ETHANEDIOL ON POLIOVIRUS (II)

SUMIYUKI AKIHAMA

Department of Biochemistry. Meiji College of Pharmacy

1,2-Bis[5(or 6)-methoxy-2-benzimidazolyl] 1,2-ethanediol (BMBID) at a concentration of 35.4 mcg/ml (10^{-4} M) clearly inhibited the formation of infectious RNA of poliovirus and the incorporation of 14 C-uridine into poliovirus RNA. Marked reduction of virus yield and inhibition of plaque formation could be demonstrated when the infectious RNA was infected on HeLa S₃ cells in the presence of BMBID, but BMBID did not have any direct inactivation effect on infectious RNA of poliovirus. It is thought therefore that the inhibitory effect of poliovirus growth by BMBID may be due to an inhibition of viral RNA replication.