

# 単純疱疹ウイルスの増殖に及ぼす生活環境物質の影響

福岡真理子・瀬戸 淑子・藤田 晴久・豊島 滋

慶応義塾大学医学部薬化学研究所化学療法部門

(昭和 59 年 11 月 16 日受付)

人の日常生活の中で体内に摂取する環境物質が、単純疱疹ウイルス、2型(HSV-2)の感染症にいかん影響を及ぼすかを研究する目的で、HSV-2のブラック形成、一段増殖、およびHSV-2誘導性 thymidine kinase 活性に対する環境物質の作用を検討した。HSV-2のブラック形成には、食用色素の amaranth, erythrosine, 化粧品色素の rhodamine B が抑制作用を示し、HSV-2の一段増殖には、amaranth, erythrosine, rhodamine B のほか、香料の safrole に抑制作用が認められた。一方、煙草成分の nicotine には HSV-2 の増殖促進作用が認められた。nicotine には、さらに紫外線処理 HSV-2 のブラック発現をも促進した。nicotine には DNA 修復機能促進作用が報告されているので、その作用によって HSV-2 の増殖ならびに紫外線照射ウイルスのブラック形成を促進したと考えられる。HSV-2 誘導性 thymidine kinase 活性については、amaranth のみが thymidine kinase 活性を抑制したが、ウイルス増殖抑制濃度に比較すると高濃度を要したため、amaranth の抗 HSV-2 作用点は thymidine kinase 活性以外にあると思われる。この研究において、我々が日常生活の中で頻回に摂取し得る物質の中には HSV-2 の増殖に抑制的、あるいは促進的に作用するものが存在し、HSV 感染症に何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。

単純疱疹ウイルス (Herpes simplex virus : HSV) は、通常、人では小児期に不顕性感染し、ほぼ 80~100% の人から抗体が検出されるが、感染性ウイルスが検出されることはなく、いわゆる静止感染状態となる。しかし、最近、公衆衛生の向上、および性意識の変化から、初感染年齢の上昇が認められ、重篤度ならびに伝播性に関して社会問題となってきている。

また、癌や臓器移植患者における再燃は、重篤な全身症となる。さらに、2型は子宮癌との相関性が疑われていることから、このウイルスの感染及び再燃機構の解明は極めて重要であると考えられる。

HSV の再燃には、紫外線、外傷、神経切断、発熱など、誘発因子が明らかな場合の外、直接的原因となるべき刺激が思い当たらないことも多い。即ち、HSV の再燃誘導に関与する物質、あるいは抑制する物質が現在までに知られている以外にも、生活環境の中に数多く存在するのではないかと考えられる。そこで、我々の研究グループは、食品添加物、煙草成分、医薬品などについて、HSV の増殖に及ぼす作用を検討し、HSV 感染症における環境物質の役割を考察した。

## I. 実験材料および方法

生活環境物質：我々が日常生活の中で、経口、経皮、経鼻的に摂取する環境物質として食品添加物から ama-

ranth(赤色2号), erythrosine(赤色3号), 香料から safrole, 化粧品用法定色素から rhodamine B, 医薬品から phenacetin, 染料から 2-acetylaminofluorene(2-AAF), 煙草成分から nicotine を用いた。amaranth erythrosine および nicotine は精製水に溶解し、20 mg/ml を薬物原液とした。safrole は ethanol で 20 mg/ml 原液とし、phenacetin は熱精製水で 2 mg/ml として使用培地に適宜に希釈して用いた。各物質の最高非毒性濃度は次のように決定した。即ち、96 穴のマイクロプレート (NUNC, Denmark) に培養した Flow 2000 細胞 (人胎児肺細胞)、または、Vero 細胞の単層培養細胞に、各被験環境物質の種々の濃度の希釈液を 0.1 ml 入れ、36.5°C で 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中で培養し、細胞の形態的变化を倒立顕微鏡下で 7 日間観察し、形態上対照正常細胞と等しく、何ら細胞毒性作用を発現しない最高濃度を測定した。

細胞：Flow 2000 細胞および Vero 細胞はそれぞれ継代数 16 代と 144 代のを Flow Lab. Co. (USA) より購入した。細胞の維持増殖には Eagle's minimum essential medium (MEM, 日水製薬〔株〕) に牛胎児血清 (Flow Lab. Co.) を 10% 添加した培地を用いた。

ウイルス：単純疱疹ウイルス、2型、169 株 (HSV-2) は、北里大学薬学部、西村千秋博士より分与された。

Table 1 Nontoxic maximum dose of each environmental substances in Flow 2000 cells

Environmental substances	Nontoxic maximum dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	Environmental substances	Nontoxic maximum dose ( $\mu\text{g/ml}$ )
Amaranth	500	2-Acetylaminofluorene	10
Erythrosine	100	Phenacetine	50
Safrole	100	Nicotine	200
Rhodamine B	20		

HSV-2 を Flow 2000 細胞に接種し、2% 牛胎児血清添加 MEM でウイルスによる細胞変性 (Cytopathic effect: CPE) が細胞層のほぼ 90% 以上に達するまで培養する。その後、培養瓶より感染細胞を掻き落とし、超音波発生装置 (Branson Sonic Power Co. USA) で 20 秒超音波処理を行ない、3,000 rpm, 10 分間遠心後の上清を  $-80^{\circ}\text{C}$  に凍結保存し、ウイルス材料として用いた。ウイルスの感染価は Vero 細胞においてブラックアッセイ法により測定した。

HSV-2 のブラック形成に及ぼす環境物質の作用の検討:  $5 \times 10^5$  個の Vero 細胞を径 35 mm のプラスチックディッシュ (NUNC, Denmark) に蒔き、2 日間インキュベーター中で培養し、単層培養細胞を得る。細胞面

をリン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.2, PBS) で洗い、1% 牛血清アルブミン (fraction V, Sigma, USA) 含有 Hank's 生理食塩水 (HBSS) で、ディッシュ当りのブラック数がほぼ 50 個になるように希釈したウイルス液の 0.1 ml を接種した。37°C 1 時間吸着後、各濃度の環境物質、10% 仔牛血清 (極東製薬(株)), 0.6% agarose (Seakam, USA) を含む MEM を加え 3 日間培養し、neutral red (Merck, West Germany) で生細胞を染色し、ブラック数を計数した。ウイルス感染価は、ブラック形成単位 (plaque forming unit: PFU) で表わす。

HSV-2 の一段増殖に及ぼす環境物質の作用の検討: プラスチック培養管 (Ambitube<sup>®</sup>, Lux Co. USA) に  $6 \times 10^5$  個の Flow 2000 細胞を蒔き、2 日間培養後、

Fig. 1 Effect of environmental substances on plaque formation of wild type HSV-2

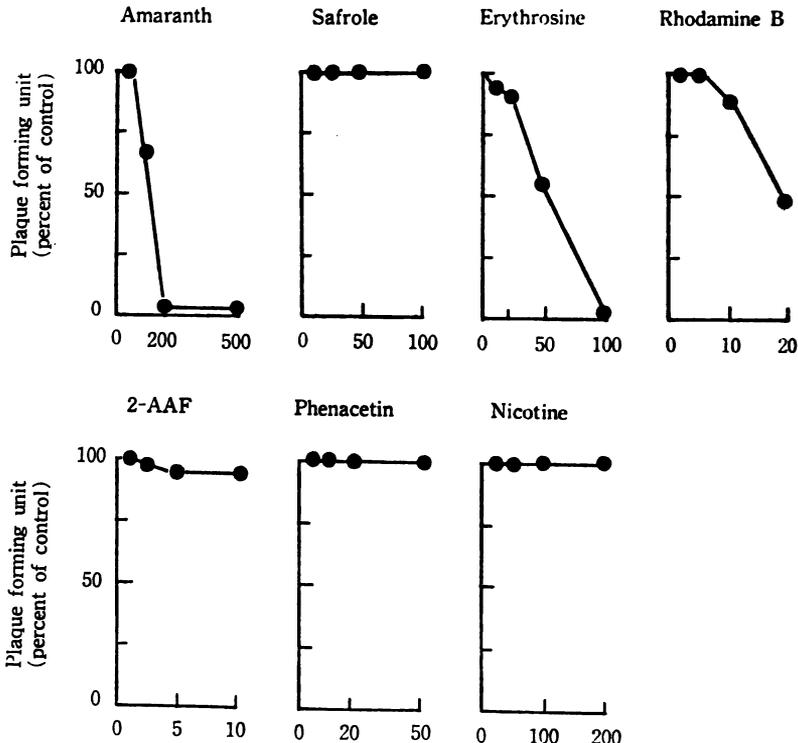
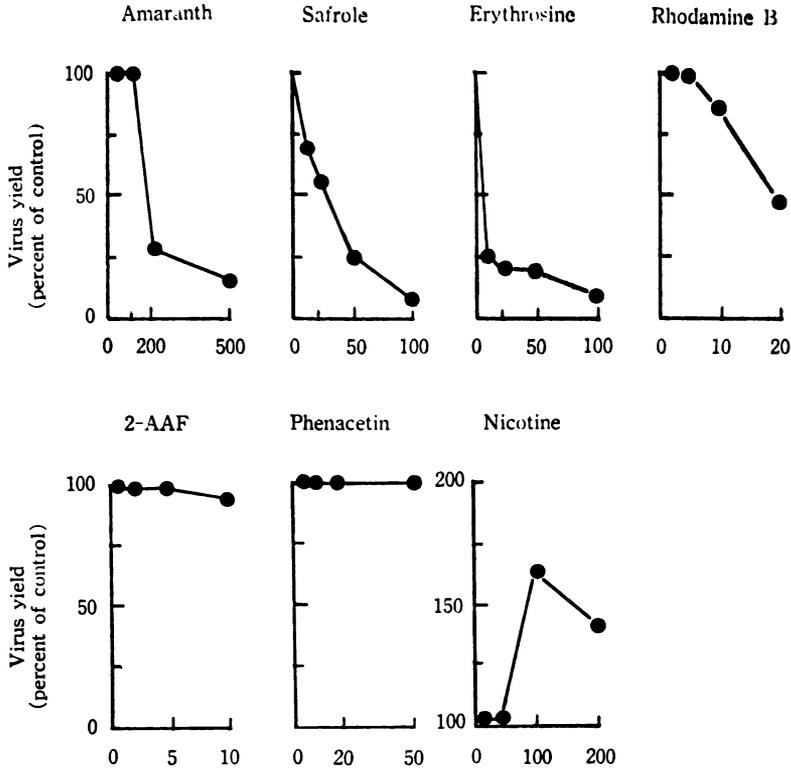


Fig. 2 Effect of environmental substances on one-step growth of wild type HSV-2



HSV-2 を細胞当りの感染率 (moi) 0.3 で接種する。1 時間吸着後、各濃度の被験物質および 10% 牛胎児血清を含む MEM を加え、20 時間培養する。細胞を超音波処理にて破壊し、3,000 rpm, 10 分間遠心後の上清について、ブラックアッセイ法で感染価を測定した。

HSV-2 誘導性 thymidine kinase 活性に対する環境物質の作用の検討:  $^3\text{H}$ -thymidine (56 mCi/mole, Amersham, UK), ATP (Sigma, USA),  $\text{MgCl}_2$  および  $\beta$ -mercaptoethanol (和光純薬(株)) を用い、リン酸化チミジンの分離は DEAE-cellulose disk (Watman, DE 81) を用いて LOWRY 法<sup>11)</sup>の方法に準じて測定した。

## II. 成績

### 1. 環境物質の細胞に対する毒性

用いた環境物質の培養細胞に対する毒性は、単層培養状態の細胞の形態変化で測定し、細胞形態に変化を来さない最高濃度を最高非毒性濃度として Table 1 に示した。

### 2. HSV-2 のブラック形成に及ぼす環境物質の作用

各環境物質の最高非毒性濃度以下の濃度について、HSV-2 のブラック形成に及ぼす影響を、Vero 細胞において測定した。その結果、amaranth, erythrosine, およ

び rhodamine B に、ブラック形成阻止作用があることが認められ、それぞれの 50% ブラック形成阻止濃度 (PDD<sub>50</sub>) は、150, 55, および 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。phenacetin, safrole, nicotine および 2-AAF は、最高非毒性濃度以下では、HSV-2 のブラック形成に何ら作用を及ぼさなかった。

しかし、ブラックアッセイは、1 個の感染単位を測定することであり、ブラック発現と、その感染単位からのウイルス産生量は必ずしも平行するものではない。即ち、ブラックの数には変化を来さないが、ウイルスの産生量に何らかの影響を与える物質が存在する可能性もある。そこで、次に、これらの環境物質について、HSV-2 の一段増殖に及ぼす影響を検討した。

### 3. HSV-2 の一段増殖に及ぼす環境物質の影響

Fig. 2 に示したように、amaranth, erythrosine, rhodamine B はブラックアッセイの時と同様に HSV-2 の増殖を抑制した。その 50% ウイルス増殖阻止濃度は、それぞれ、170, 6.7 および 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。なお、ブラックアッセイでは抑制作用の認められなかった safrole は HSV-2 の一段増殖を抑制し、その 50% ウイルス増殖阻止濃度は 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。一方、nicotine

Table 2 Effect of nicotine on the plaque formation of UV-irradiated HSV-2.

Nicotine ( $\mu\text{g/ml}$ )	No. of plaques per dish (Mean $\pm$ S.D.)	t
0	54.0 $\pm$ 3.65	
10	70.0 $\pm$ 5.12	P < 0.001
20	66.8 $\pm$ 4.09	P < 0.01
50	71.2 $\pm$ 7.40	P < 0.01
100	68.4 $\pm$ 9.63	P < 0.02
200	71.4 $\pm$ 6.27	P < 0.001

は、100  $\mu\text{g/ml}$  と 200  $\mu\text{g/ml}$  において HSV-2 の増殖を明らかに促進することが見出された。2-AAF および phenacetin は HSV-2 の増殖に何ら作用しなかった。

#### 4. 紫外線照射 HSV-2 のブラック発現に及ぼす nicotine の作用

テストされた環境物質の中で、nicotine は HSV-2 の一段増殖を促進したが、ブラック発現には作用を及ぼさなかった。nicotine は損傷を受けた DNA の修復機構を促すことが報告されているので HSV-2 の増殖促進作用も、おそらくウイルス感染によって誘導された細胞 DNA 修復機構が nicotine によって促進されたからであろうと考えられる。もし、細胞 DNA 修復機構が促進されているなら、障害を受けたウイルス DNA も修復されるであろう。そこで紫外線照射により軽度に障害を与えた HSV-2 のブラック形成に対する nicotine の作用を検討した。ウイルスは、殺菌ランプ (15 W, 東芝) 下 40 cm, 平均紫外線強度 246.5  $\mu\text{watt/cm}^2$  で 5 分間照射し、感染価として原材料のはぼ 1/2,000 に減少した材料を用いた。ウイルス吸着後、3 時間細胞を nicotine で処理し、細胞表面を PBS で洗浄後 agarose 培地を加え 72 時間後のブラック数をカウントした。

Table 2 に示すように、紫外線処理を受けた HSV-2 のブラック発現は nicotine によって明らかに促進され、nicotine が損傷を受けた HSV-2 の DNA を rescue することが確認された。また、テストした範囲では nicotine の濃度と、発現するブラック数には相関関係はなく、一定濃度以上の nicotine が必要でありかつ、充分であると考えられる。

#### 5. HSV-2 誘導性 thymidine kinase 活性へ及ぼす環境物質の影響

これまでの実験により、環境物質の中に HSV-2 の増殖を抑制するものと、促進するものが見出されたので、次に、ウイルス増殖の初期に、ウイルスの遺伝情報によって合成され、ウイルス DNA の合成に重要な役割を持つ thymidine kinase の活性に及ぼす作用を検討した。環境物質として、amaranth safrole, phenacetin, および nicotine を用いた。

Fig. 3 Effect of environmental substances on HSV-2 induced thymidine kinase activity

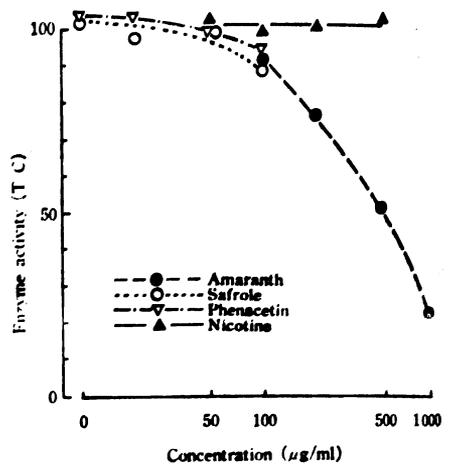


Fig. 3 に示すように、amaranth のみが高濃度において thymidine kinase 活性を抑制し、safrole および nicotine は、ほとんど作用を示さなかった。また amaranth においても、50% ブラック発現阻止濃度は 150  $\mu\text{g/ml}$ 、50% 一段増殖阻止濃度は 180  $\mu\text{g/ml}$  であったのに対し、50% thymidine kinase 阻止濃度は 500  $\mu\text{g/ml}$  であった。したがって、thymidine kinase 活性の阻止作用は amaranth の主な作用点とは考え難く、それ以外のウイルス増殖過程のどこかに作用しているものと考えられる。

#### 6. その他のウイルスのブラック形成に及ぼす環境物質の影響

HSV 1 型、及び RNA 系ウイルスである polio virus (1 型, Mahoney 株) と Venezuelan encephalitis virus (TC-83, ワクチン株) のブラック形成能に及ぼす作用を amaranth, safrole, phenacetin および nicotine について検討した。その結果、HSV-1 に対し amaranth は最高非毒性濃度で、ブラック発現阻止率として 16.5% を示したが RNA 系ウイルスには作用しなかった。さらに safrole, phenacetin 及び nicotine はいずれのウイルスのブラック発現にも影響を及ぼさなかった。

### III. 考 察

単純疱疹ウイルスの感染症に対し、日常生活の中に存在するさまざまな物質がどのように影響しているかを明らかにする目的で、いくつかの環境物質について、HSV-2 のブラック発現と、一段増殖、さらに HSV-2 誘導性 thymidine kinase 活性に対する作用を検討した。その結果、用いた数種の物質の中に HSV-2 の増殖を抑制するものと促進するものが見出された。

amaranth は美しい紅色と低毒性により多くの国々で食品添加物として使用されていた。しかし、SHTENBERG<sup>8)</sup> が 1976 年に受精率の低下および催奇性を報告したためアメリカ合衆国においては食用への使用が禁止された。しかしその後の研究で発癌性は確認できず、変異原性や胎児への毒性も認められなかったため<sup>9)</sup> 現在多くの国々で使用されている。この研究で amaranth は HSV-2 のブラック発現と一段増殖を抑制した。作用機序の詳細は明らかではないが、ウイルス増殖の基本的な過程を抑制すると思われる。また、いくつかの色素は、可視光線では phototoxic となるので<sup>5)</sup>、この場合も同様の作用による可能性も考えられる。抗ウイルス作用は HSV-1 より HSV-2 への作用の方が強かった。

erythrosine は現在のところ発癌性その他の危険性は認められていない<sup>7)</sup>。この研究では、HSV-2 のブラック発現と一段増殖を抑制した。erythrosine を含む xanthene 誘導体の多くに、phototoxicity が報告されている<sup>5)</sup>。この phototoxicity は細胞分裂の S 期に最も強いのでこのことも HSV 増殖抑制作用の一つの因子と考えられる。

safrole は、かつて石けんの香料に使用されていたが授乳前幼若マウスに強い発癌性を示すことが報告されて以来、多くの研究グループから変異原性が報告された<sup>10)</sup>。この研究で safrole は HSV-2 のブラック発現には作用しなかったが一段増殖を抑制した。このことに関しては次のことが考えられる。(i) safrole は水に難溶なのでブラック法で用いられる agarose 内では拡散が遅いこと、(ii) Flow 2000 細胞と、Vero 細胞では由来する動物の種属が異なるので代謝系が違ふこと、(iii) in put されたウイルスによるブラックの発現は阻害しないが、各ブラック中での、ウイルスの増殖が遅延されているか、または抑制されているかも知れないことなどである。

nicotine には DNA 修復機構促進により、変異原性物質の活性を促進することが知られている<sup>12)</sup>。本研究においても、nicotine は HSV-2 の一段増殖、紫外線処理 HSV-2 のブラック発現を促進した。しかし、紫外線処理をしない HSV-2 のブラック発現には作用しなかった。このことは、即ち、HSV-2 の感染によって誘導された細胞の DNA 修復機構をニコチンが促進することにより HSV-2 の増殖も促進される。そのことがさらに損傷ウイルス DNA の修復をも促進することを示唆している。したがって、損傷を受けていない wild な HSV-2 の DNA には作用しないため wild ウイルスのブラック発現には影響しないことと矛盾しない。

本研究により、日常生活の中で、人が体内に摂取する

環境物質の中には、HSV の増殖に抑制的に働くものと、促進的に働くものとが少なからず存在することが明らかとなった。

このことから、ある種の環境物質への頻回の曝露、あるいはその蓄積により、HSV の感染、発症、再燃、さらにそれらに対する治療効果の発現が重要な影響を受けていることが考えられる。したがって、これらの環境物質について、生体防御機構との相互作用の観点から、さらに、HSV の静止感染からのウイルス再活性化に対する作用の検討を行なっている。

本論文の要旨の一部は、第 6 回国際ウイルス学会 (1984, 仙台) において発表した。

なお、本研究の一部は、第 7 回日産学術研究助成金により行なわれた。

## 文 献

- 1) LOWRY, S. P.; P. E. BRESNICK & W. E. RAWLS: Differences in thymidine kinase-inducing ability of herpesvirus types 1 and 2. *Virology* 46: 958~961, 1971
- 2) SHTENBERG, A. I. & E. V. GAVRILENKO: Influence of the food dye-amaranth upon the reproductive function and development of progeny in tests on albino rats. *Vopr. Pitan.* 29: 66~73, 1970
- 3) MATSUSHITA, T.; T. SUGIMURA, M. NAGAO, T. YAHAGI, A. SHIRAI & M. SAWAMURA: Factors modulating mutagenicity in microbial tests. Short-term test systems for detecting carcinogens (NORPOTH; K. H. & R. C. GARNER) Berlin, Springer. pp. 274~285, 1980
- 4) CHUNG, K. T.; G. E. FULK & W. ANDREWS: Mutagenicity testing of some commonly used dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 641~648, 1981
- 5) MELNICK, J. L. & C. WALLIS: Photodynamic inactivation of herpes simplex virus: A status report. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 284: 171~181, 1977
- 6) OXMAN, M.: The clinical evaluation of photodynamic inactivation for the therapy of recurrent herpes simplex virus infection. *Photochem. Photobiol.* 25: 343~344, 1977
- 7) PRICE, P.; W. A. SUK, A. E. FREEMAN, W. T. LANE, R. L. PETERS, M. L. VERNON & R. J. HUEBNER. *In vitro* and *in vivo* indications of the carcinogenicity and toxicity of food dyes. *Int. J. Cancer* 21: 361~367, 1978
- 8) 小西宏明: 培養細胞を用いた xanthene 系色素の光毒性研究. *信州医誌* 29: 386~410, 1981
- 9) MILLER, J. A. & E. C. MILLER: Ultimate chemical carcinogens as reactive mutagenic electrophiles. *Origins of human cancer*. B, (HIATT,

- H. H., J. D. WATSON & J. A. WINSTEN) Cold Spring Harbour Laboratory. pp. 605~627, 1977
- 10) GREEN, N. R.: Screening of safrole, eugenol, their ninhydrine positive metabolites and selected secondary amines for potential mutagenicity. *Mutat. Res.* 57: 115~121, 1978
- 11) SWANSON, A. B.; D. D. CHAMBLISS, J. C. BLOMQUIST, E. C. MILLER & J. A. MILLER.: The mutagenicities of safrole, estragole, eugenol, trans-anethole, and some of their known or possible metabolites for salmonella typhimurium mutants. *Mutat. Res.* 60: 143~153, 1979
- 12) RIEBE, M.; K. WESTPHAL & P. FORTNAGEL.: Mutagenicity testing in bacterial test systems of some constituents of Tobacco. *Mutat. Res.* 101: 39~43, 1982

## EFFECT OF ENVIRONMENTAL SUBSTANCES ON THE REPLICATION OF HERPES SIMPLEX VIRUS *IN VITRO*

MARIKO FUKUMA, YOSHIKO SETO, HARUHISA FUJITA and SHIGESHI TOYOSHIMA  
Division of Chemotherapy, Pharmaceutical Institute,  
School of Medicine, Keio University

Some environmental substances which are taken into the body daily may affect the onset of virus infectious diseases and may influence the expression of chemotherapeutic effect. With this concept, various environmental substances were evaluated in some infection systems of HSV-2 *in vitro*. It was found that some food and cosmetic dyes (amaranth, erythrosine, rhodamine B) inhibited the plaque formation of HSV-2. Tobacco constituent (nicotine), aromatic (safrole), antifebrile drug (phenacetin) and materials of dyestuff (2-acetylaminofluorene; 2-AAF) did not affect the plaque formation of HSV-2. In one-step growth test, amaranth, erythrosine, rhodamine B and safrole inhibited the growth of HSV-2, while nicotine enhanced it. Also, nicotine enhanced the plaque formation of UV-irradiated HSV-2. Nicotine is known to enhance the DNA repair system. With a similar mechanism, nicotine may enhance the replication of HSV-2 and repair the UV-damaged viral DNA in infected cells. Phenacetin and 2-AAF did not affect the growth of this virus. HSV-2-induced thymidine kinase activity was reduced by amaranth with higher doses compared to which inhibit the virus growth. Other compounds tested, did not affect the thymidine kinase activity from HSV-2 infected cells.

From those experiments it was shown that some environmental substances affect the replication of HSV-2, and it was suggested that those substances may influence the onset and chemotherapy of HSV-infectious diseases.