

In vitro における静止感染ヘルペスウイルスの 再活性化に及ぼす生活環境物質の影響

福岡真理子・瀬戸 淑子・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 60 年 5 月 29 日受付)

今日までに私共は、日常生活の中で摂取され得る環境物質の中に、単純性疱疹ウイルス 2 型 (HSV-2) の増殖を抑制するものと促進するものが見出したので、今回はそれらの物質が *in vitro* の静止感染系において、HSV-2 の再活性化にいかん作用するかを検討した。静止感染系は、(i) 紫外線処理ウイルス (UV-HSV-2)、(ii) 代謝阻害剤処理細胞、および、(iii) *in vivo* 感染後のマウス三叉神経節、を用いて作製し、食用色素、医薬品、重金属を含む 13 個の環境物質についてその作用を検討した。その結果、(i) の系ではウイルス再活性化に対し amaranth, safrole は強く抑制し、erythrosine, 2-AAF, phenacetin は軽度に抑制した。一方 nicotine には促進作用が認められた。(ii) の系では amaranth に強い抑制作用が認められ、erythrosine, 2-AAF には軽度の抑制作用が認められた。そこで (iii) の系を用いて amaranth, safrole, phenacetin, nicotine について検討したがウイルス産生量に変動が大きく有意差は得られなかった。しかし phenacetin 処理群では非処理群に比べ 10 倍程度高い感染量が認められ、三叉神経節からのウイルス再活性化に対し、phenacetin は促進的に作用する傾向を示した。この研究で、静止感染系からのウイルス再活性化に対しても環境物質の中のいくつかは、抑制的あるいは促進的に作用することが認められ、再燃性ヘルペス感染症に対し、これらの環境物質が何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。

人が日常生活の中で摂取するさまざまな物質の中には、ウイルスによる感染症、特に持続性あるいは再発性感染症の発症と治療に何らかの影響を与えているものが存在するのではないかと、という観点から、我々の研究グループは単純性疱疹ウイルス (herpes simplex virus: HSV) の増殖に対する環境物質の作用を研究してきた。その結果、食品添加物、香粧品成分、煙草成分などのいくつかは、HSV 2 型 (HSV-2) の増殖を促進するものと抑制するものを見出した。そこで次に我々は、*in vitro* の静止感染系を用いて、HSV-2 の再活性化に及ぼす生活環境物質の影響を検討した。

静止感染系として、(i) ウイルス側に要因を置いた系で、紫外線照射 HSV-2 を用いる方法、(ii) 細胞側に要因を置いて、代謝阻害剤 (1- β -D-arabinofuranosylcytosine: Ara C) で DNA 合成を完全に抑制した細胞を用いる方法、および (iii) HSV-2 の静止感染した生体組織材料をそのまま用いる方法、により *in vitro* HSV-2 静止感染細胞系を作製し、そこからの HSV-2 の再活性化に及ぼす生活環境物質の影響を検討した。

I. 実験材料および方法

1) 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 amaranth (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, 染料原料から 2-acetylaminofluorene (2-AAF), 煙草成分から nicotine, タール成分から benzo(a)pyrene, 2,7-dimethyl-[α]benzanthracene (DMBA), および重金属から Sb, As, Hg, Cd を用いた。Amaranth, erythrosine, nicotine は精製水に溶解し、20 mg/ml を薬物原液とした。Safrole は ethanol で、benzo(a)pyrene, DMBA は dimethylsulfoxide (DMSO) で 20 mg/ml 原液とし、phenacetin は熱精製水で 2 mg/ml として使用培地で適宜に希釈して用いた。重金属は各金属の標準液 (Sb; 1,000 ppm/HCl, As; 1,000 ppm/NaCl, Hg; 1,000 ppm/HCl, Cd; 1,000 ppm/HCl, 和光純薬(株)) を使用培地で適宜希釈して用いた。各被験物質の Flow 2000 細胞 (人胎児肺細胞) における最高非毒性濃度は、36.5° または 40.5° に調整した炭酸ガス培養器中で、先の報文に記述した方法により測

定した。

2) ウイルス: HSV, 2 型, 169 株は北里大学薬学部西村千秋博士より分与された。ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) は国立予防衛生研究所 故, 甲野礼作博士より分与された。

3) 細胞: Flow 2000 細胞および Vero 細胞は Flow Lab. Co. (USA) よりそれぞれ 16 代および 144 代を購入し, 10% 牛胎児血清添加 MEM (Eagle's minimum essential medium) で増殖維持した。

4) HSV-2 の紫外線照射: HSV-2 の原材料をトリス緩衝液 (NaCl; 5.27 g, KCl; 0.26 g, CaCl₂; 0.11 g, MgSO₄·7H₂O; 2.47 g, クエン酸·H₂O; 1.05 g, Na₂HPO₄·2H₂O; 0.04 g, KH₂PO₄; 0.04 g, (tris-hydroxy-methyl)-aminomethane; 1.92 g, グルコース; 1.80 g を溶解し 1 l とする) で 1/10 に希釈し, 5 cmφ のプラスチックディッシュに 1 ml 入れ常時振とうしながら, 所定時間紫外線照射した。照射線源は東芝殺菌ランプ (15 W) を用い, 線源下 40 cm, 紫外線強度 246.5 μwatt/cm² (ultraviolet meter, model; DM-254 N, Spectronics Coop. USA で測定した) の条件下で行なった。

5) 紫外線照射 HSV-2 による静止感染系: 西山らの方法³⁾に準ずるが, 数点に変更を加えた。Ambitube® (Lux Co. USA) に Flow 2000 細胞を完全な単層状態に培養し, 紫外線照射 HSV-2 を紫外線照射前の感染価から計算し, 細胞 1 個当たり 0.3 個の感染率で感染させた。40.5°C で 1.5 時間吸着後, 細胞表面を温リン酸緩衝液で洗い, 10% 牛胎児血清添加 MEM を加え 40.5°, 5% CO₂ 下で 1 週間培養した。この間, 二度新鮮培地に交換した。HSV-2 の再活性化は培養温度を 36.5° に下げることにより行ない, 各被験環境物質はこの時点で添加された。reactivation の促進因子として用いた HCMV は HSV-2 静止感染細胞当たり (moi) 0.1 で接種し, 36.5° にて培養した。

6) 1-β-D-arabinofuranosylcytosine (Ara C) 処理細胞における静止感染系: COLBERG-POLEY らの方法³⁾に数点の変更を加えて作製した。Flow 2000 細胞を完全な単層状態とし, Ara C 25 μg/ml を含む培地で 5 時間前処理をした。moi 0.025 の HSV-2 を接種し, 1.5 時間吸着後リン酸緩衝液で細胞表面を洗浄し, Ara C 25 μg/ml を含む培地で 1 週間培養した。この間, 毎日 Ara C 25 μg/ml を含む新鮮培地で交換した。7 日後に Ara C を含まない培地に替え培養温度を 40.5° に保ち, 培地は 3 日ごとに交換した。この状態で 2 か月以上ウイルス潜伏状態で細胞を維持することができる。ウイルスの再活性化は培養温度を上昇した時点から 7 日目に, HCMV を

moi 0.02 で重感染させることにより行ない, 被験物質の添加は, HCMV の重感染直後に行なった。

ウイルスの増殖に伴って発現する CPE を 5 段階に分けてスコアとして表わした時, 感染価との関連性は 4: 75% 以上の細胞に CPE が認められる (=7.673±0.091 logPFU/ml), 3: ほぼ 50% の細胞に CPE が認められる (CPE の数が培養管当たり 14 以上=6.94±0.57 logPFU/ml), 2: CPE の数が 5~13 (=6.17±0.59 logPFU/ml), 1: CPE の数が 1~4 (=4.86±1.00 logPFU/ml), 0: CPE が全く認められない (<1.0 logPFU/ml) であった。したがって CPE 発現と感染価はほぼ平行するので薬物効果の判定は CPE のスコアで表わした。

7) *In vivo* 感染におけるマウス三叉神経節静止感染系: ICR-CD 1 6 週齢雌マウスの左下口唇皮下に HSV-2 を接種し, 1 か月後の生残マウスの左三叉神経節を取り出し, マイクロプレート (96 穴, NUNC, Denmark) にて, 10% 牛胎児血清添加 MEM 0.2 ml 中で器官培養した。この間, 3 日目に 0.05 ml の新鮮培地をさらに加え, 7 日目に神経節をホモジナイズと超音波処理にて破壊し, 遠心後の上清について HSV-2 の感染価を Vero 細胞において測定した。被験物質は器官培養中の培地に添加した。それぞれの実験系におけるウイルス感染, 再活性化および被験物質添加時期をまとめて Fig. 1 に示した。

II. 成績

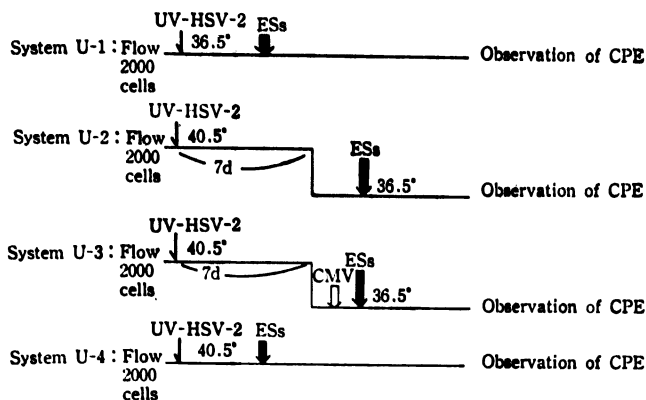
1. 環境物質の細胞毒性

Table 1 Maximum nontoxic doses of environmental substances in Flow 2000 cells at 36.5° and 40.5°

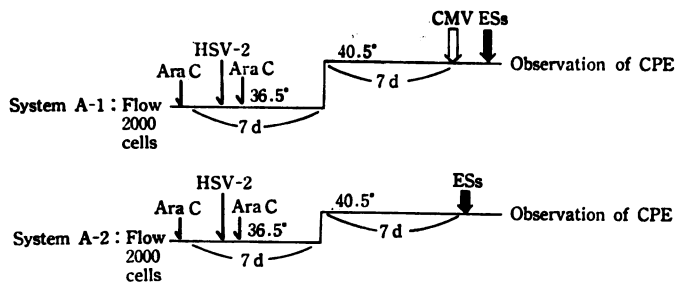
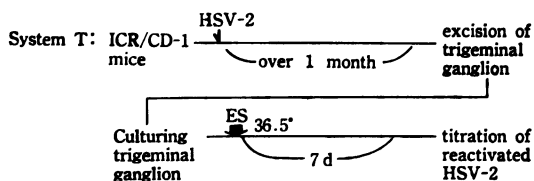
Environmental substance	Maximum nontoxic dose (μg/ml)	
	36.5°	40.5°
Amaranth	500	500
Erythrosine	100	100
Safrole	100	50
Rhodamine B	20	10
2-Acetylamino-fluorene	10	10
Phenacetin	50	50
Nicotine	200	200
7,12-Dimethylbenz-(a)anthracene	5	5
3,4-Benzo(a)-pyrene	10	10
CdCl ₂	2	2
SbCl ₃	1	1
As ₂ O ₃	0.1	0.1
HgCl ₂	1	1

Fig. 1 Various latent infection models *in vitro*

(I) Latent infection systems using UV-irradiated HSV-2.



(II) Latent infection systems using Ara C treated cells.

(III) Latent infection system using trigeminal ganglions from mice infected with HSV-2 *in vivo*.

各環境物質の Flow 2000 細胞に対する最高非毒性濃度を培養温度 36.5° および 40.5° において測定した (Table 1)。本報告中、特に記さない限り被験物質はそれぞれの測定温度における最高非毒性濃度を用いた。

2. 紫外線照射 HSV-2 の各感染系に及ぼす環境物質の影響

1) 紫外線照射 HSV-2 の増殖に及ぼす影響 (System U-1)

まず、紫外線照射 HSV-2 の許容温度 (36.5°) における増殖に対する環境物質の作用を検討した。テストした環境物質の中の数種について、結果を Fig. 2 に示した。

ウイルスの増殖によって発現する CPE は感染後 4 日目から認められ、日を追って発現程度の進行が観察された。各環境物質は Table 1 に示した最高非毒性濃度を用いた。Amaranth, erythrosine および safole は CPE の発現を強く抑制し、2-AAF および phenacetin は軽度ではあるが確実に CPE の発現を抑制した。一方, nicotine には明らかに CPE の発現の促進が認められた。Rhodamine B には明らかな作用は認められなかった。

2) 紫外線照射 HSV-2 による静止感染系からの HSV-2 再活性化に及ぼす影響 (System U-2)

次に、紫外線照射 HSV-2 を 40.5° の非許容温度で感

Fig.2 Effect of environmental substances on the replication of UV-irradiated HSV-2 at 36.5°

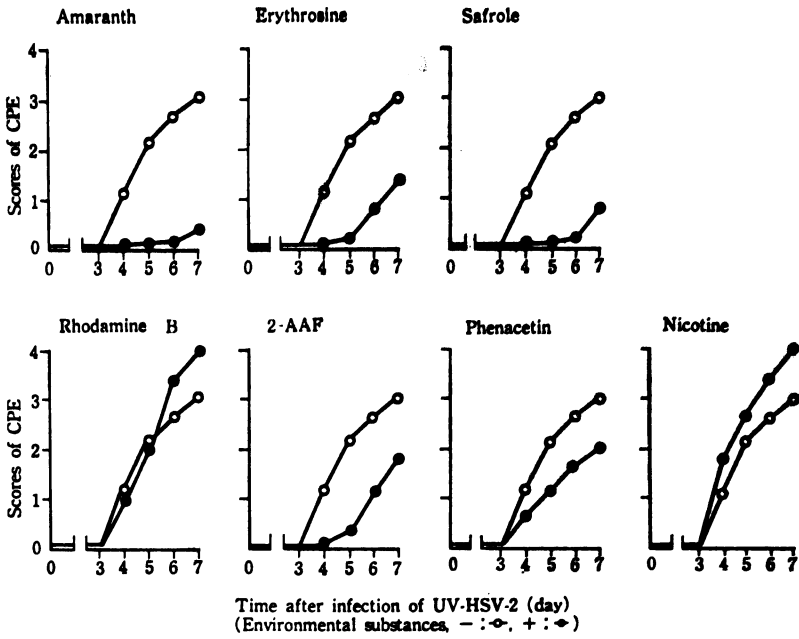
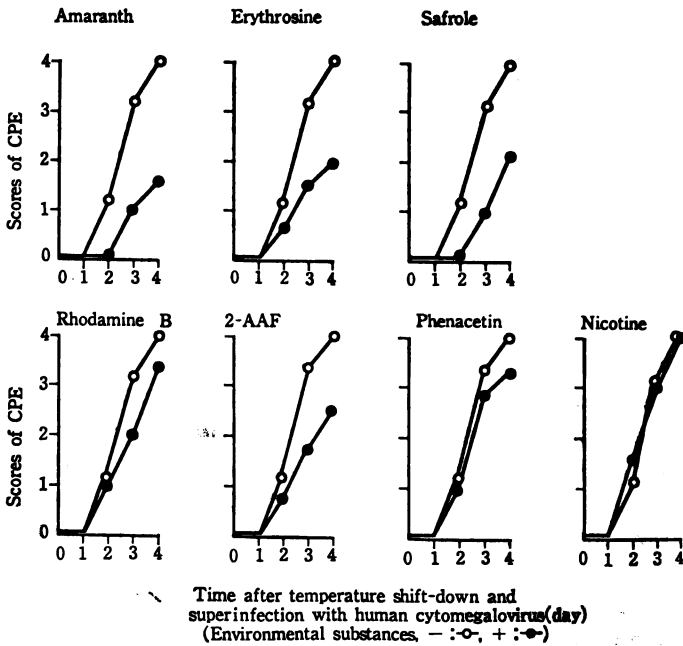


Fig.3 Effect of environmental substances on the reactivation of UV-irradiated HSV-2 from latent infection



染し、静止感染状態となった細胞を許容温度に戻すことによりウイルスを再活性化する系において環境物質の作用を検討した (Fig. 3)。

静止感染状態からの再活性化に伴うウイルス増殖は、許容温度における紫外線照射 HSV-2 の増殖 (System U-1) に比べ CPE の発現が 2 日早く認められた。これは静止感染状態の間にもウイルスの成熟と増殖に必要な蛋白あるいはその他の成分が合成、用意されていることを示唆している。System U-1 に比べて効果は減少するが、amaranth と safrole に抑制効果が認められた。Erythrosine, 2-AAF, phenacetin および rhodamine B は抑制的傾向を示したが、強い作用ではなかった。そして、この系においても nicotine には再活性化された HSV-2 の CPE の発現を促進する作用が認められた。

3) HSV-2 静止感染系からのウイルス再活性化に対する HCMV の促進効果に対する影響 (System U-3)

System U-2 と同様に操作して培養温度を許容温度に戻す際に HCMV を重感染させると CPE の発現が促進される。この時のウイルス増殖に対し、amaranth と safrole は System U-1 や System U-2 と同様に抑制作用を示し、erythrosine, 2-AAF, phenacetin および rhodamine B は軽度の抑制作用を示した。しかし、U-1,

U-2 の系で認められた nicotine による HSV-2 増殖促進効果はこの系では認められなかった。したがって nicotine の作用は HCMV による増殖促進作用をさらに強めるものではないことが示された (Fig. 4)。

次に 40.5° で静止感染状態に維持した細胞において、環境物質を作用させたが (System U-4) HSV-2 を再活性化する物質は見出されなかった。

3. 代謝阻害剤処理細胞における HSV-2 静止感染系における環境物質の影響

1) HCMV の重感染による HSV-2 の再活性化に及ぼす環境物質の影響 (System A-1)

この系においては、CPE の進行は速く、感染価の最高値も 1×10^8 PFU/ml のレベルに留まった。したがって環境物質の作用の検討には CPE の進行速度に加えて CPE の発現率 (CPE の発現した試験管数/用いた総試験管数 $\times 100$) も判定の指標とした (Fig. 5)。

環境物質を添加しない対照では、HCMV の重感染後 4 日目に CPE の発現が認められ、5 日後には、すべての試験管に CPE が観察された。この HSV-2 の再活性化に対し、amaranth は CPE の発現を完全に抑制した。Erythrosine, 2-AAF は抑制傾向を示したが、強い作用ではなかった。Phenacetin と nicotine はこの系にはほとんど作用しなかった。

Fig. 4 Effect of environmental substances on the reactivation of UV-irradiated HSV-2 which was enhanced by human cytomegalovirus from latent infection

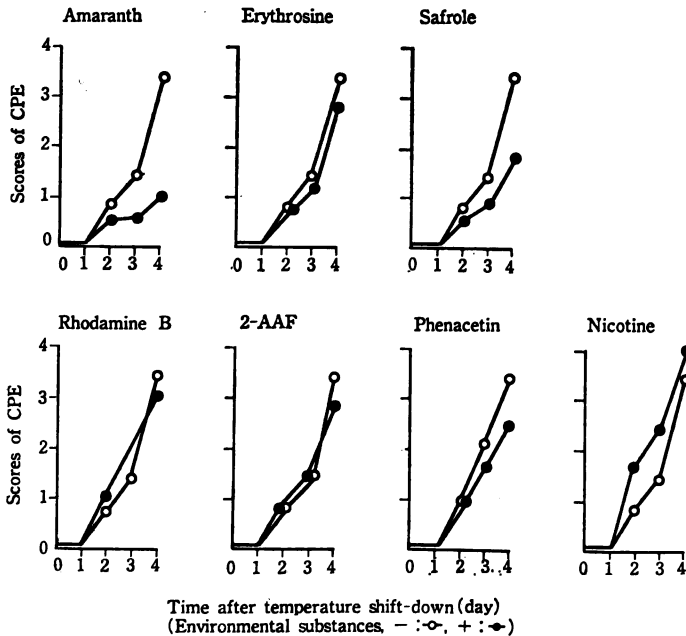
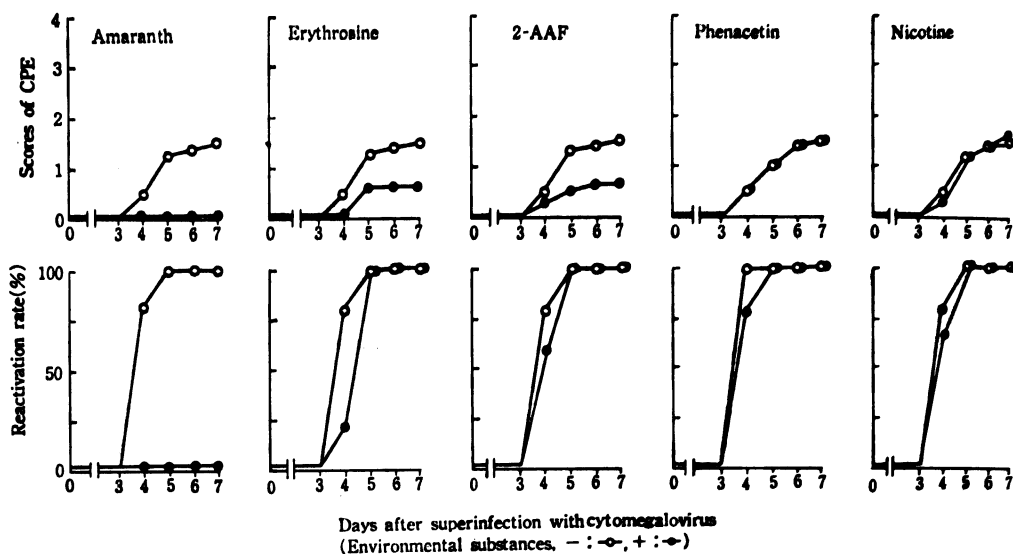


Fig. 5 Effect of environmental substances on the reactivation of HSV-2 from a latent infection system using Ara C treated cells



2) HCMV 非感染の静止感染系に及ぼす環境物質の影響 (System A-2)

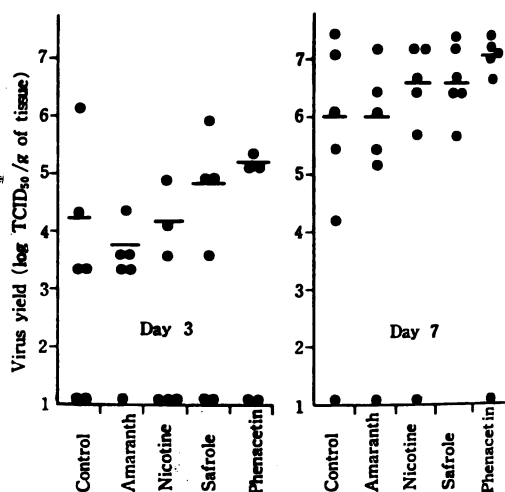
Ara C による静止感染系から, HCMV の重感染なしに環境物質単独で HSV-2 を再活性化するか否かを検討した結果, いずれの環境物質も, 単独では HSV-2 を再活性化する作用は認められなかった。

4. *In vivo* 感染後の HSV-2 静止感染マウス三叉神経節からの HSV-2 再活性化に及ぼす環境物質の影響

マウスの左下口唇皮下に HSV-2 を 1×10^6 PFU 接種すると, 1 か月後には, ほぼ半数のマウスが無症候状態で生存し, その三叉神経節内では感染性ウイルスは検出されることはない。しかし, それを切り出して, 7 日間, 器官培養を行なうと, 約 80~100% に感染性ウイルスが検出された。そこで, 三叉神経節から再活性化される HSV-2 に及ぼす環境物質の影響を検討した (Fig. 6)。

培養開始 3 日後までに, 再活性化されたウイルス量の平均値は, 対照群, amaranth (500 μ g/ml), nicotine (200 μ g/ml), safole (100 μ g/ml) および phenacetin (50 μ g/ml) は, それぞれ 4.27 ± 1.32 , 3.75 ± 0.37 , 4.22 ± 0.66 , 4.85 ± 0.94 および $5.19 \pm 0.12 \log$ TCID₅₀/g of tissue (Mean \pm SD) であり, 有意差は認められなかったが, amaranth は減少傾向を示し, phenacetin は増加傾向を示した。培養開始 7 日後では, 再活性化されたウイルス量は, 対照群, amaranth, nicotine, safole, お

Fig. 6 Effect of environmental substances on the reactivation of HSV-2 from trigeminal ganglions from mice infected with HSV-2 *in vivo*



よび phenacetin で, それぞれ 6.00 ± 1.28 , 6.00 ± 0.80 , 6.64 ± 0.63 , 6.63 ± 0.62 および $7.08 \pm 0.3 \log$ TCID₅₀/g of tissue であり, 有意差は認められなかったが, この場合も phenacetin で対照群の約 10 倍高い感染価が認められた。すなわち, amaranth は, マウスの三叉神経節からの HSV-2 の再活性化に対し, 培養後 3 日目に軽度の抑制傾向を示したが, Flow 2000 細胞を用

Table 2 Effect of environmental substances on the replication and reactivation of HSV-2 from various infection systems

Systems	Latent infection systems						Non-latent infection systems			
	UV-irradiated virus at non-permissive temperature		In Ara C treated cells		Trigeminal ganglion		Virus growth		Plaque formation*	
Latent forms	36.5° 40.5°→ CMV		No		<i>In vitro</i> ex-plantation		Non-irradiated HSV-2*	UV-irradiated HSV-2		
Reactivation	40.5→36.5°	U-2	U-3	U-4	CMV	No	T	OSG	U-1	P
Signature activity	sup	enh	sup	enh	sup	enh	sup	enh	sup	enh
Amaranth	++	-	++	-	+++	-	±	-	+++	-
Erythrosine	±	-	+	-	+	-	ND	ND	+++	++
Safrole	+	-	++	-	ND	ND	-	-	+++	-
Rhodamine B	-	±	+	-	ND	ND	ND	ND	+	+
2-AAF	±	-	+	-	+	-	ND	ND	++	-
Phenacetin	+	-	+	-	±	-	-	±	+	-
Nicotine	-	+	-	-	±	-	-	-	+	-
Sb	±	-	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
As	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cd	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Hg	-	-	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Benzo(a)-pyrene	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND
DMBA	ND	ND	ND	ND	-	-	ND	ND	ND	ND

sup : suppression, enh : enhancement, ND : not done, * : details were shown in a previous report (ref.1)

いた系におけるほど明らかな作用は認められなかった。一方、phenacetin は、紫外線照射 HSV-2 の系でウイルスの再活性化を軽度ではあるが抑制したが、マウス三叉神経節からの再活性化にはむしろ促進する傾向を示した。Nicotine および safrole は、この系においては明らかな作用は認められなかった。

HSV-2 の各感染系に及ぼす環境物質の作用をまとめて一覧とし Table 2 に示した。

III. 考 察

培養細胞における静止感染系として紫外線照射による欠損ウイルスを用いる方法と代謝阻害剤で DNA 合成を停止させた細胞を用いる方法の二方法を用いて環境物質の作用を検討した。いずれの系も生体における静止感染の 1 断面を表わしていると思われる。すなわち、生体における欠損ウイルス感染として、多数の温度感受性変異株が分離され、静止感染をする株としない株、神経節のみに静止感染をするものと感染局所に静止感染するものと、両部位に静止感染するものとに分類されている⁴⁻⁶⁾。また、紫外線照射ウイルスを再活性化するものとして、紫外線⁷⁾、X線⁸⁾、色素や変異原性物質⁹⁾など、DNA 損傷を起こし、DNA の修復機構を発現させる物質が報告されている。一方、HSV は増殖の際、細胞の酵素を利用して増殖するので、細胞増殖が抑制された状態であればウイルスは増殖することができない。生体においても HSV の静止感染部位は主として神経節である。この観点からのモデルとして用いたのが Ara C で細胞 DNA 合成を完全に抑制した System A である。この系では、非許容温度においても HCMV の重感染により HSV を再活性化できる。すなわち、これらの二方法を用いれば欠損ウイルスの再活性化、あるいは増殖の停止した細胞を再活性化し、ひいては HSV の再燃に影響を与えると思われる物質を多数の物質の中から見出すことができる考えた。

検討された物質のうち amaranth は HSV-2 の各感染系に共通して HSV 増殖抑制作用を示したのでウイルス増殖の基本的な過程を抑制するものと思われる。多くの色素は可視光線で phototoxic となりウイルス不活化、あるいは細胞分裂阻止作用を持つことが知られている^{10,11)}ので、ここで用いた amaranth, erythrosine, rhodamine B などで認められた HSV-2 増殖阻止作用にも同様の photodynamic action が働いている可能性が考えられる。Safrole や 2-AAF では、いくつかの系においてウイルス増殖抑制作用が認められた。しかし、safrole, 2-AAF, benzo(a)pyrene, DMBA の代謝産物には変異原性が報告されていて、また、2-AAF の代謝物の一つには紫外線照射 HSV を再活性化することが報告さ

れている⁹⁾。本報告では代謝物については検討していないので、代謝酵素添加をすれば、用いた物質の中にも HSV-2 の再活性化を促進する作用のあるものも見出されるかも知れない。Phenacetin は無処理のウイルス増殖には何ら作用しなかったが、紫外線照射ウイルスの増殖を軽度に抑制した。しかし、非照射ウイルスの増殖には作用しないので、ウイルスの再活性化に必要な成分の生合成が抑制されていることが示唆される。Nicotine は既報において HSV-2 の一段増殖を促進し、紫外線照射 HSV-2 のブラック発現を促進することが報告された。本研究においても紫外線処理 HSV-2 による静止感染系からのウイルス再活性化に対し促進的に作用することが認められた。したがって、この静止感染の系においても nicotine は細胞 DNA 修復機構を促進¹²⁾し、その結果同時に静止感染したウイルスの損傷 DNA を修復しウイルス再活性化を促進したと考えられる。しかし代謝阻害剤を用いた静止感染系には作用しなかったので、nicotine は DNA 修復機構の発現する許容温度において、その作用を発現すると思われる。重金属はウイルスの再活性化に抑制的に作用するものもあったが強い作用ではなかった。

そこで、amaranth, safrole, phenacetin および nicotine について、*in vivo* で HSV-2 感染を受け、静止感染状態にあるマウス三叉神経節を器官培養し、そこから再活性化される HSV-2 の増殖に対する作用を検討した。この系では無処理対照群におけるウイルス産生量の変動が大きいためにいずれの物質にも推計学的な有意差は認められなかったが、phenacetin ではほぼ 10 倍高いウイルス産生量が検出され、再活性化を促進する傾向を示した。Phenacetin は代謝されて体温中枢に作用すること¹³⁾、および変異原性¹⁴⁾があることが報告されているので、この場合も神経細胞からのウイルス活性化に対しても繊維芽細胞からの活性化に対するのと作用が異なるのかも知れない。Amaranth は紫外線照射 HSV-2 の静止感染系と代謝阻害剤処理細胞における静止感染系からのウイルス再活性化に対し、抑制的に作用したが、マウス三叉神経節からのウイルス再活性化に対しては明らかな作用を示さなかった。このことに関しては、(i) 細胞の由来する動物種が異なるために代謝機構が異なる。(ii) Flow 2000 細胞は胎児由来の繊維芽細胞で、神経細胞とは細胞種が異なり増殖形態も、代謝系も異なる。(iii) 器官培養では、器官の中心部まで薬物が到達し難く、その作用を受けにくい、などが挙げられる。Safrole と nicotine もこの系においては明らかな作用が認められなかった。

本研究において、日常生活の中で、人が体内に摂取す

る物質の中には、HSV-2 の静止感染系からのウイルス再活性化に対し促進的あるいは抑制的に作用するものが存在することが認められ、ヘルペス再燃の発症と治療に影響を及ぼしていることが示唆された。

現在さらに、これらの環境物質について *in vivo* におけるウイルス感染に対する作用と生体防御機構との関連性について研究を進めている。

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。

文 献

- 1) 福岡真理子, 瀬戸淑子, 藤田晴久, 豊島 滋: ヘルペスウイルスの増殖に及ぼす生活環境物質の影響. *Chemotherapy* 33 : 421~426, 1985
- 2) NISHIYAMA, Y. & F. RAPP: Latency *in vitro* using irradiated herpes simplex virus. *J. gen. Virol.* 52 : 113~119, 1981
- 3) COLBERG-POLEY, A. M.; H. C. ISOM & F. RAPP: Reactivation of herpes simplex virus type 2 from a quiescent state by human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76 : 5948~5951, 1979
- 4) SCRIBA, M.: Extraneural location of herpes simplex virus in latently infected guinea pig. *Nature, London* 267 : 529~531, 1977
- 5) HILL, T. J.; D. A. HARBOUR & W. A. BLYTH: Isolation of herpes simplex virus from the skin of clinically normal mice during latent infection. *J. gen. Virol.* 47 : 205~207, 1980
- 6) FONG, B. & M. SCRIBA: Use of [¹²⁵I] deoxycytidine to detect herpes simplex virus-specific thymidine kinase in tissue of latently infected guinea pig. *J. Virol.* 34 : 644~649, 1980
- 7) HARBOUR, D. A.; T. J. HILL & W. A. BLYTH: Recurrent herpes simplex virus in the mouse: Inflammation in the skin and activation of virus in the ganglia following peripheral stimulation. *J. gen. Virol.* 64 : 1491~1498, 1983
- 8) OPENSHAW, H.; L. V. S. ASHER, C. WOHLBERG, T. SEKIZAWA & A. L. NOTKINS: Acute and latent infection of sensory ganglia with herpes simplex virus: Immune control and virus reactivation. *J. gen. Virol.* 44 : 205~215, 1979
- 9) LYTLE, C. D. & J. COPPEY: Enhanced survival of ultraviolet-irradiated herpes simplex virus in carcinogen pretreated cells. *Nature* 272 : 60~62, 1978
- 10) MELNICK, J. L. & C. WALLIS: Photodynamic inactivation of herpes simplex virus: A status report. *Annal. N. Y. Acad. Sci.* 171~181, 1977
- 11) 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
- 12) RIEBE, M.; K. WESTPHAL & P. FORTNAGEL: Mutagenicity testing in bacterial test systems of some constituents of tobacco. *Mutat. Res.* 101 : 39~43, 1982
- 13) SHAHIDI, N. T. & A. HEMAIDAN: Acetophenetidin-induced methemoglobinemia and its relation to the excretion of diazotizable amines. *J. Lab. Clin. Med.* 74 : 581~585, 1969
- 14) NOHMI, T.; K. YOSHIKAWA, M. NAKADATE & M. ISHIDATE JR.: Species differences in the metabolic activation of phenacetin by rat and hamster liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110 : 746~752, 1983

INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL SUBSTANCES ON THE REACTIVATION OF HSV-2 FROM LATENT INFECTION SYSTEMS *IN VITRO*

MARIKO FUKUMA, YOSHIKO SETO and SHIGESHI TOYOSHIMA

Division of Chemotherapy, Pharmaceutical Institute, School of Medicine, Keio University

Previously, it was shown that some environmental substances (ES) which were taken into the body daily suppressed or enhanced the replication of herpes simplex virus, type 2 (HSV-2). This time, those substances were evaluated in various latent infection systems *in vitro*, whether those ES affect also the onset and cure of recurrent herpes infection. The latent infection systems were prepared, (i) using UV-irradiated HSV-2 at a nonpermissive temperature (NPT), and viruses were reactivated by lowering the temperature to a permissive one (PT), (ii) using Ara C treated human embryo cells at NPT and viruses were reactivated by superinfection with human cytomegalovirus, (iii) using trigeminal ganglions in latent infection state of mice which were infected *in vivo*. It was found that food dyes (amaranth, erythrosine), aromatic (safrole), antipyretic (phenacetin), materials of dyestuff (2-acetylaminofluorene: 2-AAF) and heavy metals (SbCl₃, HgCl₂) inhibited the reactivation of HSV-2 from some latent infection systems. Nicotine enhanced the reactivation of UV-irradiated HSV-2 at PT, however it did not enhanced the reactivation in Ara C treated cell system. None were shown to reactivate HSV-2 from the latent state at NPT without any reactant. Clear results could not be obtained in the trigeminal ganglion system because of a large variation of virus yield reactivated.

These results suggest that some ES may influence the onset and cure of recurrent HSV infection.