

# 有機ゲルマニウム化合物 Ge-132 のマウスインフルエンザウイルス 感染症に対する防御効果

麻生 久・海老名卓三郎・石田名香雄

東北大学医学部細菌学教室

鈴木 富士夫

熊本大学医学部微生物学教室

(昭和 61 年 3 月 17 日受付)

有機ゲルマニウム製剤 Ge-132 (Carboxyethylgermanium sesquioxide) のマウスのインフルエンザウイルス感染症に対する防御効果を検討した。

DDI マウスにインフルエンザウイルス (A<sub>2</sub>/熊本/H<sub>2</sub>N<sub>2</sub> 株) を 10 LD<sub>50</sub> 経鼻感染させ、感染当日より 1 日 1 回計 6 回 Ge-132 を連続経口投与したところ、100 mg/kg 投与、つづいては 20 mg/kg 投与で有意な延命効果を認め、また上記投与マウスにおいて肺内ウイルスの増殖抑制と肺のコンソリデーションの進展停止が確認された。Ge-132 は *in vitro* では直接の抗ウイルス作用を全く示さないことから、マウスにおけるインフルエンザ感染防御効果は Ge-132 投与により誘起された IFN が生体の免疫系を賦活化した結果と考えた。なお Ge-132 の経口投与を行なったマウスにおいて著明な NK 活性の増強が脾細胞中でも、肺組織でも認められ、特に感染マウスにおいて著明であった。Ge-132 投与で *in vivo* で活性化された NK 細胞はウイルス感染細胞に対し殺傷作用を示したことから、Ge-132 のマウスインフルエンザウイルス感染防御効果は Ge-132 投与で増強された NK 細胞が肺内ウイルスの増殖を阻止するとともにコンソリデーションの進展を停止した結果と考えられる。

マウスのインフルエンザウイルス感染において死に至る主因はリンパ球の浸潤により引き起こされる肺の炎症 (コンソリデーション) とその後起こる呼吸不全である<sup>1)</sup>。このコンソリデーションはヌードマウスや X 線照射マウスにインフルエンザウイルスを感染させても起こり難く<sup>2)</sup>、また抗リンパ球血清で処理したマウスにおいてはほとんど出現せず、マウスは生存する<sup>3)</sup>。しかし、このようなマウスにおいても肺内でのインフルエンザウイルスの増殖は確認されている<sup>3)</sup>。なおインフルエンザウイルス感染マウス肺野において感染初期には炎症を進展させる T 細胞 (Lyt 1<sup>+</sup>) が出現し、後期には炎症を抑制する T 細胞 (Lyt 2<sup>+</sup>) が出現してくることが知られており<sup>4)</sup>、我々はインフルエンザウイルス感染マウスでコンソリデーションが進展してマウスが死亡するのは免疫系の過剰防御によると考えている。

一方、natural killer (NK) 細胞の細胞傷害活性の強さがウイルス感染に対する抵抗性と比例するという報告<sup>5)</sup>とともに、ウイルスに感染したマウスより採取した NK 細胞を移入されたマウスはそのウイルスに対する抵抗性を獲得するという報告がある<sup>6)</sup>。またウイルス感染

細胞が NK 細胞の標的細胞になりやすいこと<sup>4,7,8)</sup> から生体のウイルス感染防御機構において、NK 細胞は重要な役割を特に初期に担っていると考えられる。

有機ゲルマニウム化合物 Ge-132 (Carboxyethylgermanium sesquioxide) は合成に成功した水溶性有機ゲルマニウム化合物のひとつであり<sup>9)</sup>、その後生理学的<sup>10)</sup>、薬理的<sup>11,12)</sup>に研究が進められ、ほとんど毒性のないことがわかった。また、Ge-132 は経口投与によりラット<sup>13)</sup>、マウス<sup>14,15)</sup>で抗腫瘍作用を示すが *in vitro* において細胞増殖阻害効果を示さず、その抗腫瘍効果は宿主の防御機構を介した作用と考えている<sup>16,17)</sup>。しかも本剤はヒトやマウスに経口投与するとインターフェロン (IFN- $\gamma$ ) を誘起し、NK 活性を増強しマクロファージの活性化を誘導することより<sup>18,19)</sup>免疫増強剤 (BCG<sup>20)</sup>、*C. parvum*<sup>21)</sup>、OK-432<sup>22)</sup>など)の範ちゅうに属し、特に経口投与で有効な IFN- $\gamma$  誘起剤、NK 活性増強剤と考えられる。

以上の背景をふまえ、本研究においては Ge-132 のマウスのインフルエンザウイルス感染症に対する防御効果を検討した。

I. 材料と方法

1. マウスのインフルエンザウイルス感染系

マウスは東北大学医学部動物実験施設より供与されたDDI系、雄6週齢を用いた。インフルエンザウイルスはマウスに充分順化したインフルエンザA<sub>2</sub>/熊本(H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>)株を用い<sup>3)</sup>、このウイルスの培養尿液は10<sup>9.0</sup>EID<sub>50</sub>で、DDIマウスに対し感染価は10<sup>5</sup>LD<sub>50</sub>を有した。

2. Ge-132

Ge-132(浅井ゲルマニウム研究所より供与)は無色の結晶をPBS(phosphate buffer saline)に溶解しpHを中性に調製後を用いた。

3. IFN 標品

Ge-132, 100 mg/kg をDDIマウスに経口投与し、24時間後に得られた血清をGe-132誘起IFN(Ge-IFN)標品とした。この血清中に認められた抗ウイルス活性はL929細胞とVSV(Indiana株)のブランク半減法により測定し300 U/mlであった(国際単位換算:対照NIHマウスIFN, Cat.No.022-904-511)。IFNα/βは小林茂保博士(東レ基礎研究所)より供与されたマウスL-cell IFN(10<sup>7</sup> U/mg protein)を用いた。

4. ウイルス感染方法

マウスへのウイルス感染はバポーネフィリン型のネブライザーで500 mmHgの圧力で30分間経鼻噴霧感染した<sup>23)</sup>。ウイルスの感染量は10 LD<sub>50</sub>とした。

ライザーで500 mmHgの圧力で30分間経鼻噴霧感染した<sup>23)</sup>。ウイルスの感染量は10 LD<sub>50</sub>とした。

5. 肺のコンソリデーションの判定方法と肺内ウイルスの定量法

肺のコンソリデーション価はHORSFALLの方法<sup>24)</sup>によ

Fig. 2 Inhibitory effect of Ge-132 on the development of lung consolidation in mice infected with influenza A<sub>2</sub> virus. Mice and administration schedule were the same as in Fig. 1. The grade of lung consolidation was determined by the HORSFALL method. PBS (●); Ge-132: 20 mg/kg (△), 100 mg/kg (○), 500 mg/kg (▲)

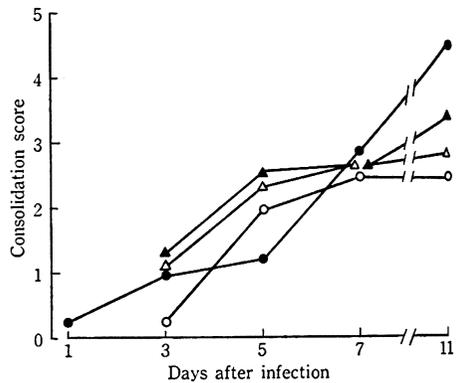


Fig. 1 Protection of mice from influenza A<sub>2</sub> virus infection by oral administration of Ge-132. Mice were intranasally infected with 10 LD<sub>50</sub> of influenza A<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>) virus by inhalation. Various doses of Ge-132 or PBS in 0.2 ml amounts were perorally given once daily for 6 consecutive days after infection. The generalized WILCOXON test (U test; n=10) was used for statistical analysis. PBS (●); Ge-132: 20 mg/kg (△), 100 mg/kg (○), 500 mg/kg (▲)

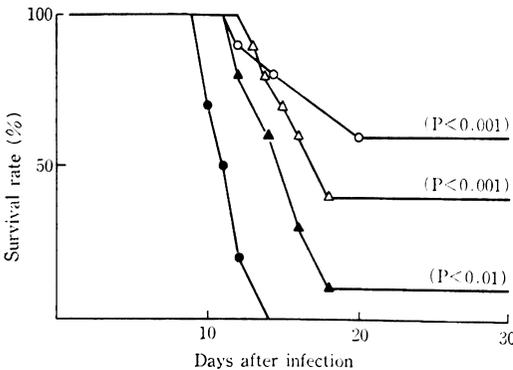
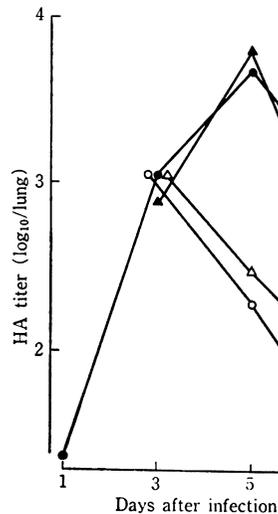


Fig. 3 Inhibitory effect of Ge-132 on virus growth in mouse lungs infected with influenza A<sub>2</sub> virus. Mice and administration schedule were the same as in Fig. 1. PBS (●); Ge-132: 20 mg/kg (△), 100 mg/kg (○), 500 mg/kg (▲)



り0から5までのスコアで判定し、1群5匹の平均で表示した。コンソリデーション値:5=死亡または100%コンソリデーション。4=80%, 3=60%, 2=40%, 1=20%のコンソリデーション。0=0%コンソリデーション。

肺内ウイルス量はウイルス感染したマウスより得た肺をホモジェナイザー(ポリトロン:PT 10.35)を用いて磨碎し、10%のサスペンションをPBSで作製、2,000×g 30分の遠心上清についてHA試験により定量した。

#### 6. NK活性測定法

NK活性は<sup>51</sup>CrラベルYAC-1細胞またはMeth-A細胞と常法により調製した脾リンパ球細胞あるいは肺内リンパ球細胞とを混合培養(E/T比50:1)し、4時間後上清に放出された<sup>51</sup>Cr量より算出した<sup>18)</sup>。また<sup>51</sup>CrでラベルしたMeth-A細胞(2×10<sup>6</sup>個)とインフルエンザウイルスA<sub>2</sub>/熊本(H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>)株10<sup>9.0</sup>EID<sub>50</sub>とを5%CO<sub>2</sub>インキュベーターで1時間培養した細胞をウイルス処理標的細胞(Inf-Meth-A)とした。

#### 7. 推計学的検討

マウスの平均生存日数ではSTUDENT t検定、全期間の生存率ではWILCOXON検定を用い検定した。NK活性の判定にはSTUDENT t検定を用いた。

## II. 結 果

### 1. Ge-132経口投与のマウスインフルエンザウイルス感染死に及ぼす影響

DDIマウスにインフルエンザウイルスを10LD<sub>50</sub>量経鼻感染させ、Ge-132投与は20mg, 100mg, 500mg/kgの3群とし感染0日目より5日目まで1日1回計6回経口投与し、Ge-132のインフルエンザウイルス感染に対する防御効果を検討した(Fig. 1)。

PBS投与の対照群はウイルス感染後9日目より死に始め14日目までにすべて死亡した。Ge-132投与群では死に始めの日がPBS投与群より2~3日遅れ、感染後20日目の判定では20mg/kg投与で40%, 100mg/kg投与で60%, 500mg/kgで10%の生存率が得られ

Table 1 Enhancement of splenic NK activity after oral administration of Ge-132 to mice infected with influenza A<sub>2</sub> virus<sup>a)</sup>

| Treatment | Infection | % Lysis <sup>b)</sup> |               |               |               |
|-----------|-----------|-----------------------|---------------|---------------|---------------|
|           |           | Days after infection  |               |               |               |
|           |           | 1                     | 3             | 5             | 7             |
| PBS       | -         | 4.2 ± 1.7             | 3.0 ± 1.7     | 5.6 ± 1.2     | 6.4 ± 2.4     |
| Ge-132    | -         | 12.0 ± 1.1**          | 13.4 ± 0.5*** | 6.2 ± 1.4     | 5.6 ± 1.1     |
| PBS       | +         | 7.8 ± 2.1             | 28.8 ± 2.5    | 43.6 ± 2.2    | 15.1 ± 2.1    |
| Ge-132    | +         | 8.1 ± 2.0             | 40.0 ± 4.0*   | 63.4 ± 3.2*** | 26.1 ± 2.6*** |

<sup>a)</sup> Mice were infected intranasally with 10 LD<sub>50</sub> of influenza A<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>) virus by inhalation. Ge-132 (100 mg/kg/0.2 ml) was perorally administrated once daily for 6 consecutive days after infection. PBS was used as a negative control. NK cell cytotoxicity was determined in a 4-hr <sup>51</sup>Cr-release assay at a 50:1 effector to target ratio.

<sup>b)</sup> Mean ± S.D. (n = 3)

\* Compared to each PBS control. (STUDENT t-test; \*: P < 0.05, \*\*: P < 0.01, \*\*\*: P < 0.001)

Table 2 Enhancement of NK activity in lung after oral administration of Ge-132 to mice infected with influenza A<sub>2</sub> virus<sup>a)</sup>

| Treatment | Infection | % Lysis <sup>b)</sup> |             |            |              |
|-----------|-----------|-----------------------|-------------|------------|--------------|
|           |           | Days after infection  |             |            |              |
|           |           | 1                     | 3           | 5          | 7            |
| PBS       | -         | 1.0 ± 0.3             | 3.3 ± 0.1   | 2.4 ± 1.7  | 3.7 ± 1.7    |
| Ge-132    | -         | 1.0 ± 0.5             | 2.2 ± 0.3   | 1.2 ± 0.7  | 2.4 ± 0.3    |
| PBS       | +         | 1.1 ± 1.3             | 13.3 ± 1.5  | 36.5 ± 3.7 | 36.1 ± 2.9   |
| Ge-132    | +         | 2.2 ± 2.5             | 24.0 ± 1.8* | 42.4 ± 1.8 | 60.3 ± 3.4** |

<sup>a)</sup> Mice and treatment protocols were the same as in "Table 1".

<sup>b)</sup> Mean ± S.D. (n = 3)

\* Compared to control treated with PBS. (STUDENT t-test; \*: P < 0.01, \*\*: P < 0.001)

た。感染後 30 日に区切って平均生存日数を求めると対照群 11.6 日にに対し、Ge-132 20 mg/kg 投与群 21.4 日 ( $P < 0.001$ ), 100 mg/kg 投与群 24.6 日 ( $P < 0.001$ ), 500 mg/kg 投与群 16.6 日 ( $P < 0.05$ ) で前 2 群では対照と比べ有意な生存日数の延長を認めた。

## 2. 同一投与方法が肺のコンソリデーションに及ぼす影響

コンソリデーションは炎症の度合より 0 から 5 までの 11 段階に分け、1 群 5 匹の平均値より求めた (Fig. 2)。感染 5 日目で Ge-132 投与群において PBS 投与群に比べむしろ炎症が促進される傾向を認めたが、11 日目では PBS 投与群が平均スコア 4.5 であったのに比べ、延命効果が認められた Ge-132 20 mg/kg で 2.8, 100 mg/kg で 2.5 とコンソリデーションの抑制が明らかに認められ、推計学的にも有意差が認められた。

## 3. 同一投与方法が肺内ウイルス量に及ぼす影響

感染後の肺内ウイルスの増殖を HA 試験を用い 1 群 5 匹の平均により求めた (Fig. 3)。肺内ウイルス量は感染 3 日目ではいずれの投与方法でも対照群との間に差を認めなかった。しかし、5 日目になると PBS 投与群と延命効果があまり認められない 500 mg/kg 投与群においてはともにウイルス量が 6,400 HAU に到達したのに比べ、延命効果が認められた Ge-132 100 mg/kg, 20 mg/kg 投与群ではそれぞれ 200 HAU, 320 HAU とウイルス増殖の明らかな抑制 (1/20 以下) が認められた。

## 4. 脾細胞と肺内リンパ球の NK 活性の測定

感染後、経口的に脾細胞と肺内リンパ球の NK 活性を測定した。Ge-132 投与の脾における NK 活性増強効果を Table 1 に示したが、非感染マウスに Ge-132 (100 mg/kg) を 1 日 1 回、6 回連続経口投与すると脾細胞の NK 活性は 1, 3 日目に PBS 投与群に比べ有意に増強した。次にインフルエンザウイルスに感染したマウスでは脾細胞の NK 活性の上昇は 3 日目より明らかに認められ、5 日目で 43.6% という高い活性値が得られた。このマウスに Ge-132 100 mg/kg を治療実験と同様のスケジュールで経口投与すると、感染 3 日目から 40.0% と非常に高い NK 活性が認められ、特に感染後期の 5 日目、7 日目において Ge-132 投与群における活性の増強は PBS 投与群と比べ顕著であった。

次に肺組織における NK 活性の動向であるが、非感染マウスでは肺内リンパ球の NK 活性は Ge-132 の投与の有無にかかわらずほとんど認められなかった (Table 2)。次にインフルエンザウイルス感染マウスで肺内の NK 活性を追跡すると、脾細胞のそれよりもやや遅れ 3 日目から活性化が認められ 5 日目でピークとなり 7 日まで持続した (Table 2)。Ge-132 (100 mg/kg) を連日

Table 3 Augmentation of NK activity not by Ge-132 itself, but by Ge-132 induced IFN *in vitro*<sup>a)</sup>

| Treatment          |           | % Lysis <sup>b)</sup> |
|--------------------|-----------|-----------------------|
| None               |           | 4.0 ± 0.8             |
| Ge-132             | 2 µg/ml   | 3.3 ± 1.0             |
|                    | 20 µg/ml  | 4.4 ± 0.2             |
|                    | 200 µg/ml | 4.1 ± 1.4             |
| Ge-IFN             | 0.3 U/ml  | 8.0 ± 1.2*            |
|                    | 3 U/ml    | 18.5 ± 2.1**          |
|                    | 30 U/ml   | 20.0 ± 0.5**          |
| IFN $\alpha/\beta$ | 100 U/ml  | 19.2 ± 0.7**          |

a) Splenocytes ( $2.5 \times 10^6$  cells/ml) of normal DDI mice were cultured in the absence or presence of different concentrations of Ge-132 or IFNs. After 24 hr, NK cell cytotoxicity was determined in a 4-hr <sup>51</sup>Cr-release assay at a 50:1 effector to target ratio.

b) Mean  $\pm$  S.D. (n = 3)

\* Compared to the control. (STUDENT t-test; \* :  $P < 0.01$ , \*\* :  $P < 0.001$ )

経口投与 (計 6 回) した群では PBS 投与群に比べ NK 活性の増強が 3 日、5 日で認められ、7 日目においては 60.3% と非常に高い障害活性を示し、このような高い数値は従来肺内で如何なる方法でも得られなかったものである。

## 5. Ge-132 あるいは Ge-132 誘起 IFN の *in vitro* で脾細胞 NK 活性に与える影響

*in vitro* の脾細胞培養に Ge-132 を 2 µg, 20 µg, 200 µg/ml 添加し、24 時間培養し NK 活性に与える影響を検討したが活性の増強は認められなかった。しかし Ge-132 誘起 IFN を 3 U/ml あるいは 30 U/ml 脾細胞培養に加えて 24 時間培養したところ、有意な NK 活性の増強が認められた。これより Ge-132 投与による NK 活性の増強は、誘起された IFN によるものと推定した。

## 6. インフルエンザウイルス処理標的細胞に対する脾細胞中 NK 活性の増強

マウスにおける NK 活性の増強は従来 YAC-1 細胞を標的とした場合に認められ、Meth-A 細胞に対しては認められなかった (Table 4)。ところが正常マウスに Ge-132 を経口投与し YAC-1 に対する傷害性の増強が認められた脾細胞はインフルエンザウイルスで処理した Meth-A 細胞に対しても *in vitro* で傷害活性を示すようになった (Table 4)。なおこの際無感作の Meth-A 細胞には全く傷害効果を示さないことは表より明らかである。この活性の増強はインフルエンザウイルス感染マウスの脾細胞についても更に明瞭に認められ、PBS 投与

Table 4 Augmented NK cell activity directed to target cells treated with influenza A<sub>2</sub> virus<sup>a)</sup>

| Treatment | Infection | % Lysis <sup>b)</sup> |           |                          |
|-----------|-----------|-----------------------|-----------|--------------------------|
|           |           | Target cells          |           |                          |
|           |           | YAC-1                 | Meth-A    | Inf-Meth-A <sup>c)</sup> |
| PBS       | -         | 3.3 ± 0.5             | 0.0 ± 1.0 | 4.5 ± 1.3                |
| Ge-132    | -         | 17.2 ± 1.8**          | 2.1 ± 1.3 | 10.2 ± 0.8**             |
| PBS       | +         | 32.0 ± 2.8            | 3.5 ± 1.6 | 19.0 ± 2.1               |
| Ge-132    | +         | 48.0 ± 1.2**          | 5.0 ± 3.2 | 28.0 ± 1.1*              |

<sup>a)</sup> Mice were infected intranasally with 10 LD<sub>50</sub> of influenza A<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>) virus by inhalation. Ge-132 (100 mg/kg/0.2 ml) was perorally given once daily starting on the day of infection. PBS was used as a negative control. Splenocytes from infected mice were obtained 5 days after infection. Splenocytes from uninfected mice were obtained 24 hr after administration of 0.2 ml of PBS or Ge-132 (100 mg/kg).

<sup>b)</sup> Mean ± S.D. (n = 3)

<sup>c)</sup> <sup>51</sup>Cr labeled Meth-A cells (2 × 10<sup>6</sup>) incubated in the presence of 10<sup>9.0</sup> EID<sub>50</sub> of influenza A<sub>2</sub> virus for 1 hr, washed with RPMI-1640 medium, were used as target cells.

\* Compared to each PBS control. (STUDENT t-test; \* : P < 0.01, \*\* : P < 0.001)

群に比べ Ge-132 投与群の Inf-Meth-A 殺傷活性は有意に増強されていた。

### III. 考 察

有機ゲルマニウム製剤 Ge-132 は *in vitro* において直接の抗ウイルス作用を全く示さないことから<sup>25)</sup>、マウスにおけるインフルエンザ感染防御効果は Ge-132 投与により生体の免疫系を賦活化した結果と考えられてきた。今回の実験で延命効果を示すため至適濃度 (100 mg/kg, Fig. 1) の存在が示唆されたが、この濃度は既報のマウスにおける抗腫瘍効果発現のための至適濃度と一致した<sup>15)</sup>。なお 1/5 量の 20 mg/kg でも推計学的には 100 mg/kg に匹敵する効果が得られた。

Ge-132 投与マウスにおいて著明な NK 活性の増強が認められたことは Ge-132 により誘起される IFN- $\gamma$  によるものと考えられ<sup>19)</sup> (Table 3), 直接の effector 細胞は脾細胞中でも肺組織でも特に感染マウスにおいて増強した NK 細胞と推定した (Table 1, 2)。これらの NK 細胞がウイルス感染細胞に対して *in vitro* で殺傷作用を示す実験結果<sup>7, 8)</sup> (Table 4) を参照すると, Ge-132 のマウスのインフルエンザウイルス感染防御効果は Ge-132 を投与することにより増強された NK 細胞が肺内ウイルスの増殖を阻止し, しかもコンソリデーションの進展を停止した結果起こったものと考えた。Ge-132 の IFN- $\gamma$  の産生のために参加する細胞群については多く

の研究があり<sup>19)</sup>, Ge-132 は *in vitro* においてはインターロイキン 2 による IFN- $\gamma$  産生を増強する<sup>26)</sup>。なお Ge-132 は T 細胞からではなく NK 細胞からの IFN 産生を増強することが *in vitro* で証明されており<sup>26)</sup>, Ge-132 は NK 細胞に作用し, NK 細胞を活性化する特異的な BRM であることが示唆された。

### 文 献

- 1) 石田名香雄, 鈴木富士夫: マウスのインフルエンザ感染における肺のコンソリデーション。最新医学 29: 1194~1201, 1974
- 2) SHIMOMURA, E.; J. SUZUKI & N. ISHIDA: Characterization of cells infiltration the lungs of X-irradiated and nude mice after influenza virus infection. Microbiol. Immunol. 26: 129~138, 1982
- 3) SUZUKI, F.; F. OHYA & N. ISHIDA: Effect of antilymphocyte serum on influenza virus infection in mice. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 146: 78~84, 1974
- 4) LEUNG, K. N. & G. L. ADA: Different functions of subsets of effector T cells in murine influenza virus infection. Cell. Immunol. 67: 312~324, 1982
- 5) BANCROFT, G. J.; G. R. SHELLAM & J. E. CHALMAR: Genetic influences on the augmentation of natural killer (NK) cells during murine cytomegalovirus infection: Correlation with patterns of resistance. J. Immunol. 126:

- 988~994, 1981
- 6) BUKOWSKI, J. F.; J. F. WARNER, G. DENNERT & R. M. WELSH: Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells *in vivo*. *J. Exp. Med.* 161: 40~52, 1985
  - 7) BISHOP, G. A.; J. C. GLORIOSO & S. A. SCHWARTZ: Relationship between expression of herpes simplex virus glycoproteins and susceptibility of target cells to human natural killer activity. *J. Exp. Med.* 157: 1544~1561, 1983
  - 8) MOLLER, J. R.; B. RAGER-ZISMAN, P. C. QUAN, A. SCHATNER, D. PANUSH, J. K. ROSE & B. R. BLOOM: Natural killer cell recognition of target cells expressing different antigens of vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 2456~2459, 1985
  - 9) TSUTSUI, M.; N. KAKIMOTO, D. D. AXTELL, H. OIKAWA & K. ASAI: Crystal structure of "carboxyethylgermanium sesquioxide". *J. Am. Chem. Soc.* 98: 8287~8289, 1976
  - 10) 佐藤隆一, 石川 明: カルボキシエチルゲルマニウム三二酸化物の高血圧自然発症ラット (SHR) の血圧におよぼす影響。基礎と臨床 7: 105~112, 1978
  - 11) 富沢撰夫, 勝呂信雄, 鹿児島正豊: ゲルマニウム化合物の一般薬理作用に関する研究。応用薬理 16: 671~682, 1978
  - 12) 永田次雄, 永田貴久, 荒蒔義知, 榎本 真, 井坂英彦, 大塚潤一: Carboxyethylgermanium Sesquioxide の静脈内投与によるビーグル犬の6ヶ月間の慢性毒性試験。応用薬理 16: 613~636, 1978
  - 13) 佐藤 博, 岩口孝雄: 新規有機ゲルマニウム化合物 Ge-132 の抗腫瘍性。癌と化学療法 6: 79~83, 1979
  - 14) KUMANO, N.; T. ISHIKAWA, S. KOINUMARU, T. KIKUMOTO, S. SUZUKI, Y. NAKAI & K. KONNO: Antitumor effect of the organogermanium compound Ge-132 on the Lewis lung carcinoma (3LL) in C57BL/6 mice. *Tohoku J. exp. Med.* 146: 97~104, 1985
  - 15) 麻生 久, 渋谷恵美, 鈴木富士夫, 中村武彦, 井上英男, 海老名卓三郎, 石田名香雄: 有機ゲルマニウム化合物 Ge-132 の抗腫瘍効果: 投与経路別効果の比較。癌と化学療法 12: 2345~2351, 1985
  - 16) SUZUKI, F.; R. R. BRUTKIEWICZ & R. B. POLLARD: Ability of sera from mice treated with Ge-132, an organic germanium compound, to inhibit experimental murine ascites tumors. *Br. J. Cancer* 52: 757~763, 1985
  - 17) SUZUKI, F.; R. R. BRUTKIEWICZ & R. B. POLLARD: Importance of T-cells and macrophages in the antitumor activity of carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132). *Anticancer Res.* 5: 479~484, 1985
  - 18) MIYAO, K.; T. ONISHI, K. ASAI, S. TOMIZAWA & F. SUZUKI: Toxicology and phase I studies on a novel organogermanium compound, Ge-132. *Current Chemother. Infect. Dis. (Proc. 11th ICC & 19th ICAAC Am. Soc. Microbiol.)*, 2: 1527~1529, 1980
  - 19) ASO, H.; F. SUZUKI, T. YAMAGUCHI, Y. HAYASHI, T. EBINA & N. ISHIDA: Induction of interferon and activation of NK cells and macrophages in mice by oral administration of Ge-132, an organic germanium compound. *Microbiol. Immunol.* 29: 65~74, 1985
  - 20) SONNENFELD, G.; A. D. MANDEL & T. C. MERIGAN: *In vitro* production and cellular origin of murine type II interferon. *Immunology* 36: 883~890, 1979
  - 21) HIRT, H. M.; H. BECKER & H. KIRCHNER: Induction of interferon production in mouse spleen cell cultures by *Corynebacterium parvum*. *Cell. Immunol.* 38: 168~175, 1978
  - 22) SAITO, M.; T. EBINA, M. KOI, T. YAMAGUCHI, Y. KAWADA & N. ISHIDA: Induction of interferon- $\gamma$  in mouse spleen cells by OK-432, a preparation of *Streptococcus pyogenes*. *Cell. Immunol.* 68: 187~192, 1982
  - 23) ISHIDA, N.; Y. KOSAKA & Y. SASAKI: Studies on experimental influenza in mice. II. Absolute amount of virus introduced into the respiratory tract of mice by standard inhalation procedure. *Tohoku J. exp. Med.* 71: 151~161, 1959
  - 24) GINSBERG, G. S. & F. L. HORSFALL: Quantitative aspects of the multiplication of influenza A virus in the mouse lung. *J. Exp. Med.* 95: 135~141, 1952
  - 25) 鈴木富士夫, 麻生 久, 小林弘行, 大西 勉, 石田名香雄: Carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) のマウスインフルエンザ感染症に対する防御効果。Chemotherapy 34: 488~494, 1986
  - 26) 宗像哲男, 千場梅子, 吉竹洋子, 古川真由美, 荒井澄夫: Ge-132 のヒト NK 細胞からの IFN 産生機序。ゲルマニウム研究会記録 13: 19~21, 1985

ANTIVIRAL ACTIVITY OF Ge-132 (AN ORGANIC  
GERMANIUM COMPOUND) IN MICE INFECTED  
WITH INFLUENZA A<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>) VIRUS

HISASHI ASO, TAKUSABURO EBINA and NAKAO ISHIDA

Department of Bacteriology, Tohoku University School of Medicine

FUJIO SUZUKI

Department of Microbiology, Kumamoto University Medical School

Ge-132 [Carboxyethylgermanium sesquioxide ;  $O_3(GeCH_2CH_2COOH)_2$ ], an organogermanium compound, has been shown to have antitumor activities in mice and rats, as revealed by inhibition of tumor growth in and prolongation of survival period of these animals. It has also been proved to have, in both human and mice, immunopotentiating activities, through both the induction of interferon- $\gamma$  in serum and the augmentation of natural killer(NK) cell activity. On the basis of these observations, we study in this paper the effects of Ge-132 on influenza virus infection in mice. When DDI mice were infected with 10 LD<sub>50</sub> of influenza A<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>) virus by inhalation, administration of 20 mg/kg or 100 mg/kg of Ge-132 for 6 consecutive days starting on the day of infection was found to have a significant protective effect. An increase in the survival fraction, a prolongation of the mean length of survival, an inhibition of the development of lung consolidation, and a decrease in virus titers in the lungs were found in treated groups as compared to control which was given PBS. NK activity in the spleens and lungs of the virus-infected mice was also significantly augmented by orally given Ge-132. In addition, NK cells whose activity was augmented by Ge-132 *in vivo* revealed a definite killing activity towards NK-insensitive Meth-A cells when the latter were sensitized with influenza virus *in vitro*. Nevertheless, no direct virocidal or virostatic activities of Ge-132 on the influenza virus were ever found *in vitro*.

These results indicate that the protective effect of Ge-132 against influenza virus infection in mice seems to be explained by its IFN- $\gamma$  inducing activity and in particular through its augmentation of NK cells.