

マウスの実験的サイトメガロウイルス感染症に
対する有機ゲルマニウム化合物
Ge-132 の防御効果

中川 昇・岡田 政信・南嶋 洋一
宮崎医科大学微生物学教室

(昭和 62 年 3 月 14 日受付)

有機ゲルマニウム化合物 Ge-132(2-carboxyethylgermanium sesquioxide) のウイルス感染症に対する防御効果をマウスサイトメガロウイルス (MCMV) 対マウスの系を用いて検討した。

ICR マウスにウイルス接種前 3 日と 1 日に Ge-132 をマウス当り 10 mg 腹腔内投与したあと、腹腔内に強毒 MCMV-Smith 株をマウス当り 5×10^4 PFU (約 2 LD₅₀ 相当) 接種し、生食水の前投与対照群と比較した。①対照マウスが 100% 感染死したのに対して、Ge-132 前投与群では 60% のマウスが生存し、②肝で増殖したウイルス量が対照の約 1/5 に抑制され、③血中 IFN 値、2-5A 合成酵素活性値の上昇が認められたが、④脾細胞中 NK 活性は変化しなかった。Ge-132 は *in vitro* ではウイルス不活化作用およびウイルス増殖抑制作用を示さなかったことから、マウスにおける MCMV 感染防御効果は、Ge-132 投与により誘起されたインターフェロン (IFN) を介し生体の感染防御系が賦活化されたことにあると考えられた。肝は MCMV 感染の最も重要な標的器官であり、Ge-132 によって誘導される主として IFN が、肝におけるウイルスの増殖を感染死にいたる閾値以下に抑制することによって、マウスは感染死を免れるのであろうと推定された。

宿主の生体防御能を増強することにより腫瘍に対する治療効果を期待して、種々の Biological Response Modifiers (BRM) が開発されてきた¹⁾。すでに、それらのいくつかはわが国において、癌患者の治療に用いられている。さらに、癌患者の末期においては、BRM の有する抗腫瘍作用のみならず感染防御作用の増強が延命に有効に作用していると考えられる²⁻⁶⁾。

われわれは、これらの BRM の生体防御増強作用をウイルス感染を指標に検討してきた。すなわち、日和見感染症をおこす代表的なウイルスであるサイトメガロウイルス (CMV) を対象に、その実験モデルとして、マウスサイトメガロウイルス (MCMV) 対マウスの系を用い BRM のウイルス感染防御作用を明らかにした⁷⁻⁹⁾。

有機ゲルマニウム製剤の一つである Ge-132 (2-carboxyethylgermanium sesquioxide) は、trichlorogermane と acrylic acid¹⁰⁾ より合成され、種々の BRM の分類の内で、低分子の IFN- γ 誘起物質として位置づけられており⁸⁻¹¹⁾、化学的に合成可能であり、毒性が低く安全性が高い物質であるとされている⁹⁾。また、Ge-132 の抗腫瘍作用は薬理・免疫調節作用の研究と相まって種々報告されてきたが、感染防御作用に関しては、主として実地臨床応用面の報告^{12,13)} が散見されるにすぎない。

ウイルス感染防御効果に関しても、その安全性、IFN 誘起作用に基づいて B 型肝炎ウイルスのキャリア¹⁴⁾、帯状疱疹患者^{15,16)} に臨床応用の試みがみられるにすぎない。

最近、インフルエンザウイルスに関して、マウスの系を用い、Ge-132 のウイルス感染防御効果を検討した成績が報告された^{17,18)}。今回、われわれは、上記の MCMV 対マウスの実験モデルにおいて、Ge-132 のウイルス感染防御効果を検討し、その生体防御増強作用を評価した。

I. 材料と方法

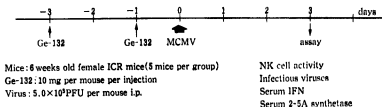
実験のデザインを Fig.1 に示す。

マウス：6 週齡、メスの ICR マウスを静岡県実験動物農業協同組合より購入して用いた。感染実験では 1 群を 5 頭として用い、致命率と生存日数に対する効果を検討した。

ウイルス：MCMV-Smith 株をブラック純化のあと、マウス唾液腺で継代して得た強毒ウイルス (SG-MCMV) をマウスの腹腔内へ、 5×10^4 PFU 接種した。

Ge-132：浅井ゲルマニウム研究所より分与された (Ge-CH₂-CH₂-COOH)₂O₃ の 10% 液 (100 mg/ml) を用い、マウス当り計 20 mg (10 mg/0.1 ml \times 2 回) を腹腔

Fig. 1 Experimental design



内へ投与した。

感染性ウイルスの定量：各臓器を Eagle's MEM を用いて、10% (w/v) の乳剤として低速遠心し、その上清中の感染性ウイルスをマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を用いて、ブラック法により定量し、PFU/organ として表わした。

NK 細胞活性：既報の方法^{3,4)}により測定した。すなわち、Fig. 1 の実験デザインに基づきマウスの脾細胞を採取し、既述の方法により調整して effector とし、YAC-1 細胞 (NK 細胞感受性) および P 815 細胞 (NK 細胞抵抗性) を target として 100 : 1 の比で反応させ、NK 細胞による細胞傷害作用を 4 時間後の ⁵¹Cr の特異的遊離率 (%) で測定した。

血中インターフェロン (IFN) の定量：L 929 細胞を被験血清で 24 時間処理したあと、vesicular stomatitis virus (New Jersey strain) を接種し、ブラック数を 50% に減少させる血清希釈倍数により血中 IFN 活性を表現した。

血中 2',5'-オリゴアデニル酸合成酵素 (2-5A 合成酵素) 活性の測定：2-5A 「柴研」キットを用い、ラジオイムノアッセイ法により測定した^{10,20)}。すなわち被験血清中の 2-5A 合成酵素をポリ (I)・ポリ (C) アガロースを用いて吸着・活性化したのち、ATP を基質として添加し 2-5A を産生させた。次いで ¹²⁵I-標識 2-5A と抗 2-5A 抗血清懸濁液を加えて反応させ、競合法により、標準曲線に基づいて 2-5A を定量し、酵素活性を測定した。

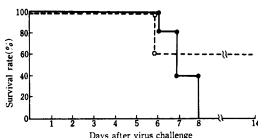
MCMV に対する不活化作用：5% 仔ウシ血清加 Eagle's MEM を用いて、Ge-132 を 1, 0.1, 0.01 mg/ml の濃度に希釈し、MCMV 10^5 PFU/ml と 1 : 9 の割合で混合した。37°C で 30, 60, 90 分の各時間反応させた後、MEF を用いてブラック法によりウイルス感染価を測定し、判定した。

MCMV に対する増殖抑制作用：試験管内で培養した MEF に MCMV を MOI 0.4 で感染させ、上記と同じ濃度の Ge-132 を含む培養液で 0, 12, 24, 48, 72, 96 時間培養した。MCMV に感染した MEF を 3 回凍結融解したあと、感染性のウイルスをブラック法により定量

Fig. 2 Effect of Ge-132 pretreatment on survival of MCMV infected mice.

Mice were administered intraperitoneally with Ge-132 3 and 1 days before challenge with 5.0×10^5 PFU per mouse.

Saline (●); Ge-132: 20 mg/mouse (○)



し、対照と比較した。

II. 実験成績

1. MCMV 感染による致命率と生存日数に対する効果

SG-MCMV 5×10^5 PFU (約 2 LD₅₀ 相当) を腹腔内に接種すると、対照群ではすべてのマウスが感染死を来したのに対して、Ge-132 前投与群では大半 (60%) のマウスが生存した (Fig. 2)。

2. MCMV の生体内増殖に対する効果

肝、脾、腎、肺、膵、唾液腺における感染性ウイルスを定量し、Ge-132 前投与群および非投与群を比較した結果、前者において肝におけるウイルス量が有意な低値を示した (Ge-132 前投与群で非投与対照群の約 1/5 に抑制された)。他方、脾、腎、肺、膵のウイルス量は Ge-132 前投与群では非投与対照群と比較して低い値を示したが、肝における程の抑制は認め得なかった (Table 1)。

3. 脾細胞の細胞傷害活性

マウス脾細胞の NK 細胞感受性の YAC-1 細胞に対する細胞傷害活性は、非感染群においては Ge-132 の腹腔内投与により増強されたが、感染群では Ge-132 の効果を認め難かった (Table 2)。一方、NK 細胞抵抗性の P 815 細胞に対しては細胞傷害活性の増強を認めなかつ

Table 1 Effect of Ge-132 pretreatment on replication of MCMV in the mouse organs

Organ	Treatment	
	Saline	Ge-132
Liver	4.94 ± 0.09*	4.19 ± 0.18**
Spleen	5.34 ± 0.36	5.02 ± 0.10
Kidney	2.63 ± 0.23	2.45 ± 0.05*
Lung	5.02 ± 0.23	4.80 ± 0.36
Pancreas	3.29 ± 0.22	2.99 ± 0.15*
Salivary gland	<1.0	<1.0

a: log PFU/organ

b: Significance *P<0.05, **P<0.001 (t-test).

た。

4. 血中の IFN および 2-5 A 合成酵素活性

非感染群では Ge-132 の腹腔内投与により血中 IFN 値の上昇がみられたが、2-5 A 合成酵素の値はほとんど変化がなかった。感染群では感染そのものによって両者の活性値の上昇がみられたが Ge-132 の前投与によってさらにその値が増大した (Table 2)。

5. MCMV に対する不活化作用および増殖抑制作用

Ge-132 は MCMV のウイルス粒子に対する直接的な不活化作用 (殺ウイルス効果) および感染細胞における増殖抑制作用 (抗ウイルス効果) を示さなかった。

III. 考 察

Ge-132 に関しては、すでにマウスに対する抗腫瘍作用、IFN 誘起作用、NK 細胞活性の増強作用、マクロファージ活性化作用、免疫調節作用、抗インフルエンザウイルス作用などが知られている⁸⁾。われわれは、今回、MCMV 対マウスの実験モデルを用いて Ge-132 のウイルス感染防御作用を検討した。Ge-132 は *in vitro* でウ

イルス粒子および感染細胞に対する抗ウイルス作用を示さないことから、マウスに対する MCMV 感染防御効果は Ge-132 投与により生体の感染防御系を賦活化した結果と考えられる。

われわれは別に他の BRM (OK-432, PS-K) の前投与によって、マウスは MCMV の致死性感染に対する非特異的感染防御能を獲得することを報告し、その機序は主として NK 細胞活性の増強であることを示した³⁻⁶⁾。

Ge-132 の感染防御効果は NK 細胞よりも IFN 活性とより相関する成績が得られた。このことは、Ge-132 のウイルス感染防御効果が他の OK-432, PS-K と異なる可能性と、より初期の段階で NK 活性の増強が行なわれた可能性を示唆している。なお、Ge-132 の NK 細胞活性の増強効果はマウスの経口投与により示されており^{11,12)}、われわれの実験は腹腔内投与とあるので、投与方法の重要性をも示している。

なお、致死量の MCMV の感染を受けたマウスにおいては、NK 細胞活性が著明に低下し、致死量以下の MCMV の感染によっては NK 細胞活性は上昇するのが通例である³⁻⁶⁾。今回は、ほぼ両者の中間のウイルス量を接種した。予備実験の結果、今回用いた 5×10^6 PFU 以上のウイルスのチャレンジに対しては Ge-132 の防御効果はみられなかった。また、2-5 A 合成酵素活性に関しては、宗川ら¹³⁾がすでに Ge-132 100 mg~600 mg/kg の腹腔内投与により脾内に 12 時間後をピークとして、2-5 A 合成酵素が誘導されることを認めている。われわれは、今回 Ge-132 20 mg/マウスの腹腔内投与 3 日後の血中 2-5 A 合成酵素を測定したが、非感染群に著しい増加を認めなかった。マウスの種類、投与後の間隔、組織の差異などがその理由であらう。しかし感染群

Table 2 Effect of Ge-132 pretreatment on parameters of non-specific resistance

Treatment ^a	Cytotoxicity ^b of spleen cells against		Serum IFN (U/ml)	Serum 2-5 A synthetase activity (P mol/dl)
	YAC-1 ^c	P815 ^c		
Uninfected				
Saline	15.9	6.1	40	87.4
Ge-132 ^d	26.5	7.6	80	85.2
Infected ^e				
Saline	35.4	7.9	320	216.7 × 10
Ge-132 ^d	30.0	6.0	640	271.4 × 10

a: Ge-132 or saline was administered to mice intraperitoneally 3 and 1 days before virus challenge.

b: Percent specific ⁵¹Cr release.

c: Effector-to-target ratio of 100:1.

d: 10 mg per mouse per injection.

e: Inoculum was 5.0×10^5 PFU per mouse.

においては 2-5A 合成酵素活性の著しい上昇が認められ、とくに Ge-132 投与群において高値を示した。

マウスにおけるインフルエンザウイルス感染に際しても、Ge-132 の救命および延命効果が、肺におけるウイルスの増殖抑制と相関することが示されている^{11,10}。Ge-132 前投与によって感染マウスの肝における MCMV の増殖抑制が認められた。肝は MCMV 感染の最も重要な標的器官であり¹¹⁻¹³、Ge-132 によって誘導される主として IFN が、肝におけるウイルスの増殖を感染死を来す閾値以下に抑制することによって、マウスは感染死を免れるのであろう。

われわれは他の BRM (OK-432, PS-K) が MCMV の慢性および潜伏感染の増悪・再燃に対して防御効果を有することを示した¹⁴。マウスのインフルエンザ感染に対しては、Ge-132 を経口投与にて治療的に用いて有効であった報告^{11,10,15}があり、今後 Ge-132 を経口投与し治療的に用いて、MCMV の慢性・潜伏感染に対する効果を検討する課題が残されている。

文 献

- 1) 漆崎一朗: Biological Response Modifiers (BRM) の概念。癌と BRM (漆崎一朗, 塚越 茂), pp. 14~25, サイエンスフォーラム社, 東京, 1982
- 2) 前原喜彦, 神代龍之介, 井口 淳: がんの化学療法および免疫療法。医学と薬学 9(6): 1840~1844, 1983
- 3) EBIHARA, K. & Y. MINAMISHIMA: Protective effect of biological response modifiers on murine cytomegalovirus infection. *J. Virol.* 51(1): 117~122, 1984
- 4) MINAMISHIMA, Y.; K. EBIHARA & M. OKADA: Protection of mice against lethal viral infection by biological response modifiers. In: *Recent Advances in Chemotherapy. Anticancer Section. Proceedings of the 14th International Congress of Chemotherapy* (ed. by J. ISHIGAMI), pp. 973~974, University of Tokyo Press, Tokyo, 1985
- 5) MINAMISHIMA, Y.; M. OKADA & K. EBIHARA: Antiviral effect of biological response modifiers: Protective effect of OK-432 on murine cytomegalovirus infections. In: *New applications of OK-432* (ed. by R. TOBE), pp. 153~162, Excerpta Medica, Tokyo, 1985
- 6) OKADA, M. & Y. MINAMISHIMA: The efficacy of biological response modifiers against murine cytomegalovirus infection in normal and immunodeficient mice. *Microbiol. Immunol.* 31: 45~57, 1987
- 7) TSUTSUI, M.; N. KAKIMOTO, D. D. AXTELL, H. OIKAWA & K. ASAI: Crystal structure of "carboxyethylgermanium sesquioxide". *J. Am. Chem. Soc.* 98: 8287~8289, 1976
- 8) 佐藤 博, 宮尾典平: 有機ゲルマニウム化合物 Ge-132 の薬理活性 (総説)。医学と薬学 9(3): 814~826, 1983
- 9) 藤田 浩: 免疫療法剤の体内動向。Pharma Medica 1(3): 407~419, 1983
- 10) 藤生 久, 石田名香雄: 免疫調節療法 化学的免疫調節剤 ゲルマニウム。免疫と疾患 5(4): 505~511, 1983
- 11) 倉根一郎, 日沼司, 伊東敬悟, 鈴木隆二, 熊谷勝男: 有機ゲルマニウム Ge-132 の免疫調節作用—インターフェロンによる免疫調節との類似性—。医学と薬学 9(1): 159~168, 1983
- 12) 長浜文雄, 安曾武夫, 伊東 康, 田辺孝一, 酒井一郎: Ge-132 内服によるじん肺症患者のかぜ症候群予防効果に関する研究(二重盲検試験)。日本災害医学会誌 34(3): 214~222, 1986
- 13) 多田慎也, 中田安成, 高橋 功, 木村郁郎: 慢性肺感染症への Ge-132 の投与。第 13 回ゲルマニウム研究会記録, pp. 66~71, 1985
- 14) 小島秀男, 市田文弘: HBe 抗体陰性 HBV キャリアに対する Ge-132 の効果に関するオープンタイプ。中間報告。第 12 回ゲルマニウム研究会記録, pp. 79~80, 1985
- 15) 新村真人 (Ge-132 帯状疱疹研究班): 帯状疱疹に対する有機 Ge-132 の二重盲検法による臨床効果の検討。皮膚 25(4): 755~762, 1983
- 16) 熊坂鉄郎: IFN 有機ゲルマニウムの帯状疱疹における応用。医学と薬学 9(1): 187~190, 1983
- 17) 鈴木富士夫, 藤生 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(6): 488~494, 1986
- 18) 藤生 久, 海老名卓三郎, 石田名香雄, 鈴木富士夫: 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。Chemotherapy 34(8): 665~671, 1986
- 19) SHIMIZU, N. & Y. SOKAWA: 2', 5'-Oligoadenylylate synthetase activity in lymphocytes from normal mouse. *J. Biol. Chem.* 254: 12034~12037, 1979
- 20) SAWAI, H.; K. ISHIBASHI, M. ITOH & N. WATANABE: Sensitive radioimmunoassay for 2', 5'-oligoadenylylates using a novel ¹²⁵I-labeled derivative of 2', 5'-tradenylylate 5'-triphosphate. *J. Biochem.* 98: 999~1005, 1985
- 21) 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(1): 65~74, 1985
- 22) 宗川吉正, 小林弘行, 宗川惇子: Ge-132 投与によるマウス脾臓中の 2-5A 合成酵素の誘導。第 14

- 回ゲルマニウム研究会記録, pp.18~20, 1986
23) OKADA, M. & Y. MINAMISHIMA: The effect of biological response modifiers on chronic and

latent murine cytomegalovirus infections.
Microbiol. Immunol. 31: 435~447, 1987

PROTECTIVE EFFECT OF GE-132 (AN ORGANIC GERMANIUM COMPOUND) ON MURINE CYTOMEGALOVIRUS INFECTION

NOBORU NAKAGAWA, MASANOBU OKADA,
and YOICHI MINAMISHIMA

Department of Microbiology, Miyazaki Medical College

Host-mediated antiviral effect of 2-carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) against murine cytomegalovirus (MCMV) was evaluated in mice. When treated with 10 mg of Ge-132 on day 3 and 1 before virus inoculation, the mice survived the challenge by 5.0×10^8 PFU of MCMV.

The protective effect was manifested as improvement of mortality, decrease in the infectious viruses replicated in the target organs, induction of interferon (IFN) in serum, but without apparent augmentation of NK cell activity. No virocidal or virostatic activity of Ge-132 on the MCMV was evidenced *in vitro*. Thus, Ge-132-induced resistance against MCMV seems to be host-mediated and it correlated with elevated serum IFN, which inhibited replication of MCMV in the target organs, especially in the liver, and subsequently saved the mice from death.