ポリオウイルスの組織培養とこれを応用した抗ウイルス剤のスクリーニングテストについて

第2報 ポリオウイルスに対する実験的化学療法に関する研究

益 永 信 男

京都府立医科大学微生物学教室 (主任 鈴木成美教授)

[受付: 4月7日・1959年]

緒 言

現今 Lymphogranuloma-psittacosis group の large animal virus 以外の Virus に対しては有効な化学療法は認められないと云つても過言ではない。Virus 病に対する化学療法は多数学者の研究にも拘わらずこれをコントロールするに足る有効な化学療法は発見されておらぬ。これが達成の至難なことは Virus の増殖形成に関与するところが大である。細胞に寄生する病原体は一般に宿主のものとは多くの点で異なる自己の代謝系を有している。従つて細菌の増殖を interfere することが出来る化合物は宿主を障害することなく細菌に作用することが出来る。しかしながら Virus の方はその増殖に細菌以上に密接な宿主依存性をもっている。それ故 Virus の發育を interfer するいかなる化合物も同様に宿主を障害するところが大である。現在種類の異なるいろいろの化合物で Virus 感染の発現に関係のある機構又は次期の増殖を interfere するものが知られている。又 in vitro で Virus を不活化し宿主に Virus を接種する際又は接種前に与えると生成される Virus 粒子の数を減少せしめる天然又は人工産物がいろいろある。化学療法に対する定義は人により異なるのは勿論であるが simple な考え方をすると Virus 増殖又は感染の發展を或る程度遅らせ又は阻止する薬剤の応用を指すものと思われる。事実多くの化合物の中には Virus に対する作用が感染前又は感染の初期に限られているものがあるがこれはむしろ感染予防に関係するものと言うべきであらう。最近における多くの研究は Virus の遺伝的特性が主としてそれらの核酸中に保持せられることが判別してから Virus の増殖が核酸代謝を interfere する化合物により遅延せしめ

られることを示した。例えば purine 及び pyrimidine base の構造類似体はいろいろなメカニズムにより Virus 増殖を抑制することが知られている。これらの中には厳格な意味での代謝拮抗的阻止剤 (competitive inhibitor) があり核酸中の base に incorporate されたり precursor からの base の產生されるのを interfere するものがある。又他の構造類似体にはこのような incorporation によつて増殖阻止作用を現わすものがある。例えば今迄動物 Virus の実験的化学療法として試みられた purine analogues としては 8-azaguanine や 2,6-Dichloro-8-hydroxypurine, 2,6-8-trichloropurine, 2,6-dichloro-7-methylpurine のようなハロゲン化 purine がありその他 2,6-Diaminopurine がある。又 pyrimidine analogues としては 5-Bromuracil, 5-nitouracil, dithiothgmine, isobarbituric acid や 5-Chlorouridine などがある。最近 Tamm et al. (1954) は Vitamin B₁₂ の 5,6-dimethyl benzimidazole moiety のクロール置換体例えば 5,6-dichloro 化合物が対応の alkyl 置換体に比し2~3倍強く組織培養したインフルエンザ Virus を抑制するのを発見してから Benzimidazole 誘導体ないし Vitamine analogues による抗 Virus 作用の研究が次第に盛んとなりつつある。余もいささか Benzimidazole の Polio virus に対する抗 Virus 作用に関する実験を行いこれを第1報に報告した。又 Quinone 誘導体はその特異的な生物

MASUNAGA Nobuo: On the tissue culture of polio virus and its application to screening test of antiviral substances. Report II. Studies on the experimental chemotherapy against polio virus. Department of Bacteriology, Kyoto Prefectural College of Medicine — Jap. J. of Bact., 14(12), 998~1008.

学的活性は古くから生化学者の興味をひいていたが¹⁾, 又或る種の抗生物質例えば Jaranicin, Fumigatin 及び Citrinin 等は Quinone 型の構造をその分子中に有していることが知られている。一方 Fischer 等は Amino-diphenyl methan はキノイド構造を有する物質の存在により抗微生物作用を示すことを明らかにした。よつて余は Quinon 誘導体の特異的な作用に鑑み Virus 性疾患に対する治療作用を有するのではないかと考え, 今度は Hydroquinone 及びその誘導体を用いて Polio virus に対する作用を検討したのでこれについて報告する。

マウス感染に及ぼす Quinone 誘導体の効果

実験材料

Virus, マウスは第1報実験に述べたものと同じ, 被検薬剤としては Brenzcatechin, Thymol blue, P-aminophenol, Hydroquinone 及び L-dinitrophenol を用いた。その構造式を次に示す。

実験成績

試験管内不活化試験

被検薬剤を 500 γ /ml 及び 200 γ /ml とし Virus 液の 10^{-2} , $10^{-2.5}$, 10^{-3} を夫々等量混和し 37°C 60 分作用せしめた後マウスの脳内に接種し対照群と比較検討した。

即ち以上の実験より Hydroquinone 処置群では 10^{-2} の

第 1 表

被 検 薬 物	濃 度 (γ)	10^{-2}	$10^{-2.5}$	10^{-3}
Brenzcatechine	500	8/8	8/8	5/8
	200	8/8	8/8	6/8
Thymol blue	500	8/8	8/8	7/8
	200	8/8	8/8	7/8
P-aminophenol	500	8/8	7/8	7/8
	200	8/8	7/8	8/8
Hydroquinone	500	2/8	2/8	1/8
	200	3/8	0/8	0/8
L-dinitro phenol	500	8/8	7/8	7/8
	200	7/8	8/8	3/8
対 照		8/8	7/8	7/8

対照が 8/8 を示すにも拘らず 2/8, 3/8 であり更に 10^{-3} においても不活化作用のあることが明かにされた。又誘導体中では Brenzcatechin 及び L-dinitrophenol が僅かに有効であつた。

Hydroquinone の有効量

前に述べた実験から Hydroquinone が優れた Virus 不活化作用を有することが判明したのでこの量の定量値を求めるために各 Virus 濃度に対する薬剤の最小有効量を求めた。即ち各濃度の Virus と所定の濃度の薬剤とを既述の如くそれぞれ作用せしめた後マウスの脳内に接種して経過を観察した。

第 2 表

Virus 濃度 薬物濃度	作用時間	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
500 γ	37°C 3 時間	0/10	0/10	0/10
200 γ		1/10	0/10	0/10
100 γ		3/10	1/10	0/10
50 γ		6/10	2/10	1/10
25 γ		9/10	5/10	0/10
10 γ		10/10	5/10	1/10
対 照		10/10	7/10	8/10

即ち上記の成績より 10^{-2} Virus では 50 γ で又 10^{-3} Virus では 10 γ で概ね 50 % 発症が阻止されることが判明した。

Hydroquinone の作用時間

更に余は Hydroquinone が Virus 不活化に要する時

間的関係を追究するため 200 γ, 100 γ の薬剤を 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} の Virus と等量混合し所定の時間作用せしめた後マウス脳内接種により観察した。

その成績は次表に示す。

第 3 表

作用温度	薬物濃度	作用時間	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
37°C	200 γ	3 時間	0/10	0/10	0/10
		2 "	7/10	4/10	1/10
		1 "	9/11	5/10	0/10
		30 分	10/10	5/10	1/10
		15 "	10/10	6/10	1/9
		5 "	10/10	4/10	2/11
	100 γ	3 時間	2/10	0/10	0/10
		2 "	8/10	4/10	1/10
		1 "	10/10	8/10	1/10
		30 分	10/10	6/10	1/9
		15 "	10/10	6/9	2/11
		5 "	10/10	9/11	2/12
	対 照	0	10/10	5/9	1/10

即ち不活化は薬剤添加と共に始まり次第に増大してゆく。これは紫外線その他の場合と可成り趣きを異にしている点に注目すべきである。

加熱及び加圧による Hydroquinone の Virus 不活化作用の変化

Hydroquinone は活性の大部分が酸化に基くものと考えられる。併し乍ら加熱及び加圧によつてその活性が如何に変化するかに関してはまだ不明である。かかる操作は本薬剤が単なる酸化反応のみならず構造上特異なる変化を生じて Virus の不活性化に変化を来さしめるであろうことが考えられる。余は以上の想定に基いてそれぞれの濃度の薬剤を 100°C 3 時間及び 2 気圧 3 時間、加熱及び加圧を行つて然る後 Virus 液と等量混合し 37°C 1 時間作用せしめてマウスの脳内に接種し対照群と比較検討を加えた。その成績は次の如し。

以上の表によつて明かな如く本剤は加圧によつて著しく活性の変化を来し 10^{-2} の Virus を不活化し得ざるのみならず 10^{-3} Virus に対し 500 γ を使用してなお 20 % の発症を示し一方加熱によつても同様の変化を来し 10^{-3} Virus に対し 500 γ を使用しても 80 % の発症を示している。

Hydroquinone による治療試験

以上述べた実験により Hydroquinone が試験管内にお

第 4 表

Hydroquinone 前処置		10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
100°C 3 時間	500	8/10	2/10	0/10
	200	8/10	2/10	0/10
	100	10/10	5/10	2/10
	50	10/10	5/9	1/10
2 気圧 3 時間	500	10/10	2/10	1/10
	200	10/10	2/10	2/11
	100	10/10	4/10	2/10
	50	10/10	5/9	0/10
(一)	50	4/10	1/10	0/10
(一)	対 照	10/10	5/10	0/10

いて著しい Virus 不活化作用を有することを確認したので更に本剤が Virus 感染症に対して如何なる治療効果を有するかを知るため次の実験を行つた。即ち 10^{-3} の毒力を示す Virus をマウスの脳内に接種し然る後所定の時間に 30 mg/kg 及び 15 mg/kg の Hydroquinone を注射して対照群と比較検討した。その成績は次の表に示す如くであるが、Virus 接種後 30 mg/kg, 及び 15 mg/kg の Hydroquinone をマウスに 3 時間, 6 時間, 12 時間, 24 時間, 48 時間及び 72 時間後に注射しても非処置の対照群との間に著明な効果を認めることが出来なかつた。よつて本実験の示す限りにおいては本剤は試験管内において Virus 不活化作用を有するもマウスの感染症に対する治療効果は期待し得ない。

第 5 表

接種 Virus	Virus 接種後 薬物投与時間	投与量	処置群	対 照
10^{-3}	3	30 mg/kg 15	27/30 27/29	37/40
	6	30 15	27/30 24/28	
	12	30 15	28/30 29/30	
	24	30 15	29/29 27/30	
	48	30 15	27/30 26/30	
	72	30 15	27/29 28/30	

組織培養系における Hydroquinone の効果

余は以上の実験から Hydroquinone が試験管内において著しい不活化作用を有するにも拘らず生体においては治療効果を示さないことを明かにしたがこれらの点を更に細胞のレベルにおいて明かにする必要から次の実験を行つた。

実験材料

Virus 細胞, 培養液は前項実験と同じ実験方法

HeLa 細胞を培養した試験管に所定の濃度の Virus 0.1 ml 及び 180 γ /ml Hydroquinone 0.1 ml を注入し更に 0.8 ml の培養液を加えて 37°C に培養を続け対照群と比較しつつ経過を観察した。

実験成績

その大要は次表に示す如くである。

第 6 表

Seed 細胞数	前培養 Medium	Hydroquinone 終末濃度	Virus 終末濃度								Log TCID ₅₀	対数差
			- 2	- 3	- 4	- 5	- 6	- 7	- 8	- 9		
40万	15%牛血清	18 γ /ml	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3	0/3	0/3	6.3	0
	Y.L.E.	対 照	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3	0/3	0/3	6.3	

即ち上記の表に示す如く細胞変性作用の抑制は対照群と比較して全く見られず Virus 増殖抑制効果は認められない。

以上余は Polio virus に対する Hydroquinone 及びその誘導体の効果に関して種々実験を行つたが本剤の生化学的特性はその著しい特異的酸化作用にあるとされている。

Wendell⁹⁾ 等は 2-hydroxy-3-alkylnaphthoquinone 及びその他の naphthoquinone 類が P. Knowlesi に対して 10⁻⁶ mol においてもなお阻止することを見出した。

この理由として Glucose の酸化の影響は受けないが Lactate の酸化がこれらの薬剤によつて阻止されることを証明した。又 Bell¹⁰⁾ らはマラリアプラスモジウム及びイーストの呼吸は Hydroquinone がチトクローム b 及び c を通じて抑制されるものであろうことを指示した。

多くのこれらの研究より Quinone 類の作用の特性は特に水素伝達系において重要な役割を演ずるものと考えられるのである⁹⁾。Polio virus の増殖に必要な酵素系については現在明かにされてはいない。併し乍ら HeLa 細胞を用いて Virus 感染時における酵素活性の変化を明かにしようとする試みは近時次第に多く行われつつある。Eaton⁹⁾ らは HeLa 細胞を用いて Polio virus の増殖が細胞の oxidative energy に負うことを種々の化学薬品を用いて証明し又 Miroff¹¹⁾ らは HeLa 細胞に Polio virus を感染せしめ P³² によつて無機磷酸等について分析した結果感染細胞には核酸及び脂質分割部に P³² の蓄積が見られることを証明した。併しこれらの研究は現在まだ開始されたばかりでもあり化学療法剤との関係において論じられているものは少いように思われる。種々の理由から現在では Virus 粒子において認め得べ

き酵素作用は持たないものとされている⁹⁾。併し乍ら Polio virus が核酸より構成されておりこのものの酵素作用は持たない所から Hydroquinone の Virus 不活化作用は Virus 粒子の酵素活性に対する阻害作用ではなくむしろ一次的な酸化反応に基く分子配列の変化と考えるべきであろう。酵素活性に対する反応基は Potter and Du Bois⁹⁾ によれば SH 基であるとされており SH 基の反応性の変化が生物学的活性の変化として表われるものとするべきであると云っている。

Polio virus は試験管内の種々の薬剤の効果をみるときに特に酸化剤に対して著しい反応性を有していることが知られているがそれはかかる所に原因するものと余は考えている。併し乍ら生体内の Virus 増殖に対して Hydroquinone が抑制作用を示さないのは単なる酵素阻害作用と Virus 増殖阻止作用とが同一でないという結論から明白である。Virus 増殖に要する必須因子はまだ明かにされていないからである。Wallenfels¹⁰⁾ は Quinone 類の阻害を示す酵素系は Carboxylase, Pyruvic dehydrogenase 及びその他の oxidase であると考えているが、

これらの点については Virus 増殖阻止と併せて更に研究を進めるべきである。以上余は Hydroquinone 及びその誘導体の Polio virus に対する影響を検討した結果 Hydroquinone は著しい試験管内不活化作用を有することを確認した。併し乍ら生体における治療効果は殆んど認めずこれらの理由について若干の考察を加えてみた。

PANS 及び関連化合物の Polio virus に及ぼす影響

PANS は日本脳炎 virus に対して実験的並びに臨床的に有効であることが認められた化合物^{11,12)}であつて構造上 P-acetyl-amino-naphthalenNa-lauroylsulfonamide であり Congo red の誘導体¹³⁾である。即ち Congo red が Polio virus に有効であつたことから本化合物が得られたものであつてこれは日本脳炎 Virus の HeLa 細胞での増殖に対して抑制作用を示し¹⁴⁾又インフルエンザ Virus の増殖に対しても抑制的であることが報告されている。併し乍ら Polio virus に対して如何なる作用を有するかを明かになし併せてその関連化合物についても抗 Virus 作用を検討し化学構造と抗 Virus 性について言及せんと試みた。

PANS の Polio virus への影響

実験材料

可検 Virus 細胞、培養液は前項実験と同じ、被検薬剤は大日本製薬株式会社の御好意に依り提供された PANS 及びその関連化合物を用いた。

実験方法は前項実験に述べたと同様な方法で薬剤の効果を判定した。

試験管内不活化試験

PANS の試験管内 Virus 不活化作用を見るため試験管内に 5 μ g/mol の PANS と Virus をそれぞれ等量混和し 37°C 24 時間作用せしめた後 TCID₅₀ を測定した。その成績は次の如し。

第 7 表

PANS 濃度 (per ml)	Virus 濃度	作用 時間	作用温度 (°C)	TCID ₅₀
5 μ g	7.6 $\times 10^3$ TCID ₅₀	24	37	10 ^{-2.8}
0	7.6 $\times 10^3$ TCID ₅₀	24	37	10 ^{-3.5}
0	7.6 $\times 10^3$ TCID ₅₀	24	0	10 ^{-3.5}

即ち PANS は僅か乍ら試験管内において Virus 不活化作用を有することが判明した。

組織培養系における PANS の効果

一定濃度の PANS と種々の Virus をそれぞれ 0.1 ml 宛試験管に注入し、培養液 0.8 ml を加えて培養を

第 8 表

PANS 濃度 (per ml)	administration time (hrs)	接種 Virus 量	C-P
5 μ g	-24	100 TCID ₅₀	4/4
5	-24	25	2/4
5	0	100	4/4
5	0	25	3/4
5	+24	100	4/4
5	+24	25	4/4
0	—	100	4/4
0	—	25	4/4

続けた。成績は次表に示す如くである。

以上の表に示した如く PANS は組織培養系においては著明な細胞変性抑制作用を示さず即ち以上のことから PANS は試験管内においては若干乍ら不活化作用を有するが組織培養系においては組織に障害を与えない限りでは抗 Virus 作用は認められなかつた。

種々の化合物の Polio virus に及ぼす影響 (その 1)

Congo red が Polio virus に対して有効であるとの考えから余は種々のナフタレンスルホンアミドの誘導体についてそれらの抗 Virus 作用を有するや否やを知るため一連の実験を行つた。即ち薬物は凡て蒸留水を以て溶解し最初最大耐量を決定し次にその 1/2~1/5 量の薬物を加え 10 TCID₅₀ の Virus に対する細胞変性阻止を検討した。その成績については次表で明らかであるが、これらの薬物はいずれも認むべき抗 Virus 作用を有していなかつた。

種々の化合物の Polio virus に及ぼす影響 (その 2)

余は前記の実験において Congo red 及びその誘導体が著明な抗 Polio virus 作用を有していないことを確めたので更に一部の Virus 性疾患に有効であるとされているスルホンアミド系化合物の数種の化合物について同様の検討を行つた。その成績は次の如し。

以上の表に見られる如く上記の薬物はいずれも優れた抗菌力を有するにも拘らず Polio virus に対しては全く無効であつた。併し乍らこれらの化合物は比較的毒性が少く特異的な酵素阻害作用より考えて更に考慮を払ふべき系列であると思われる。

余は以上述べた如く猿の腎細胞を用いて新たに薬物のスクリーニングテストを考案しこれによつて極めて能率的に薬物の効果を判定した。余は余の考案した方法によつて種々の抗 Virus 剤を研究する目的で日本脳炎治療剤 PANS, Polio virus に有効であるとされている Congo

第 9 表

No.	構 造 式	最大耐量 (モル濃度)	試験濃度	効 果
1		10^{-5}	5×10^{-6} 2×10^{-6}	(-) (-)
2		10^{-5}	5×10^{-6} 2×10^{-6}	(-) (-)
3		$>5 \times 10^{-4}$	2.5×10^{-4} 10^{-4}	(-) (-)
4		$>5 \times 10^{-4}$	2.5×10^{-4} 10^{-4}	(-) (-)
5		10^{-5}	5×10^{-6} 2×10^{-6}	(-) (-)
6		10^{-5}	5×10^{-6} 2×10^{-6}	(-) (-)
7		10^{-5}	5×10^{-6} 2×10^{-6}	(-) (-)
8		$>5 \times 10^{-4}$	2.5×10^{-4} 10^{-4}	(-) (-)
9	Congo red			

第 10 表

No.	構 造 式	最大耐量 (モル濃度)	試験濃度	効 果	Note
1	$\text{NH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\text{NH}_2$	$>5 \times 10^{-4}$	2.5×10^{-4} 10^{-4}	(-) (-)	
2	$\text{CH}_3\text{CONH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\text{NH}_2$	$>5 \times 10^{-4}$	2.5×10^{-4} 10^{-4}	(-) (-)	
3	$\text{NH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\text{NH}-\text{C}_4\text{H}_3\text{NS}$	$>5 \times 10^{-4}$	2.5×10^{-4} 10^{-4}	(-) (-)	スルファ チアゾール
4	$\text{NH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\text{NH}-\text{C}_5\text{H}_3\text{N}_2\text{CH}_3$	$>5 \times 10^{-4}$	2.5×10^{-4} 10^{-4}	(-) (-)	スルファ イソミチン (ドミアン)
5	$\text{CH}_3-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_5$	10^{-4}	5×10^{-5} 5×10^{-5}	(-) (-)	
6	$\text{CH}_3-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\text{NHCH}_3$	$>5 \times 10^{-4}$	2.5×10^{-4} 10^{-4}	(-) (-)	
7	$\text{C}_8\text{H}_{17}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\text{NH}_2$	10^{-5}	5×10^{-6} 2×10^{-6}	(-) (-)	

red 及びその誘導体, 更に一部の大型 Virus や Rickettsia に効あるスルホンアミド 剤等について検討した。その結果 PANS は試験管内における不活化作用を若干認めるもその他においては全く無効であつた。

以上余は γ -gl, Benz, Hydroquinone 及びその誘導体, PANS 及びこれらと関連のある化合物の抗 Polio virus 性を検討した。 γ -gl の効果は云う迄もなく免疫血清療法と類似と考えられ, Benz は核酸拮抗物質であり Hydroquinone 及びその誘導体は酵素反応における阻害剤であつて又 PANS 及びその化合物はビタミン拮抗物質と考えられる。これらの化合物はいずれも現在の化学療法剤研究分野の代表的立場を示す化合物であると考えて差支えない。

γ -gl はこれを感染前に投与すると或る程度有効であり, かつ強力な試験管内不活化作用を有している。前者の事項は明かに後者の試験管内不活化作用に起因していると考えられる。Virus は感染後一時的な eclipse phase を示すからこの期間内の直接不活化作用を有するものは生体内においてその量的な関係から γ -gl の有効性が現われるものと考えられる。

Benz の有効性は初期における核酸合成の阻害と云われているがこれらの点については Virus の増殖曲線よりみてうなづけることである。

Hydroquinone 及びその誘導体は強力な試験管内不活化作用を有しているが治療効果は認められなかつた。即ち単なる酵素阻害剤を用いても Virus の生体内での増殖を抑制する作用は表れないのである。このことは Wolley が既に述べている如く生体の代謝系の阻害剤は薬剤たり得ず単なる毒性としてしか作用し得ないことを意味するものである。

PANS 及びその関連化合物については PANS はその原型とみられる Congo red より実験成績の上では劣つ

Congo red :

ているかに見える。又スルホンアミド誘導体についても著効を示すものは見られなかつた。

Plaque 形成阻止帯による薬剤の効果判定に関する研究

Virus 研究の進歩は組織培養技術の進歩と考えると差支えない。特に Polio virus 研究の長足の進歩は組織培養法の進歩に負う所頗る大である。組織培養は現在3つの方法によつて進められている。即ち組織培養のさい CP-effect をもたぬ Virus は培養後これを特定の感受性動物に復元して始めてその毒力を決定するもので日本脳炎 Virus 等がそれである。本法は実験動物に培養 Virus を復元しなければならずその意義は比較的少いと云わねばならない。次に組織培養によつて Virus を培養するときその培養細胞内に特異的な封入体を形成することである。Rivers¹⁵⁾等は牛痘 Virus やヘルペス Virus に感染した家兎の角膜に特有な封入体の生ずることを観察し又 Andreus¹⁶⁾等は Virus の感染を受けた家兎睪丸の組織培養細胞に特有な封入体の生ずることを観察した。これらの封入体は免疫血清により消失することから中和抗体値の測定が可能となつた。併し乍らかかる封入体の形成は一部の Virus に限定され広い範囲に利用し得ない。第4には組織培養細胞が Virus の感染によつて所謂細胞変性作用 (CP-effect) を示すことである。既に Plotz¹⁷⁾は Virus 感染細胞が正常な発育を行ひ得ないことを指摘し Ivanovics¹⁸⁾らもこれが或る種の 変性作用を示すものであると述べていた。更に Huang¹⁹⁾は西部馬脳炎 (W.E.E.) Virus を鶏胎児の組織培養細胞に感染せしめると急激に変性を来しこれが抗血清により阻止される所から中和抗体の定量を行つていたのである。然る中に既述の如く Enders 等によつて細胞変性作用の報告がなされ多くの Virus においても類似の現象が見られるようになった。この現象は Virus 定量に絶好の手段たりうるのみならずその感染増殖機序の解明に対しても種々の興味ある課題を提供している。

Carrel²⁰⁾はマウス肉腫 Virus を細胞に感染せしめた時恰もバクテリオファージによる溶菌斑の如き外観を呈することを明記したがこのように Virus 定量手段をバクテリオファージの定量手段に近づけることは多くの研究者達の宿願でもあつた。しかる中に 1952 年 Dulbecco²¹⁾は Petri dish の底面に chickembryo fibroblasts の細胞を培養して均等な細胞膜を作りこれに W.E.E. Virus 及びニューキャッスル病 Virus (NDV) を作用させた後培養液を混じた寒天で被うとき特有な plaque を形成す

ることを報告した。即ち Virus はその細胞の中で増殖してひろがり附近の細胞が順次変性壊死に陥るので丁度バクテリオファージに見られる如き細胞の壊死群の穴があくのである。かかる研究はその後 Polio virus²²⁾の各型を始めヘルペス Virus²³⁾, 牛痘 Virus²⁴⁾, インフルエンザ Virus²⁵⁾, 水泡性口内炎 Virus²⁶⁾, Rift Valley Fever Virus²⁷⁾, Coxsackie Virus²⁸⁾, Echo Virus²⁹⁾についても行われて plaque 形成の報告がなされている。かかる plaque は抗血清により抑制され又 plaque の数は Virus の濃度に比例することが知れこの plaque を形成する単位を IPFU (plaque forming unit) と称し Schwert³⁰⁾は猿の腎細胞を培養し polio 第 II 型 MEF₁ 株 Virus を感染せしめて電子顕微鏡的検査の結果 IPFU は 1000 ± 500 個の Virus 粒子に相当することを報告した。又第 I 型 Virus は細胞1個当り 100~200 PFU であると云われている³¹⁾。この事から1個の猿腎細胞より約10万個の Virus が放出されるものとみられている。又 Dubes³²⁾は Polio virus の各株の間における plaque の大きさについて報告している。

かくして余は幾多先人の業績を参照しつつ Polio virus 第 I 型を用いて HeLa 細胞にこれを形成せしめ感受性ディスクに抗 Virus 剤を浸ませておときその周囲に特異的な plaque 形成阻止体の出来ることを見出したので以下それについて報告する。

HeLa 細胞の特殊培養法

実験材料

PBS, 既述 但し CaMg を含まないもの

トリプシン Difco 社のもので PBS で 0.25 % としたものをを用いた。

培養液 15 % 積血清添加 YLE をを用いた。

シャーレ 直径 3 cm, 良質のハイレックスを用いた。

実験方法

200 ml の Roux 培養瓶に単層培養を行つた細胞表面を PBS で2回洗滌し約 4 ml のトリプシンを注入し細胞と接触せしめ 37°C 5~10 分間放置し細胞が壁より剝離するに至るとこれを冷却してトリプシンの作用を止め 800 rpm 5 分間遠沈する。上清を捨て細胞を培養液中に浮遊せしめて懸濁液を作成し細胞数約 40/ml となるようになしこれをシャーレに 3 ml 宛注入して蓋をなし 37°C の CO₂ chamber に保つて培養する。即ち一側のポンペより炭酸ガスを、他の一側よりコンプレッサーで導入し最初の量はガスメーターで測定し洗気瓶内の発泡の度合を計測して空気と炭酸ガスの比が絶えず 100 : 5

となるよう常時マックを調整する。混合されたガスは導管を通じて孵卵器の低部に放出され低面には水をおいて孵卵器内が飽和湿度を保つように調節した。流入するガスは特に滅菌する必要を認めない。

HeLa 細胞の増殖曲線

上述の方法によりシャーレ内で HeLa 細胞の単層培養を行つたとき培養液を交換しない条件で毎日細胞数を計算しその増殖曲線を求めた所次図に示すが如き結果を得た。これによると接種時 4×10^6 の HeLa 細胞は8日目においては 9.2×10^6 となりこの間約10倍に増殖することを明かにした。

第 1 図

Plaque 形成阻止帯に関する検討

薬剤による Plaque 形成阻止帯の研究

実験材料 前項と同じ

実験方法

HeLa 細胞を単層培養したシャーレより古い培養液を除去して細胞を PBS を以つて2回洗浄したる後所定の濃度の Virus 液 1 ml を注入し 37°C の孵卵器にて1時間作用せしめ寒天を等量に混じた培養液を以つて被覆する。寒天が冷却されて固まると予め用意してある感受性ディスクにそれぞれの濃度の抗ウィルス剤を浸透せしめて寒天上におき前節に細述した CO_2 chamber に入れて培養を続け毎日観察した。

又シャーレの代りに Roux の培養瓶を用い或いは Gey の培養瓶を用いこれにゴム栓の代りに綿栓をして既述の CO_2 chamber に入れて培養するときは plaque 形成がよりよく出現することを創案した。

実験成績

I) シャーレによる方法

写真の中Aは対照であり, Virus 10^{-1} のみでありB及びCは免疫血清の100倍希釈及び原液をそれぞれ感受性

ディスクに浸したものである。

Cは相当広い Plaque 阻止帯を形成し Plaque はむしろ周辺部に止まりA及びBには阻止帯は見られない。

写真 1

II) Roux の培養瓶を用いる方法

余の考案せる方法により Roux の培養瓶に綿栓を施し CO_2 Chamber に入れたものである。即ち上方のディスクは免疫血清10倍希釈液を含ましめ下方のそれは対照として PBS のみを含むものである。前者においては直径約2cmの Plaque 形成阻止帯が観察され顕微鏡的にも細胞変性は全く見られない。後者においてはディスクの周辺より直ちに細胞変性を来し染色性は低下し細胞は全く壊死状態を示すことが観察された。この培養瓶をエルマ式コロニー計算器上に置くと更に明瞭に観察し得るのである。

写真 2

III) 薬剤による相対的阻止帯の形成

余は以上の実験結果に鑑み更に γ -gl 並びに Benz. についてもシャーレ及び Gey の培養瓶を用いて同様の試験を行つた。その成績は以下の3つの表に示す如くである。なお Plaque 形成を阻止し細胞変性を認められないものを (+), 阻止し得ないものを (-) と記載した。

第 11 表

例	1	2	3	4
免疫血清希釈倍数	$\times 10$	$\times 100$	$\times 1000$	(-)
Virus 希釈倍数	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}
ディスク周辺 2-3 mm	(+)	(+)	(-)	(-)
10 mm	(+)	(±)	(-)	(-)

第 12 表

例	1	2	3	4	5	6	7
γ -gl 希釈倍数	$\times 1$	$\times 10$	$\times 100$	$\times 1$	$\times 10$	$\times 100$	対 照
Virus 希釈倍数	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}
ディスク周辺 5 mm	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
10 mm	(+)	(+)	(-)	(+)	(±)	(-)	(-)

第 13 表

例	1	2	3	4	5
ベンツイミダゾール 希釈倍数	10^{-3} Mol	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	(-)
Virus 希釈倍数	10^{-2}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-2}
ディスク周辺 5 mm	(±)	(±)	(-)	(-)	(-)
10 mm	(±)	(-)	(-)	(-)	(-)

即ち以上の実験成績より明かな如く γ -gl は 100 倍希釈において 10^8 TCID₅₀ の Virus に対して阻止能力を有し 10 倍においては可成り広い阻止帯を形成した。又 Benz. の場合は 10^8 TCID₅₀ の Virus に対していずれも著明な阻止帯を示すことはなかつた。

小 括

以上余は余の考案した CO₂ chamber を用いて HeLa 細胞を培養するとき良好な発育を示すことを知つた。HeLa 細胞は単層をなして増殖し Dulbecco が示した Plaque 形成実験の行う好適のものである。又余は Sommer²³⁾等が示した方法を用いて種々の抗 Virus 剤の効果を

を検討した。併し乍ら本法は Virus 直接不活化作用を有するものにとつては有力な手段となりうるが抗 Virus 剤の作用機序の解明には今後の研究にまたねばならないと思われる。即ち感性ディスクより薬物が拡散する場合その拡散性や溶解性が著しく阻止帯の大きさを限定する如く思われ、又その大きさは可成り不同であり細菌学領域におけるその如く一定明瞭ではなくそのため薬剤濃度との直接的な一次的関係は見出せなかつた。併し乍ら余は本法が定性的方便としては有力な方法であると信ずるものである。

総括並に考按

余は Polio virus に対する抗 Virus 剤のスクリーニングテストとして主として組織培養法を応用し Benz. 又

は Hydroquinone 及びその誘導体等について実験を試みた。

Benz. は本組織培養系において polio virus 増殖抑制を示し、Hydroquinone 及びその誘導体については著明な試験管内不活化作用を有するがその他の方法では全く無効であつた。又日本脳炎に対する化学療法剤として登場した PANS は僅かに試験管内不活化作用を有するのみに止りその関連化合物群においても著効を示すものは見当らなかつた。又余は Plaque 法と細菌学領域において用いられる感受性ディスクの理論を応用することにより Plaque 形成阻止帯を作りこれを以つて被検薬剤の効果を判定することを考案した。以上は抗 Virus 剤の立場から見た場合であるが本症の如く神経組織の壊死を伴う疾患の場合その病理像についても考える必要がある。Virus は好んで脊髄の神経細胞を侵襲しこの過程は Virus 感染と同時に始まり Viraemia の起る頃には既に完全な Virus 増殖が始められ更に全身に拡散され所謂全身性に Virus 増殖像が見られるのである。よつて Virus の分離とその後発現する麻痺を示す頃には既に神経細胞の 6 割以上が崩壊を示しており²²⁾ このときには既

に治療の段階は化学療法的には手遅れであると云わねばならない。一般に病原性疾患に対する治療方法についての二つの流れ、即ち Ehrlich を始祖とする化学療法的方法と Behring に始まる免疫学的方法は互に相補いつつ現在に至りその輝かしい治療方法を確立したけれども寄生虫、原虫、細菌の部門において示されたこの輝かしい成果も Virus 性疾患に対してはまだその門は閉されたままの状態である。只 Jenner による牛痘ワクチンによる方法のみがこの分野における金字塔でありこの輝かしい成果の故に Virus 性疾患の治療はワクチンによるのみが正しいとする意見が多いがこれは病原体に対して個々に相補的である可きであらう。

Polio virus はソーワクチンの出現によつて現在此の問題は終つたかに見える。併し乍らなお種々の問題は治療面のみならず増殖論の面からも研究すべき多くの課題が残されている。Virus の増殖論より見るときその増殖抑制剤の研究は多くの点より期待が寄せられている。スルフォンアミドの発見が細菌の代謝系を明かになした如く³³⁾又クロラムフェニコールのバクテリオファージへの応用によつてこのものが核酸の合成のみを阻害して蛋白の生合成を阻害しないと云う Wisseman^{28, 35)}の説が提出されファージの増殖機構が著しく明かにされた如く Virus 増殖論における増殖抑制剤への期待は少しも減ずるものではないのである。余は以上の観点より全章に亘つて化学療法剤研究のための基礎的並びに応用的研究を行い種々の新知見を得た。この新知見こそは今後の化学療法剤研究のための有力なる布石であることを確信し更により優れた治療剤の発見への緒口ともなり又 Virus 学の進歩ともなることを確信するものである。

結 論

- 1) キノン誘導体群にてはハイドロキノンのみ Polio virus に対し試験管内不活化作用を有する。
- 2) PANS は若干の試験管内不活化作用を有する。
- 3) 薬剤の効果を判定するため plaque 形成阻止帯による方法も併せ行つた。

稿を終るに際し終始御懇篤なる御指導を賜つた恩師鈴木成美教授に深甚なる謝意を表すると共に御助力御助言を賜つた大日本製薬株式会社宮武徳次郎社長並びに同社研究部長筒井清博士に深謝する。又株の分与を受けた岡山大学医学部浜本英次教授に謝意を表する。

参 考 文 献

- 1) L. Michaelis & M. P. Schubert: Chm. Revs. 27, 437, (1938).
- 2) E. Fischer: J. Bact. 51, 1, (1946).
- 3) Wendell, W. B.: Fed. Proc. Soc. ExpH. Biol. Med. 5, 406, (1946).
- 4) Ball: J. B. C. 168, 257, (1947).
- 5) Wieland, H.: Über d. Verlauf d. Oxydationsorgane.
- 6) Eaton: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 86, 515, (1954).
- 7) G. Miroff: J. B. C. 255, (1957).
- 8) Pollard: The physics of viruses. (1956).
- 9) V. R. Potter, K. P. Dubois: J. Gen. Physiol. 26, 391, (1943).
- 10) K. Wallenfels: Die Chemie 58, 1 (1945).
- 11) Ueda: Keio Med. J. 5, 2, (1952).
- 12) 浦川: 京府大誌近刊号掲載予定堤。
- 13) Wood, Ving, R.: J. E. M. 82, 297, (1945).
- 14) Utz: Proc. Soc. ExpH. Biol. Med. 60, 186, (1948).
- 15) Rivers, T.: J. E. M. 60, 665, (1929).
- 16) Andrews, C. H.: Brit. J. Exp. Med. 10, 188, (1929).
- 17) Ploz: Compt. red. soc. biol. 112, 525, (1933).
- 18) Ivanovics, G.: Am. J. Hyg. 23, 55, (1936).
- 19) Huang, C. H.: Proc. Soc. ExpH. Biol. Med. 396, (1942).
- 20) Carrel, A.: J. A. M. A. 84, 157, (1925).
- 21) Dulbecco: Pro. Nat. Acad. Sci. 38, 747, (1952).
- 22) Dulbecco: J. Exptl. Med. 99, 167, (1954).
- 23) Black & Melnick: J. Immunol. 74, 236, (1955).
- 24) Noyes: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 83, 426, (1953).
- 25) Granoff: Virology 1, 252, (1955).
- 26) Sellers, R. F.: Nature, 176, 547, (1955).
- 27) Takemori, et al.: Virology. 1, 250, (1955).
- 28) Hsiung & Melnick: Virology. 1, 533, (1955).
- 29) Hsiung & Melnick: Virology. 1, 533, (1955).
- 30) Schwert: Acad. Sci. 61, 740, (1955).
- 31) Younger: J. Immunol. 73, 392, (1954).
- 32) Dubes: Virology 2, 284, (1956).
- 33) Somer: Virology 3, 387, (1957).
- 34) Brown, J. R.: J. A. M. A. 134, 757, (1947).
- 35) Wood: Brit. J. E. Patt. 21, 74, (1940).
- 36) Wisseman: J. Bact. 67, 530, (1940).
- 37) Wisseman: J. Bact. 67, 674, (1954).