原 著

大腸菌ウイルスの増殖に対する Gantrisin の作用

田 波 潤 一 郎 *

JUNICHIRO TANAMI : THE INHIBITORY ACTION OF GANTRISIN
ON THE MULTIPLICATION OF VIRUS OF ESCHERICHIA COLI

〔受稿：7月29日，1954〕

スルファミン剤は大腸菌の発育を阻害するが、酸素の消費も酸の発生も完全に抑制することはない。細菌とスルファミン剤（以下 SA と記す）との接触を一定時間内に絶てば細菌は再び発育を開始する。この現象はホモスルファミン、スルファチアゾール、アセトスルファミン等多くの SA について共通のことである。大腸菌ウイルス系に於けるウイルスの増殖に対する SA 剤の増殖抑制作用も一時的な増殖過程の阻害であり、著者等は先にホモスルファミンの作用について報告した。大腸菌ウイルスに対する種々の SA の作用は夫々特徴があり、薬剤の特異性を示すものであるが、全般に汎る報告は別の機会に譲り、本論文に於いては水に対する溶解度の高いガントリシン（以下 GA と記す。3,4 dimethyl-5 sulfanilamido-isoxazole.）の大腸菌 F₆ ウイルス T_{6g} 系に対する作用を調べた成績を報告する。

實 験 方 法

1. 培養には NH₄Cl...0.5g, (NH₄)₂SO₄...0.1g, NaCl...0.1g, MgSO₄...0.1g, Na₂HPO₄...6g, KH₂PO₄...3g, Glucose...4g, Gelatin...0.02g, 溜水...1000ml の組成を有する合成培地を用いた。培地 pH は 7.0 である。添加すべき GA, KCN は溜水溶液とし、その 0.5ml を培養管に加えて最終濃度が前者は 0.2%, 後者が 0.01 モルとなるようにした。

2. 用いたウイルスは F_{6g} と Escherichia Coli F₆ 株である。使用菌は実験時 37°C 10 時間前後合成培地斜面に培養した集落を合成培地中にかき落し、遠心沈澱によつて洗滌した菌体を集め、合成培地中に浮遊せしめ

て後 37°C, 160rpm の振盪培養を行つた。

3. ウイルスの増殖は one-step 増殖試験³⁾⁴⁾によつた。ただ目的に応じて稀釈時間、稀釈の方法等を若干変更した。即ち合成培地発育中の 10⁸/ml 程度の F₆ 菌に 10⁶/ml の割合になるようにウイルス T_{6g} を添加し、5 分間培養後その一部をとり 5000rpm 10 分間遠心沈澱し、その上清に残つた未吸着の遊離ウイルス量を求めて感染菌数を算定した。実験の各々は実験成績を述べる際に記述するが、上記 one-step 増殖試験に用いる混合管に、任意の時刻に薬物を添加し、又は稀釈による薬物の除去を行つた。稀釈は one-step 増殖試験の過程に於ける稀釈の際に 100 倍乃至 1,000 倍に合成培地を用いて稀釈した。

薬物を添加しない通常の one-step 増殖試験に於いてはウイルスの latent period 20 分、ウイルスの burst-size 40 であつた。又ウイルスと宿主菌混合後 5 分後の吸着率は 90~95% であつた。

4. KCN 溶菌作用の研究は Doermann の方法に従つた。即ち合成培地発育中の F₆ 菌が 10⁸/ml 程度になつたとき 10⁶/ml になるようにウイルス T_{6g} を添加し、5 分後に一部を遊離ウイルス計測のために採り、同時に一部を採りこれを新しい合成培地に 10 倍稀釈になるように投入し、更にこの稀釈管から 1~2 分間隔をもつてその 0.5ml を採取し、0.01 モルになるように KCN を含んだ 9.5ml の合成培地に投入した。このものを 37°C 40 分間振盪培養し、夫々の時刻に稀釈して平板上に重層した。この重層法には 0.8% 普通寒天ブイヨンを用いた。

GA 作用下に於ける F₆ T_{6g} 系に対する 0.01 モルの

* 千葉大学医学部衛生学教室

KCN の作用は、ウイルス・宿主菌系と GA を含む培養管の内容を 0.01 モルの KCN を含む合成培地中に投入し 100 倍に希釈するように計画した。その外の手技は KCN を含まない場合と同様であつた。

5. F_6 菌数及び種々の発育曲線、ウイルス・宿主菌系の溶菌曲線は濁濁計 III 型を用いてこれ等を測定した。

実験成績

1. ウイルス T_{6g} ・ F_6 菌系に対する GA, KCN の作用：

合成培地発育中の F_6 菌に 0.01 モルの KCN, 0.2% の GA を添加すれば添加直後より F_6 菌の発育が停止する。発育停止の模様を追跡すれば第 1 図の如くである。濁濁曲線と生菌数の変化とを比較すると GA の場

Fig. 1. Influence of Gantrisin (0.2%) and KCN (0.01 M.) on the bacterial multiplication. ●—● control, ○—○ Gantrisin, △—△ KCN, ↓ time of addition.

合は添加後90分までは生菌数に増減なく、その後減少を始めた。KCN の場合は添加後30分以後に生菌数の減少を認めた。GA 添加の場合は90分までに 100 倍に希釈すれば殆んど対照と同様の速度を以て発育を再開した。

ウイルス T_{6g} は 0.2% の GA, 0.01 モルの KCN によつて 2 時間内に不活化されることがなかつた。

ウイルス T_{6g} の感染した F_6 菌に対する 0.2% の GA の作用は、時間の経過につれて殺滅効果を呈したが、その程度は混合後35分までに plaque 数を計算量の 2/3

～5/8 に低下せしめたが 1/2 以下に低下せしめることはなかつた。

0.2% の GA はウイルス T_{6g} の F_6 菌への吸着に重大な阻害を与えなかつた。即ち、 T_{6g} ・ F_6 混合と同時に 0.2% の GA を添加し、5 分後に遠心沈澱し、その上清の遊離ウイルスを調らべて吸着率を算定してみると 88～92% の成績を得た。

2. T_{6g} ・ F_6 系に GA を加え以後 GA を除去しない場合のウイルス増殖：

合成培地発育中の 10^8 /ml の F_6 菌にウイルス T_{6g} を 10^6 /ml に加え同時に 0.2% の GA を加えて培養を行い、GA 濃度を変えずに、即ち希釈培地も常に 0.2% の GA を含有するようにして one-step 増殖試験を行つてみると plaque 数の増加を全く認めなかつた。0.2% の GA の添加時刻を次第に遅らせて感染後 8 分迄の各々の one-step 増殖試験を行つてみても殆んど同様に plaque 数の増加を認めなかつた。

次に F_6 菌ウイルス感染後 9 分以後に 0.2% GA を添加して one-step 増殖試験を行つてみると、GA の添加時刻が遅れる程 burst-size が大となり、burst 開始の時刻は何れも 20 分であることを認めた。10 分後並に 14 分後に 0.2% の GA を添加した場合の one-step 増殖試

Fig. 2. The effect of addition of Gantrisin (0.2%) to growth tube at various times after infection.

●—● control, △—△ addition at 10 min., ○—○ addition at 14 min., ↓ time of addition.

験の成績を第2図に示す。

合成培地発育中の F_6 菌 10^8 /ml に 10^8 /ml になる様にウイルス T_{eg} を添加し、感染後8分に0.2%のGAを添加すれば溶菌は起らなかったが、感染後9分にGAを添加すれば緩徐な溶菌が20分以後に見られた。9分以後の溶菌は何れも20分に開始され、GAの添加時刻が遅れる程溶菌速度が増し、溶菌量も大となつた。ウイルス感染後7分、10分、14分に0.2%のGAを加えた場合の溶菌曲線を第3図に示す。

Fig. 3. The turbidity of T_{eg} infected bacterial culture as affected by addition of Gantrisin (0.2%) at various times after infection
●—● control, ×—× addition at 7 min.,
△—△ addition at 10 min., ○—○ addition at 14 min., ↑ time of addition

以上の成績から F_6 菌がウイルスの感染を受けてから8分までに0.2%のGAが加えられ、以後この濃度が維持されるかぎり溶菌が起らず、ウイルスの増加も現われないことがわかる。9分以後に0.2%のGAが加えられ、以後この濃度が維持されるとウイルス・宿主系の一部が溶菌可能であり、溶菌した分だけ活性ウイルスが放出される。これは感染後9分以後の T_{eg} ・ F_6 系にGAを加えた場合の溶菌曲線から見られる溶菌量(第3図)と one-step 増殖曲線から見られる活性ウイルス量(第2図)との割合がよく一致していることから知られる。

即ち感染後9分を越えて発達した T_{eg} ・ F_6 系はGAの作用下にあつても溶菌し、その時刻までに系内に存在したウイルス前駆体は活性ウイルスとして放出される状態にあつたものと推定される。

3. T_{eg} ・ F_6 系にGAを加え適当な時刻にGAを除去した場合の one-step 増殖試験：

ウイルス・宿主菌混合と同時に0.2%のGAを加え、感染後8分までに混合培養の一部を採り100倍以上に合成培地を用いて稀釈し、この稀釈管をもととして one-step 増殖試験を行つてみると、burstの開始は20分に認められ、burst-size も普通の one-step 増殖試験の成績と大差がなかった。即ちGAの作用は感染後8分までに取り除かれればウイルスの増殖に殆んど影響を与えないものであることが知られた。ウイルス感染後9分を越えて引き続きGAが存在した場合、例えば第4図に示すが如く12分、16分、21分後に0.2%のGAを合成培地の稀釈によつて除去し、以後 one-step 増殖試験を行つてみると、稀釈時刻が8分より遅れるに従つてburst開始の時刻が遅れて現われた、この遅れ方は、

Fig. 4. Latent period and burst size of T_{eg} and F_6 system on dilution after various lengths of exposure to Gantrisin (0.2%) from the time of infection.
●—● control, and dilution at 8 min.,
△—△ dilution at 12 min.,
□—□ dilution at 16 min.,
○—○ dilution at 21 min.,
↓ time of dilution.

稀釈時刻より12~14分の間隔を示した。即ち、 T_{eg} ・ F_6 系のウイルス増殖過程中8分までの過程はGAの作

用を受けずに進行し、9分以後の過程がGAの存在によつて停止せしめられる。更に一定時間の停止の後にGAが除去されると、 $T_{6g} \cdot F_6$ 系のウイルス増殖過程は8分の状態から再開されるものと推定される。この際実験の範囲内では各々の burst-size に全く差を認めなかつたからGAのウイルス増殖阻害作用は純然たる増殖静止の形をとるものである。

4. $T_{6g} \cdot F_6$ 系に対するGAの作用とKCN溶菌との関係：

以上の成績からこの $T_{6g} \cdot F_6$ 系に於いては感染後8～9分に系がGA不感受性から感受性へ移行することが認められるが、この時期が系内に於ける活性ウイルス出現の時期とどのような関係にあるかを知る目的で次の実験を行つた。

合成培地発育中の F_6 菌 10^8 /ml に 10^8 /ml の割合にウイルス T_{6g} を加えて培養後7分までに0.01モルの割合にKCNを加えても溶菌は認められなかつた。感染後7.5分に0.01モルの割合にKCNを加えると23分後に緩徐な溶菌を認めるが、この溶菌液を plaque-count しても活性ウイルスの出現を認めなかつた。

同様の現象はウイルス感染後10分までの $T_{6g} \cdot F_6$ 系について認められた。

感染後11分ではKCN溶菌後活性ウイルスを認め、12分では多数の活性ウイルスを認めた。

溶菌曲線についてみれば、感染後12分にKCNを加えたものでは急速な溶菌が添加直後に生じた。感染後

Fig. 5. The turbidity of T_{6g} infected bacterial culture as affected by addition of KCN (0.01 M.) at various times after infection.

●—● control, ○—○ addition at 7 min.,
△—△ addition at 7.5 min.,
□—□ addition at 12 min.,
↑ time of addition.

11分及び10分にKCNを添加した場合には溶菌開始の時刻が遅れ、溶菌速度も緩徐であつた。例として F_6 菌ウイルス感染後7分、7.5分、12分に0.01モルの割合にKCNを添加した場合の溶菌曲線を第5図に示す。

この成績から考えられることは感染後7分までに0.01モルのKCNが添加されても溶菌が起らず、7.5分以後にKCNが添加されれば溶菌を起すが、11分までのKCN添加では直ちに溶菌せず一定時間後に溶菌を起す。この際は活性ウイルスの出現を認めない。11分以後になるとKCN添加と殆んど同時に溶菌を開始し全菌溶菌を起し、この際はその時刻までに系が保持していたと思われる活性ウイルスを放出するものと考えられる。合成培地発育中の F_6 菌 10^8 /ml にウイルス T_{6g} を 10^6 /ml の割合に加え0.01モルのKCNを用いて cyanide lysis を起させて plaque count を行い、1～

Fig. 6. Cyanide lysis curve of T_{6g} and F_6 system.

○—○ control one step growth experiment,
△—△ cyanide lysis curve by KCN of 0.01 M..

2分毎に活性ウイルスの出現する有様を追跡してみると第6図に示すようなウイルス増加曲線を認めた。この成績は第5図の溶菌曲線の場合の成績と一致する。

恐らく $T_{6g} \cdot F_6$ 系に対する cyanide lysis は感染後7.5分以後の過程に起り得るものであるが、溶菌に伴って活性ウイルスの出現し得るのは11分以後となるものと考えてよい。

即ち、12分以後は全菌溶菌を起してくるが、これは溶菌可能な $T_{6g} \cdot F_6$ 系が全部溶菌するのであつて、この中のある系が活性ウイルスを放出し得たものと思われる。

ウイルス合成過程阻害の立場から見れば GA はウイルス感染後8分、KCN は7~7.5分以後の過程に作用を及ぼすものと思われる。

KCN 溶菌によつて活性ウイルスの出現する時刻、即ち11~12分に系内に活性ウイルスが出現したものと考えれば、GA はこの時刻より約3分前に $T_{6g} \cdot F_6$ 系のウイルス合成過程を固定するように働くこととなる。GA を取り除くことによつて、系の合成過程が固定された8分の位置から再出発するならば稀釈後3分経過した後活性ウイルスが出現する筈である。

5. GA作用下の $T_{6g} \cdot F_6$ 系に対する KCN の作用：

合成培地発育中の F_6 菌 10^8 /ml に T_{6g} を 10^6 /ml の割合に加え、同時に0.2%の GA を加え20分間培養し、20分にその一部を採り出して100倍に稀釈し、この稀釈管から以後1~2分間隔をもつて0.5ml を採り、0.01モルの割合に KCN を含む合成培地9.5ml に投入し、

37°C40分間培養した後適宜に稀釈して平板重層法を行

Fig. 7. Cyanide lysis curve of T_{6g} and F_6 system as affected by Gantrisin of 0.2% until 20 min. after infection.

- control growth curve of virus in the presence of Gantrisin (0.2%), dilution was made at 20 min. after infection into normal synthetic medium.
- △—△ cyanide lysis curve in the presence of Gantrisin (0.2%), dilution was made at 20 min. after infection into synthetic medium containing KCN of 0.01M..

つた。この成績を第7図に示す。この場合24分には活性ウイルスの出現を認めなかつたが、25.5分に突然活性ウイルスの出現を認め、以後比較的緩やかにウイルス数の増加を認めた。KCN の添加をしない合成培地を用いて稀釈し、上述の実験を繰返して得た成績を第7図の対照として記載したが、この対照のウイルス増加と KCN 溶菌の際のウイルス増加とを比較すると、burst-size には大差はないが、ウイルス増加速度に差が見出された。

考 察

スルファミン剤 (以下 SA と記す) は一般にパラアミノ安息香酸が関与する一連の酵素系を逐次阻止するものらしく、Escherichia coli を用いた Shive 等及び Winkler 等の実験によれば、SA に最も鋭敏なものがメチオニンの合成で、次いでキサンチンその他のプリン類の合成である。尙セリンと葉酸との合成阻害にはメチオニン、プリン類の合成阻害の場合よりも多量の SA を要するという。

今の所著者の用いている F_6 菌が0.2%の GA によつてどの合成過程が、どの程度阻害されているかは明かでないが、現在の研究の限りでは葉酸の合成が阻害されている程度のものであると思われる。葉酸其の他上述の合成物質が核酸合成に関係していると考えられるから、GA によつて阻害される $T_{6g} \cdot F_6$ 系のウイルス合成過程は新しく生合成さるべき或る種の DNA 出現の直前であると考えられる。GA によつて阻害されない8分までの系内合成過程は、ウイルス・宿主菌系が周囲の栄養源から遮断された状態で起り得るもので、宿主菌の DNA 及び親ウイルスの DNA がこの過程の主役を演ずるものと思われる。

SA の抑制する酵素系という表現を用いれば、親ウイルスの DNA が菌体内に拡散して行き菌体 DNA に働きかけ、一定の準備体制を作る。この準備体制の出来上るまでは SA の抑制する酵素系は関与しない、こ

れから先の増殖過程は SA によつて抑制される酵素系の活動により、新らしく DNA 合成が起るか、又は DNA が再編成されるかしないかぎり進行し得ないこととなる。

Hershey の言う所の precursor pool の出現がこの DNA の準備体制の時期と如何なる 関係にあるかは、 $T_2 \cdot B$ 系を用いてこの種の実験を行う必要があり、更に電子顕微鏡による研究を併せ行う必要がある。

$T_{6g} \cdot F_6$ 系に於いては cyanide lysis によつて活性ウイルスの認められる時期が感染後 11~12 分である。11 分に最も早い活性ウイルスの出現があつたものとすれば、この 11 分と GA によつて最も後れて完全に溶菌を阻止される 8 分との間の 3 分間に所謂ウイルス前駆体から活性ウイルスの出現へ向う重大な合成過程が急速に発展するもので、この過程の生起、不生起を左右する酵素系が GA によつて一時的に完全に阻止される性質のものであることは興味ある事実である。

尙 諸種の SA を使用して同様なウイルス増殖阻害実験を行つてみると、抑制時刻の相異が見られ、又同じ SA でもその濃度によつて抑制効果の現われ方が異つて来る。 $T_{6g} \cdot F_6$ 系以外のウイルス系については系内酵素系の活動状態が異なるに従つて SA の抑制効果が相異なるものと思われる。

総 括

合成培地中に於ける大腸菌 F_6 とウイルス T_{6g} 系の burst 開始は 20 分で、burst size は 40 である。この系に時刻を変えて 0.2% の ガントリシン (スルファミン剤) を加え、又は稀釈除去して溶菌及び活性ウイルス増加の模様を調べ、更に 0.01 モルの KCN を添加して cyanide lysis の結果を調べた。

$T_{6g} \cdot F_6$ 系にガントリシン (GA) を添加しても感染後 8 分までに GA が除去されればウイルス増殖は対照と比較して大差を認めなかつた。

$T_{6g} \cdot F_6$ 系に GA が感染 9 分以後に添加されると部分的な溶菌と溶菌量に比例した活性ウイルスの出現を認めた。

$T_{6g} \cdot F_6$ 系に GA が 8 分前より引続き 9 分以後にわた

つて作用する限り溶菌も活性ウイルスの出現も認められなかつた。

この溶菌しない GA 作用下の $T_{6g} \cdot F_6$ 系を合成培地を用いて 100 倍以上に稀釈し、one-step 増殖試験を行つてみると、稀釈時刻より 12~14 分遅れて burst を開始し、burst-size は対照と比較して大差を認めなかつた。

この GA 作用下の $T_{6g} \cdot F_6$ 系を稀釈と同時に 0.01 モルの KCN を含む合成培地中に投入すると、稀釈後 5 分にして突然活性ウイルスの出現を認めた。

尙 $T_{6g} \cdot F_6$ 系に対して 0.01 モルの KCN を用いて cyanide lysis を行つてみると、感染後 11 分乃至 12 分に活性ウイルスの出現するのを認めた。

以上の諸成績から、 $T_{6g} \cdot F_6$ 系に対するガントリシンの作用は、ウイルス増殖過程に於ける 8 分までの過程には影響を与えず、この薬剤が存在していても進行し得る部分を認める。ウイルス感染後 8 分を越えてこの薬剤が存在しつづけるとウイルス合成過程の 9 分から 10 分の間の反応が抑圧される。この抑圧を受け得る過程を通過した $T_{6g} \cdot F_6$ 系にガントリシンを添加されても活性ウイルスを保持するようになる。

9 分後にまで引続くこの薬剤の作用により 8 分の状態に固定されている $T_{6g} \cdot F_6$ 系は稀釈により薬剤を除去すれば、固定された状態から引続いてウイルス合成過程を再開する。

参 照 文 献

- 1) 田波潤一郎、他：Virus, 2, 116-123, 1952.
- 2) 田波洋：Virus, 4, 101-108, 1954.
- 3) Delbrück, M., J. Gen. Physiol., 23, 643-660, 1940.
- 4) Adams, M. H., Methods in Medical Research, 2, 1-71, 1950.
- 5) Doermann, A. H., J. Gen. Physiol., 35, 645-656, 1952.
- 6) 田波潤一郎、他：J. J. of Hygiene, 7, 3 & 4, 183-186, 1953.
- 7) Shive, Roberts, J. Biol. Chem., 162, 463, 1946.
- 8) Winkler, Haan, Arch. Biochem., 18, 97, 1948.
- 9) Hershey, A. D. & Chase, M., J. Gen. Physiol., 36, 39-56, 1952.