放線菌の産生する抗インフルエンザ物質に関する研究

i. Streptothricin Ⅲ の試験管内作用機作

宮 川 剛 *

TSUYOSHI MIYAKAWA : STUDIES ON THE STREPTOMYCES ANTI-BIOTICS EFFECTIVE AGAINST INFLUENZA VIRUS

i. ON THE MODE OF ACTION OF STREPTOTHRICIN Ⅲ

〔受稿 9月7日 1957〕

緒 言

最近我々の教室では、発育鶏卵漿尿膜の小片と、インフルエンザAウイルスPR₈株とを組合せた、簡単な組織培養法によつて、多くの抗ウイルス物質が、放線菌濾液から系統的に単離された¹⁾。しかしそのあるものは、鶏卵内では力価を示さぬし、又マウスの体内でこのウイルスの増殖を抑えるものと云えば、今迄の所 Myxoviromycin²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾ しかない。しかし、たとえ動物体内で効かなくとも漿尿膜に於て何故ウイルスの増殖を抑えるのか、一応追求さるべきものの様に思う。何故なら、我々は多くの化学性状を異にした、抗ウイルス物質を持つて居るが、夫等の内ある一群の抗生物質は、ウイルス増殖の或る生化学的ステップを特異的に阻止するという結果を示すかもしれない。そしてある増殖段階を阻止するものは化学療法的に意味があり、即ちマウスに有効であり他の増殖段階を阻止するものはその反対であるという結果も引出される可能性がある。更にウイルス増殖を分析するという立場に立つても、之等の物質が作用する夫々の stage が特異的であれば、ウイルス増殖の Chemical stage の理解を更に深め得る。

こゝでは Myxoviromycin と化学的に類似の性質をもち、即ち Streptomycin や Streptothricin と同様な精製法で精製して得られる白色粉末の塩基であるが、特に我々が Streptothricin Ⅲ⁶⁾ と呼んだ物質を取上げそのウイルス増殖に及ぼす影響を検討することにした。Streptomycin や Streptothricin の I, Ⅱ⁷⁾ はこの組織培養法では PR₈ に対し阻止的に働かないが、同

じ抗菌スペクトルをもちほぼ同様の毒性であるに拘らず、この物質のみがウイルスの増殖を阻害する事に先ず興味をもたれた。なおこの物質は、マウスの動物実験では効かなかつた事を附言しておく。

実験材料と方法

1. ウイルス

インフルエンザAウイルス PR₈ 株の Ferret 7代、マウス593代、発育鶏卵182〜3代という継代株を用いた。卵継代にはブイヨンで10⁻⁴に稀釈した感染漿尿液を、10〜11日の発育鶏卵漿尿腔内に0.2ml接種し、37°C、48時間培養し、こゝに得られた漿尿液を試験管内培養に使用した。之等は使用迄、試験管に0.5mlづゝ分注し、-25°Cに保存した。その赤血球凝集価(HA)及び50% Tissue culture infectivity dosis (TCID₅₀) は各実験毎に測定し、その価は各々の実験に示した。

2. 組織培養法

25ml の三角フラスコに14日発育鶏卵漿尿膜の小片約0.4gを入れ、Hanks液⁸⁾を加えて、之にPR₈株ウイルスを接種し、全量3.0mlにしたものを37°Cで振盪培養し、実験に応じて時間毎に sampling して、そのHA 或いは TCID₅₀ を測定した。

3. TCID₅₀ の測定法

我々は当教室工藤⁹⁾の方法に従つて行つた。即ち4本の中試験管を1系列とし、之に1.8mlのHanks液を入れ、14日発育鶏卵漿尿膜約150mgを浮遊させ被検ウイルス液を10倍段階稀釈し、その各々の稀釈液0.2mlを1系列の中試験管に入れ、37°C、48時間振盪培養

* 東北大学医学部細菌学教室 (主任：黒屋政彦教授)

を行い、0.25% 雞赤血球凝集反応により発育の有無を判定し、Reed and Meunch¹⁰⁾の法に従つてTCID₅₀を算定した。

4. HA 価の測定法

Salk のPattern¹¹⁾法による。血球の最終濃度は0.25%である。

5. 抗生物質 Streptothricin Ⅲ

当教室に於て、放線菌 0-2 株の培養濾液から抽出精製した⁶⁾粗塩酸塩を用いた。本物質は 50mcg/ml で大腸菌標準株(梅沢)の増殖を阻止する。

実 験 結 果

1) 各種濃度の Streptothricin Ⅲ のウイルス増殖阻止に及ぼす影響

14日発育雞卵漿尿膜 0.4g, Hanks⁸⁾液 2.0ml に St Ⅲ 物質の最終濃度の10倍液 0.3ml 及びウイルス (TCID₅₀ 10^{9.0} HA 4.3) 0.3ml を最終濃度10⁻⁴で感染させ、全量を 3.0ml とし、37°C, 24時間振盪培養を行い、その後 HA 及び TCID₅₀ を測定した。

用いた St Ⅲ 物質の最終濃度は 1000mcg/ml, 500 mcg/ml, 250mcg/ml 及び 125mcg/ml である。

結果は Table 1 に示す。即ち薄められたウイルスを用いて、2段増殖の可能性のある所でみると、HA 価の完全阻止は250mcg/mlで見られるが、その4倍量即ち1,000 mcg/ml がウイルスの完全増殖阻止に必要な事がこの成績より窺われる。猶 StⅢはウイルスに対する直接不活化作用も亦吸着阻害作用もなく TTC (Triphenyl tetrazolium chloride) 反応によつて¹⁾膜の Dehydrogenase 活性を調べても、組織に対する障害作用がない事は既に前報¹²⁾に発表した。

2) 組織培養経過中の Streptothricin Ⅲ の力価の変動

Streptothricin Ⅲ は Streptothricin 系の塩基であるから、酸性の状態に於て寧ろ安定である。しかしこの組織培養条件はpHがアルカリ側(組織を加える前の Hanks 液の pHは7.2~7.4)にある、従つて一応培養中に St Ⅲ の力価減少が考えられるので、それがどの程度のものか知つて置く必要がある。実験は St Ⅲ 物質を Hanks 液で1000mcg/ml に溶解し、3ml を三角コルベんに分注し、1 組は St Ⅲ-Hanks 液に14日発育雞卵漿尿膜0.4gを浮遊させ、37°Cの孵卵器にて振盪、6 時間及び24時間に両者から培養液を sampling し、 $\frac{M}{50}$ phosphate buffer (pH7.0) で被検液の2倍希釈を行い、St Ⅲ の力価を Bacillus subtilis (PCI₂₁₉) を被検菌とするパルブ法によつて検定した。

その結果はTable 2 に示す。即ちStⅢは初め加えたものを1mg=1000uと仮定した場合に、pH7.2のHanks液では6時間振盪で780mcg/mlに減少するが24時間培養でも6時間値と同じであつた。一方漿尿膜を浮遊させた St Ⅲ-Hanks 液では6時間値は600mcg/ml であり、24時間値も亦6時間値と同様であつた。従つて St Ⅲ-Hanks 液の24時間振盪液では力価が約4/5に減少し、St Ⅲ-Hanks-漿尿膜浮遊液では24時間後約2/3に力価減少を認めた。

3) 感染後種々なる時間に与えた St-Ⅲ の増殖に及ぼす影響

一応 St-Ⅲは細胞内の virus 増殖を特異的に阻害すると思われる成績はすでに述べたが、更に、何れの時間に作用するものか、次の実験を行つた。三角フラスコに Hanks 液 2.0ml (対照は2.3ml)に14日発育雞卵漿

Table 1. Effect of different concentrations of St-Ⅲ on the growth of Influenza virus in vitro.

Antibiotic	Concentration mcg/ml	Viral titers (after 24 th hrs incubation)			
		HA (log ₁₀)	TCID ₅₀ (log ₁₀)	Difference of TCID ₅₀ between each of test and control flasks	Viral growth estimated on the basis of inoculum size
Control	none	< 3.6	9.5		+ 4.5
St-Ⅲ	1000	< 0.6	4.2	5.3	- 0.8
	500	< 0.6	6.2	3.3	+ 1.2
	250	< 0.6	6.4	3.1	+ 1.4
	125	2.4	8.2	1.3	+ 3.2

Inoculum (final concentration) : 10⁵ TCID₅₀

Table 2. Spontaneous inactivation of St-III during the incubation.

Composition		Time of the incubation (hrs)	
		6	24
St-III	pH	7.2	7.2
	Potency mcg/ml	780	780
St-III + Chorioallantoic membrane	pH	6.4	6.2
	Potency mcg/ml	600	600

St-III was dissolved in Hank's solution in the concentration of 1000 γ /ml and in one series of flasks a piece of chorioallantoic membrane was added to each.

尿膜0.4grを浮遊させ之に Stock virus ($10^{9.0}$ TCID₅₀) の 10^{-3} 稀釈液 0.3ml を加える。対照以外に 3 ケのフラスコを用意し 0 時間、6 時間及び 10 時間、37°C に振盪培養後、10mg/ml の St-III-Hanks 液を 0.3ml づゝ添加し、全量を 3.0ml とし更に振盪をつづけ、ウイルス感染後 24 時間の HA と TCID₅₀ とを測定した。その結果は Table 3 に示す。ウイルス感染と同時に St III を添加した場合 (TCID₅₀) は $10^{4.7}$ で完全阻止を示すが、6 時間、10 時間に与えたのでは不完全である。

即ち 6 時間、10 時間では既に浮遊液中に游出 virus が証明され、膜内には preemergence の状態のウイルスが証明される筈である。即ち 6 時間後 St III 添加時の浮遊液中のウイルス濃度は TCID₅₀ で $10^{5.3}$ であり、その 24 時間培養後の値は $10^{6.2}$ であつた。又 10 時間後 St III 添加時の浮遊液中のウイルス濃度は $10^{6.2}$ であり、添

加後 24 時間の浮遊液中のウイルス濃度は $10^{7.7}$ であるから、対照のそれに比較すれば、猶ウイルスの増加は阻害されて居る。即ちこの結果よりすれば St III はウイルス増殖の前期に於てはよく働くが、後期に於てもなお作用するものの如く考えられる。

4) Inoculum size の違いによる St III のウイルス増殖阻害程度

三角コルベンに漿尿膜 0.4g., 10mg/ml の St-III-Hanks 液 0.3ml, Hanks 液 2.0ml (対照は 2.3ml) を入れ之に TCID₅₀ $10^{8.93}$ のウイルスを 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} と稀釈、その 0.3cc 宛を接種した。従つてウイルスの最終濃度は夫々 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 稀釈となる。之を 37°C, 24 時間振盪培養後、HA 価及び TCID₅₀ を測定し、各組のウイルス濃度を比較した。結果は Table 4 に示す。先ず対照の各 Inoculum size による違を比べてみると所謂 Magnus¹³⁾ 現象が認められる。即ち何れの濃度のウイルスを接種しても、HA 価は 24 時間に 3.6 と高い価を示すに拘はらず、TCID₅₀ は 10^{-2} 及び 10^{-3} では低い価を示すが、 10^{-4} , 10^{-5} の接種では逆に高い価を示している。即ち 10^{-2} 接種では I/H 比が 3.6 というように低く、不完全ウイルスの産生を思わせる。然し 10^{-5} 接種では I/H 比は 6.1 となつて完全ウイルスの出現を想像させる。次に 1mg/ml の St-III 存在下で高濃度のウイルスを接種した場合は TCID₅₀ に於て対照との間に僅かの差より認められないが、接種ウイルス濃度が低濃度になるに従つてウイルスの増殖阻害が著明になつてくる*。しかしこの実験では高濃度接種の場合、接種ウイルスの内細胞感染に参与しなかつた部分を除いて居ないから実験の詳しい批判は不可能であるが、一応低濃度の Inoculum では Multiple cycle を画くた

Table 3. Sensitivity of phases of the growth to the action of St-III.

Antibiotic	Time of addition after inoculation (hrs)	When St-III was added (TCID ₅₀)	Viral titers (after 24 hrs incubation)			
			HA (log ₁₀)	TCID ₅₀ (log ₁₀)	Difference of TCID ₅₀ between each of test and control flasks	Viral growth estimated on the basis of inoculum size
Control			3.9	9.3		+4.3
St-III**	0		< 0.6	4.7	4.6	-0.3
	6	5.3	< 0.6	6.2	3.1	+1.2
	10	6.2	2.1	7.7	1.6	+2.7

** Final concentration of St-III was 100 mcg/ml Inoculum size: 10^5 TCID₅₀ in final concentration

* この点に関し本研究室の安育の成績によれば接種ウイルス量の如何に拘はらず薬剤濃度をかえて阻止の百分率を取ればその価は常に一定であるとの成績を得て居る。続報に公表の予定。

Table 4. Effect of inoculum size on the inhibition rate.

Final inoculum size	St-III mcg/ml	Viral titers (after 24 hrs. incubation)			
		HA (log ₁₀)	TCID ₅₀ (log ₁₀)	Difference of TCID ₅₀ between each of test and control flasks	Viral growth estimated on the basis of inoculum size
10 ⁻² (TCID ₅₀ 6.93)	none	3.6	7.2		+ 0.2
	1000	1.2	6.9	+ 0.3	- 0.03
10 ⁻³ (TCID ₅₀ 5.93)	none	3.6	8.7		+ 2.77
	1000	0.9	5.2	+ 3.5	- 0.73
10 ⁻⁴ (TCID ₅₀ 4.93)	none	3.6	9.5		+ 4.5
	1000	< 0.6	4.2	5.3	- 0.73
10 ⁻⁵ (TCID ₅₀ 3.93)	none	3.6	9.7		+ 5.77
	1000	< 0.6	3.5	6.2	- 0.43
10 ⁻² When infected membrane was washed with anti PR ₈ serum 1 hr after infection	none	3.0	6.5		
	1000	< 0.6	4.0	2.5	

め、対照との差が明らかになるものと考えておきたい。そこで次の実験によつて高濃度接種の場合、出来るだけ漿尿膜の residual virus 及び free virus を除去してウイルスの増殖阻害程度を観察してみた。即ち型の如く三角フラスコに St III を Hanks 液に 1000 mcg/ml になる如く加え、14日発育鶏卵漿尿膜0.4gを浮遊させ、之にウイルス最終濃度 10⁻² を接種し、1時間37°C振盪培養し、後、膜を $\frac{M}{100}$ phosphate buffered saline (pH7.0) にて2回洗滌し、第3回目 hemagglutination inhibition titer 10240倍ある抗PR₈家兎血清の120倍稀釈($\frac{M}{100}$ phosphate buffered saline)液で洗滌し、再びphosphate buffered salineにて洗滌し血清を充分に除去し、新しいMedium中に漿尿膜を移して感染後24時間、37°Cに振盪培養しHA及びTCID₅₀を測定してみた。結果はTable 4の下段に示す。即ち感染後1½時間に於て対照並にStIII処置の浮遊液中のウイルス濃度は夫々TCID₅₀ 10^{3.5} 及び 10^{4.0}であつたものが24時間時にはTCID₅₀ が夫々10^{6.5} 及び 10^{4.0}となつていた。即ち余分のウイルスを抗血清にて除去した場合、StIII処置は完全に virostatic である。之に対して対照では明かにウイルスの増殖が認められる。従つて是等の価を同じく高濃度ウイルスを接種し、浮遊液中の free virus 及び漿尿膜の residual virus を除

去しない場合の価と比較すれば、漿尿膜内ウイルスの増殖はStIIIによつて阻害されても浮遊液中及び漿尿膜の表面のウイルスは漿尿膜への感染力を失ひ難いと想像される。猶このことは前実験で確かめられた如くStIIIにVirocidal作用がない事にも関係していると考えられる*。

5) Streptothricin III のウイルス増殖阻害作用の可逆性

組織培養液中より一度加えたStIIIを除去した場合、漿尿膜細胞内ウイルス増殖が猶阻害され続けるかどうか。即ち組織に対するStIIIの前処置のウイルス産生に及ぼす影響を調べた。実験は漿尿膜0.4gを1000mcg/mlのStIII-Hanks液2.0mlに浮遊させ、37°Cに7時間孵卵器に静置した後、冷Hanks液にて3回洗い、Hanks液2.31mlの入った三角フラスコに再浮遊させ、StIIIを含めHanks液で同様に処置した対照と共にウイルス最終濃度TCID₅₀ 10^{4.93} を接種し全量を3.0ccとし、37°C、24時間振盪培養後、その浮遊液のHA価及びTCID₅₀を測定した。結果はTable 5に示す。StIIIにて前処置を行つた際、HA価及びTCID₅₀は夫々0.9及び10^{6.7}で、之に対し対照の夫は3.6 8.7であつた。即ちStIII前処置は対照との間に可成の差を来させる。従つてStIIIの漿尿膜に対する作用は、StIIIを除去し

Table 5. Incomplete reversibility of the action of Streptothricin III on the growth of Influenza virus.

Antibiotic (mcg/ml)	Viral titers (after 24 hrs. incubation)			
	HA (log ₁₀)	TCID ₅₀ (log ₁₀)	Difference of TCID ₅₀ between each of test and control flasks	Viral growth estima- ted on the basis of inoculum size
Control *	3.6	8.7		+3.77
St-III ⁺ (1000)	0.9	6.7	2.0	+1.77

* Control: Membrane was treated with Hank's solution without St-III for 7 hrs before inoculation at 37°C.

+ Test: Membrane was treated with 1 mg/ml of streptothricin dissolved in Hank's solution for 7 hrs. After the treatment both membranes were washed 3 times with Hank's solution, inoculated with virus and transferred into fresh medium without St-III.

Virus inoculum: 10^{4.93} TCID₅₀ in final concentration.

た後でも残存し完全に reversible ではない。この点は今迄報告された種々の metabolic antagonist と異なる点で、これらの薬物の働くウイルス発育の stage の分析を困難ならしめる。

6) Streptothricin III によるウイルス増殖阻害曲線

先ず予備実験として数カの三角フラスコを用意し、同様に漿尿膜を Hanks 液に加えウイルスを接種し、正常のウイルス増殖のフラスコ毎のふれを求めてみたが、問題にする程の差は見られなかつた。その結果対照として8カのフラスコを用意し、又 ST III 添加の際も亦8カを用意し、漿尿膜 0.4g宛を浮游させウイルス最終濃度 TCID₅₀ 10^{4.93} を接種し、全量 3.0ml とし感染後、37°C、24時間振盪培養を行い、1時間、3時間、6時間、9時間、12時間、15時間、18時間、24時間に浮游のウイルス濃度を CID₅₀ で測定し、対照と比較した。その結果は Fig. 1 に示す。

先ず対照の浮游液中のウイルス濃度は3時間迄は減少を示す。即ち1時間 10^{4.2} TCID₅₀、3時間で TCID₅₀ 10^{3.0} と落ちるが、その後は対数的増加を示す。即ち6時間 10^{5.3}、9時間 TCID₅₀ 10^{6.3}、12時間 TCID₅₀ 10^{7.7}、15時間 TCID₅₀ 10^{8.7} と最高に達し、18時間、20時間と経過するに従つて浮游液中のウイルス濃度は低下する。次に漿尿膜中のウイルスを測定するため膜を冷生理的食塩水 (pH7.2) にて3回洗滌後乳鉢にて磨砕し、Hanks 液にて10% suspension とし 2,500r.p.m.10分遠心後、上澄について TCID₅₀ を1時間、3時間、6時間と3回測定した。即ち漿尿膜内ウイルスは1時間、3

Fig.1. Inhibitory effect of St-III on the growth of FR8 virus.

The data presented for each curve were obtained by sampling of the fluids and the supernatantes of the 10% membrane suspension from the different flasks.

Inoculum size: TCID₅₀ 10^{4.93} in final concentration

時間、6時間に於て夫々 10^{4.2}、10^{4.0}、10^{5.3} であつた。即ちMedium中に比し感染初期3時間では膜内ウイルス量が高いが、これは Inoculum の residual virus であるか新しいウイルスであるか明確ではない。

之に対してSTIIIを最終濃度1000 mcg/ml 感染と同時に添加した場合はすでに明示した如く、吸着阻害作用は認められないが、浮游液を調べても漿尿膜内ウイルスを調べても、ウイルスの増殖は認められず、Virostatic の状態を示した。

考 按

以上の実験結果より、STⅢが Free virus に対して直接不活化作用もなく、漿尿膜に対する吸着阻害作用も有していないという、前実験の成績が確められた。従つて STⅢ のウイルス増殖阻害作用は、ウイルス再生に必要な膜内の synthetic processes に影響を与えるものと考えられる。STⅢ は用いた濃度の範囲内では組織の O_2 -up-take も阻害せず、Tritetrazolium chloride を Indicator とする葡萄糖脱水素酵素の阻害もないが、その作用は他の metabolic antagonist¹⁴⁾ の如く reversible ではない。従つて Ackermann¹⁴⁾¹⁵⁾ の行つた如きウイルス発育の stage 分析にこの物質を用うる事は不可能に終つたが、感染後 6 時間、10 時間で与えても、猶阻止を示した事は注目されるべきことの様に思う。この点に就いての discussion は第 3 報にゆずりたい。

結 論

14 日発育鶏卵漿尿膜を用いた組織培養に於て STⅢ の influenza A virus PR₈ 株の増殖に及ぼす影響を検討した。

1) 400mg の漿尿膜を用い $10^{4.93}$ TCID₅₀ を接種ウイルスの最終濃度とする条件の下では 1mg/ml の STⅢ は完全にウイルスの増殖を阻止する。但しこの条件では浮游液中の STⅢ の力価は最初の 6 時間迄に約 2/3 に減じ以後は安定である。

2) 以上の感染条件に従うと、感染後 6 時間、10 時間で STⅢ を与えても、以後の液中の TCID₅₀ で表現さ

れるウイルス増殖は対照に比して可成阻止される。

3) ウイルスの Inoculum size の低い程 STⅢ の示す増殖阻害作用は著明にあらわれる。

4) 正常漿尿膜を 7 時間 STⅢ を以て前処置した場合、STⅢ を洗滌除去した後も膜のウイルス産生能は完全に恢復されない。

5) STⅢ の存在に於けるウイルスの増殖カーブを追求の結果、吸着の阻害の見られぬ事を更に確認し得たのみならず、対照と比較して著しき増殖阻害を証明した。

稿を終るに当り、御指導を賜つた恩師黒屋教授に対して深甚なる感謝の意を表します。

文 献

- 1) Kuroya, M. et al., Jap. J. of Microbiol., **1**, 49, 1957.
- 2) 黒屋政彦, Chemotherapy, **4**, 188, 1956.
- 3) 黒屋放彦, 臨床の日本, **2**, 421, 1956.
- 4) Kuroya, M. et al., Jap. J. of Microbiol., **1**, 85, 1957.
- 5) Kikuchi, K., J. of antibiotics, (Ser. A) **8**, 145, 1955.
- 6) Inoue, M., J. of antibiotics, (Ser. A) **6**, 122, 1953.
- 7) 黒屋政彦等, J. of antibiotics, **3**, 223, 1950.
- 8) Hanks, J. H. and Wallace, R. E., Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., **71**, 196, 1949.
- 9) Kudo, H., 未発表
- 10) Reed, L. J. and Meunch, H., Am. J. Hyg., **27**, 493, 1938.
- 11) Salk, J. E., J. Imm., **49**, 87, 1944.
- 12) Miyakawa, T., Anzai, O. and Shimizu, H., Jap. J. Microbio., 掲載予定
- 13) Von Magnus, P., Acta Pathol. Microbiol. Scand., **23**, 278, 1951.
- 14) Ackermann, W. W. and Massab, H. F., J. Exp. Med., **100**, 329, 1954.
- 15) Ackermann, W. W. and Massab, H. F., J. Exp. Med., **102**, 393, 1955.