放線菌の産生する抗インフルエンザ物質に関する研究

ii G-72 物質の試験管内作用機作

宮 川 剛 *

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

ii ON THE MODE OF ACTION OF VIROSTATIC AGENT "G-72"
(CHARTREUSIN)

〔受稿 9月7日 1957〕

緒 言

放線菌の産生する抗インフルエンザウイルス物質を簡単に、而も頻度高く見出すという目的のために、我々は漿尿膜の薄片を Hanks 液中に浮べた試験管内培養を第一次 Screening として使つて見た¹⁾。結果として或種の既知の抗生物質²⁾にもウイルス増殖の抑制作用が見出されたし、又7種類の新しい物質も単離された²⁾³⁾。然し夫等の内マウスに於ける実験的化學療法に至つても、猶有効なるものは Myxoviomycin¹⁾²⁾³⁾ 4) のみの様に思われる。今放線菌から産生される抗生物質を溶媒型と水溶型に分けるならば、Myxoviomycin も亦前報⁵⁾でその作用機作を報じた Streptothricin III⁶⁾も後者に属する。今の所試験管内実験の範囲内では、果して Myxoviomycin と Streptothricin III とが、同じ様な作用機作をもつか否かは明かでない。但し前者の方が in vitro では小量でウイルスの増殖を抑制するし、動物体内でも前者のみが有効であるという Potency の差は気付かれる。次に溶媒型の物質であるが、何れも可成の毒性をマウスに示すので、動物体内でインフルエンザウイルスに対し有効と認められたものはない。しかしその内で G-72 は Chartreusin⁷⁾ 類似の物質であるが、可成毒性も低いし、又 T₃-Phage に対しても増殖阻害効果を示す。勿論濃度が高いと、宿主の E. coli B にも阻止作用を示すが、phage 増殖阻害に必要な濃度との間には可成のずれがある。

そしてこの物質は可成の低濃度でインフルエンザウイルスの増殖をも阻害する。教室の金子は⁸⁾この物質

の phage に対する作用を追求中であるので、対応して私はここにその influenza virus に対する作用機作を取上げて見た。

材料と方法

1) ウイルス

インフルエンザ A ウイルス PR₈ 株を使用した。分離後 Ferret 7 代、マウス 593 代を経た後に発育鶏卵漿尿腔に E182-3 代継代されたものをこの実験に使用した。実際には Broth で 10⁻⁴ に稀釈した感染漿尿液を、10~11 日発育鶏卵漿尿腔に 0.2ml 接種し、35°C、48 時間培養して得た漿尿液を小試験管に分注し、-25°C に保存して置き、HA 価及び TCID₅₀ は使用時、各実験毎に測定しなおした。その値は各実験毎に示してある。

2) 組織培養法

その大要は既に前報でふれた。25ml 入り三角フラスコを使用し、その中に 14 日発育鶏卵漿尿膜 0.4mg を入れ Hanks 液に浮遊させ、之に PR₈ 株を接種し全量を 3.0ml とする。37°C の孵卵器で之を 24 時間振盪培養し、必要に応じて赤血球凝集価 (HA) 及び 50% 組織培養感染量 (TCID₅₀) を測定した。

3) 50% 組織培養感染量の測定

4 本の中試験管を一系列とし、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、被検ウイルス液の 10 倍階段稀釈を行い、各々の稀釈液の 0.2ml を各系列毎に中試験管に混和し、37°C、48 時間振盪培養を行い、其後 HA 価の有無を判定、Reed and Meunch 法により TCID₅₀ を算定した。

4) Hamagglutination titration の測定

* 東北大学医学部細菌学教室 (主任: 黒屋政彦教授)

Salk の patten 法に従つた。猶雞赤血球の最終濃度は 0.125% を使用した。

5) 抗生物質

G-72 物質は本教室金子⁸⁾によつて分離された結晶を使用した。その融点は 182~3°C, 赤外線スペクトル及び紫外線スペクトル等の物理的恒数, その他の生物学的, 物理化学的性状よりほぼ Chartreusin⁷⁾ と同一物質と思われる。

実験成績

1) フラスコ毎のウイルス増殖のふれ

前報⁵⁾に於て、我々の組織培養条件に於ては、対照に高濃度のウイルスを接種した際は、Von Magnus 現象に類似の現象が認められる事、及び接種ウイルス量の少い程、抗ウイルス物質の作用が著明である事などにふれた。その後やや組織培養条件に改善を加えたので此処に触れたい。即ち 14 日発育雞卵漿尿膜より 400 mg の細片を得るために今回は卵殻を稀沃丁及び 70% Alcohol で消毒後気室の反対側をピンセットで穿孔し卵内容を漿尿膜と卵殻とが剝離せぬ様注意しながら除去した後、内径 1.5cm の円型パンチを使用し、卵殻つきのまま漿尿膜を打抜いた。この漿尿膜を Streptomycin 100γ/ml, Penicillin 100u/ml 加 Hanks 液中で洗い乍ら卵殻より剝離し、その 20 片を 1 組とした。この漿尿膜の 1 片は軽く水分を除去した Wet weight で平均 20mg である。従つて漿尿膜 20 片は 0.4g となる。

猶 1 個の卵より取り得る漿尿膜片は 15 個乃至 18 個である。この膜を用いて TCID₅₀ 10^{8.93}-10^{9.0} の漿尿膜 10⁻⁴ 稀釈液を Inoculum として培養すると、24 時間の HA 価及び TCID₅₀ は Table 1 に示す如くなり、フラスコ

Table 1. Extent of the variation in HA and TCID₅₀ titers in tissue culture fluid usising Chorioallantoic membrane.

No. of Exp. Titers	1	2	3	4	Average
HA *	3.6	3.9	3.6	3.6	3.7
TCID ₅₀	9.5	9.3	8.7	9.3	9.25

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

* Titers were estimated after 24 hours incubation and expressed as negative log to the base 10.

毎のウイルス増殖の振れが比較的少い。

2) 組織培養中の G-72 の力価変動

G-72 物質は中性附近では比較的水に難溶の物質で、Alkali 側即ち pH8.3 では 5mg/ml までよく溶解する。併しこの溶液を再び pH7.2 に修正すれば、雲状の沈澱物を生じて来る。pH7.2 に於て溶解する最高濃度の限界は 100mcg/ml 迄である。但し本物質は酸性物質で Alkali 側に於て極めて安定であるから、この組織培養条件に於ても力価の変動は少いと予想されるが、一応実験的に追求してみた。実験は G-72 を Hanks 液にて 100mcg/ml に溶解し、100°C, 5' 滅菌し、1.8ml を中試験管に分注し、その 3 組を用意した。即ち 1 組は G-72 と Hanks 液、1 組は G-72-Hanks 液に漿尿膜を約 150mg を浮遊させたもの、第 3 組は更にその上にウイルスを 10⁻⁴ 接種したもので、6 時間、12 時間、24 時間に夫々中試験管内溶液の G-72 の力価を T₃-phage 現象板でバルブ法を用いて測定した、結果は Table 2 (a) に示す。T₃-phage 現象板による力価の検定は発育

Table 2 (a) Spontaneous inactivation of G-72 during the incubation.

Composition of sets	Time of incubation (hrs.)			
	0	6	12	24
G - 72 *	15 × 18.2 *	18 × 15.3	16.5 × 17.2	14.7 × 15.6
G-72 + Membrane *		14 × 16.1	15.6 × 14.2	13.6 × 14.9
G-72 + Membrane + virus		16.2 × 15.7	14 × 15.9	13.8 × 15.2

* Each figure indicates the diameters of inhibition zones on T₃ phage plate, being estimated in two rectangular directions and expressed in mm.

+ 100 mcg of G72 was dissolved in one ml of Hank's solution

* 100 mcg of G72 was dissolved in one ml of Hank's solution and suspended with a piece of chorioallantoic membrane weighing 150mg

Table 2 (b)

Composition of sets	Time of incubation (hrs.)			
	Concentration mcg/ml	0	6	24
G-72 *	100	100	92	92
G-72 + Membrane +	100	100	92	92

* G72 was dissolved in Hank's solution in the concentration of 100 mcg/ml. Each figure indicates the titer of G72, the original solution being taken as 100 unit

+ 100 mcg/ml of G72 was dissolved in Hank's solution and suspended with a piece of Chorioallantoic membrane weighing 400mg

Table 3. Effect of differential concentration of G-72 on the growth of influenza virus.

Antibiotic	Concentration mcg/ml	Viral titers (after 24 hrs. incubation)			
		HA (log ₁₀)	TCID ₅₀ (log ₁₀)	Difference of TCID ₅₀ between each test and control flasks	Viral growth estimated on the basis of the inoculum size
Control	none	3.6	9.3		+ 4.4
G-72	50	< 0.6	4.0	5.5	- 0.93
	25	< 0.6	5.2	4.1	+ 0.3
	12.5	2.7	8.2	1.1	+ 3.3

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

阻止像が星芒状を呈し、他の宿主菌を用いた、抗生物質の力価検定の如く正確には検定出来ないが、この結果から見ると殆んど力価の低下を認められない。又この物質は *Bacillus subtilis* に対しても抗菌力を有するので、枯草菌を用いた現像板にて力価検定を行つたが、力価の著しい減弱は認められない (Table 2(b)).

3) G-72 の各種濃度のウイルス増殖に及ぼす影響

前報に於ては、抗生物質のウイルス増殖阻害の最小有効濃度を定めるに、37°C 21時間のHA価をもつてしHA価 Log0.6以下を示す抗生物質の最大稀釈を以て最小有効濃度とした。前実験の Hanks 液 2ml に漿尿膜約150mg浮游させた培養条件では25mcg/ml が本物質の最小有効阻止濃度であつたが、今回は三角フラスコの Hanks 液3cc中に0.4g漿尿膜を浮游させた培養条件を用いて HA 価を測定し、ウイルス増殖阻止最小有効濃度を定め更に之に TCID₅₀ の測定を併用した。実験は25ml 入り三角フラスコにHanks液 2.0ml を入れ之に漿尿膜 0.4g を浮游させ、G27 を Hanks 液にて稀釈し、最終濃度が50mcg/ml、25mcg/ml 及び12.5mcg/ml となるように 0.3ml 宛加へて、之にウイルス最終濃度10^{4.93} TCID₅₀ を 0.3ml 接種し、全量 3.0ml とし、37°C、24時間振盪培養し、各々のHA価及び TCID₅₀ を

測定した。その結果は Table 3 に示す。即ち TCID₅₀ を以てする本物質の最小有効濃度は 50mcg/ml となる。猶本物質は25mcg/ml より12.5mcg/ml となるに従つて急にウイルス増殖阻止作用が減ずる。この事は安齊が別に触れる予定である⁹⁾。

4) ウイルス感染後時間を経て G-72 を作用させた場合のウイルス増殖に及ぼす影響

ウイルス感染後組織内に於てウイルス増殖機構は連続的に進行している。この際、G-72 に感受性の高い時期が奈辺にあるかを明かにするために、次の様な実験を行つた。

G-72 の濃度はウイルス阻止最小有効濃度 (25mcg/ml) を用い、ウイルスはTCID₅₀10^{8.7} のものを最終濃度 TCID₅₀ 10^{4.7} となるように接種した。即ち G-72 物質の 250mcg/ml を含む Hanks 液 (pH7.6) を調製し、振盪培養中のウイルス感染漿尿膜浮游液2.7ml (漿尿膜0.4g を含む) に、0 時間、1 時間、3 時間、6 時間に0.3ml づつ添加し全量3.0ml とし、接種後37°C、24時間にMedium のHA価及び TCID₅₀ を測定した。結果はTable 4 に示す。即ち感染後1時間に加えたのでは、0 時間に加えたのと全く差を見ないが、3 時間では抑制は僅かで24 時間でHA価の産生をみる。従つて前報の ST-III⁵⁾ に比

Table 4. Sensitivity of viral growth phases to the action of G-72.

Antibiotic	Time of addition after infection (hrs.)	When G-72 was added TCID ₅₀	Viral titers (after 24 hrs. incubation)			
			HA (log ₁₀)	TCID ₅₀ (log ₁₀)	Difference of TCID ₅₀ between each test and control flasks	Viral growth estimated on the basis of the inoculum size
Control			3.6	9.3		+4.6
G-72 *	0		< 0.6	5.3	4.0	+0.7
	1	3.7	< 0.6	5.3	4.0	+0.7
	3	2.9	1.5	6.2	3.1	+1.5
	6	5.3	1.8	7.3	2.0	+2.6

* Final concentration of G-72 substance was 25 mcg/ml Inoculum size: $10^{4.7}$ TCID₅₀ in final concentration

Table 5. Effect of viral inoculum size on the inhibition with G-72 substance.

Final inoculum size	Antibiotic (mcg/ml)	Viral titers (after 24 hrs. incubation)			
		HA (log ₁₀)	TCID ₅₀ (log ₁₀)	Difference of TCID ₅₀ between each test and control flasks	Viral growth estimated on the basis of the inoculum size
10 ⁻² (10 ^{6.93})	none	3.6	7.3		+0.37
	25	2.4	6.2	1.1	-0.73
10 ⁻³ (10 ^{5.93})	none	3.6	8.7		+2.77
	25	< 0.6	5.3	3.4	-0.63
10 ⁻⁴ (10 ^{4.93})	none	3.6	9.3		+4.37
	25	< 0.6	5.2	4.1	+0.83
10 ⁻⁵ (10 ^{3.93})	none	3.6	9.3		+5.37
	25	< 0.6	2.7	6.6	-1.23
10 ⁻² When infected membrane was washed with anti PR ₈ serum 1 hr after infection	none	3.3	6.5		
	25	1.2	5.5	1.0	

べ、G-72 はウイルスの漿尿膜内に於ける合成の、より早い時期を阻害するものと思われる。

5) G-72 物質のウイルス増殖阻害の程度に及ぼす

Inoculum size の影響

今迄記載した10⁻⁴というStandard passage inoculum size では増殖阻害は著明であるが、しかしこのウイルス阻害程度が Inoculum size の大小によつて如何なる差を生ずるかを観察するために以下の実験を行つた。即ち漿尿膜 0.4gr, Hanks 液 2.0ml (対照は

2.3ml) 250mcg/ml G-72 Hanks 液 0.3ml 及びTCID₅₀ 10^{8.93} のウイルスを夫々最終濃度10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ になる様に 0.3ml 接種し、全量を 3.0ml とし、37°C, 24時間振盪培養後、対照と比較しウイルス増殖阻害程度を観察した。結果は Table 5 に示す。この結果は先にSTⅢ物質で報告したのと殆んど同じ結果で Virus を高濃度で感染させた場合はあまり有効でないが、低濃度感染の時ほど有効となる*。但し G-72 に就ては medium 中の free virus や, residual virus を抗イ

* この点に関し本研究室の安齊の成績によれば接種ウイルス量の如何に拘わらず薬剤濃度をかえてその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。

ンフルエンザ (PR8株) 家兎血清 (H.I.T. 10,240) 120 倍稀釈液で除去した場合も、之をしなかつた場合との間に著しい差を認め得なかつた。

3) G-72 物質による漿尿膜の前処置のウイルス増殖阻害に及ぼす影響

G-72 物質を或時間漿尿膜に作用させ、その後除去した際ウイルス増殖が正常漿尿膜と比べてどの程度差があるかをみる為、次の実験を行つた。

即ち、50mcg/ml、及び 25mcg/ml、G-72-Hanks液 20ml の入つたシャーレに夫々漿尿膜 0.4g を浮遊させ、37°C の孵卵器に 3 時間静置し、その後冷 Hanks 液にて 3 回洗い又 Hanks 液 20ml を含むシャーレに移し、前回同様 2 時間放置し、其後又 Hanks 液にて 3 回洗い、Hanks 液 2.3ml 入つたフラスコに再浮遊させ、 $10^{8.93}$ TCID₅₀ のウイルス液 0.3ml を最終濃度 10^{-4} に接種し、全量を 3ml とし、37°C、24 時間振盪培養し、HA 価及び TCID₅₀ を測定した。結果は Table 6 に示す。即ち対照の HA 価と G-72 前処置の夫との間には可成りの差が認められたが、TCID₅₀ ではそれ程差は認められず、対照の漿尿膜の夫に近いウイルスの増殖を見る事が出来た。即ち TCID₅₀ に関する限り G-72 の組織への影響は可逆性である。

7) G-72 物質の PR₈ 株増殖阻碍曲線

G-72 物質の添加と同時にウイルスを感染させ、37°C、24 時間経た medium の HA 価と TCID₅₀ に就いては、既にその結果を示したが、此处では時間毎に Medium 中のウイルス濃度を TCID₅₀ で追求し、その増殖阻碍経過を対照と比較した。既に記載した如く漿尿膜の大

いさを一定にすれば、ウイルス増殖のフラスコ差は考慮に入れる必要がないので、本実験に於ては 8 ケのフラスコを用意し、漿尿膜 0.4g を Hanks 液 2.0ml に浮遊させ、250mcg/ml G-72-Hanks 液 0.3ml 及び TCID₅₀ $10^{8.7}$ のウイルス液を最終濃度 10^{-4} (0.3ml) に接種し、全量 3.0ml とし、37°C、24 時間振盪培養し、ウイルス接種後 1 時間、3 時間、6 時間、9 時間、12 時間、15 時間、18 時間、24 時間に各々フラスコを取出し、浮遊液中のウイルス濃度を TCID₅₀ によつて測定した。結果は Fig. 1. に示す。即ち対照では 3 時間迄

Fig. 1. Inhibitory effect of G-72 on the growth of PR₈ virus.

Inoculum size: $10^{4.7}$ TCID₅₀ in final concentration

Table 6. Reversibility of the action of G-72 substance on the tissue.

Antibiotic	Concentr. mcg/ml	Viral titers (after 24 hrs, incubation)			
		HA (log ₁₀)	TCID ₅₀ (log ₁₀)	Difference of TCID ₅₀ between each test and control flasks	Viral growth estimated on the basis of inoculum size
Control *	none	3.0	7.9		2.97
G-72 +	50	1.8	7.0	0.9	2.07
	25	2.1	7.2	0.7	2.27

* Control membrane was treated with Hank's solution without G-72 for 5 hrs. before inoculation at 37°C

+ Test membranes were treated with 50 mcg/ml or 25 mcg/ml of G-72 dissolved in Hanks' solution at 37°C for 3 hrs, then both membranes were washed 3 times with Hanks' solution, and again treated with Hanks' solution without G-72 at 37°C for 2 hrs. before infection. Finally they were transferred into the fresh medium without G-72, and infected with virus. Inoculum size: $10^{4.93}$ TCID₅₀ in final concentration

に浮游液中のウイルス濃度は最低に達し、以後時間の経過と共に対数的に増加を示すが、G-72 添加の場合には3時間迄は対照と同様浮游液中のウイルス濃度が低下し、以後のウイルス増殖は対照のそれと比較して、遙かに抑制された。但し25mcg/ml 濃度ではその抑制は不完全である。

考 按

G-72のウイルス増殖阻碍作用がPR₈株に対する直接不活化作用でなく、又吸着阻碍でもないことは既に前実験で確認した。従つて一応G-72の阻碍作用は漿尿膜内のウイルス再産生に必要な反応系に働いた結果ではないかと思われる。次にG-72を作用させた漿尿膜のdehydrogenase 反応は100mcg/mlの濃度を使用しても、対照との間に何等の相違を見出し得ない。一方ウイルス増殖という indicator を用いて、膜の前処置の影響をみると、その障碍作用はHA生産に於ては否定出来ないが、TCID₅₀ では著しいものではなく、その作用は前報のSTⅢのそれに比すれば著しく少い。又本物質は感染後1時間迄に与えた際は、0時間と同様阻碍を示すが、3時間以後に与えたのでは、殆んど阻碍作用がない事は、ウイルスの膜内合成作用の比較的早い時期に作用する事を示す。之のStageがMethoxinin¹⁰⁾のそれと同時であるか否かは、今後研究されねばならないが、STⅢの作用時期とは明かに相違する事は云い得ると思う。この事に就いては第3報にふれる。

結 論

14日の発育鶏卵漿尿膜を用いた組織培養により、G-72のインフルエンザA型PR₈株の増殖に及ぼす影響

を調べた結果を得た。

1. G-72はアルカリ側の溶液に於て安定なためか、この振盪培養条件では殆んど力価の減弱をみない。

2. G-72は 10^{-4} のウイルス感染に対して25mcg/mlで、ほぼ完全阻止を示すが、12.5mcg/mlになると可成の増殖をゆるす。

3. ウイルス感染後或時間経過後 G-72 を作用させる場合、0時間と1時間とは、ほぼ同じく阻碍したが、3時間では殆んど抑制し得ない。

4. Inoculum Size の差によるウイルス増殖阻碍の程度を見るに、高濃度接種の場合対照との間には著明な差がないが、低濃度の場合には対照との間の差は著明である。

5. G-72 による漿尿膜の前処置実験に於てその作用は、TCID₅₀に関する限りでは完全にreverseされる。

以上の実験より、G-72は膜内に於けるウイルス増殖の比較的早い時期に作用するものと考えられる。

終りに当り御指導を賜つた恩師黒屋教授に深甚なる感謝の意を表します。

文 献

- 1) Kuroya, M. et al, Jap. J. Microbiol, **1**, 49, 1957. 2) 黒屋政彦, Chemotherapy, **4**, 188, 1956.
- 3) Kuroya, M. et al, Jap. J. Microbiol., **1**, 91, 1957. 4) Kuroya, M. et al, Jap. J. Microbiol., **1**, 85, 1957. 5) 宮川剛, 「ウイルス」掲載予定
- 6) Inoue, M., J. of Antibiotice, (Ser. A) **6**, 122, 1953. 7) Leach, B. E. et al., J. A. C. S., **75**, 4011, 1953. 8) 金子保, J. of Antibiotics, A. 掲載予定
- 9) 安斎温「ウイルス」掲載予定
- 10) Ackermann, W. W. and Massab, H. F., J. Exp. Med., **102**, 393, 1955.