放線菌の産生する抗インフルエンザ物質に関する研究

iii Differential response を利用した Streptothricin III 及び
G-72 の Sensitive stage の解析

宮川 剛* 清水喜正* 堀米栄吉*

TSUYOSHI MIYAKAWA, NOBUMASA SHIMIZU and EIICHI HORIGOME :
STUDIES ON THE STREPTOMYCES ANTIBIOTICS EFFECTIVE
AGAINST INFLUENZA VIRUSiii ON THE ANALYSIS OF THE SENSITIVE STAGES TO STREPTO-
THRICIN III AND G-72 SUBSTANCE IN DIFFERENTIAL GROWTH
CURVES.

〔受稿 9月7日 1957〕

緒 言

著者の一人は第1報¹⁾、第2報²⁾に於て、水溶型溶媒型と全く性質の異つた放線菌の産生する抗生物質 Streptothricin III 及び G-72 のウイルス増殖阻害作用の作用機作について報告した。前実験より判つた事は、G-72 の作用する Stage の方が Streptothricin III の作用する Stage より早期にあるという事である。しかし使用した抗生物質は Metabolic antagonist と違つて reversibility が悪く、従つて Ackermann et al.³⁾⁴⁾⁵⁾ が α -amino-P-methoxyphenylmethan sulfonic acid (AMPS) Methoxininine (MX) P-Fluorophenylalanine (F ϕ A) の組合せで行つた様な明確なウイルス増殖の Stage 解析は不可能であつた。又第1報、第2報の両実験は同時に行われていない。従つて第1報、第2報で報じた G-72 及び ST III のウイルス増殖阻害の sensitive phase をより明確にするために、再び此処に述べる実験を企画した。Stage 解析のため今迄行われた方法は4つあるように思われる。一は感染後各時間毎に物質を加えていつて、どの時間で作用がなくなるかを見る方法である³⁾⁵⁾。

この方法は理論的には可成違いを示しそうに思えるが、Stage に overlapping があるため正確な対照実験を行わぬと、結果はそれ程明瞭ではない。第2の方法⁵⁾は物質の膜に対する作用の reversibility のよい場合行いうるもので、薬剤を適当な時間で除去すると

MXの様に、lag phaseを置いて対照と同じ傾斜をもつたカーブで増殖する早期に作用する物質と F ϕ A の様に lag phase を置かず、対照より遙かに急な傾斜をもつて増殖がおこる晩期物質とを分ち得る。更に第3の方法⁴⁾⁵⁾は第2の方法を2つの物質で行うもので、例えばMXを7時間ではずし、F ϕ Aを加えると完全阻止が引続き起るが、F ϕ Aを7時間ではずしMXを加えると阻止が起らないという事から、MXの sensitive な Stage は F ϕ A より早期と解釈するのである。第4の方法⁶⁾はこれら薬物の存在に於て膜内のS抗原の蓄積とHA及びEID₅₀の蓄積との相関を調べるもので、若しS抗原の増殖は阻止されないとHA及びEID₅₀が阻止されると、少くとも核酸合成を抑えない晩期作用物質型とする考えである。前述した様に第2、第3の方法は此処で用いた2物質にはうまく適用出来ないの、先ず第1の方法を再び選び、更に之を明確にするため第5の方法として differential growth curve⁷⁾を試み、やゝ Stage 解析を明確にし得たので要に報告したい。猶、第4の方法の適用に就いては現在基礎実験を行いつゝある事を附記しておく。

材 料 と 方 法

1. ウイルス

インフルエンザA型PR₈株を使用した。

分離後 Ferret 7代 Mouse 593代を経た後に発育鶏卵漿尿腔に187-188代継代されたものを、この実験に

* 東北大学医学部細菌学教室 (主任: 黒屋政彦教授)

使用した。実際には Broth で 10^{-4} に希釈した感染漿尿液を10日～11日発育鶏卵漿尿腔に0.2ml接種し、 37°C 、48時間培養し得た感染漿尿液を、小試験管に分注し -25°C に保存して置き、HA 価及び EID_{50} は使用時各実験毎に測定し直し、その値は実験毎に示してある。

2. 組織培養法

25ml 入りの三角フラスコに Hanks 液 2.3ml (実験によつては Hanks 液 2.0ml に実験に使用する 10倍濃度の抗生物質-Hanks 液 0.3ml を加えた。)に14日発育鶏卵漿尿膜 0.4g を浮游させ、之に 10^{-1} 希釈のウイルス液 0.3ml を接種し全量を 3.0ml とする。 37°C 、1時間振盪培養後漿尿膜を取出し、 $\frac{M}{100}$ Phosphate Buffered Saline (pH7.1) (PBS) にて 2 回洗滌、3 回目に抗 PR_8 家兎血清 (鶏赤血球凝集抑制価 = 10240 倍) を PBS で 120 倍に希釈したもので 1 回、其後 PBS にて 4 回洗滌し、膜表面の residual virus を出来るだけ洗滌除去し、2.6ml の Hanks 液 (抗生物質は通常 0.3ml この中に含まれる) の入った新しいフラスコに再浮游させ、感染より 37°C 、24時間振盪培養した。実験に応じて培養中の浮游液を Sampling しその HA 価を測定した。

3. 赤血球凝集価 (HA 価) の測定法

Salk の Pattern 法による。猶鶏赤血球の最終濃度は 0.25% を使用した。

4. 抗生物質

第1報、第2報にて実験に使用した Streptothricin III 及び G-72 を用いた。猶 Canavanine sulfate⁸⁾ は NBC のものを用いた。

実験結果

1) PR_8 の大量感染による one step growth curve ウイルスの one step growth curve を得る目的のため次の様な実験を行つた。即ち 25ml 入りの三角フラスコに Hanks 液 2.3ml を入れ、14日発育鶏卵漿尿膜 0.4g を浮游させ、高濃度のウイルス $10^{-1} (\text{EID}_{50} 10^{10.3})$ 希釈液 0.3ml を接種し、 37°C 、1時間振盪した後漿尿膜を取出し、PBS にて 2 回、120倍希釈抗 PR_8 家兎血清にて 1 回、PBS にて 4 回洗滌し、residual virus を充分に洗滌除去し、新に Hanks 液 2.6ml 入ったフラスコに移し、感染より 37°C 、24時間振盪培養して各時間毎に 0.5ml sampling し、その度に 0.5ml の Hanks 液を補充、各時間毎の浮游液の HA 価を測定し、計算して Growth curve を画いた。

結果は Fig. 1 に示す通りの One step growth

Fig.1. One step growth curve following infection with large inoculum.

1. Almost all of the experimental results followed the curve A with a little deviation
2. Spots on the figure illustrates the extent of the maximum deviation

curve が得られた。理論的にも漿尿膜 0.4g の宿主細胞数は $10^{7.5}$ であり、之に対して接種したウイルスは $10^{8.3}$ である。従つて殆んど細胞が感染し、細胞内合成が synchronize されていると考えてよいと思う。私の用いた組織培養条件では、感染後 1 時間半に於ける浮游液の HA 価は $4 \times$ 以下であつた。之を Base として 4 時間迄は HA 価は $4 \times$ 以下であるが、感染後 5 時間より HA 価の急上昇が見られ、7 時間に於て最高に達し、爾後の増殖は Stational phase に移行した。

この私の実験は 10 数回繰返し行つたもので、結論的には同じ日の実験にはふれが少いが、実験の時期による variation は可成あり、特に卵のウイルス増殖に影響する季節的変動を否定するわけにゆかない。その変動の範囲は大体 Fig. 1 に示してある。

2) ウイルス感染後一定時間で G-72, ST-III 及び Canavanine を添加した場合のウイルス増殖に及ぼす影響

以上ウイルスの膜内合成が synchronize した状態は同一実験条件内では数ケのフラスコを使つても再現出来る様になつたので、G-72 及び ST-III の影響を感染後の各時間に於て調べた。対照として Canavanine を加えた。Canavanine が PR_8 に効かないという Pilcher⁸⁾ 等の報告は誤りで、その後石田の実験では 10^{-3}M で完全に阻止がみられ、且その作用時期は FpA と殆んど同時に云わば蛋白合成阻害型の物質である。この実験は数回繰返されたが、代表的なものを挙げると次

の様になる。即ち感染後 0 時間、1 時間、2 時間、3 時間に G-72, ST-Ⅲ 及び Canavanine sulfate の最終濃度を夫々 G-72 100mcg/ml, ST-Ⅲ 1000mcg/ml 及び Canavanine 100mcg/ml になる様に添加し、37°C 振盪培養し、感染後 24 時間時の増殖阻害度を比較して見た。結果は Fig. 2 に示す。即ち G-72, ST-Ⅲ, Canavanine は夫々 0 時間、1 時間、2 時間に添加した場合に阻害は殆んど 100% に近いが、3 時間時添加に於ては、G-72 は 75%, ST-Ⅲ は 86%, Canavanine sulfate は 95% の阻害度を示した。従つて各種の物質のウイルス合成機構の Stage に作用する順序は、早い方より列記するならば G-72 > ST-Ⅲ > Canavanine であると考えられる。

Fig. 2. Relation of inhibiting capacity of G72, Streptothricin Ⅲ and canavanine sulfate to the time after infection (after 24 hrs. incubation)

3)

次に stage 解析を更に明確にするため differential growth curve を以上の条件で求めてみた。先ず基礎実験を数回繰返したのをまとめてみたのが Fig. 3 である。即ち実験はウイルス感染の 1 時間後の処理は前実験と全く同様にして、以後 4 時間目より用意した Hanks 液 2.6ml 入った新しいフラスコに感染漿尿膜を 1 時間毎に移し、24 時間振盪培養して各フラスコ毎の浮遊液の HA 価を測定した。即ち 4 時間迄は液に蓄積した HA は <4 であるが、5 時間より HA 価の急上昇をみる。而して 6 時間、7 時間は同値で最高を示し、8 時間以降の 1 時間毎に産生されるウイルス量は漸次減少する。之を accumulate すると略々前実験と類似の One step growth curve が得られた。

Fig. 3. Differential growth curve of PR8 virus.

4) 潜伏期後期に添加した G-72, ST-Ⅲ 及び Canavanine のウイルス増殖に及ぼす影響の differential growth curve による解析

先ず同条件で感染させたフラスコを用意し、感染 1 時間後の血清洗滌は前記の如く型通り行う。これを新しいフラスコに移し、5 時間培養後更に新しいフラスコに移し、5 時間から 6 時間 (1 時間) の differential response (HA) を調べ、HA 価の揃ったもののみを実験用を選び出す。そして 6 時間で最終濃度が夫々 G-72 100mcg/ml, 50mcg/ml, ST-Ⅲ 1000mcg/ml, 50mcg/ml 及び canavanine 1000mcg/ml となる様添加したフラスコに移し、以後 6~7 時間の間の response 及び 7~9 時間、9~11 時間、11~13 時間の各 2 時間の response を調べた。勿論各々のフラスコは対照以外は同濃度の薬剤を含む。

a) G-72 のウイルス増殖に及ぼす影響

Fig. 4 に示す如く、対照のウイルス増殖は前実験と同様である。之に対し G-72 50mcg/ml は 9 時間迄は全く対照と同じであるが、以後若干の減少を示す。100mcg/ml では 7 時間ですでにウイルスの減少がみられるが、之もそう著明ではない。而も 7 時間以降の減少傾向は大体対照と平行である。之を accumulate すると G-72 を 6 時間に投与した場合は、ウイルス増殖阻害は対照との間に殆んど差がない。この結果から見ると G-72 のウイルス増殖阻害作用の Sensitive stage は 6 時間迄に大部分が進行し終つて居るものと考えられる。

Fig. 4. The effect of G-72 in the differential growth curves.

Fig. 5. The effect of Streptothricin III in the differential growth curves.

b) 0-2 のウイルス増殖に及ぼす影響 (Fig. 5)

ST-Ⅲの500mcg/ml及び1000mcg/mlを6時間に添加した場合、6時間から7時間迄のウイルス増殖は対照と同じであるが、7時間より9時間迄、9時間より11時間迄のウイルス増殖阻害は、500mcg/ml及び1000mcg/mlとも其の濃度に依じてかなり著明である。之をaccumulateしてみると対照は Fig. 4の実験に殆んど一致するが、ST-Ⅲ、1000mcg/ml、500mcg/mlのウイルス増殖阻害はG-72よりはやはつきりと認められる。

c) Canavanineのウイルス増殖に及ぼす影響

Fig. 6に示す如く、対照の増殖は前の2つの実験に殆んど類似しているが、之に対しCanavanineは添加後1時間内に於て既にウイルス増殖を阻害し、爾後の2時間毎のウイルス増殖は著明に阻害される。之をaccumulateしてみると、6時間にCanavanineを添加した場合は、1000mcg/mlに於て対照との間に著明な差が認められる。a)b)c)の3実験を比較検討するに、ウイルス増殖のsynthetic processesに対して及ぼす3者の時間的作用順位は再びG-72, ST-Ⅲ, Canavanineの順序である。

考 按

PR₈及び漿尿膜を用いてone step growth curveを画かせる条件を吟味し、このカーブの上でHAをIndicatorとした場合、潜伏期が4時間である事が明かになった。しかしG-72, ST-Ⅲ及びCanavanineの3物質にsensitiveなstageは少くとも3時間迄で、その3時間で添加した場合の阻害度によって、G-72, ST-

Fig. 6. The effect of canavanine in the differential growth curves.

Ⅲ, canavanineという sensitive stage の順序が示される. 更に differential growth curve で one step growth curve の性質を吟味すると 5~6 時間, 6~7 時間という時間がウイルス産生の最大極期であるが, 5 時間から 12 時間迄殆んどウイルスは Trickle の状態を続け, この様にウイルスの放出がすべての細胞で始つた後に薬剤を与えて, Accumulation curve で解析したのでは, HA の測定がたゞの 1 回では精度が落ちるので, 適当に区切り乍らウイルス産生の傾向を調べ, これらの物質の作用型式を検討した. 即ちすべての細胞がウイルスを release 始めてから後も猶阻害的に働く薬剤は Canavanine でその作用は顕著である

が, その程度のやゝ落るのは ST-Ⅲ, 又全く効果のないものは G-72 で, 再び妥に G-72, ST-Ⅲ, Canavanine という Sensitive の順序が示された.

結 論

PR₈ ウイルスと漿尿膜の組合せでウイルス増殖を HA で追求し, one step growth をえがかせ, 且つ differential growth curve で解析する条件を吟味した. この様な基礎実験の結果に基づいて, ①潜伏期中に薬剤を加える時間の差によるウイルス増殖抑制態度を調べ, ②増殖極期に薬剤を加えて, 猶影響があるか否かを differential response で調べるという sensitive stage の順序を求め得た.

摺筆に当り御指導賜わつた恩師

黒屋政彦教授, 並に石田名香雄助教授に深甚なる感謝の意を表します.

文 献

- 1) 宮川剛, 雑誌ウイルス掲載予定
- 2) 宮川剛, 雑誌ウイルス掲載予定
- 3) Ackermann, W. W. and Massab, H. F., J. Exp. Med, **99**, 105, 1954.
- 4) Ackermann, W. W. and Massab, H. F., J. Exp. Med., **100**, 329, 1954.
- 5) Ackermann, W. W. and Massab, H. F., J. Exp. Med., **102**, 393, 1955.
- 6) Lin, O. S. et al, J. imm., **78**, 214, 1957.
- 7) Cairns, H. J. F., J. imm., **69**, 168, 1952.
- 8) Pilcher, K. S. et al, proc. soc. Exp. biolog. & Med., **88**, 79, 1955.
- 9) 石田名香雄, 未発表