IDU ならびに類似物質のヘルペスウイルスに対する 阻止力測定の方法の比較

横浜市立大学医学部細菌学教室 (主任: 吉野亀三郎教授)

柴 野 登

COMPARISON OF DIFFERENT METHODS FOR ESTIMATION OF THE INHIBITORY ACTIVITY AGAINST HERPES SIMPLEX VIRUS OF IDU AND ANALOGUES

Noboru SHIBANO

(Department of Bacteriology, Yokohama City University School of Medicine)

(Chairman: Prof. Dr. K. Yoshino)

(受付: 3月24日, 1967)

緒 言

IDU (5-iodo-2'-deoxyuridine) その他のチミジン拮抗物質が DNA ウィルスであるところのヘルペスウィルスの増殖を阻害することが、Herrmann⁸⁾によつてニワトリ胎児細胞の組織培養を用いて証明され、また Kaufman¹¹⁾によつてウサギの実験的ヘルペス角膜炎の治療剤として IDU が著効を奏することが報告されて以来、このウィルスの起す眼科的あるいは皮膚科的疾病に対する IDU およびその類似物質の治療効果が大いに臨床方面の関心を喚び起すところとなつた¹²⁾¹⁵⁾。実験系における阻止効果としては IDU⁷⁾¹⁹⁾のほか BUdR (5-bromo-2'-deoxyuridine)²⁾²⁰⁾²³⁾²⁵⁾, FUdR (5-fluoro-2'-deoxyuridine)¹⁶⁾や MADU (5-methylamino-2'-deoxyuridine)¹⁸⁾¹⁷⁾が何れもヘルペスウイルスに対する阻止効果を示すことが知られている。

以上のごとき諸物質の効力判定は、直接ウサギの実験的ヘルペス角膜炎に点眼する方法¹²⁾、ヘルペスウィルスをウサギに皮下接種しその皮膚病変局所に薬剤を皮下注射して局所病変を観る方法⁹⁾、組織培養の CPE 発現抑制を見る方法¹⁰⁾、組織培養でのウィルスプラック減少を計る方法¹⁵⁾²¹⁾²²⁾²⁴⁾、同じく組織培養のウィルスプラックに対する寒天内拡散物質による阻止環を計る方法⁵⁾²⁰⁾、鶏卵漿尿膜上のポック数減少を計る方法¹⁶⁾で行なわれて来た。しかし、新しい合成物質のウィルス阻止力を測定しようとするときに簡単で感度が良くて正確な一定の測定方法が統一的行なわれていれば、諸家の成績の比較

も容易になるであろうし、また、その度に従来の IDU などとの効力比較を同時テストで行なう必要がなくなつて非常に便利である。特にこのことは、IDU が溶液で保存中に効力を変ずる事例⁴⁾があるのでますますその必要性を感じしめる。

以上の観点から、まず IDU を用いて、そのヘルペス阻止効果を計る方法として最も結果の再現性の高いと思われる3つの方法、すなわち組織培養での CPE 発現抑制測定法と、組織培養のウィルスプラック減少測定法と同じく組織培養プラックに対する阻止環測定法を検討した。とくに最後の方法では、ペニシリンカップの使用ならびに 20°C 拡散法を工夫してその感度を高めた。この結果、少くともスクリーニングの目的には、このペニシリンカップによる阻止環測定法がすぐれていると認めたが、この点をさらに確認するために、新たに合成された数種のチミジン誘導体を用いて、上の方法の得失を比較した。その結果をここに報告する。

材料と方法

1. ウィルス

鶏卵馴化 HF 株のヘルペスウィルスを用いた。ニワトリ胎児細胞を用いる実験では、その漿尿膜継代 476 代以上のものを使用した。この場合、たねウィルスとしては感染漿尿膜を磨砕して BS (pH 7.2 の 0.01 M リン酸緩衝生理食塩水) で 20% 乳剤とし、2,000 rpm 5 分間遠心した上清を用いた。ウィルス希釈液は上記 BS に新鮮鶏卵々黄を 0.1% に加えたものである。BS ならびに

0.1%卵黄 BS とともに、ペニシリン 500 単位/ml、ストレプトマイシン 100 γ /ml を含ませた。

HeLa 細胞を使用した実験では、上の HF 株ウイルスをさらに HeLa 細胞に継代馴化し 61 代以上 HeLa 細胞を通過したものを用いた。その継代歴および継代培養法の詳細は谷口・吉野が既報した通りである²⁶⁾。この場合は、培養液を軽遠心した上清をたねウイルスとした。

2. ニワトリ胎児細胞

9 日孵化鶏卵胎児を教室の定法²⁶⁾にしたがつてトリプシン分散し、 1×10^5 /ml の濃度になるように培養液に浮遊した上で、角チューブには 1 ml ずつ、60 mm シャーレには 5 ml ずつ、90 mm シャーレには 10 ml ずつまいた。

培養液は YLE (0.5%ラクトアルブミン水解物と 0.1%イースト抽出物を含む Earle 液) に非働化コウシ血清を 10%に含ませたものである。抗生物質としてはペニシリン 200 単位/ml とストレプトマイシン 200 γ /ml を加えた。角チューブではゴム栓を施して 37°C ふらん器に 2 日、シャーレは 37°C の 5%炭酸ガスふらん器に 2 日入れた後使用に供した。

3. HeLa 細胞

国立予防衛生研究所病理部山田正篤博士より分与された S3BB クローン HeLa 細胞を用いた。培養液は上記ニワトリ胎児細胞増殖用に使用したものと同じであるが、ただ 10%コウシ血清の代りに 20%ウシ血清を用いた。適宜の母培養から 0.05%トリプシン処理で細胞を集め、それを 2×10^5 /ml ないし 3.5×10^5 /ml の浮遊液として、1 ml ずつ角チューブに分注してゴム栓の上 37°C に 2~3 日培養し、ガラス面が単層細胞で覆われるのを待って実験に供した。

4. 透析血清

ウシ血清をセロハンチューブに入れ 10 倍量の BS に対して氷室内でマグネチックスターラーを廻して透析を行ない、外液を 24 時間ごとに取替えて、5 日後に内液を取り分け、ザイン濾過による滅菌を行なった。

5. 角チューブ培養細胞の CPE 観察

角チューブに培養した細胞にウイルスを接種する際には、まず培養液を捨て、次に PBS (Dulbecco and Vogt²⁷⁾の処方によるリン酸緩衝食塩水でマグネシウム・カルシウムを含まないもの) で細胞面を 1 回洗い、これにウイルス液 0.1 ml ずつを接種して、37°C 1 時間吸着後再び PBS で 1 回洗ってから、維持液を 1 ml ずつ加えて 37°C ふらん器に戻した。維持液は細胞増殖用の培養液の添加血清として HeLa 細胞の場合は 5%、ニワトリ胎児細胞の場合は 2%のウシ血清を用いた。CPE (細胞変性)は毎日 1 回弱拡大で観察することを 1 週間つ

づけ、その程度に応じ・±・+・++で記録した。ウイルスを接種しないで単に薬剤の毒性を調べるときの術式も上に準じ、維持液中に被検材料を所定量含ませて用いた。

6. ブラック定量法

ブラック定量法はニワトリ胎児細胞の 60 mm シャーレ培養を用いて行なった。その術式は谷口・吉野²⁶⁾の方法によつたが、ただ重層寒天の中に薬剤を含ませたときには使用血清は上記透析血清を用いた。概略を述べると、細胞面を PBS で 1 回洗ってからウイルスを 0.05 ml ずつ接種し、37°C の 5%炭酸ガスふらん器に 1 時間納めたのち重層寒天を 4 ml ずつ加えた。その組成は最終濃度 1%の寒天と 2%の非働化コウシ血清を含む培養液でフェノールレッドを除き、また重曹は最終濃度 0.11%になるように加えたものである。寒天凝固後上下倒にして炭酸ガスふらん器に戻し、3 日後に寒天 1%を含む中性紅 10,000 倍液を 2 ml ずつ重層し、さらに 1 日ふらん器に入れた後、ブラックを算定した。通常各希釈につき 3 枚ずつのシャーレを用い、その平均値からウイルス量を算定した。

7. カップによる阻止環形成

始めにウイルスを接種する時の術式は上記のブラック定量の場合と同様であるが、ただこの場合は、ウイルスが細胞面全部を掩うように、60 mm シャーレの場合には 0.2 ml、90 mm シャーレの場合には 0.5 ml の接種量を用いた。1 時間ウイルス吸着後再び PBS で細胞を洗い、次に基礎重層寒天として通常の重層寒天の半量すなわち 60 mm シャーレでは 2 ml、90 mm シャーレでは 4 ml を加えたが、この際の寒天濃度は最終 0.6%とした。この基礎重層寒天が凝固したのち、ペニシリン検定用の不銹鋼性カップ(外径 8 ± 0.1 mm・内径 6 ± 0.1 mm 高さ 10 ± 0.1 mm)²⁷⁾を静かに乗せた。60 mm シャーレでは中央に 1 箇所、90 mm シャーレでは 4 箇所を。つづいて基礎重層寒天と同じものを同量加えて、カップの周囲を固定した。次に被検液をカップに充満し、直ちにあるいは 20°C ふらん器に 2 日置いたのちに炭酸ガスふらん器に入れ爾後の処置は上記ブラック定量法に準じた。ただし、この場合はもちろんシャーレはそのまま倒立せずにふらん器に入れた。

8. IDU およびその他のチミジン拮抗剤

これらはすべて第一製薬株式会社製の発売品および試作品を用いた。その品名と化学構造は Table 1 に示す通りである。これらのものはいずれも YLE に 1% (W/V) に溶解してミリポアフィルター (0.45 μ m) で濾過滅菌してから使用に供し、保存の際はそれを -20°C に凍結した。ただし IDU のように 1%では溶解しないもの

Table 1. Compounds tested for inhibitory activity against herpes simplex virus.

Name	Structure	Name	Structure
5-Bromouridine		5-Iodo-1-β-D-xylofuranosyluracil	
5-Bromospongouridine		5-Bromo-1-β-D-lyxofuranosyluracil	
5-Iodouridine		5-Iodo-1-β-D-lyxofuranosyluracil	
5-Iodospongouridine		3'-Azido-3'-deoxy-Spongouridine	
5-Nitrouridine		1-(2', 3'-Epoxy-β-D-lyxofuranosyl) isocytosine	
Spongouridine		N-Methyl-1-(2', 3'-epoxy-3-D-lyxofuranosyl) isocytosine	
2'-Deoxy-2'-bromouridine		2-O-Methyl-1-(2', 3'-epoxy-β-D-lyxofuranosyl) uracil	
5-Bromo-3'-deoxy-spongouridine			

は、得られる最高濃度の飽和液を用いた。IDU の場合は 0.1 % をストック液とした。

結 果

1. 角チューブ培養細胞のウイルス CPE 抑制による IDU の効果判定

はじめに HeLa 細胞とニワトリ 胎児細胞を用いて角

チューブ培養をつくり、それを用いて IDU のヘルペスウイルス増殖抑制効果を見ることにしたが、まず予備実験として、ウイルスを与えないときの薬剤のみによる CPE の発現、すなわち細胞毒性の試験を行なった。IDU は 0.1 % (W/V) を YLE に溶解したものから順次 YLE で倍々希釈を作り、これらに非透析ウシ血清または透析ウシ血清を HeLa 細胞では 5 %、ニワトリ胎児細胞では

Table 2. Degeneration of tube-cultured HeLa cells and primary chick embryo cells due to the presence of IDU in culture fluid.

Cells	Bovine serum contained in culture fluid	Concentration of IDU (%)	Tube No.	Days after IDU addition					
				1	2	3	4	5	7
HeLa	Undialysed	0.1	1 2	—	—	±	+	++	++
		0.05	1 2	—	—	—	±	+	++
		0.025	1 2	—	—	—	—	—	—
		0.0125	1 2	—	—	—	—	—	—
		0	1 2	—	—	—	—	—	—
	Dialysed	0.1	1 2	—	—	++	Sl. Sl.		
		0.05	1 2	—	—	+	++	++	++
		0.025	1 2	—	—	±	±	±	+
		0.0125	1 2	—	—	—	—	—	—
		0	1 2	—	—	—	—	—	—
Primary chick embryo	Undialysed	0.1	1 2	—	—	—	—	—	—
		0.05	1 2	—	—	—	—	—	—
		0.025	1 2	—	—	—	—	—	—
		0.0125	1 2	—	—	—	—	—	—
		0	1 2	—	—	Sl.	—	—	—
	Dialysed	0.1	1 2	—	—	—	—	—	—
		0.05	1 2	—	—	—	—	—	—
		0.025	1 2	—	—	—	—	—	—
		0.0125	1 2	Sl.	—	—	—	—	—
		0	1 2	—	—	Sl.	—	—	—

Grades of degeneration are expressed by codes of — (negative), ± (slightly positive), + (positive) and ++ (strongly positive). sl. means sloughing-off of cells.

2%に加えて、各2本の角チューブ細胞に1mlずつ加え、37°C培養を1週間行なった。対照角チューブにはIDUを含まない維持液を用いた。その結果はTable 2に示すごとく、HeLa細胞では毒性が少々強く現われたが、ニワトリ胎児細胞では時に細胞層が自然剥離するチューブの現われる以外は全く細胞毒性が見られなかった。HeLa細胞に細胞毒性が強く現われたのは、もともとIDUが癌の治療剤として作られたものであることから明らかのように、核酸合成の廻転の速い癌細胞であるところのHeLa細胞が、IDUによるDNA合成阻害のための抑制を強く受けたことによるのは当然である。また、この場合透析血清を用いた方がそのIDUの働きが

強く出ているが、それは非透析血清中のチミジンがIDUの作用に相殺的に働くのに反して、透析血清ではチミジンが無くなっているためであろう。

以上の結果に基づき、以後の薬剤効果判定の実験のすべてにおいて使用血清は透析ウシ血清を使用することにした。Table 3に掲げる実験においては、HeLa細胞の角チューブに階段希釈ウイルス液を接種し、第1群では維持液に0.01% IDUを含ませ、第2群は対照としてIDUなしの維持液を加えた。その結果は、対照群の終末値(TCID₅₀)は10⁻⁶であり、IDU群のそれは10^{-1.5}で、この濃度のIDUが、10^{4.5} TCID₅₀のウイルスのCPEを抑えたことになった。その際の10⁻⁴ウイルス(すな

Table 3. Effect of 0.01 % IDU upon the CPE of herpes simplex virus in tube-cultured HeLa cells.

Group	Dilution of virus inoculated	Tube No.	Days after virus inoculation							Endpoint
			1	2	3	4	5	6	7	
IDU	10 ⁻⁰	1	—	+	S1.					10 ^{-1.5}
		2	—	+	+	S1.				
	10 ⁻¹	1	—	±	±	±	S1.			
		2	—	±	±	±	S1.			
	10 ⁻²	1	—	—	—	—	—	—	—	
		2	—	—	—	—	—	—	—	
	10 ⁻³	1	—	—	—	—	—	—	—	
		2	—	—	—	—	—	—	—	
	10 ⁻⁴	1	—	—	—	—	—	—	—	
		2	—	—	—	—	—	—	—	
Control	10 ⁻³	1	—	+	+	S1.				10 ^{-6.0}
		2	—	+	+	+	S1.			
	10 ⁻⁴	1	—	+	+	+	+	S1.		
		2	—	—	+	+	+	S1.		
	10 ⁻⁵	1	—	±	±	+	+	S1.		
		2	—	—	—	+	+			
	10 ⁻⁶	1	—	±	±	±	+	S1.		
		2	—	—	—	—	—	—	—	
	10 ⁻⁷	1	—	—	—	—	—	—	—	
		2	—	—	—	—	—	—	—	

Grades of CPE are expressed by the same codes as used for those of cellular degeneration in Table 2. sl. means sloughing-off.

(a)

(b)

Fig. 1. CPE caused by 100 TCID₅₀ of herpes simplex virus in HeLa cells and its suppression by 0.01 % IDU.

(a) 4 days after infection without IDU.

(b) 4 days after infection with IDU.

わち 100 TCID₅₀ を接種された IDU 群と対照群の細胞の接種後 4 日目の位相差顕微鏡像を Fig. 1 に示した。

次に 320 TCID₅₀ のウイルスを HeLa 細胞に接種したのち、維持液中に IDU を種々なる濃度に含ませた場合の CPE 抑制効果を見た。その結果は Table 4 に示す通り、IDU 濃度 0.0025 % までは完全な抑制があり、0.00125 % では抑制効果が少々減じ一応対照とは明らか

な差が見られたが、それ以下の濃度では殆んど効果が見られなかった。

以上のような実験をニワトリ胎児細胞でも行なおうとしたが、この場合は始めの実験で見たように、この細胞の特徴として細胞層の自然剥離がしばしば起るので、ウイルスによる CPE と交錯して判定を狂わせることが多く、ためにこの試みは不成功に終った。

以上を一括すれば、角チューブ培養細胞を用いる薬剤

Table 4. Effect of different concentrations of IDU upon the CPE of herpes simplex virus in tube-cultured HeLa cells.

Concentration of IDU in culture fluid (%)	Tube No.	Days after infection with 320 TCID ₅₀ of virus					
		1	2	3	4	5	7
0.01	1	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—
0.005	1	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—
0.0025	1	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—
0.00125	1	—	—	—	±	+	+
	2	—	—	—	—	±	+
0.000625	1	—	—	—	++	++	S1.
	2	—	—	—	++	++	S1.
0.0003125	1	—	—	+	++	S1.	
	2	—	—	+	++	S1.	
0.00015625	1	—	+	+	++	S1.	
	2	—	+	+	++	S1.	
0 (Control)	1	—	+	+	++	S1.	
	2	—	+	+	++	S1.	

Codes for CPE are the same as in Table 3.

Fig. 2. Inhibition of plaques of herpes simplex virus in primary chick embryo cells by incorporation of IDU into agar overlay.

効果判定法は、HeLa 細胞を用いればかなり感度の良い方法となり得るけれども、薬剤のみの細胞毒性試験はニワトリ胎児細胞のような初代細胞に頼らざるを得ず、また一方ニワトリ胎児細胞で薬剤のウイルス抑制効果を見ることには大きな技術的な困難がある。そのため完全な試験のためには常に両様の細胞を用意しなければならないという不便を免れることはできないという結論に達した。

2. ブラック減少測定法による IDU の効果判定

第2の方法としては、ウイルスのブラック定量と同じことを行ない、その際重層寒天の中に IDU の種々なる濃度を含ませて、それによつてどの位ブラック数が減少するかを見ることを試みた。このためには、HeLa 細胞

でもブラックを作り得る²⁸⁾のであるが、ニワトリ胎児細胞の方が簡便で、必要数の単層培養シャーレが迅速に作れるので、専ら後者を用いた。術式は、適当量のウイルスを接種し1時間吸着させた後で、0.4 ml の薬剤 (YLE で希釈したもの) を加え、直ちに 3.6 ml の重層寒天を加えて混ぜて固め、爾後の操作は通常のパック定量と同様に行なつた。

Fig. 2 に示す写真は、IDU のブラック抑制効果をこの方法で見た1つの例であるが、図中に記した%は重層寒天と混じた後の最終薬剤濃度である。この例でも判るように、この方法を用いた場合、0.01 % の IDU は完全な抑制効果を示すが、0.001%では全く効果を示さない。すなわち、薬剤の効力検定の感度という点から見れば、上記 HeLa 細胞の角チューブを用いる方法より感度が少々劣る。しかしながら、それにも拘らずこの方がすぐれているのは、角チューブの方法よりも遙に簡単な手数で済み、しかも判定が1回の観察で済むという利点があるからである。

3. カップ法による IDU の効力判定

次に、寒天内拡散薬剤によるウイルスブラック抑制を利用し、上の第2の方法のように多くのシャーレを使わず、1枚のシャーレでその阻止環の大きさを計つて薬剤の効果を見ることを試みた。もともとこの方法は Herrmann²⁹⁾が初めて IDU などのヘルペスウイルスに対する in vitro 効果を見るのに使つたものであるが、その際はペーパーディスクを使っている。もし、ペーパーディスクの代りにペニシリンカップを用いたならば、能率の良

Fig. 3. Plaque inhibition zones formed in a 90-mm dish by diffusion of IDU in agar overlay. The cups were filled with YLE containing the indicated concentrations of IDU and immediately brought to the CO_2 -incubator.

Fig. 4. Plaque inhibition zones formed in 60-mm dishes by diffusion of IDU in agar overlay. The technique was the same as in the test shown in Fig. 1.

い検定法になるのではないかと考えて、それを試みた。

術式は材料と方法の部に詳述した通りであるが、始めの実験ではウイルス接種後ペニシリンカップを重層寒天中に固定し、それに IDU を充たした後、ただちに炭酸ガスふらん器に入れる方法を用いた。問題になるのは使用ウイルス量であつて、予備実験によつて、完全密集ブランクを生ずるような濃いウイルスを用いたのでは却つて良い阻止環が得られず、それより若干少な目のウイルス量を用いなければいけないことが判つたので、HF 株感染漿尿膜乳剤の 10^{-4} を指示ウイルスとして用いることに一定した。Fig. 3 に示すのは 90 mm シャーレにカップを 4 箇置き、IDU を 0.1%・0.01%・0.001% および 0% 含む YLE でそれらを充たした場合に生じた阻止環であるが、抗生物質の検定を細菌培養で行なうときと異なり、阻止環がそれ程はつきりした輪郭を示さないで、隣接阻止環が重なり、そのため直径の計測が困難であつたので、以後は全部 60 mm シャーレを用いて各シャーレにカップを 1 箇しか置かないことにした。また阻止環直径は直交する 2 直径を平均したもので表わすことにした。

この方法で IDU の 0.1% 液以下諸種希釈を YLE にて作り、それらを用いて上記カップ法による阻止環を作らせたものの例を Fig. 4 に示す。この実験では各群 3 枚のシャーレを使用したがつ、それぞれの希釈に対する阻止環の平均直径を較べると、Fig. 5 に示すように、薬剤濃度の対数が阻止環直径と正比例することが明らかに見られた。

ただ、この場合、カップの外径が 8 mm なので、阻止環の直径は少なくとも 12 mm はないと判然とした効果

Fig. 5. Relation between the diameter of the plaque inhibition zone and the concentration of IDU filling the cup. The technique was the same as in the test shown in Fig. 1.

判定が行ない難い。その意味では、この方法では 0.0025% の IDU の効果は少々不確かということになるので、矢張り、第 1 の HeLa 細胞の角チューブを用いる方法よりも感度の点で劣ると見ざるを得なかつた。

しかしながら、手数の繁簡や材料の多寡の点では前 2 法とは比較にならない程、この第 3 の法がすぐれているので、この方法をさらに改良してその薬剤効力に対する感度を上げるべく、いろいろなことを行なつたが、結局次のような改良法がその目的を達した。すなわち、カップに IDU を充たしてから、まず 20°C ふらん器（水盤で蒸気圧を十分に保つたもの）の中に 2 日間入れて充

Table 5. The increased efficiency of assay in the new cup method in which diffusion of IDU was allowed to proceed at 20°C for 2 days before bringing dishes to the CO₂-incubator.

Concentration of IDU (%)	Number of dishes used	Average diameter of inhibition zone (mm)	Standard deviation (mm)
0.01	14	>56.0	
0.0033	13	27.4	±4.3
0.0011	12	12.2	±8.3

Table 6. Estimation of the anti-herpes virus activities of 15 newly synthesized compounds by the plaque reduction method and the new cup method using primary chick embryo cells.

Compound	Plaque reduction method						Average diameter of inhibition zone in cup assay* (mm)	Minimal cytotoxic concentration (%)
	Average number plaques appearing under overlay containing compound at (%)					Minimal effective concentration (%)		
	0.1	0.05	0.025	0.01	0			
5-Bromouridine	4	5	5	7	6	>0.1	19.5	0.5
5-Bromospongouridine	3	13	19	16	32	0.1	>56.0	>1
5-Iodouridine	11	18	11	11	10	>0.1	0	>1
5-Iodospongouridine	0	0	1.2	9	14.5	0.025	>56.0	0.25
5-Nitrouridine	4.8	20	32	29	26	0.1	36.5	0.05
Spongouridine	16	13	12	22	19	>0.1	0	>1
2'-Deoxy-2'-bromouridine	16	13	14	21	23	>0.1	0	1
5-Bromo-3'-deoxyspongouridine	7	15	8	7	10	>0.1	0	0.25
5-Iodo-1-β-D-xylofuranosyluracil	12	14	13	18	10	>0.1	0	>1
5-Bromo-1-β-D-lyxofuranosyluracil	6	8	10	14	13	>0.1	0	>1
5-Iodo-1-β-D-lyxofuranosyluracil	8	10	13	7	13	>0.1	29.0	>1
3'-Azido-3'-deoxy-Spongouridine	9	9	9	8	9	>0.1	0	>1
1-(2', 3'-Epoxy-β-D-lyxofuranosyl) isocytosine	57	67	74	65	73	>0.1	0	0.5
N-Methyl-1-(2,, 3'-epoxy-3-D-lyxofuranosyl) isocytosine	33	29	37	34	33	>0.1	0	>1
2-O-Methyl-1-) 2', 3'-epoxy-β-D-lyxofurnosyl) uracil	27	30	44	30	39	>0.1	0	1

* 1 % solution in YLE was used in the cup.

分 IDU を拡散させ、しかる後炭酸ガスふらん器に移して以後の操作は前方法と同じにするという事である。

これを試みる前には、そのような操作をすると、20°C 2 日間の拡散期間中に始めに接種したウイルスのブラック形成能が落ちるのではないかと心配したが、実際に行なつて見ると、そのようなブラック形成能の低下は殆んどないことが判つた。したがって当然の帰結として、阻止環は極めて大となり、0.01 % の IDU 液を用いた場合、16枚のシャーレによる複数試験において、いずれのシャーレにおいても阻止環はシャーレの内径全部 (56mm) に迄広がっていることが観察された。

そこでこの方法を用い、IDU の 0.0033% と 0.0011%

液を使って、各群 10 枚以上のシャーレで阻止環を測定した結果は Table 5 に示す通りであつて、薬剤効力検定の感度は著しく上り、HeLa 細胞角チューブによる効力検定法に比して感度の点でも劣らないものと見なすことができるようになった。

4. 諸種薬剤に対するブラック減少測定法とカップ法の効力判定感度の比較

少くとも IDU に関しては、ブラック減少測定法よりも、一番最後に行なつた 2 日間の 20°C 拡散期間を置いてのカップ法の方が効力測定感度がよいことは明らかとなつたが、このことが他のすべての類似物質でも同じであるかどうかについては、別途証明を要するところであ

る。HeLa 細胞角チューブを用いる方法は、たとえ感度良好であつてもこの2つの方法に較べると遙かに煩雑なので、ここでは一応上の2法の比較を諸種チミジン誘導体を用いて調べて見た。

各物質は YLE にて 1% 溶液となし、その希釈を YLE で作り、0.1, 0.05, 0.025, 0.01% とし対照は YLE のみとした。ブラック減少測定のためにはこれらを重層寒天でさらに 10 倍に希釈するので、その最終濃度を以て使用薬剤濃度とした。そして対照ブラック数より半数以下のブラック数に抑える最低薬剤濃度を有効濃度と判定した。カップ法においては 1% 溶液の原液をカップに入れて生ずる阻止環の直径の平均を計出した。また細胞毒性の方はニワトリ胎児細胞の角チューブを用いて Table 1 と同じ方法で毒性を調べ、細胞を変性させる最終濃度を以て毒性濃度とした。これらの実験の総括を Table 6 に掲げる。

この結果明らかなごとく、両方法の結果は大体平行して現われた。ただ、ブラック減少測定の場合は使用薬剤が重層寒天で 10 倍に希釈される関係上、検査できる最高濃度が 0.1% であるのに比し、カップ法の場合は原液 (1%) をそのまま使用できるため、あるものではブラック減少測定法では陰性と出たのにカップ法で陽性となったものもある。この意味においてはブラック減少法よりもカップ法の方が感度が良いと言える。また後者の方が原液だけの 1 つの希釈の使用でも阻止環の直径の大きさと大体の効力比較ができる便があるので、少なくとも新製剤の効力検定のスクリーニングには最も良い方法であると考えて差支ないと思われた。

考 按

IDU などのチミジン誘導体による DNA ウイルス疾患の治療効果を、実験的な系を使つて調べた結果から予想しようとするには幾つかの基本的問題点がある。その 1 つは実験系とくに組織培養で大きなウイルス抑制効果を示す薬剤でも生体に応用された場合には、生体のもつチミジンによつてかなりその効力が相殺されるであろうことが当然考えられる。このことは、本実験においても透析血清に比し非透析血清が、IDU の抗 HeLa 細胞の効果を減少させた結果に現われている。このことを思うと、ウサギのヘルペス¹⁰⁾やワクチニア¹¹⁾、角膜炎に対する IDU の卓効の方がむしろ意外な程であるが、最近の Jawetz ら⁹⁾の報告によれば、この場合ウイルス産生量は終局的には減少するのではなくて、むしろその早期の増殖が稍々中断されることによつて、他の生体の治癒機構 (たとえばインターフェロン産生のような) を促進させるのが治癒機転の本態のようである。また、IDU その

他類似薬剤の疾病治療効果も、眼角膜や皮膚のような表在性の病巣にのみ限られているのも上の理由によるものであろう。

したがつて in vitro の簡単な検査で疾病治療効果を予想するのは困難で、少なくとも抗ヘルペス剤といつても、眼疾患や皮膚疾患のようなものに対する効果をウサギの実験的ヘルペス角膜炎に対する効果から予想するぐらいが無事な所であらう。しかしながら、数多く作られる新合成剤をスクリーニングするのに、ウサギを用いて実験するということは大変な手数であるのみならず、そのような方法は従来の薬剤との効力比較を定量的に行なうことが非常に難しく厄介である。この意味においてここに組織培養を利用するの諸種の薬剤効力検定法の比較を行なつて、最も簡便で感度の良いカップ法を確立したことは大きな意味が有ると考える。

もちろんこの方法もスクリーニング法として万全であるとは言えない。とくに、細胞毒性の強い物質を用いた場合に、IDU 効果によるものと区別しにくい阻止環ができることが往々に見られるのは大きな欠点である。このことに関して Herrmann⁷⁾は薬剤のウイルス抑制効果による阻止環と細胞毒性による阻止環は色調ではつきり区別できると述べているが、現在までの著者の経験によるとそのような区別ははなはだ危険であつて、必ず別途にニワトリ胎児細胞角チューブ培養による細胞毒性の検査が必要と思われる。

ただ、このような欠点があるにせよ、この方法が簡便という点で遙に他の方法に勝ることを考えるならば、少なくとも新薬のスクリーニングには最も適していると言つて過言はない。何故ならば、この方法で大きな阻止環が現われた場合には、そのものについてさらに深く検討する意味で細胞毒性試験を行ない、またさらに確認の意味でブラック減少測定法を行なうのは容易だからである。

現在までにわが教室において多くのチミジン誘導体が調べられたが、IDU とほぼ同等の効果のあるものは極めて少ない。このことから考えても、カップ法でのスクリーニングで有効なる物を拾い出すことが、IDU 以上の有効物質を探すための第一のステップであると考えて差支えないと思われる。

要 約

ヘルペスウイルスに対する IDU の抑制効果を定量する方法として 3 つの方法を比較した。第 1 は角チューブ培養 HeLa 細胞におけるウイルスの CPE の発現阻止を目標にする方法で、これによると IDU 濃度約 0.001% まで抑制効果が見られた。ただし IDU は 0.025% 以上で単独でも HeLa 細胞に変性を起すので、薬剤

の細胞毒性を見るには不適である。第2の方法はニワトリ胎児細胞におけるウイルスブラック減少を測定する法で、これでは IDU 0.01 % まで効果を現したが 0.001 % では全く効果が見られなかった。第3はペニシリンカップを用いてウイルス感染ニワトリ胎児細胞上の重層寒天内に薬剤を拡散させブラック阻止環を作らせる方法で、薬剤拡散のために 20°C 2 日間培養後通常の方法でブラックを作らせた所、IDU 約 0.001 % まで濃度対数に比例する直径の阻止環が現われた。

最後の方法が極めて簡便なるのみならず、また感度でも他に劣らないので、新合成抗ウイルス剤のスクリーニングの法として最適と考え、数種のチミジン誘導体を使って実際にブラック減少測定法と較べてその点を確認した。ただし、細胞毒性検査は別に角チューブ培養ニワトリ胎児細胞のごときものを用いて調べる必要がある。

謝 辞

稿を終るにあたり、特に御懇切な御指導並びに御校閲を賜った 吉野亀三郎教授に心から感謝するとともに終始御協力を惜しまれなかった 谷口貞子助手に感謝します。

Summary

Three methods for estimating the inhibitory activity of IDU against herpes simplex virus were compared. The first method measured the CPE caused by virus in tube-cultured HeLa cells; the minimal effective concentration of IDU as estimated by this method was approximately 0.001 %. Toxicity of the drug could not be determined with HeLa cells, because IDU was more toxic to HeLa cells than to non-malignant cells such as primary chick embryo cells. The second method utilized the plaque reduction in primary chick embryo cells due to presence of IDU in the overlay medium; 0.01 % IDU completely suppressed viral plaques but no reduction was seen with 0.001 %. In the last method, virus-infected primary chick embryo cells were overlaid with a penicillin cup placed in the center, and the plaque inhibition zone caused by diffusion of the drug was measured. When diffusion of the drug was allowed to take place at 20°C for 2 days before bringing the dishes to the 37°C CO₂-incubator, efficiency of this method to assay the effect of IDU was increased; concentrations of IDU higher than 0.001 % placed in the cup resulted in exhibition of inhibition zones whose diameters were in proportion to the log of the drug. Since the last method was simplest in manipulation and no less sensitive than the other methods, it was thought recommendable for screening of anti-herpes drugs. This was further ascertained by

comparing it with the plaque reduction method using several newly synthesized thymidine derivatives. It should be cautioned, however, that cytotoxicity of a new drug must be examined in tube-cultured primary chick embryo cells in parallel with this screening.

文 献

- 1) Centifanto, Y. and Kaufman, H. E. (1965) : Thymidine kinase in IDU resistance. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 120, 23-26. — 2) Dubbs, D. R. and Kit, S. (1965) : The effect of temperature on induction of deoxythymidine kinase activity by herpes simplex mutants. *Virology* 25, 256-270. — 3) Dulbecco, R. and Vogt, M. (1954) : Plaque formation and isolation of pure line with polyomyelitis viruses. *J. Exp. Med.* 99, 167-182. — 4) Engle, C. G. and Stewart, R. C. (1964) : Pathogenesis of herpes simplex virus in the rabbit eye. *J. Immunol.* 92, 730-733. — 5) Engle, C. G. and Stewart, R. C. (1964) : Anti-herpetic activity of 5-iodo-2'-deoxyuridine in presence of its degradation products. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 120, 23-26. — 6) Force, E. E., Stewart, R. C. and Haff, R. F. (1964) : Herpes simplex skin infection in rabbits I. Effect of 5-iodo-2'-deoxyuridine. *Virology* 23, 363-369. — 7) Herrmann, E. C., Gablik, J. Jr., Engle, C. G. and Periman, P. L. (1960) : Agar diffusion method for detection and bioassay of anti viral antibiotics. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 103, 625-628. — 8) Herrmann, E. C., Jr. (1961) : Plaque inhibition test for detection of specific inhibitors of DNA containing viruses. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 107, 142-145. — 9) Jawetz, E., Schultz, R., Coleman, V. and Okumoto, M. (1965) : Studies on herpes simplex XI. The antiviral dynamics of 5-iodo-2'-deoxyuridine in vivo. *J. Immunol.* 95, 635-642. — 10) Kaufman, H. E. and Maloney, E. D. (1963) : Therapeutic anti-viral activity in tissue culture. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 112, 4-7. — 11) Kaufman, H. E. (1962) : Clinical cure of herpes simplex keratitis by 5-iodo-2'-deoxyuridine. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 109, 251-252. — 12) Kaufman, H. E., Nesburn, A. B. and Maloney, E. D. (1962) : IDU therapy of herpes simplex. *Arch. Ophthalmol.* 67, 583-591. — 13) Kaufman H. E. and Heridelberger, C. (1964) : Therapeutic antiviral action of 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine in herpes simplex keratitis. *Science* 145, 585-586. — 14) Kaufman, H. E., Nesburn, A. B. and Maloney, E. D. (1962) : Cure of vaccinia infection by 5-iodo-2'-deoxyuridine. *Virology* 18, 567-569. — 15) 小林俊策, 中村利幸 (1963) : 角膜ヘルペスと IDU — とくにヘルペスウイルスの IDU 抵抗性獲得について —, *日本眼科学会雑誌*, 67, 445-450. — 16) Ler-

- man, S., Doyle, J. and Doyle, R. F. (1962) : Effect of fluorinated pyrimidines on herpes simplex virus. *Nature* 194, 986-988. — 17) Nemes, M. M. and Hilleman, M. R. (1965) : Effective treatment of experimental herpes simplex keratitis with new derivative 5-methylamino-2'-deoxyuridine (MADU). *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 119, 515-518. — 18) Perkins, E. S., Wood, R. M., Soars, M. L., Prusoff, W. H. and Welch, A. D. (1962) : Anti-viral activities of several iodinated pyrimidine deoxyribonucleosides. *Nature* 194, 985-986. — 19) Prusoff, W. H. (1959) : Synthesis and biological activities of iododeoxyuridine, an analog of thymidine. *Biochem. Biophys. ACTA* 32, 295-296. — 20) Roizman, B., Aurelian, L. and Roane, P. R. Jr. (1963) : The multiplication of herpes simplex virus I. The programming of viral DNA duplication in HEp-2 cells. *Virology* 21, 482-498. — 21) Schneweis, K. E. (1965) : Das Verhalten von DNS-Viren in 5-Bromdesoxyuridin-behandelten Zellkulturen I. *Arch. ges. Virusforsch.* 15, 565-582. — 22) Schneweis, K. E. (1965) : Das Verhalten von DNS-Viren in 5-Bromdesoxyuridin-behandelten Zellkulturen II. *Arch. ges. Virusforsch.* 15, 583-597. — 23) Siminoff, P. (1964) : The effect of 5-bromodeoxyuridine on herpes simplex infection of HeLa cells. *Virology* 24, 1-12. — 24) Smith, K. O. (1964) : Some biological aspects of herpes virus-cell interactions in the presence of 5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU), Demonstration of cytotoxic effect by herpes virus. *J. Immunol.* 91, 582-590. — 25) Smith, K. O. and Dukas, C. D. (1964) : Effects of 5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU) on herpes virus synthesis and survival in infected cells. *J. Immunol.* 92, 550-554. — 26) Taniguchi, S. and Yoshino, K. (1964) : An analysis of the plaque assay of herpes simplex virus in chickembryo monolayers. *Arch. ges. Virusforsch.* 14, 537-552. — 27) 伝染病研究所学会編(1958) : 抗菌作用の測定法, 細菌学実習提要, 328, 丸善株式会社, 東京. — 28) Yazaki, S., Taniguchi, S. and Yoshino, K. (1966) : Improvement of the plaque assay of herpes simplex virus in HeLa cells. *Japan J. Microbiol.* 10, 133-139.