

## アヒルB型肝炎ウイルス (DHBV) に対する グリチルリチンの抗ウイルス作用

—アヒル初代培養肝細胞における検討—

田 村 徹

広島大学医学部内科学第一講座 (主任: 梶山梧朗教授)

受付 平成3年8月28日

受理 平成3年11月6日

B型肝炎ウイルス (HBV) に対する薬剤の抗ウイルス作用についての解析は、HBV と同じくヘパドナウイルス科に属するアヒルB型肝炎ウイルス (DHBV) とその宿主であるアヒルを用いた感染実験系を主に使用して行われている。アヒル初代培養肝細胞における DHBV 感染実験系は、ウイルスのライフサイクルであるウイルスの肝細胞への吸着侵入、肝細胞内でのウイルス合成、および培養液中へのウイルス放出が解析できるので、有用な実験系である。筆者は、DHBV-DNA probe を作製し、アヒル初代培養肝細胞における DHBV の感染実験を行い、グリチルリチン (GL) の抗ウイルス作用を検討した。

GL は 1.0 mg/ml の濃度では肝細胞毒性を認めなかった。同濃度の GL を用いた実験にて、GL は DHBV 接種開始時から添加するとウイルス増殖を抑制したが、接種終了時よりの添加ではウイルス増殖を抑制しなかった。また GL は肝細胞内の一定量 DHBV あたりの放出 DHBV 量を抑制した。しかし GL には DHBV 粒子の不活性化作用はなかった。これらの結果より、GL は肝細胞毒性のない 1.0 mg/ml の濃度で DHBV に対して抗ウイルス作用を示し、この GL の抗ウイルス作用の機序としては、DHBV の肝細胞への吸着侵入と肝細胞からのウイルス放出の抑制が考えられ、肝細胞内での DHBV 増殖に対する抑制作用や DHBV 粒子に対する直接的な不活性化作用によるものではないと考えられた。また、GL の 50% inhibitory dose は 0.46 mg/ml であった。

一方、GL は 0.25 mg/ml の低濃度では DHBV に対する抗ウイルス作用はほとんど認められなかった。このことは、臨床で HBV 感染症に投与されている GL 量では HBV に対する GL の抗ウイルス作用は軽微であることを示唆しており、GL のトランスアミナーゼ改善の機序として、この抗ウイルス作用は優位には働いていないと推測された。

**Key words:** グリチルリチン, アヒルB型肝炎ウイルス (DHBV), アヒル初代培養肝細胞, 抗ウイルス作用

B型肝炎ウイルス (HBV) の宿主域は霊長類のみと狭いため、HBV の動物実験系はチンパンジーを用いた限られた方法しかなく、また培養細胞を用いた HBV の感染実験系も未だ確立されていない。近年、HBV 類似ウイルスとして、ウッドチャック肝炎ウイルス (WHV)<sup>30)</sup>、リス肝炎ウイルス (GSHV)<sup>20)</sup>、アヒルB型肝炎ウイルス (DHBV)<sup>21)</sup> が発見され、総称してヘパドナウイルスと呼ばれている<sup>6)</sup>。これらヘパドナウイルスは、血中で Dane 粒子様の形態を呈し、

ウイルスの DNA は double stranded DNA であるが一部 single stranded DNA であり、内因性の DNA polymerase 活性を有し、肝細胞に持続感染を引き起こす、などの共通点を有する。また、ヘパドナウイルスの一部は、長期間にわたる持続感染によりその宿主に肝癌を発生させ、特に WHV は HBV 関連肝癌の発生機序解明のモデルとして研究されている。

一方、DHBV はその宿主であるアヒルの入手や感染実験が比較的容易であり、ウイルスの持続感染状態

を確実に作製できる。すなわち、孵化直後のアヒルに DHBV を接種すれば HBV と同様に持続感染状態となり、またアヒル初代培養肝細胞（以下アヒル初代肝細胞）に対しても、培養液中への DHBV の添加により感染が成立する。このため、現在はもっぱらこのウイルスを用いた感染実験が行われ、ヘパドナウイルスの合成過程やウイルス遺伝子の機能についての解析がなされている。また HBV に対する薬剤の抗ウイルス作用やその作用機序を解明する手段としても、この DHBV の感染実験系を用いた検索が行われている<sup>33</sup>。

現在臨床では B 型慢性肝炎に対してグリチルリチン (GL) を主成分とする強力ネオミノファーゲン C (SNMC) が投与されており、肝機能の改善やさらにはその大量長期投与で肝組織像までも改善したと報告されている<sup>8,11,12,17,32</sup>。この GL は生薬甘草の主サポニンであり、グリチルレチン酸と 2 分子のグルクロン酸が抱合したものである。本薬剤には抗炎症作用、抗アレルギー作用に加え、水痘・带状疱疹ウイルス (VZV)<sup>3</sup>、human immunodeficiency virus (HIV)<sup>13,14</sup> など種々のウイルスに対して抗ウイルス作用があると報告されている。しかしながら、GL の HBV に対する抗ウイルス作用について検討した報告は少ない。

そこで著者は DHBV-DNA probe を作製し、Tuttleman<sup>35</sup>、Uchida<sup>36</sup> らが確立したアヒル初代肝細胞を使用した DHBV の感染実験系を用いて、GL の DHBV に対する抗ウイルス作用を検討した。

## 材料と方法

### 1. アヒル初代肝細胞の作製

孵化後 2～3 週の DHBV 非感染アヒル（日本産ペキンダック）を用い、Seglen<sup>25</sup> の変法にて肝細胞の分離を行った。すなわち、麻酔下にて開腹し、門脈にカニューレーション後、右心房を切開し流出路を作成、次に前灌流用緩衝液 (0.5 mM EGTA, 10 mM HEPES pH 7.4, Ca<sup>2+</sup>(-) Mg<sup>2+</sup>(-) Hanks 液) 100 ml にて前灌流を行った後、collagenase 溶液 (10 mM HEPES pH 7.4, collagenase 0.5 mg/ml, Hanks 液) 100 ml で灌流し、消化した肝臓を取り出した。collagenase 溶液中にて肝細胞を分離し、細胞懸濁液をナイロンメッシュで濾過した。500 rpm 2 分間の遠心により細胞をペレットとし、5% fetal calf serum, 15 mM HEPES pH 7.4, 1 mg/liter insulin, 1.5 mg/liter glucose, 0.01 mM prednisolone, 300 mg/liter penicillin, 100 mg/liter streptomycin を添加した L-15 培養液 (Gibco 社製) に再浮遊させ、

さらにこの遠心による細胞の洗浄操作を 2 回行った。肝細胞を L-15 培養液に浮遊させ、トリパンブルーにて細胞の生存率が 90% 以上であることを確認後、 $1 \times 10^5$  cell/0.2 ml 培養液/cm<sup>2</sup> の濃度でカルチャーボトル (ファルコン社製プライマリアラスコ) にまき、37°C の条件下で培養を行った。培養液交換は連日または 2 日に一度行った。

### 2. DHBV-DNA probe の作製

DHBV 陽性アヒル血清 (約  $10^{10}$  virion/ml) 1 ml を 20% sucrose 4 ml に重層した後、Beckman SW 50.1 ローターにて 50000 rpm 2 時間遠心し、DHBV を含むペレットを得た。この DHBV の DNA は double stranded DNA であるが、一部 single stranded DNA となっている (partially double stranded DNA) ため、DHBV が有する内因性 DHBV-DNA polymerase 活性を利用し、Kaplan らの方法<sup>15,16</sup> にて partially double stranded DHBV-DNA を complete double stranded DHBV-DNA とした。次に、proteinase K 溶液 (20 mM Tris HCl, 0.1 M NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% SDS pH 7.4, proteinase K 0.5 mg/ml) にて 57°C 12 時間蛋白を消化した後、フェノールクロロホルムで DNA を抽出し、エタノール沈澱にて DHBV-DNA を得た。この DHBV-DNA を TE 溶液 (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) に溶解した後、1% agarose gel にて電気泳動し、約 3.7 kb にある relaxed circular double stranded DHBV-DNA のバンドを切り出し回収した。この DHBV-DNA と plasmid pYEJ-001 を制限酵素 *EcoR1* にて処理後 ligation を行い、DHBV-DNA を pYEJ-001 に組み込んだ plasmid-DNA を作製し、competent *E. coli* に移入した後培養した。培養した *E. coli* より plasmid-DNA を抽出精製し、この plasmid-DNA を *EcoR1* にて処理した後、1% agarose gel にて電気泳動を行い、3.0 kb の cloned linear DHBV-DNA を回収した。得られた cloned DHBV-DNA に random primer extension labeling 法<sup>4</sup> にて <sup>32</sup>P-dCTP をラベルし、約  $10^8$  cpm/ $\mu$ g の比活性を有する <sup>32</sup>P-DHBV-DNA probe を作製した。

### 3. Southern blot hybridization 法<sup>28</sup>による肝細胞内 DHBV-DNA の解析

採取した培養肝細胞に proteinase K 溶液を加え 57°C 12 時間反応させ、フェノールクロロホルム抽出後エタノール沈澱にて核酸を抽出、次に RNase 溶液 (20 mM Tris HCl, 0.1 M NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% SDS pH 7.4, RNase A 0.1 mg/ml) にて 57°C 1 時間反応後、proteinase K を 0.2 mg/ml の濃度で加え 2

時間反応させ、フェノールクロロホルム抽出とエタノール沈澱を行い DNA を抽出して TE 溶液に溶解した。抽出 DNA 各 10  $\mu$ g を 1% agarose gel にて電気泳動後 nylon membrane にトランスファーし、紫外線で固定した。prehybridization 溶液 (0.18 M NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 1.0% SDS pH 7.4, 5 g/liter non-fat powdered milk, 0.01% sodium azide, 0.5 mg/ml salmon testis DNA) にて prehybridization 後、hybridization 溶液 (prehybridization 溶液 + <sup>32</sup>P-DHBV-DNA probe) で 68°C 12 時間 hybridization を行い、Kodak XAR-5 film で autoradiography を行った。

### 4. spot hybridization 法による培養上清中及び肝細胞内 DHBV-DNA の測定<sup>24</sup>

採取した培養上清 1 ml を 20% sucrose 4 ml に重層し、Beckman SW 50.1 ローターにて 50000 rpm 2 時間遠心して培養上清中の DHBV をペレットとした後、50  $\mu$ l の TE 溶液に再浮遊させ、この DHBV 溶液を nylon membrane に spot し、DNA を 0.4 N NaOH にて変性させた後、紫外線で固定した。以下 Southern blot hybridization と同様に prehybridization, hybridization 及び autoradiography を行い、film 上の spot を densitometer にて定量し、DHBV-DNA 量を求めた。一部肝細胞より抽出した DNA も spot し、肝細胞内の DHBV-DNA を定量した。

### 5. DHBV 陽性アヒル血清の調整

孵化後 1 日目のアヒルの腹腔内に DHBV 陽性血清を接種し、DHBV 持続感染アヒルを作製した。接種後 7 日目に心臓採血にてアヒル血清を採取し、spot hybridization 法により血清中の DHBV-DNA 量の測定を行い、DHBV 陽性血清をアヒル初代肝細胞への接種用血清とした。

### 6. アヒル血清中の DHBV 濃度の測定

DNA の一塩基の平均分子量は約 324 であり、DHBV は 3.0 kbp の二重鎖 DNA ウイルスであることより、DHBV 1 virion あたりの DHBV-DNA は約  $3 \times 10^{-6}$  pg と算出される。この結果と血清中の DHBV-DNA 量の測定値より、血清中の DHBV 濃度を求めた。

### 7. 薬剤

GL (ミノファーゲン製薬より供与) は Ca<sup>2+</sup>(-) Mg<sup>2+</sup>(-) phosphate buffered saline (PBS (-)) に溶解し、pH 7.4 に調整して用いた。

### 8. GL の肝細胞毒性実験

アヒル初代肝細胞作製 2 日後に、各種濃度の GL

を含む培養液 (0, 0.1, 1.0, 5.0, 10 mg/ml) に置換した。同濃度の GL を含む培養液にて 5 日間連日培養液交換を行った後、培養肝細胞を 0.01% EDTA, 0.16% trypsin 処理にて回収した。回収した培養細胞中の生存細胞数はトリパンブルーにて測定したが、GL 1.0 mg/ml 以下の添加群では、control と比較して生存細胞数に明かな差は認めなかった (Fig.1)。そこで GL 1.0 mg/ml 添加群については、GL を 9 日間添加した後の生存肝細胞数についても検討したが、control と差はなかった。これらのことより、GL は 1.0 mg/ml 以下の濃度では肝細胞毒性を認めないと考えられ、以下の実験は GL 1.0 mg/ml の濃度で行った。

### 9. DHBV の肝細胞への吸着侵入及び肝細胞内増殖に対する GL の影響 (実験 1)

実験 1 のスケジュールは Fig. 2A に示したごとくであり、DHBV 接種はアヒル初代肝細胞作製翌日より 24 時間行った。すなわち、DHBV 陽性血清を感染頻度約 1000 で培養液に加え、24 時間培養後に培養液を吸引し、PBS (-) で 3 回洗浄して未吸着のウイルスを取り除いた。GL は 1.0 mg/ml の濃度で、ウイルス接種開始時 (0 hr)、接種開始 6 時間後 (6 hrs)、12 時間後 (12 hrs)、及び接種終了時 (24 hrs) の各時間より培養液中に添加し、ウイルス接種後 9 日目に培養肝細胞を回収して、肝細胞 DNA を抽出した。各肝細胞 DNA 5  $\mu$ g を spot して肝細胞内の DHBV-DNA 量を定量し、同時に Southern blot

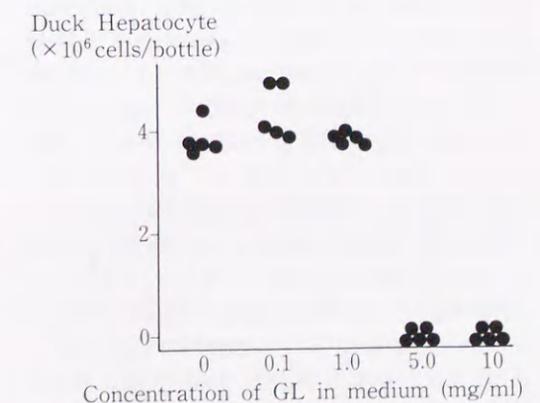
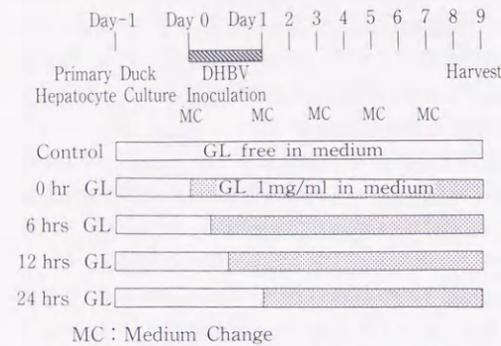


Fig. 1. Cytotoxicity of GL against duck hepatocytes in primary culture. Duck hepatocytes were exposed to various concentrations of GL in the maintenance medium for five days and then counted by the trypan blue dye exclusion method.



MC: Medium Change  
**Fig. 2A.** Experimental design. Duck hepatocytes were inoculated with DHBV-positive duck serum for 24 hrs. Duck hepatocytes were cultured with GL-free medium (control) or GL (1.0 mg/ml)-supplemented medium from the indicated times (0 hr GL~24 hrs GL) and then harvested nine days after inoculation.

hybridization を行い, GL (-) の培養液で培養した control と比較した。実験は duplicate で行った。

#### 10. 肝細胞からの DHBV 放出に対する GL の影響 (実験 2)

実験 2 は, 実験 1 と同様の方法で培養肝細胞に DHBV 接種を 24 時間行い, PBS (-) で洗浄後より連日 1.0 mg/ml の濃度の GL を含む培養液にて培養液を交換し, ウイルス接種後 9 日目の培養上清と培養肝細胞を採取した。そして培養上清中と肝細胞内の DHBV-DNA 量を測定し, 培養上清中の総 DHBV-DNA 量を肝細胞内の総 DHBV-DNA 量で割った値, すなわち肝細胞内の一定量ウイルスあたりの放出ウイルス量を GL (-) の培養液で培養した control と比較した。

#### 11. GL による肝細胞前処理実験 (実験 3)

アヒル初代肝細胞作製翌日より, 24 時間 GL を 1.0 mg/ml の濃度で培養液中に添加し, PBS (-) で洗浄後 GL (-) の培養液に置換して DHBV 接種を 24 時間行い, その後も GL (-) の培養液で培養し, ウイルス接種後 9 日目の肝細胞内の DHBV-DNA を GL で肝細胞を前処理していない control と比較した。

#### 12. GL の DHBV 不活性化実験 (実験 4)

実験 4 では, DHBV 陽性血清 (約  $10^{10}$  virion/ml) に GL を最終濃度が 1.0 及び 10 mg/ml になるように試験管内で加え (control は PBS (-) を添加), 37 °C で 1 時間インキュベートした後, 培養肝細胞に接種

した。尚 GL 10 mg/ml 群では, ウイルス接種時に培養液中の GL 濃度は希釈されて 0.3 mg/ml になるため, control と GL 1.0 mg/ml 群にも, ウイルス接種時に培養液中の GL 濃度が 0.3 mg/ml になるように GL を調節し添加した。ウイルス接種後 24 時間目に培養肝細胞を PBS (-) で洗浄し, その後は各群とも GL (-) の培養液で培養し, ウイルス接種後 9 日目の肝細胞内の DHBV-DNA を比較した。

#### 13. 培養液中の GL 濃度の測定 (実験 5)

アヒル初代肝細胞作製 2 日後より, 0.09 と 0.80 mg/ml の濃度の GL を含む培養液に置換し, 置換時より 48 時間後まで経時的に培養液を採取し, 採取した培養液中の GL 濃度を測定<sup>22)</sup> した。

#### 14. DHBV-DNA polymerase 活性に対する GL の影響 (実験 6)

DHBV 陽性血清を超遠心により濃縮して得た DHBV 溶液に, GL を最終濃度がそれぞれ 0.01, 0.1, 1.0 mg/ml になるように添加して, DHBV-DNA polymerase (DHBV-DNA-P) 活性を測定し, 試験管内での DHBV-DNA-P 活性に対する GL の影響を control と比較した。この DHBV-DNA-P 活性の測定には <sup>3</sup>H-dTT を使用し, Kaplan らの方法<sup>15, 16)</sup> に準じた。

#### 15. 統計学的解析

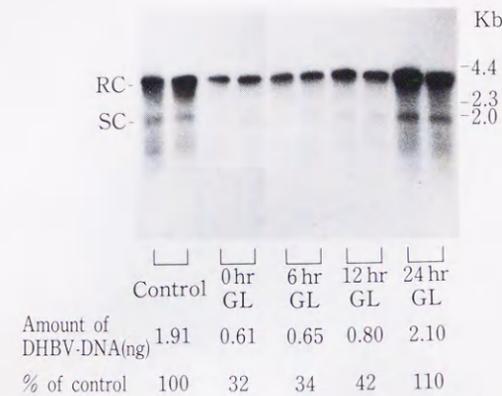
成績の統計学的解析は, 二群間の比較に対し Mann-Whitney 検定を用い,  $p < 0.05$  以下を有意差ありとした。

### 成 績

#### 1. DHBV の肝細胞への吸着侵入及び肝細胞内増殖に対する GL の影響 (実験 1)

ウイルス接種後 9 日目の Southern blot 法による各群の肝細胞内 DHBV-DNA 解析と DHBV-DNA 量の平均値を Fig. 2B に示した。

各群の DHBV-DNA 量を control と比較すると, ウイルス接種時 (0 hr~12 hrs) から GL を添加した群の肝細胞内の DHBV 増殖は 32~42% に抑制され, その内でも早期より GL を添加した群において抑制が強い傾向を認めた。しかし, 接種終了時 (24 hrs) から GL を添加した群では, DHBV は control と同程度に増殖し, GL による DHBV 増殖抑制は認めなかった。また Southern blot 法による解析において, control 群では DHBV-DNA の肝細胞内での種々の存在様式, すなわち 3.7 kb のバンドである relaxed circular double stranded DNA とそれ以下のスメアである partially double stranded DNA, 2.0 kb



**Fig. 2B.** Southern blot analysis of DHBV-DNA and amount of DHBV-DNA in duck hepatocytes. DHBV-DNA in 5  $\mu$ g of total DNA were measured by spot hybridization. The amount of DHBV-DNA was expressed as the average value for each group. RC: relaxed circular double stranded DNA, SC: supercoiled DNA.

のバンドである supercoiled DNA, 1.4 kb 以下のスメアである single stranded DNA を認めたが, control と GL 添加群の DNA 泳動パターンには変化がなく, DHBV-DNA の合成過程には差がなかった。

次にウイルス接種開始時 (0 hr) より培養液中に各種濃度の GL を 9 日間添加した後, 肝細胞 DNA を抽出し, 肝細胞 DNA 5  $\mu$ g あたりの DHBV-DNA 量を測定して control と比較した (Fig. 3)。DHBV に対する GL の 50% inhibitory dose ( $ID_{50}$ ) は, 0.46 mg/ml であった。

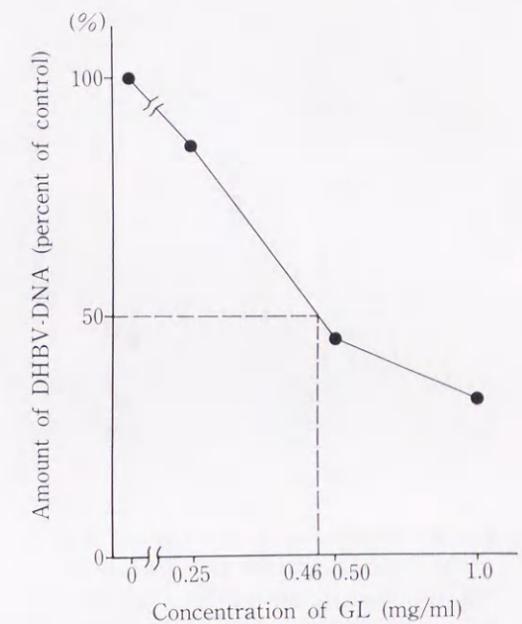
#### 2. 肝細胞からの DHBV 放出に対する GL の影響 (実験 2)

肝細胞への DHBV 接種終了時より GL (1.0 mg/ml) を培養液に持続的に添加して, ウイルス接種後 9 日目の肝細胞内の一定量ウイルスあたりの放出ウイルス量を control と比較した (Fig. 4)。

control は  $0.206 \pm 0.021$  (Mean  $\pm$  SD), GL 添加群は  $0.063 \pm 0.037$  であり, GL 添加群の肝細胞から放出されたウイルス量は, control に比し有意に低値であった ( $p < 0.01$ )。

#### 3. GL による肝細胞前処理実験 (実験 3)

GL で肝細胞の前処理を行い, DHBV 接種後 9 日目の肝細胞内 DHBV-DNA を Southern blot 法により検出し, control と比較した (Fig. 5)。GL 前処理群の DHBV は control と同程度に増殖し, 差を認め



**Fig. 3.** Inhibitory effect of GL on DHBV. From the beginning of DHBV inoculation, duck hepatocytes were cultured with GL (0.25, 0.50, 1.0 mg/ml)-supplemented medium for nine days and then harvested. DHBV-DNA in 5  $\mu$ g of total DNA was measured by spot hybridization. Experiments were carried out in triplicate.

なかった。

#### 4. GL の DHBV 不活性化実験 (実験 4)

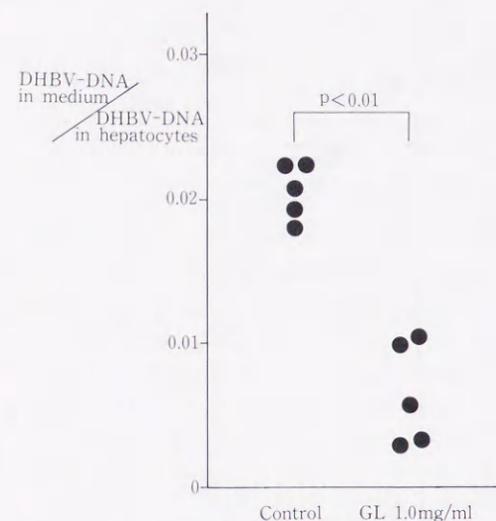
GL でウイルス粒子の前処理を行い, 接種後 9 日目の肝細胞内 DHBV-DNA を Southern blot 法により検出した (Fig. 6)。DHBV は GL 1.0, 10 mg/ml 群ともに control と同程度に増殖し, 差を認めなかった。

#### 5. 培養液中の GL 濃度の検討 (実験 5)

GL 0.09, 0.80 mg/ml 添加群とも培養液中の GL 濃度は経時的にあまり変化なく, 高濃度状態が持続した (Fig. 7)。

#### 6. DHBV-DNA-P 活性に対する GL の影響 (実験 6)

*in vitro* での GL の DHBV-DNA-P 活性に対する直接的な影響を検討したが, DHBV-DNA-P 活性値は, GL を 0.01~1.0 mg/ml の各種濃度で添加したすべての群とも control と比較して差はなかった (Fig. 8)。

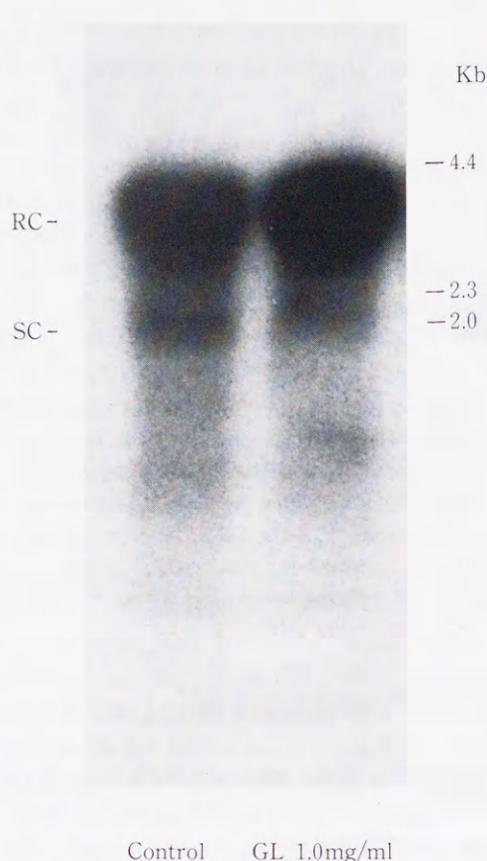


**Fig. 4.** Suppression of the release of DHBV by GL. The ratio of DHBV-DNA released into the medium to DHBV-DNA in duck hepatocytes was measured on the ninth day after inoculation.

### 考 察

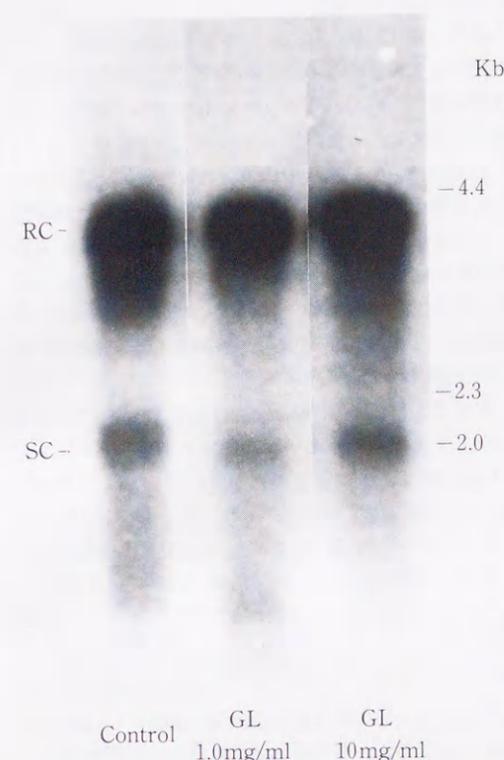
近年、B型慢性肝炎に対する治療薬剤は多く開発されているが、これら薬剤の抗ウイルス作用を検定する *in vivo* の実験は、主に HBV と同じヘパドナウイルス科に属する DHBV と、その宿主であるアヒルを用いた感染実験系を使用して行われている。一方、同様の検討を行う肝細胞培養系としては、ヒト肝癌培養細胞株 (HepG2) へのクローン化 HBV-DNA の導入 (transfection) による HBV の肝細胞内合成と培養液中への放出実験系<sup>26,31)</sup> と、DHBV とアヒル初代肝細胞を用いた感染実験系がある。前者の実験系は、ヒト肝癌細胞を使用しているため、ヒトインターフェロン等の種特異性を有する薬剤についての肝細胞内でのウイルス合成に対する抗ウイルス作用を検討<sup>19)</sup> できる利点があるが、クローン化 HBV-DNA を化学操作により肝細胞内に導入するため、HBV の肝細胞への吸着侵入に対する解析はできない。それに対し、後者の実験系は DHBV を用いているが、ウイルスのライフサイクルであるウイルスの肝細胞への吸着侵入、肝細胞内でのウイルス合成、および培養液中へのウイルス放出が解析できる利点がある。

現在 B 型慢性肝炎に対する治療としては、抗ウイルス作用を持つ薬剤であるインターフェロンや adenine



**Fig. 5.** Pretreatment of duck hepatocytes with GL. Duck hepatocytes were pretreated with GL (1.0 mg/ml)-supplemented medium for 24 hrs before inoculation of DHBV. From the start of inoculation, duck hepatocytes were cultured with GL-free medium for nine days and then harvested. DHBV-DNA in duck hepatocytes were detected by Southern blot analysis.

arabioside (Are-A) などが臨床応用されているものの、その効果は必ずしも充分ではない。また GL を主成分とする SNMC も臨床で多用されているが、SNMC 投与の主な目的としては、鈴木ら<sup>32)</sup> が明らかにしたように、トランスアミナーゼ改善を期待しての使用である。この GL のトランスアミナーゼ改善の機序としては、本薬剤のステロイド様作用<sup>18)</sup>、肝細胞膜安定化作用<sup>23,27)</sup>、natural killer 活性の増強作用<sup>21)</sup> などが示唆されているが、著者は、GL の HBV に対する抗ウイルス作用を検討する目的で、DHBV を用

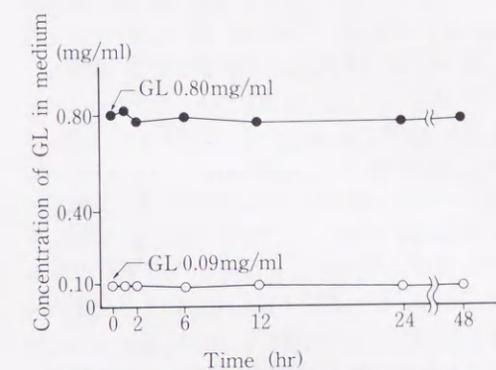


**Fig. 6.** Inactivation of DHBV with GL. DHBV were pretreated with GL at various concentrations for 1 hr at 37 °C before inoculation. From the beginning of DHBV inoculation, duck hepatocytes were cultured with GL-free medium for nine days and then harvested. DHBV-DNA in duck hepatocytes were detected by Southern blot analysis.

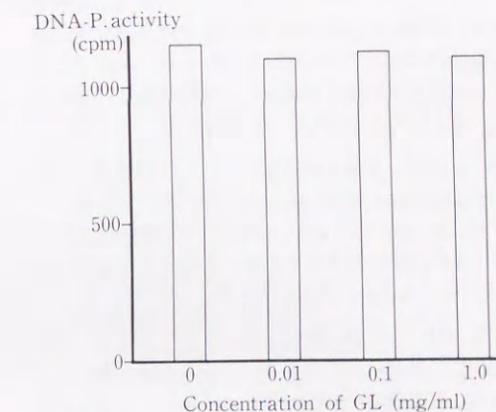
いてアヒル初代肝細胞における感染実験を行った。

GL は DHBV 接種開始時から添加すると DHBV 増殖を抑制したが、接種終了時よりの添加ではウイルス増殖を抑制しなかった。このことより、GL は DHBV の感染初期段階、すなわち肝細胞への吸着侵入を抑制するが、その後の肝細胞内でのウイルス核酸合成は抑制しないと考えられた。また GL は肝細胞内の一定量 DHBV あたりの放出 DHBV 量を抑制したことより、GL は肝細胞からの DHBV の放出も抑制していると考えられた。しかし GL には DHBV 粒子の不活性化作用はなかった。

馬場ら<sup>3)</sup> は、培養細胞感染実験において GL が水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV) に対して抗ウイルス作用を認め、GL の VZV に対する ID<sub>50</sub> は 0.55



**Fig. 7.** Concentration of GL in the medium of duck hepatocyte primary culture.



**Fig. 8.** Inhibitory effect of GL on DHBV-DNA polymerase activity. Experiments were carried out in triplicate.

mg/ml であり、この GL の VZV 抑制作用機序として VZV のヒト胎児繊維芽細胞への侵入脱殻と細胞からの VZV 放出の抑制が示唆されたことと報告しており、DHBV と VZV に対する GL のウイルス抑制作用は類似した機序によるものと考えられた。この GL の DHBV 吸着侵入に対する抑制の機序は明らかではないが、DHBV を GL で前処理してもウイルス不活化作用は認められず、また培養肝細胞をウイルス接種前に GL で前処理し、ウイルス接種開始時より GL を含まない培養液で培養しても DHBV の吸着侵入は抑制されなかったことより、DHBV の吸着侵入抑制には、吸着侵入時に GL が存在することが必要であると考えられた。伊藤ら<sup>13,14)</sup> は、MT-4 細胞への human immunodeficiency virus (HIV) 感染実験に

対する GL の抗ウイルス作用を plaque forming assay 法にて検討したところ, GL は HIV による plaque 形成を 0.5 mg/ml の濃度で完全に抑制し, GL の ID<sub>50</sub> は 0.125 mg/ml であったと報告している。また MOLT-4 細胞を用いた実験より, HIV に対する GL の抗ウイルス作用機序として, HIV がレセプターである細胞の CD4 と結合すると, 細胞の proteinkinase C によって CD4 がリン酸化され, その結果 HIV が細胞内に侵入する<sup>3)</sup>が, GL はこの proteinkinase C を抑制するために HIV の細胞内への侵入を抑制していると考察している。

このように GL は, DNA 型ウイルス (DHBV, VZV) のみならず RNA 型ウイルス (HIV) に対しても抗ウイルス作用を認めた。それぞれのウイルスに対する GL の ID<sub>50</sub> は, HIV に対してのみやや低濃度であるが, GL の抗ウイルス作用がウイルスの細胞への感染段階に対する抑制であることは共通である。これらのウイルスはすべてエンベロープを有することより, GL は DHBV の細胞への感染段階でウイルスのエンベロープのレセプターに作用してウイルスの吸着侵入を抑制, もしくは HIV と同様に細胞側のレセプターに作用して抑制している可能性が考えられる。また GL は前述した VZV と同様に DHBV に対してもウイルス放出抑制作用を認め, 興味ある現象と考えられたが, その機序は不明である。

一方, GL には *in vivo* においてインターフェロン誘起能があるといわれている<sup>1,7)</sup>が, 今回の実験における GL の DHBV 抑制機序とインターフェロンの抗ウイルス作用の機序は明かに異なることから, 今回の GL の抗ウイルス作用は, インターフェロンの誘導によるものではないと考えられた。

DHBV 核酸の肝細胞内での合成過程は, 肝細胞に感染した DHBV の genome が supercoiled DNA となり, それを鋳型として pregenome RNA が作られ, 次に逆転写酵素によりマイナス鎖 single stranded DNA ができた後, DNA polymerase により partially double stranded DNA になると考えられている<sup>29)</sup>。ウイルス核酸合成を阻害する抗ウイルス剤には, actinomycin D などの RNA 転写阻害剤, HIV 感染症の治療薬である 3'-azido-2', 3'-dideoxythymidine (AZT) などの逆転写酵素阻害剤, Ara-A などの DNA polymerase 阻害剤などがあるが, 今回の実験で GL は肝細胞内の DHBV 核酸合成を抑制しておらず, GL には上記のような肝細胞内でのウイルス核酸合成過程に対する阻害作用はないと考えられた。実際に GL による DHBV-DNA-P 阻害作用の有無につい

ては確認のための検討を行ったが, GL は 1.0 mg/ml の濃度でも DHBV-DNA-P 活性を阻害しなかった。また GL には HIV の逆転写酵素反応に対しても阻害作用はないといわれており<sup>13)</sup>, このことは著者らの結果と一致する。

しかしながら, この DHBV に対する GL の抗ウイルス効果は, GL 1.0 mg/ml の濃度でも肝細胞へのウイルス感染は完全には抑制できておらず, ウイルス感染防御という点からみると不完全であるといえる。このことは, *in vivo* での DHBV の感染実験において GL には感染予防効果はなかったという高野らの報告<sup>34)</sup>を裏付ける結果である。

臨床における B 型慢性肝炎の治療として, SNMC が広く使用されているが, 投与量は通常 40 ml (GL 80 mg)/日で, この量での無効例に対しては 100 ml/日の大量投与が行われている。ヒトに SNMC を 100 ml 静注すると, 投与直後の血中 GL 濃度は約 0.04 mg/ml であり, その後代謝され経時的に低下する<sup>10)</sup>。それに対し, 今回の実験で示したように, 培養液中の GL はほとんど代謝されず, 添加時の GL 濃度を保った状態での DHBV に対する GL の ID<sub>50</sub> が 0.46 mg/ml と高濃度であり, 0.25 mg/ml の濃度の GL では DHBV 増殖抑制効果はほとんど認められなかった。以上のことを直接 HBV 感染症にあてはめることは個々の患者の血中ウイルス量が一定でないため難しいが, 今回の実験結果は, 現在臨床で使用されている SNMC 量では HBV の肝細胞への感染を完全には防御できない可能性を示唆している。また SNMC の 100 ml 大量投与を行い, 各種 HBV 因子に対する SNMC の影響を検討した報告でも, 横須賀ら<sup>37)</sup>は SNMC は HBV に対してステロイド様作用を示し, ウイルスの増殖を助長すると述べ, 日野<sup>8,9)</sup>は SNMC 投与中の HBV マーカーの推移は natural course に近い変動であると述べており, 両報告とも GL は抗ウイルス的には働いていないことを示唆している。これらのことより, B 型慢性肝炎に対して臨床で使用されている GL 量では, 血中のウイルスの肝細胞への感染と肝細胞からの放出の抑制は軽微なものであり, GL のトランスアミナーゼ改善の機序としては, 直接的な抗ウイルス作用よりも, 前述したステロイド様作用や肝細胞膜安定化作用などが重要であると考えられた。

本論文の要旨は, 第26回日本肝臓学会総会 (1990年6月, 東京) において発表した。

## 謝 辞

稿を終わるに臨み, 終始懇切なる御指導, 御校閲を賜った恩師・梶山梧朗教授, 広島大学医学部細菌学教室・吉田哲也教授に深甚なる謝意を表します。また直接御指導を賜った広島大学医学部附属病院放射線部・中西敏夫講師, 広島大学医学部第一内科学教室・吉川正哉博士, DHBV 陽性アヒル血清を供与していただいた島根医科大学第2内科・島田宜浩前教授, 及び GL 濃度を測定していただいた富山医科薬科大学・矢野三郎教授に深く感謝の意を表します。また終始御協力を頂いた広島大学医学部第一内科学教室の諸兄に心より感謝致します。

## 参 考 文 献

1. Abe, N., Ebina, T. and Ishida, N. 1982. Interferon induction by glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in mice. *Microbiol. Immunol.* 26: 535-539.
2. 荒井澄夫, 栗田口敏一 1981. ヒトNK細胞の活性因子, p. 221-240. 水野, 武谷, 石田 (編), 続生体防御の機構. 東京大学出版会.
3. Baba, M. and Shigeta, S. 1987. Antiviral activity of glycyrrhizin against varicella-zoster virus *in vitro*. *Antiviral Res.* 7:99-107.
4. Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132:6-13.
5. Fields, A. P., Bednarik, D. P., Hess, A. and May, W. S. 1988. Human immunodeficiency virus induces phosphorylation of its cell surface receptor. *Nature* 333:278-280.
6. Gust, I. D., Burrell, C. J., Coulepis, A. G., Robinson, W. S. and Zuckerman, A. J. 1986. Taxonomic classification of human hepatitis B virus. *Intervirology* 25:14-29.
7. 林 芳郎, 中田勝彦, 麻生 久, 鈴木富士夫, 石田名香雄 1979. グリチルリチン製剤のインターフェロン誘起作用. *薬理と治療* 7:3861-3864.
8. 日野邦彦 1983. 肝疾患の治療—最近の動向, Glycyrrhizin 剤による治療. *医学と薬学* 9:739-747.
9. 日野邦彦 1986. B 型慢性肝炎の治療, SNMC. *肝胆膵* 13:553-560.
10. 日野邦彦, 宮川 浩, 藤岡高弘, 丹羽寛文 1987. 慢性肝炎, グリチルリチン. *治療学* 19:204-208.
11. 日野邦彦, 宮川 浩, 高橋 淳, 熊田博光, 池田健次, 吉場 朗, 太田康幸, 鈴木 宏 1986. 慢性活動性肝炎の肝組織に及ぼす強力ネオミノファーゲンシー (SNMC) 大量療法の効果. *肝胆膵* 13:797-807.
12. 日野邦彦, 宮原 透, 宮川 浩, 藤倉 寛, 岩崎政明, 高橋 淳 1981. 慢性肝疾患に対する強力ネオミノファーゲンCの大量 (100 ml) 療法. *肝胆膵* 3:137-146.
13. Ito, M., Nakashima, H., Baba, M., Pauwels, R., Clercq, E. D., Shigeta, S. and Yamamoto, N. 1987. Inhibitory effect of glycyrrhizin on the *in vitro* infectivity and cytopathic activity of the human immunodeficiency virus [HIV (HTLV III/LAV)]. *Antiviral Res.* 7:127-137.
14. Ito, M., Sato, A., Hirabayashi, K., Tanabe, F., Shigeta, S., Baba, M., Clercq, E. D., Nakashima, H. and Yamamoto, N. 1988. Mechanism of inhibitory effect of glycyrrhizin on replication of human immunodeficiency virus (HIV). *Antiviral Res.* 10:289-298.
15. Kaplan, P. M., Greenman, R. L., Gerin, J. L., Purcell, R. H. and Robinson, W. S. 1973. DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J. Virol.* 12:995-1005.
16. 吉川正哉 1986. B 型慢性肝疾患における HBV specific DNA polymerase 活性に関する臨床的研究. *広島大学医学雑誌* 34:881-899.
17. 熊田博光, 吉田行哉, 池田健次, 小宅映士, 吉場朗, 遠藤雄三, 新田恭子, 藤沢さくえ, 瀬戸幸子, 塚田理康 1982. 慢性肝炎における血清トランスアミナーゼおよび肝生検組織像からみたグリチルリチン製剤の効果の比較検討. *肝胆膵* 4:457-462.
18. Kumagai, A., Yano, S., Otomo, M. and Takeuchi, K. 1957. Study on the corticoid-like action of glycyrrhizin and the mechanism of its action. *Endocrinol. Jap.* 4:17-27.
19. Lampertico, P., Malter, J. S. and Gerber, M. A. 1991. Development and application of an *in vitro* model for screening anti-hepatitis B virus therapeutics. *Hepatology* 13:422-426.
20. Marion, P. L., Oshiro, L. S., Regnery, D. C., Scullard, G. H. and Robinson, W. S. 1980. A virus in beechey ground squirrels that is related hepatitis B virus of humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2947-2944.
21. Mason, W., Seal, G. and Summers, J. 1980. Virus of ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J. Virol.* 36:829-836.
22. 中野直子, 加藤弘巳, 鈴木英彦, 中尾完英, 矢野三郎, 金岡又雄 1980. グリチルリチン酸および

- グリチルリチンの酵素免疫測定法 (第1報・第2報). 薬理と治療 8:4167-4173.
23. 沖田 極, 野田健一, 近藤信夫, 水田 実 1975. 肝疾患治療薬の作用に関する基礎的検討 (I) Glycyrrhizin の D-galactosamine 肝障害に対する作用. 肝臓 9:620-628.
  24. **Scotto, J., Hadchouel, M., Hery, C., Yvart, J., Tiollais, P. and Brechot, C.** 1983. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by a simple spot hybridization technique: comparison with results for other viral markers. Hepatology 3:279-284.
  25. **Seglen, P. O.** 1975. Preparation of isolated rat liver cells. Meth. Cell Biol. 13:29-83.
  26. **Sells, M. A., Chen, M. and Acs, G.** 1987. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:1005-1009.
  27. 志気保子, 白井厚治, 斉藤 康, 吉田 尚, 若新政史, 熊谷 朗 1984. 遊離肝細胞からのトランスアミナーゼ遊出に及ぼすグリチルリチンの影響. 和漢医薬学会誌 1:11-14.
  28. **Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503-517.
  29. **Summers, J. and Mason, W. S.** 1982. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. Cell 29:403-415.
  30. **Summers, J., Smolec, J. M. and Snyder, R.** 1978. A virus similar to hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:4533-4537.
  31. **Sureau, C., Romet-Lemonne, J., Mullins, J. I. and Essex, M.** 1986. Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA. Cell 47:37-47.
  32. 鈴木 宏, 太田康幸, 滝野辰郎, 藤沢 洵, 平山千里, 清水直容, 麻生芳郎 1977. 強力ネオミノファーゲンCの慢性肝炎に対する治療効果について—二重盲検法による検討—. 医学のあゆみ 102:562-578.
  33. **Suzuki, S., Lee, B., Luo, W., Tovell, D., Robins, M. J. and Tyrrell, D. L. J.** 1988. Inhibition of duck hepatitis B virus replication by purine 2', 3'-dideoxynucleosides. Bioch. Bioph. Res. Com. 156:1144-1151.
  34. 高野 進, 小俣政男, 奥田邦雄, 大藤正雄 1989. Hepadna ウイルス感染成立に及ぼすウイルス (DHBV) 投与量, 時期, およびグリチルリチン投与の影響. 肝臓 30:723-726.
  35. **Tuttleman, J. S., Pugh, J. C. and Summers, J. W.** 1986. *In vitro* experimental infection of primary duck hepatocyte cultures with duck hepatitis B virus. J. Virol. 58:17-25.
  36. **Uchida, T., Suzuki, K., Okuda, Y. and Shikata, T.** 1988. *In vitro* transmission of duck hepatitis B virus to primary duck hepatocyte culture. Hepatology 8:760-765.
  37. 横須賀収, 小俣政男, 伊藤よしみ, 内海勝夫, 森順子, 奥田邦雄 1982. Glycyrrhizin 大量投与におけるB型肝炎ウイルス因子の検討. 肝臓 23:750-759.

## Antiviral Effect of Glycyrrhizin on Duck Hepatitis B Virus —Effect in Duck Hepatocyte Primary Culture—

Tohru TAMURA

The First Department of Internal Medicine, Hiroshima University School of Medicine  
(Director: Prof. Goro KAJIYAMA)

The antiviral effect of glycyrrhizin (GL) on duck hepatitis B virus (DHBV) which belongs to the hepadna virus family as well as human hepatitis B virus (HBV) was studied in duck hepatocyte primary culture. The cultured duck hepatocytes were inoculated with DHBV for 24 hrs. On the ninth day after inoculation, DHBV-DNA in the hepatocytes and the medium were analyzed using DHBV-DNA probe.

GL showed an antiviral effect on DHBV at a concentration of 1.0 mg/ml without cytotoxicity against the hepatocytes. The 50% inhibitory dose (ID<sub>50</sub>) of GL was 0.46 mg/ml. As for the mechanism of the antiviral effect of GL, the present results suggested that GL has inhibitory effects on the absorption, penetration and release of virus particles, but does not inhibit virus replication in the hepatocytes nor directly inactivate the virus particles.

The antiviral effect of GL on DHBV proved to be weak at a concentration of 0.25 mg/ml. This result leads to the conclusion that the anti-HBV effect of GL is very weak or negligible at the serum concentration of GL (<0.04 mg/ml), which has been usual clinical dose in patients with hepatitis.