

## 論 文 内 容 要 旨

Effects of Traditional Kampo Drugs and Their Constituent Crude Drugs on Influenza Virus Replication *In Vitro*: Suppression of Viral Protein Synthesis by Glycyrrhizae Radix

(漢方薬とそれを構成する生薬のインフルエンザウイルス増殖に対する影響：カンゾウによるウイルス蛋白質合成抑制)

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2019, in press.

主指導教員：坂口 剛正 教授

(医系科学研究科 ウイルス学)

副指導教員：大毛 宏喜 教授

(広島大学病院 感染症学)

副指導教員：菅井 基行 客員教授

(国立感染症研究所 薬剤耐性学)

野村 俊仁

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

季節性インフルエンザの流行は高齢者では死亡に至ることがあり、小児で集中治療を要することもある。また、新型インフルエンザの出現に伴う大流行も危惧される。いくつかの抗インフルエンザウイルス薬が使用されているが、耐性ウイルスの出現などの問題もあり、新規の抗ウイルス薬の開発は、続けていかなくてはならない重要な課題である。

麻黄湯はインフルエンザ患者に対して適応があり、抗ウイルス作用が報告されている。しかし他の漢方薬に関する報告は限られている。本研究では呼吸器症状を呈する際に処方される漢方薬と、それを構成する生薬による抗ウイルス作用を検討した。

漢方薬は葛根湯、麻黄湯、慈陰降火湯、川芎茶調散、麦門冬湯の5種類をツムラより購入した。生薬に関してもカンゾウ、ソウジュツ、ジオウ、チンピ、センキュウ、ボウフウをツムラより購入した。これらの試薬は50°C、60分間、Dulbecco's modified Eagle's mediumに溶解し、不溶性物質を除去したうえで、0.22 µmフィルターで濾過した。この試薬を、インフルエンザウイルス A/Udorn/72(H3N2)のMDCK細胞への感染実験において使用してウイルス増殖への影響を検討した。

はじめに漢方薬および生薬の細胞傷害性を検討した。MDCK細胞を、試薬濃度を調整した細胞維持液中で24時間培養し、その細胞からの逸脱酵素LDHを測定した。漢方薬では、川芎茶調散および麦門冬湯でそれぞれ24.5, 21.9 mg/mlの濃度で細胞傷害性を認めたが他の漢方薬では認めなかった。生薬では、カンゾウで12.5 mg/mlの濃度で細胞傷害性を認めたが、他の生薬では認めなかった。以降の試験は、細胞傷害性の認められなかった試薬濃度で実験を行った。

臨床において使用される葛根湯、麻黄湯、慈陰降火湯、川芎茶調散、麦門冬湯の5種類の漢方薬について検討した。インフルエンザウイルスをMDCK細胞にm.o.i. = 5あるいは0.2の条件で1時間感染させて、その後、ウイルス液を、濃度調整した試薬入り細胞維持液と交換した。感染24時間後の培養上清を採取し、その中のウイルス量をHemagglutinin (HA) 試験とTCID<sub>50</sub>法で定量した。その結果、m.o.i. = 5では麻黄湯で濃度依存性に抗ウイルス作用を認めた。葛根湯と川芎茶調散も高濃度では抗ウイルス作用を認めた。m.o.i. = 0.2では麦門冬湯以外で、3 mg/ml以上の濃度において抗ウイルス作用を認め、葛根湯、麻黄湯、慈陰降火湯、川芎茶調散、麦門冬湯の50%阻害濃度は0.34, 0.82, 0.46, 0.71, 3.7 mg/mlであった。麻黄湯では蛋白質合成阻害などウイルス感染細胞に対する作用が、慈陰降火湯ではウイルスの出芽抑制など細胞間伝播への作用が考えられた。葛根湯と川芎茶調散に関しては両方の機序による抗ウイルス作用の可能性がある。どの漢方薬でもウイルス粒子に対する直接不活化作用は認めなかった。

抗ウイルス作用のみられた4種類の漢方薬に含まれる生薬を調べて、入手が可能であった生薬から、すでに報告のある麻黄は除いて、13種類の生薬を検討した。m.o.i. = 5で行った感染実験ではカンゾウ（甘草）でのみ強い抗ウイルス作用を認めた。また、m.o.i. = 0.2の感染実験ではカンゾウの50%阻害濃度は0.27 mg/mlと低値であった。ほかのセンキュウ、チンピ、ジオウ、ソウジュツでは、それぞれ0.78, 0.89, 1.1, 2.1 mg/mlであった。

カンゾウとセンキュウについては蛋白質合成阻害作用も検討した。インフルエンザウイルスを MDCK 細胞に m.o.i. = 5.0 で感染させ、1 時間後に試薬濃度を調整した維持液と交換した。感染 7 時間後に <sup>35</sup>S-システイン・メチオニンで 20 分間パルス標識して蛋白質合成を評価した。その結果、カンゾウでのみウイルス蛋白質特異的な合成阻害作用を認めた。

今回検討した 5 種類の漢方薬のうち、4 種類で培養細胞レベルでの抗ウイルス作用を認め、麻黄湯の作用が最も良好であった。含まれている麻黄による抗ウイルス作用は既に報告されているが、麻黄を含まない漢方薬でも抗ウイルス作用を確認できた。効果のあった漢方薬に含まれる生薬の中では、カンゾウによる抗ウイルス作用が最も良好であった。カンゾウは本研究で用いた 5 種類の漢方薬の全てに含まれており、漢方薬の抗インフルエンザウイルス作用と関連している可能性がある。一方、抗ウイルス作用の弱かった麦門冬湯にも含まれており、他の成分との混合により作用が影響を受けたことも考えられた。カンゾウはウイルス蛋白質合成を選択的に抑制しており、ウイルス特有の生合成を阻害している可能性がある。今後、このメカニズムの研究を行っていきたい。