

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士(医学)	氏名	野村 俊仁
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 Effects of Traditional Kampo Drugs and Their Constituent Crude Drugs on Influenza Virus Replication <i>In Vitro</i> : 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)			
論文審査担当者			
主査教授	酒井規雄	印	
審査委員教授	志馬伸朗		
審査委員講師	岩本博志		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>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。本研究において申請者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。</p> <p>申請者は、漢方薬の葛根湯、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、ポ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/Udm/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。</p> <p>申請者は、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の高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。</p> <p>次に申請者は、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時間吸着させて、その後、ウイルス接種液を、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</p>			

Hemagglutinin (HA) 試験と TCID50 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%阻害濃度はそれぞれ 0.34, 0.82, 0.46, 0.71, 3.7mg/ml であった。麻黄湯では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と考えられた。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。

申請者はさらに抗ウイルス作用のみられた 4 種類の漢方薬のうち、研究が進んでいる麻黄湯と葛根湯を除く慈陰降火湯、川芎茶調散に含まれる生薬のうち、入手可能であった 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。他のセンキュウ、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。

また申請者は、カンゾウとセンキュウについて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。

今回申請者が検討した 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。含まれているマオウによる抗ウイルス作用は既に報告されているが、マオウ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過程を阻害している可能性がある。

以上の結果から、本論文は呼吸器症状に対して臨床で処方されている漢方薬および生薬のインフルエンザウイルスに対する作用を検討し、広く漢方薬に含まれる生薬のカンゾウが、ウイルス蛋白質に特異的な蛋白質合成抑制活性をもつことを明らかにし、漢方薬のインフルエンザウイルスに対する作用機構の一端を明らかにした点で高く評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が野村俊仁氏に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。