

別記様式第 6 号（第 16 条第 3 項，第 25 条第 3 項関係）

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	柿本 聖樹
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目			
<p><i>In vitro</i> Suppression of SARS-CoV-2 Infection by Existing Kampo Formulas and Crude Constituent Drugs Used for Treatment of Common Cold Respiratory Symptoms</p> <p>（感冒での呼吸器症状の治療に使用される既存漢方薬やそれを構成する生薬による <i>in vitro</i> での SARS-CoV-2 ウイルス抑制効果の検証）</p>			
論文審査担当者			
主査	教授	服部 登	印
審査委員	教授	志馬 伸朗	
審査委員	准教授	入江 崇	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>COVID-19 の治療薬として中和抗体薬や抗ウイルス薬が開発されているが、COVID-19 は未だ収束には至っていない。新規に薬事承認をされた治療薬の問題点としては、副作用への懸念、薬価が高い点などが挙げられ、更に重症化リスクのない軽症患者へは適応外とされている。そのため、従来から汎用性が高い既存薬を、COVID-19 の新たな治療選択肢として検証することは重要な課題である。COVID-19 と同様にウイルス性の呼吸器感染症であるインフルエンザウイルス感染症や感冒に対しては、漢方薬が処方されることがあり、麻黄湯がインフルエンザウイルス感染症に対する有病期間を短縮することや、麻黄湯を構成する生薬のマオウにはインフルエンザウイルスに対して抗ウイルス効果を示すことが報告されている。</p> <p>そこで申請者は、漢方薬が呼吸器感染症に対して使用経験が豊富かつ、比較的安価であることに着目し、感冒時に処方される漢方薬と、それらを構成する生薬の SARS-CoV-2 抗ウイルス作用を検討した。</p> <p>申請者は、感冒時に使用される漢方薬として、麻黄湯、柴胡桂枝湯、葛根湯、升麻葛根湯、小青竜湯、川芎茶調散、麦門冬湯、補中益気湯の 8 種類の処方エキス末を、生薬としてマオウ、カンゾウ、オウゴン、シャクヤク、サイコ、センキュウの 6 種類の生薬単味エキス末を用いて検討を行った。試薬の調製として 50℃、1 時間、Dulbecco's modified Eagle's medium に溶解した後、遠心分離により不溶性物質を除去し、0.22 μm フィルターで濾過した。この試薬を SARS-CoV-2/JP/Hiroshima-46059T/2020 の TMPRSS2 発現 Vero 細胞への感染実験に使用することで、抗ウイルス作用を検証した。申請者はまず、抗ウイルス作用の検討に使用する試薬濃度を検討するため、漢方薬と生薬の細胞傷害性を評価し</p>			

た。TMPRSS2 発現 Vero 細胞を、試薬濃度を調整した細胞維持液で 24 時間培養し、その細胞から培地中に放出された乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を測定した。漢方薬では麻黄湯、柴胡桂枝湯、葛根湯、升麻葛根湯に 20 mg/ml の高濃度で 30%以上の細胞傷害性を認めたが、10 mg/ml 以下の濃度では全ての漢方薬で細胞傷害性を認めなかった。生薬では、オウゴン及びサイコでそれぞれ、5 mg/ml、10 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。これらの結果から、試薬が細胞傷害性を認めない濃度を選択し、以下の実験を実施した。

8 種類の漢方薬について抗ウイルス作用を検討するため、SARS-CoV-2 を TMPRSS2 発現 Vero 細胞に m. o. i. 0.05 の条件で 2 時間吸着させ、上清を除去後に、濃度を調整した試薬入りの細胞維持液と交換した。24 時間後の培養上清を採取し、TCID₅₀ 法でウイルス量を定量した。申請者は定量結果から 50%阻害濃度を算出したところ、麻黄湯に最も良好な抗ウイルス作用が認められた。一方で、麦門冬湯と補中益気湯は抗ウイルス作用を示さなかった。また、全ての漢方薬についてウイルス粒子に対する直接不活化作用は認めなかった。

申請者は抗ウイルス作用が認められた 6 種類の漢方薬のうち、入手可能であった 6 種類の生薬の抗ウイルス作用について検討した。生薬については、ウイルスの複製過程を検証するため、m. o. i. を 0.05 と 10 の 2 条件で細胞に感染させた。その結果、m. o. i. 10 の条件ではマオウ、シャクヤク、オウゴンに抗ウイルス作用が認められた。また、m. o. i. 0.05 の条件ではマオウ、シャクヤク、オウゴン、カンゾウの順に抗ウイルス作用が認められた。従って、生薬ではマオウに抗ウイルス作用が最も強く、m. o. i. 0.05 と 10 の条件で抗ウイルス作用が認められたことから、試薬が感染細胞に作用して、細胞内のウイルス複製を抑制していることが示唆された。カンゾウは m. o. i. 10 の条件で抗ウイルス作用が示されず、隣接する非感染細胞へのウイルス拡散を抑制する作用を持つことが示唆された。各生薬のウイルス粒子に対する直接不活化作用を検討したところ、マオウが僅かに感染価を低下させたことから、ウイルス粒子に直接作用して不活化させている可能性も示唆された。申請者はこれらの結果から、マオウとマオウを含有する漢方薬である麻黄湯、葛根湯、小青竜湯について、マオウの含有量に応じて 50%阻害濃度を算出し比較したところ、麻黄湯、葛根湯、小青竜湯の 50%阻害濃度は 163.6、517.3、450.4 μg/ml となった。同等のマオウ含有量においても、生薬の異なる組み合わせにより、ウイルス抑制効果が影響を受ける可能性が示唆された。

今回申請者が検討した漢方薬のうち、麻黄湯の抗ウイルス作用が最も良好であり、生薬では、マオウの作用が最も良好であった。一方で、漢方薬は、生薬の組み合わせによって、抗ウイルス作用に影響を及ぼす可能性が示唆された。

以上の結果から、本論文は呼吸器感染症に対して使用されている漢方薬や生薬の SARS-CoV-2 に対する抗ウイルス効果を検証し、マオウがインフルエンザウイルスと同様に抗ウイルス作用を示すことを明らかにした。従って、COVID-19 の治療薬を模索する上で、漢方薬の抗ウイルス作用を明らかにした点は高く評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。