

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09288

研究課題名(和文) 培養ヒト気道上皮細胞を用いた漢方薬の抗ウイルス効果に関する研究

研究課題名(英文) Experiments for investigating antiviral effect of Kampo formula using primary culture of human air way epithelial cells

研究代表者

菊地 章子(Kikuchi, Akiko)

東北大学・医学系研究科・講師

研究者番号：00400325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト気道上皮細胞にライノウイルスを感染させ葛根湯を作用させたところ明らかなウイルス増殖抑制効果は認められなかったが、ウイルスの細胞内侵入に関与する酸性エンドソームの発現量低下と炎症性物質の産生が減少した。また麻黄湯や麻杏甘石湯はインフルエンザウイルス増殖抑制効果があり、酸性エンドソームの発現量低下も認められた。以上のことからこれらの漢方薬は、ウイルスの気道上皮細胞内への侵入抑制効果とウイルス感染で引き起こされる過剰な気道炎症を抑制する効果を持つ可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではヒト気管もしくは鼻腔粘膜の初代培養細胞を用いて、急性上気道感染症に用いられる漢方薬に関する実験を行った。風邪の原因であるライノウイルスやインフルエンザウイルスに対して漢方薬のウイルス増殖抑制効果や炎症関連物質の減少効果が認められ、ウイルスの気道上皮細胞内への侵入抑制効果や好中球遊走抑制効果が示唆された。古来から用いられている漢方薬の効果や作用機序はいまだ不明な部分も多いが、本研究によりその一部が解明された。

研究成果の概要(英文)：Kakkonto, a popular Kampo formula for common cold, did not significantly inhibit rhinovirus proliferation in human primary tracheal or nasal epithelial cells, but reduced acidic endosomes and inflammatory cytokines. Maoto or makyokansekito inhibited proliferation of influenza virus and inflammatory cytokines. These results indicated that kakkonto, maoto, and makyokansekito may have inhibitory effects of virus invasion into upper airway epithelial cells and restrain airway excessive inflammations.

研究分野：漢方医学

キーワード：上気道感染症 ウイルス 気道上皮細胞 漢方薬 サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

漢方医学は日本の伝統医学で、古来より急性感染症に多く使用されてきた歴史がある。しかしヒトの体内での薬物動態や作用機序に関する研究はまだまだ不十分である。近年の臨床研究において、急性ウイルス性上気道炎に対する漢方薬の有効性が報告されているが、正常ヒト気道上皮細胞を用いた漢方薬に関する実験はほとんど行われていない。

2. 研究の目的

急性ウイルス性上気道炎に対する漢方薬の効果とその作用機序を解明するため、正常ヒト気道上皮細胞を用いて漢方薬のライノウイルス・インフルエンザウイルスに対する抗ウイルス効果の有無とその機序を解明する。

3. 研究の方法

(1) 漢方薬のウイルス放出抑制効果に関する検討

初代培養のヒト気管上皮細胞・鼻腔粘膜上皮細胞にライノウイルス 14 型と新型インフルエンザウイルス (A/H1N1 pdm2009) を感染させる。

漢方薬 (葛根湯、麻黄湯、麻黄附子細辛湯、麻杏甘石湯など) を作用させてそれぞれの培養液の上清を感染後 1、3、5、7 日後に採取しウイルス放出量の継時的変化を測定する。

また漢方薬によるウイルス放出抑制効果の容量依存性を検索するため、溶液濃度の希釈率を変えてウイルス放出量の変化を検討する。

漢方薬溶液または対照溶液で処理した気道上皮細胞のウイルス RNA 量を、リアルタイム定量 RT-PCR (polymerase chain reaction with reverse transcription) を用いて定量し、比較する。

(2) 漢方薬のウイルス感染メカニズムに対する効果の検討

培養上清中の炎症性サイトカイン (IL-1, IL-6, IL-8, TNF 等) を測定
漢方薬処理後または対照液処理後の培養液の上清を、ウイルス感染前後に採取し、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) で測定する。

ヒト培養気道上皮細胞内の酸性エンドソームに対する漢方薬の効果を見るため、酸性エンドソームの蛍光強度を漢方薬処理前後で測定する。

ヒト培養気道上皮細胞の核蛋白を抽出し、NF- κ B の測定を行う。

4. 研究成果

(1) 漢方薬のウイルス放出抑制効果に関する検討

ヒト気管上皮細胞またはヒト鼻粘膜上皮細胞にライノウイルス 14 を感染させ、葛根湯溶液を作用させて放出されたウイルス力価を確認したが明らかな抑制効果は得られなかった。

ヒト気管上皮細胞またはヒト鼻粘膜上皮細胞にインフルエンザウイルス (A/H1N1 pdm2009) を感染させ、麻黄湯、麻黄附子細辛湯、麻杏甘石湯溶液を添加してウイルス放出量の変化を検討した。麻黄附子細辛湯では明らかな抑制効果は得られなかったが、麻黄湯と麻杏甘石湯では感染 1 日後のウイルス増殖抑制効果を認めた (図 1)。

ウイルス RNA を RT-PCR で測定したところ葛根湯によりライノウイルスの RNA 複製は減少しなかった。

生薬単味エキス (麻黄・桂皮・杏仁・甘草) と石膏を用いてインフルエンザウイルス増殖抑制効果にどの生薬が寄与しているかを検討したが、どの生薬単味エキスも明らかなウイルス増殖抑制効果を示さなかった。

麻黄湯に気道上皮細胞に対する細胞障害性がないことを確認した。

(2) 漢方薬のウイルス感染メカニズムに対する効果の検討

培養上清中の炎症性サイトカイン (IL-1, IL-6, IL-8, TNF 等) を測定

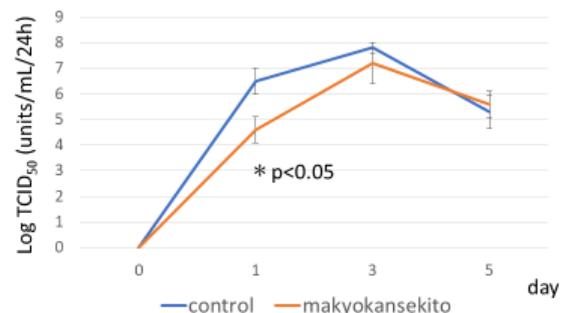


図 1: インフルエンザウイルスに麻杏甘石湯湯を作用させた場合のウイルス力価

ライノウイルスに葛根湯を作用させた場合、IL6 は変化無かったが IL8 が低下する傾向が認められた (図 2)。インフルエンザウイルスに麻黄湯・麻杏甘石湯を作用させた場合は培養上清中サイトカイン (IL6, IL8) の測定では IL8 で低下する傾向が認められた。ウイルス感染による気道上皮細胞でのサイトカイン産生に対する葛根湯、麻黄湯、麻杏甘石湯の効果を検討した。好中球性炎症サイトカインの抑制傾向は認められたが、好酸球性炎症に関わるサイトカインへの影響は認めなかった。

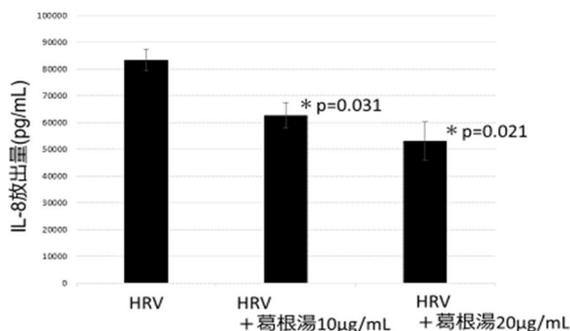


図 2 : ライノウイルス (HRV) に対して葛根湯を作用させた場合の IL8 放出量

ヒト培養気道上皮細胞内の酸性エンドソームに対する漢方薬の効果を測定。ヒト鼻粘膜上皮細胞に葛根湯、麻黄湯、麻杏甘石湯を作用させたところ、酸性エンドソームの発現量の低下を認めた (図 2、3)。

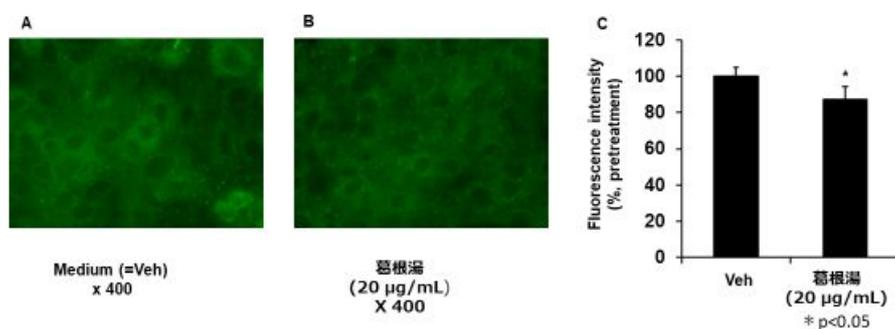


図 2 : 葛根湯による酸性エンドソームの蛍光強度の変化

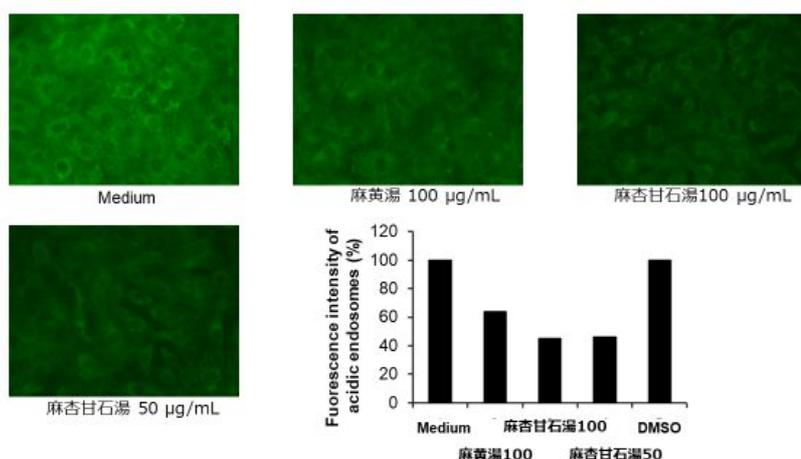


図 3 : 麻黄湯と麻杏甘石湯による酸性エンドソームの蛍光強度の変化

NF-κB の測定 気道上皮細胞に漢方薬を作用させた場合、NF-κB は抑制される傾向にありサイトカインの産生抑制と関連すると推測された。

葛根湯は本実験系では明らかなライノウイルス増殖抑制効果は認められなかったが、酸性エンドソームの発現量低下と IL-8 産生を減少させることが示された。また正常ヒト気道上皮細胞を用いた実験により、麻黄湯や麻杏甘石湯では過去の報告より低い濃度でも酸性エンドソームの発現量低下が認められた。以上のことからこれらの漢方薬は、ウイルスの気道上皮細胞内への侵入抑制効果とウイルス感染で引き起こされる過剰な気道炎症を抑制する効果を持つ可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山谷 睦雄 (Yamaya Mutsuo) (60261640)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	
研究分担者	高山 真 (Takayama Shin) (80579954)	東北大学・大学病院・准教授 (11301)	
研究分担者	沼田 健裕 (Numata Takehiro) (20748678)	東北大学・医学系研究科・非常勤講師 (11301)	