

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590896

研究課題名(和文)漢方処方「麻黄剤」のインフルエンザウイルス感染に対する有効性の機序の解析

研究課題名(英文)Action mechanism of Ephedra Herb drug group against influenza virus infection

研究代表者

永井 隆之(NAGAI, Takayuki)

北里大学・大学院感染制御科学府・講師

研究者番号：00172487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルス(IFV)感染マウスへ、麻黄剤である「麻黄湯」を治療的に経口投与すると、感染2日後において、鼻腔及び肺洗液の総IgA抗体価、並びに血清の総IgG抗体価を上昇させた。また、気道炎症モデルマウスへ、麻黄剤である「小青竜湯」を治療的に経口投与すると、肺においてTh2細胞(抗体産生を促進)への分化に関与する転写因子の遺伝子及びTh2細胞遊走因子の遺伝子の発現が抑制された。これらの結果より、麻黄湯の抗IFV活性に気道における総IgA抗体の上昇が関与していること、並びに小青竜湯の気道炎症に対する有効性に肺におけるTh2細胞への分化や集積の抑制が関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：When one of Ephedra herb drug group "maoto" was orally administered to mice on upper respiratory tract infection of influenza virus from 4 h to 52 h postinfection (p.i.), the total IgA antibody (Ab) titers in nasal wash and bronchoalveolar lavage fluid, and total IgG Ab titer in serum were increased in comparison with water-treated control at 52 h p.i. The expressions of GATA3 (master transcription factor of Th2 cell) and TARC (Th2 chemokine) mRNA in the lung were decreased by administration of another Ephedra herb drug group "shoseiryuto" to airway inflammation model mice. These results indicate that maoto exerts influenza virus reducing effect at an early phase of the infection through probably augmentation of the natural Abs, and the efficacy of shoseiryuto against airway inflammation may be related to the suppression of differentiation of Th0 into Th2 cell and accumulation of the Th2 cell in the lung.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科一般(含心身医学)

キーワード：漢方薬 麻黄湯 小青竜湯 インフルエンザ 気道炎症 自然抗体 Th2細胞 東洋医学

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザは毎年流行を繰り返し、乳幼児においては脳炎・脳症、高齢者においては肺炎を引き起こし、人類にとって生命に関わる危険な感染症である。現在、インフルエンザ対策としては、ワクチンの接種が最も有効な予防手段である。しかし、現行の皮下接種ワクチンは重症化の予防作用はあるが、感染そのものを予防する作用は弱い。また、2009年の豚由来のA型H1N1亜型ウイルスのように、これまでヒトに感染したことがないウイルスが流行した場合には、ワクチンの製造・供給が不十分になる場合もある。一方、インフルエンザの治療には抗インフルエンザウイルス薬が用いられている。インフルエンザウイルスが感染細胞から遊離するときに働くノイラミニダーゼ(シアリダーゼ)を阻害することによって抗インフルエンザウイルス活性を示すザナミビルとオセルタミビルが開発され、臨床で頻用されているが、経口薬であるオセルタミビルに対する耐性ウイルスの高頻度での出現が報告されている。オセルタミビル耐性ウイルスは、臨床での使用が開始されたシアリダーゼ阻害活性を有する抗インフルエンザウイルス薬であるペラミビルに対しても耐性であることが報告されている。これらのことより、インフルエンザ治療薬の選択肢の幅を広げることが必要とされている。

2. 研究の目的

漢方方剤のある種のもは、古来より臨床において急性の呼吸器感染症の治療に用いられていることから、インフルエンザに対する有効性が期待される。しかし、漢方薬のインフルエンザに対する有効性を科学的に証明した報告はほとんどなかった。研究代表者はこれまでに、漢方方剤のひとつである「小青竜湯」がインフルエンザウイルスを感染させたマウスにおいて、気道における同ウイルスの増殖を抑制し、抗インフルエンザウイルス活性を示すことを明らかにしている。また、小青竜湯は粘膜免疫系の誘導組織である腸管パイエル板のTリンパ球を活性化し、気道においてインフルエンザウイルス特異的IgA抗体を上昇させることによって抗ウイルス活性を示すことを報告している。さらに、抗ウイルスIgA抗体を上昇させる成分として不飽和ヒドロキシ脂肪酸の一種である9,12,13-トリヒドロキシ-10E-オクタデセン酸(ピネリン酸)の立体異性体の混合物を見出している。小青竜湯はまた、気道炎症モデルマウスに治療的に経口投与することにより、気道炎症を抑制する作用を有することを報告している。一方、小青竜湯と同様に「麻黄湯」を構成生薬とする漢方方剤である「麻黄湯」が、臨床でインフルエンザの治療に用いられている。しかし、臨床において麻黄湯のインフルエンザにおける解熱作用については報告されているが、抗インフルエンザウイルス

活性については報告されていなかった。研究代表者らは、麻黄湯がインフルエンザウイルス感染マウスにおいても投与開始後48時間以内に解熱作用を示し、臨床研究における解熱作用がマウスでも再現されるとともに、気道での同ウイルスの増殖を抑制することを明らかにしている。さらに、麻黄湯は獲得免疫が働く前の早い段階で、気道でインフルエンザウイルス結合性抗体価を上昇させることを明らかにしている。

しかし、小青竜湯や麻黄湯を初めとする「麻黄剤」の気道における有効性の機序は十分に解明されているとは言えない。そこで本研究では、研究代表者らが行って来た麻黄剤のインフルエンザウイルス感染及び気道炎症に対する免疫系を介した有効性の作用メカニズムの研究をさらに進展させることを目的として検討を行った。

3. 研究の方法

麻黄湯(構成生薬:麻黄、桂皮、杏仁、甘草)及び小青竜湯(構成生薬:半夏、麻黄、桂皮、芍薬、五味子、細辛、甘草、乾姜)は、北里大学東洋医学総合研究所漢方処方集に従って調製し、煎出後の煎液を凍結乾燥したものを実験に用いた。

(1) *In vivo*におけるインフルエンザウイルス感染に対する作用

A/Jマウス(雌性、実験開始時7週齢)に、ペントバルビタールナトリウム注射液(50 mg/kg)を腹腔内投与して麻酔し、インフルエンザウイルスA/PR/8/34(20×LD₅₀)を両側鼻腔に1μlずつ接種して上気道感染させた。その後、感染4時間後から52時間後まで、麻黄湯の煎剤エキス溶液または水を給水瓶から自由摂取させた。感染2日後に血清、肺洗液、鼻腔洗液を調製した。肺洗液、鼻腔洗液、血清中のtotal IgA、IgG₁及びIgM抗体価はELISA法で測定した。

(2) 気道炎症に対する作用

BALB/cマウス(雌性、実験開始時6週齢)に、0日目と5日目に卵白アルブミン(OVA, 8 μg)と水酸化アルミニウムゲル(2 mg)の混合物を腹腔内投与し、12日目と19日目に0.5% OVA-PBS溶液を1時間吸入させて気道炎症モデルを作製した。小青竜湯の煎剤エキス溶液(0.5 g/kg)は13日目から20日目まで経口投与した。21日目に肺を採取し、肺におけるmRNAの発現量をリアルタイムPCR法で測定した。

4. 研究成果

(1) インフルエンザウイルス感染マウスにおける抗体産生に対する麻黄湯の影響

インフルエンザウイルス上気道感染マウスの肺洗液中のtotal IgA抗体価を測定したところ、水投与群に比べ、麻黄湯投与群で有意な上昇が認められた(図1)。また、鼻腔洗液中のtotal IgA抗体価及び血清中のtotal IgG₁抗体価は麻黄湯の投与によって上昇傾向を

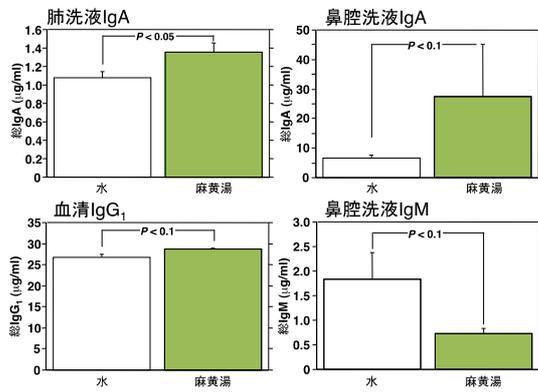


図1. インフルエンザウイルス上気道感染マウスにおける総抗体価に対する麻黄湯の影響

示した。しかし、予想に反して鼻腔洗液中の total IgM 抗体価は麻黄湯の投与によって低下傾向を示した。これらの結果から、インフルエンザウイルス感染マウスに麻黄湯を投与することによりこれまでに報告したインフルエンザウイルス結合性抗体価だけでなく、total IgA 及び IgG₁ 抗体価も上昇させることが明らかとなった。

(2) 小青竜湯の気道炎症に対する改善作用の機序の解析

OVA 誘発気道炎症モデルマウスに小青竜湯を経口投与し、肺における免疫関連因子の mRNA 発現変化を測定したところ、Th2 細胞への分化のマスター転写因子である GATA3 mRNA の発現量は非炎症群と比べて気道炎症モデルで増加し、小青竜湯の投与で有意に減少した(図2)。Th1 細胞への分化のマスター転写因子である T-bet 及び Treg 細胞への分化のマスター転写因子である Foxp3 の mRNA 発現量も気道炎症モデルで増加したが、小青竜湯で影響は見られなかった。これに対し、Th17 細胞への分化のマスター転写因子である ROR γ t mRNA の発現量は小青竜湯の投与によって減少傾向を示した(図2)。これらの結果より、小青竜湯は Th2 及び Th17 細胞への分化を抑制する可能性が示唆された。次に、肺におけるリンパ球の遊走に關するケモカインの mRNA 発現に対する小青竜湯の作用について検討を行った。気道上皮細胞や樹状細胞が産生する Th2 ケモカインである TARC の mRNA 発現量を測定した結果、非炎症群と比べて気道炎症モデルでは著しく増加した。これに対し、小青竜湯を投与した群

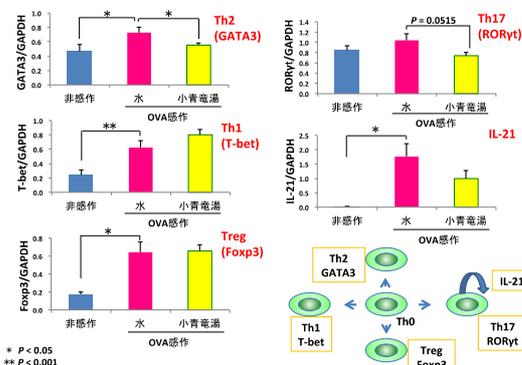


図2. 肺でのリンパ球分化関連転写因子mRNA発現に対する小青竜湯の影響

では有意な減少が認められた。これらの結果より、気道炎症モデルマウスの肺において、小青竜湯は Th2 細胞への分化並びに集積を抑制することによって有効性を示す可能性が考えられた。また、Th17 細胞への分化を抑制することで気道炎症が抑制されることが考えられた。

(3)まとめ

本研究での検討により、麻黄剤のうち麻黄湯はインフルエンザウイルス結合性抗体を含む自然抗体を上昇させることにより、インフルエンザウイルス感染早期において抗ウイルス活性を示すのに対し、同じ麻黄剤でも小青竜湯は獲得免疫系を介して気道炎症に対して有効性を示すことが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計6件)

- 1) Nagai T., Kataoka E., Aoki Y., Hokari R., Kiyohara H., Yamada H.: Alleviative effects of a Kampo (a Japanese herbal) medicine "maoto (Ma-Huang-Tang)" on the early phase of influenza virus infection and its possible mode of action. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2014**, Article ID 187036, 12 pages (2014). 査読有
DOI: 10.1155/2014/187036
- 2) Hokari R., Nagai T., Yamada H.: *In vivo* anti-influenza virus activity of Japanese herbal (Kampo) medicine, "Shahakusan," and its possible mode of action. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2012**, Article ID 794970, 13 pages (2012). 査読有
DOI: 10.1155/2012/794970
- 3) 山田陽城、清原寛章、永井隆之: パチュリでインフルエンザ対策 .アロマトピア、**21** (2), 18-21 (2012). 査読有
- 4) Kiyohara H., Ichino C., Kawamura Y., Nagai T., Sato N., Yamada H., Salama M. M., Abdel-Sattar E.: *In vitro* anti-influenza virus activity of a cardiotonic glycoside from *Adenium obesum* (Forssk.). *Phytomedicine* **19** (2), 111-114 (2012). 査読有
DOI: 10.1016/j.phymed.2011.07.004
- 5) Kiyohara H., Ichino C., Kawamura Y., Nagai T., Sato N., Yamada H.: Patchouli alcohol: *in vitro* direct anti-influenza virus sesquiterpene in *Pogostemon cablin* Benth. *J. Nat. Med.* **66** (1), 55-61 (2012). 査読有
DOI: 10.1007/s11418-011-0550-x
- 6) 永井隆之、高田愛美、清水ユリ子、中尾麻里乃、松木(江森)道子、山田陽城: 小青竜湯の気管支喘息に対する薬効機序の気道炎症モデルマウスを用いた解析 - ステロイド薬との比較 - .漢方と免疫・アレルギー、**24**, 85-103 (2011). 査読有

〔学会発表〕(計14件)

- 1) 永井隆之、宮田彩香、清原寛章、山田陽城：漢方方剤「小青竜湯」の気管支喘息に対する薬効機序の気道炎症モデルマウスを用いた解析．第63回日本アレルギー学会秋季学術大会、2013年11月29日、東京
- 2) Yamada H., Kiyohara H., Nagai T., Yabe T.: Action mechanism and active ingredients in Kampo (Japanese herbal) medicines. SEE PhytoChemNet Workshop, Medical and Aromatic Plants in South East Europe: Environmental and Socio-Economic Challenges, The role of MAB reserves, 2013年6月3日, Plovdiv, Bulgaria
- 3) 穂苅 玲、永井隆之、山田陽城：漢方方剤「瀉白散」の poly(I:C)誘発気道炎症に対する作用の検討．日本薬学会第133年会、2013年3月28日、横浜
- 4) 宮田彩香、永井隆之、山田陽城：漢方方剤「小青竜湯」とその構成生薬の気道炎症(気管支喘息)に対する作用の検討．日本薬学会第133年会、2013年3月28日、横浜
- 5) Yamada H., Kiyohara H., Nagai T., Yabe T.: How can we make an evidence on clinical effects of Kampo (Japanese herbal) medicines by pharmacological approaches? 2012 Shanghai International Conference on Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine, 2012年10月21日, Shanghai, China
- 6) Nagai T., Kiyohara H., Yamada H.: Anti-influenza virus and anti-inflammatory activities of a Kampo medicine, shoseiryuto through airway immune system. Joint Congress for International Conference of Traditional Chinese Medicine Pharmacology and 5th Annual Conference of the Specialty Committee of Traditional Chinese Medicine Pharmacology, World Federation of Chinese Medicine Societies (ICTCMP-WFCMS), 2012年9月8日, Beijing, China
- 7) Nagai T., Kiyohara H., Yamada H.: Anti-influenza virus and anti-inflammatory activities of Ephedra Herb drug group through airway immune system, 第12回日本臨床中医薬学会学術大会、2012年9月6日, Shenyang, China
- 8) 穂苅 玲、永井隆之、山田陽城：瀉白散のインフルエンザウイルス感染およびウイルス性気道炎症に対する抑制作用．第29回和漢医薬学会学術大会、2012年9月2日、東京
- 9) 宮田彩香、永井隆之、山田陽城：気道炎症(気管支喘息)モデルマウスの抗原特異的IgE抗体価及び気道過敏性に対する小青竜湯構成生薬の影響．第29回和漢医薬学会学術大会、2012年9月2日、東京
- 10) 穂苅 玲、永井隆之、山田陽城：漢方方剤「瀉白散」のウイルス性気道炎症に対する

効果．日本薬学会第132年会、2012年3月29日、札幌

- 11) Yamada H., Kiyohara H., Nagai T., Yabe T.: Elucidation of action mechanism and active ingredients of Kampo medicines as traditional natural products medicine. International Symposium on Traditional Chinese Medicine 2011 & the 26th Symposium on Natural Products, 2011年10月29日, Taichung, Taiwan
- 12) 穂苅 玲、永井隆之、山田陽城：「瀉白散」の抗インフルエンザウイルス作用の検討．第28回和漢医薬学会学術大会、2011年8月27日、富山
- 13) 永井隆之、清原寛章、山田陽城：麻黄剤のインフルエンザウイルス感染に対する作用と気道免疫系を介した機序の解析．第28回和漢医薬学会学術大会、2011年8月27日、富山
- 14) Yamada H., Kiyohara H., Nagai T., Yabe T.: Recent progress on pharmacological evaluation of Kampo medicines for clinical application and new drug development. 2011 American Society of Pharmacognosy Annual Meeting, 2011年8月1日, San Diego, USA

〔図書〕(計1件)

- 1) 清原寛章、永井隆之、松本 司、矢部武士、山田陽城：薬学生のための漢方医薬学(改訂第2版)(山田陽城、花輪壽彦、金成俊編集) 南江堂(東京)(2012)の第3章 pp. 99-159 (分担執筆)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.lisci.kitasato-u.ac.jp:8080/bio_pharm

<http://www.kitasato-u.ac.jp/lisci/life/chart/LSI-lab25.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 隆之 (NAGAI, Takayuki)

北里大学・大学院感染制御科学府・講師
研究者番号：00172487

(2) 研究分担者

清原 寛章 (KIYOHARA, Hiroaki)

北里大学・大学院感染制御科学府・教授
研究者番号：70161601

(3) 連携研究者

小田口 浩 (ODAGUCHI, Hiroshi)

北里大学・東洋医学総合研究所・副所長
研究者番号：40214150