

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590672

研究課題名（和文） 漢方薬の粘膜免疫の活性化能を応用した粘膜ワクチンの開発

研究課題名（英文） Development of mucosal vaccine based on mucosal immune system enhancing activity of Kampo medicines.

研究代表者

宮田 健（MIYATA TAKESHI）

崇城大学・薬学部・客員研究員

研究者番号：90040310

研究成果の概要（和文）：

インフルエンザの予防には経鼻ワクチンが効果的であるが、その免疫誘導にはアジュバンドが必要である。本研究では、粘膜免疫を増強する漢方薬が、経口アジュバンドとなることを提唱し、麻黄湯が肺・血清中の IgA・IgG 抗体産生量を増強することを明らかにし、さらに経鼻ワクチン接種後のウイルス抗原特異的な抗体を誘導することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Intranasal administration of hemagglutinin vaccine with an adjuvant is effective for protection against influenza virus infection. In this study, we found that Kampo medicines, which enhance mucosal immune system, are used for an oral adjuvant. Maoto increased IgA, IgG antibody in bronchoalveolar lavage fluid and serum. Maoto also showed production of virus-specific antibody after intranasal vaccination.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般（含心身医学）

キーワード：漢方薬，インフルエンザ，東洋医学

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザを始めとする感染性疾患の予防には、すでにワクチン療法が定着している。しかし、現行のワクチンの多くは、不活化ウイルスを用いた皮下接種によるものであり、これは血中の IgG レベルの上昇は生じるものの、感染防御の最前線である気道や消化管での IgA の産生を促すものではない。従って、現行の皮下ワクチン療法は、感染後の病態の悪化を予防することはできても、感

染そのものを予防することができない。さらに、IgG は非常に特異性が高いために、インフルエンザなど複数のウイルス種によって発症する感染症では交差防御能が低く、ワクチンとして接種したウイルス株以外の流行株には無効である。従って、より高度な感染予防のためには、経鼻投与や経口投与などワクチンを直接粘膜組織へと到達させることが必須であるが、ワクチンの単独投与では IgA の産生を誘発させることは難しく、抗原

提示細胞を刺激するアジュバントを用いることが必須となる。しかしながら、従来型のアジュバントであるアルミニウム、カルシウム等では、抗体産生能を高める効果は見込めるものの、局所反応が強く、投与後の強い炎症応答が問題となる。また、特にアルミニウムアジュバントは IgE 産生を刺激するため、小児アレルギー疾患を増悪することや、アルツハイマー型痴呆や透析脳症の病因となる危険性も示唆されている。このような背景のもと、より安全性の高いアジュバントの検索が行われ、toll-like 受容体リガンドである細菌毒素やインターフェロン- γ 等のサイトカイン類など、自然免疫系の賦活物質が考案されてきたが、炎症惹起という問題点は残されており、安全性の問題をクリアしたとは言い難い。一方、最近になって、人工肺サーファクタントをアジュバントとして用いたインフルエンザ経鼻ワクチンに関する良好な成績が報告されている。本法は上記の問題点を全て解消する素晴らしい方法であるが、人工サーファクタントのコストを考えると、広く実施されるべき予防接種への応用が現実的とは言い難く、これに代わる安価な方法が求められる。

我々はこれまで、長年にわたって漢方薬の薬効に関する基礎薬理的な研究を行ってきた。特に、呼吸器疾患領域で鎮咳去痰薬として用いられる麦門冬湯を中心に、その薬理作用のプロファイルを調べてきたが、麦門冬湯は知覚神経終末での軸索反射系を抑制することで咳中枢への求心性インパルスを抑制し鎮咳作用を現すばかりでなく、緩和ではあるがステロイド様の抗炎症作用および著明な肺サーファクタント分泌促進作用をもつことを見出している。この肺サーファクタント分泌促進作用は、*in vivo*の動物実験のみならず、単離培養した肺胞 II 型上皮細胞でも認められ、代表的な分泌促進物質である β -アドレナリン作用薬 (terbutaline) に比し、それほど遜色のないものであった。この分泌に関わる機序についても詳細に検討し、II 型細胞内の cAMP-依存性シグナルと、 Ca^{2+} -依存性シグナルの相乗的なクロストークに基づく、合理的な反応であることも確認している。また、抗炎症作用については、麦門冬湯の主要な抗炎症成分であるグリチルリチンについてマイクロアレイ解析を行いその特徴を調べたが、その遺伝子発現調節作用はステロイド薬と酷似していた。中でもインターフェロン- γ /STAT 依存的に発現が亢進する SOCS3, GBP2 および IRF1 などの mRNA については、むしろステロイド薬よりも強力に抑制することが分かっている。さらに、未だその機序は不明ではあるが、動物実験で麦門冬湯は肺洗浄液中への総 IgA の分泌を亢進することも分かってきた。すなわち、麦門冬

湯には既に粘膜ワクチンのアジュバントとしての有用性が示されている肺サーファクタントの分泌促進作用とともに粘膜免疫賦活作用をもちつつ、過剰な炎症反応を抑制する、まさに理想的な粘膜免疫アジュバントとしての性質をもつと考えられる。

2. 研究の目的

漢方薬とワクチンの組み合わせによる抗原特異的 IgA 産生能について調べ、実効性が高く安価で実用化可能な粘膜ワクチン療法の確立を目指す。麦門冬湯あるいはその他の漢方薬を投与した動物を用い、インフルエンザワクチンの経鼻投与による気道粘膜でのウイルス特異的 IgA の産生能を調べ、漢方薬のアジュバント効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) 漢方薬投与マウスの IgA および IgG 産生能の評価

漢方薬の IgA および IgG 産生能の評価について、麦門冬湯および麻黄湯について検討した。BALB/c マウス (雄, 7 週齢) に、漢方薬を 500mg/kg/day, 14 日間経口投与後、血清および肺洗浄液を採取し、ELISA 法により、検体中の IgA 量と IgG 量を測定した。

(2) 経鼻インフルエンザワクチン接種における漢方薬のアジュバント効果

BALB/c マウスに漢方薬を 14 日間投与後、インフルエンザワクチンを経鼻接種し、さらに 14 日間漢方薬を投与後、血清および肺洗浄液中の IgA 量および IgG 量を測定した。また、インフルエンザウイルスに特異的な抗体量を HI 試験により測定した。

4. 研究成果

(1) 漢方薬投与マウスの IgA および IgG 産生能の評価

BALB/c マウスに麦門冬湯または麻黄湯を 2 週間投与後、血清および肺洗浄液中の IgA 量および IgG 量を測定した。麻黄湯投与群では血清中の IgA 抗体の産生量が増加したが、血清中の IgG 抗体量はコントロールと変化がなかった。一方、麦門冬湯投与群には血清と肺洗浄液中の IgA と IgG の産生量には有意な変化はなかった。(図 1)

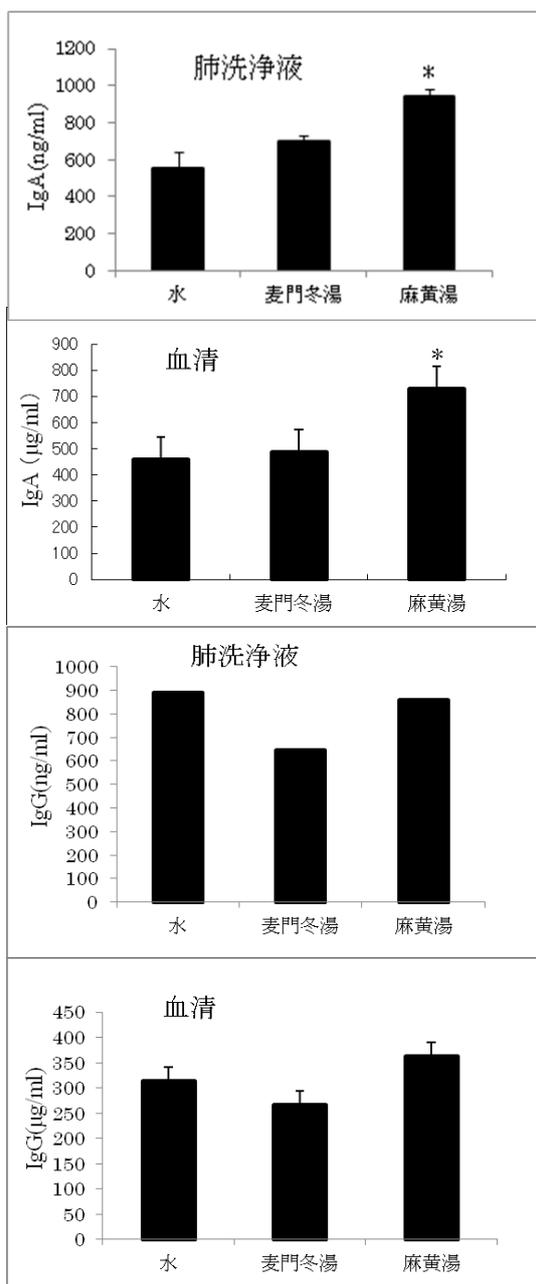


図1 麦門冬湯, 麻黄湯による IgA 抗体と IgG 抗体の産生量の変化 (14 日目)

*:p<0.05 vs control.

(2) 経鼻インフルエンザワクチン接種における漢方薬のアジュバント効果

さらにインフルエンザワクチンを経鼻接種後, 14 日間漢方薬を投与した. 麻黄湯投与群では肺洗浄液・血清中に 14 日目と同程度の IgA 抗体が持続的に産生されていた. また, 麻黄湯投与群においては, 肺洗浄液・血清中に IgG 抗体の産生量の増加が確認された (図 2)

つぎに HI 試験により肺洗浄液および血清

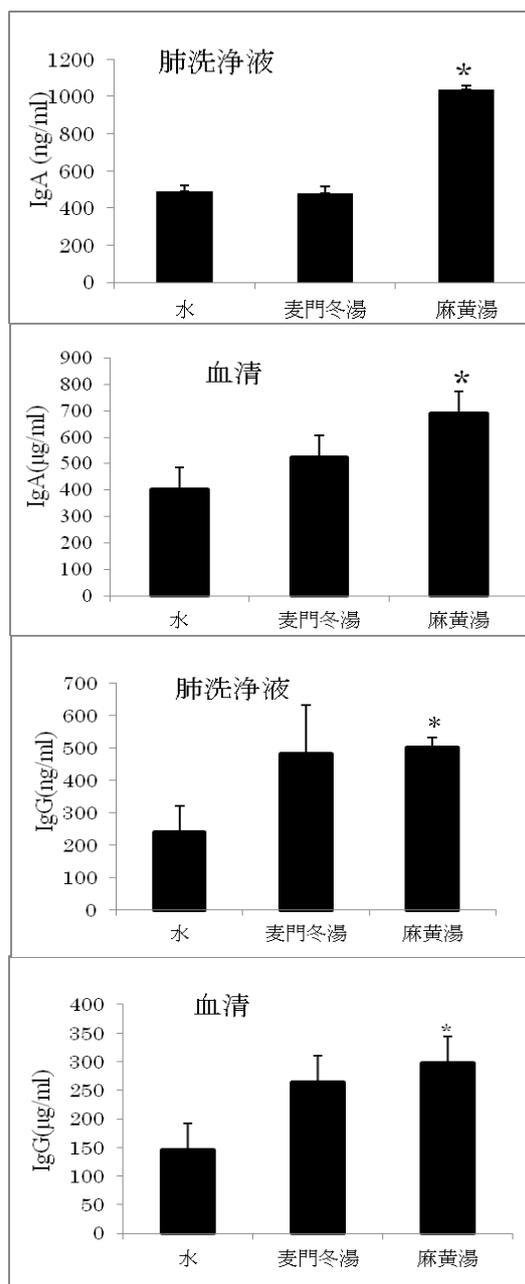


図 2 経鼻ワクチン接種後の麦門冬湯, 麻黄湯による IgA 抗体と IgG 抗体の産生量の変化 (28 日目)

*:p<0.05 vs control.

中の抗 HA 抗体による赤血球凝集反応阻害を調べた結果, 麻黄湯投与群の肺洗浄液、血清中に阻害活性を確認した。

以上の成績は, 麻黄湯の経口アジュバントとしての可能性を示唆する重要な知見であると考えられる。

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 28 件)

- ① Inada C, Thi Le X, Tsuneyama K, Fujiwara H, Miyata T, Matsumoto K. Endogenous acetylcholine rescues NMDA-induced long-lasting hippocampal cell damage via stimulation of muscarinic M(1) receptors: elucidation using organic hippocampal slice cultures. *Eur J Pharmacol*, 査読有, 699, 2013, 150-159.
- ② Zhao Q, Niu Y, Matsumoto K, Tsuneyama K, Tanaka K, Miyata T, Yokozawa T. Chotosan ameliorates cognitive and emotional deficits in an animal model of type 2 diabetes: possible involvement of cholinergic and VEGF/PDGF mechanisms in the brain. *BMC Complement Altern Med*, 査読有, 12, 2012, 188.
- ③ Kurauchi Y, Hisatsune A, Isohama Y, Mishima S, Katsuki H. Caffeic acid phenethyl ester protects nigral dopaminergic neurons via dual mechanisms involving haem oxygenase-1 and brain-derived neurotrophic factor. *Br J Pharmacol*. 査読有, 166, 2012, 1151-1168.
- ④ Mibu N, Yokomizo K, Uchida W, Takemura S, Zhou J, Aki H, Miyata T, Sumoto K. Molecular symmetry and biological activities of new symmetrical tris(2-aminoethyl)amine derivatives. *Chem Pharm Bull*, 査読有, 60, 2012, 408-414.
- ⑤ Ohno M, Murakami K, El-Aasr M, Zhou JR, Yokomizo K, Ono M, Nohara T. New spirostanol glycosides from *Solanum nigrum* and *S. jasminoides*. *J Nat Med*, 査読有, 66, 2012, 658-663.
- ⑥ Ohnishi M, Katsuki H, Fukutomi C, Takahashi M, Motomura M, Fukunaga M, Matsuoka Y, Isohama Y, Izumi Y, Kume T, Inoue A, Akaike A. HMGB1 inhibitor glycyrrhizin attenuates intracerebral hemorrhage-induced injury in rats. *Neuropharmacology*. 査読有, 61, 2011, 975-980.
- ⑦ Hisatsune A, Nakayama H, Kawasaki M, Horie I, Miyata T, Isohama Y, Kim KC, Katsuki H. Anti-MUC1 antibody inhibits EGF receptor signaling in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, 405, 2011, 377-381.
- ⑧ Zhao Q, Matsumoto K, Tsuneyama K, Tanaka K, Li F, Shibahara N, Miyata T, Yokozawa T. Diabetes-induced central cholinergic neuronal loss and cognitive deficit are attenuated by tacrine and a Chinese herbal prescription, kangen-karyu: elucidation in type 2 diabetes db/db mice. *J Pharmacol Sci*, 査読有, 117, 2011, 230-242.
- ⑨ Mibu N, Yokomizo K, Saisho M, Oishi M, Aki H, Miyata T, Sumoto K. Synthesis and antiviral activities of some N-acyl-2,6-diaminopyridines and related linker mode identical twin drugs. *Heterocycles* 査読有, 83, 2011, 385-393.
- ⑩ Yamada M, Hayashida M, Zhao Q, Shibahara N, Tanaka K, Miyata T, Matsumoto K. Ameliorative effects of yokukansan on learning and memory deficits in olfactory bulbectomized mice. *J Ethnopharmacol*, 査読有, 135, 2011, 737-746.
- ⑪ Zhao Q, Yokozawa T, Tsuneyama K, Tanaka K, Miyata T, Shibahara N, Matsumoto K. Chotosan (Diaoteng San)-induced improvement of cognitive deficits in senescence-accelerated mouse (SAMP8) involves the amelioration of angiogenic/neurotrophic factors and neuroplasticity systems in the brain. *Chin Med*, 査読有, 6, 2011, 33.
- ⑫ Takigawa A, Setoguchi H, Okawa M, Kinjo J, Miyashita H, Yokomizo K, Yoshimitsu H, Nohara T, Ono M. Identification and characterization of component organic and glycosidic acids of crude resin glycoside fraction from *Calystegia soldanella*. *Chem Pharm Bull*, 査読有, 59, 2011, 1163-1168.
- ⑬ Miyata T. Novel approach to curatives of Mibyou (presymptomatic diseases). *Yakugaku Zasshi*, 査読有, 131, 2011, 1289-1298.
- ⑭ Nishimoto Y, Hisatsune A, Katsuki H, Miyata T, Yokomizo K, Isohama Y. Glycyrrhizin attenuates mucus production by inhibition of *MUC5AC* mRNA expression in vivo and in vitro. *J Pharma Sci*, 査読有, 113, 2010, 76-83.
- ⑮ Yamakawa N, Suemasu S, Kimoto A, Arai Y, Ishihara T, Yokomizo K, Okamoto Y, Otsuka M, Tanaka K, Mizushima T. Low direct cytotoxicity of loxoprofen on gastric mucosal cells. *Biol Pharm Bull*, 査読有, 33, 2010, 398-403.
- ⑯ Yamashita Y, Hoshino T, Matsuda M, Kobayashi C, Tominaga A, Nakamura Y, Nakashima K, Yokomizo K, Ikeda T, Mineda K, Maji D, Niwano Y, Mizushima T. HSP70 inducers from Chinese herbs and their effect on melanin production. *Exp Dermatol*. 査

読有, 19, 2010, 340-342.

[学会発表] (計 15 件)

- ① 壬生伸子, 横溝 和美, 植木菜美, 斎藤 愛, 竹村 知, 内田 航, 周建融, 安藤初美, 宮田 健, 須本國弘, トリポータル受容体型対称性分子の合成と生物活性, 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 28 日, 札幌市.
- ② 横溝和美, 周 建融, 宮田 健, Roles of antioxidants and heat shock protein induces as an antifatigue effects induced by health supplements, BIT' s 8th Annual Congress of International Drug Discovery Sciences and Technology, 2010 年 10 月 26 日, 北京 (中国).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 健 (MIYATA TAKESHI)
崇城大学・薬学部・客員研究員
研究者番号: 90040310

(2) 研究分担者

磯濱 洋一郎 (ISOHAMA YOICHIRO)
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号: 10240920

(3) 研究分担者

横溝 和美 (YOKOMIZO KAZUMI)
崇城大学・薬学部・教授
研究者番号: 80240919