

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460919

研究課題名(和文)漢方方剤「瀉白散」の宿主介在性抗インフルエンザウイルス作用と作用機序の解析

研究課題名(英文) Host-mediated anti-influenza virus activity and action mechanism of a Kampo (traditional Japanese herbal) medicine "shakakusan"

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・准教授

研究者番号：00172487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Poly(I:C)の経鼻投与により作成したウイルス性気道炎症モデルマウスに、瀉白散煎剤(SHS)、含有成分のリクイリチゲニン(LG)またはモルシン(MOR)を経口投与したところ、Poly(I:C)により上昇した肺の炎症性サイトカイン、好中球マーカー、好中球ケモカイン及び受容体のmRNA発現量は、SHS投与により減少し、LGやMORにも同様の作用が認められた。また、Poly(I:C)の添加によりヒト気道上皮細胞で増加した炎症性サイトカイン、好中球ケモカインのmRNA発現量は、SHSの添加により減少した。LGやMORにも同様の作用が認められたことから、これらが活性成分の一部であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hot-water extract of a Kampo (traditional Japanese herbal) medicine "shahakusan" or its constituents (liquiritigenin, morusin) was administered orally to the viral airway inflammation model mice prepared by intranasal inoculation of synthetic viral double-stranded RNA analog, Poly(I:C). The mRNA expression levels of inflammatory cytokines, neutrophil markers, neutrophil chemokines and their receptors in lungs increased by inoculation of Poly(I:C) were decreased by administration of shahakusan extract, and similar effects were observed in liquiritigenin and morusin. The mRNA expression levels of inflammatory cytokines and neutrophil chemokines increased in human bronchial epithelial cell line, BEAS-2B, by addition of Poly(I:C) were decreased by addition of shahakusan extract. Since similar actions were also observed in liquiritigenin and morusin, it was suggested that these constituents are at least a part of the active ingredients of shahakusan extract.

研究分野：漢方薬理学

キーワード：漢方薬 瀉白散 気道炎症 インフルエンザ 好中球 ケモカイン フラボノイド 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効果はあるが、感染そのものを予防する作用は弱い。また、A型H1N1亜型 pdm2009 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)阻害薬が開発され、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(厚生労働省報道発表資料, 2009)。また、これらの抗インフルエンザウイルス薬はインフルエンザの発症後 48 時間以内に服用を開始しないと有効性が期待出来ない(添付文書情報)。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。研究代表者らはこれまでに、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。一方、「麻黄湯」が近年、臨床でインフルエンザの治療に用いられている。臨床研究においては、麻黄湯のインフルエンザにおける解熱作用が報告されている。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投与開始後 48 時間以内に解熱作用を示し、気道での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、気道で抗インフルエンザウイルス抗体を上昇させることを明らかにしている。しかし、これらの漢方方剤はインフルエンザの初期に

は有効とされているが、感染がある程度進行した病態に対しては有効とされていない。研究代表者らは、呼吸器感染症が下部気道に進行した症状に有効とされる「瀉白散」の煎剤がマウスにおいて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<sup>1)</sup>。

そこで本研究では、瀉白散煎剤のインフルエンザウイルス感染に対する有効性の作用機序について、気道免疫系に対する作用を中心に解析するとともに、作用成分の解明を行うことを目的として検討を行った。

### 3. 研究の方法

瀉白散(構成生薬: 桑白皮、地骨皮、炙甘草、粳米)は、大塚敬節『経験・漢方処方分量集』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。瀉白散煎液含有成分であるリクイリチゲニン、モルシン及び含有成分の腸内細菌代謝物であるグリチルレチン酸は市販のものを用いた。

#### (1) *In vivo* におけるウイルス性気道炎症に対する作用の検討

BALB/c マウス(♀, 7 週齢)に 3 日間連続でウイルス二重鎖 RNA 合成類似物である Poly(I:C) (25 µg/mouse)を片側鼻腔に経鼻投与することで気道炎症を惹起させ、同時に水、瀉白散煎剤エキス(1.0 g/kg/day)、リクイリチゲニン(7 mg/kg/day)またはモルシン(7 mg/kg/day)を経口投与した。最終投与から 6 時間後に肺を採取し、mRNA の発現量をリアルタイム PCR 法により測定した。また、24 時間後に気管支肺胞洗浄液(BALF)を採取し、ELISA 法によりタンパク質量を測定した。

#### (2) *In vitro* におけるウイルス性気道炎症に対する作用の検討

ヒト気道上皮 BEAS-2B 細胞株に Poly(I:C)を添加することで炎症を惹起させ、30 分後に瀉白散煎剤エキス、リクイリチゲニン、モルシンまたはグリチルレチン酸を添加し、Poly(I:C)添加から 3 時間後に細胞を回収した。細胞についてリアルタイム PCR 法で mRNA 発現量を測定した。また、Poly(I:C)添加から 6 時間後の培養上清について ELISA 法でタンパク質量を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) Poly(I:C)投与モデルマウスの気道炎症に対する作用の解析

Poly(I:C)の投与により上昇した肺における炎症性サイトカインである *Il1b*、好中球ケモカインである *Cxcl1* と *Cxcl2*、好中球ケモカイン受容体である *Cxcr2*、好中球マーカーである *Gr1* (図 1) 及び好中球から分泌されるカルシウム結合タンパク質の構成要素である *S100a8* の mRNA 発現量が瀉白散煎剤エキスの投与により有意に減少した。また、リクイリチゲニン及びモルシンの投与では Poly(I:C)投与による肺での *Il1b*、*Cxcl1* (リクイリチゲニンのみ)、*Cxcr2*、*Gr1* (図 1) 及び *S100a8* の mRNA 発現増強に対する抑制効果が瀉白

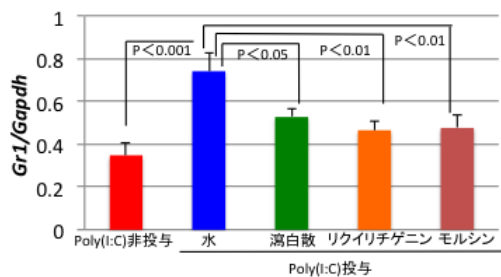


図1 Poly(I:C)誘発気道炎症モデルマウスの肺での *Gr1* の mRNA 発現量に対する瀉白散煎剤、リクイリチゲニン、モルシンの影響

散煎剤エキスと同様に認められた。また、ELISA 法によるタンパク質の測定では、Poly(I:C)で上昇したBALFのIL-6のリクイリチゲニン及びモルシンの投与により有意な低下が認められた。

(2) Poly(I:C)添加気道上皮細胞株に対する作用の解析

BEAS-2B 細胞への Poly(I:C)添加により増加した炎症性ケモカインである *CXCL10*, *CXCL8*, *CXCL1*, *CXCL2*、炎症性サイトカインである *IL6* の mRNA 発現量が瀉白散煎剤エキスの添加により有意に減少した。また、ELISA 法でタンパク質の量的変化を測定したところ、瀉白散煎剤エキスの添加により *CXCL10*, *IL-6*, *CXCL1* 産生量の有意な低下が認められた。瀉白散煎剤エキスの含有成分及び腸内細菌代謝物についても同様の検討を行ったところ、グリチルレチン酸の添加で *CXCL10*, *IL1b* の、リクイリチゲニンの添加で *CXCL10*, *IL1b*, *TNF* の、モルシンの添加で *CXCL10* の mRNA 発現量の有意な減少が認められた。

(3)まとめ

研究代表者らはこれまでに、インフルエンザウイルス下気道感染モデルマウスにおいて瀉白散煎剤の投与により肺での炎症が抑制されることを報告しているが<sup>1)</sup>、瀉白散煎剤の肺での炎症の改善が抗ウイルス効果だけによるものなのか、直接的な炎症の改善効果もあるのかは明らかにならなかった。しかし、本研究の Poly(I:C)経鼻投与モデルマウスを用いた検討において、瀉白散煎剤の投与により肺における炎症性サイトカイン、好中球ケモカイン、好中球ケモカイン受容体や好中球マーカーなどの mRNA の発現量の抑制が認められたことから、本煎剤には好中球の肺への集積を抑制し、直接的な炎症の改善効果も有することが示唆された。また、本煎剤の含有フラボノイドであるリクイリチゲニン及びモルシンは瀉白散煎剤の有する気道炎症改善作用の一部の発現を担っている可能性が示唆された。さらに、ヒト気道上皮細胞株への添加実験で、瀉白散煎剤やその含有成分及び腸内細菌代謝物が炎症性サイトカイン、炎症性及び好中球ケモカインの産生を抑制したことから、瀉白散煎剤の作用発現メカニズムとして、経口投与後に含有成分や

その腸内細菌代謝物が腸管から吸収され、肺組織に分布して作用する経路を経由するメカニズムが関与していることが示唆された。

<引用文献>

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**, 794970 (2012).

## 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3件)

Shirahata T., Nagai T., Hirata N., Yokoyama M., Katsumi T., Konishi N., Nishino T., Makino K., Yamada H., Kaji E., Kiyohara H., Kobayashi Y.: Syntheses and mucosal adjuvant activity of simplified oleanolic acid saponins possessing cinnamoyl ester. *Bioorg. Med. Chem.* **25** (6), 1747-1750 (2017). 査読有 DOI: 10.1016/j.bmc.2016.09.052

Chiba T., Asami Y., Suga T., Watanabe Y., Nagai T., Ōmura S., Shiomi K. (他4名): Herquiline A, produced by *Penicillium herquei* FKI-7215, exhibits anti-influenza virus properties. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **81** (1), 59-62 (2017). 査読有

DOI: 10.1080/09168451.2016.1162084

Sekiya M., Kiyohara H., Maruyama H., Tsukada N., Yasuda A., Nagai T., Yamada H.: Anti-inflammatory effect of hospital-grade hochuekkito extract, a traditional Japanese herbal medicine, on methotrexate-induced intestinal mucositis in mice. *Trad. Kampo Med.* **2** (2), 81-88 (2015). 査読有 DOI: 10.1002/tkm2.1026

[学会発表](計16件)

Nagai T., Kiyohara H.: Pharmacological activities and active ingredients in Kampo (traditional Japanese herbal) medicines through mucosal immune system. 2nd International Science Graduate Scholars' Conference, 2017年5月25日, Manila, Philippines

出原麻由、出野智史、松井英則、田中遥友、永井隆之、森崎 浩、清原寛章: 構成生薬の異なる補中益気湯煎剤の呼吸器粘膜免疫系調節作用の比較解析. 日本薬学会第137年会, 2017年3月26日, 東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)

Kiyohara H.: Intestinal immune system and plant polysaccharides as its modulator. The 3rd International Conference on Advanced Pharmaceutical Research (ICAPH 2016), 2016年3月17日, Bangkok, Thailand  
清原寛章、関谷路子、西本裕紀、施 嘯睿、

出原麻由、永井隆之、山田陽城：医療用補中益気湯エキス製剤の上気道粘膜免疫系賦活化作用成分の解析．日本生薬学会第62回年会、2015年9月11日、長良川国際会議場（岐阜県岐阜市）

安田綾乃、関谷路子、丸山弘子、永井隆之、清原寛章：メソトレキセート誘発小腸粘膜炎症に対する補中益気湯の制御作用と作用成分の解析．第32回和漢医薬学会学術大会、2015年8月22日、富山国際会議場（富山県富山市）

梶田祐三子、永井隆之、清原寛章：ワクチン経鼻接種モデルを用いた補中益気湯煎剤の粘膜免疫機構調節作用の解析．日本薬学会第135年会、2015年3月28日、兵庫医療大学（兵庫県神戸市）

黄子綾、永井隆之、鄭美和、伊藤剛、及川哲郎、花輪壽彦、井上岳、松原肇、清原寛章：高血糖モデルマウスでの呼吸器粘膜免疫系異常に対する八味丸煎剤の作用の解析．日本薬学会第135年会、2015年3月28日、兵庫医療大学（兵庫県神戸市）

安田綾乃、小堀雄貴、関谷路子、丸山弘子、清原寛章：メソトレキセート誘発小腸上皮障害に対する補中益気湯の制御作用と作用成分の解析．日本薬学会第135年会、2015年3月26日、神戸学院大学（兵庫県神戸市）

高田果奈、永井隆之、高井亮一、清原寛章：漢方方剤「小青竜湯」の抗炎症効果の作用機序の気道炎症モデルマウスを用いた検討．日本薬学会第135年会、2015年3月26日、神戸学院大学（兵庫県神戸市）  
小西成樹、白畑辰弥、永井隆之、清原寛章、平田望、横山将来、勝見達也、西野貴司、牧野一石、山田陽城、梶英輔、小林義典：マイクロフローリアクターを用いたオレアノール酸 C28 位の配糖化の検討とインフルエンザウイルスに対するアジュバント活性の測定．GlycoTOKYO 2014、2014年11月8日、千葉大学松戸キャンパス（千葉県松戸市）

Konishi N., Shirahata T., Nagai T., Hirata N., Yokoyama M., Katsumi T., Nishino T., Makino K., Kiyohara H., Yamada H., Kaji E., Kobayashi Y.: Glycosylation of oleanolic acid at C28 by using Flow Microreactor and evaluation of adjuvant activity against influenza virus. The 8th JSP-CCTGNM-KSP Joint Symposium on Pharmacognosy, 2014年9月13日、福岡大学（福岡県福岡市）

清原寛章、永井隆之：漢方薬の粘膜免疫機構に対する作用の解析．日本生薬学会第61回年会、2014年9月13日、福岡大学（福岡県福岡市）

高井亮一、永井隆之、山田陽城、清原寛章：瀉白散のウイルス性気道炎症に対する抑制作用の機序と活性成分の検討．第31回和漢医薬学会学術大会、2014年8月31日、

幕張メッセ国際会議場（千葉県千葉市）  
黄子綾、永井隆之、鄭美和、伊藤剛、及川哲郎、花輪壽彦、清原寛章：高血糖モデルマウスの呼吸器粘膜免疫系に対する八味地黄丸煎剤の作用の解析．第31回和漢医薬学会学術大会、2014年8月31日、幕張メッセ国際会議場（千葉県千葉市）  
梶田祐三子、永井隆之、清原寛章：補中益気湯煎剤の粘膜免疫機構に対する調節作用の解析．第31回和漢医薬学会学術大会、2014年8月31日、幕張メッセ国際会議場（千葉県千葉市）

小堀雄貴、永井隆之、白畑辰弥、小林義典、清原寛章：腸管パイエル板の免疫機能への和漢薬由来サポニン類の作用の解析．第31回和漢医薬学会学術大会、2014年8月31日、幕張メッセ国際会議場（千葉県千葉市）

#### 〔図書〕(計1件)

山田陽城、清原寛章、松本司、矢部武士、永井隆之、伊藤直樹：薬学生のための漢方医薬学（改訂第3版）（山田陽城、花輪壽彦、金成俊、小林義典編集）南江堂（東京）(2017)の第4章 pp. 193-254（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.lisci.kitasato-u.ac.jp:8080/bio_pharm)  
<http://www.kitasato-u.ac.jp/lisci/life/chart/LSI-lab25.html>  
<https://www.kitasato-u.ac.jp/research/gakubu/k111102105.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・准教授  
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・所長  
研究者番号：40214150

##### (4)研究協力者

高井亮一（TAKAI, Ryoichi）  
岡村和磨（OKAMURA, Kazuma）  
伊藤寛文（ITO, Hironori）