

平成 21 年 6 月 11 日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19590697  
 研究課題名（和文） 抗インフルエンザウイルス薬と漢方薬の併用療法による  
 早期ウイルス駆逐効果の検討  
 研究課題名（英文） The efficacy of combined administrations of antiviral drug and Kampo  
 formulations for early influenza virus expulsion.  
 研究代表者  
 扇谷 えり子 (OHGITANI ERIKO)  
 京都府立医科大学・医学研究科・助教  
 研究番号：80300820

研究成果の概要：老化促進モデルマウス SAMP1 に十全大補湯を投与すると、インフルエンザウイルス PR8 株感染における生存率が有意に上昇し、十全大補湯は免疫低下した動物モデルにおいてインフルエンザ感染防御効果があることが判明した。また、十全大補湯あるいは補中益気湯と抗ウイルス薬オセルタミビルとの併用投与では、オセルタミビル単独投与より、肺中ウイルス量を抑制する効果が得られる事が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般

キーワード：インフルエンザウイルス 漢方薬 抗ウイルス薬

## 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザは毎年多くの感染者を出している、重要なウイルス感染症の一つである。また、新型インフルエンザウイルス出現による、パンデミックの脅威も高まりつつあり、インフルエンザの予防、治療対策が急務となっている。抗ウイルス薬のオセルタミビルに対する耐性ウイルスが増加しているなかで、日本は他国に抜きん出てオセルタミビルを高頻度で使用している。リスクの高い高齢者に抗ウイルス薬を投与することは必要な処置であるが、新型インフルエンザのパンデミ

ックに備える意味においても、薬剤耐性ウイルスの出現率を抑制する努力が必要である。オセルタミビルは、感染初期に投与すれば症状が軽減され、体内のウイルス量も成人では平熱化とともに減少していくが、1歳児では平熱になってもウイルスが残存し、完全に淘汰されるのには投薬後約10日を要するという報告がある。また、オセルタミビルによる治療で成人の1%前後、小児では5.5%、小児でも低年齢層では20%前後に耐性ウイルスの発生が認められるとされている。免疫低下をきたしている高齢者においても、低年齢層と

同様の現象が認められると推測される。オセルタミビルは、治療開始後 4 - 5 日目以降という遅い時期に耐性ウイルスが出現し、投薬後のウイルス体内残留期間が長引くのに比例して、耐性ウイルス出現率が高まると考えられる。そこで、高齢者への抗インフルエンザウイルス薬投与の際に、免疫賦活効果のある漢方薬を併用することで、単独投薬時よりも体内のウイルス量を速やかに減少させることが期待できると考え、老化促進モデルマウスを用いて、基礎的な検討を行うこととした。

## 2. 研究の目的

本研究は以下のことを明らかにすることを目的とした。

(1) A 型インフルエンザウイルスに感染した老化促進モデルマウス(SAMP1)に投与して、生存率の上昇、症状軽減、早期ウイルス駆逐効果が認められる漢方薬。

(2) 選定した漢方薬の効果の作用機序。

(3) SAMP1-A 型インフルエンザウイルス感染系において、漢方薬および抗インフルエンザウイルス薬(NA 阻害剤)の併用投与群と抗ウイルス薬単独投与群の体重変化、肺中のウイルス量の変化の比較。併用投与は単独投与よりウイルスを早期に体内から駆逐する効果が認められるか。

## 3. 研究の方法

### (1) 漢方薬

十全大補湯(黄耆、桂皮、熟地黄、芍薬、川きゅう、白朮、当帰、人參、茯苓、甘草)あるいは、補中益気湯(人參二、黄耆、蒼朮または白朮、柴胡、当帰、升麻、陳皮、生姜、大棗、甘草)を6mg/mlで蒸留水に溶解し、感染1-4週間前より全期間中自由飲水により摂取させた。コントロール群は通常の飲水を摂取させた。

### (2) マウス

老化促進モデルマウスSAMP1雄、正常コントロールマウスSAMR1雄を用いた。いずれも日本エスエルシー株式会社より購入した。

### (3) ウイルス

インフルエンザウイルスA/Puerto Rico/8/34(PR8)株を使用した。ウイルスは11日齢の孵化鶏卵の尿膜腔に0.2ml接種し、37℃、48時間培養した。数時間4℃に静置した後、尿膜腔液を回収して5000 r.p.m、10分、4℃で遠心して上

清を採取し、フィルトレーションしてウイルスストック液とした。ストック液は使用時まで、-80℃で保存した。ウイルス感染価は、MDCK細胞を用いてplaque assayにより定法どおりに測定した。

### (4) LD<sub>50</sub>測定

10週齢のSAMP1およびSAMR1マウスについて1群5匹とし、10段階希釈した10<sup>2</sup>-10<sup>6</sup>pfu/30μlのウイルス液を経鼻接種し、感染後15日まで生死を観察して、Reed & Munch法でLD<sub>50</sub>を算出した。

### (5) 生存率

漢方薬投与開始後7日目に、10週齢のSAMP1マウスに10<sup>4</sup>pfu/30μlでPR8株を経鼻接種し、感染後15日まで生死を観察した。Kaplan Meier法により生存率を算出し、ログランク検定により漢方投与群とコントロール群の生存率の差の検定を行った。

### (6) 肺中のサイトカイン産生量とウイルス量測定

十全大補湯投与開始後7日目に、10週齢のSAMP1マウスに10<sup>4</sup>pfu/30μlでPR8株を経鼻接種した。コントロール群には、漢方薬の代わりに通常の飲水を投与した。両群とも感染7日後まで、経時的にそれぞれ4匹ずつsacrificeした。

肺ホモジナイズ上清について、IL-6、IL-10、IL-12p70、MCP-1、TNF-α、IFN-γ、IL-2、IL-4、IL-5をCytometric Bead Array System(Becton, Dickinson and Company)で、RANTES、MIP-1α、IL-1βをELISA法(Biosource International, Inc.)で測定した。ウイルス量の測定はplaque assayにより行った。サイトカイン産生量の有意差検定にはt検定を使用した。

### (7) 組織標本の作製と染色

10週齢のSAMP1マウスに10<sup>4</sup>pfu/30μlでPR8株を経鼻接種し、感染3日目および7日目に肺、脾臓、脳を採取し、10%ホルマリンで固定した。定法に従って70%アルコールより順次アルコール濃度を上げて脱水処理を行い、パラフィン包埋ブロックとし、約4μmの厚さの標本作製した。

それぞれの組織標本についてHematoxylin & Eosin染色を、肺組織標本についてはGram染色(組織用)も行った。Gram染色は、最終段階で組織観察用にピクリン酸で染色した。

(8)漢方薬，オセルタミビル併用投与実験  
十全大補湯あるいは補中益気湯、コントロール群として通常の飲水を感染4週間前から全期間投与した15週齢のSAMP1マウスに、ウイルスを $10^4$  pfu/30  $\mu$ lで経鼻接種し、感染4-5時間後から5日間、リン酸オセルタミビル5mg/200  $\mu$ lを1日2回経口投与した。感染2、5、8日目にマウスをsacrificeし、肺組織中のウイルス量を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1)十全大補湯によるインフルエンザウイルス感染防御効果

PR8株のLD<sub>50</sub>はSAMP1が $10^{2.8}$  pfu/30  $\mu$ l、SAMR1が $10^{4.5}$  pfu/30  $\mu$ lであり、SAMP1のインフルエンザウイルス感受性は有意に高かった。漢方薬投与実験において、2回の実験で十全大補湯投与群計20匹、コントロール群計18匹のSAMP1を使用した結果、十全大補湯投与群の生存率は70.0%、非投与群は33.3%となり、十全大補湯投与により生存率は有意に改善した(図1)。補中益気湯投与群はコントロール群と差異が認められなかった。このことから、十全大補湯は、免疫低下した動物モデルに対してインフルエンザ感染防御効果があることが認められた。

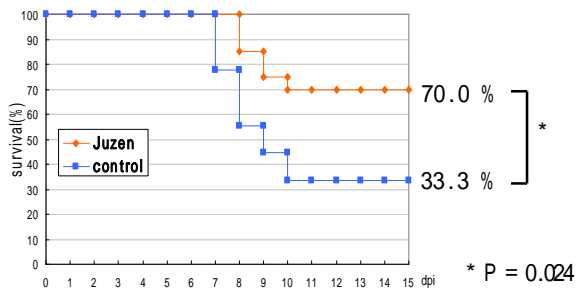


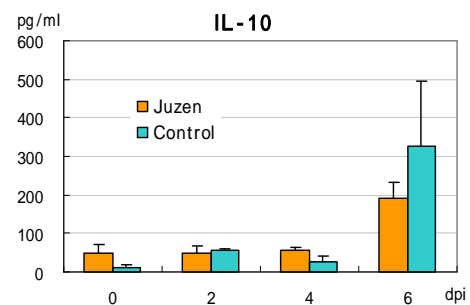
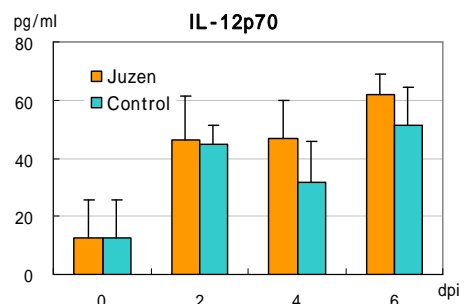
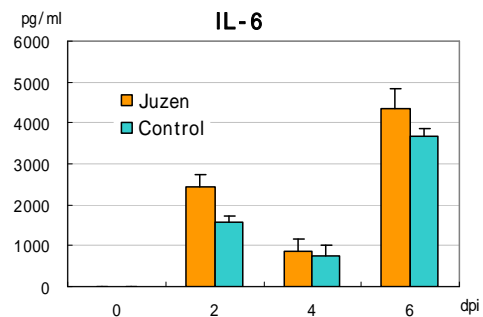
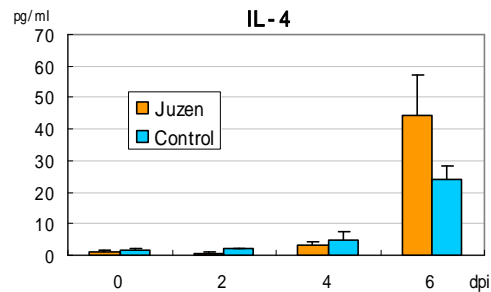
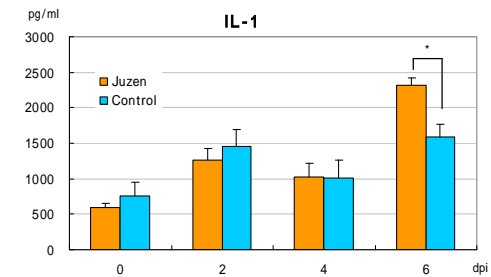
図1 SAMP1マウスのPR8株感染における十全大補湯投与群およびコントロール群の生存率

##### (2) 十全大補湯の作用機序。

SAMP1マウスのPR8株感染において、肺組織のIL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP-1, TNF-, IFN-, RANTES, MIP-1の産生量を測定したところ、IL-2, IL-5以外で感染後の上昇が認められ、感染6日目に最も上昇しているものが多かった。特に、IFN-, MCP-1の6日目の上昇率が高かった。RANTESのみ、感染2日目が最も高かった(図2)。

十全大補湯投与群とコントロール群で有意に産生量に差異が認められたのは、IL-1の

感染6日目であった。



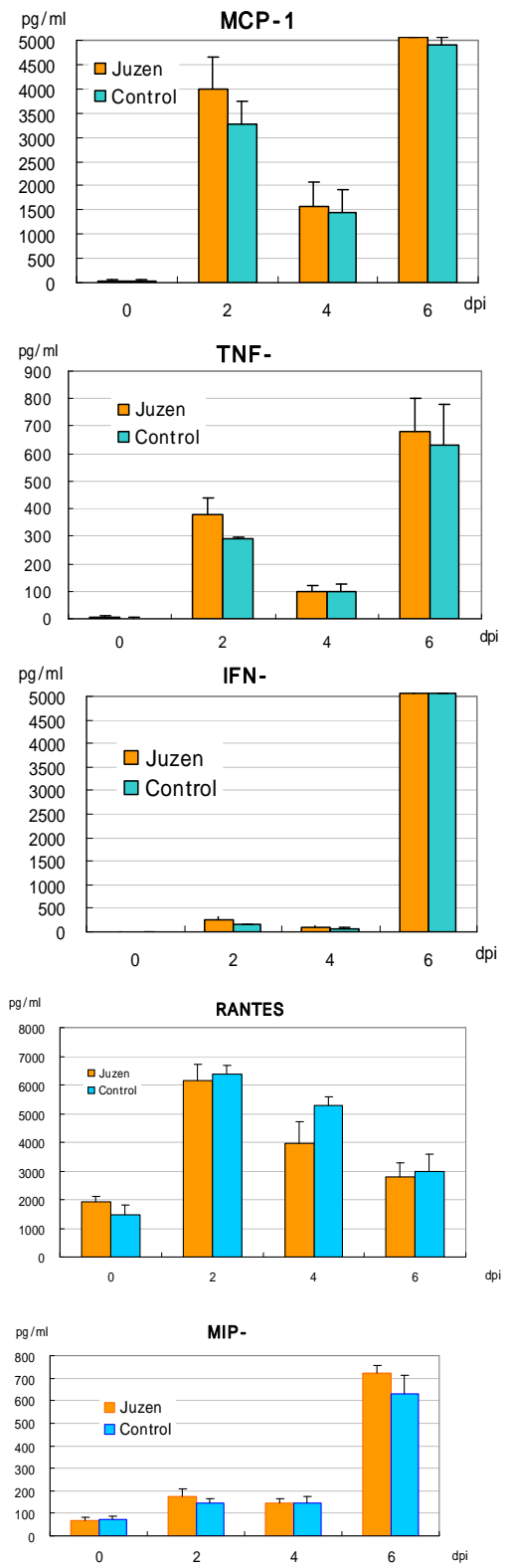


図2 PR8 株感染における肺組織中の各種サイトカイン産生量

肺組織中のウイルス量は、感染 2 日目に急激に上昇し、3 日目には低下した。そのまま同レベルを 7 日目まで維持した。両群間のウイルス量の差異は認められなかった(図

3)。ウイルス量測定の実験は 2 回行い、再現性があることを確認した。

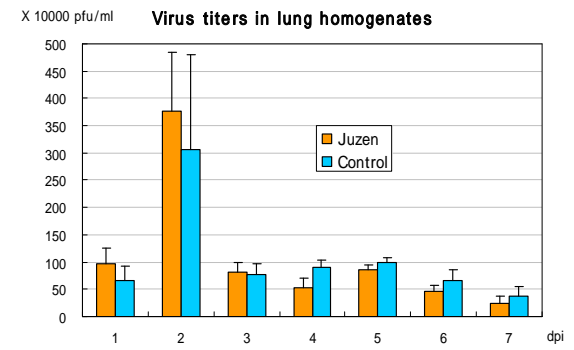
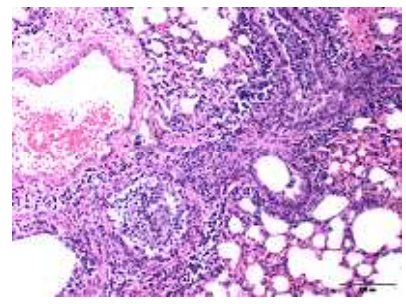


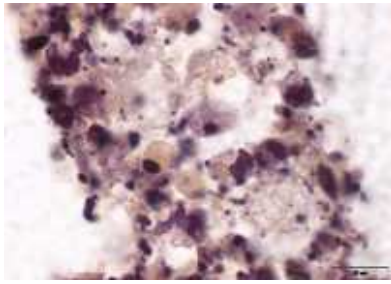
図3 肺組織中のウイルス量

SAMP1 マウスの肺は肉眼的には、感染 3 日目で点状出血が、7 日目では肺全体の激しい炎症が認められた。炎症部位の組織像はどちらも似通っており、気管支の周囲を中心として赤血球や白血球の滲出、浸潤が見られ、気管支内腔は、核崩壊した好中球およびその壊死物が、ほぼ内腔を閉塞していたり、変性剥脱した気管支粘膜上皮に代わり気管支壁に付着したりしていた。白血球浸潤が気管支を中心に起こっていること、特に気管支内腔で化膿性の変化を見ること、肺胞の変化が気管支の区域単位で起こっていることなどから経気道的に起きた炎症と考えられた。また、Gram 染色により、Gram 陽性の細菌が観察された(図4)。脾臓および脳の組織所見に変化は認められなかった。

A. 3 dpi

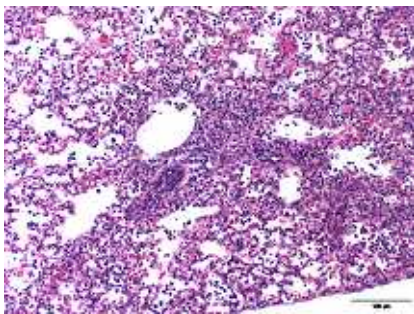


HE X100



Gram X1000

B. 7 dpi



HE X100

図4 感染3日目および7日目の肺組織

SAMP1 マウスの PR8 株感染において、次のような理由から、ウイルス感染に続発してひきおこされた細菌性肺炎が関与しているものと思われた。肺中のウイルス量が、十全大補湯投与群、非投与群とも、マウスが感染後7日目から死に始めるにもかかわらず、感染2日目に急激に上昇した後3日目には低下した。両群とも肺組織中のサイトカインは、かなり産生量の高いものが多く、また、感染2日目に小ピーク、6日目に大ピークと2相性の上昇が認められるものが多かった。肺組織所見では、感染後3日目で気管支に好中球の浸潤が強く見られ、細菌が散見された。感染7日目の肺の炎症像は激烈であった。肺組織中の細菌はウイルスを鼻腔接種した際に鼻腔に常在していたものが侵入したか(ウイルス液のコンタミネーションではないことを確認済み、Mock 感染では肺に変化がなかった)、もともと肺に存在していたものと考えられる。

PR8 株感染において、十全大補湯投与による

肺組織の IL-1 産生促進が認められたが、このことがマクロファージや好中球の活性化と関連性があり、細菌2次感染に抑制的に働いて、生存率を改善したことが示唆された。

### (3) 漢方薬およびオセルタミビルの併用投与によるウイルス早期駆逐効果

オセルタミビル単独投与群では、一旦低下した肺組織中のウイルス量が感染8日目に増加した。これは、感染5日目でオセルタミビルの投与を終了しているため、ウイルスが再び増加したものと考えられる。しかし、併用投与群では十全大補湯、補中益気湯ともに、感染8日目もさらに低下していたことから、これらの漢方薬はウイルス駆逐に寄与していると思われた(図5)。併用投与実験はまだ実験途中でさらにデータを重ねる必要がある。

X10000 Virus titers in lungs homogenates

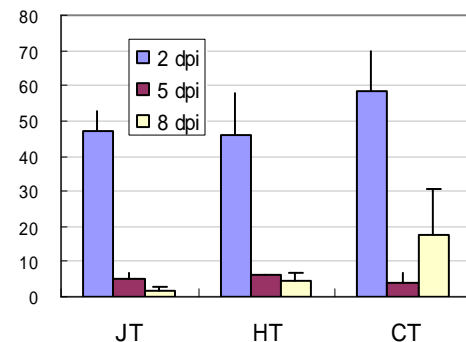


図5 漢方併用投与群、オセルタミビル単独投与群のウイルス量

JT：十全大補湯、オセルタミビル併用投与  
HT：補中益気湯、オセルタミビル併用投与  
CT：オセルタミビル単独投与

### 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)

[学会発表](計1件)

扇谷 えり子、喜多 正和、今西 二郎

老化促進モデルマウスにおける十全大補湯によるインフルエンザウイルス感染防御効果の検討

第55回日本ウイルス学会

平成19年10月21日

札幌コンベンションセンター

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

扇谷 えり子 (OHGITANI ERIKO)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：80300820

### (2)研究分担者

今西 二郎 (IMANISHI JIRO)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：40112510

喜多 正和 (KITA MASAKAZU)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：60153087