

平成 21 年 3 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2008
課題番号：19592432
研究課題名 (和文) 東洋の知に基づく感染予防に関する研究
研究課題名 (英文) Study on the infection control and prevention based on oriental philosophy
研究代表者 落合 宏 (OCHIAI HIROSHI) 富山大学医学薬学研究部 (医学)・教授 研究者番号：30018692

研究成果の概要：東洋の知に基づく和漢薬を対象にすることは、感染予防の面からも西洋医学にはない新たな可能性が期待できる。その和漢薬の一つ桂皮アルデヒド (シナモン) (200～20 μ M) はインフルエンザウイルス感染後 3-4 時間の 1 時間添加した時最大のウイルス増殖抑制作用を示した。またその芳香吸入は感染マウスの生残率を有意に改善した。そこで再度芳香暴露の影響を検討したところ、37℃、1 時間芳香暴露で生残ウイルスはおよそ 1/10 に減少することを見いだした。このことからシナモン芳香暴露はインフルエンザウイルス感染予防に有用かつ新しい方法であることが示唆された。同時にマイタケ抽出液は、マクロファージを刺激し抗インフルエンザウイルス蛋白質 (TNF- α) を産生させることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬分野

科研費の分科・細目：看護管理学

キーワード：感染看護、和漢薬、インフルエンザウイルス、芳香暴露、シナモン、マイタケ

1. 研究開始当初の背景

(1) 2004年と2006年に韓国と中国をホストに国際伝統看護学会議が中国、台湾、タイ、チベット、米国、カナダ、ノルウェーおよび日本からのおよそ100名の参加の基に開催されている。この会議では、参加諸国より、自国の伝統的看護に関する研究・教育の現状が報告され、米国からは、伝統的看護を人間全体から見ると新しい治療パラダイムとして位置付けられていること、看護師のみならず民間人からも

その需要が高まっていることが明確に述べられた。このことは、看護の分野においても、西洋医学が取り残したものを補完するものとしての伝統的看護の重要性の認識が浸透してきたことを意味し、新たな看護実践への発展への可能性が強く示唆される。しかしながら、伝統看護を「経験」から「科学」として確立するためには、科学的根拠の蓄積が必要である。本学科も、東西医学融合を建学理念とし

た学問的環境（平成15年には「東洋の知に基づく個の医療の創生」でCOEに採択）の中で、平成17年度入学生に適用された新カリキュラムには「東洋の知と看護」を開設し、定期的な勉強会を開催している。私も、上記国際会議に3題を発表し、かつCOEリサーチフェローとして、また微生物学担当の看護学科専任教官として、東洋医学、特に和漢薬の感染看護への活用を模索してきた。しかも感染看護の分野は、対感染症（対病原体）との関わりが第1義的な研究テーマであり、他看護研究分野に比し、客観的評価あるいは科学的根拠が得易い研究分野としての特徴がある。この点からも、感染看護の分野は伝統的看護を「経験」から「科学」として確立する門戸となりうるものと考えた。

(2) このような視点に立ち、インフルエンザウイルスを対象にして種々和漢薬の増殖抑制作用を検討してきた。その結果、麻黄は、感染細胞に直接添加することで増殖を抑制すること。一方、乾姜は、直接添加では増殖抑制作用は示さないが、生体防御機能の中で重要な役割を果たしているマクロファージを刺激し腫瘍壊死因子（TNF- α ）を介して間接的にウイルス増殖を抑制することを見いだした。このように、東洋の知に立脚した和漢薬にインフルエンザウイルス感染予防に有用なものがあることの知見を得たことが本研究の背景にある。

2. 研究の目的

本研究は、上記の知見をさらに拡大するために、麻黄のように、直接感染細胞に添加してウイルス増殖抑制作用を示す和漢薬の探索および乾姜のようなマクロファージ介在性に増殖抑制効果を発揮する物質のさらなる探索を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試薬：Trans-cinnamaldehyde（シナモン、和光純薬、大阪）と *Eucalyptus radiata* 由来植物オイル（ユーカリ、ロット番号 BIOERFEGR0904、健草舎、山梨）は適宜 Eagle's minimum essential medium(MEM)で希釈した。マイタケ子実体加熱（120℃、30分）抽出物の凍結乾燥粉末（ME）およびMEの限外濾過分画凍結乾燥粉末（雪国まいたけ、新潟）は秤量後、Dulbecco's MEMに溶解し、内毒素を除去するために数回ミリポアフィルターで濾過滅菌した。

(2) インフルエンザウイルス：A型 Aichi 株、A型 PR8 株および B型 Sing 株の感染漿尿液を適宜希釈して用いた。

(3) マクロファージ介在性ウイルス増殖抑制の検討：マウスマクロファージ由来細胞株 P388D1 細胞に種々濃度の ME（あるいはその分画）を加え、その培養液（CM）を経時に採取し下記の実験に使用した。

(4) ウイルス増殖の検討：イヌ腎由来 MDCK 細胞を感染細胞として用いた。ウイルス増殖実験には、24穴プレートに培養した MDCK 細胞にウイルスを感

染後、上記 CM あるいはシナモンを添加し、一定時間培養後、培養上清中のウイルス量を MDCK 細胞によるブラック法で算定した。

(4) 芳香暴露によるウイルスの不活化および増殖抑制の検討：3.5cm ディッシュに、シナモン（主として原液）100 μ l を入れた小容器を置き、小容器周囲にウイルス液を注入し、ビニールテープで密閉後芳香暴露した。その後、経時的にウイルス液を回収し、生残ウイルス量をブラック法で計測した。

(5) 芳香暴露のブラック形成に及ぼす影響：6cm ディッシュを用い、MDCK 細胞にウイルスを感染し、ブラック用寒天培地を重層した。寒天が固化後逆さにし、ディッシュ蓋中央に滅菌円形濾紙を置き、希釈シナモン（或いは植物精油）を 40 μ l 加え、48 時間芳香暴露した。その後、出現したブラック数を算定した。

4. 研究成果

(1) マクロファージ介在性抗インフルエンザウイルス物質の探索

新たに ME に乾姜同様な抗インフルエンザウイルス作用のあることを見いだした。ME で 10 時間マクロファージ刺激後の CM を感染細胞に加えると、増殖ウイルス量は対照のおよそ 45% に減じた。さらに ME を限外濾過法により、分子量 >100 万、100 万～30 万、<30 万の 3 つに分画した場合、マクロファージに最も強いウイルス増殖抑制を導いたのは 100 万～30 万の分画であり、ウイルス量は対照のおよそ 30% に減じた。このウイルス増殖抑制は、広域スペクトラムを示し用いた 3 ウイルス株に対して発揮された。ME 刺激で得た培養上清のウイルス増殖作用機構も、乾姜と同じであり、TNF- α によるウイルス蛋白合成阻害であることを確認した。これら結果より、予めマイタケを摂取しておくことは、生体防御機能で重要なマクロファージを刺激しインフルエンザウイルス感染に有効な防御能を付与する可能性が示唆された。

(2) シナモン直接添加によるインフルエンザウイルス増殖抑制作用

まず、細胞毒性を示さない濃度のシナモン（<200 μ M）を用い、ウイルス感染細胞に添加した時、10 時間後のウイルス量は、いずれのウイルス株（3 株）でも濃度依存的に減少した。そこで PR8 株を用い、感染後 1 時間毎にシナモン添加時間をずらして 1 時間だけ添加した。図 1 のように、シナモン（40 μ M）が感染後 3-4 時間の 1 時間に存在した時が最大の増殖抑制を示した。この増殖抑制機序を検討したところ、ウイルス mRNA は通常に合成されるが、翻訳レベルでウイルス蛋白合成が阻害されていることを明らかにされた。

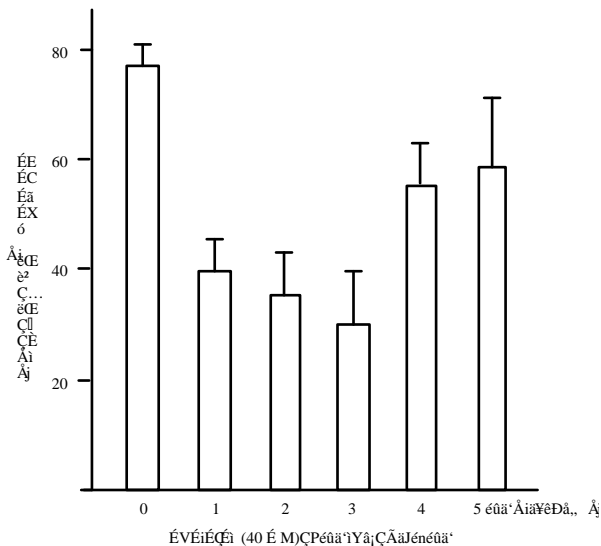


Figure 2: Survival rates (%) over 5 days post-infection.

この結果をもとに、PR8 株感染マウスへのシナモン投与を点鼻投与群と吸入投与群および無投与対照群で感染後 10 日目の生残率を比較したところ(図 2)、点鼻投与群(250 μg/匹/日)、吸入投与群(50mg/籠/日) および対照群の生残率は、それぞれ 30%、80% および 20%であり、吸入投与群が、他 2 群に対して有意に高くなることを見いだした。そこで、下記のようにシナモン芳香暴露のインフルエンザウイルス不活化作用を検討した。

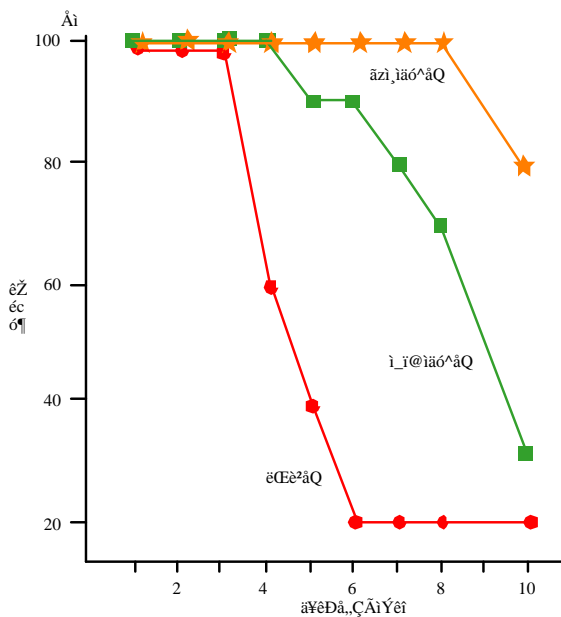


Figure 3: Survival rates (%) over 10 days for different groups.

(3) シナモン芳香暴露のインフルエンザウイルス不活化作用

まず A 型 Aichi 株を用いて、シナモン原液からの芳香暴露を検討したところ、図 3 に示したように、ウイルス不活化は温度と暴露時間依存性に起こるこ

とを明らかにした。20℃では、2 時間暴露でもウイルス生残率は 46.5%であったが、28℃では 16.3%と生残率が顕著な減少を示した。37℃で暴露すると最大の不活化作用が得られ、15 分と 30 分暴露では生残ウイルス率は 87%~86%であったが、45 分暴露で 28%と急速に減少し、最終的に 1 時間暴露で 10.4%まで減少した。

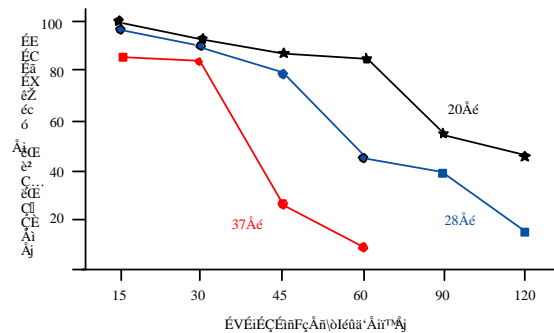


Figure 3: Virus survival rates (%) over 120 minutes at different temperatures.

そこで、A 型 PR8 株と B 型 Sing について同様に 1 時間暴露したところ、それぞれのウイルス株の生残率は、15.7%と 18.4%であった。但しシナモン 10 倍希釈液芳香暴露のウイルス不活化作用は弱く、1 時間暴露後の 3 株ウイルスの生残率は 65~68.6%に止まった。

さらに、プラック形成中 48 時間にわたり種々濃度のシナモンを芳香暴露したところ、250 倍希釈シナモンは強い細胞毒性を発揮し、細胞は脱落した。500 倍希釈シナモン芳香暴露のプラック数は非暴露対照と同じであり、プラック形成抑制効果は示さなかった。しかし、図 4 に示したように 380 倍希釈シナモンを芳香暴露したところ、芳香が直接当たるディッシュ中央部から周辺に向けてプラック形成が抑制される所見を得た。プラック形成率は、3 株で対照の 42.1%~50.9%であった。植物精油であるユーカリ(30%液)芳香暴露も同様に、プラック数をほぼ 50%に減じた。

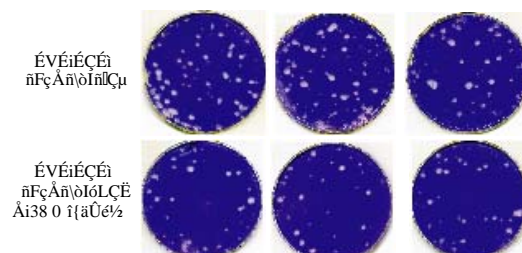


Figure 4: Plaque formation in cell culture dishes under different conditions.

このように、シナモン芳香暴露は、インフルエンザウイルス不活化作用があること、また、プラック形成抑制実験により、感染してしまったウイルスでも、子孫ウイルス量は減少しプラック形成までにはいたらずにその増殖が抑制されることを初めて明らかにした。

これらの結果は、上記感染マウスのへの吸入投与の効果の一部を説明するものと考えられた。

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 15 件)

(1) 中平比沙子、小尾信子、宮原龍郎、落合宏：植物精油の直接接触および芳香暴露の抗インフルエンザウイルス作用に関する研究、アロマセラピー学雑誌、9: 38-46, 2009.

(2) Hamazaki T., Suzuki N., Ochiai H., et al. (7名、6 番目)：The depressive effects of 5, 8, 11-eicosatrienoic acid(20:3n-9) on osteoblasts. *Lipids* 44:97-102, 2009.

(3) Obi N., Hayashi K., Ochiai H., et al. (9名、9番目)：Inhibitory effect of TNF- α produced by macrophages stimulated with *Grifola frondosa* extract (ME) on the growth of influenza A/Aichi/2/68 virus in MDCK cells. *Am. J. Chinese Med.* 36:1171-1183, 2008

(4) Matsuya Y., Imamura Y., Miyahara T., Ochiai H., and Nemoto H.: Approach to a new dihydrofuran-fused cyclic system by a remarkable switching of endolexo selectivity of a [4+2] cycloaddition reaction. *Eur. J. Org. Chem.* 1426-1430, 2008.

(5) 吉井美穂、八塚美樹、塚原節子、落合 宏：看護学生の臨地実習における感染防止対策に関する意識と実際。富山大学看護学会誌 8(1)：63-67, 2008.

(6) 境美代子、吉井美穂、小尾信子、落合 宏：看護師の試験的使用を通じたゲル状擦式手指消毒剤の評価。富山大学看護学会誌 8(1)：33-40, 2008.

(7) 村田亜悠美、小尾信子、中平比沙子、宮原龍郎、落合 宏：ホタテ貝殻焼成粉末の殺菌および殺インフルエンザウイルス作用について。富山大学看護学会誌 7(2)：39-49, 2008.

(8) 長 光代、落合 宏、上野栄一：終末期がん患者の男性家族員が捉えたギアチェンジ。富山大学看護学会誌 7(2)：15-28, 2008.

(9) 安東則子、小尾信子、宮崎 剛、落合 宏：ポリクオタニウム-51 含有エタノールの手指消毒効果とマウス皮膚保護作用。日本環境感染学会誌 23:35-39, 2008.

(10) 山根節子、落合 宏：看護の場のダブルバインド。看護展望 32：89-94, 2007.

(11) 河野 彩、小尾信子、吉井美穂、宮原龍郎、落合 宏：Lamp 法によるセラチア菌の迅速診断に関する研究。

(12) Obi R., Tohda M., Ochiai H., et al. (10名、9番目)：Chotosan enhances macrophage colony-stimulating factor mRNA expression in the ischemic rat brain and C6Bu-1 glioma cells. *Biol. Pharm. Bull.* 30(12)：2250-2256, 2007.

(13) Matsubara H., Yoshii M., Miyahara T., Obi N., and Ochiai H.：Study on the infection-preventive characteristics of Japanese green tea. *J. Nursing Soc. of Univ. Toyama* 7:23-31, 2007.

(14) Matsuya Y., Sasaki K., Ochiai H., and Nemoto H.：Synthesis and biological evaluation of dihydrofuran-fused perhydrophenanthrenes as a new anti-influenza agent having novel structural characteristic. *Bioorg. Med. Chem.* 15:424-432, 2007.

(15) Hayashi K., Imanishi N., Ochiai H. (7名、7番目)：Inhibitory effect of cinnamaldehyde, derived from Cinnamomi cortex, on the growth of influenza A/PR/8 virus in vitro and in vivo. *Antiviral Res.* 74:1-8, 2007.

[学会発表] (計 11 件)

(1) 吉井美穂、小尾信子、宮原龍郎、落合宏：茶抽出液が細胞に及ぼす影響。第 9 回富山大学看護学会学術集会。2008, 12月4日, 富山。

(2) Obi N., Nakahira H., Nishitani M., Miyahara T., and Ochiai H.：Inhibitory effect of an essential oil derived from *Melaleuca alternifolia* on the influenza virus infection in in vitro. The 7th East Asian Conference on Infection Control and Prevention, 11, 13, 2008, Soul, Korea.

(3) Hamazaki T., Suzuki N., Widyowati R., Miyahara T., Kadota S., Ochiai H. and Hamazaki K.：The effect of n-9 eicosatrienoic acid (mead acid) on osteoblasts. *International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids*, 2008, 5, 17, Kansas City, USA.

(4) Obi N., Nakahira H., Miyahara T., and Ochiai H.：Attitude of the nursing school students to learn Kamp (Japanese herbal) medicine. 2008 International Conference on Traditional Nursing. 2008, 5, 2, Toyama.

(5) Nakahira H., Obi N., Miyahara T. and Ochiai H.：Inhibitory effect of several essential oils on the growth of influenza virus. 2008 International Conference on Traditional Nursing. 2008, 5, 2, Toyama.

(6) Hayashi K., Obi N., Kashiwayama Y., Terasawa K., Shimasa Y. and Ochiai H.：Evaluation of inhibitory effect of cinnamaldehyde, derived from Cinnamomi cortex, on the growth of influenza virus in vitro and in vivo. 2008 International Conference on Traditional Nursing. 2008, 5,

2, Toyama.

(7) 片田祐子, 八塚美樹, 落合宏: 医療安全教育分野のシュミレーション教育に関する日米比較. 第 8 回富山医科薬科大学看護学会学術集会, 2007, 11 月 17 日, 富山.

(8) 小尾信子, 中平比沙子, 嶋田豊, 落合宏: 乾姜エキスの抗インフルエンザウイルス作用について. 富山大学 21 世紀 COE プログラムシンポジウム, 2007, 11 月 16 日, 富山.

(9) 林 克美, 小尾信子, 嶋田 豊, 寺澤捷年, 落合宏: 桂皮アルデヒドの抗インフルエンザウイルス作用について. 21 世紀 COE プログラムシンポジウム, 2007, 11 月 16 日, 富山.

(10) 小尾信子, 中平比沙子, 吉井美穂, 宮原龍郎, 落合宏: 乾姜エキスの A 型インフルエンザウイルス増殖抑制に関する研究. 第 44 回日本細菌学会中部支部総会, 2007, 10 月 11 日, 愛知.

(11) 吉井美穂, 中平比抄子, 小尾信子, 落合宏, 太田美智雄.: 茶抽出液による EHEC 0157 の増殖抑制効果とその形態学的変化. 第 44 回日本細菌学会中部支部総会, 2007, 10 月 11 日, 愛知.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

落合 宏 (OCHIAI HIROSHI)

富山大学・医学薬学研究部 (医学)・教授

研究者番号: 30018692

(2) 研究分担者

吉井 美穂 (YOSHII MIHO)

富山大学・医学薬学研究部 (医学)・講師

研究者番号: 30334733