

機関番号：32607
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590705
 研究課題名（和文） 漢方方剤「麻黄湯」のインフルエンザウイルス感染に対する抗病効果と薬効機序の解析
 研究課題名（英文） ACTION MECHANISM OF A KAMPO MEDICINE “MAOTO” 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

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、漢方方剤「麻黄湯」を治療的に経口投与すると、解熱作用を示し、感染2日後において鼻腔及び肺でIFVの増殖を抑制した。また、麻黄湯は感染2日後において、鼻腔・肺・血清中の抗IFV抗体を上昇させた。一方、非感染マウスに麻黄湯を経口投与しても、肺及び血清中のIFV結合性抗体が上昇した。これらの結果より、麻黄湯は自然抗体の上昇により抗IFV活性を示すことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Oral administration of a Kampo medicine “maoto” showed antipyretic activity, and reduced influenza virus (IFV) titers in nasal wash and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of mice at 2 days post infection. Maoto increased anti-IFV antibody titers in nasal wash, BALF and serum at 2 days post infection. Maoto also increased IFV-bound antibody titer in BALF and serum of uninfected mice. These results suggest that maoto shows anti-IFV activity through the increment of natural antibody.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科一般（含心身医学）

キーワード：漢方薬、麻黄湯、インフルエンザ、解熱作用、自然抗体、東洋医学

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザはインフルエンザウイルス(IFV)による急性感染症の一種で、毎年冬期に流行し、39℃以上の発熱、頭痛、関節痛、筋肉痛など、全身症状が強い重篤な疾病である。また近年、高病原性鳥IFV(H5N1)のヒトでの流行も危惧されている。現在、インフルエンザの予防には、ワクチンが用いられており、治療の第一選択薬としては、オセルタミビル(OSE)が頻用されている。しかし、OSE

の成人に対する有用性は認められるものの、1歳未満の小児への安全性が確立されておらず、また、インフルエンザの治療中にOSE耐性IFVが出現し、その比率も増加しているなど、OSE投与に伴う安全性や有効性に関する問題も危惧されている。そのため、インフルエンザに対して、安全かつ有効に多様な患者に対応するために、新薬の開発を含め、治療薬の選択の幅を広げていくことが望まれる。

2. 研究の目的

医療用漢方製剤として保険適用が認められている 148 種類の漢方方剤の中で唯一、麻黄湯は、適応の項に「インフルエンザ」の記載があり、経験的にインフルエンザの治療に用いられてきた。しかし一部、臨床試験について報告されているが、基礎研究による麻黄湯のインフルエンザに対する有効性の評価や作用機序の検討は、未だ行われていない。そこで本研究は、麻黄湯の EBM (evidence-based medicine) の確立を目的に、インフルエンザに対するその有効性と薬効発現機序について、培養細胞を用いた *in vitro* の評価系と *in vivo* のマウス感染モデルによる評価系を用い、検討した。

3. 研究の方法

麻黄湯(構成生薬: 麻黄、桂皮、杏仁、甘草)は、北里大学東洋医学総合研究所漢方処方集に従い調製し、煎出後の煎液を凍結乾燥したものを実験に用いた。

(1) *In vitro* 抗 IFV 活性

MDCK 細胞を用いて、single-cycle replication 法及び multi-cycle replication 法で抗 IFV 活性を測定した。

(2) *In vivo* における IFV 感染に対する作用

マウス(雌性、実験開始時 7 週齢)に、ネンブータル注射液(50 mg/kg)を腹腔内投与して麻酔し、IFV (20×LD₅₀)を両側鼻腔に 1 µl 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、麻黄湯の煎液または水を給水瓶から自由摂取させた。感染 0 時間から 120 時間後まで、直腸体温を測定した。感染 2 日後と 5 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 IFV 特異的 IgA、IgG₁ 及び IgM 抗体価は ELISA 法で測定した。ウイルス価は、プラーク形成法で測定した。

(3) インフルエンザワクチンによる吸収試験

血清あるいは肺洗液に IFV A/PR/8/34 ワクチンを添加し、4°C で一晩インキュベーションした後、遠心分離し、その上清をサンプルとして ELISA 法により IFV 結合性抗体価を測定した。

(4) IFV 中和作用の測定

IFV に肺洗液を添加し、37°C で 1 時間インキュベーションして中和反応をさせた後、IFV 価をプラーク形成法により測定した。

(5) NK 活性の測定

脾臓細胞の NK 活性は YAC-1 細胞を標的として Flow cytometer を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) *In vitro* 抗 IFV 活性

Multi-cycle replication 法と single-cycle replication 法ともに、麻黄湯並びにその構成生薬に顕著な抗 IFV 作用は認められなかつ

た。また、麻黄湯には IFV のシリアダーゼを阻害する作用は認められなかった。

(2) *In vivo* における IFV 感染に対する作用

まず、7 系統のマウス(DBA/2、ICR、C57BL/6、BALB/c、A/J、C3H/HeJ、ddY)に IFV A/PR/8/34 (H1N1) を上気道感染させ、体温変化に対する影響について、検討を行ったところ、A/J マウスが最も鋭敏な発熱反応を示した。そこで、A/J マウスを用いて、IFV A/PR/8 感染に対する麻黄湯の作用の検討を行った。その結果、水投与群と比較して、麻黄湯(0.9 g/kg/day)投与群では、感染 52、120 時間後に有意な解熱作用が、また麻黄湯(1.6 g/kg/day)投与群では、感染 24、28、32、36、48、52 時間後に有意な解熱作用が見られた(図 1)。

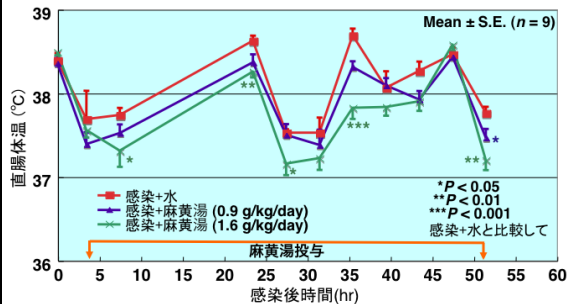


図 1 IFV A/PR/8 を感染させた A/J マウスの直腸体温に対する麻黄湯の影響

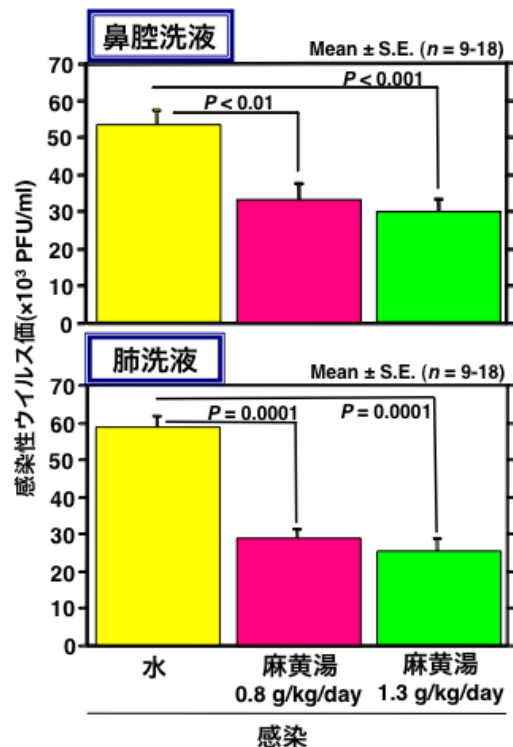


図 2 IFV A/PR/8 を感染させた A/J マウスの感染 2 日後の鼻腔洗液及び肺洗液のウイルス価に対する麻黄湯の影響

さらに、感染2日後において、水投与群と比較して、麻黄湯(0.8 g/kg/day, 1.3 g/kg/day)投与群では、肺洗液と鼻腔洗液のウイルス価が有意に低下した(図2)。

また、麻黄湯(0.8 g/kg/day)投与群では、水投与群と比較して、血清抗ウイルス IgG₁ 抗体価、肺洗液抗ウイルス IgA 抗体価及び鼻腔洗液抗ウイルス IgM 抗体価が有意に上昇し、麻黄湯(1.3 g/kg/day)投与群では、肺洗液抗ウイルス IgA 抗体価、血清抗ウイルス IgG₁ 抗体価が有意に上昇した。さらに、A/J マウスに IFV B/Ibaraki/2/85 を上気道感染させ、麻黄湯(1.6 g/kg/day)を経口投与したところ、感染 32、44、52 時間後に有意な解熱作用が認められた。また、感染5日後において、水投与群と比較して、麻黄湯(1.0 g/kg/day, 1.6 g/kg/day)投与群で、肺洗液と鼻腔洗液のウイルス価の有意な低下が認められた。

(3)非感染 A/J マウスに対する作用

非感染の A/J マウスに麻黄湯を投与することにより、血清及び肺洗液中の IFV 結合性 IgM 抗体価、血清中の IFV 結合性 IgG₁ 抗体価の有意な上昇が認められた。また、この血清及び肺洗液中の IFV 結合性 IgM 抗体価は、インフルエンザワクチンで吸収することにより、吸収前と比較してその有意な低下がみられた。さらに、IFV に対する中和作用を検討したところ、麻黄湯を投与したマウスの肺洗液によって IFV 価の低下傾向が認められた。

一方、感染早期の自然免疫の主要因子の一種である NK 細胞への麻黄湯の作用を検討したところ、IFV 感染した A/J マウスに麻黄湯を投与しても脾臓細胞の NK 活性の上昇は認められなかった。

(4) BALB/c マウスにおける IFV 感染に対する作用

IFV 感染後の BALB/c マウスに麻黄湯(0.2 g/kg/day, 1.0 g/kg/day)を経口投与し、感染2および4日後における鼻腔洗液の IFV 価を測定したが、その低下はわずかであり、有意ではなかった。

(5)構成生薬の一味抜き処方による抗 IFV 活性成分

IFV を感染させた A/J マウスに、麻黄湯または構成生薬の一味抜き麻黄湯を投与したところ、麻黄湯と比較して構成生薬のいずれを除いても肺洗液および鼻腔洗液における IFV 価を低下させる作用の減弱が認められた。

(6)まとめ

In vitro に比べ、*in vivo* で麻黄湯の IFV 感染に対する作用が顕著に見られたことから、麻黄湯はウイルスに対する直接的な作用よりも、宿主の免疫機能を介した作用の寄与が大きいことが示唆された。また、麻黄湯は、A 型の H1N1 亜型及び B 型ウイルスの A/J マウスへの感染に対して、解熱作用及び気道

でのウイルス増殖の抑制作用を示すことが明らかになった。さらに、血清抗ウイルス IgG₁ 抗体価、肺洗液抗ウイルス IgA 抗体価及び鼻腔洗液抗ウイルス IgM 抗体価を有意に上昇させる作用が認められたことから、麻黄湯は、IFV 感染マウスの全身及び局所の粘膜免疫系の促進を介して、気道でのウイルス増殖を抑制することが示唆された。また、非感染 A/J マウスにおいても IFV 結合性抗体価を上昇させる作用が確認された。加えて、インフルエンザワクチンでの吸収処理によりその IFV 結合性抗体価が低下するとともに、中和作用の検討において IFV 価の低下傾向が認められた。さらに、NK 活性の増強が認められなかったことから、麻黄湯の抗 IFV 作用には、その機序の一つとして IFV と結合性を有する自然抗体が関与している可能性が示唆された。この作用が麻黄湯が早期に薬効を発現することに関与していることを推定した。

また、一味抜き麻黄湯を用いた検討において、いずれの生薬を抜いても麻黄湯の作用が低下したことから、麻黄湯の抗 IFV 活性は4種類の構成生薬に含まれる活性成分の相互作用によって生じている可能性が示唆された。

さらに、麻黄湯の抗 IFV 活性はマウスの系統により相違することが認められたが、麻黄湯は臨床で実証の患者に用いられていることから、その応答性が異なったことが考えられる。

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3件)

- 1) Nagai T., Shimizu Y., Shirahata T., Sunazuka T., Kiyohara H., Ōmura S., Yamada H.: Oral adjuvant activity for nasal influenza vaccines causes by combination of two trihydroxy fatty acid stereoisomers from the tuber of *Pinellia ternata*. *Int. Immunopharmacol.* **10** (6), 655-661 (2010). 査読有
- 2) 山田陽城、清原寛章、松本 司、永井隆之: 小児の漢方療法—エキス剤を使いこなそう II. 漢方の基礎と薬効・その展開 漢方薬と免疫. 小児科診療, **73** (3), 387-391 (2010). 査読有
- 3) Nagai T., Nakao M., Shimizu Y., Kodera Y., Oh-Ishi M., Maeda T., Yamada H.: Proteomic analysis of anti-inflammatory effects of a Kampo (Japanese herbal) medicine 'shoseiryuto (xiao-qing-long-tang)' on airway inflammation in a mouse model. *Evid.*

Based Complement. Alternat. Med.
2009 Oct 27. [Epub ahead of print] 査
読有

[学会発表] (計 18 件)

- 1) 青木悠香、永井隆之、穂苺 玲、山田陽城：
漢方方剤「麻黄湯」のインフルエンザウイ
ルス感染に対する薬効機序の検討。日本薬
学会第 131 年会、2011 年 3 月 31 日、静
岡
- 2) Yamada H., Nagai T., Yabe T.: Search of
anti-infectious and anti-depressant-like
substances from the Kampo medicines
through elucidation of their action
mechanism. NRCT-JSPS Core
University Program on Natural
Medicine in Pharmaceutical Sciences,
The 9th Joint Seminar, 2010 年 12 月 8 日,
Bangkok, Thailand
- 3) 山田陽城、清原寛章、永井隆之、松本 司、
矢部武士:漢方薬の作用メカニズムの解析
から学ぶこと。第 18 回天然薬物の開発と
応用シンポジウム、2010 年 11 月 12 日、
東京
- 4) 永井隆之、山田陽城:プロテオミクスは漢
方医薬学に貢献できるか?—プロテオーム
解析による漢方薬の薬効解明とマーカ
ー探索の成果と課題—。第 8 回北里疾患プ
ロテオーム研究会、2010 年 9 月 2 日、東
京
- 5) 青木悠香、永井隆之、山田陽城:麻黄湯の
インフルエンザウイルス感染に対する薬
効機序の検討。第 27 回和漢医薬学会学術
大会、2010 年 8 月 29 日、京都
- 6) 永井隆之、高田愛美、山田陽城:小青竜湯
の気道炎症モデルマウスに対する作用の
ステロイド薬との比較。第 27 回和漢医薬
学会学術大会、2010 年 8 月 28 日、京都
- 7) Yamada H., Kiyohara H., Nagai T.:
Recent progress on elucidation of
immunomodulating activity and its
action mechanism of Kampo (Japanese
herbal) medicines 9th Meeting of
Consortium for Globalization of Chinese
Medicine. 2010 年 8 月 24 日, Hong Kong,
China
- 8) 青木悠香、永井隆之、山田陽城:漢方方剤
「麻黄湯」のインフルエンザウイルス感染
に対する薬効機序の検討。第 23 回バイオ
サイエンスフォーラム、2010 年 8 月 5 日、
十和田
- 9) 永井隆之、高田愛美、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—。第 29 回漢方免疫アレルギー
研究会学術集会、2010 年 6 月 12 日、
東京
- 10) 永井隆之、山田陽城:麻黄剤の辛温解表作
用とその機序の解析。第 61 回日本東洋医
学会学術総会、2010 年 6 月 5 日、名古屋
- 11) 高田愛美、永井隆之、山田陽城:漢方方剤
「小青竜湯」の気道炎症モデルマウスの肺
における作用機序の検討。日本薬学会第
130 年会、2010 年 3 月 30 日、岡山
- 12) Nagai T., Yamada H.: Anti-allergic
effects of a Kampo (Japanese herbal)
medicine “shoseiryuto (xiao-qing-long-
tang, so-cheong-ryong-tang)” on airway
inflammation in a mouse model. The
First International Meeting on Japan-
China-Korea Traditional Medicine (第 1
回日中韓伝統医薬学会)、2009 年 10 月 25
日、東京
- 13) 高田愛美、永井隆之、山田陽城:小青竜湯
とステロイド薬の気道炎症モデルマウス
に対する作用の比較。第 26 回和漢医薬学
会学術大会、2009 年 8 月 29-30 日、千葉
- 14) 永井隆之、片岡枝里花、山田陽城:麻黄湯
のインフルエンザウイルス感染に対する
有効性及び薬効発現機序の検討。第 26 回
和漢医薬学会学術大会、2009 年 8 月 29-30
日、千葉
- 15) 片岡枝里花、永井隆之、山田陽城:漢方方
剤「麻黄湯」のマウスにおける抗インフ
ルエンザウイルス活性。日本薬学会第 129
年会、2009 年 3 月 28 日、京都
- 16) 片岡枝里花、永井隆之、山田陽城:麻黄湯
のインフルエンザウイルス感染に対する
効果。第 25 回和漢医薬学会学術大会、
2008 年 8 月 30-31 日、大阪
- 17) 永井隆之、清水ユリ子、小寺義男、大石正
道、前田忠計:小青竜湯の気道炎症モデル
マウスに対する薬効発現機序の検討。第
25 回和漢医薬学会学術大会、2008 年 8 月
30-31 日、大阪
- 18) 永井隆之:漢方薬の薬効解析へのプロテオ
ーム解析の応用。第 58 回日本電気泳動学
会シンポジウム、2008 年 6 月 13 日、東
京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 4 件)

名称: Vaccine preparation containing fatty
acid as a constituent

発明者: 山田陽城、清原寛章、永井隆之

権利者: 学校法人北里研究所

種類: 特許

番号: CA2365392

取得年月日: 2010 年 12 月 14 日

国内外の別：国外（カナダ）

名称：脂肪酸を構成成分とするワクチン製剤

発明者：山田陽城、清原寛章、永井隆之

権利者：学校法人北里研究所

種類：特許

番号：4551001

取得年月日：2010年7月16日

国内外の別：国内

名称：Vaccine preparation containing fatty acid as a constituent

発明者：山田陽城、清原寛章、永井隆之、
砂塚敏明

権利者：学校法人北里研究所

種類：特許

番号：US7560484

取得年月日：2009年7月14日

国内外の別：国外（米国）

名称：Vaccine preparation containing fatty acid as a constituent

発明者：山田陽城、清原寛章、永井隆之

権利者：学校法人北里研究所

種類：特許

番号：EP1195162

取得年月日：2008年6月4日

国内外の別：国外（欧州）

〔その他〕

ホームページ等

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

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・准教授

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・室長

研究者番号：40214150