

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590906

研究課題名(和文) インフルエンザにおける麻黄湯の自然免疫賦活作用に関する検討

研究課題名(英文) Enhancement of natural immunity in influenza by maoto

研究代表者

鍋島 茂樹 (NABESHIMA, Shigeki)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：50304796

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)：麻黄湯は古来よりインフルエンザに効果があることが知られていたが、そのメカニズムについては解明されていない。我々は、A549細胞にインフルエンザウイルス(PR8株)を感染させ、同時に麻黄湯を添加した際に、麻黄湯によりウイルス増殖が抑制されるかどうかを検討した。培養24時間後、培養液中の感染性ウイルス価、ウイルスRNAおよびウイルス蛋白は著明に減少した。次に麻黄湯の添加時期をずらして検討したところ、前処置、または感染6時間以内で最も効果が高いことがわかった。

麻黄湯は、インフルエンザウイルスの感染初期に、何らかの機序でウイルスの侵入または、増殖を抑えていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Although maoto has been known to be effective traditionally in influenza, little is known about its mechanisms. We investigated the anti-virus capacity of maoto in in-vitro system using A549 cell line infected with influenza virus (PR8). Twenty-four hours later, virus titer in medium, viral RNA, and viral proteins were significantly reduced when added with maoto. To investigate the phase of the experimental infection at which maoto is effective, we added it to culture wells at different times and assayed the virus titer and intracellular virus RNA level 24 hr post-infection. When maoto was added in the pre-treatment, infection, and early propagation phases (<8 hrs), the virus titers and viral RNA were significantly lower than with medium only.

We suggest that maoto may block the invasion of influenza virus to cytoplasm or inhibit the early propagation phase of influenza virus.

研究分野：感染症

キーワード：インフルエンザ 漢方 麻黄湯 抗インフルエンザ薬

1. 研究開始当初の背景

麻黄湯・オセルタミビル・ザナミビルを用いたランダム化試験にて、麻黄湯は図1に示すごとく、単独でオセルタミビル・ザナミビルと同等の発熱改善作用と症状スコア改善作用を有していた。しかし、そのメカニズムに関しては不明であった。

2. 研究の目的

in vitro において麻黄湯が抗インフルエンザ・ウイルス活性を有するかどうかを検討し、あわせてその機序を解析する。麻黄湯は細胞上のパターン認識受容体に結合し、I型インターフェロンを誘導することで、さらに抗ウイルス分子を発現させると予想される。麻黄湯とインターフェロン系の活性化を解析することで、さらに漢方薬の科学的根拠・有効性が解明されると考えられる。

3. 研究の方法

初年度は A549 細胞培養液中にインフルエンザ・ウイルスと麻黄湯を添加し、ウイルス増殖が抑制されるかどうかを調べる。具体的には培養液中の感染性ウイルスと細胞内のウイルス RNA を PCR で定量する。培養時間は主として 24 時間とする。このとき、数種のサブタイプや他の抗インフルエンザ薬を対照として用いて普遍性があるかどうかを検討する。

また抗ウイルス機序を調べるため、ウイルス感染後に麻黄湯を添加して A549 細胞を培養し、培養液中あるいは細胞内の I 型 IFN の産生、Jak-Stat 系の活性化、細胞内抗ウイルス蛋白 (Mx GTPase、PKR) の誘導について検討する。

オートファジーとの関連に関しては、細胞内のオートファジーマーカーを蛍光顕微鏡またはウェスタンブロットで可視化する。

4. 研究成果

麻黄湯の添加により、培養 24 時間後のウイルス titer は、コントロールの laninamivir、amantadine と同様、容量依存性に著明に低下した (図 1)。ウイルス RNA・蛋白量に関しても麻黄湯添加で発現量低下が認められた。A/H3N2、B 型ウイルスに対しても、また他の細胞株を用いた場合にも同様の効果が認められた。前もって PR8 に麻黄湯を 1 時間作用させた上で感染させると、コントロールにおけるウイルス titer と変化が無く、麻黄湯によるウイルスへの直接作用は否定された。一方、A549 に麻黄湯で 1 時間 pre-treatment を行い PR8 を感染させると、増殖抑制効果を示したため、初期免疫を介する機序が示唆された。さらに麻黄湯添加の時期をずらしてウイルス RNA の複製を抑制する時間帯を調べると、感染後 2 時間、特に最初の 60 分以内に集中していることがわかった (図 2)。

さらに、培養液中あるいは細胞内の I 型

IFN の産生、Jak-Stat 系の活性化、細胞内抗ウイルス蛋白 (Mx GTPase、PKR) の誘導に関しては、麻黄湯を投与することにより、抗ウイルス分子の抑制がおこる事がわかり、これらの抗ウイルス分子で麻黄湯の抗ウイルス作用を説明できないことがわかった。

インフルエンザウイルス感染では、オートファゴソームとライソソームの融合 (オートファジーの成熟) が阻害されることが知られている。そこでオートファジーの関与を考え、GFP-LC3 導入 A549 細胞に PR/8 を感染させたところ、蛍光顕微鏡にて細胞質のオートファゴソームは増加したが、ライソソームと融合しているものは少なく、オートファジーの成熟が阻害されていることが確かめられた。麻黄湯をこの系に添加すると、オートファゴソームはさらに増加し、ライソソームとの融合が認められ、オートファジーの成熟阻害が解除されていることがわかった (図 3)。ウェスタン・ブロッキングでも同様の結果であった。

考察

麻黄湯によるインフルエンザウイルス増殖抑制効果は、IFN やそれによって誘導される抗ウイルス分子を増強させるのではなく、主としてインフルエンザウイルス感染初期のおそらく脱核前後の life cycle に作用することがわかった。また、意義は今のところ不明であるが、麻黄湯はインフルエンザ感染細胞のオートファジー機能を強化することがわかった。これに関しては、今後のさらなる研究が必要である。

図1

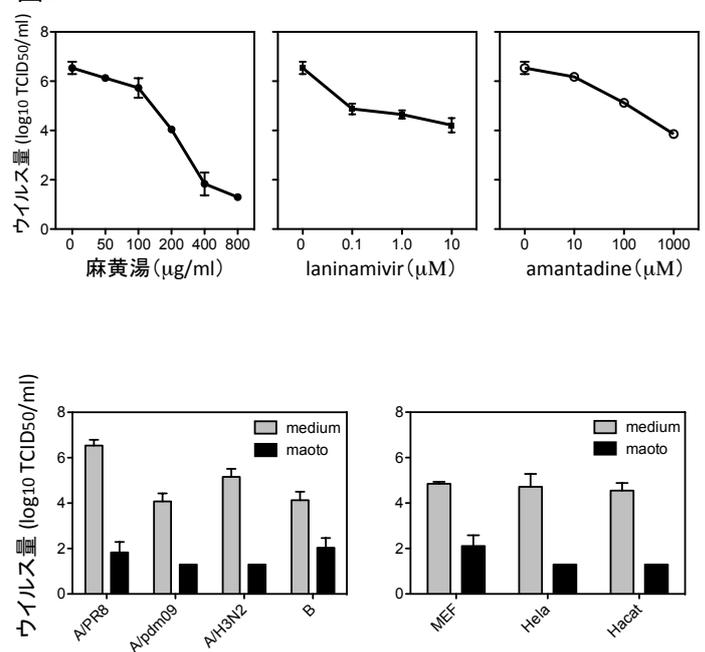


図2

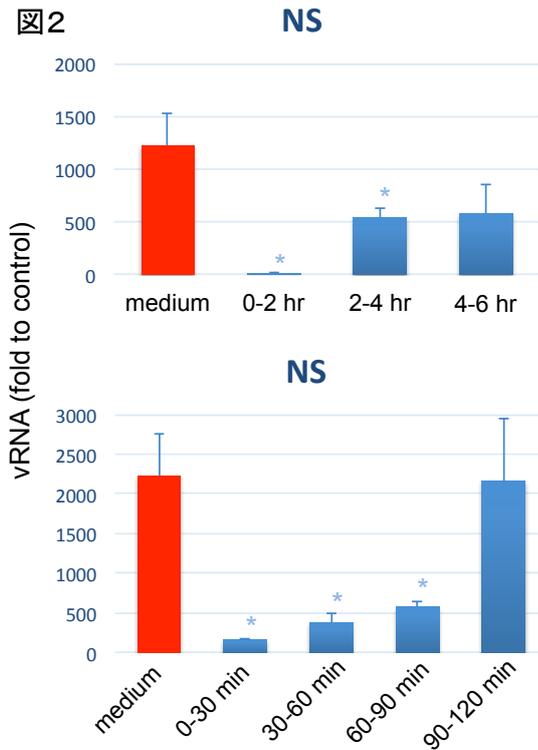
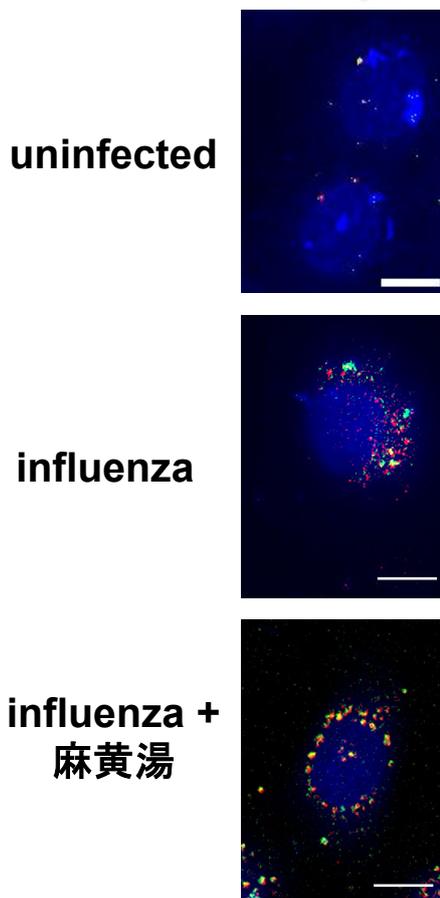


図3 GFP-LC3+Lysotracker



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 5 件)

①培養細胞を用いた、麻黄湯による抗インフルエンザ・ウイルス作用の検討 / 鍋島茂樹、増井信太、鯉坂和彦、武岡宏明. 第 85 回日本感染症学会総会 (2011-4-21, 東京都)

② Influenza A virus supression of autophagosome maturation and its reversal by maoto, a traditional herbal medicine / Nabeshima S, Yamauchi K, Masui S, Ishii K, Soejima T, Hiromatsu K. International Union of Microbiological Society 2011 Congress (2011-9-15, Sapporo city)

③インフルエンザウイルスによるオートファジーの成熟阻害と麻黄湯によるその解除 / 鍋島茂樹、増井信太、長澤佳郎、鯉坂和彦、武岡宏明. 第 86 回日本感染症学会総会 (2012-4-25, 長崎市)

④インフルエンザにおける麻黄湯の臨床効果とその作用機序 (学会長賞受賞講演) / 鍋島茂樹. 第 7 回日本病院総合診療医学会総会 (2013-8-30, 広島市)

⑤麻黄湯の抗インフルエンザ作用とオートファジー / 鍋島茂樹、増井信太、長澤佳郎、鯉坂和彦、武岡宏明. 第 63 回日本東洋医学会総会 (2013-6-2, 鹿児島市)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鍋島 茂樹 (NABESHIMA, Shigeki)

研究者番号：50304796

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし