

ミャンマー産伝統薬用植物由来の 抗インフルエンザ活性天然化合物の探索研究

申請代表者	庄司 正樹	徳島文理大学薬学部生化学講座	助教
所外共同研究者	増田 麻来	徳島文理大学薬学部生化学講座	学部学生
所外共同研究者	葛原 隆	徳島文理大学薬学部生化学講座	教授
所内共同研究者	伊藤 卓也	資源開発部門天然物化学分野	准教授

■背景・目的

1912年全世界で5000万人もの死者を出したスペインインフルエンザ（スペイン風邪）や近年流行した高病原性鳥インフルエンザに代表されるように、インフルエンザウイルス感染は度々世界的な大流行を引き起こしている。現在、インフルエンザウイルス感染症の治療に対して、インフルエンザウイルスの細胞外放出に関与するノイラミニダーゼ（NA）を標的とするオセルタミビルやペラミビル、ザナミビル、ラニナミビル等が汎用されている。しかしながら、A型インフルエンザH1N1株にオセルタミビルやペラミビル耐性株が出現しており、また鳥インフルエンザについても、既にオセルタミビル耐性株が発生している。一方、ザナミビルやラニナミビルでは、まだ耐性株が検出されていないが、オセルタミビルやペラミビルと同様にNAを標的とすることから、耐性株が発生する可能性を有している。したがって、オセルタミビル等のインフルエンザウイルスNA標的薬に代わる新規抗インフルエンザ薬の開発は急務である。

そこで、我々は、革新的な抗インフルエンザ薬を開発するための候補化合物を探索するために、生物多様性ホットスポットに着目した。これは、地球上で固有種の割合が高く生物多様性が豊富にもかかわらず、人類による破壊の危機に瀕している地域であり、現在35の地域が選定されている。その中でも、薬用植物資源が世界的に豊富かつ、環境破壊により早急に探索研究が必要なミャンマーは、1950年代に植物の調査が行われて以降、50年以上にわたり国が閉ざされた状態にあったため、薬用植物研究は十分に行われていない。また、この国では、日常的に薬用植物を生薬として使用した伝統療法が西洋療法と同様に行われており、新規抗インフルエンザ薬候補化合物を探索するための宝庫であると言える。

我々は、ミャンマー由来植物から革新的な抗インフルエンザ薬を開発する為の候補化合物を探索する目的で、富山大学和漢医薬学総合研究所の天然物化学分野の伊藤卓也准教授らとの共同研究を開始した。そこで、伊藤らにより供与された118種類のミャンマー産植物由来エキスをを用いて、A型インフルエンザウイルスH1N1株（A/PR/8/34）感染からの細胞生存率を指標とするスクリーニングを行った（図1）。このアッセイでは、高力価のインフルエンザ

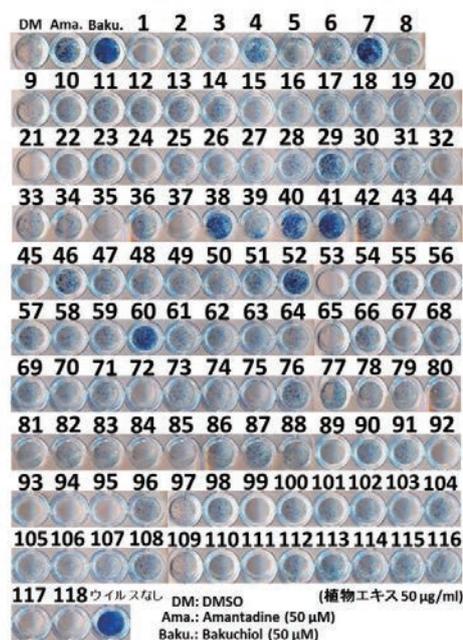


図1 ミャンマー産伝統薬用植物由来エキスをを用いた抗インフルエンザスクリーニング

ウイルスを感染させることでウエル内の細胞が死滅しクリアな像が観察され、一方感染から細胞が生存すると、その後の培養により細胞が増殖し青く染色される像が観察できる(図1)。118種類のミャンマー産植物由来エキスのスクリーニング結果により、抗インフルエンザ活性を示したエキス番号7及び38, 40, 41, 52, 60の6種類の植物エキスを見出した(図1)。その中でも、我々は、強力な活性を示した番号60の植物であるトウダイグサ科植物 *Jatropha multifida* Linn. (*J. multifida*) に着目した。この植物は、アジアやアフリカを通して、熱帯・亜熱帯地域に広く分布しており、ミャンマーでは“Say-ma-khan”と呼ばれる伝統生薬として知られ、熱や消化不良、咳、皮膚感染等の症状に使用されている。また、植物部位で適応が異なっており、種子油や植物乳液、葉は、下剤や墮胎薬、創傷、神経皮膚炎、湿疹、かゆみ等の治療に使用され、根や幹は、抗菌や抗マラリア、抗腫瘍等の活性を有することが報告されている。しかしながら、ミャンマーを採取源とした *J. multifida* の薬理作用及び含有する天然化合物の探索研究は、今まで行われていない。

そこで、本研究では、ミャンマー産植物 *J. multifida* の抗インフルエンザ活性の解析と活性成分の特定を目的とした。

■結果・考察

J. multifida 抽出エキスに含まれる抗インフルエンザ活性物質を特定する為、*J. multifida* の茎から70%エタノールにより粗抽出物を作製後、水(H₂O)及び酢酸エチル(EtOAc)、ヘキサン(Hex)、クロロホルム(CHCl₃)を用いて各溶媒抽出エキスを調製した。初めに、*J. multifida* の各溶媒抽出エキスのイヌ腎臓由来(MDCK)細胞に対する細胞毒性試験を行ったところ、培養24時間では、各溶媒抽出エキスによる細胞毒性は示さなかったが(図2A)、培養72及び96時間においてクロロホルム抽出エキスのみ25 µg/mL以上で細胞毒性を示した(図2B及び2C)。

インフルエンザウイルスは、エンベロープを持つマイナス鎖の一本鎖RNAウイルスであり、その生活環は、宿主への吸着→侵入→脱殻→ゲノム複製→粒子再構成→放出を辿る(図3)。

したがって、*J. multifida* の各溶媒抽出エキスがウイルス生活環のどの段階を阻害するのか、MDCK細胞に各溶媒抽出エキス及びインフルエンザウイルスを作用させる方法の違いにより検討した。

初めに、ウイルス生活環初期である宿主

への吸着から脱殻までの感染阻害効果を検討するために、これらの各溶媒抽出エキスをA型インフルエンザウイルス(A/PR/8/34)と混合し37°Cで30分間前培養しMDCK細胞に添加した。培養96時間後生存細胞を染色したところ、水抽出エキスでは25-3.1 µg/mLまで多くの生存細胞が観察され、クロロホルム抽出エキスでは25 µg/mLのみ少ない生存細胞が観察されたが、酢酸エチル及びヘキサン抽出エキスではネガティブコントロールであるDMSO

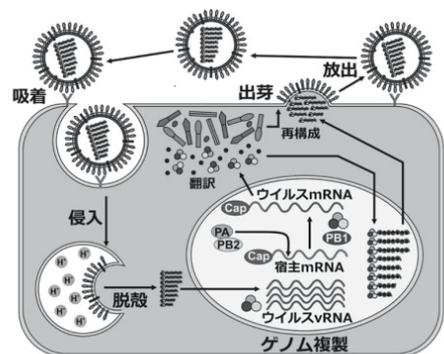


図3 インフルエンザウイルスの生活環

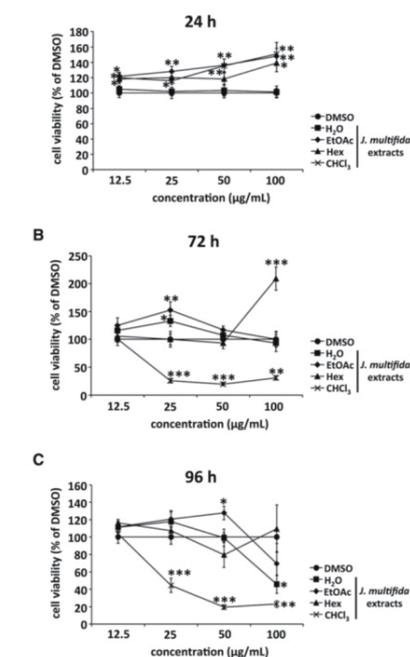


図2 *J. multifida* 各溶媒抽出エキスの細胞毒性

群と同様に生存細胞が見られなかった (図 4)。また、上記のウイルス感染阻害活性を定量化するために、ウイルスとの混合物を細胞に添加し培養 24 時間後インフルエンザウイルス核タンパク質の免疫抗体染色法により感染細胞のみ染色後 (図 5A)、感染細胞数を測定した (図 5B)。DMSO 群と比較し、水抽出エキスでは 25-3.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで濃度依存的に感染細胞数が有意に減少し (図 5B)、一方水抽出エキスには及ばないもののクロロホルム抽出エキスでも 25-6.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで感染細胞数が有意に減少した (図 5B)。以上より、*J. multifida* の茎由来の水抽出エキスには、強力なインフルエンザウイルス感染阻害活性を有することが分かった。

次に、ウイルス生活環の比較的後期であるゲノム複製から放出までの増殖阻害効果を検討するために、あらかじめ A/PR/8/34 を MDCK 細胞に添加しウイルス感染細胞を作製後、*J. multifida* の各溶媒抽出エキスを作用させ培養 24 及び 48、72 時間時点で培養上清中のウイルス力価を測定した。その結果、DMSO 群と比較し、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の酢酸エチル及びヘキサン、クロロホルム抽出エキス群で有意にウイルス力価が減少したが、その中でもクロロホルム抽出エキスが最も有意に減少した (図

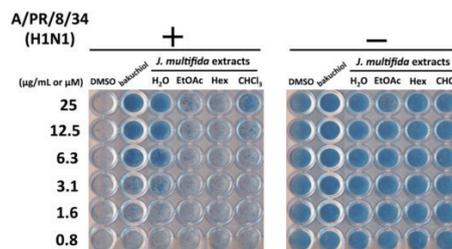


図4 *J. multifida* 各溶媒抽出エキスの感染からの生存細胞率を指標としたインフルエンザウイルス感染阻害活性

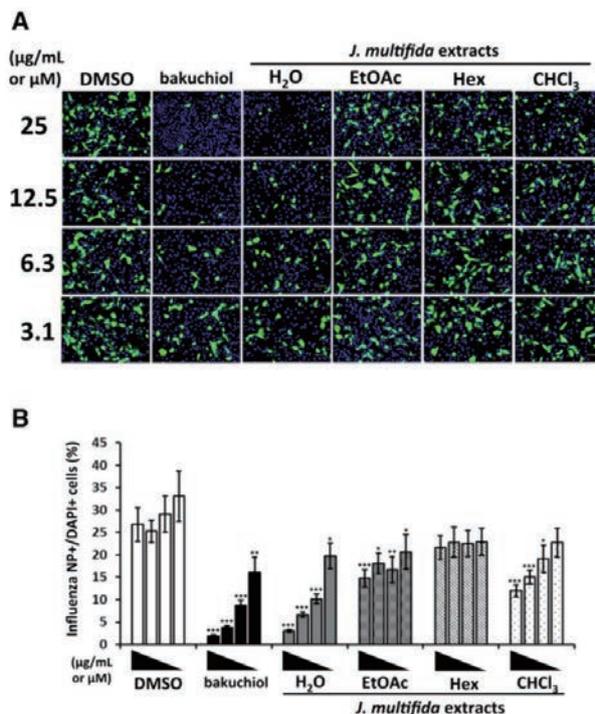


図5 免疫抗体染色法による *J. multifida* 各溶媒抽出エキスによるインフルエンザウイルス感染阻害活性

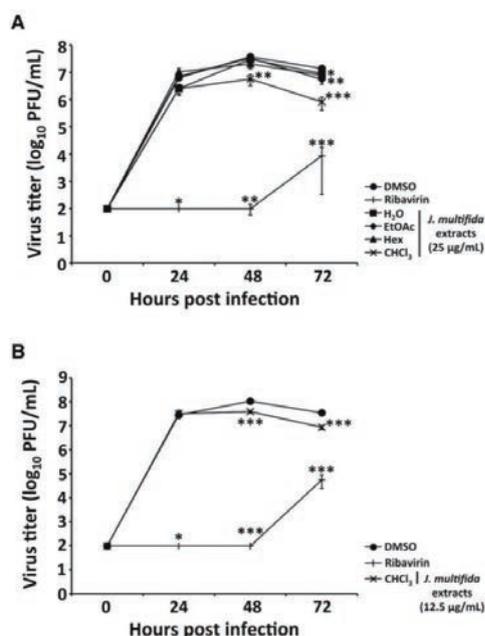


図6 *J. multifida* 各溶媒抽出エキスのインフルエンザウイルス増殖阻害活性

6A)。しかしながら、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のクロロホルム抽出エキスは、細胞毒性試験により培養 72 時間で毒性を示していたことから、毒性のない 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で検討したところ、DMSO 群と比較し有意にウイルス力価が減少した (図 6B)。以上より、*J. multifida* の茎由来のクロロホルム抽出エキスには、強力なインフルエンザウイルス増殖阻害活性を有することが分かった。

本研究で行った感染からの細胞生存率及び感染細胞数を測定する試験法では、ウイルスとエキスを前処理した混合物を細胞に作用させるため、インフルエンザ生活環において吸着から脱殻まで (感染) を阻害することを示唆している。一方、培養上清中のウイルス量を測定する試験法では、ウイルスを感染させた細胞に対してエキスを作用させるため、ゲノム複製から放出まで (増殖) を阻害することを示唆している。これらのことから、それぞれのエキスには、阻害メカニズムの異なる化合物の存

在が推測される。本研究成果は、高く評価され、BMC Complementary and Alternative Medicine (2017, 17:96) に掲載された。

我々は、*J. multifida* の茎由来の水及びクロロホルム抽出エキスに含まれる活性成分の特定のために、さらに分画して水抽出エキスからは3つのエキスを調製し A/PR/8/34 の感染からの細胞生存効果を、クロロホルム抽出エキスからは7つの化合物を特定し A/PR/8/34 の増殖阻害効果をそれぞれ検討した。DMSO 群と比較して、水抽出エキス由来の画分2及び3にウイルス感染からの細胞生存効果を示し、一方クロロホルム抽出エキス由来7化合物では有意なウイルス増殖阻害効果を示さなかった。したがって、水抽出エキス由来の画分2及び3にウイルス感染を阻害する化合物が存在し、一方クロロホルムエキス由来の特定できなかった化合物に増殖阻害活性があるのではないかと推察される。

■結論

本研究において、我々は、革新的な抗インフルエンザ薬を開発する為の候補化合物を探索する目的で、118種類のミャンマー由来植物エキスを用いて A 型インフルエンザウイルスの感染からの細胞生存率を指標とするスクリーニングを行ったところ、強力な活性を示す6種類の植物由来エキスを見出した。その中でも、特に高い活性を示した *J. multifida* の茎から水及び酢酸エチル、ヘキサン、クロロホルムによる各溶媒抽出エキスを調製し、インフルエンザウイルス感染及び増殖阻害活性を検討した。その結果、水抽出エキスには、強力なインフルエンザウイルス感染阻害活性が、一方クロロホルム抽出エキスには、強力なインフルエンザウイルス増殖阻害活性を有することが分かった。これらの結果は、*J. multifida* の茎には、革新的な抗インフルエンザ薬を開発するための候補化合物を探索するソースとしてだけでなく、既に伝統生薬として使用されていることから、抗インフルエンザ生薬としての可能性を秘めている。

■発表論文

Masaki Shoji*, So-Yeun Woo, Aki Masuda, Nwet Nwet Win, Hla Ngwe, Etsuhisa Takahashi, Hiroshi Kido, Hiroyuki Morita, Takuya Ito* and Takashi Kuzuhara*. *Corresponding authors.

Anti-influenza virus activity of extracts from stems of *Jatropha multifida* Linn. collected in Myanmar.

BMC Complementary and Alternative Medicine 2017, 17:96.