

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 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 資源開発研究部門 天然物化学分野 准教授
(現 大阪大谷大学 薬学部 天然薬物学講座) (現 教授)

■背景・目的

我々は、新しい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、薬用植物資源が世界的に豊富にも関わらず薬用植物研究が未だ不十分なミャンマーの薬用植物に着目した。そこで、118種類のミャンマー産植物由来エキスについて、A型インフルエンザウイルス感染からの生存細胞率を指標とするスクリーニングを行った(図1)。その結果、コントロール(DMSO群)(図1, 青枠)と比較して、強力な活性を示す6種類の植物エキス(図1, 赤枠:#7および38, 40, 41, 52, 60)を見出した(図1)。

我々は、スクリーニング結果の中でも強い活性を示した#41 および 52, 60 の植物らに着目した。#60: トウダイグサ科植物の *Jatropha multifida* Linn. は、ミャンマーにおいて“Say-ma-khan”として知られる伝統生薬であり、熱や消化不良、咳、皮膚感染等の症状に使用されている。この植物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ために、水及び酢酸エチル、ヘキサン、クロロホルムエキスを調製し、A型インフルエンザウイルスの感染及び増殖阻害活性を検討した。DMSO群と比較して、水エキスではウイルス感染細胞数、一方クロロホルムエキスでは培養上清中のウイルス量がそれぞれ有意に減少した(公表論文1)。本研究成果は、高く評価され、*BMC Complementary and Alternative Medicine*(公表論文1)に掲載された。

次に、我々は、#41: カヤツリグサ科植物 *Cyperus scariosus* R. Br および#52: リンドウ科植物 *Gentiana kurroo* Royle. に着目した。一般的に、*C. scariosus* は抗炎症および抗胃痛、利尿、発汗、一方 *G. kurroo* は抗菌、抗炎症、抗マラリア、鎮痛、鎮静として、それぞれミャンマーの伝統生薬として使用されている。しかしながら、今回のスクリーニングで見出した抗インフルエンザ活性およびその活性成分については、分かっていない。そこで、本研究では、*C. scariosus* および *G. kurroo* の詳細な抗インフルエンザ活性の検討とその活性成分の特定を目的とした。

■結果・考察

我々は、詳細な抗インフルエンザ活性と活性成分の特定のために、*C. scariosus* および *G. kurroo* 根茎から水および酢酸エチル、ヘキサン、クロロホルムを用いて、各種溶媒抽出エキスを作製した。

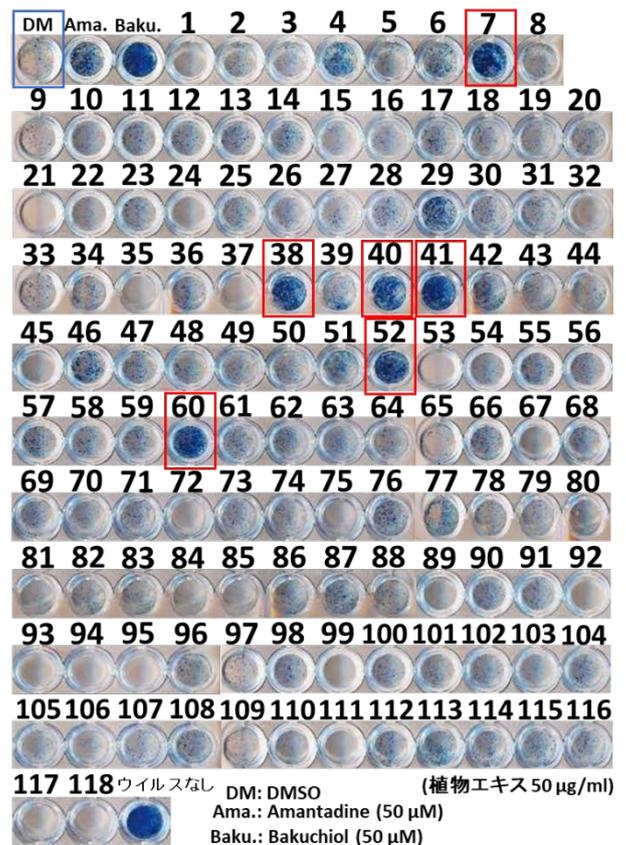


図1 ミャンマー産伝統薬用植物由来エキスを用いた抗インフルエンザスクリーニング

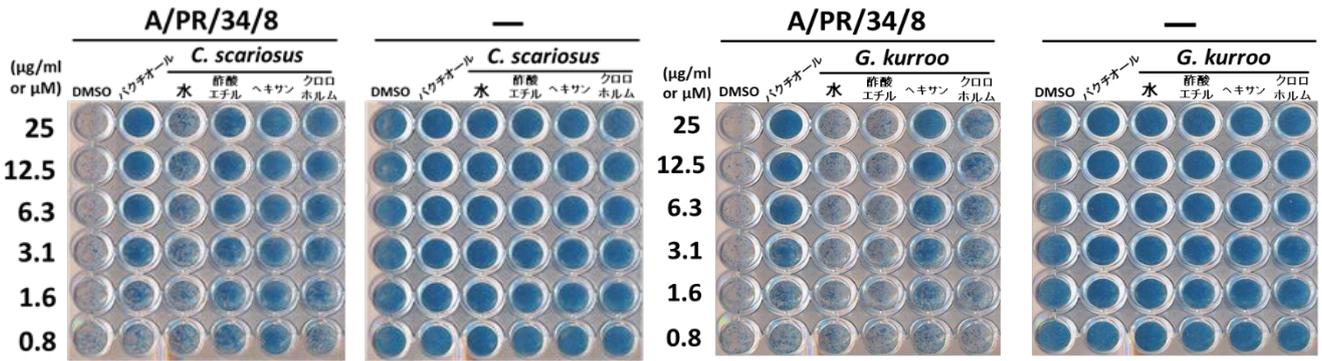


図2 *C. scariosus* 各溶媒抽出エキスによるウイルス感染からの細胞生存効果 図3 *G. kurroo* 各溶媒抽出エキスによるウイルス感染からの細胞生存効果

初めに、各溶媒抽出エキスと A 型インフルエンザウイルス (A/PR/34/8) を共培養し、イヌ腎臓由来 (MDCK) 細胞に作用させた。培養 4 日後細胞を染色することにより、インフルエンザウイルス感染からの細胞生存率を測定したところ、*C. scariosus* の酢酸エチルおよびヘキサン、クロロホルムエキス (図 2) に、一方 *G. kurroo* のヘキサンエキス (図 3) に濃度依存的なウイルス感染からの強力な細胞生存効果を示した。次に、それぞれの抽出エキスと A/PR/34/8 の共培養試料を MDCK 細胞に作用後、インフルエンザウイルス核タンパク質 (NP) を免疫蛍光染色することで、ウイルス感染細胞数を測定した。その結果、*C. scariosus* の酢酸エチルおよびヘキサン、クロロホルムエキスの作用により、濃度依存的なウイルス感染細胞数が減少し、その中でもヘキサンエキスが最も強力な減少率を示した (図 4)。一方 *G. kurroo* では、ヘキサンエキスにのみ濃度依存的にウイルス感染細胞数が減少した (図 5)。感染からの細胞生存率および感染細胞数を測定する試験法は、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、ウイルス生活環において感染初期を阻害することを示唆している。以上より、*C. scariosus* および *G. kurroo* のヘキサンエキスには、ウイルス感染を阻害する強力な化合物が含まれていると考えられる。

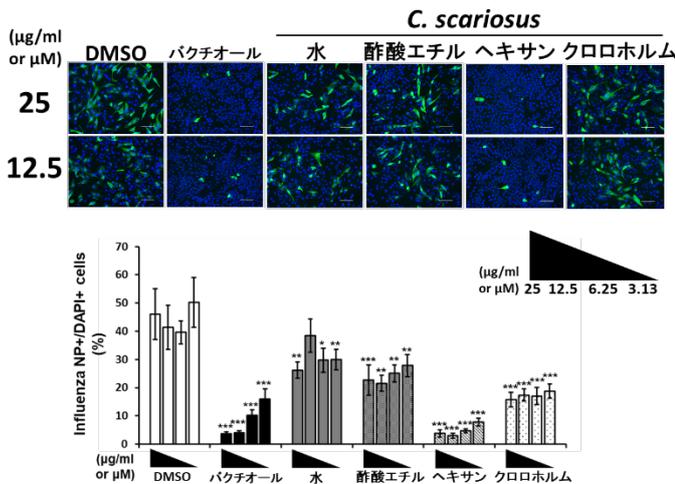


図4 *C. scariosus* 各溶媒抽出エキスによるウイルス感染阻害効果

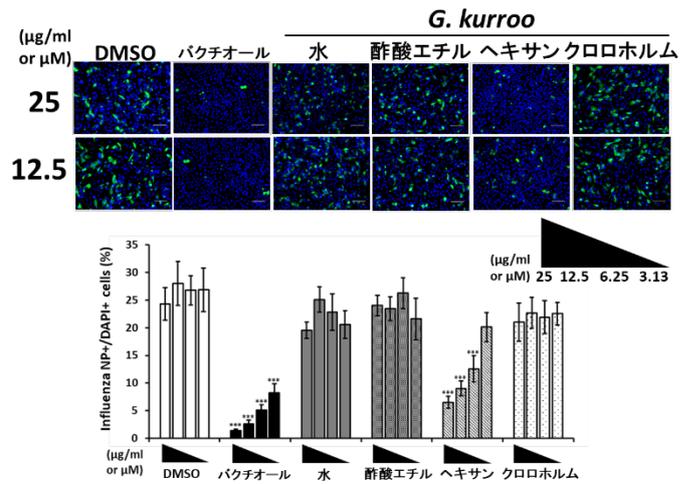


図5 *G. kurroo* 各溶媒抽出エキスによるウイルス感染阻害効果

さらに、あらかじめ A/PR/34/8 を感染させた MDCK 細胞に *C. scariosus* および *G. kurroo* の各溶媒抽出エキスを作用させ、培養 24 から 72 時間まで経時的に培養液中のウイルス力価を測定することにより、ウイルス増殖阻害作用を検討した。*C. scariosus* では、ヘキサンエキスにのみ経時的なウイルス力価の減少が見られた (図 6A)、一方 *G. kurroo* の各溶媒抽出エキスでは、ウイルス力価の減少が見られなかった (図 6B)。培養液中のウイルス量を測定する試験法では、あらかじめ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、感染後期 (増殖) を阻害することを示唆している。以上より、*C. scariosus* のヘキサンエキスは、ウイルス増殖を抑制する化合物を有することが考えられる。

次に、我々は、*G. kurroo* のヘキサンエキスに含まれる抗インフルエンザ活性成分を特定するため、

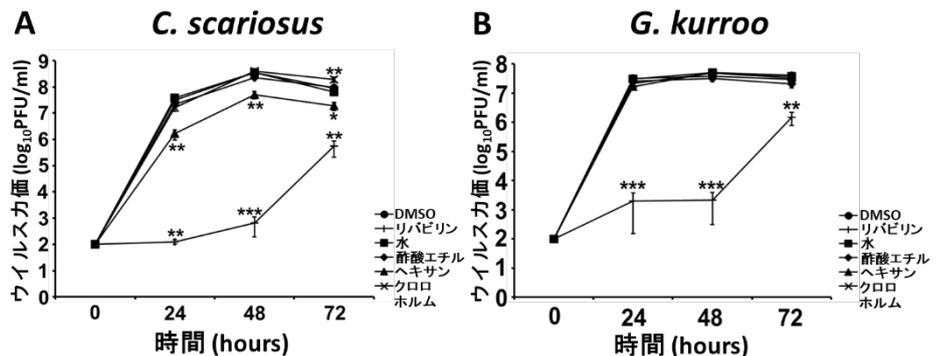


図6 *C. scariosus* および *G. kurroo* 各溶媒抽出エキスによるウイルス増殖阻害効果

様式 1-5

種目 (一般研究 I)

各種クロマトグラフィーにより分画・精製を行ったところ、Compound#1~5 が単離された。これら 5 種の化合物と A/PR/34/8 の共培養試料を MDCK 細胞に作用後、ウイルス感染からの細胞生存性と感染細胞数を測定した。これらの化合物は、いずれもウイルス感染細胞の生存性を上昇させ(図 7)、感染細胞数を減少させた(図 8)。特に、Compound#1 に最も強い活性が認められた。したがって、*G. kurroo* 根茎のヘキサソエキスによる抗インフルエンザ活性は、Compound#1~5 が関与し、Compound#1 がその活性の中心となっていると考えられる。

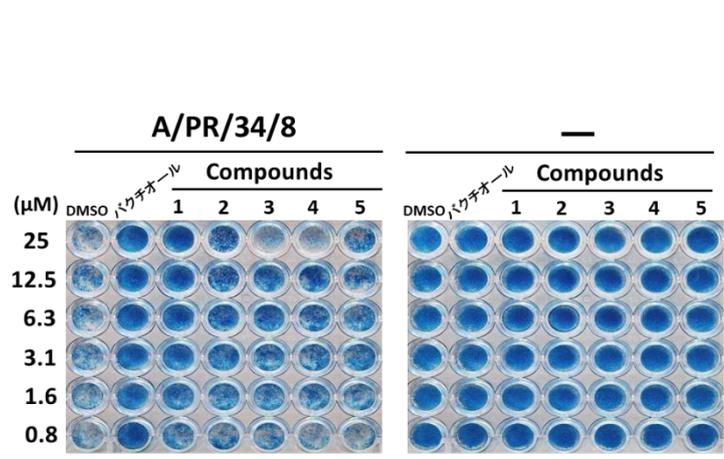


図7 *G. kurroo*根茎のヘキサソエキスから分離された化合物によるウイルス感染からの細胞生存効果

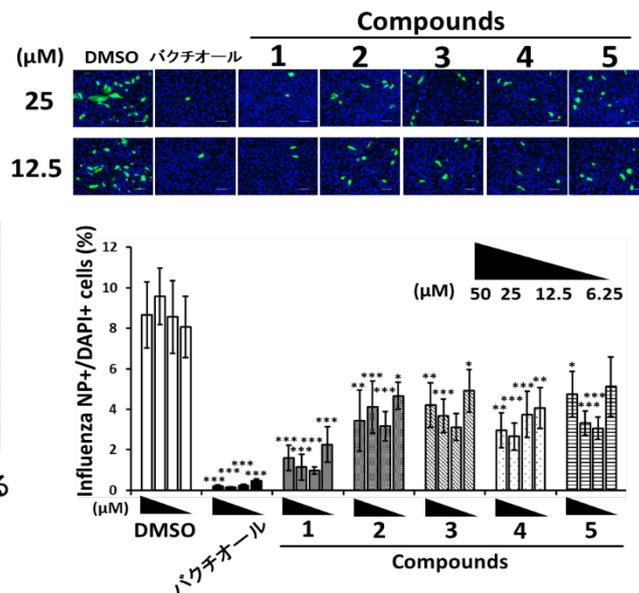


図8 *G. kurroo*根茎のヘキサソエキスから分離された化合物によるウイルス感染阻害効果

■結論

本研究により、我々は、*C. scariosus* および *G. kurroo* 根茎のヘキサソエキスによる抗インフルエンザ活性を発見しただけでなく、強力な抗インフルエンザ活性を示す新たな化合物 Compound#1 も見出した。しかしながら、これらのエキスや化合物がどのようなメカニズムにより抗インフルエンザ活性を示しているのか分かっていない。したがって、これらの抗インフルエンザ活性のメカニズム解析が今後の研究課題である。本研究結果は、ミャンマー産の *C. scariosus* および *G. kurroo* 根茎が抗インフルエンザ生薬として使用できること、さらに Compound#1 が新たな抗インフルエンザ薬のリード化合物としての可能性を秘めていることを示している。

■公表論文

1. 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.

■公表予定論文

1. Masaki Shoji*, So-Yeun Woo, Mami Tomimoto, Minami Sugimoto, Aki Masuda, Nwet Nwet Win, Hla Ngwe, Etsuhisa Takahashi, Hiroshi Kido, Hiroyuki Morita, Takuya Ito* and Takashi Kuzuhara*. *Corresponding authors.
Anti-influenza activity of hexane extracts of *Gentiana kurroo* Royle rhizomes collected in Myanmar. *BMC Complementary and Alternative Medicine* submitted.

2. Masaki Shoji*, So-Yeun Woo, Natsumi Yano, Minami Sugimoto, 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 the rhizome of *Cyperus scariosus* R. Br collected in Myanmar.
Manuscript in preparation.