

単純ヘルペスウイルス1型の増殖に対する小柴胡湯及びその単味生薬の阻害効果

金 恩源^{*a,b)} 林 京子^{b)} 庭山清八郎^{b)}^{a)}富山医科薬科大学和漢薬研究所免疫機能制御部門, ^{b)}富山医科薬科大学医学部ウイルス学教室Inhibitory effects of Syô-saiko-tô and its components on the *in vitro* replication of herpes simplex virus type 1Enyunan JIN^{*}, Kyoko HAYASHI and Seihachiro NIWAYAMA^{a)}Department of Control of Immunoregulatory System,

Research Institute for Wakan-Yaku, Toyama Medical and Pharmaceutical University

^{b)}Department of Virology, School of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University

(Received November 14, 1988. Accepted December 12, 1988.)

Abstract

Syô-saiko-tô (Xiao-Chai-Hu-Tang), one of the Kampo-hozai (Chinese medicine), and its components were investigated for the *in vitro* action on replication of herpes simplex virus type 1, using plaque forming assay system in HeLa cells. Therapeutic index (ID₅₀/ED₅₀) was 12 for Syô-saiko-tô, 27 for Pinelliae Tuber, 26 for Glycyrrhizae Radix, 12 for Scutellariae Radix, 10 for Bupleuri Radix, all of those showing relatively high selectivity. Syô-saiko-tô and Scutellariae Radix exerted direct virucidal activities. Therefore, the antiviral effects of these extracts are suggested to be partially attributed to direct inactivation of virus particles.

Key words Syô-saiko-tô, plaque assay, herpes simplex virus type 1, *in vitro* therapeutic index.

Abbreviations HSV-1, herpes simplex virus type 1; ID₅₀, 50% inhibitory dose for cell growth; ED₅₀, 50% inhibitory dose for virus replication; m.o.i., multiplicity of infection; PFU, plaque-forming unit; Syô-saiko-tô (Xiao-Chai-Hu-Tang), 小柴胡湯.

緒 言

小柴胡湯は肝炎の治療に繁用される方剤であり、抗炎症、免疫賦活、抗ウイルス等の作用のあることが知られている^{1,2)}。この方剤が日本脳炎ウイルスの増殖を抑制することを以前 *in vivo* 及び *in vitro* での実験で確認した³⁾。また、柴胡や甘草に抗ウイルス成分の含有されていることも報告されている^{4,5)}。これらのことを考え合わせると、小柴胡湯はウイルス増殖の抑制に関与する可能性が高いと思われる。今回、薬用植物の有する生理活性解明の一環として小柴胡湯とそれに配合される各単味生薬の熱湯抽出エキスを用いて、単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1) の増殖への影響を *in vitro* の実験系で検討した。

材料と方法

(1) **試料の調製**: 大棗を除くすべての供試材料は、10倍量の蒸留水を加えて、半量になるまで煮沸後、その濾液を噴霧乾燥して粉末エキスとしたものであり、津村順天堂より入手した。大棗エキスは、同様に煮沸処理後、凍結乾燥して調製した。滅菌蒸留水を各エキスに加えて100 mg/ml とし、約20分間煮沸滅菌処理を行った。これに等量の20%仔牛血清 (CS) を含む Eagle's MEM を加えて、最終濃度を50 mg/ml とし、適宜希釈して使用した。

(2) **HeLa 細胞に対する細胞毒性**: 24穴プレートに subconfluent の状態に培養した HeLa 229 細胞を最終濃度 1~50 mg/ml の上記エキスを添加した

*〒930-01 富山市杉谷2630

本論文の要旨は、1988年；第25回日本細菌学会中部支部総会で発表した。

10% CS 加 MEM 培地で処理した。24 時間後に生細胞を trypan blue exclusion 法で計算した。細胞毒性は、薬物無添加の対照の生細胞数に対する百分率を求め、50% 増殖抑制濃度 (ID_{50}) で表わした。

(3) HSV-1 増殖抑制試験: Confluent に培養した HeLa 229 細胞に、HSV-1 (HF 株) 液を m.o.i. = 0.5 で室温、1.5 時間吸着感染させ、PBS (-) で 2 回洗浄後、薬物添加の 2% CS 加 MEM 培地で 24 時間処理した。3 回凍結融解後、試料中のウイルス量を、HeLa 細胞を用いた plaque yield reduction 法によって求めた。Plaque 数が薬物無添加区の 50% に減少する濃度 (ED_{50}) を、各エキスについて算出した。選択的抗ウイルス効果を表わす方法として、治療指数 (ID_{50}/ED_{50}) を計算し、試料間の作用強度を比較した。

(4) ウイルス不活化試験: 生薬エキスとウイルス液 (5×10^8 PFU/ml) を等量混合し、37°C、8 時間処理後、plaque assay を行い、残存する感染性ウイルス量を求めた。

結 果

1. 細胞毒性効果

HeLa 細胞に対する増殖阻害作用は Table I に示したように黄芩が最も強く、その ID_{50} は 1200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。次いで毒性の高かったのは甘草と生姜で、続いて小柴胡湯、柴胡、人参、大棗であり、半夏は最も低い毒性を示した。

2. 抗 HSV-1 作用

抗ウイルス効果を *in vitro* 治療指数で比較したところ、小柴胡湯が 12.4 であったのに対し、半夏 27、

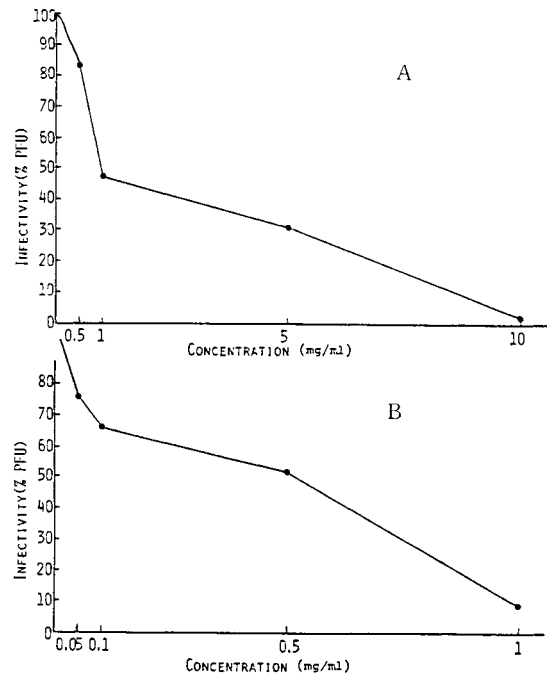


Fig. 1 Direct virucidal activity of extract.
A: Syô-saiko-tô, B: Scutellariae Radix.

甘草 26、黄芩 12、柴胡 10 といずれも高い選択毒性を示した (Table I)。人参、大棗、生姜には著しい阻害効果が認められなかった。

3. 殺ウイルス活性

HSV-1 に対する不活化試験では、上記の細胞毒性効果の成績に基づいてほぼ ID_{50} 値以下のエキス濃度の範囲で実施した。すなわち、小柴胡湯及び柴

Table I ID_{50} and ED_{50} of crude extracts for cell growth and replication of HSV-1^a.

Extract	Cytotoxicity	Antiviral activity	<i>In vitro</i>
	(ID_{50}) ^b	(ED_{50}) ^c	therapeutic index
	$\mu\text{g}/\text{ml}$	$\mu\text{g}/\text{ml}$	(ID_{50}/ED_{50})
Syô-saiko-tô	8200	660	12.4
Bupleuri Radix	9950	1000	10.0
Glycyrrhizae Radix	2500	97	25.8
Scutellariae Radix	1200	100	12.0
Pinelliae Tuber	49000	1800	27.2
Ginseng Radix	24000	>5000	<4.8
Zizyphi Fructus	28000	>5000	<5.6
Zingiberis Rhizoma	2600	440	5.9

a: HeLa cells were employed for both cytotoxicity and plaque assays.

b: Dose necessary to inhibit 50% of the growth of cells.

c: Dose necessary to inhibit 50% of the plaque-forming units.

胡は1~10 mg/ml, 半夏1~25 mg/ml, 甘草及び黄芩は0.5~2 mg/mlの量で使用した。著しい抗ウイルス作用の認められなかった人參, 大棗, 生姜については検討しなかった。その結果, Fig. 1に示したように小柴胡湯と黄芩に直接的殺ウイルス効果を認め, 他の生薬にはみられなかった。この場合, 小柴胡湯は1 mg/mlの濃度で残存感染性ウイルス粒子を47%に, 5 mg/mlでは31%に, また10 mg/mlでは2%にまで減少させた。黄芩の場合, 0.5 mg/mlで52%, 1 mg/mlで9%にまでウイルスを不活化することが認められた。

考 察

小柴胡湯のウイルス感染症に対する効果は, 基本的には本剤の有する特異的な抗ウイルス作用と非特異的な免疫賦活作用にあると思われる。小柴胡湯の免疫賦活能に関しては, インターフェロンの誘導, cAMP活性化, 細胞性免疫と体液性免疫の増強等が証明されている³⁾。小柴胡湯にはB型肝炎ウイルス感染細胞の破壊効果が認められ, HBe抗原の sero-conversionの促進もみられている⁶⁾。今回, まだその効果が検討されていないHSV-1の増殖について検討した。その結果, HSV-1に対する*in vitro*での治療指数は12.4となり, 比較的高い選択毒性を示すことが明らかになった。この方剤がウイルス増殖のどの段階に影響をあたえるのかは不明であるがその効果の少なくとも一部が直接的なウイルス不活化作用によるものであることが示唆された。

小柴胡湯を構成する単味生薬のうち, 柴胡³⁾, 甘草⁷⁾にインターフェロン誘導作用が見られる。主成分が同定されているものには柴胡, 甘草, 人參等がありそれぞれのsaikosaponin, glycyrrhizin, ginsenosideには抗ウイルス作用, 抗腫瘍効果等の生理活性が見いだされ, 高く評価されている。今回の実験では, HSV-1に対する*in vitro*での治療指数は柴胡10, 甘草25.8と高値を示したが, 一方, 人參は5未満となり抗HSV-1作用は期待できなかった。黄芩の治療指数は12で, 更に直接的な殺ウイルス活性を有することが明らかになった。このことから, 黄芩の抗ウイルス活性の作用機序の1つとしてウイルス不活化作用が考えられる。半夏の場合, HSV-1に対する治療指数が27となり, 被検試料の中で最も高い選択毒性を示した。しかし, その有効

成分は不明で, 化学的本体の解明に興味をもたれるところである。以上述べた各構成生薬については, 主要な成分と作用機序が明らかにされている部分もあるが, 多くの成分の薬理作用は未解明であり, 未知物質が抗ウイルス活性に寄与している可能性も考えられる。今回得られた*in vitro*での実験からみて, 実験動物を用いた*in vivo*の感染実験も検討する必要があると思われる。

結 論

小柴胡湯とその単味生薬を用いて単純ヘルペスウイルス1型の増殖への影響を*in vitro*のassay系で検討した。50%宿主細胞増殖抑制効果(ID₅₀)をtrypan blue exclusion法で, 50%ウイルス増殖抑制効果(ED₅₀)をplaque assayで検討した。その結果, HSV-1に対する治療指数は小柴胡湯12, 半夏27, 甘草26, 黄芩12, 柴胡10となり, いずれも比較的高い増殖抑制効果を示し, 人參, 大棗, 生姜には著しい効果がみられなかった。作用機序解明のため, HSV-1に対する直接的な不活化作用を検討したところ, 小柴胡湯と黄芩に殺ウイルス効果を認め, 他の生薬にはみられなかった。

文 献

- 1) Shimizu, K., Amagaya, S. and Ogihara, Y.: Combined effects of Syδ-saiko-tō (Chinese traditional medicine) on the anti-inflammatory action of steroid. *J. Pharmacobio-Dyn.* 7, 891-899, 1984.
- 2) Iwama, H., Amagaya, S. and Ogihara, Y.: Studies of combined use of steroid and Syδ-saiko-to, one of Kompo-hozai (Chinese traditional medicine), on pituitary-adrenocortical function and immune responses. *J. Pharmacobio-Dyn.* 9, 189-196, 1986.
- 3) 金 恩源, 常 春燕, 李 建平, 陳 麗妹, 魏 育林: 小柴胡湯の抗ウイルス作用と免疫能におよぼす影響. 第5回和漢医薬学会講演要旨集, p. 97, 1988.
- 4) 有地 滋: サイコ(柴胡). 治療学7, 693, 1981.
- 5) Baba, M. and Shigeta, S.: Antiviral activity of glycyrrhizin against varicella-zoster virus *in vitro*. *Antiviral Res.* 7, 99-107, 1987.
- 6) 溝口靖紘: Lymphokine Activated Killer (LAK) Cell 活性に及ぼす小柴胡湯の影響. アレルギー 35, 1119, 1986.
- 7) Abe, N., Ebina, T. and Ishida, N.: Interferon induction by glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in mice. *Microbiol. Immunol.* 26, 535-539, 1982.