

伝統医薬から抗ウイルス剤の検索法

—伝統医薬エキスの抗単純ヘルペスウイルス活性と治療効果について—

黒川 昌彦, 白木 公康*

富山医科薬科大学ウイルス学教室

Assay procedure of antiviral therapeutic agents from traditional medicines: Screening of antiviral traditional medicines against herpes simplex virus type 1 *in vitro* and *in vivo*

Masahiko KUROKAWA and Kimiyasu SHIRAKI*

Department of Virology, Toyama Medical and Pharmaceutical University

(Accepted September 14, 1994.)

Abstract

Traditional medicines contain various metabolites derived from nucleic acid, protein, and lipid metabolism. Some specific metabolites of them may recognize the differences between viral and host metabolism resulting in antiviral activity, and therefore traditional medicines are useful sources to search new antiviral agents. We described general assay procedures for antiviral activity and therapeutic activity of agents from traditional medicines. Based on these procedures, we applied them to screen about 200 traditional medicines for anti-herpes simplex virus type 1 activity (HSV-1) and found that 12 of their hot water extracts had anti-HSV-1 therapeutic activity in mice. Then we separated fractions with anti-HSV-1 therapeutic activity from these extracts by evaluating the chemical property of anti-HSV-1 compounds in them followed by isolation of anti-HSV-1 compounds. We hope that these procedures used for anti-HSV-1 activity would be useful to develop antiviral therapeutic agents from purified materials or extracts of traditional medicines.

Key words Traditional medicines, antiviral assay, anti-herpes simplex virus activity, anti-therapeutic agents.

はじめに

医療の高度化にともないエイズや免疫不全患者に対する抗ウイルス治療薬が開発され実用化されるようになってきた。エイズでは、アジドチミジン(AZT)、ジダノシン(ddI)、ザルシタビン(ddC)、スタブジン(D4T)、ホスホノメディン(PFA)等が治療に使用され、単純ヘルペスや水痘、帯状疱疹には、アデニンアラビノシド(ara A)、イドクスウリジン(IDU)、アシクロビル(ACV)、ソリ

ブジン(BVArU)、ペンシクロビル(PCV)、また、サイトメガロウイルスには、ガンシクロビル(DHPG)が使用されている(Table I)。しかしながら、免疫不全患者でのこれら薬剤の長期投与により耐性株が出現しており、細菌でのペニシリン耐性が出現してこれらに対応できるように種々の作用機序を有する抗生物質、抗菌剤が開発されてきた歴史が繰り返される感がある。そこで、これまで開発されてきた化学合成による核酸誘導体だけでなく、自然界に存在する天然物化合物にその対象が広げられてきている。¹⁻¹²⁾ 天然物由来の伝統医薬にはその由

*〒930-01 富山市杉谷2630
2630 Sugitani, Toyama 930-01, Japan

Table I Antiviral agents and their target sites in viral replication process.

Replication process	Antiviral agent	Target virus
Adsorption and invasion	Amantadine *	Influenza virus
	Remantadine *	Influenza virus
	Bis (5-amidino-2-benzimidazole) methane	Respiratory syncytial virus,
	Dextran sulfate	HIV
Uncoating	Amantadine *	Influenza virus
	Rimantadine *	Influenza virus
	4',6-Dichloroflavin, SDS	Rhinovirus, poliovirus
Transcription	9- β -D-Arabino furanosyladenine (ara A) *	HSV, varicella zoster virus, Hepatitis B virus
	(S)-9-(2,3-Dihydroxypropyl) adenine (DHPA)	Influenza virus
Replication	9- β -D-Arabino furanosyladenine (ara A) *	HSV
	Acyclovir *	HSV, varicella zoster virus
	Ganciclovir (DHPG) *	Cytomegalovirus
	1- β -D-Arabinofuranosyl- <i>E</i> -5- (2-bromovinyl) uracil (BVaraU) *	Varicella-zoster virus
	Penciclovir (PCV) *	HSV, varicella-zoster virus
	5'-Iodo-2'-deoxyuridine (IDU) *	HSV
	Phosphonoformate (PFA) *	HSV, HIV, Cytomegalovirus
	Ribavirin *	Respiratory syncytial virus RNA viruses, HSV
	2-(α -Hydroxybenzyl)-benzimidazole	Picornaviruses
	Azidothymidine (AZT) *	HIV
	Didanosine (ddI) *	HIV
	Dideoxycytidine (ddC) *	HIV
	Stavudine (D4T) *	HIV
Translation	Interferon	
Posttranslational processing		
	Protease inhibitor	Myxoviruses, picornaviruses, togaviruses, HIV
Glycosylation	2-Deoxy-D-glucose, D-glucosamine, tunicamycin	Myxoviruses, HSV
Budding or release		
	2-Deoxy-2,3-dihydro-N- trifluoroacetylneuramic acid (FANA)	Influenza virus

* Antiviral agents which is used in the world.

来する生物体特有な種々の代謝産物が含まれている。それらの中には宿主細胞とウイルス代謝の違いを認識して抗ウイルス活性を示す可能性のある物質が含まれていると考えられ、異なる抗ウイルス作用機序を持つ新しい抗ウイルス治療薬を開発するには格好の材料である。

本稿では、伝統医薬のエキス剤、抽出分画、精製化合

物など被検物質の抗ウイルス活性測定法について概説し、伝統医薬の抗ウイルス活性の一般的スクリーニング法の実験方法例と我々の実験結果例を紹介した。これらの方法を用いて、我々は、伝統医薬の抗単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1) 活性を *in vitro* と *in vivo* でスクリーニングし、HSV-1 感染症の治療に使用できる可能

性のある和漢薬を選択した。¹³⁾さらに、これら伝統医薬の *in vivo* で抗 HSV-1 活性を示す物質を含む分画やその活性物質の物性を簡便に推定できる実験法を示し、¹⁴⁾ この方法に基づき、いくつかの抗 HSV-1 活性物質を同定することができた。^{15, 16)} 伝統医薬からのエキス、分画、精製化合物の抗 HSV-1 活性を測定できるこれらの方法が、今後、和漢薬からの抗ウイルス活性物質の開発の参考になる事を願うものである。

1. 抗ウイルス活性測定法の概略

A. *in vitro* 抗ウイルス活性測定法

In vitro 抗ウイルス活性測定法では、一般に培養細胞を用いて被検物質によるウイルス感染性の不活化を含めた増殖抑制効果を測定する。このため、パピローマウイルス、C型肝炎ウイルスのように現在培養細胞を用いて増殖させることができないウイルスは例外であるが、目

的とするウイルスが増殖できる適切なウイルス-培養細胞系を選択することが必要である。また、被検物質が培養細胞に有効に取り込まれることができるように、抗ウイルス被検物質の化学的性質をできるだけ把握し、ウイルスあるいは宿主細胞代謝系の中で被検物質と培地成分とが競合することがないように培地を選択しなければならない(たとえば、核酸誘導体を試験する場合、salvage 回路を介するか否かによる核酸含有あるいは非含有培地の選択など)。このように、ウイルス-細胞-培地の適切な組み合わせの選択は、抗ウイルス活性を評価するために重要である。

HSV, サイトメガロウイルス, インフルエンザウイルス, ポリオウイルス, 麻疹ウイルス等は、以下に述べるように単層培養細胞を用いたプラーク減少法 (Fig. 1) によりウイルス増殖の抑制効果を定量的に測定できる。し

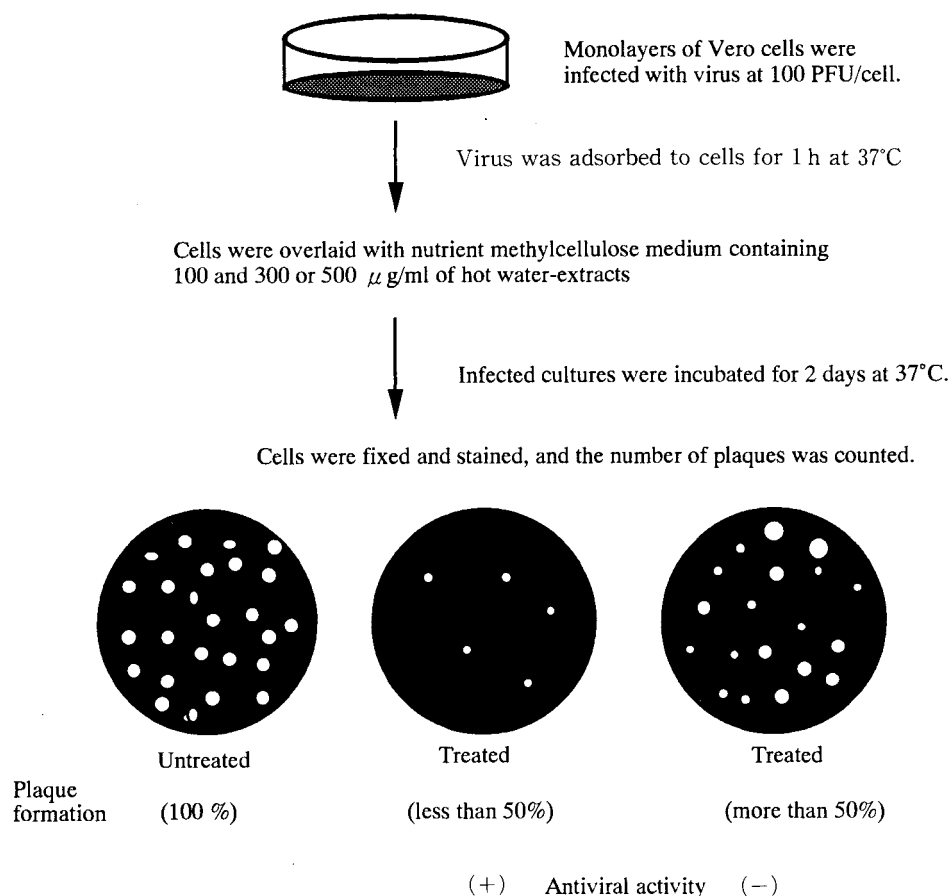


Fig. 1 Plaque reduction assay. When the test sample has antiviral activity, the number of plaques in the untreated dishes is reduced in the treated dishes or the size of plaques may become small. When the test sample does not have significant antiviral activity, the number and size of plaques in the treated dishes are not affected.

かし、血球細胞のような浮遊細胞に感染するEB (Epstein-Barr) ウイルス、ヒトヘルペスウイルス6型(HHV 6)¹⁷⁾、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 等は、ウイルス感染による細胞変性効果 (cytopathic effect, CPE) を指標にして、あるいは、蛍光抗体法、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法、Polymerase chain reaction (PCR) 法、ドットプロットハイブリダイゼーション法等でウイルス抗原や核酸量を測定し、ウイルス増殖抑制効果を検討しなければならない。また、単層培養細胞、浮遊細胞を問わず、CPE を起こすウイルスについてはCPEを指標にして簡便に多くの被検物質のウイルス増殖抑制効果を測定し、抗ウイルス活性をスクリーニングできる。

ウイルスは、宿主細胞内で段階的な増殖過程をとるので、抗ウイルス物質の標的となり得る過程も多い。Fig. 2にHIV増殖過程を例として示した。このウイルスに対しては、吸着、逆転写酵素活性、蛋白合成や修飾、出芽の各過程での阻害剤が知られている。このように、特定のウイルス増殖過程に必要とされる核酸、蛋白(酵素)に焦点を当てた抗ウイルス活性測定も行われる。主な阻害剤とそのターゲットとなるウイルス増殖過程をTable 1に概略した^{18, 19)} ウイルスの細胞への吸着阻害試験¹⁻⁴⁾、融合阻害試験^{20, 21)}、核酸合成阻害試験¹⁷⁾、逆転写酵素、蛋白分解酵素阻害剤を指標としたもの(服部らの実験技術例に詳述)等の特定のウイルス増殖過程の被検物質による阻害試験法についての詳細は他の総説、ウイルス試験法を参照していただきたい。

In vitro 抗ウイルス活性測定法は、ACVのように、感染細胞に対して直接効果を示し、生体内で吸収され直接抗ウイルス活性を示す物質²²⁾の検索には有効な方法である。しかし、プロドラッグとして存在する物質の検索には適していない。また、葛根湯のように生体内でbiological response modifiersを介して作用する²³⁾物質の検索にも適さないことを経験している。したがって、これらの活性を検索するには、次に述べるモルモットを用いた吸収実験や薬理学的、免疫学的な手法を用いて1次スクリーニングを行う必要があるだろう。

B. in vivo 抗ウイルス活性測定法

抗ウイルス剤の治療効果の有無は、動物感染実験で判定される。したがって、in vivo 抗ウイルス活性測定法では、ウイルス感染動物の病変進展度、臓器中ウイルス増殖量、致死率等への被検物質投与による影響を測定することにより、抗ウイルス治療効果を検討する。このため、最終的に人に対する被検物質の有効性が検討できる適切な感染動物実験モデル系を選択することが大切である。最近では、severe combined immunodeficiency (SCID)

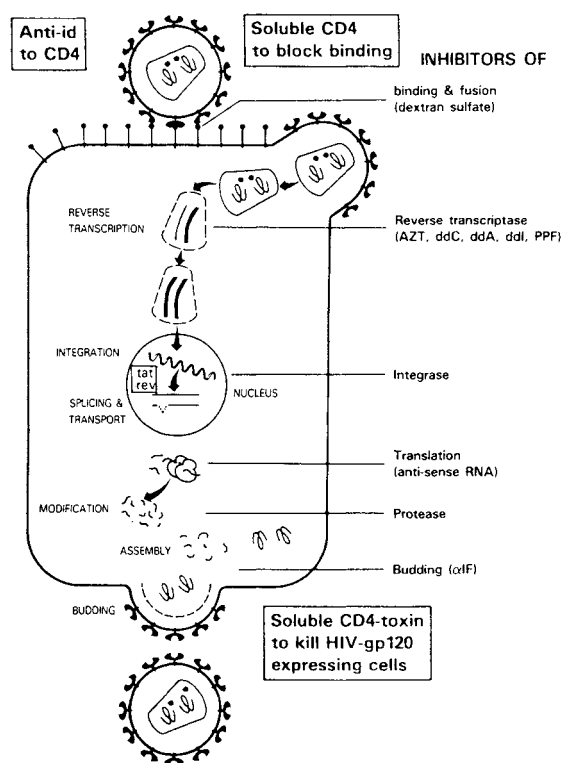


Fig. 2 Strategies for blocking HIV replication. This scheme depicts the simple life cycle of HIV replication. Strategies that interrupt retrovirus replication in general, and those for HIV in particular (boxed), are outlined. AZT, ddC, ddA, and ddI are deoxynucleotide analogues that cause chain termination. PPF is phosphonoformate, a reverse transcriptase inhibitor. α IF is α -interferon.

This scheme was adopted from Fields Virology, Second edition, Fields, B.N. (Ed) *et al.*¹⁷⁾ HSV replication is different from HIV. Nucleoside analogues as anti-HSV agents, such as ACV, show selective anti-HSV activity by inhibiting enzyme activity involved in the DNA synthesis of HSV. For example, ACV is selectively phosphorylated by thymidine kinase of HSV and the resulting triphosphorylated ACV inhibits DNA polymerase activity of HSV specifically; One of ara-A actions inhibits the synthesis of dCDP from CDP by ribonucleotide reductase; Trifluorothymidine (TFT) inhibits the synthesis of dTMP from dUMP by thymidylate synthetase.

マウスに移植したヒト胸腺やリンパ腺内でHIVが増殖できること^{24, 25)}やポリオウイルスの受容体を導入したトランスジェニックマウスがポリオウイルス感受性となること²⁶⁾が報告されており、ウイルスが本来感染しない動物でも、ウイルス感染動物モデルとして抗ウイルス治療薬開発に利用可能になると考えられる。

2. 伝統医薬の抗ウイルス活性測定の実際

以上のことを踏まえて、我々が抗 HSV-1 治療和漢薬のスクリーニングを行った実験の方法、手順を以下に示す。

A. 被検物質の濃度設定

被検物質として、伝統医薬を熱水、有機溶媒などで抽出したエキス、精製化合物などが考えられる。

被検物質の経口投与後、抗ウイルス活性物質がすべて吸収されることを前提とした血清中の被検物質濃度に相当する in vitro 試験濃度を設定した。生体内で吸収効率の非常に良い物質としてグルコースがある。糖尿病患者では、グルコースの 100 g 空腹時負荷試験で、血中糖濃度が 300 mg/dl (10 g 空腹時負荷試験に対しては 300 μ g/ml) に達する。²⁷⁾ このため、被検物質に含まれる抗ウイルス物質が最大限吸収されるとグルコースのような血中濃度に達することが考えられる。そこで、100 μ g/ml を in vivo における推定被検物質濃度として想定した場合、抗ウイルス活性を持つ可能性のある被検物質をできるだけ見逃さないために、より高い 300 μ g/ml あるいは 500 μ g/ml の濃度でも抗ウイルス活性を測定できる。このように in vivo で吸収され、生体内で達し得ると想定される被検物質の最高濃度あるいはそれより低い濃度で in vitro 抗ウイルス活性をスクリーニングできる。特に抗ウイルス比活性の高いと考えられる精製物質や合成化合物の抗ウイルス活性を検討する場合には、現在実用化されている治療薬のようにもっと低い濃度設定で有効な抗ウイルス活性を検討することができるだろう。また、注射薬として使用することを前提とすればこれらの濃度の設

定は、溶媒や溶解度などにより規定される可能性がある。一般的には、種々の投与方法による被検物質の pharmacokinetics に基づいて濃度設定を行うことが最善であるだろう。

B. in vitro 抗ウイルス活性測定

被検物質の抗ウイルス活性を定量的に検索するために、プラーク減少法を用いることができる。この方法は、単層培養細胞にウイルスを接種して数日後細胞を固定、染色した時、ウイルス感染により変性、脱落した細胞部分が染色されないでプラークになることに基づいている (Fig. 1)。このプラーク形成を利用して、ウイルス接種後被検物質非添加培地 (対照) で形成されたプラーク数を 100 % として被検物質添加培地で形成されたプラーク数の減少率を算定することにより抗ウイルス活性を検討できる。この時、通常用いる対照プラーク数は 50–100 個程度であるが、プラーク数が多過ぎる場合、薬剤感受性が低くなる事が知られている。また、プラークの数だけではなく、そのサイズの縮小化も抗ウイルス活性の指標となる。

熱水エキスをを用いたプラーク減少法 (Table II) では、プラーク数を対照の 50 % 以下に減少した熱水エキスを抗ウイルス活性を持つエキスとして選択した。これは、プラーク測定法の値のバラツキの範囲を越えており、有意の減少を意味することと、プラーク減少法でプラーク形成を 50 % 阻害する ACV 濃度 (ED50) が、in vivo でも有効な抗ウイルス活性を示す血清中濃度に相当している例があるからである。²⁸⁻³⁰⁾

Table II Antiviral assay of hot water extracts by plaque reduction assay.

Traditional medicines	Used part	Plaque formation (%) ^a						Cytotoxicity			
		100 μ g/ml			300 or 500 μ g/ml			100 μ g/ml		300 or 500 μ g/ml	
		HSV	Polio	Measles	HSV	Polio	Measles	Visible ^b	DNA ^c	Growth ^d	Visible DNA
								(%)	(%)	(%)	(%)
<i>Ainsliaea fragrans</i> Champ.	whole plant	55.7	94.2	87.0	51.7	84.4	88.6	—		—	
<i>Alisma plantago-aquatica</i> L.var. orientale Samuelsson	rhizome	98.2	79.9	83.8	81.7	72.7	105.1	—		— ^e	
<i>Allolophora caliginosa trapezoides</i> Ant. Druges	whole body	82.6	86.9	91.9	79.2	93.3	61.1	—		—	
<i>Alocasia odora</i> K.Koch	rhizome	96.8	89.1	64.7	88.1	81.4	90.5	—		—	
<i>Alpinia officinarum</i> Hance ^{f,g}	rhizome	106.8	58.9	107.7	0.0 ^b	11.5	90.2	—	73.5	87.6	± 62.2
<i>Alyxia stellata</i> Roem.	bark	59.8	74.6	87.0	57.9	75.4	95.3	—		—	
<i>Andrographis paniculata</i> Nees	bark	61.7	88.1	87.9	63.6	55.1	105.1	—		—	
<i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge ^g	rhizome	84.1	44.2	89.1	95.2	30.1	94.1	±		± ^e	
<i>Angelica acutiloba</i> Kitagawa var. sugiyamae Hikino	root	108.5	63.5	123.5	116.9	66.7	307.8	—		±	
<i>Arctostaphylos uva-ursi</i> (L.) Sprengel	leaf	111.0	63.3	110.6	74.0	54.6	67.1	—		±	
<i>Areca catechu</i> L. ^{f,g,i}	seed	0.0	86.5	93.6	0.0	0.0	0.0	±	64.7	91.2	± ^e 52.8
<i>Aristolochia contorta</i> Bge.	fruit	88.8	108.8	88.1	99.1	120.2	67.6	—		—	
<i>Artemisia capillaris</i> Thunb.	seeding	79.1	71.8	97.5	59.7	52.5	91.3	—		—	
<i>Artemisia princeps</i> Pamp. ^{f,g,i}	leaf	65.0	84.3	10.8	0.0	40.5	13.6	—	47.8	84.7	— ^e 47.5

<i>Asiasarum heterotropoides</i> F. Maekawa var. <i>seoulense</i> F. Maekawa ^g	whole plant	95.1	73.2	104.3	98.6	43.0	118.1	—	— ^e		
<i>Aster tataricus</i> L.f.	root	109.8	109.2	84.9	83.3	99.5	105.9	—	—		
<i>Astragalus membranaceus</i> (Fisch.) Bge.	root	86.8	88.4	74.9	81.3	92.4	82.9	—	—		
<i>Atractylodes lancea</i> (Thunb.) DC.	rhizome	74.7	83.7	87.5	106.6	82.7	99.7	—	—		
<i>Atractylodes ovata</i> DC.	rhizome	91.5	104.9	92.2	91.5	104.6	88.2	—	— ^e		
<i>Aucklandia lappa</i> Dcne.	root	103.4	77.6	86.5	100.0	63.8	83.7	—	—		
<i>Belamcanda chinensis</i> (L.) DC. ¹	rhizome	110.5	97.4	100.0	86.3	55.1	0.0	±	± ^e		
<i>Bletilla striata</i> (Thunb.) Reichb.fil.	rhizome	123.7	109.9	89.2	98.3	77.7	105.9	—	— ^e		
<i>Brainia insignis</i> (Hook.) J.Sm. ^{1,2}	rhizome	62.7	61.0	109.7	0.0	54.6	5.1	—	87.3	90.7	± 73.8
<i>Brucea javanica</i> (L.) Merr. ^{1,2,3}	seed	6.3	0.0	37.2	0.0	0.0	0.0	±	9.7	45.0	± 4.5
<i>Buthus martensi</i> Karsch	whole body	104.7	81.4	83.2	84.4	85.5	84.8	—	—		
<i>Caesalpinia sappan</i> L. ^{1,2,3}	bark	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	+	2.8	11.1	++ 0.0
<i>Camellia japonica</i> L.	leaf	89.7	85.3	88.2	54.8	59.0	102.3	—	—		
<i>Cannabis sativa</i> L.	fruit	91.2	100.5	87.8	82.4	73.4	93.7	—	—		
<i>Cassia fistula</i> L. ^{1,2,3}	bark	67.0	52.1	100.0	0.0	2.8	14.1	±	6.7	76.5	± 3.6
<i>Chrysanthemum morifolium</i> Ramat.	capitulum	92.1	98.2	98.2	86.8	81.7	68.7	—	— ^e		
<i>Cimicifuga heracleifolia</i> Komarov	rhizome	84.1	84.6	86.9	79.4	82.1	103.6	—	—		
<i>Cinnamomum sintok</i> Blume ^{1,2,3}	bark	0.0	102.5	153.0	0.0	0.0	0.0	±	71.9	109.3	+ 47.4
<i>Citrus unshiu</i> Marc.	fruit peel	79.1	103.5	110.0	62.8	77.7	106.8	—	—		
<i>Clematis chinensis</i> Osbeck	root	99.2	98.7	76.9	100.0	64.1	83.3	—	—		
<i>Cnidium monnieri</i> (L.) Cuss.	fruit	100.0	78.9	100.0	85.8	81.7	100.0	—	—		
<i>Coix lacryma-jobi</i> L. var. <i>ma-yuen</i> Stapf	seed	74.5	93.6	77.1	98.0	100.5	71.2	—	—		
<i>Coptis chinensis</i> Franch. ^{1,2,3}	rhizome	74.1	89.7	5.6	0.0	0.0	0.0	±	52.3	65.8	+ ^e 22.3
<i>Cornus officinalis</i> Sieb. et Zucc.	fruit	102.1	82.2	100.0	97.9	57.2	100.0	—	— ^e		
<i>Corydalis yanhusuo</i> W. T. Wang ^g	rhizome	101.7	77.4	358.8	78.0	6.4	380.4	—	± ^e		
<i>Curculigo orchoides</i> Gaertn. ^g	fruit	77.6	88.1	104.7	77.6	42.4	126.0	—	—		
<i>Curcuma aeruginosa</i> Roxb. ^g	rhizome	70.1	34.0	136.7	78.5	29.7	112.6	±	±		
<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb. ^g	rhizome	77.6	39.0	103.7	84.1	35.6	113.5	±	±		
<i>Cyperus rotundus</i> L.	rhizome	81.4	89.9	73.2	78.4	104.6	84.4	—	—		
<i>Cyrtomium fortunei</i> J. Sm. ^{1,2,3}	rhizome	59.6	66.5	112.1	0.0	0.0	0.0	±	97.5	101.7	+ 49.8
<i>Dictamnus dasycarpus</i> Turcz.	root bark	134.2	121.4	74.8	135.6	130.6	78.9	—	—		
<i>Dioscorea hispida</i> Dennst.	rhizome	50.0	95.8	69.4	58.3	94.8	72.3	—	—		
<i>Drynaria fortunei</i> (Kunze) J. Smith ¹	rhizome	87.4	90.5	108.5	0.0	64.2	107.7	—	45.6	106.2	± 15.5
<i>Dryopteris crassirhizoma</i> Nakai ^g	rhizome	62.1	93.8	89.9	51.7	48.4	91.7	—	—		
<i>Elaeocarpus grandiflorus</i> Smith ^{1,2,3}	fruit	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	+	21.4	7.8	++ 6.4
<i>Elephantopus scaber</i> L. ^{g,1}	leaf	85.8	20.8	85.0	59.2	17.7	47.8	±	±		
<i>Ephedra sinica</i> Stapf ^g	stem	92.7	43.2	100.9	68.1	100.0	96.6	—	±		
<i>Epimedium sagittatum</i> (Sieb. et Zucc.) Maxim. ¹	leaf	65.1	91.7	84.3	42.3	92.6	77.3	—	96.8	87.0	— 81.5
<i>Equus aninus</i> L.	gelatin	91.8	64.3	81.7	91.8	66.3	89.4	—	—		
<i>Euphorbia kansui</i> Liou	root	105.5	83.7	94.7	105.5	75.0	97.6	—	—		
<i>Evodia rutaecarpa</i> Hook. f. et Thoms. ^g	fruit	83.8	82.1	94.4	92.1	41.1	94.9	—	—		
<i>Ficus edelfeltii</i> King.	bark	104.4	108.3	87.9	85.4	68.5	111.2	—	—		
<i>Forsythia suspensa</i> Vahl. ^{g,1}	fruit	98.6	72.9	26.1	60.8	30.7	6.7	—	± ^e		
<i>Fritillaria thunbergii</i> Miq.	rhizome	87.3	56.0	89.8	70.6	90.4	89.3	—	—		
<i>Galium aparine</i> L.	whole plant	65.6	81.4	75.4	78.1	78.5	83.2	—	—		
<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis	fruit	112.6	87.4	94.0	93.7	58.8	112.1	—	— ^e		
<i>Gentiana macrophylla</i> Pall.	root	84.3	87.2	72.2	94.1	78.0	95.6	—	—		
<i>Gentiana scabra</i> Bunge	root, rhizome	95.8	99.5	57.2	90.8	86.2	79.5	—	—		
<i>Geranium thunbergii</i> Sieb. et Zucc. ^{1,2,3}	whole plant	91.6	30.0	104.7	23.5	21.5	0.0	±	76.1	76.4	± 35.3
<i>Geum japonicum</i> Thunb. ^{1,2}	whole plant	81.7	90.4	76.1	0.0	0.0	79.9	—	88.9	65.0	± ^e 40.7
<i>Ginkgo biloba</i> L.	leaf	84.2	98.9	128.8	86.8	92.8	54.6	—	— ^e		
<i>Ginkgo biloba</i> L.	fruit	103.4	108.1	133.3	100.0	85.8	337.3	—	— ^e		
<i>Houttuynia cordata</i> Thunb.	whole plant	69.8	81.2	101.9	68.2	64.4	105.6	—	—		
<i>Juglans mandshurica</i> Maxim. ^{1,2,3}	bark	73.6	35.5	96.5	0.0	4.8	3.5	—	60.1	73.4	+ 51.1
<i>Lasiosphaera fenzlii</i> Reich.	fruit body	89.2	100.4	76.7	81.6	105.0	77.3	—	—		
<i>Lithospermum erythrorhizon</i> Sieb. et Zucc. ^g	root	97.5	61.9	87.9	107.6	50.0	88.4	—	—		
<i>Lonicera japonica</i> Thunb.	flower bud	114.7	105.2	95.8	109.8	106.4	96.6	—	— ^e		
<i>Loranthus parasiticus</i> (L.) Merr. ^g	aerial part	60.0	83.3	91.0	67.5	29.2	93.7	—	—		
<i>Lycium chinense</i> Mill.	fruit	86.8	95.0	106.2	73.6	82.2	94.4	—	—		
<i>Lycopus lucidus</i> Turcz.	whole plant	93.3	91.2	95.1	87.9	90.1	101.6	—	—		
<i>Machilus thunbergii</i> Sieb. et Zucc. ^{1,2}	bark	98.6	55.6	111.8	17.8	0.0	62.2	—	96.2	83.3	± 89.4
<i>Magnolia fargesii</i> Cheng	flower bud	90.8	79.0	87.4	119.3	81.4	83.7	—	—		
<i>Magnolia obovata</i> Thunb.	bark	94.1	70.5	77.2	94.1	79.5	97.2	—	—		
<i>Magnolia officinalis</i> Rehd. et Wils. ¹	bark	71.7	122.7	71.6	95.5	120.6	34.1	—	±		

<i>Matteuccia orientalis</i> (Hook.) Trev.	rhizome	79.6	68.6	70.2	70.8		—		—			
<i>Matteuccia orientalis</i> (Hook.) Trev.	spore	81.7	56.9	93.2	72.1		75.3	—	—			
<i>Matteuccia struthiopteris</i> (L.) Todaro ^s	rhizome	49.7	65.9	86.6	60.9	34.6	96.2	—	—			
<i>Melia toosendan</i> Sieb. et Zucc.	fruit	99.2	91.0	94.1	98.4	90.4	86.4	—	—			
<i>Miscanthus sinensis</i> Anderss.	spike	98.9	87.4	85.8	82.4	86.7	75.8	—	—			
<i>Nandina domestica</i> Thunb.	leaf	91.5	71.3	189.2	96.6	63.5	251.0	—	— ^e			
<i>Oldenlandia diffusa</i> (Willd.) Roxb.	whole plant	88.8	99.0	91.9	78.1	90.0	61.1	—	— ^e			
<i>Ophiopogon japonicus</i> Ker-Gawler	root	147.5	105.2	103.0	127.1	109.9	123.5	—	— ^e			
<i>Paeonia suffruticosa</i> Andrews ^{f,g,i}	root bark	96.5	124.2	119.1	0.0	35.5	0.0	±	93.3	98.2	± ^e	73.4
<i>Parameria laevigata</i> Moldenke ^s	bark	52.5	43.8	102.0	68.3	32.3	88.1	±	±			
<i>Parkia roxburghii</i> Benth.	fruit	99.3	100.0	85.0	70.8	78.7	105.8	—	—			
<i>Patrinia villosa</i> Juss.	root	99.3	99.5	78.9	78.9	80.3	99.9	—	— ^e			
<i>Phellodendron amurense</i> Ruprecht ^{f,g,i}	bark	85.3	103.4	17.2	29.4	43.3	0.6	±	57.5	59.7	± ^e	32.6
<i>Physalis angulata</i> L. ^s	aerial part	102.9	17.6	108.7	86.1	0.0	105.8	±	±			
<i>Picrorrhiza kurroa</i> Royle ex. Benth.	rhizome	98.4	71.8	62.4	112.7	67.9	74.2	—	—			
<i>Pinellia ternata</i> Breitenbach	rhizome	109.6	106.6	100.0	71.2	106.1	50.8	—	—			
<i>Pistacia lentiscus</i> L. (?)	resin	105.5	70.5	100.7	89.0	82.2	90.7	—	—			
<i>Plagiogyria matsumureane</i> Makino ^s	rhizome	76.1	73.9	90.8	50.7	0.0	84.6	±	±			
<i>Platycodon grandiflorum</i> (Jacquin) A.DC. ⁱ	root	86.3	123.0	95.1	105.5	97.4	0.0	—	—	±		
<i>Polygala tenuifolia</i> Willd. ^{f,g,i}	root	118.6	86.4	100.0	0.0	0.0	0.0	±	49.8	67.6	+ ^e	38.1
<i>Polygonum cuspidatum</i> Sieb. et Zucc. ^{f,g}	root, rhizome	93.4	88.0	112.0	0.0	38.0	105.7	—	75.9	78.4	— ^e	70.0
<i>Portulaca oleracea</i> L.	aerial part	93.7	95.1	80.2	75.5	72.2	154.3	—	—			
<i>Prunella vulgaris</i> L. subsp. <i>asiatica</i> Hara ^f	spike	66.1	83.5	111.8	0.0	64.6	111.8	—	92.4	102.6	— ^e	75.3
<i>Prunus armeniaca</i> L.	seed	95.1	103.1	104.2	101.4	116.5	108.9	—	— ^e			
<i>Prunus mume</i> Sieb. et Zucc. ^s	fruit	88.0	75.8	73.1	102.1	38.9	74.4	—	—			
<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch.	seed	130.5	89.9	130.4	93.2	73.3	323.5	—	— ^e			
<i>Pueraria lobata</i> (Willd.) Ohwi	root	96.5	89.6	102.6	82.5	84.8	98.3	—	— ^e			
<i>Pulsatilla chinensis</i> (Bunge) Regel	root	100.0	74.6	100.0	105.6	101.5	102.3	—	—			
<i>Punica granatum</i> L. ^{f,g,i}	root bark	0.0	79.5	0.0	0.0	0.0	0.0	±	103.5	67.4	+ ^e	38.7
<i>Quercus salicina</i> Blume ^s	leaf	74.0	48.0	95.9	98.6	30.6	89.0	—	—			
<i>Quisqualis indica</i> L. ^s	fruit	100.0	28.2	10.0	105.2	16.9	127.3	—	—			
<i>Rheum palmatum</i> L. ^{f,g,i}	rhizome	93.2	13.7	108.1	0.0	0.0	0.0	—	64.4	64.6	+	50.3
<i>Rhus javanica</i> L. ^{f,g,i}	gall	0.0	65.1	3.4	0.0	4.3	0.0	±	20.1	41.7	± ^e	12.4
<i>Rosa laevigata</i> Michx. ^s	fruit	100.0	25.4	108.2	80.9	69.0	97.6	—	—			
<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	root	89.9	87.1	98.7	58.6	83.3	65.8	—	— ^e			
<i>Sarcandra glabra</i> (Thunb.) Nakai	leaf	67.7	129.8	92.6	51.6	140.3	76.7	—	—			
<i>Schizandra chinensis</i> (Turcz.) Baill.	fruit	99.3	121.4	110.6	101.4	119.0	108.5	—	—	± ^e		
<i>Scolopendra subspinipes multidentis</i> L. Koch.	whole body	101.6	93.8	94.8	81.3	76.4	81.7	—	—			
<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi ^{f,g,i}	root	78.3	66.0	12.3	66.4	14.7	5.0	—	— ^e			
<i>Senecio kirliloui</i> Turcz.	whole plant	103.1	105.9	90.9	86.1	96.6	87.5	—	—			
<i>Sida mysorensis</i> Wight et Arn. ^s	seed	100.0	67.6	100.0	100.3	33.8	53.1	—	—			
<i>Sinomenium acutum</i> Rehd. et Wils	root	108.0	100.0	94.7	112.4	64.8	99.5	—	—			
<i>Sophora japonica</i> L. ^s	flower bud	81.3	67.1	97.2	65.4	49.5	98.1	—	—			
<i>Sophora subprosarata</i> Chun et Chen	root	96.5	99.5	103.4	88.1	57.7	131.9	—	— ^e			
<i>Spatholobus suberectus</i> Dunn ^{f,g,i}	rhizome	92.2	80.2	75.4	0.0	0.0	0.0	—	82.8	61.7	±	35.4
<i>Stellera chamaejasme</i> L.	root	81.6	87.0	80.0	80.1	81.7	83.9	—	—			
<i>Stemona japonica</i> Miq.	root	79.4	106.9	72.7	91.2	103.2	80.0	—	—			
<i>Strobilanthes crispus</i> L.	leaf	107.3	109.3	90.3	93.4	94.4	114.6	—	—			
<i>Struthiopteris nipponica</i> (Kunze) Nakai ^s	rhizome	57.1	66.0	96.1	56.5	33.4	94.6	—	—			
<i>Strychnos nux-vomica</i> L. ^s	seed	60.8	39.6	89.1	88.3	47.9	87.8	—	—	±		
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. et Perry ^{f,g,i}	flower bud	79.4	55.1	98.6	0.0	0.0	0.0	±	70.6	66.8	+	
<i>Taraxacum mongolicum</i> Hand.-Mazz.	whole plant	101.4	113.5	84.3	83.9	125.7	78.8	—	— ^e			
<i>Terminalia arjuna</i> Wight et Am. ^{f,g,i}	bark	56.3	22.5	100.0	0.0	0.0	0.0	±	67.5	76.0	+	40.9
<i>Terminalia belerica</i> Roxb. ^{f,g,i}	fruit peel	70.8	7.4	104.4	0.0	0.0	0.0	±	82.2	73.0	+	22.4
<i>Terminalia chebula</i> Retz ^{f,g,i}	fruit	99.6	32.6	152.0	0.0	0.7	0.0	—	77.5	66.9	+ ^e	18.3
<i>Uncaria gambir</i> Roxburgh ^s	leaf	97.4	85.3	104.7	89.5	24.2	92.7	—	—			
<i>Usnea misaminensis</i> Vain.	whole plant	117.8	111.1	86.9	84.7	53.7	93.2	—	—			
<i>Viscum album</i> L. var. <i>coloratum</i> (Komar.) Ohwi	stem, leaf	72.1	80.2	93.2	73.6	86.6	102.5	—	—			
<i>Woodfordia floribunda</i> Salisb. ^{f,g,i}	flower, leaf	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	+	86.1	61.6	++	13.8
<i>Zanthoxylum bungeanum</i> Maxim. ^{f,g}	fruit peel	107.7	80.4	100.0	20.3	14.3	100.0	—	72.2	93.8	± ^e	49.9
<i>Zanthoxylum schinifolium</i> Sieb. et Zucc.	fruit peel	90.1	75.8	103.1	82.4	77.9	98.6	—	—			
<i>Zea mays</i> L.	stigma	77.6	91.0	73.9	80.1	86.0	85.3	—	—			
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	rhizome	79.4	87.6	94.6	79.4	76.6	101.5	—	—			
<i>Ziziphus jujuba</i> Mill. var. <i>inermis</i> (Bge.) Rehd.	fruit	85.7	101.7	88.6	80.3	104.2	92.6	—	—			

^a The range of plaque numbers of untreated controls was 50-150. Plaque formation represents the percentage compared to untreated controls. Percent plaque formation of HSV-1 was 0 % at both 100 and 300 $\mu\text{g/ml}$ of ACV.

^b ++, +, $\pm$, and - indicate strong, intermediate, weak, and no cytotoxicity, respectively.

^c Percent of [^3H]-thymidine-uptake into DNA of HW-extracts-treated cells to that of untreated-cells. The cells were treated with 100 or 300 $\mu\text{g/ml}$ of HW-extracts. Traditional medicines indicated by footnote (f) in this Table I were tested.

^d Percent of the number of cells grown in the presence of HW-extracts (100 $\mu\text{g/ml}$) to that in its absence. Traditional medicines indicated by footnote (f) in this Table I were tested.

^e Plaque reduction assay was performed at 500 $\mu\text{g/ml}$.

^f HSV-1-inhibitory traditional medicines selected in this assay.

^g Poliovirus-inhibitory traditional medicines selected in this assay.

^h Underlines represent the percentages less than 50 % in plaque reduction assay.

ⁱ Measles virus-inhibitory traditional medicines selected in this assay.

C. 細胞毒性試験

細胞毒性を示す被検物質濃度に対する抗ウイルス活性を示す被検物質濃度の比率 (therapeutic index) が大きいほど優れた抗ウイルス活性物質と考えられている。したがって、細胞毒性試験は、抗ウイルス活性測定のため設定された被検物質濃度で、一般に抗ウイルス活性測定と平行して行われる。また、この試験は、通常被検物質による細胞増殖阻害、DNA 合成阻害等を指標にして行われ、複数の細胞毒性試験法による結果を総合的に検討して被検物質の抗ウイルス活性が評価される (Table II)。

D. モルモット血清を用いた抗ウイルス活性吸収試験と代謝物質の抗ウイルス活性試験

In vitro 抗ウイルス活性測定法で抗ウイルス活性を示した被検物質の有効成分が、すべて in vivo で吸収され抗ウイルス活性を示すとは限らない (注射薬、外用薬として使用する場合はこの限りではない)。そこで、感染動物実験で被検物質の治療効果を検討する前段階として、モルモットの消化管に直接被検物質を投与し、得られた血清中の抗ウイルス活性を調べることにより、in vitro で活性を示した被検物質が in vitro でも抗ウイルス活性を示すことができるかを検索できる。¹⁴⁾ また、この方法を用いれば、生体内で代謝され、はじめて抗ウイルスを示す被検物質の検索にも利用できると考えられる。

モルモット消化管のどの部位から伝統医薬被検物質の抗ウイルス活性成分が吸収されるかは不明である。このため、消化管のすべての部位 (胃、小腸、大腸) に同時に被検物質を投与することにより、被検物質中の抗ウイルス活性成分の吸収部位の違いによる吸収効率の不均一化を避けることができる。また、抗ウイルス剤は、ACV のように経口投与後 2 時間以内に吸収され、生体内で有効な抗ウイルス活性を発揮することが必要であると考えられる。²²⁾ そこで、消化管に被検物質を投与し、2 時間後に採血、分離した血清中の抗ウイルス活性を測定した。しかし、一般的に pharmacokinetics により、体内分布

に臓器特異性などがある被検物質についてはこの方法は適切でないだろう。Woodwardia orientalis (貫衆) のように in vitro で強い抗ウイルス活性を示しても、血清吸収分画にその活性が認められず、また、マウスへの経口投与でも有効性を認めない被検物質もある。このような場合、被検物質が生体内で吸収されるか否かについて投与方法を含め検討する必要があるだろう。

血清中の抗ウイルス活性の測定には、ウイルス増殖抑制試験法を用いることができる。生体内では、臓器当たりの増殖総ウイルス量の減少度が、抗ウイルス剤の治療効果に反映する。このため、ウイルス増殖抑制試験法は、プラーク減少法よりも in vivo で臓器中のウイルス量を反映した実験系であると考えられ、被検物質投与モルモット血清存在下で一定細胞数当たりに増殖した総ウイルス量と水投与対照モルモット血清存在下で増殖した総ウイルス量を比較して被検物質による臓器中のウイルス増殖抑制効果の判定ができる。

E. in vivo 抗ウイルス活性測定

経口投与した被検物質の抗 HSV-1 治療効果を検討するには、人で多く見られる HSV-1 皮膚感染に相当するマウス経皮感染モデルを用いることができる。^{13, 31, 32)} 用いたマウス経皮感染系は、マウスが感染後 8-10 日で脳炎により死亡する致死モデルである。^{13, 32)} しかし、その皮膚病変は、マウスが死に至るまでに人での HSV-1 感染で見られる皮膚病変 (水疱、びらん、帯状皮疹) の進展に類似した経過をたどる (Fig. 3)。このため、単に致死率を比較して被検物質の抗ウイルス活性の有無を判定するだけでなく、皮膚病変の程度や遅延状況に対する臨床的な治療効果における有効性も検討できる利点がある。また、人に対する伝統医薬の抗ウイルス治療効果を推測するため、人で用いられている乾燥伝統医薬の投与量に相当する量をマウスに投与した。ここで大切なことは、現在一般に使用されている抗ウイルス剤との効果の比較試験を行い、この抗ウイルス剤と被検物質の有効性と特異性について比較することである。



0 day after infection (Score 0)



5-6 days after infection (Score 6)



3-4 days after infection (Score 2)



8-10 days after infection (Score 8)



5-6 days after infection (Score 4)



8-10 days after infection (Score 10)

Fig. 3 Development of skin lesions in mice infected with HSV-1. HSV-1 replicated in the skin is transported to spinal ganglia through sensory neuron and grows in the ganglia. The grown viruses return to skin through sensory neuron again at about 3 days after infection and grow in the skin along sensory neuron extensively. Therefore skin lesions, such as vesicles, erosion, ulceration, and zosteriform are formed.

F. 被検物質の実験方法例

以下に我々が、約200種の伝統医薬から12種の抗HSV-1治療薬をスクリーニングした実験を例として、プラーク減少法、細胞毒性試験法、モルモットへの熱水エキス投与法、ウイルス増殖抑制試験法、動物感染実験の順に実験方法例を示す。

[プラーク減少法の実験方法例 (Fig. 1)]

プラスチック培養皿(60 mm Φ)に単層培養したアフリカミドリザル腎臓由来 Vero 細胞に、100個のプラークを形成できるウイルス量を含むウイルス液(100プラーク形成単位, PFU/0.2 ml)を加え、ウイルスを細胞に吸着させる。室温で1時間後、設定した濃度の被検物質(経口投与を前提とした時、精製化合物やエキスの濃度は0-300 μ g/ml)を含む維持培地[0.8%メチルセルロース、2%仔牛血清を添加した Eagle's minimum essential medium (MEM) 培地]を細胞に重層し、数日間37°Cで細胞を培養する。倒立顕微鏡でプラーク形成を確認し、5%ホルマリン溶液で細胞を固定、0.03%メチレンブルー溶液で染色後、形成されたプラークを数える。プラークが小さいときは実体顕微鏡下でプラークを数えた。用いた Vero 細胞は、HSV (1型, 2型)、麻疹ウイルス、ポリオウイルス等多くのウイルス種に感受性であり、種々のウイルス増殖に広く利用されている培養細胞である。このため、DNA ウイルスか RNA ウイルスか、あるいはエンベロープがあるか否か等による構造様式、増殖様式の異なるウイルスに対する抗ウイルス活性を同時に調べることが可能となり、被検物質の作用機序の違いも推定できる。

[細胞毒性試験方法例]

プラーク減少法に伴った細胞毒性評価例: 培養液中に毒性物質が存在することにより死細胞となった単層培養細胞は、培養皿表面に吸着できなくなり、細胞を固定、染色後も死細胞が脱落した部位は染色されない。このため、プラーク減少法でプラスチック培養皿表面に染色され残った非感染細胞(プラーク以外の部分)の染色度合によって細胞毒性を評価できる。この方法は、プラーク減少法に伴ってできる簡便さがあり、非感染細胞の脱落地合をスコア化して細胞毒性を検討できる (Table II)。

細胞増殖抑制試験方法例: 24穴プレートの1穴当たり 2.5×10^4 個の Vero 細胞を植え込み、5%仔牛血清を含む2 ml の MEM 培地で37°C、2日間培養する。培養液を除去後、抗ウイルス活性測定のために設定した濃度の被検物質を含む新鮮培地を加え、さらに2日間細胞を培養する。単層に増殖した細胞をトリプシンで処理後、トリパンブルー溶液(青色色素液)に細胞を懸濁する。この結

果、死細胞は青色を呈し、生細胞は青色に染色されないため、血球計算板を用いて生細胞数を算定することができる。

^3H -チミジンの取込み試験例: 細胞増殖抑制試験と同様に、Vero 細胞を24穴プレートで2日間培養する。培養液を除去後、 ^3H -チミジン (37 kBq) と抗ウイルス活性測定のために設定した濃度の被検物質を含む新鮮培地を加え、さらに細胞を培養する。18時間後、20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、5 mM EDTA、0.5% SDS、100 μ g/ml proteinase K を含む溶解液で細胞を溶解し、溶解液の一定量 (50-100 μ l) をろ紙 (1 cm $\times$ 1 cm) にスポット後ただちに氷冷した5%トリクロロ酢酸でDNAを固定する。その後、ろ紙をエタノールで洗浄し、乾燥後、液体シンチレーションカウンターでろ紙の放射活性を測定する。この方法では、被検物質が ^3H -チミジンと競合して細胞に取り込まれる物質である場合には、 ^3H -チミジンの細胞への取り込みが減少することを考慮しなければならない。

[モルモットへの熱水エキス投与法の実験方法例]

モルモットを麻酔下で開腹し、胃、小腸、大腸に直接注射器で各々10 mlの水に懸濁した大量の被検物質を投与後直ちに閉腹した。2時間後、麻酔下で全血液を採取し、血清を無菌的に分離した。この血清中の抗ウイルス活性を以下のウイルス増殖抑制試験法で検討した。

[ウイルス増殖抑制試験法の実験方法例]

プラスチック培養フラスコ (25 cm 2) に単層培養した Vero 細胞に、100個の細胞当たり1個のプラークが形成できるように希釈したウイルス液 (0.01 PFU/細胞/0.2 ml) を加え、室温で1時間ウイルスを細胞に吸着させる。吸着後、25%モルモット血清を含む5 mlのMEM培地を加え、37°Cで細胞を培養する。HSV-1の増殖サイクルは6-8時間のため、24時間後に凍結、融解した培養液を3,000回転、15分遠心した上清中のウイルス量を Vero 細胞を用いたプラーク法で決定した。

[マウス HSV-1 経皮感染実験方法例]

Balb/c マウス (6週令, 雌) の右側腹部を脱毛剤 (ヘアリムーバー) を用いて脱毛した。この脱毛した表皮 (5 mm $\times$ 5 mm の範囲) を10本に束ねた27G皮内針で乱切り、 1×10^6 PFU/7 μ l の HSV-1 (7401H 株) を滴下、塗布することにより感染させた。被検物質 (人で用いられている乾燥伝統医薬の投与量に相当するマウスに対する量) あるいは対照とした水は、ウイルス感染8時間前に一度経口投与し、感染後、1日3回8時間毎に7日間投与した。一日3回の投与の際に皮膚病変の進展を観察、次のように皮膚病変を数値化し、マウス皮膚病変の遅延、延命作用などの治療効果を検討した。0: 病変なし, 2:

Table III Antiviral activity of anti-HSV-1 traditional medicines against other viruses.

Virus specificity : Traditional medicines
HSV-1 only : <i>Drynaria fortunei</i> , <i>Epimedium sagittatum</i> , <i>Purunella vulgaris</i>
Poliovirus, HSV-1 : <i>Alpinia officinarum</i> , <i>Geum japonicum</i> , <i>Matteuccia struthiopteris</i> , <i>Polygonum cuspidatum</i> , <i>Zanthoxylum bungeanum</i>
Measles virus, HSV-1 : <i>Brainia insignis</i>
Poliovirus, measles virus, and HSV-1 : <i>Areca catechu</i> , <i>Artemisia princeps</i> , <i>Brucea javanica</i> , <i>Caesalpinia sappan</i> , <i>Cassia fistula</i> , <i>Cinnamomum sintok</i> , <i>Coptis chinensis</i> , <i>Cyrtomium fortunei</i> , <i>Elaeocarpus grandiflorus</i> , <i>Geranium thunbergii</i> , <i>Juglans mandshurica</i> , <i>Paeonia suffruticosa</i> , <i>Phellodendron amurense</i> , <i>Polygala tenuifolia</i> , <i>Punica granatum</i> , <i>Rheum palmatum</i> , <i>Rhus javanica</i> , <i>Spatholobus suberectus</i> , <i>Syzygium aromaticum</i> , <i>Terminalia arjuna</i> , <i>Terminalia belerica</i> , <i>Terminalia chebula</i> , <i>Woodfordia floribunda</i>

Underlined traditional medicines were active in an *in vivo* assay.

水疱の形成, 4:局所のびらん形成, 6:軽度帯状皮疹, 8:中度帯状皮疹, 10:重度帯状皮疹 (Fig. 3)。

G. 抗 HSV-1 治療効果をもつ伝統医薬エキスのスクリーニング実験結果例

これまで述べてきた方法を用いて, 我々は伝統医薬からの精製化合物, 分画, エキスの抗 HSV-1 活性測定を行った。¹³⁻¹⁶⁾ その結果, 粗抽出物であるエキスでもこれらの方法を用いて十分に抗 HSV-1 活性測定ができたので, 敢えて抗 HSV-1 治療効果をもつ精製化合物による実験でなく, 分画の第一段階である熱水エキスのスクリーニング実験結果例をここで紹介する。

Vero 細胞を用いたブランク減少法により, 我々は142種の伝統医薬熱水エキスの *in vitro* 抗ウイルス活性をスクリーニングし, 32種が抗 HSV-1 活性, 55種が抗ポリオウイルス活性, 30種が抗麻疹ウイルス活性を持つことを明らかにした (Table II)。¹³⁾ また, 抗 HSV-1 活性を持つ32種の中で5種はポリオウイルスに対し, 1種は麻疹ウイルスに対し, 3種は HSV-1 だけに対して抗ウイルス活性を示すことが明らかになった。(Table III)。したがって, 3種の熱水エキスは HSV-1 に対する特異的な抗ウイルス活性物質を含んでおり, 他の29種には前記3種と異なった作用機序を示す抗 HSV-1 活性物質が含まれている可能性が考えられた。

Table IV は大根草熱水エキスのモルモットを用いた吸収実験結果例を示している。大根草熱水エキスを投与したモルモット血清中に, 有意な抗 HSV-1 活性が認められた。この実験系を用いて, *in vitro* で抗 HSV-1 活性を持つ32種の熱水エキスから, 消化管から吸収され抗ウイルス活性を示した21種を選択した。したがって, これらエキスには, 生体内で吸収され得る抗ウイルス活性成

Table IV Effects of guinea pig sera on the growth of HSV-1 in Vero cells.

Exp.no	Mean virus yield $\pm$ S.D. ($\times 10^{-7}$ PFU/ml)	
	Control (water)	<i>Geum japonicum</i>
1	6.15 $\pm$ 1.94	2.48 $\pm$ 0.21 (40.3%)*
2	9.89 $\pm$ 0.16	4.28 $\pm$ 1.92 (43.3%)*
3	13.7 $\pm$ 0.14	3.08 $\pm$ 4.26 (22.5%)*

Hot water extract of *Geum japonicum* Thunb. or water was orally administered to guinea pigs. Sera obtained from 3 guinea pigs in each group were assayed for their yield reduction of HSV-1. Virus yield is expressed as a mean $\pm$ standard deviation (S.D.). Figures in parentheses are the percent of each control virus yield.

*Significant difference from the control, $p < 0.05$ by Student's *t*-test.

分が含まれていると考えられた。また, *Woodwardia orientalis* エキスのように, *in vitro* 実験で抗 HSV-1 活性を示す物質を含んでいても,¹⁵⁾ モルモットを用いた吸収実験で抗 HSV-1 活性を示さない場合もあり, 吸収実験法は, *in vivo* で抗 HSV-1 活性を示すエキスのスクリーニングに役立つ方法であることが確認できた。

In vivo 抗ウイルス活性試験の結果, *in vitro* 抗ウイルス活性測定法で選択した伝統医薬から最終的に抗 HSV-1 治療効果を示す12種の熱水エキスを選択することができた (Table V)。また, これら12種の熱水エキスは, 現在臨床で用いられている ACV の常用量に相当する量をマウスに投与した場合 (5 mg/kg) と同程度の治療効果を示した。¹³⁾ したがって, マウス HSV-1 経皮感染系で抗ウイルス治療効果を示した熱水エキスは, 人に対しても有

Table V Traditional medicines with anti-HSV-1 activity and their traditional clinical application.

Name	Clinical application
<i>Alpinia officinarum</i>	Parotiditis, Gastric and duodenal ulcer
<i>Caesalpinia sappan</i>	Swelling and pain, Subcutaneous, hemorrhage
<i>Geum japonicum</i>	Bruise, Diuresis, Empyema
<i>Paeonia suffruticosa</i>	Hypertension, Allergic rhinitis
<i>Phellodendron amurense</i>	Epidemic meningitis, Pneumonia
<i>Polygala tenuifolia</i>	Acute mastitis
<i>Polygonum cuspidatum</i>	Chronic myelitis, Burn, Arthritis
<i>Punica granatum</i>	Amebic dysentery
<i>Rhus javanica</i>	Gastric and duodenal ulcer, Empyema
<i>Syzygium aromaticum</i>	Acute gastroenteritis
<i>Terminalia arjuna</i>	Heart diseases, Hypertension
<i>Terminalia chebula</i>	Chronic pharyngolaryngitis, Diarrhea

効であると考えられた。

3. 伝統医薬熱水抽出エキスからの抗ウイルス活性分画検索への抗ウイルス活性測定法の応用

我々の目的は、伝統医薬から *in vivo* で有効な抗ウイルス活性物質を開発することにある。先に述べた抗ウイルス活性測定方法で選択した12種の伝統医薬熱水エキスには、*in vivo* で有効な抗ウイルス活性物質が含まれていると考えられるため、抗ウイルス活性成分検索の良い材料となり得る。そこで、伝統医薬熱水エキスを例として、これより *in vivo* で抗 HSV-1 活性を持つ分画やその活性物質の物性を簡便に推定できる実験法を紹介する。

従来、伝統医薬に含まれる抗ウイルス活性物質を検索する場合、伝統医薬は、種々の有機溶媒や酸、アルカリによる分別抽出、カラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー等により分画される。その後、得られたすべての分画や精製物質についての抗ウイルス活性が *in vitro*, *in vivo* で検討される。しかし、*in vitro* で抗ウイルス活性を示す分画や物質が必ずしも *in vivo* でも有効な活性を示すとはかぎらない。このため、*in vitro* で抗ウイルス活性を示した分画や物質の有効性を *in vivo* 試験で再び検討しなければならない。我々の用いた血清への吸収試験は、生体内で吸収される抗ウイルス活性成分を含む伝統医薬の検索に有効であった。したがって、抗ウイルス活性を指標にして、吸収された抗ウイルス活性物質を含む血清を分画することによって、伝統医薬から *in vivo* で活性を示す成分の分画方法を決定することができると考えられる。そこで、我々は、熱水エキスを投与したモルモット血清を化学的性質に基づいて分画し、得られた分画の抗ウイルス活性を検討した。

[血清の分画の実験方法例 (Fig. 4)]

被検物質を投与したモルモット血清 (3.5 ml) に 1.5 ml

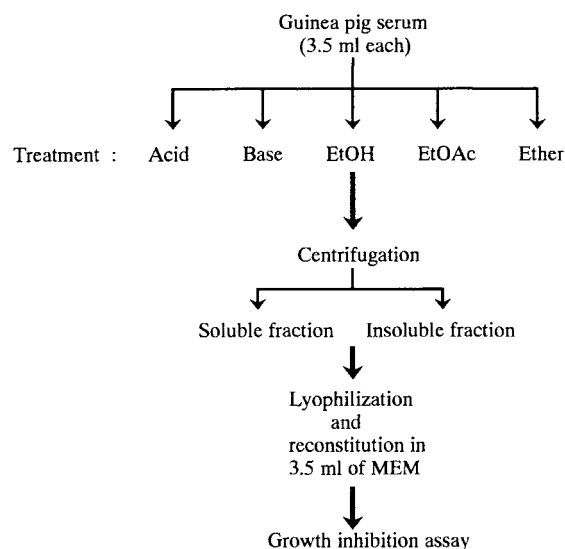


Fig. 4 Anti-HSV-1 assay of serum fractions. Sera obtained from guinea pigs were simultaneously treated with each solvent. Sensitivity of anti-HSV-1 activity to acid or base and its solubility in organic solvent are assessed by the treatments as shown in the figure.

の25% NH_4OH (アルカリ溶液) あるいは 0.175 ml のトリフルオロ酢酸 (酸溶液) を加え、 4°C で1時間緩やかに攪拌後、3,000回転、20分遠心した混合液上清を凍結乾燥した。初めに使った血清量 (3.5 ml) に調製するために、凍結乾燥物に MEM 培地を加え総量を 3.5 ml にした。一方、血清 (3.5 ml) に6倍容積のエタノールを加え、室温で1時間緩やかに攪拌した。また、当量の酢酸エチルあるいはエーテルで血清 (3.5 ml) を抽出し、これらの混合液を3,000回転、20分遠心した。抽出を3回繰り返して得られた有機溶媒層を集め、減圧乾燥し、0.1 ml の DMSO に溶解後、MEM 培地を加え 3.5 ml になるように溶解した。これら分画の抗ウイルス活性をウイルス増殖抑制試験で検討した。

この方法を用いて、大根草の *in vivo* での抗ウイルス活性成分が酸、アルカリ耐性酢酸エチルで抽出できることを明らかにした (Table VI)。また、大根草から直接抽出した酢酸エチル分画は、マウス感染実験でも HSV-1 感染に対して有効な治療効果を示した。¹⁴⁾ このことより、血清分画方法は、*in vivo* での抗ウイルス活性成分を含む分画を得るための有効な手段であると考えられる。

In vivo で有効な抗ウイルス活性を示す分画が明らかになり、抗ウイルス活性を指標にしてその分画に含まれ

Table VI Effects of various fractions obtained from guinea pig sera on the growth of HSV-1 in Vero cells.

Fractions	Mean virus yield $\pm$ S.D. ($\times 10^{-7}$ PFU/ml)	
	Control (Water)	<i>Geum japonicum</i>
Exp. 1		
Acid soluble	7.37 $\pm$ 1.41	5.59 $\pm$ 0.17 (75.8%)
Basic soluble	3.69 $\pm$ 1.02	2.50 $\pm$ 0.57 (67.8%)
EtOH soluble	2.35 $\pm$ 0.33	1.24 $\pm$ 0.12 (52.8%)*
insoluble	1.33 $\pm$ 0.76	2.93 $\pm$ 0.05 (220.3%)
Ether extract	3.17 $\pm$ 1.18	3.31 $\pm$ 0.41 (104.4%)
insoluble	14.6 $\pm$ 3.75	14.3 $\pm$ 3.25 (97.9%)
Exp. 2		
EtOAc extract	5.24 $\pm$ 0.10	2.65 $\pm$ 0.68 (50.6%)*
insoluble	3.52 $\pm$ 0.83	3.24 $\pm$ 0.73 (92.0%)

Each fraction was prepared from serum of guinea pigs administered with water or hot water extract of *Geum japonicum* Thunb. Sera obtained from three guinea pigs were assayed for anti-HSV-1 activity (yield reduction) independently. Figures in parentheses are the percent of each control virus yield.

*Significant difference from the control, $p < 0.01$ by Student's t -test.

る物質の化学的性質が推測できれば、さらに抗ウイルス活性物質を分画するための有効で最適な方法を選択することができる。以下に種々の pH に対する大根草酢酸エチル分画に含まれる抗ウイルス活性物質の安定性を検討した一例を紹介する。

[抗ウイルス活性を指標にした活性物質検索の実験方法例]

大根草酢酸エチル分画 (400 mg) を 20 ml の 20 mM 磷酸緩衝液 (pH 8.0) に懸濁し、3,000回転、15分遠心後、上清を0.45 μ m ミリポアーフィルターでろ過する。このろ液に 10 mM HCl または NaOH を添加し、種々の pH にろ液を調製する。室温で1時間静置し、種々の pH 懸濁液 2 ml を3,000回転、15分遠心後、沈渣を 2 ml DMSO に溶解する。また、上清の 1 ml を等量の酢酸エチルで二回抽出する。この抽出酢酸エチル層を集め、減圧乾燥後、1 ml の DMSO に溶解する。水層に残っている酢酸エチルを減圧除去後、蒸留水を加えて 1 ml に調製する。これら得られたすべての分画の抗ウイルス活性をプラーク減少法を用いて検討した。

Table VII に示すように、大根草酢酸エチル分画の抗ウイルス活性が、強酸性下では酢酸エチル層に、強アルカリ性下では水層に移行することから、抗ウイルス活性物質は弱アルカリ性物質であることが推定できた。したがって、抗ウイルス活性を指標にした活性物質の検索は、

Table VII Anti-HSV-1 activity of *Geum japonicum*-EtOAc-extractable fraction at various pH.

pH	Plaque formation (%)			
	Supernatant	Precipitate	EtOAc	Aq.
1	54.5	78.9		
3	0.0	92.6	0.0	71.1
4	0.0	75.6	0.0	65.7
5	0.0	74.8	0.0	68.6
6	0.0	75.6	0.0	54.1
7	0.0	78.1	73.1	28.5
8	0.0	92.6	71.1	30.6
9	0.0	71.1	66.5	0.0
10	0.0	76.4	74.4	0.0
11	0.0	98.8	81.0	0.0
12	58.7	82.6		

Anti-HSV-1 activity of *Geum japonicum*-EtOAc-extractable fraction was examined for pH stability by plaque reduction assay at 150 μ g/ml. Figures represent the percentage of control culture. EtOAc and Aq. represent EtOAc phase and aqueous phase, respectively, in EtOAc extraction of supernatant.

伝統医薬に含まれる in vivo で有効な抗ウイルス活性物質を分画、同定するための有効な手段であると考えられた。

おわりに

我々は、伝統医薬の抗ウイルス作用が in vivo で有効であることを立証することにより、抗ウイルス薬としての評価を得ることができると考えている。長年に渡って多くの伝統医薬から抗ウイルス活性物質の検索が行われているが、in vivo で有効な抗ウイルス活性を示し、臨床的に利用されているものは少ない。しかし、我々は、in vivo での抗ウイルス活性を重視した検索法を用いることによって、現在使用されているアシクロビルに匹敵する抗 HSV-1 活性を示す生薬で抗ウイルス治療効果を持ち、人に対しても使用できると考えられる伝統医薬を選択することができたと考えられる¹³⁾。また、抗ウイルス活性を指標にした活性物質を含む分画の検索により、抗 HSV-1 治療効果を持つ伝統医薬の抗ウイルス活性分画を、また、その活性物質の物性を推定できた¹⁴⁾。したがって、紹介した一連の検索法とその試験法は、伝統医薬の in vivo での抗ウイルス活性を明らかにするために有用であり、また、in vivo で抗ウイルス活性を示す成分の分画法にも利用できる可能性があり、今後の伝統医薬から

の抗ウイルス治療薬の開発に役立つと考えられる。

謝 辞

本論文で紹介した実験例は、富山医科薬科大学和漢薬研究所、難波恒雄教授、門田重利助教授、昭和シェル石油中央研究所、穂積豊治氏、大山晴夫氏との共同研究であり、深く感謝いたします。

References

- 1) Fukuchi, K., Sakagami, H., Okuda, T., Hatano T., Tanuma S., Kitajima, K., Inoue Y., Inoue S., Ichikawa, S., Nonoyama, M. and Konno, K.: Inhibition of herpes simplex virus infection by tannins and related compounds. *Antiviral Res.* **11**, 285-298, 1989.
- 2) Hayashi, K., Nishino, H., Niwayama, S., Shiraki, K. and Hiramatsu, A.: Yucca leaf protein (YLP) stop the protein synthesis in HSV-infected cells and inhibits virus replication. *Antiviral Res.* **17**, 323-333, 1992.
- 3) Okada, Y. and Kim, J.: Interaction of concanavalin A with enveloped viruses and host cells. *Virology* **50**, 507-515, 1972.
- 4) Sydislis, R.J., Owen, D.G., Lphr, J.L., Rosler, K.-H. A. and Blomster, R.N.: Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **35**, 2463-2466, 1991.
- 5) Amoros, M., Fauconnier, B. and Girre, R.L.: In vitro antiviral activity of a saponin from *Anagallis arvensis*, Primulaceae, against herpes simplex virus and poliovirus. *Antiviral Res.* **8**, 13-25, 1987.
- 6) Chang, R.S. and Yeung, H.W.: Inhibition of growth of human immunodeficiency virus *in vitro* by crude extracts of chinese medical herbs. *Antiviral Res.* **9**, 163-176, 1988.
- 7) Ito, M., Nakashima H., Baba, M., Pauwels, R., De Clercq, E., Shigeta S. and Yamamoto, N.: Inhibitory effect glycyrrhizin on the in vitro infectivity and cytopathic activity of the human immunodeficiency virus [HIV (HTLV/LAV)]. *Antiviral Res.* **7**, 127-137, 1987.
- 8) Hudson, J.B.: Plant photosensitizers with antiviral properties. *Antiviral Res.* **12**, 55-74, 1989.
- 9) Tabb, H.D., Chang, R.S. and Smith, K.M.: Isolation, purification, and partial characterization of prunellin, an anti-HIV component from aqueous extracts of *Prunella vulgaris*. *Antiviral Res.* **11**, 263-274, 1989.
- 10) Tang, J., Colacino, J.M., Larsen, S.H. and Spitzer, W.: Virucidal activity of hypericin against enveloped and non-enveloped DNA and RNA viruses. *Antiviral Res.* **13**, 313-326, 1990.
- 11) Yamamoto, N., Furukawa, H., Ito, Y., Yoshida, S., Maeno K. and Nishiyama, Y.: Anti-herpesvirus activity of citrusine-I, a new acridone alkaloid, and related compounds. *Antiviral Res.* **12**, 21-36, 1989.
- 12) Yao, X.-J., Wainberg, M.A. and Parnaiak, M.A.: Mechanism of inhibition of HIV-1 infection in vitro by purified extract of *Prunella vulgaris*. *Virology* **187**, 56-62, 1992.
- 13) Kurokawa, M., Ochiai, H., Nagasaka, K., Neki, M., Xu, Kadota, S., Sutardjo, S., Matsumoto, T., Namba, T. and Shiraki, K.: Antiviral traditional medicines against herpes simplex virus (HSV-1), poliovirus, and measles virus in vitro and their therapeutic efficacies for HSV-1 infection in mice. *Antiviral Res.* **22**, 175-188, 1993.
- 14) Kurokawa, M., Hase, K., Xu, H.-X., Yamamura, J., Koyasu, M., Sato, H., Kadota, T., Hozumi, T., Namba, T. and Shiraki, K.: A novel procedure for the identification of a fraction with anti-herpes simplex virus type 1 activity in vivo from hot-water extract of traditional medicines, *Geum japonicum* THUNB. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* **10**, 195-203, 1993.
- 15) Xu, H.-X., Kadota, S., Kurokawa, M., Shiraki, K., Matsumoto, T., and Namba, T.: Isolation and structure of Woodwardin, a new glucoside having antiviral activity, from *Woodwardia orientalis*. *Chem. Pharm. Bull.* **41**, 1803-1806, 1993.
- 16) Xu, H.-X., Kadota, S., Wang, H., Kurokawa, M., Shiraki, K., Matsumoto, T., and Namba, T.: A new hydrolyzable tannin from *Geum japonicum* and its antiviral activity. *Heterocycles* **38**, 167-175, 1993.
- 17) Shiraki, K., Okuno, T., Yamanishi, K. and Takahashi, M.: Phosphonoacetic acid inhibits replication of human herpesvirus-6. *Antiviral Res.* **12**, 311-318, 1989.
- 18) Fields, B.N., Knipe, D.M., Chanock, R.M., Hirsch, M.S., Melnick, J.L., Monath, T.P. and Roizman, B. (Ed.) *Fields Virology*, Second edition, Raven Press, New York.
- 19) Mori, R. and Amako, K. (Ed.) *Toda's New Bacteriology*, 30th edition, Nanzando company, limited, Tokyo.
- 20) Ochiai, H., Kurokawa, M., Hayashi, K. and Niwayama, S.: Antibody-mediated growth of influenza A NWS virus in macrophagelike cell line P388D1. *J. Virol.* **62**, 20-26, 1988.
- 21) Kida, H., Webster, R.G. and Yanagawa, R.: Inhibition of virus-induced hemolysis with monoclonal antibodies to different antigenic areas on the hemagglutinin molecule of A/seal/Massachusetts/1/80 (H7N7) influenza virus. *Arch. Virol.* **76**, 91-99, 1983.
- 22) De Miranda, P., Krasny, H.C., Page, D.A. and Elion, G.B.: The disposition of acyclovir in different species. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **219**, 309-315, 1981.
- 23) Nagasaka, K., Kurokawa, M., Imakita, M., Terasawa, K., and Shiraki, K. Efficacy of Kakkon-to, a traditional herb medicine, in herpes simplex virus type 1 infection in mice. *J. Med. Virol.* (accepted).
- 24) Bosma, G.C., Custer, R.P. and Bosma, M.J.: A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature (London)* **301**, 527-530, 1983.
- 25) Namikawa, R., Kaneshima, H., Lieberman, M., Weissman, I.L., and McCune, J.M.: Infection of SCID-hu mouse by HIV-1. *Science* **242**, 1682-1686, 1988.
- 26) Ren, R., Costantini, F., Gorgacz, E.J., Lee, J.J., and Racaniello, V. R.: Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: A new model for poliomyelitis. *Cell* **63**, 353-362, 1990.
- 27) Kosaka, K., Hagura, R. and Kuzuya, T.: Insulin responses in equivocal and definite diabetes, with special reference to subjects who had mild glucose intolerance but later developed definite diabetes. *Diabetes* **26**, 944-952, 1977.
- 28) Lewis, L.D., Fowle, A.S.E., Bittner, S.B., Bye, A. and Isaacs, P.E. T.: Human gastrointestinal absorption of acyclovir from tablet duodenal infusion and sipped solution. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **21**, 459-462, 1986.
- 29) Crumpacker, C.S., Schnipper, L.E., Zaia, J.A. and Levin, M.J.: Growth inhibition by acycloguanosine of herpesviruses isolated from human infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **15**, 642-645, 1979.
- 30) Shiraki, K., Ochiai, H., Namazue, J., Okuno, T., Ogino, S., Haya-

- shi, K., Yamanishi, K. and Takahashi, M.: Comparison of antiviral assay methods using cell-free and cell-associated varicella-zoster virus. *Antiviral Res.* **18**, 209-214, 1992.
- 31) Simmons, A. and Nash, A.A.: Zosteriform spread of herpes simplex virus as a model of recrudescence and its use to investigate the role immune cells in prevention of recurrent disease. *J. Virol.* **52**, 816-821, 1984.
- 32) Kumano, Y., Yamamoto, M., and Mori, R.: Protection against herpes simplex virus infection in mice by recombinant murine interferon- β in combination with antibody. *Antiviral Res.* **7**, 289-301, 1987.