

和漢生薬によるウイルス感染症の治療の研究

—グリチルリチンの抗B型肝炎ウイルス作用機序の解明—

白木 公康

富山医科薬科大学医学部ウイルス学

Effect of glycyrrhizin on hepatitis B surface antigen

Kimiyasu SHIRAKI

Department of Virology, Toyama Medical and Pharmaceutical University

(Accepted January 12, 1995.)

Abstract

Glycyrrhizin, a major component of an herb (licorice), has been widely used to treat chronic hepatitis B in Japan. This substance, which improves liver function with occasional complete recovery from hepatitis, was examined for its effects on the secretion of hepatitis B surface antigen (HBsAg) *in vitro*. In this study the action of glycyrrhizin on hepatitis B virus has been elucidated. Glycyrrhizin suppressed the secretion of HBsAg and accumulated it in PLC/PRF/5 cells dose-dependently. Its action was further analyzed and determined in the HBsAg-expression system using varicella-zoster virus. Glycyrrhizin suppressed the secretion of HBsAg resulting in its accumulation in the cytoplasmic vacuoles in the Golgi apparatus area. HBsAg labeled with ³⁵S-methionine and cysteine was accumulated in the cells and its secretion was suppressed dose-dependently in glycyrrhizin-treated culture. The secreted HBsAg was modified by N-linked and O-linked glycans but its sialylation was inhibited dose-dependently by glycyrrhizin. Thus glycyrrhizin suppressed the intracellular transport of HBsAg at the trans-Golgi area after O-linked glycosylation and before its sialylation. HBsAg particles were mainly observed on the cell surface in the glycyrrhizin-treated culture but not in the untreated culture. This suggests that a sialylation of HBsAg particles resulted in the novel surface nature of glycyrrhizin-treated HBsAg particles. We elucidated the unique mechanism of glycyrrhizin action on HBsAg processing, intracellular transport, and secretion.

Key words glycyrrhizin, hepatitis B virus, HBsAg, chronic hepatitis B, sialylation.

1. はじめに

グリチルリチン (Fig. 1) は、和漢生薬「甘草」の主成分で、その重量の6~14%を占めている。人類と甘草(グリチルリチン)との関わりは、約4,000年前のメソポタミアの時代に遡る。現在、日本では甘草のほとんどは輸入され、その量は年間約10トンに及ぶ。その用途としては、グリチルリチンが特有の甘味を有し、砂糖の約250倍甘

いことから、甘味料として、あるいは、味噌・醤油などを始め多くの食品添加物として使用されている。このような用途を持つグリチルリチンが、一方で慢性肝炎の治療に使用されている。

B型肝炎ウイルス(HBV)は、急性肝炎・慢性肝炎・肝硬変・肝癌の原因ウイルスであり、日本人の約150万人が保因者で、世界中に約2億人の保因者がいると推定されている。HBV感染予防のためにワクチンが開発され、ハイリスクグループ(医療従事者、母子感染の危険

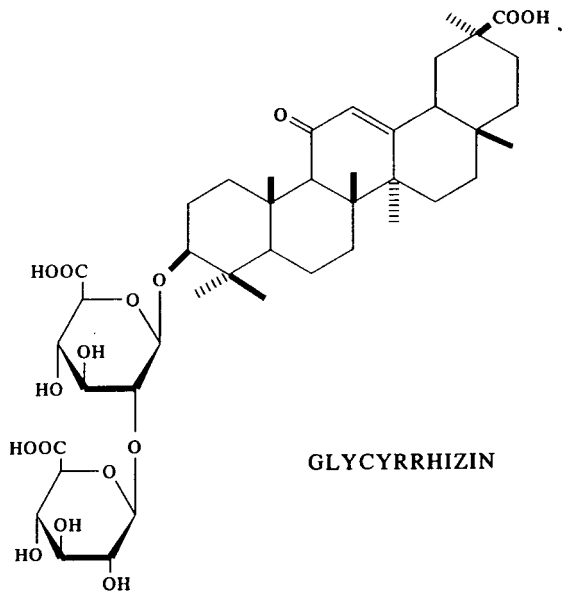


Fig. 1 Structure of glycyrrhizin.

がある新生児など) に対してワクチンの接種が行われ、新たな感染者は激減している。しかし、既に感染している保因者の一部は、慢性 B 型肝炎として徐々に肝機能障害が進み肝硬変や肝臓へと進展すると考えられる。したがって、現行の B 型肝炎のワクチンが有効に機能していれば、今後の B 型肝炎の問題点としては、感染症としての問題より、むしろ慢性 B 型肝炎患者に対する治療が考えられる。しかしながら、この感染症の治療に特效薬はない。したがって、慢性 B 型肝炎の治療には、グリチルリチンや小柴胡湯などの生薬由来薬物などが主として使用され、抗ウイルス療法としてのインターフェロン療法や免疫抑制剤の副腎皮質ステロイド療法などは、ほとんど行われていない。

グリチルリチンの慢性肝炎の治療効果の原理に関して、グリチルリチンによる種々の免疫賦活化作用が慢性肝炎の肝機能改善の作用機序として考えられてきた。しかしながら、慢性 B 型肝炎の発症機序として、宿主の免疫が HBV 感染肝細胞を傷害することが考えられている。この考え方に基けば、グリチルリチンによって宿主の HBV に対する免疫が賦活化されれば、免疫による肝細胞の傷害が增強して、一時的にも肝機能障害が増悪することが考えられる。このことは、慢性 B 型肝炎の場合にグリチルリチンの投与開始と共に、降トランスアミナーゼが認められ、肝細胞傷害の軽減が臨床的に確認されることと矛盾することとなる。長期的な効果としては、HBV に対する免疫賦活化により肝機能障害の軽減が行

なわれると考えられるが、グリチルリチン投与後の短期的な効果の説明としては適当と思われない。グリチルリチンが、HBs 抗原の産生・分泌過程に関して与える影響について、生化学的・免疫組織化学的に検討を行った。そこで、グリチルリチンが直接肝細胞の HBV に作用し、肝機能障害を抑制し、抗 HBV 作用を示すことを示唆する結果を得た。本研究結果は、Journal of Hepatology 1994 年、21 巻 601-609 頁に掲載されたものである。

2. グリチルリチンの抗 HBV 作用の検討

B 型肝炎表面 (HBs) 抗原を産生する人肝癌由来細胞 Alexander 細胞を用いて、グリチルリチンが Alexander 細胞の HBs 抗原の産生・分泌に与える影響を細胞内と細胞外の HBs 抗原量を RPHA 法と ELISA 法によって測定した。Fig. 2 の様にグリチルリチン処理により、濃度

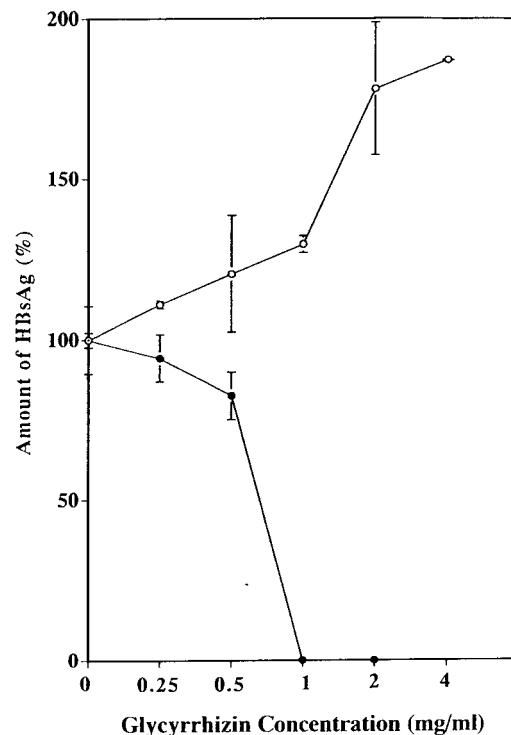


Fig. 2 Effect of glycyrrhizin on production and secretion of HBsAg in the PLC/PRF/5 cell culture. The amounts of HBsAg in the cells and the culture supernatant are expressed as the mean percentage $\pm$ S.D. (n=6) of those in untreated cells. Open and closed circles represent the amount of HBsAg detected in the cellular and supernatant fractions. Glycyrrhizin suppressed the secretion of HBsAg and the amount of intracellular HBsAg increased dose-dependently.

依存性に HBs 抗原の細胞外への分泌が抑制され、細胞内で産生された HBs 抗原が蓄積されていることが明らかになった。Alexander 細胞の系では、これ以上の解析が困難であった。そこで、この HBs 抗原の細胞内蓄積・分泌抑制機構を解析するため水痘ウイルスを用いた HBs 抗原の産生系で、グリチルリチンが HBs 抗原の産生・プロセッシングに与える影響について検討した。この系で産生される HBs 抗原は、N 型糖鎖、O 型糖鎖、シアル酸の修飾を受けており、糖鎖修飾を細胞内輸送のマーカールとして細胞内蓄積部位を解析することが可能である。グリチルリチン処理した場合には、無処理の場合に比べ HBs 抗原の分子量は減少していた (Fig. 3)。Alexander 細胞を用いた系では、この変化は検出できなかった。これは、Alexander 細胞を用いた系と異なり、水痘ウイルスによる発現系では、N 型糖鎖だけでなく O 型糖

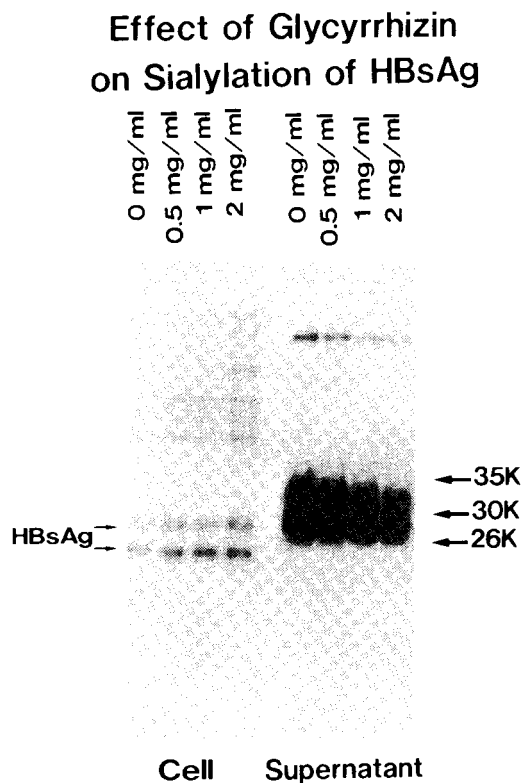


Fig. 3 Intracellular (Cell) and culture supernatant (Supernatant) HBsAg labeled with [35 S] methionine and cysteine. HBsAg synthesized and secreted in the presence of glycyrrhizin (0, 0.5, 1 and 2 mg/ml) was analyzed in SDS-PAGE. Glycyrrhizin caused a slight, dose-dependent accumulation of synthesized HBsAg in the intracellular fraction but had no effect on the molecular weights in the cells. The amount of secreted HBsAg was suppressed and its electrophoretic mobility increased in a dose-dependent manner by glycyrrhizin.

Effect of Glycyrrhizin on Sialylation of HBsAg

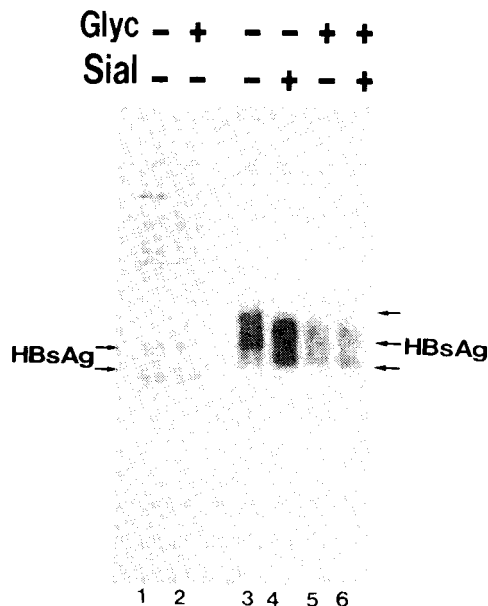


Fig. 4 Sialylation of intracellular (1 and 2) and secreted (3, 4, 5 and 6) HBsAg.

- and + indicate without and with glycyrrhizin (Glyc) or sialidase (Sial) treatment, respectively. HBsAg secreted in the absence of glycyrrhizin was sensitive to sialidase (neuraminidase), and the mobility of HBsAg treated with sialidase increased compared to that without sialidase. On the other hand, HBsAg secreted in the presence of 2 mg/ml glycyrrhizin had the same mobility as sialidase treated HBsAg without glycyrrhizin treatment. The molecular weights of glycyrrhizin-treated HBsAg were not markedly influenced by sialidase treatment compared with untreated HBsAg.

鎖を有しており、糖鎖に付加されたシアル酸の数が多く検出が可能であったと思われる。糖鎖修飾を解析すると、N 型と O 型糖鎖が HBs 抗原に付加されており、N 型糖鎖に関しては、高マンノース型から複合型への移行が行われていた。しかし、N 型と O 型糖鎖末端へのシアル酸の付加が行われていなかった (Fig. 4)。これらの糖鎖修飾過程への生化学的影響から、グリチルリチンの阻害部位はトランス Golgi 領域であることが考えられた。

さらに、通常電顕・免疫電顕観察により、無処理細胞とグリチルリチン処理細胞の間で HBs 抗原の細胞内局在を比較することにより、形態学的にもトランス Golgi 領域に HBs 抗原が蓄積しており、HBs 抗原の細胞外へ

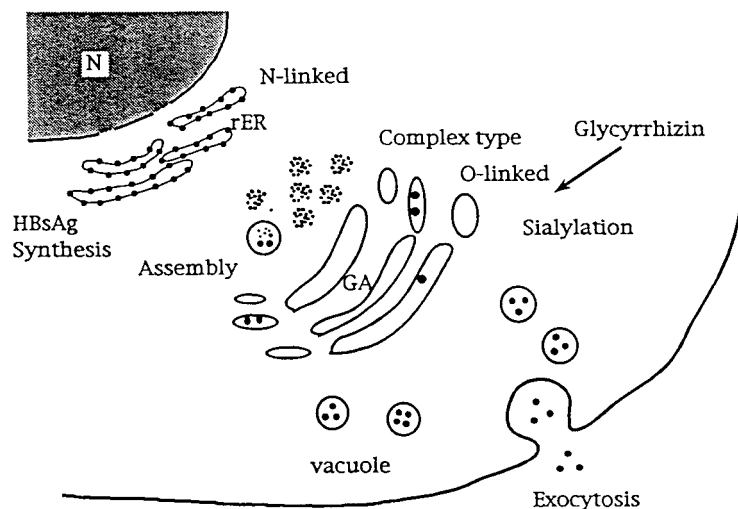


Fig. 5 Intracellular transport and glycosylation of HBsAg and the inhibition site of glycyrrhizin.

の輸送が阻害されていることが確認された。このように、グリチルリチンがHBs抗原へのシアル酸付加をトランスGolgi領域で阻害することを明らかにした。これらの結果をFig. 5に示した。HBs抗原は、リポゾームで合成され、高マンノース型（N-型）糖鎖の付加を受ける。Golgi装置へ運ばれ、高マンノース型糖鎖は複合型糖鎖へと転換され、O型糖鎖の付加もうける。そして、それら糖鎖末端にシアル酸の付加を受け細胞外へ分泌される。グリチルリチンは、この過程のトランスGolgi領域での細胞内輸送を阻害し、O型糖鎖の付加された後シアル酸が付加される以前の段階を阻害（矢印）する。

また、無処理細胞では、HBs抗原を細胞表面に認めることは無かったが、グリチルリチン処理細胞では、HBs抗原が細胞膜上にも認められ、HBs抗原粒子の表面の性状の変化を示唆した。このことは、HBs抗原のシアル酸付加阻害効果と対応していることが考えられた。

3. おわりに

ここで使用したグリチルリチンの濃度は、0.25～4.0 mg/mlと比較的高い濃度を用いたが、マウスに静注されたグリチルリチンの90%以上が肝臓に分布することから、生体内でもこれらの濃度は充分達成される濃度と考えられる（その後の研究で、この実験で使用した濃度で処理した細胞におけるグリチルリチン濃度と臨床的に慢性肝炎の治療に使用されているグリチルリチンを動物に

投与した場合に肝細胞での濃度を比較したところ同等である事が明かとなった）。したがって、これらの結果は、単に*in vitro*の実験的な結果としてより、生体内での現象と考えられる。一般に、糖鎖は蛋白の構造の安定化・蛋白分解酵素に対する抵抗性・免疫原性に関する影響を有している。シアル酸は陰性荷電を有し糖鎖構造の還元末端に存在している。HBs抗原のシアル酸を除去した場合に、免疫原性は増強されるが、蛋白分解酵素に対する抵抗性や血清中での安定性は低下することが報告されている。したがって、グリチルリチンがシアル酸の付加を阻害することによって以下の様な可能性が考えられた。

短期的なグリチルリチンの効果の可能性として、投与されたグリチルリチンがHBV感染肝細胞のHBs抗原の分泌抑制機構から予想されるように、免疫の標的細胞としての肝細胞でのHBV関連抗原の提示が阻害されることによって、肝細胞破壊が抑制される可能性が考えられた。この機序によれば、グリチルリチン投与直後から慢性B型肝炎患者の肝機能障害が改善されることが充分理解できる。

長期的には、HBs抗原粒子のシアル酸除去に基づく免疫原性の増強効果からHBs抗原の抗原性が高まることによって、HBVに対する免疫状態が改善される可能性が考えられる。したがって、従来から報告されているようにグリチルリチンによる宿主の免疫賦活化作用とともに、グリチルリチン投与によるHBs抗原に対する免疫状態の改善により、長期的にHBVに対する免疫状態の

改善により肝機能障害の改善を期待することが考えられる。

このように、グリチルリチンの直接的な抗 HVB 効果の検討により、グリチルリチンによる慢性 B 型肝炎患者での肝機能障害改善作用の新しい作用機序の可能性が示された。更に詳細の検討を行いたい。

この研究の過程で、富山医科薬科大学医学部ウイルス学教室をはじめ第 3 内科、和漢薬研究所の多くの方々の協力と援助を得たこととこの研究を評価していただけたことを感謝いたします。また、和漢医薬学会奨励賞受賞を励みとして、和漢医薬学会の発展に貢献したいと思います。