

財団法人日中医学協会  
2004年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2004年 3月 11日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 伊藤 博夫 

所属機関名： 鹿児島大学

所属部署： 大学院医歯学総合研究科 職名： 助教授  
〒 890-8544

所在地： 鹿児島市桜ヶ丘8-35-1

電話： 099-275-6182 内線： 6182

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

**感染病原体付着抑制物質の調査研究**

3. 成果の概要 (100字程度)

細菌を殺すのではなく組織への定着を抑制することに基づく感染症予防薬の開発を目指し、中医学文献を精査してそのような物質を含む伝統薬原料を探索した結果、赤芍、青蒿、牛膝の3種の原材料が選択された。各原材料から得た粗抽出成分の細菌定着抑制活性を測定し、新規な感染症予防薬探索のための天然物ライブラリー原料として有望性が示唆された。粗抽出物を逆相HPLCで分画し、各々94～100のコンポーネント・フラクションを得て、各物質についての成分ライブラリーを構築することに成功した。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 伊藤 博夫 職名： 助教授

所属機関： 鹿児島大学 部署： 大学院医歯学総合研究科

中国側研究者氏名： 魏 睦新 職名： 主任教授

所属機関： 南京医科大学第1附属病院 部署： 中医科

— 日中医学協会助成事業 —  
感染病原体付着抑制物質の調査研究

日本側研究代表 伊藤 博夫

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科助教授

中国側研究代表 魏 睦新

南京医科大学第一附属病院教授

共同研究者 軒原 清史

南京医科大学客員教授、ハイペップ研究所 CEO

### 要旨

細菌を殺すのではなく、細菌の組織への定着抑制というメカニズムに基づく感染症予防薬の創製を目指し、中医学文献を精査して候補物質を含むと推定される伝統薬原料を探索した。その結果、赤芍 (*radix paeoniae rubra*)、青蒿 (*herba artemisiae annuae*)、牛膝 (*radix cyathulae*) の3種の原材料を選定し、研究に必要な量を収集した。ついで、投与形態を考慮した抽出を行い、粗抽出成分の細菌定着抑制活性を測定した。いずれの抽出物においても、心内膜炎原因菌のひとつである *Granulicatella adiacens* のヒト・フィブロネクチンへの付着に対し、一定レベルの抑制が示された。この結果は、新規な感染症予防薬探索のための天然物ライブラリー原料の有望性と中医学的考察に基づくスクリーニング法の可能性を示唆するものであった。粗抽出物から活性物質を純化・単離し、さらに構造解析へと進めるために、粗抽出物を逆相セミ分取カラムを用いた高圧液体クロマトグラフィーで分画し、各々100前後の天然物由来成分ライブラリーの構築に成功した。

**Keywords :** 天然物質ライブラリー, 感染性心内膜炎, 口腔細菌, 付着, フィブロネクチン

### 緒言 :

抗生剤の発達した現代の先進諸国においても、細菌感染症は依然として人々の脅威であり続けている。特に抗生剤耐性細菌の蔓延は大きな社会的問題となっており、新しい着想に基づく感染症対策が求められている。日本側代表研究者の伊藤と軒原は、一般に多用される抗生物質のような病原体を殺すというメカニズムではなく、ヒト組織への定着だけを抑制することに基づく感染症予防薬の開発を目指し、細菌の宿主細胞外基質タンパク質に対する付着能と病原性の関連に注目した。そしてフィブロネクチン付着を抑制するモノクローナル抗体の樹立と、そのモノクローナル抗体をプローブとして合成ペプチドライブラリーの検索を行ってきた<sup>(1-3)</sup>。しかし、化合物ライブラリーとしては、合成品のみではなく、天然物質由来のものも有用性にも注目すべきである。古来より用いられてきた中医薬(漢方薬)は、まさしく天然物薬効性化合物ライブラリーであり、効果と安全性に関しては中医学の長年の経験に裏付けられている。本共同調査研究では、中国側代表研究者の魏らが、中医学臨床の専門知識を駆使して多くの中医学文献を調査し、数多くの伝統薬の中から細菌の定着抑制を作用機序とする可能性のある薬剤原料を精査した。次いでそれらの原材料から天然物由来化合物ライブラリーを構築した。

### 材料と方法 :

中医学臨床の専門知識に基づき文献を精査し、考察・文献的スクリーニングを行うことによって、以下の3種類の中国伝統医薬用植物が原材料候補として選択された。選択作業の過程は、結果の項に詳述する。

① 赤芍 (英名 : *radix paeoniae rubra*、中国名 : Chi Shao 以下 CS) : 内モンゴル産、2004年11月採取

② 青蒿 (英名 : rherba artemisiae annuae、中国名 : Qing Hao 以下 QH) : 広西省桂林地区産、2004 年 10 月採取

③ 川牛膝 (英名 : cythula officinalis kuan 中国名 : Niu Xi: 以下 NX) : 四川省産、2004 年 1 月採取

以上の原材料は江蘇省薬材会社に委託し購入した。

各原料植物は蒸留水中に 60 分浸漬した後、80 kPa の圧力下で 30 分、3 回煎じて水溶性画分を抽出した。固形物を遠心除去後、直ちに凍結保存した。得られた粗抽出物は、ハイペップ研究所京都ラボにおいて、アセトニトリルと 10mM 塩酸の直線濃度勾配による逆相セミ分取カラムによる高圧液体クロマトグラフィー (HPLC) で UV 吸収を指標とし、成分ライブラリーとした。

粗抽出物の細菌の組織付着に対する阻害活性の評価は、伊藤が確立した細胞外基質タンパク質フィブロネクチン上の細菌体結合エピトープを認識するモノクローナル抗体によるアッセイ系<sup>(3)</sup>を用いて行った。

## 結果 :

### 1. 中医学的考察に基く原材料の選択

#### 1) 感染症の伝統中医学的認識<sup>(4,5)</sup>

感染症は、中医学の立場では、熱性の外邪 (邪熱) の体内への侵入によって生じた陰陽のバランスの崩れと、気血運行異常を示す疾病と認識される。邪熱の性質の違いと患者の体質の違いによって、感染症における宿主の生体反応が特徴付けられる。中医学では、その反応状態の違いを把握し、適切な“証”を診断し、その証に対応する治療方針・処方を、長い経験の知識庫 (種々の古典) の中から選択することを治療原則としている。

一般に感染症は熱性証であり、陰陽弁証のもとに、解熱作用のある清熱剤を選んで対症療法的に治療されることが多い。病原体の種類によって、あるいは体質によって、治癒の困難な症例が存在するが、そのようなタイプの疾患に対する解析診断方法として、衛気営血弁証 (えいきえいけつべんしょう) が 2~300 年前に確立された。これは傷寒論の六経弁証を基礎に発展した弁証方法で、温熱性の病気の過程を 4 つの段階に分類する。

衛気営血弁証の基本的な考え方は、感染症は最初、衛分証 (えぶんしょう ; 感染源の勢いがそれほど強くなく、患者の抵抗力もあるもの) より、次の気分証 (きぶんしょう ; 熱が高く炎症反応も強い) に進行する。さらに進むなら宿主の身体の抵抗力が損なわれ、体液 (陰液) も不足し、さらに中枢神経系や内臓にも障害が及んだり、あるいは播種性血管内凝固症候群 (DIC) による凝血障害を伴うような場合は、営分証 (えいぶんしょう) から血分証 (けつぶんしょう) と診断される (脚注参照)。

中医学の感染学説の中に、重症化あるいは慢性化の場合に熱邪が去らない重要な病理メカニズムは、熱が血と結合して、血熱或いは瘀熱が形成される故であるとするものがある<sup>(6)</sup>。こうなると単純な解熱、清熱剤などの効果は期待できない。涼血清熱剤、あるいは清熱剤と涼血化瘀剤の組合せが不可欠となる。この治療法の原理には、従来の西洋医学の抗生剤とは全く異なり、宿主の身体状態を調節して邪熱との複合を阻害するか、もしくは結合した後でも解離しやすいようにさせるなどの機序が含まれていると考えられる。このように、臨床的には既に 2000 年以上、特に明清時代以来、長期間の実践によってその有効性が立証されてきた中医学の治療原理に基づいて、斬新な感染症治療薬の創薬に向けた仮説を立てることが可能となった。

#### 脚注)

「営」の意味について : 気分の病毒が解除されなければ、人体の正気は虚弱となり、津液は不足する。病毒は人体の虚に乗じて営分に侵入するか熱が血分に入るため、舌質絳、心煩不寝、時にうわ言、身熱が夜間にはなははだしい。口渇はそれほどひどくない。見え隠れする斑疹、脈細数などの証候が現れる。「血」の証はさらに重症の場合を指す。

## 2) 感染性心内膜炎の中医学的考察に基づく病原細菌の組織定着抑制性中薬（漢方薬）の推定

感染性心内膜炎、なかでも亜急性細菌性心内膜炎（Subacute bacterial endocarditis; SBE）の症状と発症機序は、前述したように中医学的立場では、営分証あるいは血熱（熱性の病原が血液と結合して発症する病気）と診断される。SBEは潜在性に始まり、他の全身性疾患と類似しており、微熱（39℃以下）、寝汗、易疲労性、倦怠感、体重減少、および弁の機能不全を伴う。心臓における微生物の循環器内病巣は、傷害された内皮細胞から組織因子が放出されたときに形成される無菌性のフィブリンと血小板からなる疣贅に、偶然に血流中に侵入した細菌が定着することで形成が開始される。疣贅を形成する微生物は、フィブリンや血小板の層で囲まれたバイオフィルムを形成し、好中球、免疫グロブリン、および補体の接触を受けにくくなることで、宿主の防御機構に対して抵抗性を示す。SBEには次の典型症状が見られる。

- 心症状（心雑音、動悸、鬱血性心不全）
- 炎症症状（WBC↑、赤沈↑、CRP+、脾腫）
- 感染症状（ $\gamma$ グロブリン↑、フィブリノーゲン↑）
- Osler 結節（指先に現れる有痛性紅斑、圧迫で出現）
- Janeway 斑（手足に現れる無痛性紅斑、圧迫で消失）
- Roth 斑（眼底の出血性梗塞、中心が白色、周囲が赤色）

以上のような病理と症状は、中医学の血熱証あるいは瘀熱証と一致する。血熱証に効果のある薬物は「涼血清熱薬」であるが、残念ながら日本の漢方薬理論には本薬はほとんどみられない。一方中国においては、心内膜炎に対する研究はまだ無いが、SLEをはじめ、皮膚科、内科、婦人科、外科等の慢性感染症の治療によく利用される薬剤である<sup>(7,8)</sup>。

上記の中医学的考察に基づき、血熱あるいは瘀熱証に効く薬物で、なお薬理的な研究成果でも病原微生物の組織定着抑制作用のある可能性が高い、① 赤芍（CS）、② 牛膝（NX）、③ 青蒿（QH）の3種類の中薬原料を選択した。なお、牛膝には懷牛膝と川牛膝の2種類が存在するが、今回は川牛膝を選定した。

## II. 抽出物の細菌付着阻害活性

3種の中薬原料の粗抽出物はいずれも、高濃度においてヒト・フィブロネクチンの細菌結合エピトープに対するモノクローナル抗体の結合を競合的に阻害した（図1）。すなわち、いずれの物質についても、新規な感染症予防薬探索のための天然物ライブラリー原料としての可能性が示された。なかでもCSは5%濃度で60%抑制、50%濃度で97%抑制と、他の2種よりも有意（ $p<0.01$ ）に高い効果が示された。

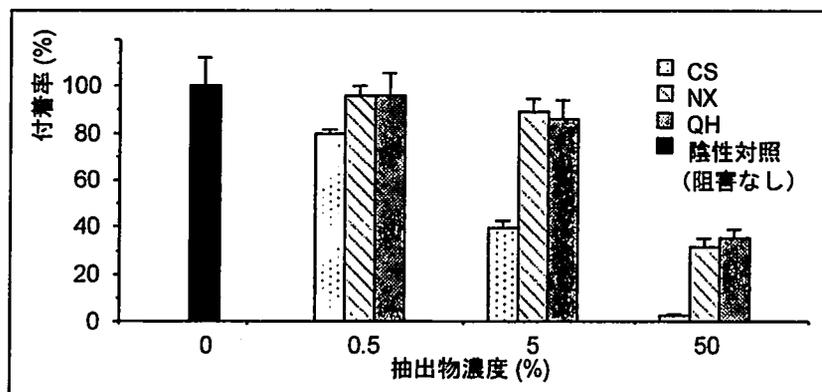


図1. 中薬原料粗抽出物の細菌付着阻害活性

## III. 成分ライブラリーの構築

中薬原料の3種の粗抽出物は、セミ分取逆相 HPLC により吸光度のモニタによって成分ライブラリー化し

た。各ピークを分取し、おのおの CS では 94、NH では 96、QH では 100 画分からなるコンポーネント・フラクションを得て、成分ライブラリーの構築に成功した。QH の逆相 HPLC による分画のクロマトグラムを図 2 に例示する。各ライブラリーは生物アッセイに供した後、活性成分をさらに物理化学的な検定へすすめ、その化学構造を突き止める予定である。

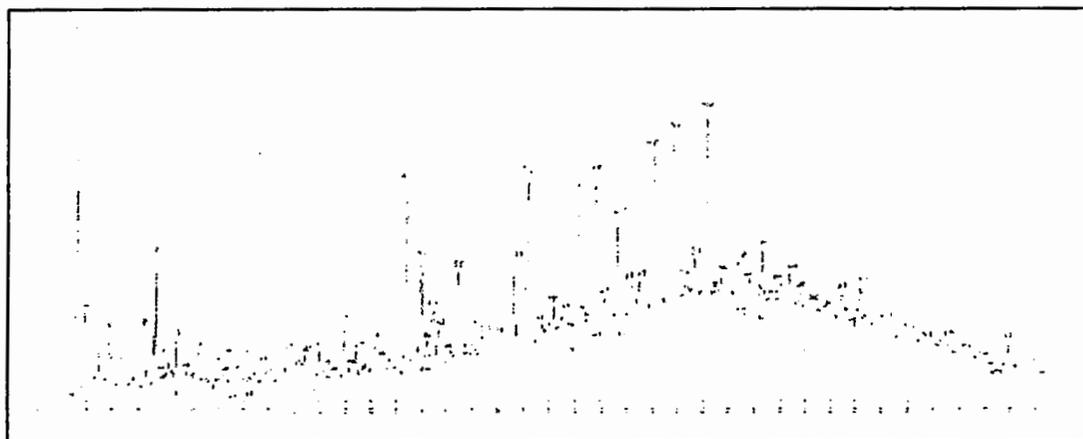


図 2. QH の成分ライブラリー（逆相 HPLC によるプロファイル）

#### 考察：

東西医学の知識と技術を融合させる独創的な当該研究は、全く新しい、安全で使い易い感染症予防薬の開発へ向けた基盤となるものである。また本共同研究を通じて、日本側が保有する特定の先端技術を中国側の研究者が習得することができ、今後は中国において自立的に分画・機能解析が出来るようになり、中国における、中医学を基盤とした新薬の自主開発力の整備・拡充に寄与することが期待される。また魏は、本共同研究のために鹿児島大学を訪れた際、最新中医学臨床に関する特別講義を行い、日本の医師・歯科医師・医歯学大学院生らの中医学に対する大いなる関心を集め、また多方面からの活発な討論が行われた。

#### 参考文献：

- (1) Ito, H.-O., Nokihara, K., Soutome, S., Yamamoto, S., Sato, S., Ohyama, T., Inoue, M. Development of lead compounds focusing on prevention of infective endocarditis using combinatorial peptide libraries. *In: Benedetti, E., Pedone, C. (Eds.) Peptides 2002*, Wiley, U.K. p. 518-519 (2002)
- (2) Nokihara, K., Ito, H.-O., Ohyama, T., Soutome, S., Yasuhara, T., Inoue, M. Application of combinatorial peptide libraries, as an example for prevention against infective endocarditis. *In: Yamada, T. (Ed.) Peptide Science 2002, the Japanese Peptide Society*, p. 77-80 (2003)
- (3) Ito, H.-O., Soutome, S., Nokihara, K., Inoue, M. Identification and characterization of bacterial-binding property in the type III repeat domain of fibronectin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320: 347-353 (2004)
- (4) 蘭 茂. 滇南本草（中国古典、15世紀）
- (5) 李 時珍. 本草綱目（中国古典、16世紀）
- (6) 魏 睦新ら. 医科大学教科書“中医学”，東南大学出版社，2004；p. 148
- (7) 李 荣成. 中医药对感染性全身炎症反应综合征作用的研究与思考（中医学の全身感染性炎症反応総合症に対するの効用検討） 中国中西医结合急救杂志 6: 243-244 (1999)
- (8) 譚 余庆, 赵 一, 林 启云, 等. 青蒿提取物抗内毒素实验研究（青蒿提抽出物の内毒素抑制についての実験研究） 中国中药杂志 24: 166-171 (1999)

作成日：2005年3月8日