

上原記念生命科学財団

研究報告集

Vol. 12 1998

財団法人 上原記念生命科学財団

## 27. 抗酸化作用を有する漢方薬, 生薬およびその成分の抗エイズ作用の検討 [96 奨-12]

渡辺 賢治

北里研究所東洋医学総合研究所

### 緒言

HIV に感染しても 10 年以上エイズを発症せずに長期間生存する例がある。このことは HIV が感染してウイルスがプロウイルスの状態状態で感染細胞の DNA に組み込まれても、活性化されなければエイズを発症することなく長期間生存可能であることを示唆している。したがって HIV がプロウイルスの状態からどのような機構で活性化されるのかを研究することは HIV 感染者がエイズを発症するのを予防する上で非常に重要なことである。

NF- $\kappa$ B は細胞質に存在する転写因子でプロウイルスの活性化を担っているが、宿主の細胞が TNF, IL-1 など炎症性サイトカインの刺激を受けると細胞内に反応性の酸化中間体が発生し、これが NF- $\kappa$ B のうち I $\kappa$ B をリン酸化したのち蛋白融解する。残された p65 と p50 のダイマーは核内に移行し、HIV プロウイルスの LTR の kB 結合部分に結合し HIV の遺伝子が活性化される。この活性化は pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), N-acetylcysteine (NAC), フラボノイド類などの抗酸化薬で抑制されることが知られている<sup>1-3)</sup>。

小柴胡湯は抗酸化作用を有することが知られており<sup>4)</sup> HIV プロウイルスの活性化を抑制する可能性がある。本研究においては小柴胡湯, またその構成生薬の一つであり、抗酸化作用をもつ黄芩中のフラボノイドのバイカリンとバイカレインに抗 HIV 作用があるか否かの検討を行った。

### 方法

#### 1. 細胞培養

細胞はヒトプロモサイトである U937 を用いた。培養液は 10% FBS, L-グルタミン, ペニシリン, ストレプトマイシンの入った RPMI 1640 の complete medium を用い、5% CO<sub>2</sub> で培養した。

#### 2. 細胞毒性

小柴胡湯の抗 HIV 作用が細胞毒性のある領域で示されているのかどうかを検討するため、MTT アッセイを行った。

#### 3. HIV1-LTR の転写活性に及ぼす影響

HIV-1 のプロモーターである LTR とレポーター遺伝子であるクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) を連結したプラスミド (pHIV1-CAT) をエレクトロポレーションにてトランスフェクトした (Bio-Rad gene pulsar)。24 時間後、PMA で刺激し、一部の細胞は小柴胡湯, バイカリン, バイカレインにて前処置をした。24 時間後、細胞を回収し細胞内蛋白を抽出して蛋白量を測定し 60  $\mu$ g の蛋白を CAT-ELISA (ペーリンゲーマンハイム社) に用いた。

#### 4. NF- $\kappa$ B 活性化 (ゲルシフトアッセイ)

細胞を 2 と同様に刺激したのち、24 時間後に核蛋白を抽出する。活性型 NF- $\kappa$ B (p65, p50) をみるために  $\kappa$ B 結合部位の 2 本鎖 DNA プローブを<sup>32</sup>P にて標識し、核蛋白と反応させ、電気泳動したのちオートラジオグラフィで観察した。

### 結果

#### 1. 細胞毒性

MTT アッセイの結果では、小柴胡湯は 500  $\mu$ g/ml から、バイカリンは 20  $\mu$ g/ml から細胞毒性を示しはじめた。バイカレインは 1  $\mu$ g/ml から毒性を示したので以後の検討から除外した。

#### 2. HIV-1LTR の活性化抑制作用

ヒトプロモサイトの U937 は TPA に対して鋭敏に反応し、TPA 1 ng/ml で 20~50 倍程度、TPA 10 ng/ml で 50~100 倍程度遺伝子転写活性が上昇する。小柴胡湯を前処置しておくと、TPA による HIV1-LTR の転写活性化は濃度依存的に抑制され、20  $\mu$ g/ml でプラトー

に達した。バイカリンも濃度依存的に HIV1-LTR の転写活性を抑制し、2  $\mu$ g/ml でプラトーに達した。

3. 転写因子 NF- $\kappa$ B 活性化に及ぼす小柴胡湯の影響  
TPA による NF- $\kappa$ B の活性化は、小柴胡湯およびバイカリンの前処置により抑制された。

### 考察

漢方薬は長い間の使用経験により、比較的安全に使用することができる。本邦では小柴胡湯は広く肝疾患に用いられる薬剤で使用頻度も高い。今回、小柴胡湯のもつ抗酸化作用に着目し、HIV のプロウイルスの活性化抑制ができるか否かの検討をした。HIV の研究においては、動物もしくはウイルスそのものを用いた実験には制限があり、*in vitro* の実験で行ったため、このまますぐに臨床応用に結び付けることは困難であるが、他の抗酸化剤と同様、HIV プロウイルスの活性化を抑制する可能性が示された。小柴胡湯は柴胡, 黄芩, 半夏, 大棗, 人参, 生姜, 甘草の七味からなる処方であるが、黄芩の中のフラボノイド類である、バイカレインならびにそのグルクロン酸抱合体であるバイカリンは抗酸化作用をもつことが知られている。バイカレインは細胞毒性が強く今回の検討には不適切であったが、バイカリンには、HIV プロウイルス活性化抑制作用があることが示され

た。漢方薬のもつ抗酸化作用は抗 HIV 作用に止まらず、動脈硬化抑制や紫外線障害防止など幅広く応用される分野として注目される。

### 文献

- 1) SCHRECK, B., MEIER, D., MANNEL, N., DROGE, W. & BAEUERLE, P. A.: Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor  $\kappa$ B activation in intact cells. *J. Exp. Med.*, 175: 1181-1194, 1992.
- 2) ROEDERER, M., RAJU, P. A., STAAL, F. J. T. & HERZENBERG, L. A.: N-Acetylcysteine inhibits latent HIV expression in chronically-infected cells. *AIDS Res. Hum. Retrov.*, 7: 563-567, 1991.
- 3) ONO, K., NAKANE, H., FUKUSHIMA, M., CHERMANN, J. C. & BARRE-SINOSSI, F.: Inhibition of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. *Eur. J. Biochem.*, 190: 469-476, 1990.
- 4) YOSHIKAWA, T., TAKAHASHI, S., NAITO, Y., TANIGAWA, T., UEDA, S., OYAMADA, Y., SUGINO, H. & KONDO, G.: Influence of traditional Chinese medicines of oxygen-derived free radicals. *J. Clin. Exp. Med.*, 152: 741-742, 1990.