＜実例報告＞＜学術雑誌＞

**栄養補助食品「（MMT）」の投与で、老齢マウスの実験**

**インフルエンザ・モデルの症状が改善**

J. CERVIa、F. MAROTTAb、C. BATERa、K. MASULAIRa、

E. MINELLIb、M. HARADAc、P. MARANDOLAd

a SFJO研究所（パリ、フランス）,ｂ伝統医学WHOセンター、ミラノ大学（ミラノ、イタリア）, c MCH病院（東京、日本）, d GAIA、エイジ・マネジメント基金（パヴィア、イタリア）

研究成果は「アナルス・オブ・ザ・ニューヨーク・アカデミー・オブ・サイエンシズ」誌、1067: 408-413 (2006年)。2006年 ニューヨーク科学アカデミー。に報告された。この雑誌は１８２３年創刊の雑誌で年間28刊出版され、世界すべての科学雑誌の中で２番目に多く他の論文などで引用される世界的に権威のある学術雑誌です。

**［要旨］**

20ヵ月齢のスイス・マウスを、(A)対照群、（B）感染群、（C）感染しているが5mgの植物性化合物MMTで治療した群の3つに分けた。マウスは75Hウイルス・ユニット30μLで経鼻的にウイルス感染させた。MMTの投与によって、鼻のウイルス感染症状と熱性反応が著しく低下した。フォルマザン陽性細胞、肺内及び血漿中のリポペロキシダーゼ、肺組織のTNF‐αはウイルス感染時に増加したが、MMT治療群では改善が認められた（P＜0.05）。また、MMTの投与によってSOD、カタラーゼ活性、アスコルビン酸が正常に戻り、肺のウイルス力価が有意に減少したが、鼻ではそうでなかった。しかし、鼻の炎症性浸潤は有意に減少した。MMTは老齢動物で臨床応用できる可能性があり、老齢動物においても安全性という点で優れた側面をもっている。

キーワード：インフルエンザ・モデル；老齢マウス；TNF-α；RANTES；植物性化合物

**［はじめに］**

インフルエンザとインフルエンザ症候群の予防と治療に有効な選択肢には依然として幾つかの制限がある。高齢者の場合には特にそうである。こうした症状がある場合、炎症や酸化といった現象が組織に損傷を与え、損傷が永続してしまうようだが、インフルエンザ・ウイルス感染時の治療薬としての抗酸化物質の有効性については、ほんの数えるほどしか論文報告されていない。そこで、本研究では、抗酸化と抗炎症という特性があることで知られる、幾つかの薬草成分を含む漢方養生サプリメントMMT(協通事業、東京、日本)について分析を行った1－5。

**［研究材料及び方法］**

実験のデザイン

20ヵ月齢のスイス・マウス（25～30g）を無菌環境の中で飼育し、（A）健康な対照群、（B）感染群、（C）MMTで治療を施した感染群の3群に分けた。マウスにはエーテル麻酔下で75HAウイルス・ユニット（尿膜腔液中で増殖させたA/香港/8/68）30μLを経鼻的にウイルス感染させた。対照群には同量の滅菌した尿膜腔液を投与した。MMT治療群は、ウイルスを接種した日から屠殺する日まで漢方養生サプリメント（MMT：ショウガ、琉球藍、田七、杜仲、羅漢果（モモルデカ）、甘草、ネギ）15mgを1日3回に分けて経口投与した。研究期間全体を通して臨床的な感染症状が認められたが、肺ホモジネートのウイルス力価に加え、鼻洗浄液中の感染細胞総数を8日間で確定した。

**［気管支肺胞洗浄液（BALF）の回収と肺組織の保管］**

第4日目に、細胞ペレットを得るためにBALFを回収し、遠心分離機にかけた。また、RANTES（regulated upon activation of normal T cell expressed and secreted）測定のために、リアルタイムのポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）を用いて定量分析を実施、PCRによってできた産物はデンシトメトリー分析で定量化した。その直後、頸管脱臼によってマウスを屠殺し、氷冷PBS溶液で灌流させた後、肺を入手した。

**［スーパーオキシド・ラジカル産生の評価］**

細胞懸濁液を50μLの0.2％ニトロブルー・テトラゾリウム（NBT）と混ぜ、培養した後、レーシュマン染色法を用いて対比染色した。フォルマザン陽性細胞（F＋）を盲検法（blindly）でスコア化し、3回の結果すべてを細胞200個あたりのF＋細胞の数として表わした。

**［細胞測定と生化学的測定］**

1.　全肺をホモジナイザーにかけ、アスコルビン酸塩を測定するためにその上澄みを高速液体クロマトグラフィー/電気化学的検出を用いて分析した。組織培養の上澄みから得たTNF‐α活性については、L929標的細胞系に対する細胞融解活性を定量化することで評価を行った。血漿抗酸化状態については、血漿マロニルジアルデヒド値を測定して調べた。

**［毒性学的研究］**

別のマウス・グループにMMT（5～30ｇ/体重kg/日）もしくは殺菌水を1日1回、連続14日間、胃管栄養法を用いて経口投与し、あらかじめ定められた10の組織（脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、膵臓、胃、小・大腸、腎臓、骨髄）の毒性症状について評価した。

**［統計分析］**

グループ間の統計比較は「ペアt検定」を用いて行い、P値が0.05を下回る場合を統計的に有意と見なした。

**［結果］**

感染マウスは、感染から約12時間後に熱性反応を呈するようになり、それが約48時間持続した。MMTの経口投与によって、運動活性の低下だけではなく、ウイルス感染による鼻の症状も目立って減少し、基準値を上回る体温上昇の濃度曲線下面積（the area-under-the-curve measurement for the increase in body temperature over baseline values）が46％減少した（治療を施さない感染マウス群に対しP＜0.05）。フォルマザン陽性細胞はウイルス感染時に80％増加したが、栄養補助食品の投与後は44％に減少した（P＜0.01）。感染群では、血漿SOD、カタラーゼ活性、アスコルビン酸が有意に減少した（それぞれ9.8±1.2、23.7±2.3、及び52.2±8.2対14.2±1.1、29.7±1.9、及び79.7±7.9、P＜0.05）。だが、栄養補助食品投与群では、対照群と同様の活性が認められた（P＜0.05）。対照群と比べると、ウイルス感染時には肺抽出物や血漿レベルでのMDA値が、肺組織のTNF‐α値とともに有意に上昇した（それぞれ＞2倍と＞７倍、健康な対照群に対してP＜0.01）。しかし、これらのパラメーターはいずれも、MMTの投与によって有意に低下させることができた（50％近く、P＜0.05）。鼻洗浄液のウイルス力価は、ウイルス接種から36時間後に急増し、感染後の観察第3日目にはウイルス感染価が最大の50％（TCID50）に達した（3.88±0.33 log10 TCID50s/ml）。MMT治療群には有意の差は認められなかった。その一方で、鼻洗浄液中の炎症細胞の総数は早い段階から有意に低下し、この状態は研究期間中持続した（P＜0.05）。MMTはまた、BAL法を用いて回収したマウス上皮細胞内でのRANTESの発現もしくは産生を37％と有意に減少させることも分かった（治療を行わない群に対してP＜0.05）。肺ホモジネートのウイルス活性は鼻洗浄液中ほど高くはなかったが、MMT投与群では有意に低下した（治療を行わない群に対してP＜0.05、図1）。

（左上より）

Log10/gm

治療を行わない群

MMT治療群

（左から右へ）

12時間、24時間、36時間、48時間、60時間、3日、4日、8日

図1　インフルエンザ・モデルにおける肺のウイルス力価：MMTの効果（中央値±標準偏差）。

＊治療を行わない群に対してP＜0.05

**［MMTの毒性学的検査］**

MMTを最高30g/体重kg/日（すなわち、マウスをインフルエンザ・ウイルス感染の影響から守るために必要な量の50倍以上）投与したが、薬剤に関係した毒性との関連性はなかった。

**［考察］**

高齢の患者は、複数の薬剤を服用している間、よく免疫不全状態に陥り、ウイルス感染を併発するリスクが高いことが知られている。疾患の発症には、好中球とマクロファージの肺への集積が一役買っていると見ていいだろう。実際、これまでの研究では、インフルエンザ・ウイルスへの感染がビタミンEやグルタチオンの内因性濃度を低下させること6や、キサンチン・オキシダーゼ値が上昇すること7が報告されている。従って、本研究においては、BALペレットにおいてスーパーオキシド・ラジカルの産生が有意に増加したのに加え、SODやカタラーゼが減少した。こうしたプロセスと並行して、血中、ことに肺においてMDAが増加した。また、肺ホモジネートではアスコルビン酸の減少とTNF-αの増加が認められた。TNF-αはIL-8や細胞接着分子の発現によって白血球漸増の引き金になることが知られている。漢方養生サプリメントMMTを食餌に加えると、上記の現象はすべて有意に、部分的もしくは完全に抑えられた。MMT各構成成分単独の詳細なメカニズムについては、現時点では明らかにできないが、その成分の多くは抗炎症特性や抗酸化特性を有している1-5。そうした特性は、ネギの構成成分であるalk(en)ylsulfinothioic acid alk(en)yl-esterの喘息抑制効果8とともに、MMTを投与した感染マウスの症状改善を解き明かす上で一助となるかもしれない。実のところ、抗酸化物質の摂取不足は、肺免疫系の機能を一段と低下させる可能性があり、インフルエンザ感染マウスにビタミンEの栄養補助食品を投与すると、Th1サイトカインの産生が改善することが立証されている9。興味深いことに、MMTの投与によって、Th1関連の免疫反応と関係するRANTESの値が有意に低下した。これは核転写因子NF-KB調節分子IKB-αとp38 MAPキナーゼのリン酸化が阻害された結果かもしれない。この点については最近、MMTの構成成分の一つにそうした作用のあることが示唆されている10。最後に、MMTを投与しても鼻洗浄液中の高ウイルス力価は変化しなかったが、肺のウイルス量は有意に減少した。これは、MMTの投与によって局所的な炎症細胞の漸増は弱まったが、MMTはウイルスに対する特効的な働きが十分でないため、ウイルス接種直後の鼻腔内での急激なウイルス増殖を抑えることができなかったためと考えることもできるだろう。しかし、全身レベル及び肺レベルで内因性及び抗炎症性の特性が改善したことが、肺のウイルス血症を抑える上で一役買っている可能性もある。上記の実験に基づき、安全な天然物質であるMMTは臨床的に応用できる潜在性を有していることが示され、その作用機序をより詳細に解明するために、さらなる研究を継続して行われている。