***In vitro* evaluation of synergistic inhibitory effects of neuraminidase inhibitors and Methylglyoxal against Influenza virus infection**

インフルエンザウイルス感染に対する Methylglyoxal と Neuraminidase 阻害薬の併用による相乗的阻害効果についての検討

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 新興感染症病態制御学系専攻
SIRIWAN CHARYASRIWONG (チャリヤシリワン シリワン)

【目的】

インフルエンザウイルスは、インフルエンザ疾患を引き起こすオルソミクソウイルス科に属するウイルスであり、毎年冬季に流行し多数の罹患者を出している。また近年では、ヒト-ヒト間で感染性を示す高病原性新型インフルエンザウイルスの出現と世界的大流行（パンデミック）の発生が懸念されており、有効な防疫策の構築が急務である。インフルエンザウイルスに対する現行の防疫策としては、ワクチン接種による予防と抗ウイルス薬による治療に大別される。しかしながら、インフルエンザウイルスでは変異株が高頻度で出現するため、ワクチンの効果も限定的であり、有効な治療薬であっても耐性株出現の問題が看過できない。治療薬は、タミフル、リレンザ、イナビル、ラピアクタといった neuraminidase 阻害薬が開発され使用されているが、最も多用されているタミフルに関しては既に薬剤耐性株の出現が確認されており、新規抗インフルエンザウイルス剤の開発が常に求められている。

蜂蜜は食品としてだけでなく民間療法に用いられてきた歴史がある。これまでの検討から我々は蜂蜜の成分である MGO に抗インフルエンザウイルス活性を見出してきた。MGO の示す抗インフルエンザウイルス活性の作用機序としては、ウイルス粒子に直接的に作用していることが示唆されている。一方、既存薬である各種 NA 阻害剤は感染細胞からの新生ウイルス粒子の放出過程を阻害することが知られている。本研究では作用機序の異なる MGO と NA 阻害剤の併用効果について検討することを目的とした。

【方法】

(1)活性確認試験：96 ウェルプレートに MDCK 細胞を播種し、37℃ 5%CO₂ 下で一晩培養した。細胞を無血清培地で一度洗浄した後、計 4 種の抗インフルエンザウイルス薬と MGO について抗ウイルス活性を確認するため、計 5 株の A 型インフルエンザウイルスと 6 株の B 型インフルエンザウイルスを各薬剤の段階希釈系列存在下に細胞に感染させた。ウイルスは 100 TCID₅₀/well (MOI≒0.002 に相当)の感染力価で添加した。また、各薬剤の細胞毒性評価のため、段階希釈した薬剤のみを細胞に添加した。ウイルス及び薬剤添加後、37℃ 5%CO₂ 下で 3 日間培養した後、細胞を 70%エタノールで固定し、クリスタルバイオレットでウイルス感染に伴う CPE(cytopathogenic effect: 細胞変性効果)を免れた残存細胞を染色した。染色液を除去し、水で軽くリンスした後風乾させた。風乾後のプレートについてプレートリーダーで 560 nm における吸光度を測定し定量した。各薬剤については、50%感染阻害濃度 (IC₅₀; 50% inhibitory concentration) 及び 50%細胞毒性濃度 (CC₅₀; 50% cytotoxic concentration) を算定し、さらに薬剤の有効性の指標とされる SI (selectivity index) を算出した。

(2)既存の抗ウイルス薬と MGO の併用効果の検討:MDCK 細胞に段階希釈したタミフル、リレンザ、イナビルまたはラピアクタと、段階希釈した MGO を同時に添加し、A/WSN/33 とタミフル耐性株である A/Nagasaki/HA-58 (A/HA-58)を感染させた。(1)と同様に感染 3 日後細胞を染色し定量・解析した。

【結果】

(1) MGO の A/WSN/33 株に対する IC₅₀ 値は 0.24 mM, CC₅₀ 値は 1.4 mM と算定された。SI(=CC₅₀/IC₅₀)は約 5.8 であった。MGO はタミフル耐性株である A/HA-58 株に対しても抗ウイルス活性を示した。MGO の A/HA-58 株に対する IC₅₀ 値は 0.25 mM と算定された。A/WSN/33 株と比較し、ほぼ同等であると考えられる。

(2) B 型インフルエンザウイルスに対する NA 阻害剤の効果は A 型に対して同等か低い傾向にあった。一方、B 型インフルエンザウイルスに対する MGO の IC₅₀ 値は A 型と比較し顕著に低値を示し、B 型株への有効性が確認された。さらに、MGO は NA 阻害剤に対する感受性の有無によらず、いずれの株に対しても抗ウイルス活性を示すことが示唆された。(Table 1.)。

Table1. 各 NA 阻害剤と MGO の異なるインフルエンザに対する IC₅₀ 値一覧

Compound	Virus strain	^a IC ₅₀ (μM)	Ave. (relative)		Virus strain	IC ₅₀ (μM)	Ave. (relative)	
Oseltamivir	B/Lee/40	LS □ 23□ ± 3.50	49 (11.7)	S	A/WSN (H1N1)	LS □ 2.5 ± 0.50	4.2 (1.0)	S
	B/Brisbane	LS □ 75□ ± 48.00		S	A/PR/8 (H1N1)	LS □ 9.4 ± 0.90		S
	B/2014/6	CI □ 33□ ± 6.50		S	A/HK (H3N2)	LS □ 0.7 ± 0.03		S
	B/2014/8	CI □ 11□ □	22 (5.2)	S	A/no.6 (2009)	CI □ 36□ ± 28.00	37.5 (8.9)	S
	B/2014/1	CI > 810□ ± 270.00		R	A/no.33 (2009)	CI □ 39□ ± 16.00		S
	B/2014/4	CI □ 970□ □		R	A/HA-58 (2009)	CI □ 870□ □	>935 (222.6)	R
	B/2014/7	CI > 1000□ □ □	>926.7 (220.6)	R	A/no.16 (2009)	CI > 1000□ □		R
Zanamivir	B/Lee/40	LS □ 0.32 ± 0.06	1.51 (1.0)	S	A/WSN (H1N1)	LS □ 0.11 ± 0.02	0.15 (1.0)	S
	B/Brisbane	LS □ 2.7 ± 5.20		S	A/PR/8 (H1N1)	LS □ 0.24 ± 0.00		S
	B/2014/6	CI □ 0.2 □		S	A/HK (H3N2)	LS □ 0.11 ± 0.03	1.34 (8.9)	S
	B/2014/8	CI < 0.2 □	6.2 (41.3)	S	A/no.6 (2009)	CI □ 1.7 ± 0.80		S
	B/2014/1	CI □ 11.7 □		S	A/no.33 (2009)	CI □ 2.2 ± 0.50		S
	B/2014/4	CI □ 9.9 □		S	A/HA-58 (2009)	CI □ 0.11 ± 0.02	>100 (666.7)	R
	B/2014/7	CI □ 9.0 □ □	>500 (259.1)	R	A/no.16 (2009)	CI > 100□ □ □		R
Laninamivir	B/Lee/40	LS □ 4.0 ± 0.21	13.5 (7.0)	S	A/WSN (H1N1)	LS □ 1.2 ± 0.30	1.93 (1.0)	S
	B/Brisbane	LS □ 23□ ± 3.30		S	A/PR/8 (H1N1)	LS □ 1.6 ± 0.10		S
	B/2014/6	CI □ 12□ ± 4.50		S	A/HK (H3N2)	LS □ 3.0 ± 0.80	28.73 (14.9)	S
	B/2014/8	CI □ 17□ □ □	>500 (259.1)	S	A/no.6 (2009)	CI □ 48□ ± 13.00		S
	B/2014/1	CI > 500□ □ □		R	A/no.33 (2009)	CI □ 35□ ± 5.30		S
	B/2014/4	CI > 500□ □ □		R	A/HA-58 (2009)	CI □ 3.2 ± 0.30	>500 (259.1)	R
	B/2014/7	CI > 500□ □ □	>500 (259.1)	R	A/no.16 (2009)	CI > 500□ □		R
Peramivir	B/Lee/40	LS □ 0.2 ± 0.06	0.52 (20)	S	A/WSN (H1N1)	LS □ 0.011 ± 0.00	0.26 (1.0)	S
	B/Brisbane	LS □ 0.84 ± 0.04		S	A/PR/8 (H1N1)	LS □ 0.061 ± 0.00		S
	B/2014/6	CI □ 2.8 ± 0.10		S	A/HK (H3N2)	LS < 0.005	0.095 (3.6)	S
	B/2014/8	CI □ 0.7 □	1.75 (67.3)	S	A/no.6 (2009)	CI □ 0.12 ± 0.03		S
	B/2014/1	CI □ 17□ ± 3.50		R	A/no.33 (2009)	CI < 0.07 ± 0.03		S
	B/2014/4	CI > 25□ □		R	A/HA-58 (2009)	CI > 2.5 □ □	>13.75 (528.8)	R
	B/2014/7	CI > 25□ □ □	>22.3 (859)	R	A/no.16 (2009)	CI > 25□ □ □		R
MGO	B/Lee/40	LS □ 39 ± 10.00	31 (0.09)	S	A/WSN (H1N1)	LS □ 240□ ± 190.00	340 (1.0)	S
	B/Brisbane	LS □ 23□ ± 6.90		S	A/PR/8 (H1N1)	LS □ 360□ ± 130.00		S
	B/2014/6	CI □ 48□ ± 29.00		S	A/HK (H3N2)	LS □ 420 ± 140.00	234.5 (0.7)	S
	B/2014/8	CI □ 140□ ± 19.00	89 (0.26)	S	A/no.6 (2009)	CI □ 195□ ± 79.00		S
	B/2014/1	CI □ 110□ ± 5.70		S	A/no.33 (2009)	CI □ 246□ ± 2.00		S
	B/2014/4	CI □ 59□ □ □		S	A/HA-58 (2009)	CI □ 250□ ± 140.00	234.5 (0.7)	S
	B/2014/7	CI □ 88□ □ □	>500 (259.1)	S	A/no.16 (2009)	CI □ 247□ ± 3.70		S

^a

(3) 各 NA 阻害剤を単独で作用させた際の IC₅₀ 値と、MGO を NA 阻害剤と同時に作用させた際の IC₅₀ 値を比較したところ、いずれの NA 阻害剤についても IC₅₀ 値が MGO の併用により顕著に減少することが示唆された。(Table 2.)。タミフル、リレンザ、イナビル、ラピアクタの IC₅₀ 値は 174 μM の MGO の併用により、それぞれほぼ 100 分の 1、300 分の 1、30 分の 1、200 分の 1 に減少した。

Table2. MGO 共添加時における各 NA 阻害剤の IC₅₀ 値一覧

Conc. of	oseltamivir		zanamivir		laninamivir		peramivir	
MGO (μM)	IC ₅₀ (μM)	Relative ratio	IC ₅₀ (μM)	Relative ratio	IC ₅₀ (μM)	Relative ratio	IC ₅₀ (μM)	Relative ratio
0	1.8 ± 0.08	1.0	0.30 ± 0.19	1.0	0.25 ± 0.01	1.0	0.028 ± 0.015	1.0
5.4	2.0 ± 0.31	1.1	0.37 ± 0.25	1.2	0.22 ± 0.03	0.86	0.0055 ± 0.001	0.20
22	0.58 ± 0.22	0.32	0.046 ± 0.02	0.15	0.14 ± 0.07	0.53	0.0033 ± 0.0020	0.12
170	<0.020	<0.011	<0.0010	<0.0033	<0.010	<0.04	0.0033 ± 0.0020	<0.0054

表中「relative ratio」は各 NA 阻害剤単独添加時の IC₅₀ 値を「1」とした場合の相対値を示している。

(4) タミフル耐性株に対する MGO と NA 阻害剤の併用効果について検討した結果、タミフル耐性株に対しても、MGO と NA 阻害剤の併用により、相乗効果がみとめられた。さらに、相乗効果は MGO の濃度依存的に増強することが確認された (Table 3)。

Table 3. タミフル耐性株に対する MGO とタミフルの併用効果

Concentration of MGO (μ M)	6.25 TCID ₅₀		100 TCID ₅₀	
	IC ₅₀ of oseltamivir (μ M)	Relative ratio	IC ₅₀ of oseltamivir (μ M)	Relative ratio
0	200	1	>1000	1
25	110	0.55	ND	N/A
100	7.7	0.038	ND	N/A
125	<3.9	<0.019	448	<0.45
250	<3.9	<0.019	46	<0.046

【考察】

本研究より、MGO はインフルエンザウイルスに対して、血清型や薬剤感受性によらず、いずれの株に対しても抗ウイルス活性を示すことが示唆された。

B 型インフルエンザウイルスは A 型と同様オルソミクスウィルス科に属する同属のウイルスであるが、既存の NA 阻害剤に対する効果に差異が確認された。NA 阻害剤は A 型株に対する抑制効果が B 型株よりも高い可能性が示唆された。一方、MGO は B 型株に対してより低値の IC₅₀ 値を示し、A 型株よりも有効性が高いことが確認された。

本研究より、MGO は既存の NA 阻害薬と併用することでインフルエンザウイルスに対する感染抑制効果を顕著に増強することが明らかとなった。計 4 種の NA 阻害剤 (Oseltamivir, Zanamivir, Laninavir, Peramivir) の単独添加時における IC₅₀ 値が、MGO の濃度依存的に、各々最大で約 100 分の 1、300 分の 1、30 分の 1、200 分の 1 に減少し、抑制効果の増強が確認された。

インフルエンザウイルスにおける抗ウイルス剤の相乗効果の作用メカニズムについてはさらに検討する必要があるが、異なる作用機構の抗ウイルス剤の併用は AIDS において HAART 療法としてその有用性が確立しており、インフルエンザウイルス治療においても使用薬剤量の低減、薬剤耐性ウイルスの出現の低減という観点からも検討すべき課題であると考えられる。

【基礎となった学術論文】

1. Charyasriwong S., Watanabe K., Rahmasari R., Matsunaga A., Haruyama T., Kobayashi N. *In Vitro* Evaluation of Synergistic Inhibitory Effects of Neuraminidase Inhibitors and Methylglyoxal Against Influenza Virus Infection *Archives of Medical research*, 46, 8-16 (2015)
2. Charyasriwong S., Haruyama T., Kobayashi N. *In vitro* evaluation of the antiviral activity of methylglyoxal against influenza B virus infection *Drug Discoveries & Therapeutics*. 10(4) 201-210 (2016).