

201215010A

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業（臨床研究推進研究事業）

漢方薬によるワクチンアジュバント効果の  
検討と臨床応用

平成24年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 濟木 育夫

平成25年（2013年）5月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- 漢方薬によるワクチンアジュバント効果の検討と臨床応用 .....1  
済木 育夫

### II. 分担研究報告

1. 高齢者におけるインフルエンザワクチンに対する漢方薬のアジュバント作用の長期効果の検討  
.....6  
済木 育夫、後藤 博三、小泉 桂一
2. 尿路感染症患者における尿中サイトカインに及ぼす抗生剤と漢方薬の比較検討.....15  
後藤 博三
3. 漢方薬を投与された RA 患者におけるインフルエンザワクチン接種後の免疫応答.....19  
小暮 敏明
4. インフルエンザワクチン接種患者での十全大補湯投与群と非投与群の一般血液生化学検査の推移  
について.....23  
並木 隆雄、来村 昌紀
5. 漢方薬による HPV ワクチンに対するアジュバント効果の検討と臨床応用.....29  
斎藤 滋、中島 彰俊、島 友子
6. 漢方薬のインフルエンザワクチンアジュバント療法の有効性を検討するための統計手法の評価  
.....33  
折笠 秀樹、熊谷 直子
7. 子宮頸癌前癌病変に対するヒトパピローマウイルス (HPV) 治療ワクチン開発における漢方薬アジ  
ュバントの有効性に関する研究.....37  
川名 敬
8. 粘膜免疫システムを介した漢方アジュバントの作用メカニズムの解明.....44  
清野 宏
9. ワクチンアジュバント開発に向けた樹状細胞の抗原提示能力を亢進する生薬の網羅的な探索  
.....51  
小泉 桂一

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....57

IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....62

## 漢方薬によるワクチンアジュバント効果の検討と臨床応用

主任研究者 済木育夫 富山大学和漢医薬学総合研究所病態生化学分野 教授

### 研究要旨

昨年度までに、基礎研究より探索されたアジュバント効果を有する漢方薬に関して、高齢者およびリウマチ患者のインフルエンザワクチンに対する漢方薬のアジュバント応用に向けた予備的検討を行った。その結果、十全大補湯は、統計的な有意差は得られなかったが、抗体価の低い高齢者のインフルエンザワクチン接種後の抗体価上昇に好影響を及ぼしている可能性が示唆された。さらに、リウマチ患者関しても、インフルエンザワクチン接種後の免疫応答の経過観察を行った結果、臨床的に有意な Seroconversion を認め、インフルエンザワクチン免疫応答に Positive に作用する可能性明となった。本年度は、多数の高齢者に対して、十全大補湯のインフルエンザワクチンに対するアジュバントとしての有用性の評価を行った。

また、基礎研究において、これら漢方薬の種々ワクチンに対するアジュバント効果の機序解明、および、漢方薬成分よりワクチンに対する新規アジュバントを開発するための探索研究を行った。

### 分担研究者

清野 宏 東京大学医科学研究所炎症免疫学分野 教授

川名 敬 東京大学医学部附属病院産科婦人科学 助教

後藤博三 富山大学大学院医学薬学研究部和漢診療学 准教授

小暮敏明 社会保険群馬中央総合病院和漢診療科 部長

並木隆雄 千葉大学大学院医学研究院和漢診療学講座 准教授

斎藤 滋 富山大学大学院医学薬学研究部産科婦人科学 教授

折笠秀樹 富山大学大学院バイオ統計学・臨床疫学 教授

小泉桂一 富山大学和漢医薬学総合研究所漢方診断学分野 准教授

### A. 研究目的

（平成 22 年度当初目的の変更はない。）

高齢化が進む中、高騰する医療費の削減や、感染症の罹患率低減、さらには近年のがん研究の進展を背景としてがんの発症抑制を目的とした、種々のワクチンが医療現場で利用されている。海外では、効率的にワクチンの効果を得るために、アジュバントを用いた製剤が広く用いられているが、安全性を懸念する声もあり、国内では、アジュバントの使用はごく一部の製剤に限られている。このような中、新型インフルエンザ等の新興感染症に対するワクチンや、がん治療ワクチンの効果増強等のため、安全かつ効果的なワクチンアジュバントが強く求められている。一方、漢方薬の免疫に

対する影響について、これまで我々は、自然免疫の活性化を介して薬効が発揮されることを数多く報告してきた（eCAM, 2008, 他 37 編）。漢方薬の獲得免疫に対する影響は未だ明らかでないが、最近我々は、漢方薬である十全大補湯が、がんワクチンを用いた抗原特異的な獲得免疫の誘導を促進し、抗がん効果の増強につながることを動物実験において明らかにした。この結果から、現在医療現場で用いられている漢方薬は、安全性の高い経口ワクチンアジュバントとして、速やかに応用できるものと期待している。そこで本研究では、現在医療現場で接種可能なワクチンを用いて、併用した際にそのワクチンの効果を増強する漢方薬を網羅的に探索する基礎研究を行うと共に、その有用性を臨床研究により評価する。これにより、既存のワクチンによる予防医療をより効果的・効率的に行うための漢方薬併用療法を、薬都・富山より提言するとともに、新規ワクチン開発時の未承認アジュバントの安全性リスクの回避による開発促進、抗原使用量減少による製造量の増加に資することを目的とする。具体的には、基礎研究と臨床研究を連関させながら遂行することで、漢方薬の中から、ワクチン抗原に対する (1) 特異的抗体の産生、(2) 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の誘導、さらには (3) 交差反応性抗体の産生 の増強が可能な漢方薬を網羅的に探索し、治療適応根拠に基づき、免疫力が低下した高齢者、およびリウマチ患者のインフルエンザならびに子宮頸がんワクチンアジュバントとして迅速に利用可能とする点にある。

なお、本総括研究報告書は研究組織全体の総括的な研究概要の報告とするため、分担研究の詳細は各分担研究報告書に記載する。

## B. 研究方法

### 1. 臨床研究①(高齢者およびリウマチ患者

のインフルエンザワクチンに対する漢方薬のアジュバント応用に向けた予備的検討)

済木、後藤、小暮、並木、小泉、折笠の分担報告の研究手法の項を参照のこと。

### 2. 臨床研究②(子宮頸がんワクチンに対する漢方薬のアジュバント応用に向けた予備的検討)

川名、齋藤、折笠の分担報告の研究手法の項を参照のこと。

### 3. 基礎研究(ワクチンアジュバント効果を有する漢方薬のその機序解析)

済木、清野、川名、小泉の分担報告の研究手法の項を参照のこと。

#### (倫理面への配慮)

本研究で用いる十全大補湯、補中益気湯および黄耆建中湯等の漢方薬はすでに医薬品として使用され、重篤な副作用の報告はない。仮に投与中に副作用が生じた際には、直ちに投与を中止し適切な処理を行う。この点に関して対象患者にはインフォームドコンセントを行い承諾を得た。なお、この臨床研究は富山大学倫理委員会から承認済みである。実験動物を用いた基礎研究に関しては、national animal welfare committee のガイドラインに従って行った。

## C. 研究結果

### 1. 臨床研究①(高齢者およびリウマチ患者のインフルエンザワクチンに対する漢方薬のアジュバント応用に向けた予備的検討)

済木、後藤、小暮、並木、小泉、折笠

本事業において、我々は高齢者などのインフルエンザのハイリスクグループに対する漢方薬のインフルエンザワクチンアジュバントとしての可能性を多面的に解析し、多施設において漢方薬非投与症例と比較検討してきた。今年度は、昨年度の短期効果の結果をもとに被検薬として十全大補湯を

用い、6 ヶ月の長期間にわたりインフルエンザワクチンの抗体産生に及ぼす影響を検討した。対象は千葉県、群馬県、富山県の長期療養型病床4施設に入院中の患者でインフルエンザワクチン接種予定者91名。参加者を無作為に十全大補湯投与群と漢方薬非投与群の2群に分け、28週間経過観察した。インフルエンザワクチン接種4週前、接種時、接種後4週、8週、12週、24週にHI価を測定した。その結果、HI価の推移は、4週から24週において十全大補湯投与群が漢方薬非投与群に比べて有意に上昇した( $p < 0.05$ )。このことから、十全大補湯はインフルエンザワクチン接種による高齢者のH3N2に対する抗体産生を増強し、維持することが明らかとなった。

また、リウマチ患者に対しての検討も行った。漢方薬を服用しているRA患者においてインフルエンザワクチン免疫応答がいかなるProfileを呈しているかを明らかにすることを目的として、45例(平成22年度)・56例(平成23年度)の漢方薬を投与されているRAを対象として3種類のSubunitについて観察研究を実施した。その結果、漢方薬が投与されているRA患者は、1)血清変換(Seroconversion)において健常人とほぼ同様であった、2)MTX投与群/非投与群で血清変換に差異は見られなかった、3)臨床的に有意な抗体価以上を呈する患者(Seroprotection)が多かった、4)インフルエンザワクチン接種前後でRAの疾患活動性の増悪は見られなかった、等の結果が得られた。これを受けて平成24年度にはBio.製剤が投与されているRA患者に特化して免疫応答を明らかにする目的で7例のBio製剤が投与された漢方薬内服中のRA患者に限定して3種類のSubunitについて観察研究を実施した。その結果、A型の2つのSubunitでは十分なSeroconversion・Seroprotection効果が観察された。しかしながらB型では、その効果が弱く、また

SeroimmunizationについてはBio未投与群と比較して低反応であった。

## 2. 臨床研究②(子宮頸がんワクチンに対する漢方薬のアジュバント応用に向けた予備的検討)川名、齋藤、折笠

子宮頸がん治療ワクチンに関しては、HPV16型E7が細胞表面に提示された乳酸菌Lactobacillus casei(乳酸菌E7ワクチン:GLBL101c)のGMP製剤を作成した。施設研究倫理委員会の承認を得て、第I/IIa相臨床試験を計画し、平成21年から臨床試験が開始している。

### (1) E7発現乳酸菌経口薬(GLBL101c)のヒトでの有効性の検討

1~6 cap/日へのdose-escalationの検討では、4cap/日投与例の3例がE7-CMIを最も高いレベルで誘導された。病理学的評価としては、1cap/日もしくは2cap/日投与の4例は、CIN3病変が残存(SD)し、円錐切除術を必要とした。E7-CMIが最も高いレベルであった4cap/日投与例では、3例全例がCIN1-2(CR1例、PR2例)に退縮し、臨床の有効性が示され手術を回避できた。これらの3例は試験終了後、介入せずに経過観察中であるが2-2.5年経過しても全症例ともCIN3の再発を認めていない。6cap/日投与のコホート4のうち、高いE7-CMIがcervical lymphocyteに誘導された1例はCIN2(PR)に退縮した。E7-CMIの誘導が弱かった2例ではCIN3が消失せず(SD)、後療法を必要とした。これらの結果を効果安全性評価委員会で検討し、至適用量を4cap/日と設定し、その用量で更に7例の症例を追加した。4cap/日の全10例の有効性を検討したところ、10例中7例がエンドポイントの投与開始後9週で、CIN1-2(CR4例、PR3例)に退縮した。さらに13週目にさらに1例がCIN2(PR)に退縮した。エンドポイント(9週)における奏効率(CR+PR)は70%となり、投与後6か月時点での奏効

率は80%となった。全17例における薬理効果として、子宮頸部リンパ球中のE7-CMI誘導能を臨床効果別にまとめたところ(CR+PR vs. SD)、SD(n=8)ではE7-CMIが中央値16.1 cells/10<sup>5</sup>cellsであったのに対し、CR+PR(n=9)では、33.6 cells/10<sup>5</sup>cellsとなり、有意にE7-CMIが高くなっていることがわかった(Mann-Whitney検定, p=0.001)。子宮頸部リンパ球中のE7-CMIが臨床効果を反映するバイオマーカーになりうることを示された。

### (2) HPV ワクチン接種時における十全大補湯の効果

HPV ワクチン接種を行う女性を対象に、漢方薬が副作用軽減作用および抗体産生のアジュバント効果を持つかを検討中である。対象は20代の一般女性であり、無作為に十全大補湯エキス投与群と非投与群を割り付けし、ワクチン接種を行っている。調査項目は、症状日記を用いて副反応の軽減の有無：局所（注射部位）の特定した症状（疼痛、発赤、腫脹）および全身性の特定した症状（疲労、筋肉痛、頭痛、胃腸症状、関節痛、発疹、発熱、蕁麻疹）を調査し、血液検体を用いて生化学検査(BUN、Cre、GOT、GPT、 $\gamma$ -GTP)および免疫学的検査(HPV抗体価)の測定を行う。これまで38名が2群に分かれ投与を開始し、副作用の差につき解析を行った。両群ともに副作用発現に有意な差を認めなかった。また、重篤な副作用も一例も認めなかった。今後は、漢方薬による抗体産生へのアジュバント効果の評価を行う予定である。

### 3. 基礎研究(ワクチンアジュバント効果を有する漢方薬のその機序解析)

済木、清野、川名、小泉

漢方薬の構成生薬から増強効果を有する活性成分を同定し、生薬成分由来の新たなアクチンアジュバントを開発する目的で、富山大学和漢医薬学総合研究が構築した和

漢薬標準ライブラリー（合計112種類の生薬を用いて、樹状細胞の2種類の主要組織適合遺伝子複合体(MHC class IおよびII)に対する抗原提示能力を亢進させる生薬を探索した。その結果、樹状細胞の抗原特異的なMHC Class I提示能を2倍以上亢進させる生薬27種類の中に、十全大補湯構成10生薬のシャクヤク、トウキ、ビャクジュツ、ブクリョウの4種類(1.7倍のカンゾウを含めると5種類)も含まれていた。昨年度までに、我々は、漢方薬の十全大補湯が、樹状細胞のがんモデルワクチン特異的な抗原提示を増強し、さらには、マウス担がんモデルにおけるワクチン効果を増強することを報告してきた。この増強効果は、十全大補湯が樹状細胞の抗原提示を亢進させる4-5種類もの生薬で構成されていた結果であると思われる。

また、昨年度までに、経口ワクチンに対するアジュバント活性を有した漢方薬である補中益気湯の腸管IgA産生を増強に基づく生体防御機能について検討した。その結果、IgA抗体産生量と相関したコレラ毒素の経口チャレンジに対する生体防御が認められた。さらに経口ワクチン投与時における漢方薬の全身免疫系への作用を検討したところ、腸管IgA産生を増強する補中益気湯は血清中IgG産生も増強することが判明した。さらに腸管IgA産生をほとんど増強しない十全大補湯においては、補中益気湯よりも強い血清中IgGの産生増強効果があることが判明した。

さらに、補中益気湯(HET)と粘膜アジュバントである大腸菌トキシン(LTB)をアジュバントとして、GLBL101cとともにマウス経口投与したところ、HETをGLBL101cに併用した場合に脾臓細胞ではE7-CMIが上昇すること、GLBL101cにLTBとHETの両方を併用した場合に腸管粘膜リンパ球で高いE7-CMIが誘導されることを昨年度までに示してきた。乳酸菌と漢方薬、粘膜アジュ

バントを併用することによって E7-CMI を粘膜リンパ球に誘導する作用が相乗的に増強すると考えられたが、LTB は毒性の問題からヒトへの投与が難しい。そこで、本年度は、LTB に代わって、ヒトでの使用経験のある alpha-GalCer を粘膜アジュバントとして用い、同様の検討を行った。マウスに 1mg/head の GLBL101c を経口投与する際に、alpha-GalCer と HET を併用することにより、GLBL101c 単独と比べて約 2 倍の E7-CMI 上昇が観察された (図 1)。粘膜リンパ球における GLBL101c + HET+alpha-GalCer による E7-CMI 誘導能は、GLBL101c+HET+LTB による誘導能よりも高いことがわかった

#### D. 考察

#### E. 結論

平成 24 年度の本事業において、当初計画通り、高齢者に対するインフルエンザワクチンに対する漢方薬のアジュバント効果に関する無作為化比較臨床研究も終了した。その結果、長期療養型病床群に入院中の高齢者に対して、インフルエンザワクチンに対する十全大補湯のアジュバント効果を検討した。その結果、十全大補湯はインフルエンザワクチン接種による高齢者の H3N2 に対する抗体産生を増強し、維持することが明らかとなった。今後、インフルエンザワクチンの抗体産生に関して、基礎研究では十全大補湯の有効成分と作用機序の解明や、臨床研究では適切な投与期間や適応病態の検討を実施していく必要があると考えられる。さらに、Bio 治療下で漢方薬を投与された RA 患者におけるインフルエンザワクチン接種後の免疫応答の経過観察を本院和漢診療科で加療中の RA 患者を対象に実施した。その結果、A strain においては臨床的に有意な Seroconversion を認め、インフルエンザワクチン免疫応答に Positive に作用する可能性が示唆された。

しかしながら B strain では有意な免疫応答が観察されず、この臨床的な問題に関してはさらに多数例での臨床研究を継続する必要があると考えられる。

子宮頸がんワクチンに関しては、HPV ワクチン接種を行う健康人女性への漢方内服は、ワクチン接種による副作用悪化効果はなく、今後はワクチン効果の増強・効果の持続を検討していく予定である。また、HPVE7 発現型乳酸菌 GLBL101c の経口投与は、粘膜免疫を介した世界初の癌ワクチンである。ヒトの子宮頸部における E7 特異的細胞性免疫誘導を伴い、病理学的有効性が得られていることから、薬理効果に伴った臨床効果と考えられた。GLBL101c の 4 cap/日投与における奏効率 80% は、明らかな臨床効果を考えられた。漢方や粘膜アジュバントの併用によって GLBL101c の投与量を減らすことができる可能性があり低コスト化や臨床的効果の増強が期待される。

さらに、基礎研究結果から、十全大補湯および補中益気湯のワクチンアジュバント効果の免疫学的機序も明らかにすることができた。将来的に種々ワクチンと漢方薬の併用療法構築の際における有用な情報を提供できると思われる。

#### F. 健康危険情報

特記事項無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 2. 学会発表

各分担研究者の項を参照のこと

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許出願

##### 2. 実用新案登録

各分担研究者の項を参照のこと

##### 3. その他

なし

## 高齢者におけるインフルエンザワクチンに対する漢方薬の アジュバント作用の長期効果の検討

研究代表者 済木 育夫 富山大学和漢医薬学総合研究所  
病態生化学分野 教授

研究分担者 後藤 博三 医療法人 北聖病院 漢方内科部長

研究分担者 小泉桂一 富山大学和漢医薬学総合研究所  
漢方診断学分野 准教授

### 研究要旨

本事業において、我々は高齢者などのインフルエンザのハイリスクグループに対する漢方薬のインフルエンザワクチンアジュバントとしての可能性を多面的に解析し、多施設において漢方薬非投与症例と比較検討してきた。今年度は、昨年度の短期効果の結果をもとに被検薬として十全大補湯を用い、6ヶ月の長期間にわたりインフルエンザワクチンの抗体産生に及ぼす影響を検討した。対象は千葉県、群馬県、富山県の長期療養型病床4施設に入院中の患者でインフルエンザワクチン接種予定者91名。参加者を無作為に十全大補湯投与群と漢方薬非投与群の2群に分け、28週間経過観察した。インフルエンザワクチン接種4週前、接種時、接種後4週、8週、12週、24週にHI価（A/カリフォルニア/7/2009（H1N1）、A/ビクトリア/210/2009（H3N2）、B/ブリスベン/60/2008（ビクトリア系統）の抗体価）を測定した。その結果、A/Victoria/210/2009（H3N2）に対して、接種4週後、接種12週後、接種24週後において十全大補湯投与群は漢方薬非投与群に比べて、HI価が高値を示した症例数の増加傾向を認めた（ $p < 0.1$ ）。さらに接種8週後では十全大補湯投与群は漢方薬非投与群に比べて、HI価が高値を示した症例数の有意な増加を認めた（ $p < 0.05$ ）。同様にA/Victoria/210/2009（H3N2）に対するHI価の推移は、4週から24週において十全大補湯投与群が漢方薬非投与群に比べて有意に上昇した（ $p < 0.05$ ）。このことから、十全大補湯はインフルエンザワクチン接種による高齢者のA/Victoria/210/2009（H3N2）に対する抗体産生を増強し、維持することが明らかとなった。

### A. 研究目的

インフルエンザワクチンは、インフルエンザ予防の重要な手段である。現在、これらワクチン療法の効果を増強するために、接種したワクチン抗原に対する特異的な免

疫系を誘導する、いわゆるワクチンアジュバントの開発が国家プロジェクトとして遂行されている。これらワクチンアジュバントに付与すべき機能としては、(1)抗体産生の一過的な増加効果のみが着目されがた

が、将来的には(2)抗体産生の持続効果および(3)副反応の軽減を付与した次世代型のワクチンアジュバントの開発が望まれている。さらに、新型インフルエンザ対策として行われるプレパンデミックワクチンの有用性を高めるためには、接種したワクチン抗原と近似構造の抗原をも認識する(4)交差性抗体群の誘導可能なワクチンアジュバントの開発が必須である。

近年、幾つかの漢方薬にワクチンアジュバントとしての効果が示唆される報告が散見されている。しかしながら、これらの報告は上記(1)に関する検討にとどまっていることが多く、包括的にワクチンアジュバントの付与すべき機能を検討してはいない。

そこで、本検討では、高齢者などのインフルエンザのハイリスクグループに対する漢方薬のインフルエンザワクチンアジュバントとしての可能性を(1)から(4)の項目を中心として多面的に解析し、多施設において漢方薬非投与症例と比較検討する。昨年度の短期効果の結果をもとに、被検薬として十全大補湯を用い、6ヶ月の長期間にわたり、インフルエンザワクチンの抗体産生に及ぼす影響を検討する。

## B. 研究方法

1) 対象は千葉県、群馬県、富山県の長期療養型病床 4 施設に入院中の患者でインフルエンザワクチン接種予定者 91 名。対象者は 65 才以上で、重篤な担癌患者・感染症患者、全身状態の著しく悪化している患者は除外した。

2) 参加者を割り付けソフトにより無作為に十全大補湯投与群(一日量 7.5g/日をワクチン接種 4 週間前から内服開始)と漢方薬非投与群の 2 群に分け、28 週間経過観察した。インフルエンザワクチン接種 4 週前、接種時、接種後 4 週、8 週、12 週、24 週に各調査項目を測定し、十全大補湯投与群と漢方

薬非投与群を比較検討した。

3) 調査項目は、年齢、身長、体重、主要疾患、主な合併症、介護度、寝たきり度、日常生活自立度。抗体産生の増加効果の検討のため HI 価 (A/カリフォルニア/7/2009 (H1N1)、A/ビクトリア/210/2009 (H3N2)、B/プリズベン/60/2008 (ビクトリア系統)の抗体価)を測定した。また、副反応に及ぼす影響を検討するため血中 IgE-RIST、血液生化学検査 (WBC, RBC, Hb, Ht, 血小板数, 血液分画, TP, Alb, AST, ALT, LDH, ALP,  $\gamma$  GTP, BUN, Cr, UA, Na, K, Cl, CRP) を実施した。

4) 調査項目は、mean $\pm$ S.D. で表し、インフルエンザワクチン接種後の各時点での群間比較は Cochran-Armitage trend test を実施し、 $P < 0.05$  を統計学的に有意と判定した。調査期間の 4 週から 24 週における各群間の抗体価の推移の比較には、抗体価を順序データとして (10 倍未満を 0、10 倍を 1、20 倍を 2、40 倍を 3、80 倍を 4、160 倍を 5、320 倍を 6、640 倍を 7、1280 倍を 8 とランク付けした) 変換した後、Nonparametric repeated ANOVA を用いておこない  $P < 0.05$  を有意と判定した。

(倫理面への配慮)

本研究は富山大学倫理委員会の承認を得て実施した。

## C. 研究結果

1) 十全大補湯投与群と漢方薬非投与群の背景因子、脱落例、安全性の検討  
参加者の 1 名が割り付け前に同意を撤回し 90 名が本研究に参加した。参加者は十全大補湯投与群 44 名 (男性 10 名、女性 34 名、平均年齢 85.6 $\pm$ 8.2 才) と漢方薬非投与群 46 名 (男性 11 名、女性 35 名、平均年齢 85.5 $\pm$ 8.3 才) に割り付けられた。両群の背景因

子を表 1 に示した。研究継続できなかつた参加者は、十全大補湯投与群で原疾患の増悪による死亡 1 名、重症化 3 名、同意撤回 1 名、内服拒否 2 名、割付後研究開始までに経口摂取不能となった者 2 名、腸閉塞発症 1 名、脳梗塞発症 1 名、胃もたれ 1 名の 12 名であった。漢方薬非投与群では原疾患の増悪による死亡 1 名、同意撤回 1 名であった。安全性の検討で、血液生化学検査では、感染等によると考えられる白血球増加、CRP 上昇以外に、明らかな異常所見を認めなかつた。また、血中 Ig-E-RIST 値も有意な変化を認めなかつた。自覚症状として十全大補湯の内服による胃もたれの訴えが 1 名認められ、内服中止となった。

2) 十全大補湯投与群と漢方薬非投与群のインフルエンザワクチン接種 4 週前、接種時、接種後 4 週、8 週、12 週、24 週における各 HI 価の症例数の比較

A/ California/7/2009 (H1N1) に対しては、十全大補湯投与群と漢方薬非投与群でインフルエンザワクチン接種後 4 週から接種後 24 週における各 HI 価の症例数に有意な差は認められなかつた (表 2)。A/ Victoria /210/2009 (H3N2) に対して、接種 4 週後、接種 12 週後、接種 24 週後において十全大補湯投与群は漢方薬非投与群に比べて、HI 価が高値を示した症例数の増加傾向を認めた ( $p = 0.0739$ 、 $p = 0.0849$ 、 $p = 0.0895$ )。さらに接種 8 週後では十全大補湯投与群は漢方薬非投与群に比べて、HI 価が高値を示した症例数の有意な増加を認めた ( $p = 0.0229$ ) (表 3)。B/ Brisbane /60/2008 に対しては、十全大補湯投与群と漢方薬非投与群でインフルエンザワクチン接種後 4 週から接種後 24 週における各 HI 価の症例数に有意な差は認められなかつた (表 4)。

3) 十全大補湯投与群と漢方薬非投与群のインフルエンザワクチン接種後から 24 週にお

ける各 HI 価の推移の比較

A/ California/7/2009 (H1N1) に対する HI 価の推移は、十全大補湯投与群と漢方薬非投与群で有意な差は認められなかつた (図 1-(1))。A/ Victoria /210/2009 (H3N2) に対する HI 価の推移は、十全大補湯投与群が漢方薬非投与群に比べて有意に上昇した ( $p = 0.0468$ ) (図 1-(2))。B/ Brisbane /60/2008 に対する HI 価の推移は、十全大補湯投与群と漢方薬非投与群で有意な差は認められなかつた (図 1-(3))。

#### D. 考察

今回我々は、高齢者などのインフルエンザのハイリスクグループに対する漢方薬のインフルエンザワクチンアジュバントとしての可能性を (1) 抗体産生の一過的な増加効果 (2) 抗体産生の持続効果 (3) 副反応の軽減 (4) 交差性抗体群の産生増強効果の項目を中心として多面的に解析し、多施設において漢方薬非投与症例と比較検討した。

昨年度までの本事業において、漢方薬十全大補湯と補中益気湯のインフルエンザワクチン接種後の抗体産生に及ぼす影響を検討した。その結果、接種前抗体価 10 以下で接種後抗体価 40 以上または接種前抗体価に比べて抗体価の上昇率が 4 倍以上を陽転と定義し、十全大補湯投与群、補中益気湯投与群、漢方薬非投与群の陽転率の推移を検討したところ、A/ Victoria /210/2009 (H3N2) に対する陽転率が十全大補湯投与群 46% と漢方薬非投与群 15% に比較して上昇傾向が認められた。このことから、抗体価の低い高齢者のインフルエンザワクチン接種後の抗体価上昇に十全大補湯は、好影響を及ぼしていると考えられた。そこで、本年度はさらに症例数を追加し、十全大補湯を用いたインフルエンザワクチンに対するアジュバント作用の長期効果を検討した。

今回の検討で、十全大補湯の内服により対照群に比較して、インフルエンザワクチ

ン接種後の A/ Victoria /210/2009 (H3N2) に対する HI 価の高値症例が 4 週後から上昇傾向となり、8 週後には有意に上昇した。さらに、24 週後まで上昇傾向は継続した。このことから、十全大補湯にはインフルエンザワクチン接種後の A/ Victoria /210/2009 (H3N2) に対する抗体産生の増強と維持効果があることが明らかになった。これまでの報告では、抗体価が 10 倍未満の高齢者 18 名を 2 群に分け麻黄附子細辛湯をインフルエンザワクチン接種前 7 日から接種後 14 日内服させたところ、ワクチン接種 4 週後の A (H3N2) に対する抗体価が麻黄附子細辛湯内服群で有意に上昇したとの報告がある (岩崎鋼 他、麻黄附子細辛湯が高齢者におけるインフルエンザワクチン接種に及ぼす影響、漢方と免疫・アレルギー 17、97-103、2004)。一方、20-60 才の 36 名の健常男性を 2 群に分け補中益気湯をインフルエンザワクチン接種前 14 日から接種前日まで内服させ、接種 0 週から 12 週の抗体価を測定したところ、補中益気湯投与群と非投与群で差は認められなかったとの報告がある (Hamazaki K. et al., No effect of a traditional Chinese medicine, Hochu-ekki-to, on antibody titer after influenza vaccination in man: A randomized, placebo-controlled, double-blind trial, Phytomedicine 14, 11-14, 2007)。このような漢方薬のインフルエンザワクチンアジュバント効果に関する検討は、使用する漢方薬の種類、投与期間、対象者など種々の影響を受けると考えられる。今回十全大補湯をワクチン接種前 4 週から内服し、ワクチン接種 4 週後で、対照群に比べて抗体価は上昇傾向を示した。今後、どの程度の内服期間がアジュバント効果増強に影響を及ぼすか検討を要する。一方、今回アジュバント効果の認められた十全大補湯は漢方薬の中でも補剤に位置づけられた処方である。保険診療においても、

病後の体力低下、疲労倦怠、食欲不振、貧血などの適応病名を有しており、アジュバント効果のみでなく、高齢者の種々の症状改善に有用でかつ長期投与に適した漢方薬である。安全性に関しては、十全大補湯投与群で脱落者が多く認められたが、これまでの報告を考慮すると十全大補湯の直接的な副作用によるものは胃もたれの一例であると考えられた。

今後、インフルエンザワクチンの抗体産生に関して、基礎研究では十全大補湯の有効成分と作用機序の解明や、臨床研究では適切な投与期間や適応病態の検討を実施していく必要があると考えられる。

#### E. 結論

長期療養型病床群に入院中の高齢者に対して、インフルエンザワクチンに対する十全大補湯のアジュバント効果を検討した。その結果、十全大補湯はインフルエンザワクチン接種による高齢者の A/ Victoria /210/2009 (H3N2) に対する抗体産生を増強し、維持することが明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Waiwut P, Shin MS, Yokoyama S, Saiki I, Sakurai H. Gomisin A enhances tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced G1 cell cycle arrest via signal transducer and activator of transcription 1-mediated phosphorylation of retinoblastoma protein. Biol Pharm Bull. 2012;35(11):1997-2003.
- 2) 小泉桂一、犬嶋明子、大江未来広、柴原直利、済木育夫 トピックス：漢方薬のワクチンアジュバント効果、最新医学、2013、869-873

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 十全大補湯投与群（J群）、十全大補湯非投与群（N群）の背景因子

群	性別		平均年齢 (才)	主要原疾患			介護度				
	男	女		脳血管障害	認知症	骨関節疾患	1	2	3	4	5
J	10	34	85.6±8.2	26	19	6	3	3	6	9	23
N	11	35	85.5±8.3	28	18	8	5	4	4	8	25

(mean±S. D.)

表2 A/ California/7/2009(H1N1)における十全大補湯投与群（J群）と漢方薬非投与群（N群）のインフルエンザワクチン接種4週前、接種時、接種後4週、8週、12週、24週の各HI価の症例数の比較

	各HI価（倍）の症例数								p value
	<10	10	20	40	80	160	320		
<4週前>									
J群 (n=42)	13	12	10	2	4	1	0		
N群 (n=45)	14	11	5	11	4	0	0		
<接種時>									
J群 (n=37)	12	10	9	2	3	1	0		
N群 (n=45)	13	12	5	11	4	0	0		
<4週後>									
J群 (n=36)	3	10	7	7	7	0	2	0.8235	
N群 (n=44)	2	10	12	10	7	3	0		
<8週後>									
J群 (n=34)	2	9	8	7	4	2	2	0.3529	
N群 (n=44)	6	11	7	10	10	0	0		
<12週後>									
J群 (n=33)	8	10	6	4	3	2	0	0.4028	
N群 (n=45)	11	16	6	11	1	0	0		
<24週後>									
J群 (n=31)	3	8	10	4	4	2	0	0.2848	
N群 (n=44)	9	12	5	15	3	0	0		

表3 A/ Victoria /210/2009(H3N2)における十全大補湯投与群 (J群) と漢方薬非投与群 (N群) のインフルエンザワクチン接種4週前、接種時、接種後4週、8週、12週、24週の各HI価の症例数の比較

	各HI価(倍)の症例数									p value
	<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	
<4週前>										
J群 (n=42)	8	11	10	6	4	3	0	0	0	
N群 (n=45)	4	15	15	6	4	1	0	0	0	
<接種時>										
J群 (n=37)	6	11	9	4	4	3	0	0	0	
N群 (n=45)	4	14	16	6	4	1	0	0	0	
<4週後>										
J群 (n=36)	1	8	5	5	8	6	2	0	1	0.0739
N群 (n=44)	1	10	9	18	3	1	1	1	0	
<8週後>										
J群 (n=34)	0	5	6	7	6	5	4	0	1	0.0229
N群 (n=44)	0	7	14	15	5	1	1	0	1	
<12週後>										
J群 (n=33)	1	8	5	7	7	3	1	0	1	0.0849
N群 (n=45)	2	15	8	14	4	0	1	0	1	
<24週後>										
J群 (n=31)	0	8	5	8	6	2	1	0	1	0.0895
N群 (n=44)	1	13	12	12	4	1	0	0	1	

表4 B/ Brisbane /60/2008 における十全大補湯投与群 (J群) と漢方薬非投与群 (N群) のインフルエンザワクチン接種4週前、接種時、接種後4週、8週、12週、24週の各HI価の症例数の比較

	各HI価(倍)の症例数						p value
	<10	10	20	40	80	160	
<b>&lt;4週前&gt;</b>							
J群 (n=42)	12	17	5	6	2	0	
N群 (n=45)	10	23	4	7	0	1	
<b>&lt;接種時&gt;</b>							
J群 (n=37)	11	15	5	4	2	0	
N群 (n=45)	10	20	8	6	0	1	
<b>&lt;4週後&gt;</b>							
J群 (n=36)	4	19	10	3	0	0	0.2576
N群 (n=44)	9	21	13	1	0	0	
<b>&lt;8週後&gt;</b>							
J群 (n=34)	7	15	8	3	1	0	0.4411
N群 (n=44)	13	19	8	3	0	1	
<b>&lt;12週後&gt;</b>							
J群 (n=33)	3	17	8	4	1	0	0.2610
N群 (n=45)	3	32	6	3	1	0	
<b>&lt;24週後&gt;</b>							
J群 (n=31)	1	16	13	1	0	0	0.6710
N群 (n=44)	1	28	13	1	1	0	

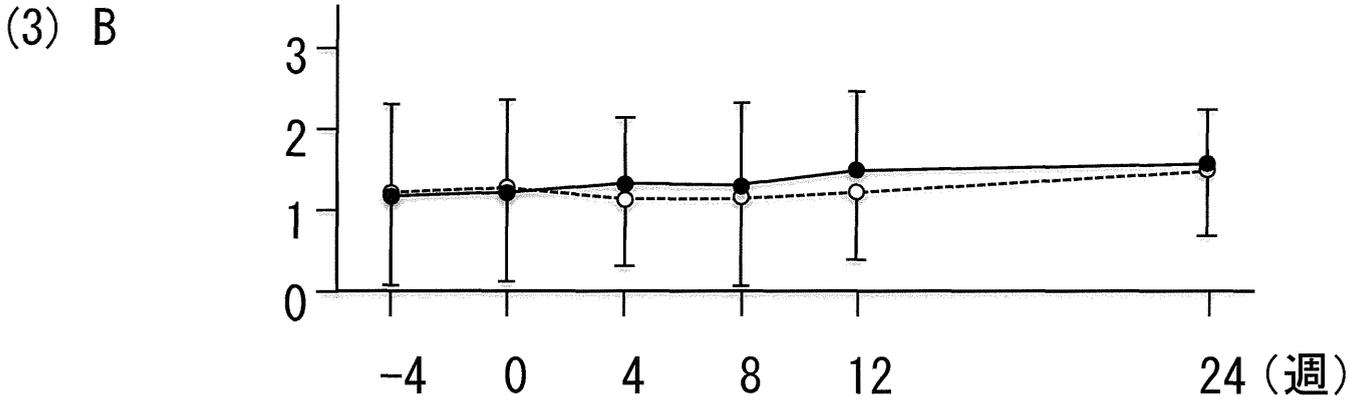
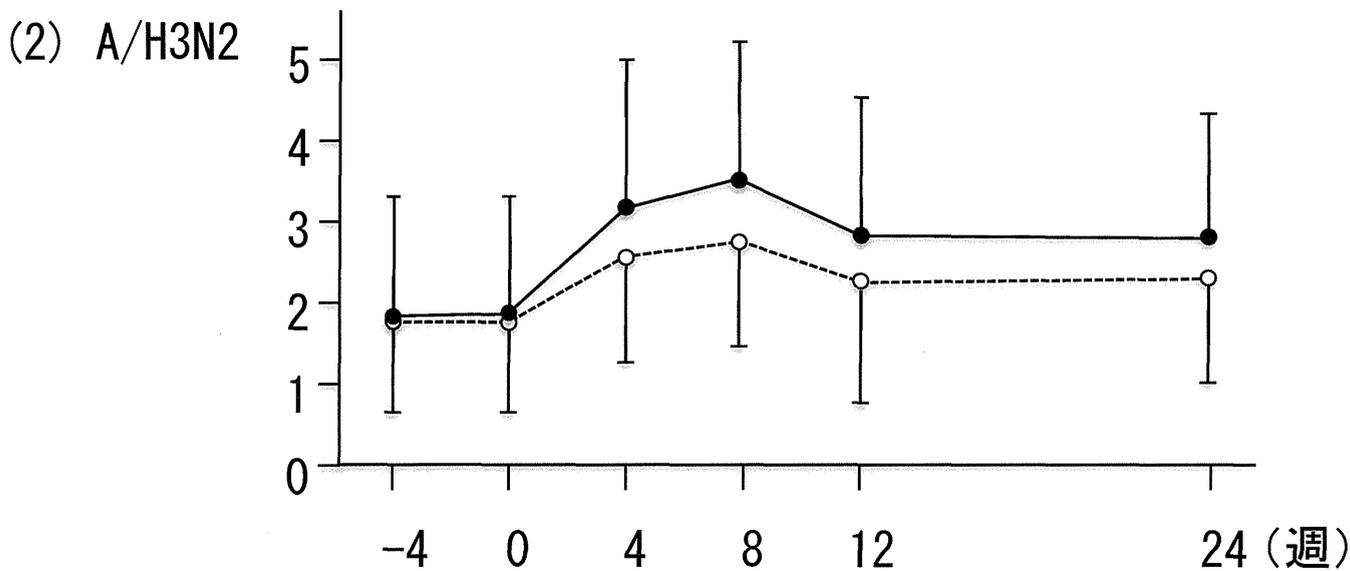
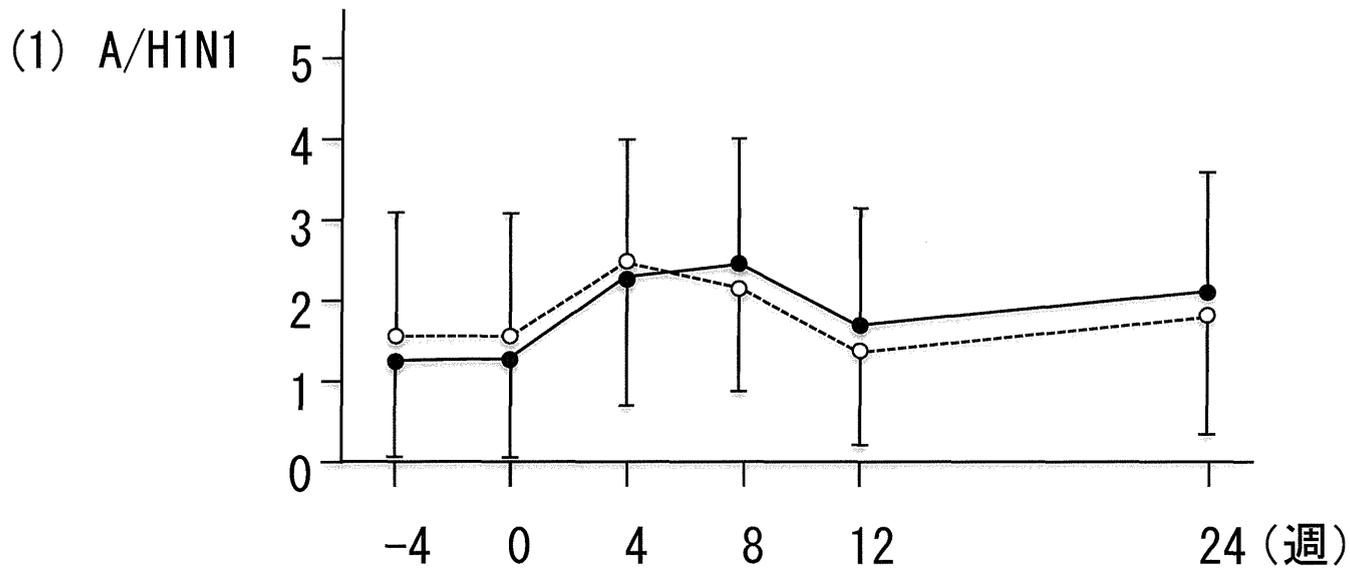


図1 十全大補湯投与群 (●) と漢方薬非投与群 (○) のインフルエンザワクチン接種後から24週における各HI価の推移の比較  
 (抗体価を順序データとして変換し、mean±S.D. で表示)

## 尿路感染症患者における尿中サイトカインに及ぼす抗生剤と漢方薬の比較検討

研究分担者 後藤 博三 医療法人 北聖病院 漢方内科部長

### 研究要旨

尿中サイトカインは尿路感染時に尿路局所で産生され、尿路における局所免疫として、生体防御に関与しているといわれている。そこで、今回我々は、漢方薬投与前後の尿中サイトカインを検討し、尿路感染に対する漢方薬の作用機序の検討を試みた。対象は尿路感染を繰り返す高齢慢性膀胱炎患者 10 名（平均年齢 84.6±8.3 才）。薬物の投与に関してはクロスオーバーデザインとし、膀胱炎症状増悪時に 1 日あたり猪苓湯 7.5g を分 3 かミノマイシン 100mg を分 1 で 7 日間投与し、その後 1 ヶ月以上間隔を開けて、再度膀胱炎症状が増悪した時点で前回と異なる薬剤を投与した。調査項目は各薬剤の投与前後に尿を採取し、尿中の IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 と尿中白血球数を測定した。結果は猪苓湯投与前後で IL-1 $\beta$  が減少傾向 ( $p<0.1$ ) を示した。IL-6 と IL-8 は有意な変化を認めなかった。尿中の白血球数は投与前に比べて 4 例が減少した。ミノマイシン投与前後で IL-8 は有意な減少 ( $p<0.01$ ) を認め、IL-1 $\beta$  は減少傾向 ( $p<0.1$ ) を示し、IL-6 は有意な変化を認めなかった。尿中の白血球数は投与前に比べて 8 例が減少した。今回の検討で、両薬剤とも炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  の減少傾向を認めた。しかし、ミノマイシン投与時には有意に低下した IL-8 は猪苓湯投与前後で変化なく、猪苓湯は抗生剤による抗菌作用と異なる機序で炎症を改善している可能性が示唆された。今後、作用機序の解明が必要であるが、膀胱炎に抗生剤が多用され、耐性菌の蔓延が憂慮される高齢慢性膀胱炎患者に対して、猪苓湯は有効な治療薬となりうると考えられた。

### A. 研究目的

長期臥床患者はしばしば尿路感染症を繰り返し、栄養摂取の障害や敗血症により全身状態の悪化の一因となっている。一方、尿路感染時には尿中の IL-6 や IL-8 などのサイトカインが上昇することが報告されている。これら因子は、尿路感染時に尿路局所で産生され、尿路における局所免疫として、生体防御に関与していることが示唆されている。そこで、今回我々は、漢方薬投

与前後の尿中サイトカインを検討し、抗生剤投与時と比較検討することで、尿路感染に対する漢方薬の作用機序の検討を試みる。

### B. 研究方法

対象は当院入院中の尿路感染を繰り返す慢性膀胱炎患者 10 名。対象者は 65 才以上で、重篤な担癌患者・感染症患者、全身状態の著しく悪化している患者は除外した。薬物の投与に関してはクロスオーバーデザ

インとし、対象者を無作為に2群に分け、微熱や尿混濁などの膀胱炎症状の悪化を認めた時点で、各群に1日あたり猪苓湯7.5gを分3かミノマイシン100mgを分1で7日間投与した。その後1ヶ月以上間隔を開けて、再度膀胱炎症状が増悪した時点で前回猪苓湯の投与者にはミノマイシンを投与し、ミノマイシンの投与者には猪苓湯を初回と同用量投与した。調査項目は薬剤の投与前後に尿を採取し、尿中のIL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8と尿中白血球数を測定した。尿中IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8はEIA法で測定しmean $\pm$ S.D.で表し、猪苓湯投与前後とミノマイシン投与前後で比較検討した。投与前後の比較にはpaired t-testを用いておこないP<0.05を有意と判定した。群間の比較には分散分析を使用した。

(倫理面への配慮)

本研究は当院倫理委員会の承認を得て実施した。

#### C. 研究結果

参加者は男性5名、女性5名で平均年齢84.6 $\pm$ 8.3才であった。経過中1例が原疾患の悪化のため抗生剤の投与ができず、猪苓湯投与群10名、ミノマイシン投与群9名が解析対象となった。

猪苓湯投与前後で、IL-1 $\beta$ は330.9 $\pm$ 578.9 pg/mlから183.0 $\pm$ 412.6 pg/mlと減少傾向(p=0.073)を示した。IL-6は11.75 $\pm$ 8.22 pg/mlから7.74 $\pm$ 6.10 pg/ml、IL-8は1759.5 $\pm$ 2037.7 pg/mlから1888.5 $\pm$ 2287.8 pg/mlと有意な変化を認めなかった。尿中の白血球数は、投与前に比べて減少例が4例、変化無しが3例、上昇例が3例であった。

ミノマイシン投与前後でIL-8は3615.1 $\pm$ 905.9 pg/mlから1935.0 $\pm$ 940.3 pg/mlと有意な減少(p=0.0099)を認めた。IL-1 $\beta$ は113.9 $\pm$ 93.9 pg/mlから42.7 $\pm$ 46.5

pg/mlと減少傾向(p=0.097)を示し、IL-6は11.8 $\pm$ 6.6 pg/mlから8.0 $\pm$ 4.55 pg/mlと有意な変化を認めなかった。尿中の白血球数は、投与前に比べて減少例が8例、変化無しが1例であった。いずれの項目も両群間では差を認めなかった(図)。

#### D. 考察

今回の検討では、猪苓湯投与時に尿中のIL-1 $\beta$ が減少傾向を示し、IL-6、IL-8に変化を認めず、尿中白血球数の減少も10例中4例にのみ認められた。一方、ミノマイシン投与時には、尿中のIL-1 $\beta$ が減少傾向を示し、IL-8は有意に減少し、尿中白血球数は9例中8例で認められた。IL-1 $\beta$ は主にマクロファージ系の細胞から産生される代表的な炎症性サイトカインである。尿中のIL-1 $\beta$ が低下傾向を示したことから、猪苓湯とミノマイシンともに尿路感染症に対して抗炎症的に作用した可能性が示唆される。また、これまで尿路感染患者の尿中にはIL-6、IL-8等のサイトカインが高濃度に検出されることが報告されている。なかでも、尿中IL-8濃度と尿中白血球数とは高い相関が得られ、IL-8が尿路感染症の最も大きな防御機構の一つである白血球遊出に重要な意義を有していると考えられている。今回の検討で、ミノマイシン投与時にIL-8が有意に投与前後で低下した。その機序として、ミノマイシンの抗菌作用により炎症が改善しIL-8の誘導が減少し、尿中への白血球遊走が抑制されたことが考えられる。一方、猪苓湯ではIL-8の変化は認めなかったことから、抗生剤による抗菌作用と異なる機序で炎症を改善している可能性が示唆された。今後、作用機序の解明が必要であるが、膀胱炎に抗生剤が多用され、耐性菌の蔓延が憂慮される高齢慢性膀胱炎患者に対して、猪苓湯は有効な治療薬となりうると考えられた。

#### E. 結論

高齢慢性膀胱炎患者に猪苓湯を投与したところ尿中の炎症性サイトカインの減少傾向を認めた。しかし、ミノマイシン投与時とは異なるサイトカインの変動を認め、猪苓湯の膀胱炎に対する効果は抗生物質による抗菌作用とは異なる作用機序の関与が示唆された。

#### F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許出願

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし