

総 説

生体防御因子群の分泌を促進する塩酸アンブロキシソールの抗インフルエンザ効果

西川 舞, Bing Yang, 井手 美喜子, 奥村 裕司, 木戸 博

徳島大学分子酵素学研究センター酵素分子化学部門

(平成14年5月13日受付)

(平成14年5月16日受理)

インフルエンザウイルスの感染性は、感染力の発現に必要な生体内プロテアーゼ群（危険因子）と感染防御に関わる物質群（生体防御因子）のバランスによって決定されていることが明らかとなってきた。最近我々は、去痰剤として古くから使用されてきた塩酸アンブロキシソールが、上気道の粘膜プロテアーゼインヒビターや下気道の肺サーファクタント、さらに IgA, IgG などの生体防御因子群の分泌を増加させることによって気道内でのインフルエンザウイルスの増殖を抑制し、抗インフルエンザ効果を発揮することを明らかにした。今後、様々な感染症の治療と予防へ、塩酸アンブロキシソールなどの生体防御因子分泌促進剤の応用が期待される。

1. はじめに

ウイルス遺伝子の変異により、小流行と大流行を繰り返すインフルエンザ感染症は、世界における年間の感染症死亡例約1700万人のトップに位置し、病状が重篤化しやすい幼児や高齢者、慢性疾患の患者といったハイリスク者にとって最も危険な感染症である。またこれらハイリスク者は、現在我が国だけでもおよそ2000万人以上に上り、全人口に占める率も増加の一途を辿っている。そのため、インフルエンザの罹患または罹患による病状の重篤化を防ぐには、あらかじめワクチン接種等により個人の免疫応答を誘導・強化しておく必要がある。

一般に、インフルエンザウイルスに対する感染感受性は個体差が大きく、その違いは、インフルエンザ感染における生体内リスク因子（感染を促進する因子）と生体内防御因子（感染を抑制する因子）のバランスに依存することが我々の研究から明らかになってきた¹⁾。一般にヒトの体内ではリスク因子が優位なために、ウイルスは

気道に感染して増殖する。具体的な生体側の感染リスク因子として3種類のトリプシン型セリンプロテアーゼがこれまでに同定され、感染防御因子として酵素阻害物質や肺サーファクタントが同定されてきた。以上の背景から両因子のバランスを制御する物質に対する関心が高まり薬剤の検索が行われた。最近我々は、従来去痰薬として使用されてきた塩酸アンブロキシソールが生体内防御物質の分泌を促進して、抗インフルエンザ効果を示すことを見出した²⁾。

2. 生体内感染リスク因子

インフルエンザウイルスが感染性を獲得するためには、生体内のトリプシン型プロテアーゼによるウイルス外膜糖タンパク質（ヘマグルチニン：HA）が限定分解され、膜融合活性が発現する必要がある^{1,3,6)}。つまり、この限定分解により、HA分子の切断端に新たに出現した疎水性領域を介してウイルス膜と細胞膜との融合が起こり、感染が成立する。このような限定分解に携わる生体内プロテアーゼとして、これまでに、呼吸気管支および終末気管支に局在するトリプターゼクララ⁷⁾や、細気管支に局在するミニプラスミン⁸⁾が知られていたが、更に最近の研究から、肺胞上皮下層に局在する異所性アニオニックトリプシン⁹⁾もウイルスの肺への感染、肺炎などの感染増悪に関与していることが明らかとなった。これらのウイルス感染活性化プロテアーゼ群は、様々なウイルス株に対してそれぞれ親和性を異にしており、ウイルスが感染する細胞や臓器トロピズムを決定する因子と考えられる。

3. 生体内感染防御因子

先に挙げた生体内プロテアーゼがインフルエンザウイルスの感染リスク因子であるならば、これらプロテアーゼに対するインヒビターや、ウイルス活性を中和する抗体 (IgA, IgG) などは、感染防御因子に位置付けられる。例えば、涙液や唾液中等など主に上気道からの分泌が認められる mucous protease inhibitor (MPI) は、感染リスク因子であるトリプターゼクララの活性を直接阻害するだけでなく、エラスターゼ活性を阻害することによりミニプラスミンの形成を阻害し、インフルエンザウイルスの活性化を抑制していると考えられている¹⁰⁾。また、肺胞や終末細気管支周辺の粘液中に含まれ、レクチン作用を有する蛋白質を含む肺サーファクタントは、トリプターゼクララを吸着して抗ウイルス効果を発揮することが明らかとなっている¹¹⁾。

4. 塩酸アンブロキシソール

インフルエンザ感染の生体防御因子である MPI や肺サーファクタントの分泌量を促進する薬物として、従来去痰薬として使用されている塩酸アンブロキシソール (図1) が効果を示すことを、最近我々は明らかにすることができた²⁾。通常、インフルエンザウイルスを経鼻感染させたマウスでは、ヒトと同様感染 2 ~ 3 日目から肺に炎症巣が現れ、増悪に伴ってその肺は肝臓様に変化し、

肺の呼吸面積がほとんど消失して死亡する。しかし、塩酸アンブロキシソールを 1 日投与量として 10mg/kg を腹腔内に投与したマウスでは、著明な炎症の軽減と、ウイルスの増殖抑制効果が観察された。その結果、図 2 で示すように、塩酸アンブロキシソール未投与のマウスではインフルエンザ感染後 9 日目まで全てが死亡したのに対して、塩酸アンブロキシソールを腹腔内に投与したマウスでは、10mg/kg/day をピークに約半数のマウスが生存し、10mg/kg/day 以上の投与では逆にウイルス感染抑制効果は減少し、ベル型の致死率抑制効果を示した。この効果の原因を解明するため、3 週齢の離乳期マウスに 6.6×10^4 plaque forming units (PFU) のインフルエンザウイルスを経鼻感染させた後、塩酸アンブロキシソールを 1 日 2 回腹腔内に投与 (1 日量 10 及び 30mg/kg) して、気管支洗浄液 (3 ml) 中の感染防御因子群の量を測定した。

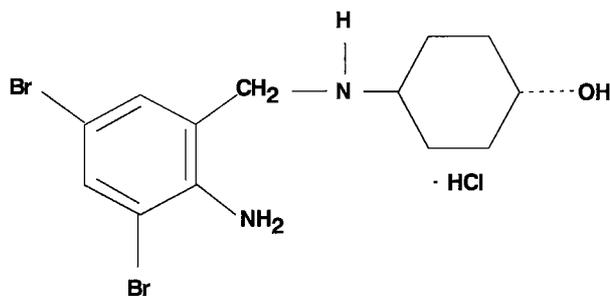


図1 塩酸アンブロキシソール
肺表面活性物質分泌促進作用、気道液分泌促進作用及び繊毛運動亢進作用を有し、喀痰の咯出を促進することが知られている。

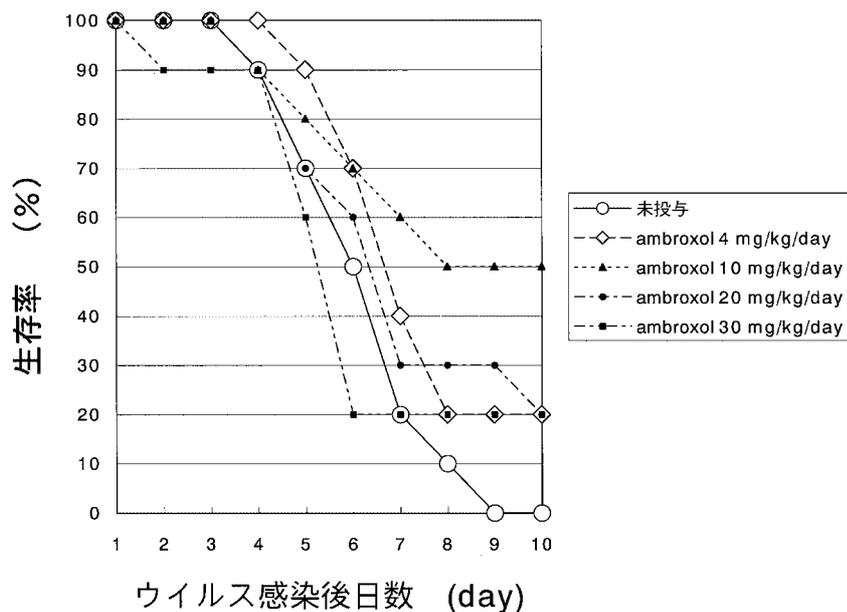


図2 インフルエンザ感染マウスの致死率に対する塩酸アンブロキシソールの抑制効果。
各群 (10匹) に 6.6×10^4 plaque forming units (PFU) のインフルエンザウイルスを経鼻感染させ、塩酸アンブロキシソールを 1 日 2 回腹腔内に投与し、生存率を測定した。なお、塩酸アンブロキシソール量は 1 日の総量を示す。

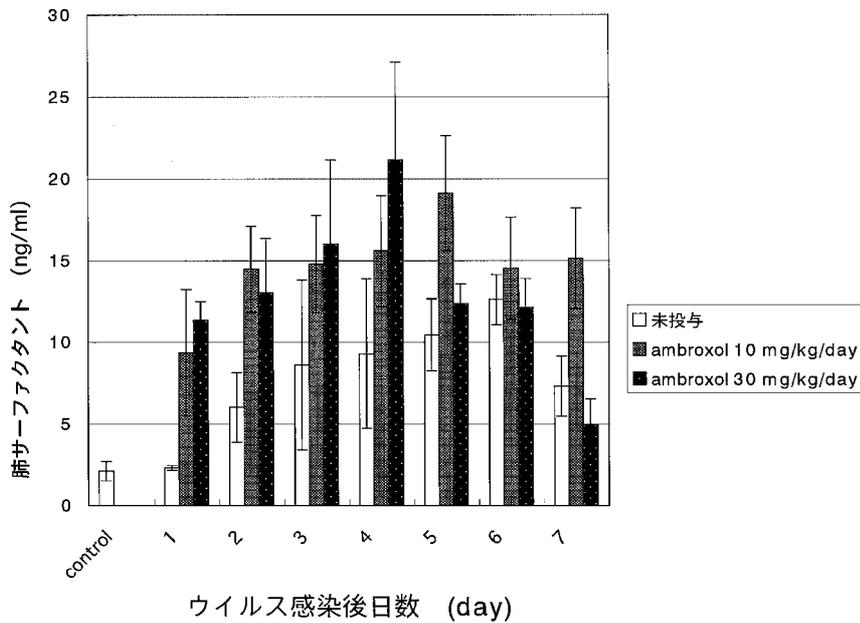


図3 肺サーファクタント分泌に対する塩酸アンブロキシソールの促進作用。3週齢の離乳期マウスに 6.6×10^4 plaque forming units (PFU)のインフルエンザウイルスを経鼻感染させた後、塩酸アンブロキシソールを1日2回腹腔内に投与(1日量10及び30mg/kg)して、気管支洗浄液(3ml)中の肺サーファクタントプロテインA量を測定した。

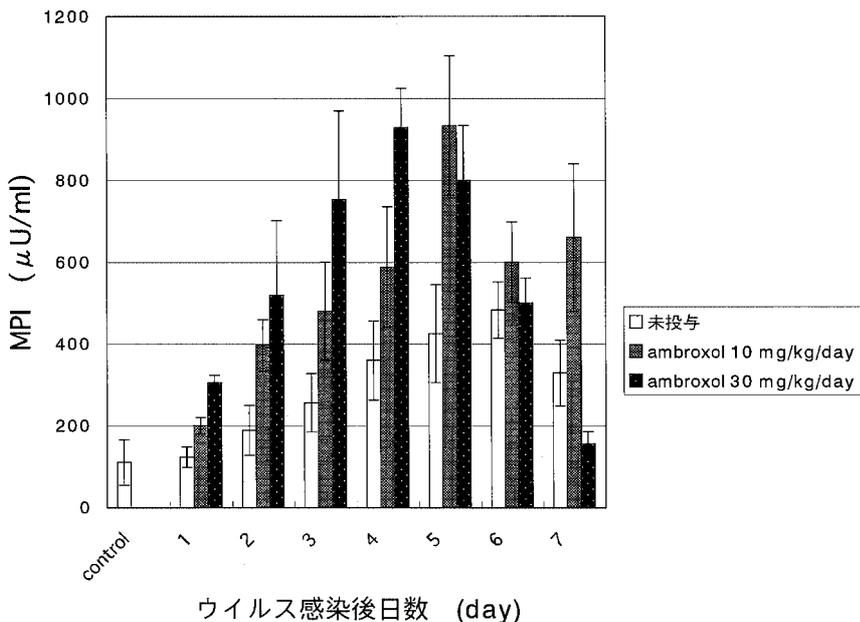


図4 MPI分泌に対する塩酸アンブロキシソールの促進作用。3週齢の離乳期マウスに 6.6×10^4 plaque forming units (PFU)のインフルエンザウイルスを経鼻感染させた後、塩酸アンブロキシソールを1日2回腹腔内に投与(1日量10及び30mg/kg)して、気管支洗浄液(3ml)中のMPI量を測定した。

図3で示すように、塩酸アンブロキシソール投与群では、極めて早期の24時間頃から肺サーファクタントの分泌量に著明な増加が認められ、5日目まで高値を維持した。しかしながら、10mg/kg/day投与群と30mg/kg/day投与群を比較した場合、10mg/kg/day投与群が感染後7日間、肺サーファクタントの分泌量を高値に維持できたのに対し、30mg/kg/day投与群ではその効果は維持できず、むしろ感染5日目以降、分泌量は次第に減少した。また図4で示すように、塩酸アンブロキシソールは、気管支洗浄

液中のMPI量も増加させた。塩酸アンブロキシソールによる肺サーファクタントの分泌増加が投与直後の早期から顕著であったのに対し、MPI量の増加は後半期に著明であった。この場合も肺サーファクタントに対する効果と同様、10mg/kg/day投与群でその効果は高く、30mg/kg/day投与群では気道分泌液中のMPI量を高いレベルで維持することはできなかった。更に興味深いことに、塩酸アンブロキシソールの投与は、粘膜免疫を担うIgA量の増加も促すことが明らかとなった(図5)。この効

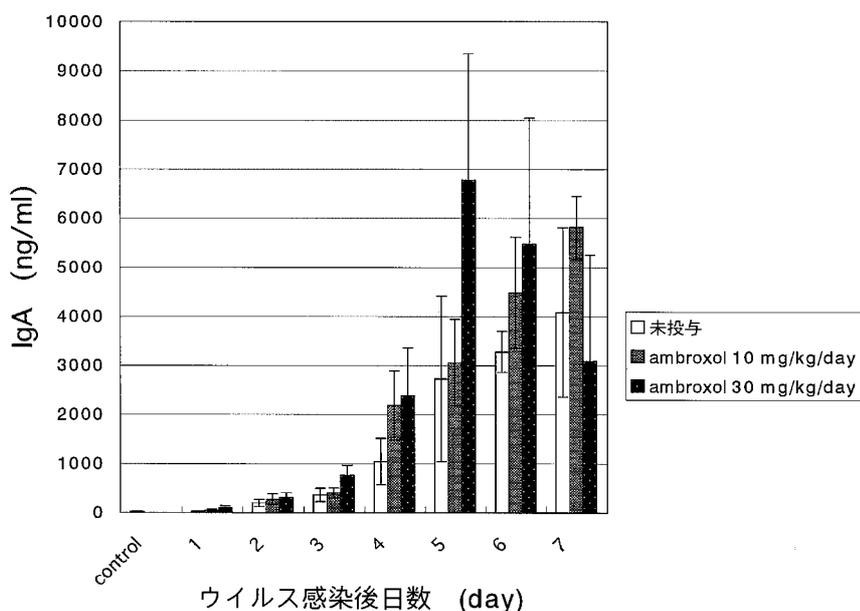


図5 塩酸アンブロキシソールのIgA分泌促進作用。
3週齢のマウスに 6.6×10^6 plaque forming units (PFU)のインフルエンザウイルスを経鼻感染させた後、塩酸アンブロキシソールを1日2回腹腔内に投与(1日量10及び30mg/kg)して、気管支洗浄液(3ml)中の粘膜型IgA量を測定した。

果は特に投与開始5日目以後の後期で顕著であった。以上の結果から、塩酸アンブロキシソールは感染防御因子の合成よりはむしろ、分泌の増加に関与し、過剰の塩酸アンブロキシソールの投与は細胞内の分泌顆粒や感染防御因子の枯渇を引き起こすと推定された。今回の実験で、塩酸アンブロキシソールがウイルス活性化プロテアーゼの活性阻害物質以外に、粘膜型IgAの分泌を促進していることが観察されたが、IgAは比較的抗原認識の特異性が低くどのようなタイプのインフルエンザウイルスに対しても中和活性を示す傾向にあるため、抗原認識特異性の高いIgGよりも、有効なワクチン増強効果が得られるものと考えられる。

5. おわりに

現在も広く去痰薬として使用されている塩酸アンブロキシソールは、それ自身がウイルスの増殖を阻害するわけではないが、肺サーファクタント、MPI、IgAをはじめとする防御因子の気道への分泌を促進し、生体を防御因子優位に傾けることで、抗インフルエンザ作用を示すことが明らかとなった。今後、塩酸アンブロキシソールの分子レベルでの作用機構が解明されることにより、抗インフルエンザ作用増強剤またはワクチン増強剤としての開発・応用が期待される。

文 献

- 1) Kido, H., Murakami, M., Oba, K., Chen, Y., *et al* : Cellular Proteinases Trigger the Infectivity of the Influenza A and Sendai Viruses. *Mol. Cells*, 9(3), 235-244, 1999
- 2) Yang, B., Yao, D.F., Ohuchi, M., Ide, M., *et al* : Ambroxol suppresses Influenza-virus proliferation in the mouse airway by increasing antiviral factor levels. *Eur. Respir. J.*, 19 : 1-7, 2002
- 3) Homma, M., Ohuchi, M. : Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells ; Structural difference of Sendai virus grown in eggs and tissue culture cells. *J. Virol.*, 12 : 1457-1465, 1973
- 4) Nagai, Y., Klenk, H. D., Rott, R. : Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology*, 72 : 494-508, 1976
- 5) Klenk, H. D., Rott, R. : The molecular biology of influenza virus pathogenicity. *Adv. Virus Res.*, 34 : 247-281, 1988
- 6) Klenk, H. D., Garten, W. : Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends. Microbiol.*, 2 : 39-43, 1994
- 7) Kido, H., Yokogoshi, Y., Sakai, K., Tashiro, M., *et al.* : Isolation and characterization of a novel trypsin-like

- protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells : A possible activator of the viral fusion glycoprotein. J. Biol. Chem., 267 : 13573-13579, 1992
- 8) Murakami, M., Towatari, T., Ohuchi, M., Shiota, M., *et al.* : Mini-plasmin found in the epithelial cells of bronchioles triggers infection by broad-spectrum influenza A viruses and Sendai virus. Eur. J. Biochem., 268 : 2847-2855, 2001
- 9) Towatari, T., Ide, M., Ohoba, K., Yamada, H. *et al.* : Identification of ectopic anionic trypsin I in rat lungs potentiating pneumotropic virus infectivity and increased enzyme level after virus infection. Eur. J. Biochem., 2002 (in press.)
- 10) Beppu, Y., Imamura, Y., Tashiro, M., Towatari, T., *et al.* : Human mucus protease inhibitor in airway fluids is a potential defensive compound against infection with influenza A and Sendai virus. J. Biochem., 121 : 309-316, 1997
- 11) Kido, H., Sakai, K., Kishino, Y., Tashiro, M., *et al.* : Pulmonary surfactant is potential endogenous inhibitor of proteolytic activation of Sendai virus and influenza A virus. FEBS Lett., 322 : 115-119, 1993

Ambroxol suppresses influenza virus multiplication in the airway by increasing antiviral factor levels

Mai Nishikawa, Bing Yang, Mikiko Ide, Yuushi Okumura and Hiroshi Kido

Division of Enzyme Chemistry, Institute for Enzyme Research, The University of Tokushima, Tokushima

SUMMARY

Ambroxol, known as a mucolytic agent, has been used for the treatment of chronic bronchitis and neonatal respiratory distress syndrome. Furthermore, ambroxol exhibits antioxidant and anti-inflammatory properties with reduction of the release of inflammatory cytokines. However, little is known about the pharmacological effect of ambroxol on influenza-virus infection *in vivo*. In this study, the protective effect of ambroxol against influenza-virus multiplication in the airway was investigated in mice. Ambroxol or the vehicle was administered intraperitoneally twice a day for 5-7 days to mice shortly after intranasal infection with a lethal dose of influenza A/Aichi/68 (H3N2) virus, and the survival rate and levels of factors regulating virus multiplication in the airway fluid were analyzed. Ambroxol significantly suppressed virus multiplication and improved the survival rate of mice. Moreover, ambroxol stimulate the suppressors of influenza-virus multiplication, such as pulmonary surfactant, mucus protease inhibitor and IgA. These findings suggest that the effect of ambroxol on influenza-virus infection may result from the up-regulation of the suppressors. In this review, we discussed the effects of ambroxol on prevention and treatment of influenza virus infection.

Key words : influenza virus, ambroxol, pulmonary surfactant, trypsin, mucus protease inhibitor