

原著論文

## 生薬センソ及びその含有成分ブファリンと ガマブフォタリンの C 型肝炎ウイルスと デングウイルスに対する抗ウイルス活性

堀 田 博<sup>\*1</sup>・鞠 千 恵<sup>\*2</sup>・西 本 幸 子<sup>\*1</sup>  
増 井 涼<sup>\*3</sup>・杉 本 智 潮<sup>\*3</sup>・清 水 康 晴<sup>\*3</sup>  
須 藤 慶 一<sup>\*3</sup>・河 上 仁 美<sup>\*4</sup>・瀧 野 裕 之<sup>\*4</sup>  
川 原 信 夫<sup>\*4, 5</sup>

### Antiviral Activity of Toad Cake and Its Compounds Bufalin and Gamabufotalin against Hepatitis C Virus and Dengue Virus

HOTTA Haku, UTSUBO Chie, NISHIMOTO Sachiko, MASUI Ryo,  
SUGIMOTO Chishio, SHIMIZU Yasuharu, SUDO Keiichi, KAWAKAMI Hitomi,  
FUCHINO Hiroyuki and KAWAHARA Nobuo

#### Abstract :

**Purposes** : The purpose of this study was to investigate antiviral activity of crude drug extracts from toad cake and its compounds, thereby aiming to help develop a new antiviral drug candidate.

**Methods** : Extracts obtained from toad cake by using liquid-liquid extraction with various solvents and its low-molecular-weight compounds isolated by using preparative high performance liquid chromatography (Prep-HPLC) were tested for antiviral activity against hepatitis C virus (HCV) and dengue virus (DENV).

**Results** : A methanol-extract and an ethyl acetate-extract from toad cake showed strong antiviral activity against HCV and DENV. Bufadienolides, called cardiac glycosides, were isolated from the extracts by using Prep-HPLC. Among the isolated bufadienolides, bufalin and gamabufotalin showed the strongest antiviral activity against HCV and DENV. Both compounds inhibited HCV and DENV replication at the post-entry step, with their cytotoxicity being marginal.

**Conclusion** : Bufalin and gamabufotalin showed strong antiviral activity against HCV and DENV with marginal cytotoxicity. We propose that they can be a good candidate for a lead compound to develop an antiviral drug(s) against HCV and DENV.

**Key Words** : Toad cake, Bufalin, Gamabufotalin, Antiviral activity, Hepatitis C virus, Dengue virus

#### 要約 :

目的 : 生薬センソ及びその成分の抗ウイルス活性を解析し, 抗ウイルス薬開発に資することを目的と

\*1 甲南女子大学医療栄養学部医療栄養学科

\*2 神戸大学大学院保健学研究科

\*3 救心製薬株式会社東京研究所

\*4 医薬基盤・健康・栄養研究所薬用植物資源研究センター

\*5 高知県立牧野植物園

した。

**方法：**生薬センソから、各種の溶媒を用いた液液抽出により抽出物を得て、さらに分取高速液体クロマトグラフィー等を用いて、その抽出物から低分子化合物を単離した。それらの試料について、C型肝炎ウイルス(HCV)及びデングウイルス(DENV)に対する抗ウイルス活性を測定した。

**結果：**センソの熱メタノール抽出物と酢酸エチル抽出物はHCV及びDENVに対して強い抗ウイルス活性を示した。また、その抽出物から、強心配糖体に属する7種類のブファジエノライド化合物を単離した。なかでも、ブファリンとガマブフォタリンは最も強い抗HCV活性( $IC_{50} \leq 0.025 \mu\text{g/ml}$ )と抗DENV活性( $IC_{50} \leq 0.025 \mu\text{g/ml}$ )を示した。それらの抗ウイルス物質は、HCVやDENVの感染性粒子を直接中和するのではなく、HCVやDENVが細胞に吸着・侵入した後の増殖過程を阻害した。一方、ブファリンとガマブフォタリンの50%細胞障害活性は抗ウイルス活性より著しく弱く( $CC_{50} > 5.76 \mu\text{g/ml}$ と $> 6.43 \mu\text{g/ml}$ )、良好な選択指数( $SI > 178.6$ )を示した。

**結論：**ブファジエノライドのうち、ブファリンとガマブフォタリンは強い抗HCV活性及び抗DENV活性を有することを明らかにした。ブファジエノライドの構造と機能を考察し、新規抗ウイルス薬開発の可能性を提唱した。

**キーワード：**センソ, ブファリン, ガマブフォタリン, 抗ウイルス活性, C型肝炎ウイルス, デングウイルス

## I. はじめに

C型肝炎ウイルス(HCV)は、フラビウイルス科ヘパシウイルス属に属するRNAウイルスで、ウイルス遺伝子の多様性に基づいて7種類の遺伝子型(1型~7型)に分けられる<sup>1)</sup>。HCVは主に血液を介して感染する。HCVに感染すると、約20%~30%の症例で一過性感染(急性肝炎または不顕性感染)を引き起こし、数ヶ月以内に治癒する。一方、残りの約70%~80%の症例では長期間にわたる持続感染を引き起こす。当初はほとんど症状がないか軽度の慢性肝炎のことが多いが、徐々に進行して肝硬変や原発性肝細胞癌を引き起こす。また、HCV感染が2型糖尿病発症の誘因のひとつであることも明らかになっている<sup>2)</sup>。HCV感染者は我が国に約100万人と推定されており、毎年約3万人がHCVによる肝硬変や原発性肝細胞癌で死亡している。世界全体では、HCV感染者は約1億7000万人と推定されている。C型慢性肝炎の治療は、近年の直接作用型抗ウイルス薬(DAA)の登場により、高い治療効果が期待できるようになったが、高薬価、治療に伴う薬剤耐性株の出現、特定の遺伝子型ウイルスに特有の薬剤耐性等の理由から、安全・安価で

効果的な治療薬のさらなる開発が求められている。

デングウイルス(DENV)は、フラビウイルス科フラビウイルス属に属するRNAウイルスで、ウイルス抗原性の違いに基づいて4種類の血清型(1型~4型)に分けられる<sup>3)</sup>。DENVは感染蚊(ネッタイシマカ、ヒトスジシマカ等)に刺咬されることによって感染する。不顕性感染のこともあるが、典型的な症状を伴うものをデング熱と呼ぶ。感染蚊の刺咬後2~15日の潜伏期の後に突然の高熱で発症し、頭痛、眼窩痛、顔面紅潮、結膜充血を伴い、発熱は2~7日間持続する(二峰性であることが多い)。初期症状に続き、全身の筋肉痛、骨関節痛、全身倦怠感を呈する。発症後3~4日で胸部、体幹から始まる発疹が出現し、四肢、顔面に広がる。症状は1週間程度で回復する。しかし、一部の患者において、2~7日間の発熱の後に重症化し、血小板減少による出血傾向と血漿漏出による血圧低下(ショック)を主な症状とする致死性病態が出現することがある。これらは、デング出血熱あるいはデングショック症候群と呼ばれる。デングウイルスの伝播は蚊が多く生息する熱帯地域に多く、症状のあるデング熱患者の発生は世界中で毎年5000万~1億人、デング出血熱患者は年間25万~50万人と推定さ

れ、年間 1 万～2 万人が死亡している。DENV に対する有効な抗ウイルス治療薬は未だ開発されていない。

薬用植物等の天然物の抽出液やそれに含まれる低分子化合物が様々なウイルスに対して抗ウイルス作用を示すことが知られており、我々もこれまでに、抗 HCV 作用を示す薬用植物抽出液や低分子化合物の同定を行ってきた<sup>4)</sup>。薬用植物以外に、動物由来の物質も、人類にとって有用な天然資源として知られている。なかでも、動物生薬は動物の一部の組織あるいは全体を用いた生薬で、その数は少ないものの強い生物活性を有するものもあり、多くの生薬製剤等に配合されている。例えば、センソはアジアヒキガエル (*Bufo gargarizans* Cantor) またはヘリグロヒキガエル (*Bufo melanostictus* Schneider) の耳腺の分泌物を乾燥したものであり<sup>5,6)</sup>、強心作用、鎮痛作用、抗炎症作用、抗がん作用等を有する<sup>6-8)</sup>。センソは漢字で蟾酥、英語で Toad cake, ラテン語で Bufonis Crustum と表記される。

本研究では、動物生薬の新規効能の探索のため、センソの抗 HCV 活性及び抗 DENV 活性を評価し、それに含まれる抗ウイルス物質を探索・同定することを目的とした。

## II. 方 法

1) 培養細胞とウイルス: 細胞は HCV と DENV に感受性の高いヒト肝癌由来の Huh7it-1 細胞を用い、10% 牛胎児血清添加高グルコースダルベッコ改変イーグル培地 (和光純薬) を用いて、37℃、5% CO<sub>2</sub> で培養した。ウイルスは HCV J6/JFH-1-P47 株 (遺伝子型 2 型) 及び DENV Trinidad 1751 株 (血清型 2 型) を用いた<sup>9)</sup>。

2) 抗ウイルス活性の測定: (i) 24-well プレートに Huh7it-1 細胞を  $1 \times 10^5$  cells/well の濃度でまき、一夜培養の後、一定濃度のウイルス (HCV または DENV) と種々の濃度に希釈した動物生薬由来の試料を混合して 2 時間反応させてから、培養液を除いて各 well に加えた。2 時間後、細胞を培養液で洗浄し、さらに同濃度の動物生薬試料を含む培養液を加えて、46 時間培養を続けた。培養上清中のウイルス感染価

を測定し、コントロールとの比較で 50% 感染阻止濃度 (IC<sub>50</sub>) を算出した。上記の実験条件の他に、(ii) ウイルス接種前 2 時間と接種中 2 時間のみ動物生薬エキスを処理を行う実験や、(iii) ウイルス接種後のみ動物生薬試料処理を行う実験も併せて行った<sup>10)</sup>。

3) ウイルス感染力価の測定: カバーグラスを入れた 24-well プレートに Huh7it-1 細胞を  $1 \times 10^5$  cells/well の濃度でまき、一夜培養の後、培養液を除いて 10 倍階段希釈したウイルス液を細胞に接種した。1 時間のウイルス吸着後に余剰のウイルス液を除き、培養液を加えて培養した。翌日、細胞を 4% パラホルムアルデヒド (室温, 20 分) で固定し、0.5% Triton X-100 (室温, 20 分) で処理した。その後、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、一次抗体として抗 HCV NS3 マウスモノクローナル抗体または抗 DENV E2 マウスモノクローナル抗体を、二次抗体として Alexa Fluor 488 標識ウサギ抗マウス IgG を用いて蛍光染色して、蛍光顕微鏡 (オリンパス, BX 53-43 FLD-4) により感染細胞数を計測した。その結果に基づいて、ウイルス感染力価 (ffu/ml) を算出した<sup>9)</sup>。

4) 細胞障害活性の測定と選択指数の算出: 96-well プレートにまいた Huh7it-1 細胞を動物生薬試料の 2 倍階段希釈液または対照試薬 (0.1% ジメチルスルホキシド [DMSO]) を含む培養液で 48 時間処理した。処理後、10 µl の MTT (または WST-1) 試薬を各 well に添加し、4 時間培養した後、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad 社, iMark) で 450 nm と 630 nm の波長における吸光度を測定した。0.1% DMSO 処理対照を 100% として、各濃度の動物生薬試料で処理した細胞の生存率をもとに、50% 細胞障害濃度 (CC<sub>50</sub>) を求めた。CC<sub>50</sub> 値を IC<sub>50</sub> 値で除して選択指数 (SI) を算出した。

5) センソ由来各種抽出物の作製: センソは 3 種類の異なるロット番号 (①, ②, ③) のものを用いた。これらのセンソを熱メタノールあるいは熱水で抽出し、濃縮・乾固して、熱メタノール抽出物 (M) 及び熱水抽出物 (W) を得た。

熱メタノール抽出物 (M) に水を加え、振盪や超音波により懸濁後、酢酸エチルを加えて、分液ロートにて分配した。その後、酢酸エチル

層を取り出し、濃縮・乾固して、酢酸エチル抽出物(M-A)を得た。次いで、残された水層にブタノールを加えて、分液ロートにて分配した。その後、ブタノール層を取り出し、濃縮・乾固して、ブタノール抽出物(M-B)を得た。最後に、残された水層を濃縮・乾固して、水抽出物(M-W)を得た。これらの抽出物をDMSOに溶解し、抗ウイルス活性の測定に供した。

また、上記の熱水抽出物(W)についても、熱メタノール抽出物(M)の場合と同様の分配操作により、酢酸エチル抽出物(W-A)、ブタノール抽出物(W-B)及び水抽出物(W-W)を得た。

6) 熱メタノール抽出物からの酢酸エチル抽出物(M-A)に存在するブファジエノライド化合物の単離：上記の方法で得られた抽出物(M-A)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画し、ODSカラム(ジエールサイエンス社, Inertsil ODS-3)を用いた分取高速液体クロマトグラフィーにより、抗ウイルス活性を担う可能性が考えられるブファジエノライド化合物

の単離を試みた。得られた単離化合物をDMSOに溶解し、抗ウイルス活性の測定に供した。

### Ⅲ. 結 果

#### 1. センソ由来抽出物の抗ウイルス活性

まず、3種類の異なるロットのセンソについて、それぞれの熱メタノール抽出物(M)の抗HCV活性を測定した。この測定においては、一定濃度のHCVと種々の濃度に希釈したセンソ抽出エキスを混合して2時間反応させてから、培養液を除いて各wellに加え、2時間後に細胞を培養液で洗浄し、同濃度の抽出エキスを含む培養液を加えて46時間培養するという条件下で行った。その結果、すべてのロットに抗HCV活性( $IC_{50}=0.075\sim0.30\text{ }\mu\text{g/ml}$ )が認められた(表1)。一方、細胞障害活性( $CC_{50}$ )は $0.35\sim0.85\text{ }\mu\text{g/ml}$ で、SIは2.8~8.4であった。

次に、それぞれのロットの熱メタノール抽出物(M)と熱水抽出物(W)の酢酸エチル抽出

表1 センソの各種抽出物の抗ウイルス活性( $IC_{50}$ )と細胞障害活性( $CC_{50}$ )

抽出物	ロット No.	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )		$CC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	SI (HCV)
		HCV	DENV		
M	①	0.075	n.d.	0.35	4.7
	②	0.30	n.d.	0.85	2.8
	③	0.095	n.d.	0.80	8.4
M-A	①	0.03	0.07	0.035	1.2
	②	0.028	0.12	0.15	5.4
	③	0.025	0.06	0.15	6.0
M-B	①	0.35	0.56	1.80	5.1
	②	0.27	0.60	2.0	7.4
	③	0.29	0.56	1.8	6.2
M-W	①	>3	2.1	n.d.	n.d.
	②	>10	2.1	n.d.	n.d.
	③	>3	2.0	n.d.	n.d.
W-A	①	0.03	0.035	0.10	3.3
	②	0.03	0.033	0.19	6.3
	③	0.028	0.025	0.09	3.2
W-B	①	0.35	1.5	3.5	10
	③	0.30	2.5	0.60	2.0
W-W	①	>10	>4	n.d.	n.d.
	②	>10	>4	n.d.	n.d.
	③	>10	>4	n.d.	n.d.

M: 熱メタノール抽出物, A: 酢酸エチル抽出物, B: ブタノール抽出物, W: 水抽出物.  
n.d.: 検査せず.

物 (M-A 及び W-A), ブタノール抽出物 (M-B 及び W-B), 水抽出物 (M-W 及び W-W) について, 抗 HCV 活性を調べた。その結果, 最初の抽出がメタノール抽出であるか熱水抽出であるかに拘らず, 二段階目の抽出が酢酸エチル抽出 (M-A 及び W-A) の場合に,  $IC_{50}=0.03 \mu\text{g/ml}$  程度の強い抗 HCV 活性が認められた (表 1)。一方, 二段階目の抽出が熱水抽出 (M-W 及び W-W) の場合には, 明らかな抗 HCV 活性は認められなかった。

同様に, 抗 DENV 活性も, M-A 及び W-A において, 同程度に強く認められた。また, 二段階目の抽出が熱水抽出 (M-W 及び W-W) の場合には, 明らかな抗 DENV 活性は認められなかった。

ウイルス接種前 2 時間と接種中 2 時間のみそれぞれの抽出物で処理した場合には, いずれの場合にも, 明らかな抗ウイルス活性は認められなかった。

## 2. センソから単離したブファジエノライド化合物の抗ウイルス活性

センソの熱メタノール抽出物からの酢酸エチル抽出物 (M-A) には主要な強心配糖体 (ブファジエノライド) が集積されることから, それらが抗ウイルス活性の本体ではないかと推測し, それらの単離を試みた。その結果, 7 種類のブファジエノライド化合物 (ブファリン, テロシノブファギン, ガマブフォタリン, シノブファギン, レシブフォゲニン, シノブフォタリン, デスアセチルシノブファギン) を単離した。これら 7 種類のブファジエノライドの構造式を図 1 に示す。

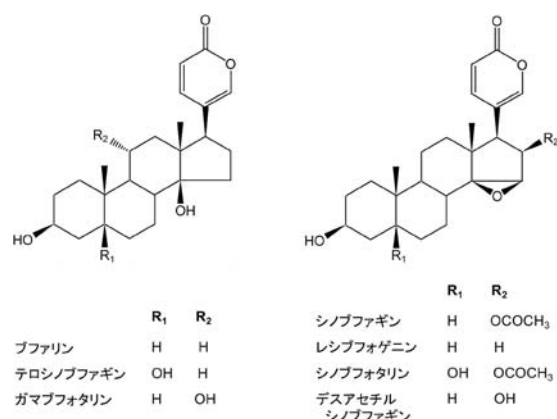


図 1 ブファジエノライドの構造式

そこで, この 7 種類のブファジエノライドの抗ウイルス活性について検討した。抗ウイルス活性の測定においては, ウイルス接種後のみ薬剤処理した場合と, ウイルス接種前 2 時間と接種中 2 時間のみ薬剤処理した場合に分けて実験し, 抗ウイルス効果を比較解析した。

ウイルス接種後のみ薬剤処理した場合には, HCV に対してはブファリンが, また, DENV に対してはブファリンとガマブフォタリンが, それぞれ  $IC_{50}=\leq 0.025 \mu\text{g/ml}$  ( $\leq 0.065 \mu\text{M}$ ) と最も強い抗ウイルス活性を示した (表 2)。細胞障害活性は  $CC_{50}=>5.76 \mu\text{g/ml}$  ( $>16 \mu\text{M}$ ) または  $>6.43 \mu\text{g/ml}$  ( $>16 \mu\text{M}$ ) であり, 選択指数は  $SI=>230.4$  (または  $>178.6$ ) であった。ブファリンとガマブフォタリンに次いで, テロシノブファギン, シノブファギン及びシノブフォタリンが HCV と DENV に対して中等度の抗ウイルス活性を示した ( $IC_{50}=0.064\sim 0.394 \mu\text{g/ml}$  [ $0.16\sim 0.86 \mu\text{M}$ ])。一方, レシブフォゲニン及びデスアセチルシノブファギンは有意の抗ウイルス活性を示さなかった。

ウイルス接種前 2 時間と接種中 2 時間のみ薬剤処理した場合には, ブファリンとガマブフォタリンを含むすべてのブファジエノライドは, HCV と DENV のいずれに対しても, 明らかな抗ウイルス活性を示さなかった ( $IC_{50}=>1.6 \mu\text{g/ml}$  [ $>4.0 \mu\text{M}$ ])。

以上の結果より, ブファリン, ガマブフォタリン, テロシノブファギン, シノブファギン, シノブフォタリンはいずれも, HCV や DENV が細胞内に侵入して以降のウイルス増殖過程を抑制するものと考えられた。

## IV. 考 察

センソはアジアヒキガエルやヘリグロヒキガエルの耳腺分泌物を乾燥させたものであり, 日本薬局方では, センソは, ブファリン, シノブファギン, レシブフォゲニンが合計で 5.8% 以上含有されているものと規定されている<sup>5)</sup>。センソは強心作用, 鎮痛作用, 抗炎症作用, 抗がん作用を有することが知られている<sup>6-8)</sup>。センソの主な活性成分は, ブファジエノライドと呼ばれる強心配糖体の一種である。強心配糖体は心筋に作用し, 共通の化学構造上の特徴を有する

ステロイド配糖体である。糖またはアミノ酸、ステロイド、ラクトンから構成されるが、ステロイド核の17位に6員環のラクトン(ピロン環)を持つものをブファジエノライド、17位に5員環のラクトンを持つものをカルデノライドと呼び、両者を区別している。今回我々が単離したブファリンやガマブフォタリン等はブファジエノライドに分類されている。現在、ブファジエノライドとして118種類の化合物が知られているが、それらはグループA(14-ヒドロキシブフォゲニン類)、グループB(14,15-エポキシブフォゲニン類)、グループC(14-ヒドロキシブフォトキシニン類)、グループD(14,15-エポキシブフォトキシニン類)に分けられる<sup>11)</sup>。本研究で単離したブファリン、テロシノブファギン、ガマブフォタリンはグループAに、シノブファギン、レシブフォゲニン、シノブフォタリン、デスアセチルシノブファギンはグループBに分類されている。

本研究により、センソの熱メタノール抽出物(M)及びそれから得られた酢酸エチル抽出物(M-A)が、HCVとDENVに対する抗ウイルス活性を有することが明らかになった(表1)。そこで、M-A抽出分画に集積することが知られているブファジエノライドを単離して検討したところ、グループAに属するブファリンとガマブフォタリンが最も強い抗ウイルス活性を示すことが明らかになった(表2)。一方、グループBに属するシノブファギン、シノブフォタリンは中等度の抗ウイルス活性を示したが、レシブフォゲニン、デスアセチルシノブファギンは抗ウイルス活性をほとんど示さなかつ

た。さらに、ブファリンやガマブフォタリンは、HCVやDENVの感染性粒子を直接中和するのではなく、HCVやDENVが細胞に吸着・侵入して以降の増殖過程を阻害することがわかった。

ブファジエノライドの抗HCV活性や抗DENV活性についてはこれまでに報告されておらず、我々の知る限りでは、本研究が最初の報告である。一方、その他のウイルスについては、ブファリンがライノウイルス<sup>12)</sup>、B型肝炎ウイルス<sup>13,14)</sup>、SARSコロナウイルス-2を含む様々なコロナウイルス<sup>15,16)</sup>及びRSウイルス<sup>17)</sup>等に対して抗ウイルス活性を示すことが報告されている。ブファリンによるそれらの抗ウイルス活性の作用機序として、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPase(ATP1A1)の阻害に基づく細胞内シグナル伝達機構の変調が提唱されている<sup>15,17-19)</sup>。そして、ブファリンによるATP1A1の阻害は、プロテアソームにおけるATP1A1の分解促進によることが報告されている<sup>20)</sup>。一方、カルデノライドの一種であるウアバインがATP1A1の阻害を介してデングウイルスの感染性粒子形成を阻害していることも報告されており<sup>21)</sup>、ウイルス感染におけるATP1A1の役割の重要性が近年大きく注目されている。さらに、ブファリン等のブファジエノライドの抗がん作用にもATP1A1の阻害が関与していることが報告されている<sup>20,22)</sup>。このように、ウイルス感染や悪性腫瘍をはじめとして、ATP1A1を介する様々な病態の治療におけるブファジエノライドの役割にも着目していく必要があると思われる。今後、ATP1A1を含めて、ブファジエノライドが関与

表2 センソ由来のブファジエノライドの抗ウイルス活性(IC<sub>50</sub>)と細胞障害活性(CC<sub>50</sub>)

ブファジエノライド	IC <sub>50</sub> (μg/ml)		CC <sub>50</sub> (μg/ml)	SI (HCV)
	HCV	DENV		
ブファリン	0.025	≤0.025	>5.76	>230.4
テロシノブファギン	0.156	0.064	>6.43	>41.2
ガマブフォタリン	0.036	≤0.026	>6.43	>178.6
シノブファギン	0.230	0.106	>7.07	>30.7
レシブフォゲニン	1.500	1.075	>6.14	>4.1
シノブフォタリン	0.394	0.289	>7.33	>18.6
デスアセチルシノブファギン	>1.60	>1.60	>6.40	UC

UC, 不詳

する標的分子の詳細な解析, 及び, 化学合成技術に基づくブファジエノライドの構造展開等の研究の発展が期待される。

## V. 結 論

本研究により, センソの抽出物は抗 HCV 活性と抗 DENV 活性を有することが明らかになり, その抗ウイルス活性を担う成分として数種類のブファジエノライドが同定された。なかでも, ブファリンとガマブフォタリンが最も強い抗ウイルス活性を示した。ブファリンやガマブフォタリンは, HCV や DENV の感染性粒子を直接中和するのではなく, HCV や DENV が細胞に吸着・侵入して以降の増殖過程を阻害することも明らかになった。一方, ブファリンやガマブフォタリンの細胞障害活性は抗ウイルス活性に比べて極めて軽度なものであった。今後, ブファリンやガマブフォタリンをリード化合物として, 新規抗ウイルス薬の開発につながることを期待される。

## 付記

本研究は甲南女子大学, 神戸大学, 医薬基盤・健康・栄養研究所, 救心製薬株式会社による産官学連携共同研究の一環として行われた。本研究の成果に基づいて特許出願を行なった (特願 2019-169549)。本研究の実施にあたっては, 文部科学大臣の確認を受け (27 受文科振第 1391 号, 30 受文科振第 723 号), 神戸大学及び甲南女子大学の遺伝子組換え実験安全委員会の承認を受けた (承認番号 27-55, 承認番号 7201803)。

## 参 考 文 献

- 1) 小熊恵二, 若宮伸隆, 堀田博. 肝炎ウイルス. シンブル微生物学改訂第 6 版, pp.343-350, 2018. 南江堂.
- 2) Deng L, Shoji I, Ogawa W, Kaneda S, Soga T, Jiang DP, Ide YH, Hotta H. Hepatitis C virus infection promotes hepatic gluconeogenesis through an NS5A-mediated, FoxO1-dependent pathway. *J Virol*. 85 : 8556-8568, 2011.
- 3) 堀田博. デング熱, デングウイルス. 感染・炎症・免疫, 45 : 213-220, 2015.
- 4) Wahyuni TS, Aoki-Utsubo C, Hotta H. Promising anti-hepatitis C virus compounds from natural resources. *Nat Prod Commun*. 11 : 1193-1200, 2016.
- 5) 第十八改正日本薬局方 (厚生労働省告示第 220 号. 令和 3 年 6 月 7 日). センソ, pp.1927-1928, 2021.
- 6) Yang Z, Luo H, Wang H, Hou H. Preparative isolation of bufalin and cinobufagin from Chinese traditional medicine ChanSu. *J Chromatogr Sci*. 46 : 81-85, 2008.
- 7) KEGG DRUG : センソ. [https://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?dr\\_ja:D06750](https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?dr_ja:D06750).
- 8) Lee HJ, Koung FP, Kwon KR, Kang DI, Cohen L, Yang PY, Yoo HS. Comparative analysis of the Bufonis venenum by using TLC, HPLC, and LC-MS for different extraction methods. *J Pharmacopuncture*. 15 : 52-65, 2012.
- 9) Chen M, Aoki-Utsubo C, Kameoka M, Deng L, Terada Y, Kamitani W, Sato K, Koyanagi Y, Hijikata M, Shindo K, Noda T, Kohara M, Hotta H. Broad-spectrum antiviral agents : secreted phospholipase A<sub>2</sub> targets viral envelope lipid bilayers derived from the endoplasmic reticulum membrane. *Sci Rep*. 7 : 15931, 2017.
- 10) Aoki-Utsubo C, Chen M, Hotta H. Time-of-addition and temperature-shift assays to determine particular step(s) in the viral life cycle that is blocked by antiviral substance (s). *Bio-protocol*. 8 : e2830, 2018.
- 11) Zhan X, Wu H, Wu H, Wang R, Luo C, Gao B, Chen Z, Li Q. Metabolites from *Bufo gargarizans* (Cantor, 1842) : A review of traditional uses, pharmacological activity, toxicity and quality control. *J Ethnopharmacol*. 246 : 112178, 2020.
- 12) Kamano Y, Satoh N, Nakayoshi H, Pettit GR, Smith CR. Rhinovirus inhibition by bufadienolides. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 36 : 326-332, 1988.
- 13) Cui X, Inagaki Y, Xu H, Wang D, Qi F, Kokudo N, Fang D, Tang W. Anti-hepatitis B virus activities of cinobufacini and its active components bufalin and cinobufagin in HepG2.2.15 cells. *Biol Pharm Bull*. 33 : 1728-1732, 2010.
- 14) Okuyama-Dobashi K, Kasai H, Tanaka T, Yamashita A, Yasumoto J, Chen W, Okamoto T, Maekawa S, Watashi K, Wakita T, Ryo A, Suzuki T, Matsuura Y, Enomoto N, Moriishi K. Hepatitis B virus efficiently infects non-adherent hepatoma cells via human sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *Sci Rep*. 5 : 17047, 2015.
- 15) Burkard C, Verheije MH, Haagmans BL, van Kuppeveld FJ, Rottier PJ, Bosch BJ, de Haan CA. ATP1A1-mediated Src signaling inhibits coronavirus entry into host cells. *J Virol*. 89 : 4434-4448, 2015.
- 16) Yang CW, Lee YZ, Hsu HY, Jan JT, Lin YL, Chang SY, Peng TT, Yang RB, Liang JJ, Liao CC, Chao TL, Pang YH, Kao HC, Huang WZ, Lin JH, Chang CP, Niu GH, Wu SH, Sytwu HK, Chen CT, Lee SJ. Inhibition of SARS-CoV-2 by highly potent broad-spectrum anti-coronaviral tylophorine-based derivatives. *Front Pharmacol*. 11 : 606097, 2020.
- 17) Lingemann M, McCarty T, Liu X, Buchholz UJ, Surman S, Martin SE, Collins PL, Munir S. The alpha-1 subunit of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (ATP1A1) is required for macropinocytic entry of respiratory syncytial virus (RSV) in human respiratory epithelial cells. *PLoS Pathog*. 15 : e1007963, 2019.
- 18) Schmidt N, Lareau CA, Keshishian H, Ganskih S,

- Schneider C, Hennig T, Melanson R, Werner S, Wei Y, Zimmer M, Ade J, Kirschner L, Zielinski S, Dölken L, Lander ES, Caliskan N, Fischer U, Vogel J, Carr SA, Bodem J, Munschauer M. The SARS-CoV-2 RNA-protein interactome in infected human cells. *Nat Microbiol.* 6 : 339-353, 2021.
- 19) Souza E Souza KFC, Moraes BPT, Paixão ICNP, Burth P, Silva AR, Gonçalves-de-Albuquerque CF.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase as a target of cardiac glycosides for the treatment of SARS-CoV-2 infection. *Front Pharmacol.* 12 : 624704, 2021.
- 20) Lan YL, Wang X, Lou JC, Xing JS, Yu ZL, Wang H, Zou S, Ma X, Zhang B. Bufalin inhibits glioblastoma growth by promoting proteasomal degradation of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha 1$  subunit. *Biomed Pharmacother.* 103 : 204-215, 2018.
- 21) Carvalho FA, Carneiro FA, Martins IC, Assunção-Miranda I, Faustino AF, Pereira RM, Bozza PT, Castanho MA, Mohana-Borges R, Da Poian AT, Santos NC. Dengue virus capsid protein binding to hepatic lipid droplets (LD) is potassium ion dependent and is mediated by LD surface proteins. *J Virol.* 86 : 2096-2108, 2012.
- 22) Cheng CS, Wang J, Chen J, Kuo KT, Tang J, Gao H, Chen L, Chen Z, Meng Z. New therapeutic aspects of steroidal cardiac glycosides : the anticancer properties of Huachansu and its main active constituent Bufalin. *Cancer Cell Int.* 19 : 92, 2019.