

カリン中ポリフェノール画分による新型インフルエンザウイルスの感染抑制効果

誌名	日本食品科学工学会誌 : Nippon shokuhin kagaku kogaku kaishi = Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology
ISSN	1341027X
著者名	黒田, 玲子 佐々木, 裕 西川, 智子 黒田, 和道 桜井, 孝治 山本, 樹生 清水, 一史
発行元	日本食品科学工学会
巻/号	58巻10号
巻号補足	
掲載ページ	p. 496-498
発行年月	2011年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



カリン中ポリフェノール画分による 新型インフルエンザウイルス の感染抑制効果

黒田(澤井) 玲子^{1,2}, 佐々木裕², 西川智子², 黒田和道²,
桜井孝治¹, 山本樹生², 清水一史^{2*}

¹ (株)ロッテ中央研究所

² 日本大学医学部感染症ゲノム研究センター

Antiviral Activity of *Chaenomeles Sinensis* Against
Influenza A/Chiba/1001/2009 (H1N1) pdm Virus

Reiko Sawai-Kuroda^{1,2}, Yutaka Sasaki², Tomoko Nishikawa²,
Kazumichi Kuroda², Kouji Sakurai¹, Tatsuo Yamamoto²
and Kazufumi Shimizu^{2*}

¹ Lotte Co., Ltd., Central Laboratory, 3-1-1 Numakage,
Minami-ku, Saitama, Saitama 336-8601

² Nihon University School of Medicine, 30-1 Oyaguchikami-
chuo, Itabashi-ku, Tokyo 173-8610

We previously reported that a polyphenol-rich fraction, CSD3, of the fruit of *Chaenomeles sinensis* neutralizes seasonal influenza viruses. In this study, we examined whether CSD3 possesses antiviral activities against the H1N1 virus of swine origin that caused a global pandemic in 2009. Treatment of the pandemic influenza virus, A/Chiba/1001/2009 (H1N1) pdm, with CSD3 at 250 µg/ml decreased viral infectivity by 1/3 000. This indicates that the anti-viral components in *C. sinensis* are also effective against the 2009 pandemic influenza virus. In addition, infectivity was suppressed five times more than hemagglutinating activity with CSD3 treatment at 5 µg/ml, suggesting that CSD3 inhibits at multiple steps of infection, particularly the steps after adsorption.

(Received May 12, 2011; Accepted Jun. 27, 2011)

Keywords : *Chaenomeles sinensis*, influenza A/2009 (H1N1) pdm virus, neutralizing activity

キーワード : カリン, 新型インフルエンザウイルス, 感染中和活性

カリン (*Chaenomeles sinensis*) は, 中国が原産の落葉性高木であり, 果実部はカリン酒や砂糖漬け, シロップ等にして食されている. その果実は榲桲(メイサ)と呼ばれ, 去痰, 鎮咳, 鎮痛等を薬効とした漢方として処方されている. 大澤らは, カリン果実中の薬効成分の同定を行い, 咽頭炎の原因菌である溶血性連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) に対する抗菌性成分としてオレアノール酸などのトリテルペン類を¹⁾, 炎症成分として高分子ポリフェノール類を²⁾

報告している. 筆者らは, カリン果実中の高分子ポリフェノール類の季節性インフルエンザウイルスに対する赤血球凝集抑制効果と感染抑制効果を報告している³⁾.

インフルエンザは, 毎年のように流行を繰り返しており, 時折パンデミックと呼ばれる世界的な大流行を引き起こす. 2009年3月, メキシコを発端として発生した H1N1 新型ウイルスによるインフルエンザもその一つである. 今回, 新型インフルエンザウイルス A/Chiba/1001/2009 (H1N1) pdm に対してカリン抽出物に赤血球凝集抑制効果および感染抑制効果が認められたので, その結果を報告する.

1. 実験方法

(1) 細胞株およびウイルス

細胞は Mardin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞を用いて, 10% ウシ胎仔血清を含む Eagle's minimum essential medium (EMEM) で培養した. インフルエンザウイルスは, A/Udorn/307/72 (H3N2) および A/Chiba/1001/2009 (H1N1) pdm (千葉県衛生研究所より分与) を用いた. A/Udorn/307/72 は, 発育鶏卵 (11 日卵) 漿尿膜腔内に接種し増殖させ, 清水らの方法により精製した⁴⁾. A/Chiba/1001/2009 (H1N1) pdm 株は MDCK 細胞に接種し, 炭酸ガス培養機 (37°C, 5%CO₂) 内で 2 日間増殖させた. 5 000 rpm 5 分間遠心の上清液をウイルス液とした.

(2) カリン中の活性成分の精製

カリン (*C. sinensis* Koehne) の乾燥果実は, 中国の湖北省の市場から入手した. 乾燥果実 100 g を 50% エタノール (700 ml) で 1 時間還流抽出し, ろ過後, 抽出液を減圧濃縮および凍結乾燥させることによりカリン 50% エタノール抽出物 (CSE50) を得た (23 g). CSE50 を水により懸濁させ, Diaion HP-20 (三菱化学) カラムクロマトグラフィー (カラム: 8 × 15 cm) により 5 段階の含水エタノール (0, 20, 40, 60 および 100% エタノール) を用いて溶出させ, CSD1 (水溶出画分: 14.5 g), CSD2 (20% エタノール溶出画分: 3.2 g), CSD3 (40% エタノール溶出画分: 3.7 g), CSD4 (60% エタノール溶出画分: 161 mg), CSD5 (100% エタノール溶出画分: 161 mg) の 5 つの画分を得た. 各画分中の縮合型ポリフェノール量は (-) -epicatechin を標準物質として用い, バニリン-塩酸法⁵⁾ により定量した.

(3) 各画分の感染中和価の測定

各画分の感染中和価は, A/Udorn/307/72 (H3N2) を用いて, プラーク形成能の抑制度を算出することにより評価した. 0.1 ml のウイルス液 (1 000 plaque forming units (PFU) /ml) に等量の分画物 10 倍段階希釈液を加え, 室温で 30 分間反応させ, 100 µl を MDCK 細胞 (6 穴プレート) に接種し, 室温で 60 分間吸着させた. 吸着後, 0.6% アガロース, 1.5% ゼラチン, 2.5 µg/ml トリプシンを含む Leibovitz's L-15 培地 (Life Technologies Japan Ltd.) を 1.6 ml 添加し, 固化した. 34°C で 3 日間培養した後, 出現したプラーク数を計測し, 50% 感染中和濃度 (IC₅₀) を求めた.

¹ 〒336-8601 埼玉県さいたま市南区沼影 3-1-1

² 〒173-8610 東京都板橋区大谷口上町 30-1

* 連絡先 (Corresponding author), shimizu.kazufumi@nihon-u.ac.jp

ウイルスおよび分画物の希釈には TGS (25mM トリス, 140mM 塩化ナトリウム, 5mM 塩化カリウム, 0.7mM リン酸ナトリウム 12 水和物, 5.6mM グルコース, pH7.4) を用いた。

(4) 赤血球凝集価減少試験

赤血球凝集価 (HA 価) の測定は, 96 穴プレートを用いて行った。リン酸緩衝生理食塩水で各濃度の CSD3 処理ウイルスの 2 倍段階希釈液系列 (50 μ l) を作り, 0.5% (v/v) 鶏赤血球 50 μ l を添加し, 4℃ 1 時間静置後, 赤血球凝集の有無を判定し, 凝集を示す最高希釈の逆数を各ウイルス液の HA 価とした。カリン CSD3 画分の新型インフルエンザウイルス A/Chiba/1001/2009 (H1N1) pdm に対する赤血球凝集抑制活性を HA 価減少試験により評価した。0.1ml のウイルス液 (HA 価: 32) に等量の CSD3 液 (0: コントロール, 0.1~500 μ g/ml) を加え, 室温で 60 分間反応させた後, HA 価を測定した。

(5) 感染価減少試験

カリン CSD3 画分の新型インフルエンザウイルス A/Chiba/1001/2009 (H1N1) pdm に対する感染性中和活性を感染価減少試験により評価した。0.1ml のウイルス液 (2×10^7 PFU/ml, HA 価: 32) に等量の CSD3 液 (0: コントロール, 0.1~500 μ g/ml) を加え, 室温で 60 分間反応させ, 感染価をプラーク形成能および Tissue Culture Infectious Dose 50% (TCID₅₀) 量により測定した。

i) プラーク形成能による測定

各濃度の CSD3 処理ウイルスの 10 倍段階希釈液系列を作り, 100 μ l を MDCK 細胞 (6 穴プレート) に接種し, 前述の方法でプラークを計数した。感染価は PFU/ml で表した。

ii) TCID₅₀量による測定

各濃度の CSD3 処理ウイルスの 10 倍段階希釈液系列を 2.5 μ g/ml トリプシンを含む MEM で作り, 200 μ l を MDCK 細胞 (24 穴プレート) に接種し, 炭酸ガス培養機で 37℃ 3 日間培養した。培養後, 上清液中の赤血球凝集活性の有無により感染を判定し, TCID₅₀量を求めた。

2. 実験結果および考察

(1) カリン分画物のポリフェノール含有量および感染中和価の測定

カリンの 50%エタノール抽出物を, DiaionHP-20 を用いて 5 段階の含水エタノールで溶出させ CSD1~5 に分画した。各フラクションの A/Udorn/307/72 (H3N2) に対する 50%感染中和 IC₅₀およびポリフェノール含量を表 1 に示した。CSD3 画分が最も高い感染抑制活性 (IC₅₀=0.8 μ g/ml) を有していた。また, CSD3 はポリフェノール含量が 53.8%と最も高かった。そこで, 以後の実験では CSD3 を用いて A/Chiba/1001/2009 (H1N1) pdm に対する抗ウイルス効果を評価することとした。

(2) CSD3 処理の A/Chiba/1001/2009 (H1N1) pdm 対

表 1 カリン分画物のポリフェノール含量

名称	IC ₅₀ (μ g/ml) ^a	総フラバン量 (%) ^b
CSE50	1.0	19.4 $\pm$ 1.3
CSD1	19.8	N.D.
CSD2	1.8	45.2 $\pm$ 2.3
CSD3	0.8	53.8 $\pm$ 3.1
CSD4	1.5	20.5 $\pm$ 0.7
CSD5	1.7	N.D.

^a: A/Udorn/307/72 に対する 50%感染中和濃度。

^b: エピカテキン換算, $n=3$, 平均値 $\pm$ 標準偏差。

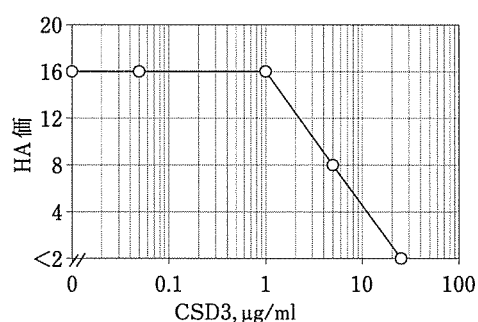


図 1 CSD3 の A/Chiba/1001/2009(H1N1)pdm に対する赤血球凝集抑制活性

する赤血球凝集抑制活性

CSD3 処理による新型ウイルス A/Chiba/1001/2009 (H1N1) pdm の赤血球凝集抑制活性を, 赤血球凝集価減少試験により評価した。赤血球凝集試験はウイルス表面のヘマグルチニンが赤血球のレセプターと結合する反応に基づくものであり, ウイルスのレセプター結合能を評価する試験である。50 μ g/ml 以上の CSD3 では, CSD3 自身の赤血球凝集作用が観察されたため, 赤血球凝集価減少試験は, 25 μ g/ml 以下の CSD3 を用いて行った。1 μ g/ml 以下ではウイルスの HA 価は, 非処理ウイルスと同様 16 であり, 赤血球凝集価の減少は観察されなかった。5 μ g/ml の処理では 8 であり 1/2 に減少した。25 μ g/ml では検出限界 (2) 未満に減少した (図 1)。

(3) A/Chiba/1001/2009 (H1N1) pdm に対する CSD3 の感染中和活性

新型ウイルスに対する感染中和活性を, プラーク感染価減少試験により評価した。未処理ウイルスの感染価は 1.0×10^7 PFU/ml であった。CSD3 処理により, 用量依存的に感染抑制効果が確認され, 1 μ g/ml では約 2/3, 25 μ g/ml では約 1/60, 250 μ g/ml では約 1/10 000 に感染価が減少した (図 2)。しかし, 極小なプラークが多く, プラーク数の正確な計測が困難であった。

次に TCID₅₀感染価減少試験で CSD3 の感染中和活性を評価した。1 μ g/ml の CSD3 処理では約 1/3, 5 μ g/ml では約 1/10, 25 μ g/ml では約 1/100, 250 μ g/ml では 1/3 000 に

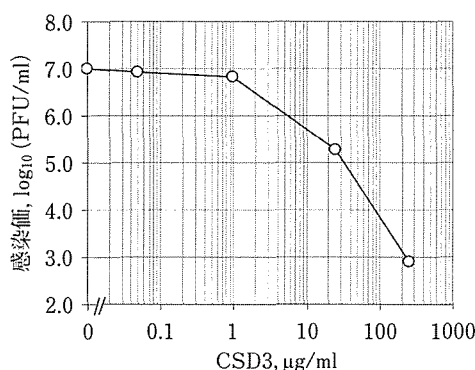


図2 CSD3のA/Chiba/1001/2009(H1N1)pdmに対する感染性中和活性(プラーク法)

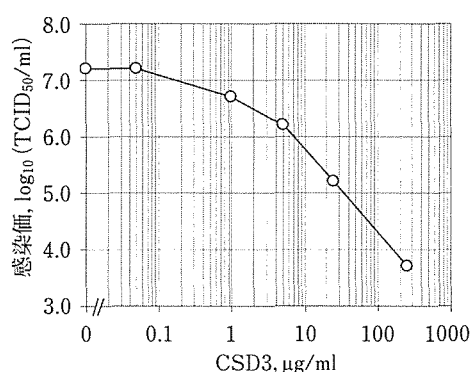


図3 CSD3のA/Chiba/1001/2009(H1N1)pdmに対する感染性中和活性(TCID₅₀法)

TCID₅₀感染価は減少した(図3)。感染の判定を増殖ウイルスによる赤血球凝集活性の測定と、感染による細胞変性効果(Cytopathic effect: CPE)の顕微鏡観察により行ったが、判定は完全に一致して信頼度の高い結果が得られた。この結果からCSD3の 1×10^7 PFU/mlの新型ウイルスに対する50%感染中和IC₅₀を算出すると0.3 $\mu\text{g/ml}$ になった。H3N2季節性ウイルスの一つであるA/Udorn/72に対するIC₅₀は0.8 $\mu\text{g/ml}$ であった(表1)ので、CSD3は新型ウイルスに対してH3N2季節性ウイルスに対する感染中和活性と同等以上の活性を持つことが明らかになった。

5 $\mu\text{g/ml}$ のCSD3処理では、赤血球凝集価の減少は約1/2であったが、感染価の減少は約1/10であった。感染価の減少は赤血球凝集価の減少の5倍であり、CSD3は

A/Chiba/1001/2009(H1N1)pdmの吸着以降のウイルス増殖過程を主に抑制することが示唆された。

3. 要約

我々は、カリン(*Chaenomeles sinensis*)中の高分子ポリフェノールの季節性インフルエンザウイルスA/Udorn/307/72(H3N2)に対する感染性中和活性および赤血球凝集抑制効果を既に報告している³⁾。

カリン中の活性画分CSD3を用いて、新型インフルエンザウイルスA/Chiba/1001/2009(H1N1)pdmに対する赤血球凝集抑制活性および感染性中和活性を評価したところ、5 $\mu\text{g/ml}$ のCSD3で処理したウイルスは赤血球凝集価が約1/2に、感染性が約1/10に減少することが明らかになった。250 $\mu\text{g/ml}$ の処理では感染価は1/3000に減少したこれらの結果は、カリン中の抗インフルエンザウイルス活性成分は、H1N1新型インフルエンザウイルスに対しても有効であることを示す。更に、赤血球凝集価の減少以上に感染性が減少したことからウイルス吸着段階以降における抑制作用の存在が示唆された。

新型インフルエンザウイルスを分与頂いた千葉県衛生研究所江口弘久研究所長および小川知子研究員に感謝する。本研究は文部科学省のオープン・リサーチ・センター整備事業による私学助成を得て行われた。

文 献

- 1) 大澤謙二, 安田英之, 森田博史, 竹谷孝一, 糸川秀治, カリン(*Chaenomeles sinensis*)果実より単離されたトリテルペン及び β -sitosterolの抗菌活性及び抗溶血活性, *Natural Medicines* **51** (4), 365-367 (1997).
- 2) 大澤謙二, 宮崎郁子, 今井啓二, 荒川 勉, 安田英之, 竹谷孝一, カリン(*Chaenomeles sinensis*)果実のヒアルロニダーゼ阻害効果及びラット肥満細胞からのヒスタミン遊離阻害効果について, *Natural Medicines* **53** (4), 188-193 (1999).
- 3) Sawai, R., Kuroda, K., Shibata, T., Gomyou, R., Osawa, K. and Shimizu, K., Anti-influenza virus activity of *Chaenomeles sinensis*, *J. Ethnopharmacol.*, **118**, 108-112 (2008).
- 4) Shimizu, K., Mullinix, M.G., Chanock, R.M. and Murphy, B.R., Temperature-Sensitive Mutants of Influenza A/Udorn/72 (H3N2) Virus, *Virology*, **117**, 45-61 (1982).
- 5) Richard, B.B. and William, T.T., Analysis of condensed tannins using acidified vanillin, *J. Sci. Food. Agric.*, **29**, 788-794 (1978).

(平成23年5月12日受付, 平成23年6月27日)