

# カシスエキスの抗インフルエンザウイルス作用

誌名	信州大学農学部紀要
ISSN	05830621
著者名	野口,茜 武田,俊之 渡辺,剛 保井,久子
発行元	信州大学農学部
巻/号	44巻1-2号
掲載ページ	p. 1-8
発行年月	2008年3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



## カシスエキスの抗インフルエンザウイルス作用

野口 茜\*・武田俊之\*\*・渡辺 剛\*\*・保井久子\*

\*信州大学大学院農学研究科 機能性食料開発学専攻 食品微生物学研究室

\*\*タマ生化学 株式会社

**要約** 毎年冬季に流行するインフルエンザ感染症は、主にA型インフルエンザウイルス (Flu) により発症する。A型 Flu は、複数の亜型に分類されることやゲノム変異が頻繁に起こることから、その予防にワクチン接種は完全とは言えず、また抗 Flu 薬も問題が多い。一方、紅茶や緑茶等の茶フラボノイドは、高い Flu 感染阻害作用を有することが注目されている。そこで、我々はアントシアニンなどのフラボノイドを多量に含む果実であるカシスに注目し、その抗 Flu 作用を検討した。その結果、カシスエキスは Flu に対して高い赤血球凝集阻害作用を示し、Flu 感染モデルマウスを用いた試験において、発症率を減少させ、生存率を高めた。これらのことから、カシスエキスはA型 Flu の予防に有効であると考えられた。また、活性成分の探索のため、カシスエキスを合成吸着樹脂にて分画し、赤血球凝集阻害作用を調べた。その結果、アントシアニン以外の物質が含まれる画分に、強い吸着阻害作用を有する化合物の存在が示唆された。

**キーワード**：ポリフェノール、カシス、インフルエンザウイルス、感染防御

### 1. はじめに

インフルエンザウイルス (Flu) は、オルトミクソウイルス科に分類され、A, B, C型に分類される。この中で特にA型 Flu は、表面タンパク質の違いから複数の亜型に分類されることや、抗原性が変異しやすいなどの理由により、毎年インフルエンザ感染を流行させる。免疫力の弱い幼児や高齢者の場合、この Flu 感染が原因となり死に至ることもある恐ろしい感染症である<sup>1-3)</sup>。しかしながら、Flu に対する効果的で安全性の高い予防薬や治療薬は未だ開発されていない。その理由は、A型 Flu の多様な抗原性変異にある。

抗原性の変化をもたらすゲノムの変異は、2種類ある。一つは抗原シフトと呼ばれる現象である。抗原シフトは、Flu に特徴的で、同一の宿主細胞に2種類の Flu が感染すると分節を入れ替えた混合株が出現する。基本的に Flu は宿主特異的に感染するが、抗原シフトにより宿主の種間を越えた感染が可能になる。現在注目されている鳥インフルエンザのヒトへの感染は、Flu の抗原シフトが原因である。この抗原シフトにより、他の生物を宿主としていた Flu がヒトへの感染能力を有することで、致死的なイン

フルエンザ感染を引き起こし、世界的に大流行させるウイルスが誕生する危険性がある<sup>4-7)</sup>。さらに、もう一つの抗原性変異として、抗原ドリフトというゲノム変異がある。A型 Flu は、このゲノム変異により表面タンパク質のアミノ酸配列を変化させるため、同じ亜型であっても抗原性の異なるウイルスが出現する。ヒトは、抗原特異的な抗体を生産することで生体防御を行っている。しかし、Flu の変異により特異的な抗体はその効力を失い、インフルエンザ感染が毎年流行する原因となる<sup>6,7)</sup>。

現在、Flu の予防はワクチンが主流であるが、ワクチンはインフルエンザ感染の流行状況や流行前の健康なヒトが持っている免疫の状況などから、変化する Flu の抗原性を予測することで製造される。さらに、現在使用されているインフルエンザワクチンはヒトの間で流行しているA/ソ連型 (H1N1) やA/香港型 (H3N2) 及びB型に対して効果があるものであり、H5型やH7型などの鳥インフルエンザに対しては効果がない。また、抗 Flu 薬に対しては、副作用や耐性ウイルスの出現が危惧されている。

このように画期的な特效薬がない Flu であるが、近年ある種のフラボノイドの抗 Flu 作用が注目されている。紅茶や緑茶に含まれるフラボノイドの研究は古くから行われており、これら茶に含まれる theaflavin digallate (TF3) や (-) -epigallocatechin gallate (EGCG) などのフラボノイドが、Flu

受理日 2007年11月29日

採択日 2008年1月22日

の吸着を阻害する作用が数多く報告されている<sup>8-11)</sup>。また、フラボノイドは抗Flu作用以外にも、抗酸化作用<sup>12,13)</sup>、血中コレステロール低下作用<sup>14,15)</sup>及び血小板凝集抑制作用<sup>16,17)</sup>など数多くの生体調節機能が報告されている。

そこで、我々はフラボノイドの一種であるアントシアニンを多く含有する果実であるカシスに注目した。カシスは、バラ目スグリ科に属し、ゼリーやジャム、リキュールなどに利用されている。カシスの生体調節機能として、血圧上昇抑制作用<sup>18)</sup>や抗ヘルペスウイルス作用<sup>19)</sup>が報告され、さらにカシスアントシアニンの効用として抗酸化作用<sup>20)</sup>や抗Flu作用<sup>21,22)</sup>が報告されている。しかし、抗Flu作用の作用物質は不明な点がある。我々は、カシスエキスの抗Flu作用を検討し、さらにその作用物質を解明することを目的とした。

## 2. 材料及び方法

### 1) 使用インフルエンザウイルス株

Flu A/Puerto rico/8/34 (PR8株: H1N1) を使用した。Flu は、発育鶏卵 (11日卵) 尿膜腔内に接種し、34°Cで2日間培養させ、4°Cに一晩置き、尿膜腔液を採取した<sup>23,24)</sup>。この尿膜腔液のFlu価は、MDCK細胞 (イヌ腎由来細胞) を用いて測定し、50%感染する希釈の逆数値で表記し、 $10^{7.4}$ TCID<sub>50</sub>/mlであった。この尿膜腔液をウイルス液として使用した。

### 2) 使用サンプル

カシスエキスは、カシスエキス-35 (CE; タマ生化学製) を用いた。CE中の主なアントシアニンは、

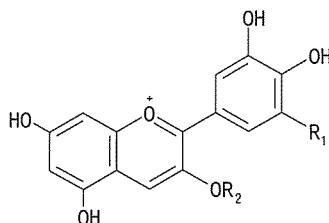
delphinidin-3-rutinoside (Del3-R), delphinidin-3-glucoside (Del3-G), cyanidin-3-rutinoside (Cya3-R) 及び cyanidin-3-glucoside (Cya3-G) である事から、本CE中の各アントシアニンの量を標準品 (Del3-R 及び Del3-G; Polyphenols社製 (Norway), Cya3-R 及び Cya3-G; Extrasynthese社製 (France)) を用いてHPLCにて定量した。この定量値から、4種のアントシアニン総量に対する各アントシアニンの含有比率を求めた (図1)。

HPLCによる分析を、以下のように行った。分析カラムは、YMC-Pack Pro C18 RS ODS 250×4.6mm (ワイエムシ社製) を用いた。検出波長は540nm、流速は1.5ml/min、カラム温度は40°Cの条件下で行った。移動層は、A: 2%リン酸、B: 2%リン酸: アセトニトリル=2: 8を用い、グラジエントプログラムは、0% Bから始まり、40分で25% B、46分で100% B、さらに分析終了の50分まで100% Bとした。

CEの分画を、図2のように行った。5.03gのCEを60mlの脱イオン水に溶解し、合成吸着樹脂 HP-20SS (三菱化学株式会社) 100mlに負荷した。HP-20SSを300mlの脱イオン水で水洗 (F1) 後、15%エタノール (EtOH) 200mlを3回通した (F2, F3, F4)。その後60% EtOH 200mlを3回通した (F5, F6, F7)、最後に100% EtOHで10回洗浄した (F8)。回収された各画分の溶媒をエバポレーターにて50°C以下で濃縮後、各画分サンプルとした。

### 3) CE各画分の分析

成分分析は、薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて行った。なお、TLCプレートにはSilica gel 60 F<sub>254</sub> 0.5mm (メルク社製) を10×9cm用い、



Compounds	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	カシスエキス含有比率
Delphinidin-3-rutinoside	OH	Rutinose	53.7%
Delphinidin-3-glucoside	OH	Glucose	12.4%
Cyanidin-3-rutinoside	H	Rutinose	29.7%
Cyanidin-3-glucoside	H	Glucose	4.2%

図1 カシスエキスに含有する主要アントシアニン

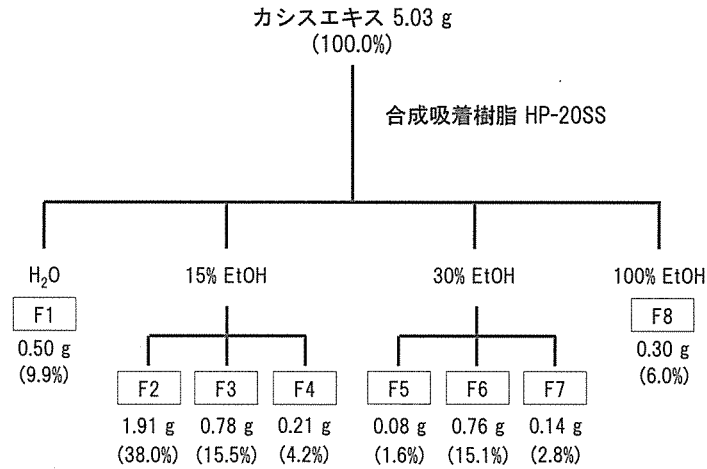


図2 カシスエキスの分画法及び回収率

展開溶媒には酢酸エチル/メチルエチルケトン/ギ酸/水 (5 : 3 : 3 : 1) の混合液を用いた。展開後、紫外光線 (254nm 及び365nm) でUV吸収を有する化合物を確認した。その後、炭化試薬として硫酸セリウム溶液 (硫酸セリウム/濃硫酸/水 (1.5/30/68.5)) を噴霧し、50°Cで5分間加熱させ、再度各画分のUV吸収を確認した。

#### 4) 鶏赤血球及びマウス

鶏赤血球は、日本バイオテストより購入された。保存液中の鶏赤血球を各試験前に、0.1%牛血清アルブミン (BSA) 含有リン酸緩衝液 (PBS) にて2000rpm, 10分間遠心洗浄し、沈殿物を鶏赤血球とした。

BALB/c 雌性マウスは、日本SLCより購入した8週齢を用いた。

#### 5) 赤血球凝集阻害試験

Fluが呼吸器粘膜上皮細胞に吸着する過程を、CE, 各種アントシアニン及び各画分サンプルが阻害するか測定するために赤血球凝集阻害試験を行った。PBSで0.2もしくは2.0mg/mlに調整された各サンプル50 $\mu$ lを、50 $\mu$ lのPR8 ( $10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml)と混合し、室温で1時間、96well丸底プレート上で反応させた。反応後、サンプルとウイルスの混合液を、0.1% BSA含有PBSにてプレート上で2倍段階希釈した。その後、0.1% BSA含有PBSで0.5%に調整された鶏赤血球を全てのwellに50 $\mu$ l添加し、室温で1時間静置後、赤血球凝集反応を確認した。完全な赤血球凝集作用 (HA) を引き起こすウイルスの最高希釈率を、HA価として決定した<sup>11,23)</sup>。また、それぞれの試験は3回行われ、平均値±標準偏差として表された。

#### 6) インフルエンザ感染モデルマウスを用いた試

#### 験

BALB/c 雌性マウス (8週齢) を、3群に分け、1群6匹を試験に供した。CE溶液は、PBSにて0.1及び0.2mg/mlに調整された。0.1% BSA含有PBSで希釈したPR8 ( $10^{6.8}$  TCID<sub>50</sub>/ml) と各濃度のCE溶液を37°C, 3分間混合し、反応液とした。ネンプターの腹腔内投与により麻酔 (65 $\mu$ g/g body weight) したマウスの両鼻腔に、各反応液を10 $\mu$ lずつ (20 $\mu$ l/マウス) 投与し、下気道感染を行った。その後、14日間発症及び生存の状態を観察した。マウスのインフルエンザ発症は、体重の減少、毛の逆立ち、動作の緩慢さから判定した。control群は、CE溶液の代わりにPBSと反応させたPR8を下気道感染させた<sup>23,24)</sup>。本研究における動物実験は、信州大学動物実験指針に基づいて行われた。

#### 7) 統計

HA価のcontrol群と試験群の間の違いについては、Statcel (オーエムエス社, 統計解析ソフト) を使用し、スチューデントのt検定を行った。また、発症率曲線及び生存率曲線のcontrol群と試験群の間の違いについては、Statcelを用いてlogrank検定を行った。

### 3. 結果及び考察

#### 1) カシスエキスの赤血球凝集阻害作用

HirstがA型Fluによる赤血球凝集作用を観察して以来<sup>25)</sup>、その技術は現在でもFluの分離や定量、精製などに用いられている。赤血球凝集作用は、Flu表面のヘムアグルチニンが、赤血球のシアル酸を含むレセプターと結合する反応であり、Fluが呼吸器粘膜上皮細胞に吸着する現象を反映してい

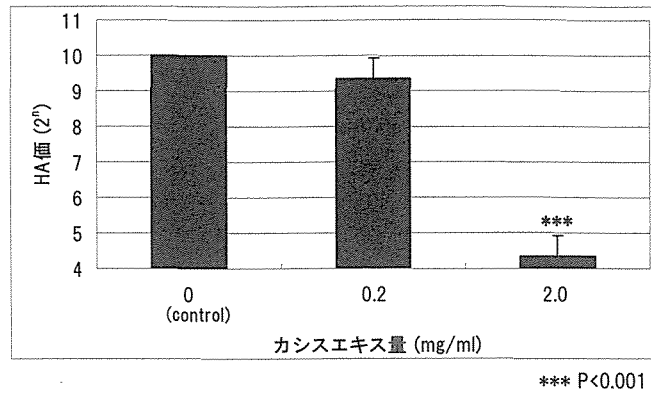


図3 カシスエキスの赤血球凝集阻害作用

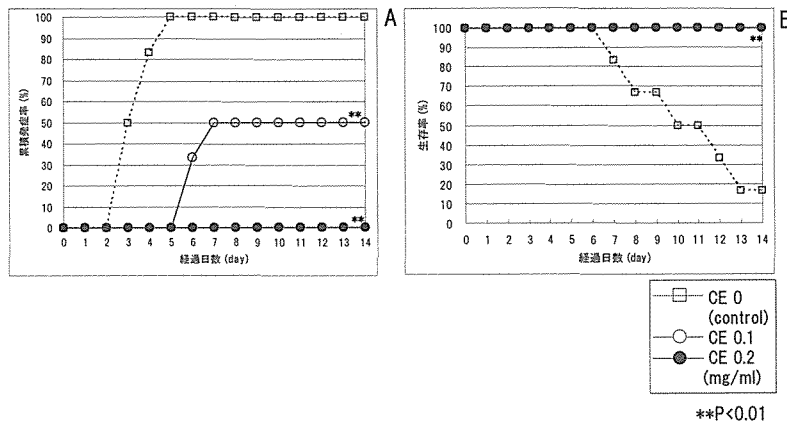


図4 カシスエキスのインフルエンザ感染性阻害作用

A: 発症率抑制作用 B: 生存率上昇作用

る<sup>4,26)</sup>。赤血球凝集阻害試験は、カシスエキス (CE) が、Fluの細胞への吸着を阻害できるか検討するために行われた。CE 0mg/ml (control) 及び CE 0.2mg/ml で処理した PR8 の HA 価は、それぞれ  $2^{10}$  及び  $2^{9.3}$  であった。それに対し、CE 2.0 mg/ml での HA 価は  $2^{4.3}$  であり、control と比較して有意に高い赤血球凝集阻害作用が認められた ( $P < 0.001$ ) (図 3)。また、高い赤血球凝集抑制作用が報告されている紅茶と比較しても、CE は同程度の高い活性を示していた (データ示さず)。

## 2) インフルエンザ感染モデルマウスを用いたカシスエキスの感染性阻害作用

高い赤血球凝集阻害作用を示した CE は、マウスにおける Flu 感染性阻害作用が期待された。そこで、Flu 感染モデルマウスを用いて、CE がその感染を阻害できるか検討した。インフルエンザ発症率を経時的に測定した結果、control 群が感染後 5 日目に 100% となったのに対し、CE 0.2mg/ml 処理群は全く発症が見られず、有意に抑制されていた ( $P < 0.01$ )。さらに CE 0.1mg/ml 処理群でも、14日間

の観察期間で 50% の発症率を示したが、control 群と比較して有意に抑制されていた ( $P < 0.01$ ) (図 4 A)。また、生存率は control 群が 7 日目から死にはじめ、14 日間の観察期間で約 17% だったのに対し、CE 0.1mg/ml 及び CE 0.2mg/ml 処理群は、100% であり、有意な生存率の増加が認められた ( $P < 0.01$ ) (図 4 B)。これらの結果から、*in vitro* における CE の効果が *in vivo* でも実証され、CE が高い抗 Flu 作用を有することが明らかとなった。

## 3) カシスエキス主要アントシアニンの赤血球凝集阻害作用

Knox らは、CE 中のアントシアニンに抗 Flu 作用があることを、MDCK 細胞を用いたブランク法により明らかにしている<sup>21,22)</sup>。そこで、我々も CE の活性成分をアントシアニンの観点から解明するために、CE 主要アントシアニン標準品を用いて赤血球凝集阻害試験を行った。主要なアントシアニンである Del3-R、Del3-G、Cya3-R 及び Cya3-G を CE と同濃度の 2.0mg/ml にし、赤血球凝集阻害作

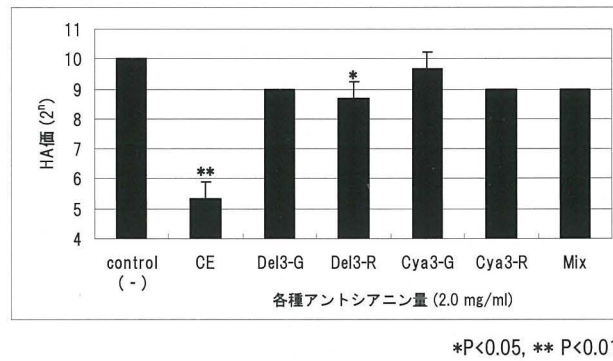


図5 カシスエキス主要アントシアニンの赤血球凝集阻害作用

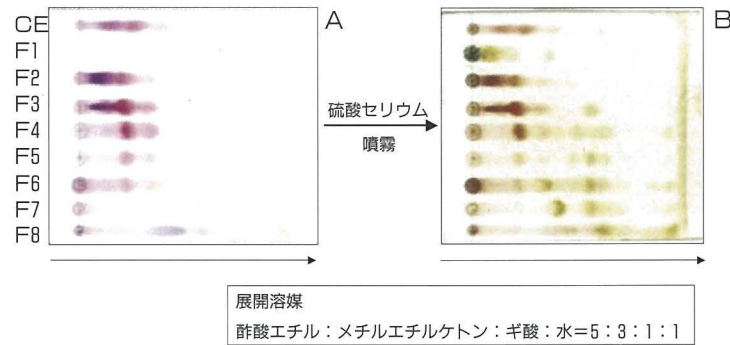


図6 カシスエキス各画分の薄層クロマトグラム

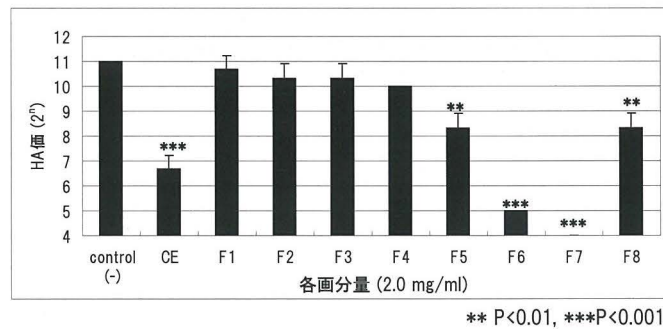


図7 カシスエキス各画分の赤血球凝集阻害作用

用を調べた。その結果、controlのHA値が $2^{10}$ であったのに対し、Del3-Rは $2^{8.6}$ と有意な阻害作用 ( $P < 0.05$ ) が認められたが、CEの $2^{5.3}$ と比較して低い阻害作用であった。一方、Del3-G、Cya3-G及びCya3-Rは、controlと比較して有意な阻害作用が見られなかった(図5)。また、CE中の各アントシアニン含有率を液体クロマトグラフィー(HPLC)にて標準品を基準に定量した結果、Del3-Rは53.7%、Del3-Gは12.4%、Cya3-Rは29.7%及びCya3-Gは4.2%だった(図1)。これらの比率をもとにアントシアニンMix(Mix)を作製し、その活性を調べたが、controlと比較して有意な活性は認められなかった(図5)。以上の結果から、

本CEの抗Flu活性には、アントシアニンであるDel3-Rの関与も考えられるが、それ以外の含有成分の関与が大きいと推測された。

#### 4) カシスエキス各画分の赤血球凝集阻害作用

アントシアニン以外の活性成分を探索するために、CEの分画及び分析を試み、各画分サンプルの赤血球凝集阻害作用を調べた。図2に合成吸着樹脂による分画法及び回収率を示し、図6に各画分の薄層クロマトグラフィー(TLC)及び硫酸セリウムを噴霧し炭化させた各画分の結果を示した。

これら各画分サンプルを $2.0\text{mg/ml}$ とし、赤血球凝集阻害試験を行った。その結果、controlのHA値が $2^{11}$ であったのに対し、F5画分は $2^{8.6}$  ( $P <$

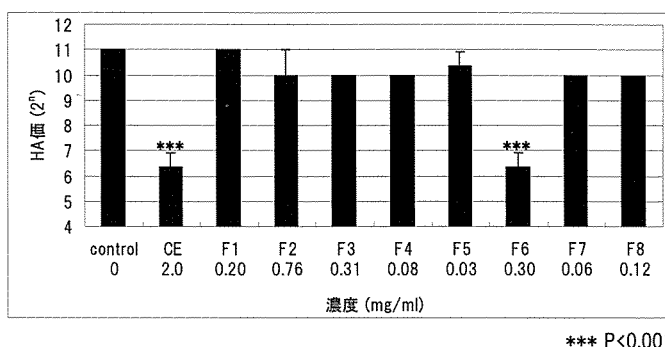


図8 カシスエキス中に含まれる各画分量あたりの赤血球凝集阻害作用

0.01), F6画分は $2^5$  ( $P < 0.001$ ), F7画分は $< 2^4$  ( $P < 0.001$ ), F8画分は $2^{8.3}$  ( $P < 0.01$ )と有意に高い阻害作用を示した。しかし, F1, F2, F3及びF4画分は, controlと比較して有意な活性が認められなかった。また, この時, 未分画CEのHA価は $2^{6.7}$ であった(図7)。このことから, 含有量を考慮して, F6またはF7画分に吸着阻害作用物質が存在することがわかった。

次に, 図2に示される各画分の回収率をもとに, CE中に占める各画分の割合を算出し, CE 2.0mg/ml中に含有する各サンプル量を用いて抗Flu作用を検討した。controlのHA価が $2^{11}$ であったのに対し, F6画分は $2^{6.3}$  ( $P < 0.001$ )と有意に高い阻害作用を示した。これは, 2.0mg/mlのCEと同程度HA価であった。しかし, その他の画分に有意な阻害作用は認められなかった(図8)。一方, 4種類のアントシアニン標準品を用いて, HPLCにてアントシアニン量を測定した結果, F1は0%, F2は46.6%, F3は57.6%, F4は19.7%, F5は9.3%, F6は2.6%, F7は0.4%及びF8は0.2%であった(データ示さず)。活性の高いF6画分にアントシアニン量が少ないことから, CEの活性物質はアントシアニン以外の物質であることが考えられた。また, F6画分は, 硫酸セリウム噴霧後にもUV吸収が見られたことから, 芳香族系の化合物を含有することが推測された(図6B)。

さらに, 我々はカシス同様cyanidinやdelphinidinを含有するブルーベリー<sup>27)</sup>を用いて赤血球凝集阻害試験を行った。その結果, ブルーベリーエキスの抗Flu作用がCEより低いことがわかった(データ示さず)。このことから, CEの活性成分がアントシアニン以外であると考えられた。我々は, F6画分に含有する成分をより詳細に同定するために, 更なる試験を行っている。

##### 5) まとめ

我々は, 古くからインフルエンザ感染に悩まされ, その脅威は現在も続いている。疫学的な調査の結果, アメリカでは毎年約30万人がFluに感染し, 多数の死亡者が発生すると報告されている<sup>28,29)</sup>。現在, この驚異的な感染症に対する画期的な予防薬もしくは治療薬の早急な開発が求められている。今回の試験から, 我々はCEが高い抗Flu作用を有することを明らかにし, その成分がアントシアニン以外の物質であることを示した。これらの発見は, CEがインフルエンザ感染を予防する特効薬となりうることを示し, CEを含有する製品をゆっくり飲んだりうがいすることにより, 鼻や口から侵入したFluが不活化される可能性を示唆した。

##### 引用文献

- 1) Watkins, J.: Influenza: burden of disease in childhood, *Int. Congr. Ser.*, **1263**, 263-266, 2004.
- 2) Munoz, F.M.: Influenza virus infection in fancy and early childhood, *J. Prrv.*, **4**, 99-104, 2003.
- 3) Kappagoda C., Issacs D., Mellis C., Peat J., Silva L.D. and O'Connell A.: Critical influenza virus infection, *J. Paediatr. Child health*, **36**, 318-321, 2000.
- 4) Glaser, L., Stevens, J., Zamarin, D., Wilson, I.A., Garcia-Sastre, A., Tumpey, T.M., Basler, C.F. and Taubenberger, J.K.: A single amino acid substitution in 1918 influenza virus hemagglutinin changes receptor binding specificity, *J. Virol.*, **79**, 11533-11536, 2005.
- 5) Ansaldo, F., Icardi, G., Gasparini, R., Campello, C., Puzelli, S., Bella, A., Donatelli, I., Salmaso, S. and Crovari, P.: New A/H3N2 influenza variant: a small genetic evolution but a heavy burden on the Italian population during 2004-2005 season, *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 3027-3029, 2005.

- 6) Hampson, A.W. and Mackenzie, J.S.: The influenza viruses, *Med. J. Aust.*, **185**, 39-43, 2006.
- 7) 八田正人, 川岡義裕: 高病原性鳥 H5N1 インフルエンザウイルスの流行, 日本ウイルス学会, **55**, 55-62, 2005.
- 8) Song, J.M., Lee, K.H. and Seong, B.L.: Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus, *Antiviral Res.*, **68**, 66-74, 2005.
- 9) Imanishi, N., Tuji, Y., Katada, Y., Maruhashi, M., Konosu, S., Mantani, N., Terasawa, K. and Ochiai, H.: Additional inhibitory effect of tea extract on the growth of influenza A and B viruses in MDCK cells, *Microbiol. Immunol.*, **46**, 491-494, 2002.
- 10) Clark, K.J., Grant, P.G., Sarr, A.B., Belakere, J. R., Swaggerty, C.L., Phillips, T.D. and Woode, G. N.: An in vitro study of theaflavins extracted from black tea to neutralize bovine rotavirus and bovine coronavirus infections, *Vet. Microbiol.*, **63**, 147-157, 1998.
- 11) Nakayama, M., Suzuki, K., Toda, M., Okubo, S., Hara, Y. and Shimamura, T.: Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols, *Antiviral Res.*, **21**, 289-299, 1993.
- 12) Lee, S. and Lee, K.W.: Protective effect of (-)-epigallocatechin gallate against advanced glycation endproducts-induced injury in neuronal cells, *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1369-1373, 2007.
- 13) Ranjbar, A., Khorami, S., Safarabadi, M., Shahmoradi, A., Malekirad, A.A., Vakilian, K., Mandegary, A. and Abdollahi, M.: Antioxidant activity of Iranian *Echium amoenum* Fisch & C.A. Mey flower decoction in humans: a cross-sectional before/after clinical trial, *Evid Based Complement Alternat Med*, **3**, 469-473, 2006.
- 14) Davalos, A., Fernandez-Hernando, C., Cerrato, F., Martinez-Botas, J., Gomez-Coronado, D., Gomez-Cordoves, C. and Lasuncion, M.A.: Red grape juice polyphenols alter cholesterol homeostasis and increase LDL-receptor activity in human cells in vitro, *J. Nutr.*, **136**, 1766-1773, 2006.
- 15) Hirano-Ohmori, R., Takahashi, R., Momiyama, Y., Taniguchi, H., Yonemura, A., Tamai, S., Umegaki, K., Nakamura, H., Kondo, K. and Ohsuzu, F.: Green tea consumption and serum malondialdehyde - modified LDL concentrations in healthy subjects, *J. Am. Coll. Nutr.*, **24**, 342-346, 2005.
- 16) Pignatelli, P., Santo, S.D., Buchetti, B., Sanguigni, V., Brunelli, A. and Violi, F.: Polyphenols enhance platelet nitric oxide by inhibiting protein kinase C-dependent NADPH oxidase activation: effect on platelet recruitment, *FASEB J.*, **20**, 1082-1089, 2006.
- 17) Peluso, M.R.: Flavonoids attenuate cardiovascular disease, inhibit phosphodiesterase, and modulate lipid homeostasis in adipose tissue and liver, *Exp. Biol. Med.*, **231**, 1287-1299, 2006.
- 18) Iwasaki-Kurashige, K., Loyaga-Rendon, R.Y., Matsumoto, H., Tokunaga, T. and Azuma, H.: Possible mediators involved in degreasing peripheral vascular resistance with blackcurrant concentrate (BC) in hind-limb perfusion model of the rat, *Vascul. Pharmacol.*, **44**, 215-223, 2006.
- 19) Suzutani, T., Ogasawara, M., Yoshida, I., Azuma, M. and Knox, Y.M.: Anti-herpesvirus activity of an extract of *Ribes nigrum* L., *Phytother. Res.*, **17**, 609-613, 2003.
- 20) Matsumoto, H., Nakamura, Y., Hirayama, M., Yoshiki, Y. and Okubo, K.: Antioxidant activity of black currant anthocyanin aglycons and their glycosides measured by chemiluminescence in a neutral pH region and in human plasma, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 5034-5037, 2002.
- 21) Knox, Y.M., Suzutani, T., Yoshida, I. and Azuma, M.: Anti-influenza virus activity of crude extract of *Ribes nigrum* L., *Phytother. Res.*, **17**, 120-122, 2003.
- 22) Knox, Y.M., Hayashi, K., Suzutani, T., Ogasawara, M., Yoshida, I., Shiina, R., Tsukui, A., Terahara, N. and Azuma, M.: Activity of anthocyanins from fruit extract of *Ribes nigrum* L. against influenza A and B viruses, *Acta Virol.*, **45**, 209-215, 2001.
- 23) 清島潤子, 堀 徹治, 保井久子: マウスにおけるグァバ葉熱水抽出物のインフルエンザウイルス感染性阻止作用, 日本食品化学学会誌, **8**, 11-16, 2001.
- 24) Yasui, H., Kiyoshima, J. and Hori, T.: Reduction of influenza virus titer and protection against influenza virus infection in infant mice fed *Lactobacillus casei* Shirota, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **11**, 675-679, 2004.
- 25) Hirst, G.K.: The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus, *Science*, **94**, 22-23, 1941.
- 26) Sidwell, R.W. and Smee, D.F.: In vitro and in vivo assay systems for study of influenza virus inhibitors, *Antiviral Res.*, **48**, 1-16, 2000.
- 27) Neto, C.C.: Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular



- disease, *Mol. Nutr. Food Res.*, **51**, 652-664, 2007.
- 28) Thompson, W.W., Shay, D.K., Weintraub, E., Brammer, L., Cox, N., Anderson, L.J. and Fukuda, K.: Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States, *JAMA*, **289**, 179-186, 2003.
- 29) Thompson, W.W., Shay, D.K., Weintraub, E., Brammer, L., Bridges, C.B., Cox, N.J. and Fukuda K.: Influenza-associated hospitalizations in the United States, *JAMA*, **292**, 1333-1340, 2004.
- 

## Inhibitory Effect of Cassis Extract against Influenza Virus Infection

Akane NOGUCHI\*, Toshiyuki TAKEDA\*\*, Tsuyoshi WATANABE\*\*  
and Hisako YASUI\*

\*Department of Sciences of Functional Foods, Graduate School of Agriculture, Shinshu University

\*\*Tama Biochemical co., LTD

### Summary

Influenza virus (Flu) A type that breaks out every year has multiple subtypes and mutates the antigenicity every year. For this reason, it is hard for us to prevent the infection by vaccine. Furthermore, anti-Flu drugs have many troubles. On the other hand, it has been reported that flavonoids of black tea and green tea have an anti-Flu function. Therefore, we noticed cassis containing many flavonoids such as anthocyanin, and investigated an anti-Flu function using *in vitro* and *in vivo* tests. Cassis extract (CE) inhibited hemagglutination caused by Flu, and reduced accumulated symptom rate and improved the survival rate caused by nasal inoculation of Flu to mice. In addition, we fractionated, analyzed and investigated functional substance of CE. In the results, we found that anti-Flu functional substance of CE would be aromatic compounds without anthocyanins. These results indicate that CE has utilizable components to prevent infection of Flu A type.

**Key word**: polymeric phenol, cassis, influenza virus, protection