

加賀野菜の抗インフルエンザウイルス作用の検討 および機能性成分の検索

石川県立大学大学院 生物資源環境研究科*
永井 栄美子

1. 研究の目的と背景

石川県の加賀野菜をはじめとする農林水産物の需要拡大を目的として、食品の機能性研究が多く行われている。例えば、ヘタ紫ナスや加賀ツルマメ、加賀レンコン、金時草の抗酸化性や二塚カラシ菜の ACE 阻害能等が報告されている¹。また、同様の目的で全国で各地域の農林水産物に対しても機能性研究が行われているが、機能性研究の対象疾患は生活習慣病がほとんどである。そのため、これらの機能性を見出すだけでは他との差別化が難しく、今となっては高付加価値化と言えるのが疑問視されている。このような機能性研究が抱える背景のため、新しい機能性に着目し高付加価値化を考える必要があり、抗 IFV 作用を有する食品の検索は新たな高付加価値戦略としても期待できる。インフルエンザは毎年流行を引き起こし、その感染者数の多さとワクチンや治療薬の有効性等について問題になっている。そのため、インフルエンザに対する新たな対策が必要とされている。その一つとして食品の機能性が着目されており、コンブに含まれるフコイダンや、緑茶に含まれるカテキン、ココアポリフェノール等において抗 IFV 作用が報告されている²⁻⁴。

そこで、本研究では高付加価値化を目指した加賀野菜の新たな機能性を明らかにするべく、*in vitro* における加賀野菜の抗 IFV 作用の有無の検討および機能性成分の検索を行った。

2. 研究の方法および内容

2-1. 試料の調製

表 1 に示す試料を凍結乾燥し、ミキサーで粉碎した。

表 1 実験に使用した加賀野菜一覧

赤皮カボチャ	金時草
赤ズイキ	クワイ
加賀一本太ネギ	源助ダイコン
加賀ツルマメ	サツマイモ
加賀太キュウリ	タケノコ
加賀レンコン	二塚カラシ菜
金沢春菊	ヘタ紫ナス
金沢セリ	

粉碎した試料に対して 100 倍量の蒸留水を加え、80℃ で 1 時間攪拌し抽出した。その後 40 g, 20 分の条件で遠心分離を行い、上清を 0.45 μm シリンジフィルター (Millipore) でろ過し、凍結乾燥を行った。得られた抽出物に対して適量の蒸留水を加え再溶解させた。得られた溶液は、0.22 μm シリンジフィルターを用いて滅菌後、実験に使用するまで -80℃ で保存した。

2-2. 活性試験

24 well プレートに単層培養した MDCK 細胞を洗浄後、適当な濃度に希釈した IFV (H1N1 A/PR/8/34 株: 0.0001 moi, H3N2 A/Aichi/2/68 株: 0.001 moi, B/Nagasaki/1/87: 0.0001 moi, B/Shanghai/361/2002: 0.0001 moi) を 1 時間吸着させた (37℃, 5% CO₂)。0.4% BSA, 2 μg / mL アセチルトリプシン含有 D-MEM に熱水抽出物を加えサンプル含有培地とし、感染細胞をサンプル含有培地 (500 μL / well) で培養した (37℃, 5% CO₂)。24 時間後に上清を回収し、フォーカス法により上清中のウイルス力価の測定を行った。抗 IFV 作用を示したサンプルのうち熱水抽出物に対してはより詳細な抗 IFV 作用を評価するために half maximal (50%) inhibitory concentration (IC₅₀) を求めた。

2-3. ウイルス力価の測定 (フォーカス法)

96 ウェルマルチプルウェルプレートに単層培養した MDCK 細胞を洗浄後、活性試験の際に回収した上清を 30 μL / well 加え 1 時間吸着させた (37℃, 5% CO₂)。その後 E-MEM で細胞を洗浄し、0.4% BSA 含有 E-MEM を 100 μL / well 加え、15 ~ 18 時間培養した (37℃, 5% CO₂)。培養液を除去後、100% エタノールを加えて感染細胞を固定した。エタノールを除去後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で細胞を洗浄した。1000 倍希釈した一次抗体を加え 40 分間反応させた (37℃)。一次抗体溶液を除去後、PBS で細胞を洗浄し、1000 倍希釈した二次抗体 (ヤギ抗マウス IgG(H+L)-HRP 複合体; BIO RAD) を加え 40 分間反応させた (37℃)。二次抗体溶液を除去後、PBS で細胞を洗浄した。ここで使用した一次抗体及び二次抗体の希釈には PBS を用いた。その後染色液を加え、室温で 10 分間反応させた。染色液には 3,3'-Diaminobenzidine (DAB; nakarai tesque) 0.3

* 現 東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 微生物潜在酵素 (天野エンザイム) 寄付講座

mg / mL, H₂O₂ (富士フィルム和光純薬) 0.01% 含有 PBS を用いた。反応後に染色液を除去し、水道水で細胞を洗浄後、さらに蒸留水で洗浄し乾燥させ、光学顕微鏡下で染色されたフォーカス数をカウントし、ウイルス力価 (FFU / mL) を算出した。

2-4. 細胞毒性試験 (MTT 試験)

MT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay キット (細胞増殖キット I (MTT); roche) を用いて活性を示したサンプルの細胞毒性を試験した。操作はキットの指示に従った。

2-5. Time of addition assay

熱水抽出物を感染細胞に処理する時間帯を変えることで、熱水抽出物がどの段階でウイルス増殖を阻害するのかについて検討を行った。

ウイルスを希釈する際の培地は終濃度 0.4% BSA を含む EMEM を用いた。ウイルスを培養する際の培地の作成には終濃度 0.4% BSA および 2 µg/ml アセチルトリプシンを含む DMEM を用いた。

MDCK 細胞を 24 well プレートに播種し、24 時間培養を (37°C, 5% CO₂)、EMEM で 2 回洗浄後、実験に用いた。洗浄後の MDCK 細胞に希釈した PR8 株を 100 µl; 0.01 moi の濃度で播種し、1 時間インキュベートした。その後、EMEM で洗浄し、DMEM を加え 8 時間培養を行った (37°C, 5% CO₂)。

ウイルス希釈時の溶液および培養液には、抽出物の終濃度が 10% になるように抽出物を加え各時間帯に処理した。添加した時間帯はウイルス感染前 (-12 h) ウイルス吸着時 (-1 h)、ウイルス培養時 (0 ~ 8 h)、ウイルス吸着時および培養時 (-1 ~ 8 h) である。また、培養時に関し

ては、さらに 4 時間ごとに処理した場合 (0 ~ 4 h, 4 ~ 8 h) についても検討を行った。

8 時間の培養後、細胞を -80°C で凍結させ、凍結融解を 2 回繰り返した後、遠心分離 (1,200 rpm, 10 分) し、上清のみを回収した。回収した上清中のウイルス力価はフォーカス法により測定した。

2-6. 固相カラムを用いた分画

各試料に対して固相カラム (500 mg/mL C18; GL Science) を用いて分画した。まず、C18 カラムを 100% アセトニトリルおよび超純水でコンディショニングした。その後試料溶液 10 mL および 0 ~ 50% アセトニトリル 2 mL を用いて分画し、各画分 (Fra.1: 試料溶液, Fra.2: 超純水, Fra.3: 5% アセトニトリル, Fra.4: 10% アセトニトリル, Fra.5: 20% アセトニトリル, Fra.6: 50% アセトニトリル) を回収した。凍結乾燥後、超純水で再溶解後した溶液を 0.22 µm シリンジフィルターを用いて滅菌した。

2-7. 統計処理

結果の値は平均値 ± SD で示し、有意差検定は Student's t-test により行った。

3. 研究の実施経過

H1N1 A/PR/8/34 株に対する活性試験では加賀野菜の多くでウイルス増殖を阻害することが確認された。このうち、阻害率が 50% 以上であったものについてはさらに細胞毒性試験を行った。その結果、赤ズイキ、ヘタ紫ナス、源助ダイコン、クワイに関しては、今回細胞毒性試験において使用した試料濃度では細胞毒性を示さず、ウイルス増殖に対する阻害率も高いことが明らかとなった (表 2)。

表 2 各試料の抗インフルエンザウイルス作用

	添加濃度 (µg/mL)	阻害率 (%)	CC ₅₀ (µg/mL)
加賀一本太ネギ	1180	84.4	>1180
加賀ツルマメ	948	100	>948
金沢セリ	1268	0	
加賀レンコン	480	95.6	>480
赤ズイキ	930	70.7	無
ヘタ紫ナス	840	99.9	無
加賀太キュウリ	1200	21	>1200
源助ダイコン	1180	98.7	無
タケノコ	1200	100	>1200
サツマイモ	1080	100	>1080
金沢春菊	1020	42.5	
金時草	1540	100	無
二塚カラシ菜	800	100	>800
赤皮カボチャ	1540	23.2	
クワイ	800	100	無

次にこの4つの試料のうち、実験に使用するための十分な試料が確保できた赤ズイキおよびクワイについて、Time of addition assayを行い、ウイルス増殖のどの段階を阻害しているのかについて検討した(図1-A)。赤ズイキではウイルスの吸着および増殖前期・後期において阻

害作用を示した。クワイに関してはウイルスの吸着および増殖後期に阻害作用が確認された(図1-B)。

固相カラム(C18)を用いた分画では、いずれの試料とも素通り画分および水溶出画分にて強い活性が確認された(表3)。

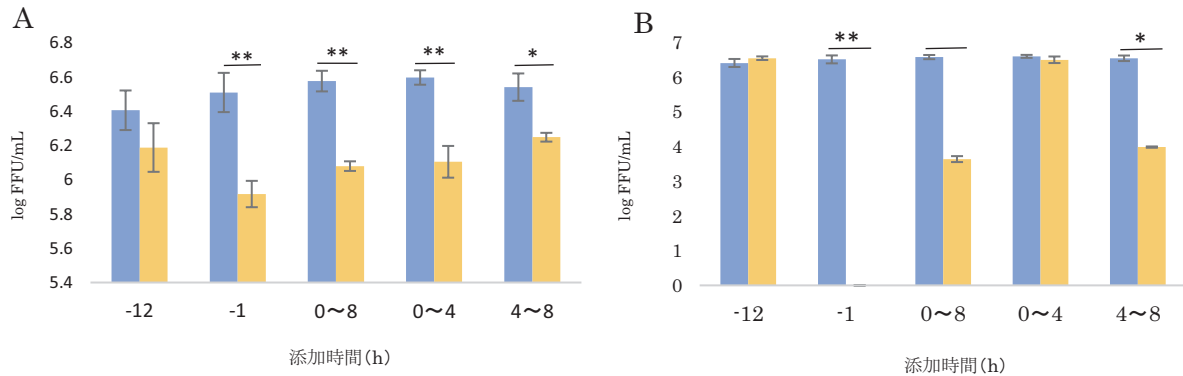


図1 Time of addition assayによる作用機序の検討

(A) 赤ズイキ、(B) クワイに対してPR/8/34株を用いたTime of addition assayを行った。Controlを青色軸、各試料を橙色軸で示した。各試料を添加する時点を-12h(細胞への前処理)、-1h(IFV吸着時)、0~4h(IFV増殖前期)、4~8h(IFV増殖後期)と変化させて培養した際のウイルス力価(log FFU/mL)を示す。* $P < 0.01$ * $P < 0.05$

表3 固相カラム(C18)によって得た画分の抗IFV作用

	Fr.1	Fr.2	Fr.3	Fr.4	Fr.5	Fr.6
赤ズイキ	98.5	11.9	0.0	0.0	0.0	0.0
クワイ	99.4	79.0	18.9	28.3	13.4	6.3

数字はH1N1 A/PR/8/34株に対する各画分の抗IFV作用を示したものである(単位: %)。Fr.1: 非吸着画分、Fr.2: 超純水画分、Fr.3: 5%アセトニトリル画分、Fr.4: 10%アセトニトリル画分、Fr.5: 20%アセトニトリル画分、Fr.6: 50%アセトニトリル画分

4. 研究から得た結論・考察

本研究により、加賀野菜が抗IFV作用を有することを確認し、高付加価値化につながる新たな機能性を見出すことができた。

加賀野菜のうちでも赤ズイキおよびクワイが強い抗IFV作用を示すことが明らかになった。また、これらの試料がウイルス増殖のどの段階を阻害しているのかについて検討したところ、赤ズイキ・クワイともにウイルスの吸着時および細胞内での増殖時の両方を阻害することが確認された。この結果より、赤ズイキやクワイに含まれる有効成分は、複数存在し様々な段階で阻害作用を示したことが考えられた。このことは、固相カラムによる分画においてクワイが非吸着画分および水溶出画分の両方において抗IFV作用が確認されたことから推測できる。また、アセトニトリルで溶出される成分ではほとんど抗IFV作用が確認されなかったことから、赤ズイキやクワイに含まれる有効成分は水溶性のものが大半であると考えられる。

5. 残された問題・今後の課題

本研究により加賀野菜が抗IFV作用を明らかにし、これまでに報告のない加賀野菜のあらたな機能性を見出したが、その有効成分の同定にまでは至らなかった。機能性成分の検索では、今回分画に用いた固相カラム(C18)には有効成分がほとんど吸着していないと考えられる。よって、成分同定をしていくためには、カラムの条件検討を行い、活性が確認できた画分についてLC/MSを用いた成分分析を行う必要がある。

6. 参考文献

- 林美央, 道畠俊英, 勝山陽子, 三輪章志, 川嶋正男, 矢野俊博, 榎本俊樹, 県産農産物を活用した機能性食品の研究—加賀野菜の機能性について—, 石川県立工業試験場平成16年度研究報告, **54**, 57-64 (2004)
- Song, J-M., Lee, K-H. & Seong, B-L., Antiviral

- effect of catechins in green tea on influenza virus., *Antiviral Res.*, **68**, 66-74 (2005), <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2005.06.010>
- 3 Kamei, M., Nishimura, H., Takahashi, T. *et al.*, Anti-influenza virus effects of cocoa., *J. Sci. Food Agric.*, **96**, 1150-1158 (2016), <https://doi.org/10.1002/jsfa.7197>
- 4 Hayashi, K., Lee, J-B., Nakano, T. & Hayashi, T., Anti-influenza A virus characteristics of a fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* in mice with normal and compromised immunity., *Microbes Infect.*, **15**, 302-309 (2013), <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.12.004>