



ナツハゼ果実のA型インフルエンザウイルス感染阻害 活性に関する成分の探索

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2019-01-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 関澤, 春仁 メールアドレス: 所属:
URL	https://fmu.repo.nii.ac.jp/records/2000217

学位論文

ナツハゼ果実のA型インフルエンザウイルス
感染阻害活性に関与する成分の探索

福島県立医科大学大学院医学研究科
感染症学分野
関澤春仁

概要

ブルーベリーはアントシアニン等のポリフェノールを多く含有しており、様々な機能性を示す果実として知られる。しかしながら抗ウイルス作用に関する報告は少ない。そこでブルーベリーの抗インフルエンザウイルス作用を明らかにするため、培養細胞へのインフルエンザウイルス感染の初期段階の感染阻害活性について、37種のブルーベリー類の品種間比較を実施した。その結果、栽培種ではエリオット、ラビットアイ系のウイルス感染阻害活性が高く、野生種ではナツハゼの阻害活性が非常に高いことを明らかとし、阻害活性と総ポリフェノール含量には高い相関があることを明らかにした。

これらの結果を踏まえ、本研究ではインフルエンザウイルス感染阻害活性が高かったナツハゼについて、感染阻害活性に関与する成分の探索を行った。ナツハゼ抽出物を合成吸着樹脂に吸着後、0、10、20、30、40、50 および 80%濃度のエタノール水溶液で順次溶出して分画した。10 および 20%濃度の画分にはナツハゼに特徴的なポリフェノールであるアントシアニンの多くが含まれていたが、ウイルス感染阻害活性は低かった。一方、30、40、50%濃度の画分は高いウイルス感染阻害活性を示し、アントシアニン以外のポリフェノールが多く含まれていた。HPLCで分析した結果、30、40、50%濃度の画分にウイルス感染阻害活性の高い特徴的な3つのピークを見出した。これら3つのピークをHPLCでそれぞれ画分A、B、Cとして分取し、ウイルス感染阻害活性を調べたところ、画分AとBに強い活性を確認した。それぞれの画分をESI-LC/MSで分析した結果、画分AにはプロシアニジンB2とフェルラ酸誘導体が、画分Bにはフェルラ酸六炭糖が含まれていることが明らかとなり、ナツハゼ果実のウイルス感染阻害活性にはプロシアニジンB2とフェルラ酸誘導体が関与していることがわかった。

目次

1. 序論

2. 方法

- 2-1 試料
- 2-2 合成吸着樹脂によるナツハゼ抽出物の分離
- 2-3 HPLC によるナツハゼ抽出物の分離
- 2-4 細胞とウイルス
- 2-5 ウイルス感染阻害活性の評価
- 2-6 総ポリフェノール含量の測定
- 2-7 総アントシアニン含量の測定
- 2-8 ESI-LC/MS による分子量の推定

3. 結果

- 3-1 ナツハゼ画分に含まれるポリフェノールとインフルエンザウイルス感染阻害活性の関係
- 3-2 ESI-LC/MS による分子量の推定
- 3-3 ポリフェノール標準品のインフルエンザウイルス感染阻害活性

4. 考察

謝辞

引用文献

1. 序論

ブルーベリーは生食や加工に幅広く利用されている果実の一つで、世界で広く栽培されている。アントシアニン等のポリフェノールを多く含んでいることから、様々な機能が期待されており、サプリメント等の加工食品にも幅広く利用されている。ブルーベリーの機能性として、眼科領域では暗下での視力回復の促進効果¹、網膜色素や角膜上皮細胞の保護作用^{2,3}などが報告されている。また、ポリフェノールの抗酸化能による体内の活性酸素の除去作用^{4,5}や、肝臓の酸化ストレスや肝硬変の抑制作用も報告されている⁶。しかしながら、ブルーベリーの抗ウイルス作用についての報告は少ない^{7,8}。

ベリー類の抗ウイルス作用についてはブラックカラント（カシス）で複数の報告があり、単純ヘルペスウイルス1型やRSウイルス^{9,10}、インフルエンザウイルス^{11,12}に有効とされている。肺炎レンサ球菌やインフルエンザ菌に対する抗菌作用¹⁰も報告されている。ブラックカラントはブルーベリーと同様、小粒で加工食品に広く利用されるベリー類果実である。しかし、ブラックカラントはユキノシタ目スグリ科スグリ属であるのに対し、ブルーベリーはツツジ目ツツジ科スノキ属であり、植物学的には異なるため、果実に含まれるポリフェノール等の成分にも差があると考えられる。また、ブルーベリーには非常に多くの品種があり、同じブルーベリーでも機能性の有無や強弱に差があると考えられる。

そこでブルーベリーの抗インフルエンザウイルス作用に着目し、培養細胞へのインフルエンザウイルス感染の初期段階の感染阻害活性について、37種のブルーベリー類の品種間比較を実施したところ、栽培種ではエリオット、ラビットアイ系のウイルス感染阻害活性が高く、野生種ではナツハゼの阻害活性が非常に高いことを確認し、阻害活性と総ポリフェノール含量には高い相関があることを明らかにしている¹³。

インフルエンザウイルス感染阻害活性が最も高かったナツハゼについては、国内の低山地に自生しているブルーベリーと同じツツジ科スノキ属の植物であり、現在は主に庭木や生け花の材料として流通している。近年、福島県内においてナツハゼ果実を特産品として利用する動きがあり、徐々にではあるが、果実として流通するようになってきた。クエン酸を多く含むため酸味が強く、アントシアニンに由来する非常に濃い紫色が特徴であり、加工品等への利用が期待されている。

本研究では感染阻害活性の高さや食材利用への期待等の背景を踏まえ、ナツハゼに含まれるインフルエンザウイルス感染阻害活性に関与する成分の探索を実施した。

2. 方法

2-1 試料

福島県内で収穫されたナツハゼ (*Vaccinium oldhamii*) 果実を用いた。果実は冷凍保存し、それぞれの実験に供する際に解凍した。

2-2 合成吸着樹脂によるナツハゼ抽出物の分離

冷凍されたナツハゼ果実を凍結乾燥し、粉碎後に 80%エタノールを添加、5°Cで一晩静置した。その後、8000×g で 10 分間遠心分離して上清を回収し、減圧下で濃縮乾固してナツハゼエタノール抽出物を得た。

ナツハゼエタノール抽出物 5 g を 50 mL の蒸留水に溶解し、ガラスカラム (直径 20 mm ×長さ 300 mm) に充填した 20 g の合成吸着樹脂 (DIAION HP-20、三菱ケミカル株式会社、東京) に吸着させた。その後、エタノール水溶液 (10%、20%、30%、40%、50%、80%) を用いて分離および分取を行った。分取したそれぞれの画分は濃縮乾固し、重量を測定した。

得られた画分は 20%ジメチルスルホキシド (ナカライテスク株式会社、京都) 水溶液に溶解し、それぞれ 1 mg/mL の濃度になるよう調製した。このようにして得た合成吸着樹脂画分を、総ポリフェノール含量、総アントシアニン含量およびインフルエンザウイルス感染阻害活性の評価に用いた。

2-3 HPLC によるナツハゼ抽出物の分離

ナツハゼ果実を解凍し、0.1%ペクチナーゼ (ペクチナーゼ SS, ヤクルト薬品工業株式会社、東京) を加えてミキサーでペースト状になるまで攪拌し、40°Cで 2 時間、酵素反応させた。その後 8000×g で 10 分間遠心分離し、上清を得た。得られた上清は先述した合成吸着樹脂に添加し、蒸留水を流して糖類などの水溶性の物質を除去後、80%エタノール水溶液を流して合成吸着樹脂に吸着した物質を含むエタノール溶液を回収した。回収したエタノール溶液は減圧濃縮と凍結乾燥によりナツハゼ抽出物とした。抽出物は 10 mg/mL になるように蒸留水に溶解し、UV/VIS 検出器を接続した高速液体クロマトグラフ (L-2000、株式会社日立ハイテクノロジーズ、東京) を用いてさらに分離した。分離条件は以下の通りである。カラム : Develosil HG-5、4.6 mm×150 mm、5 μm、野村化学株式会社、愛知)、検出波長 : 326 nm、カラムオープン温度 : 40°C、流速 : 1 mL/min、移動相 : エタノール水溶液 (0-10 分は 5%を維持、10-50 分にかけて 40%まで濃度を上昇させた)。以上を 1 サイク

ルとし、手動で分取を繰り返した。

得られた画分は減圧乾固後に重量を測定し、20%ジメチルスルホキシド水溶液に溶解し、それぞれ 1 mg/mL の濃度になるよう調製した。このようにして得た合成吸着樹脂画分を、総ポリフェノール含量およびインフルエンザウイルス感染阻害活性の評価に用いた。

2-4 細胞とウイルス

実験には MDCK (イヌ腎臓尿細管上皮) 細胞を用いた。MDCK 細胞はインフルエンザウイルスに対する感受性が高く、臨床検体からのウイルス分離にも用いられており、インフルエンザウイルスの実験で一般的に用いられる細胞である。細胞培養には 4%のウシ胎児血清 (Sigma-Aldrich, MO, USA) と 3 種の抗生物質 (300 μ g/mL ストレプトマイシン (Meiji Seika ファルマ株式会社、東京)、300 U/mL ペニシリン (Meiji Seika ファルマ株式会社、東京)、1 μ g/mL アンフォテリシン B (ブリistol・マイヤーズ株式会社、東京)) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (日水製薬株式会社、東京) (以下 DMEM/FCS) を用いた。

インフルエンザウイルスは 2009-2010 シーズンに山形県で分離された A/Yamagata/165/2009pdm を用いた。このウイルスは 2010 年に山形県衛生研究所から分与されたものを MDCK 細胞に感染させて 37°C で 3 日間培養した。その培地を 3000rpm で 10 分間遠心分離後に上清をマイクロチューブに分注して -80°C で保存していたものである。感染価は 1.5×10^7 pfu/mL であった。

2-5 ウイルス感染阻害活性の評価

ウイルスの感染阻害として感染の初期段階に着目した。本研究では果汁を含む飴を食した場合などを想定し、ウイルスと活性成分が同時に細胞上に存在する条件を設定し、以下の方法で感染阻害活性を評価した。

DMEM/FCS に混合した MDCK 細胞をプラスチック製細胞培養用 12 ウェルプレートに 1 mL/ウェル 播種し、37°C に設定した CO₂ インキュベーターで 3 日間、単層培養した。実験時にプレートの培養液を除去し、4%のウシ血清アルブミン (Roche, Basel, Switzerland) と 3 種の抗生物質 (前述) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (以下 DMEM/BSA) で 10000、1000、100 pfu に希釈したウイルス液と DMEM/BSA (対照) を横列に、250、75、25 μ g/mL 濃度に希釈した分画試料を縦列に、ウイルス濃度と分画試料濃度がそれぞれ異なる組み合わせとなるよう、200 μ L/ウェルずつ同時に加え、室温で攪拌しながら 5 分間吸着させた。

その後5分経過したウェルから順にウイルス液と分画試料の混合液を除去、DMEM/BSAで細胞を洗浄した後、1%アガロース (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) と1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ トリプシン (Sigma-Aldrich, MO, USA) を含む DMEM/BSA を2 mL/ウェル 重層した。37°Cに設定したCO₂インキュベーターで3日間培養した後、10%ホルマリンで細胞を固定、ゲルを除去して0.05%クリスタルバイオレットで染色した。感染阻害活性は対照のプラーク数と比較して50%プラーク数を抑制する分画試料濃度をそれぞれIC₅₀として算出した。実験は3回繰り返して行った。

2-6 総ポリフェノール含量の測定

総ポリフェノール含量は10%濃度のサンプル果汁をフォリン・チオカルト法で測定した¹⁴。96穴マイクロプレートに試料10 μL と蒸留水60 μL を加え、その後蒸留水で2倍希釈したフォリン・チオカルト試薬 (メルク、フランクフルト、ドイツ) を15 μL 添加して攪拌、5分後に2%炭酸水素ナトリウム水溶液を75 μL 添加して攪拌、室温で15分間反応させた後に750 nmの吸光度を測定した。標準品には没食子酸 (和光純薬工業株式会社、大阪) を用い、没食子酸換算で算出した。

2-7 総アントシアニン含量の測定

10%濃度の果汁試料を吸光度法で測定した¹⁵。96穴マイクロプレートに試料30 μL と5%トリフルオロ酢酸水溶液を120 μL 加え、520 nmの吸光度を測定した。標準品にはシアニジン-3-グルコシド (和光純薬工業株式会社、大阪) を用い、シアニジン-3-グルコシド換算で算出した。

2-8 ESI-LC/MSによる分子量の推定

HPLCで分取したナツハゼ抽出物の分子量推定には、エレクトロスプレーイオン化質量分析計 (LTQ Orbitrap Veros pro, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を、分離にはダイオードアレイ検出器が付属した超高速液体クロマトグラフ (Ultimate 3000 RSLC, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いた。分離条件は以下の通りである。カラム: ACQUITY UPLC HSS C18 column, 2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm , Waters, MA, USA)、検出波長: 200-750 nm、カラムオープン温度: 40°C、流速: 0.3 mL/min、移動相: A液 (0.1%ギ酸水溶液) およびB液 (0.1%ギ酸含有アセトニトリル) の2液グラジエント (B液について、0-1分は

5%を維持、1-9分にかけて80%まで上昇、9-19分にかけて50%に下降させ、その後平衡化するために19-29分を初期条件である5%で維持)。

分取したナツハゼ抽出物はカラムで分離し、ダイオードアレイ検出器を通過した後に質量分析計に供した。質量分析計のパラメータは以下の通りである。スプレー電圧値:3.0 kV、ソースヒーター温度:400℃、キャピラリー温度:230℃、シースガス流量:40 (任意単位)、オグジリラリガス流量:5 (任意単位)、分解能:10000、マスレンジ: m/z 100-1000。

3. 結果

3-1 ナツハゼ画分に含まれるポリフェノールとインフルエンザウイルス感染阻害活性の関係

ナツハゼ抽出物を吸着させた合成吸着樹脂から濃度の異なるエタノール水溶液を用いてポリフェノールを分離・分取し、得られた重量、総ポリフェノール含量、総アントシアニン含量およびインフルエンザウイルス感染阻害活性を測定した (Table 1)。回収量は水面分が最も多いが、これは樹脂に吸着しない糖類などの水溶性の物質が主であると考えられる。

総ポリフェノール含量は 10% から 50% 画分までは 330 から 445 $\mu\text{g/mL}$ の範囲であり、顕著な差はなかったが、総アントシアニン含量は 10% と 20% 画分でそれぞれ 439 $\mu\text{g/mL}$ 、377 $\mu\text{g/mg}$ となり、アントシアニン全体の 67% が 10% と 20% 画分に含まれていることが確認された。このことから、30%、40%、50% 画分にはアントシアニン以外のポリフェノールが多く含まれていることが明らかとなった。

一方、感染阻害活性は水面分とエタノール 10% 画分では確認できなかったが、20% 画分以降で確認され、特に 30%、40%、50% 画分で高い活性を示すことが確認された。

それぞれの画分を HPLC で分析したところ、10% と 20% 画分では溶出時間の短いところに大きなピークが確認された。このピークはナツハゼ果実に大量に含まれているアントシアニンやクロロゲン酸であることを HPLC によって別途確認している。一方、30%、40%、50% 画分では 35 から 45 分に 3 つの特徴的なピークが確認された (Figure 1)。

この結果、ナツハゼ果実に大量に含まれているアントシアニンやクロロゲン酸には強いインフルエンザウイルス感染阻害活性はなく、エタノール濃度 30%、40%、50% 画分に含まれているポリフェノールが主要な成分であることが明らかとなった。

次に、高い感染阻害活性を示す成分を明らかにするため、エタノール濃度 30%、40%、50% 画分に含まれていた 3 つのピークを HPLC により分取し、それぞれを画分 A、B、C とした (Figure 2)。分取量は画分 A が 7.6 mg、画分 B が 3.1 mg、画分 C が 4.2 mg となり、重量あたりの総ポリフェノール含量は画分 C が最も高かった。しかしインフルエンザウイルス感染阻害活性は画分 A と B が高く、画分 C はそれらの 1/6 程度であった (Table 2)。

3-2 ESI-LC/MS による分子量の推定

HPLC で分画された画分 A、B、C を ESI-LC/MS で分析した (Table 3)。ESI-LC/MS で分離した際のクロマトグラムは、先の HPLC による分離のクロマトグラムとは少し異なっている

(Figure 3)。これは使用したカラムが異なることや検出波長が 220 から 750 nm の積算値を用いていることによる。各画分には複数のピークが存在しており、画分 A に含まれるピークを #1、#2、#3、画分 B に含まれるピークを #4、#5、画分 C のピークを #6 と #7 とした。

ピーク #1 は 7.1 分に検出され、ネガティブイオンモードで m/z 577、ポジティブイオンモードで m/z 579 に主要イオンのマススペクトルを得た。また、MS/MS により $[M-H]^-$ が m/z 451、425、407 および 289、 $[M+H]^+$ が m/z 427、429 および 291 のプロダクトイオンを得た。さらに、ピーク #1 の UV/VIS スペクトルの吸収極大は 279 nm であった。これらの結果は、ピーク #1 がプロシアニジン B1 や B2 などのエピカテキンの二量体であることを示している。そこで、市販のプロシアニジン B2 の標準品の分子量や MS/MS スペクトル、UV/VIS スペクトルを比較した結果、ピーク #1 はプロシアニジン B2 であることが明らかとなった。

ピーク #2 は 7.45 分に、#3 は 7.99 分に検出され、ネガティブイオンモードによるそれらの主要イオンと MS/MS スペクトルはほぼ同様であった。これらのピークの主要イオンの $[M-H]^-$ は m/z 355 で、プロダクトイオンは m/z 295 ($[M-H-60]^-$)、235 ($[M-H-120]^-$)、217 ($[M-H-120-18]^-$)、193 ($[M-H-162]^-$)、および 175 ($[M-H-162-18]^-$) であった。UV/VIS スペクトルもほぼ同じであり、吸収極大は 329 nm 付近であった。一方、これらのピークのポジティブイオンモードによる主要イオンと MS/MS スペクトルからは有用な情報を得ることはできなかった。黒ニンジンの研究で、フェルラ酸誘導体の主要イオンの $[M-H]^-$ は m/z 355、プロダクトイオンは m/z 295、217、193、175 および 134 であり、吸収極大は 330 nm であったと報告されている¹⁶。このことから、今回得られたピーク #2 と #3 はフェルラ酸誘導体であることが明らかとなった。

ピーク #4 と #5 はそれぞれ 11.05 分と 11.46 分に検出され、主要イオンの $[M-H]^-$ は m/z 355 であった。しかし、MS/MS スペクトルはピーク #2 と #3 と異なっていた。 m/z 355 の $[M-H]^-$ は m/z 193 ($[M-H-162]^-$) に顕著なプロダクトイオンを与えた。このパターンは乾燥プラム¹⁷ およびハーブ¹⁸ の研究では、フェルラ酸六炭糖であると報告されている。このことから、画分 B の主要なピークはフェルラ酸六炭糖であることが明らかとなった。

ネガティブイオンモードにおいて、ピーク #6 は 12.47 分に、#7 は 12.55 分に検出され、主要イオンはそれぞれ m/z 447 と m/z 579 に確認された。また、ポジティブイオンモードにおいて、ピーク #6 と #7 の主要イオンは m/z 449 と m/z 581 にそれぞれ確認され、プロダクトイオンは m/z 303 ($[M+H-146]^+$) と m/z 449 ($[M+H-146]^+$) にそれぞれ確認された。ピーク #7 の MS/MS スペクトルについては、#6 で確認されたフラグメンテーションパターン

と似ていた。また、 m/z 449 以外のプロダクトイオンは、 m/z 431 ($[M+H-132-18]^+$)、413 ($[M+H-132-18 \times 2]^+$)、345 および 303 ($[M+H-132-146]^+$) に確認された。さらにピーク #6 と #7 の UV/VIS スペクトルの吸収極大は 349 nm 付近であった。これらのデータから、ピーク #6 と #7 が、それぞれケルセチン-3-O-ラムノシドやケルセチン-0-ペントシド-0-ラムノシドのようなケルセチン配糖体であることが明かとなった¹⁶。

3-3 ポリフェノール標準品のインフルエンザウイルス感染阻害活性

ESI-LC/MS による分析の結果、インフルエンザウイルス感染阻害活性の高い画分 A、B にはプロシアニジン B2、フェルラ酸誘導体が含まれていることが明らかになったことから、これらのポリフェノール単体について市販の標準品（和光純薬工業株式会社、大阪）を購入し、インフルエンザウイルス感染阻害活性の IC_{50} を算出した。分取画分サンプルと同じ方法で測定した結果、プロシアニジン B2 は $452 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、フェルラ酸は $1024 \mu\text{g}/\text{mg}$ となり、画分 A、B よりも活性が低かった。なお、比較として分取に用いたナツハゼ抽出物を測定したところ、 IC_{50} は $72 \mu\text{g}/\text{mg}$ となり、高い活性を示した。

4. 考察

ブラックカラント^{10,11,12}やアロニア²⁰、エルダーベリー²¹、クランベリー²²といったベリー類果実は抗インフルエンザウイルス作用があると報告されている。そしてこれらの果実に含まれるポリフェノール類が抗ウイルス効果を示すことも明らかとなっている^{23,24}。

我々のグループは既にインフルエンザウイルス感染阻害活性とポリフェノール含量は強い相関があることを確認しており、ブルーベリー類においてもポリフェノールが感染阻害活性を示している可能性が高いことを明らかにしている¹³。ブルーベリーにはアントシアニンが多く含まれており、アントシアニンにはインフルエンザウイルス感染阻害活性があることが知られている¹²。しかしながら、本研究においてナツハゼ抽出物を合成吸着樹脂で分離した結果、アントシアニンよりも高いインフルエンザウイルス感染阻害活性を示すポリフェノールが存在する可能性が示唆された。

それらのポリフェノールを同定するために、ナツハゼ果実からインフルエンザウイルス感染阻害活性を有する3つの画分A、B、Cを分取し、LC/MSによる分析を行った結果、それらにはプロシアニジンB2、フェルラ酸誘導体およびケルセチン配糖体が含まれていることを明らかにした。

ポリフェノールと抗インフルエンザウイルス作用については様々な報告があり、ケルセチンはインフルエンザウイルスのノイラミニダーゼやヘマグルチニンに^{25,26}、プロシアニジンB2はノイラミニダーゼに結合して感染を抑制する²⁷されている。しかしプロシアニジンB2は抗ウイルス活性に寄与しないという、相反する結果も報告されている²⁸。同様にフェルラ酸も抗ウイルス作用について相反する報告がなされており^{29,30}、ポリフェノールの種類によっては抗インフルエンザウイルス作用に対する評価が定まっていない。そこでプロシアニジンB2とフェルラ酸の標準品を購入して感染阻害活性を調べたところ、いずれの標準品でも高い活性は確認されなかった。このような結果の違いについての原因は不明であるが、アグリコンへ結合する糖による構造の違いや、ポリフェノール同士の相互作用などが影響している可能性が考えられる。例えば緑茶に含まれるカテキンは、その構造によって抗インフルエンザウイルス効果が異なり、カテキン混合物では抗ウイルス効果が非常に強くなることが知られている³¹。前述のとおり、ポリフェノールの抗インフルエンザウイルス作用はノイラミニダーゼやヘマグルチニンへの結合によってもたらされることを示すという報告は多く^{25,26,28,32,33}、ポリフェノールの構造が結合に影響を及ぼすことも明らかにされている^{34,35}。本研究においても、フェルラ酸やケルセチンは糖などが結合した配糖体の状態で存在しており、この構造の違いが感染阻害活性に影響した可能性がある。

また、画分 A、B、C にはそれぞれ複数のポリフェノールが混在しており、分画前の抽出物の感染阻害活性は高い。これらのことから、ナツハゼの示す強いインフルエンザウイルス感染阻害活性は複数のポリフェノールの相乗効果も影響していると考えられる。

本研究ではインフルエンザウイルス感染阻害活性の高かった画分に含まれる成分のすべてを明らかにすることはできなかったが、それらの画分にはプロシアニジン B2、フェルラ酸誘導体が含まれていることを明らかにし、ナツハゼがインフルエンザウイルスの感染予防に役立つ素材である可能性が示唆された。

現在、ナツハゼを栽培している地域は限られており、収穫も手作業であるため、食品企業が加工原料として用いるほどの収穫量や価格は確保できていない。また、果実としての栽培方法などは確立されておらず、果実の利用拡大のためには課題が残されている。しかしながら、その野性味のある味や濃厚な紫色、そして本研究で明らかになったインフルエンザウイルス感染阻害活性など、食品素材としては魅力的であり、活用の幅は広いと考えられる。これらのことから、ナツハゼはメジャーなブルーベリーとは異なる、地域限定の特産果実として育てていくことが望ましいと思われる。

今後は本研究で得られた成果を活用し、新たな付加価値を持った加工品の開発を行うことで地域活性化に貢献していきたいと考えている。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導ご鞭撻を賜りました福島県立医科大学医学部微生物学講座 錫谷達夫教授、生田和史講師（現 東北医科薬科大学医学部微生物学教室准教授）、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構食品研究部門企画管理部 亀山眞由美部長に深く感謝申し上げます。

また、本研究を遂行する上で多くのご指導、ご協力、ご激励を賜りました、福島県立医科大学医学部微生物学講座 石岡賢講師、腰塚哲朗講師、小林敬広助教、宮崎希助教、西山恭子専門医療技師、管野良子主任医療技師に心から深くお礼申し上げます。

そして、社会人課程での入学を許可して頂き、本研究の遂行にご支援いただきました福島県農業総合センターの皆様にも深く感謝いたします。

引用文献

1. Kalt W, McDonald JE, Fillmore SA, Tremblay F. Blueberry effects on dark vision and recovery after photobleaching: placebo-controlled crossover studies. *J Agric Food Chem.* **46**:11180–11189(2014)
2. Liu Y, Song X, Zhang D, Zhou F, Wang D, Wei Y, Gao F, Xie L, Jia G, Wu W, Ji B. Blueberry anthocyanins: protection against ageing and light-induced damage in retinal pigment epithelial cells. *J Nutr.* **108**:16–27(2012)
3. Li J, Ruzhi Deng, Hua X, Zhang L, Lu F, Coursey TG, Pflugfelder SC, Li DQ. Blueberry Component Pterostilbene Protects Corneal Epithelial Cells from Inflammation via Anti-oxidative Pathway. *Sci Rep.* **6**:19408(2016)
4. Bingül İ, Başaran-Küçükgergin C, Aydın AF, Soluk-Tekkeşin M, Olgaç V, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M. Blueberry treatment attenuated cirrhotic and preneoplastic lesions and oxidative stress in the liver of diethylnitrosamine-treated rats. *Int J Immunopathol Pharmacol.* **29**:426–437(2016)
5. Braga PC, Antonacci R, Wang YY, Lattuada N, Dal Sasso M, Marabini L, Fibiani M, Lo Scalzo R. Comparative antioxidant activity of cultivated and wild Vaccinium species investigated by EPR, human neutrophil burst and COMET assay. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* **17**:1987–1999(2013)
6. Contreras RA, Köhler H, Pizarro M, Zúiga GE. In Vitro Cultivars of Vaccinium corymbosum L. (Ericaceae) are a Source of Antioxidant Phenolics. *Antioxidants (Basel).* **4**:281–292(2015)
7. Ikuta K, Mizuta K, Suzutani T, Anti-influenza virus activity of two extracts of the blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) from New Zealand and Poland. *Fukushima J Med Sci.* **59**:35–38(2013)
8. Joshi SS, Howell AB, D' Souza DH, Reduction of Enteric Viruses by Blueberry Juice and Blueberry Proanthocyanidins. *Food Environ Virol.* **8**:235–243(2016)
9. Suzutani T, Ogasawara M, Yoshida I, Azuma M and Knox YM, Anti-herpesvirus activity of an extract of *Ribes nigrum* L. *Phytother Res* **17**:609–613(2003)
10. Ikuta K, Hashimoto K, Kaneko H, Mori S, Ohashi K and Suzutani T, Anti-viral and anti-bacterial activities of an extract of the Blackcurrant (*Ribes nigrum* L.). *Microbiol Immunol.* **56**:805–809(2012)

11. Knox YM, Suzutani T, Yoshida I and Azuma M, Anti-influenza virus activity of crude extract of *Ribes nigrum* L. *Phytother Res.* **17**:120-122(2003)
12. Knox YM, Hayashi K, Suzutani T, Ogasawara M, Yosida 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)
13. Sekizawa H, Ikuta K, Mizuta K, Takechi S, Suzutani T. Relationship between polyphenol content and anti-influenza viral effects of berries. *J Sci Food Agric.* **93**:2239-2241(2013)
14. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzimol.* **299**:152-178(1999)
15. Oki T, Masuda M, Furuta S, Nihiba Y, Suda I. Radical scavenging activity of french fries made from purple-fleshed sweet potato. *Food Sci Technol Res.* **48**:926-932(2001)
16. Kammerer D, Carle R, Schieber A. Characterization of phenolic acids in black carrots (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **18**:1331-1340(2004)
17. Fang N, Yu S, Prior RL. LC/MS/MS characterization of phenolic constituents in dried plums. *J. Agric Food Chem.* **50**:3579-3585(2002)
18. Vallverdú-Queralt A, Regueiro J, Martínez-Huélamo M, Rinaldi Alvarenga JF, Leal LN, Lamuela-Raventos RM. A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chem.* **154**:299-307(2014)
19. Jabeur I, Martins N, Barros L, Calhella RC, Vaz J, Achour L, Santos-Buelga C, Ferreira IC. Contribution of the phenolic composition to the antioxidant, anti-inflammatory and antitumor potential of *Equisetum giganteum* L. and *Tilia platyphyllos* Scop. *Food Funct.* **8**:975-984(2017)
20. Park S, Kim JI, Lee I, Lee S, Hwang MW, Bae JY, Heo J, Kim D, Han SZ, Park MS. *Aronia melanocarpa* and its components demonstrate antiviral activity against influenza viruses. *Biochem Biophys Res Commun.* **440**:14-19(2013)

21. Kinoshita E, Hayashi K, Katayama H, Hayashi T, Obata A. Anti-influenza virus effects of elderberry juice and its fractions. *Biosci Biotechnol Biochem*. **76**:1633–1638(1012)
22. Weiss EI, Hourii-Haddad Y, Greenbaum E, Hochman N, Ofek I and Zakay-Rones Z, Cranberry juice constituents affect influenza virus adhesion and infectivity. *Antivir Res*. **66**:9–12(2005)
23. Noguchi A TT, Watanabe T, Yasui H, Inhibitory Effect of Cassis Extract against Influenza Virus Infection. *Journal of the Faculty of Agriculture SHINSHU UNIVERSITY*. **44**:1–8(2008)
24. Roschek B Jr, Fink RC, McMichael MD, Li D, Alberte RS. Elderberry flavonoids bind to and prevent H1N1 infection in vitro. *Phytochemistry*. **70**:1255–1261(2009)
25. Liu Z, Zhao J, Li W, Shen L, Huang S, Tang J, Duan J, Fang F, Huang Y, Chang H, Chen Z, Zhang R. Computational screen and experimental validation of anti-influenza effects of quercetin and chlorogenic acid from traditional Chinese medicine. *Sci Rep*. **6**:19095(2016)
26. Wu W, Li R, Li X, He J, Jiang S, Liu S, Yang J. Quercetin as an Antiviral Agent Inhibits Influenza A Virus (IAV) Entry. *Viruses*. **8**:6;(2016)
27. Yang ZF, Bai LP, Huang WB, Li XZ, Zhao SS, Zhong NS, Jiang ZH. Comparison of in vitro antiviral activity of tea polyphenols against influenza A and B viruses and structure-activity relationship analysis. *Fitoterapia*. **93**:47–53(2015)
28. Derksen A, Hensel A, Hafezi W, Herrmann F, Schmidt TJ, Ehrhardt C, Ludwig S, Kühn J. 3-O-galloylated procyanidins from *Rumex acetosa* L. inhibit the attachment of influenza A virus. *PLoS One*. e110089(2014)
29. Weeratunga P, Uddin MB, Kim MS, Lee BH, Kim TH, Yoon JE, Ma JY, Kim H, Lee JS. Interferon-mediated antiviral activities of *Angelica tenuissima* Nakai and its active components. *J Microbiol*. **54**:57–70(2016)
30. Enkhtaivan G, Maria John KM, Ayyanar M, Sekar T, Jin KJ, Kim DH. Anti-influenza (H1N1) potential of leaf and stem bark extracts of selected medicinal plants of South India. *Saudi J Biol Sci*. **22**:532–538(2015)
31. Song JM, Kwang HL, Seong BL. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antivir Res*. **68**:66–74(2005)

32. Kim M, Kim SY, Lee HW, Shin JS, Kim P, Jung YS, Jeong HS, Hyun JK, Lee CK. Inhibition of influenza virus internalization by (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Antivir Res.* **100**:460-472(2013)
33. Rakers C, Schwerdtfeger SM, Mortier J, Duwe S, Wolff T, Wolber G, Melzig MF. Inhibitory potency of flavonoid derivatives on influenza virus neuraminidase. *Bioorg Med Chem Lett.* **24** :4312-4317(2014)
34. Müller P, Downard KM. Catechin inhibition of influenza neuraminidase and its molecular basis with mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* **111**:222-230(2015)
35. Swaminathan K, Dyason JC, Maggioni A, von Itzstein M, Downard KM. Binding of a natural anthocyanin inhibitor to influenza neuraminidase by mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* **405**:6563-6572(2013)

Table 1 合成吸着樹脂によるナツハゼ抽出物の分離

Elute solvent	Volume of solvent (mL)	Weight of residue (mg)	Total polyphenol content ($\mu\text{g/mL}$)	Total anthocyanin content ($\mu\text{g/mL}$)	IFV adsorption inhibitory activity (IC50) ($\mu\text{g/mL}$)
Water	200	2867	28	2	ND
10% ethanol	100	76	415	439	ND
20% ethanol	100	114	445	377	159
30% ethanol	100	47	400	149	38
40% ethanol	100	20	327	80	22
50% ethanol	100	3	330	90	65
80% ethanol	200	4	191	91	85

Table 2 HPLC によるナツハゼ抽出物の分離

Fraction	Collection amount of the fraction (mg)	Total polyphenol content ($\mu\text{g/mL}$)	IFV adsorption inhibitory activity (IC50) ($\mu\text{g/mL}$)
A	7.6	228	38
B	3.1	278	40
C	4.2	371	238

Table 3 ESI/MS によるナツハゼ抽出物分取画分の分析

Fraction	Peak No.	Retention time (min.)	UV (λ max) (nm)	ESI mode	Presursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Putative compound
A	#1	7.10	279	(-)	577	451, 425, 407, 289	procyanidin B2
				(+)	579	427, 429, 291	
	#2	7.45	329	(-)	355	295, 235, 217, 193, 175	ferulic acid derivatives
B	#3	7.99	325	(-)	355	295, 235, 217, 193, 175	ferulic acid derivatives
				(+)	ND	no information	
	#4	11.05	315	(-)	355	193	ferulic acid <i>O</i> -hexosides
C	#5	11.46	307	(-)	355	193	ferulic acid <i>O</i> -hexosides
				(+)	357	195, 163	
C	#6	12.47	349	(-)	447	301	quercetin <i>O</i> -rhamnoside
				(+)	449	303	
	#7	12.55	349	(-)	579	300	quercetin <i>O</i> -pentoside + <i>O</i> -rhamnoside
				(+)	581	449	

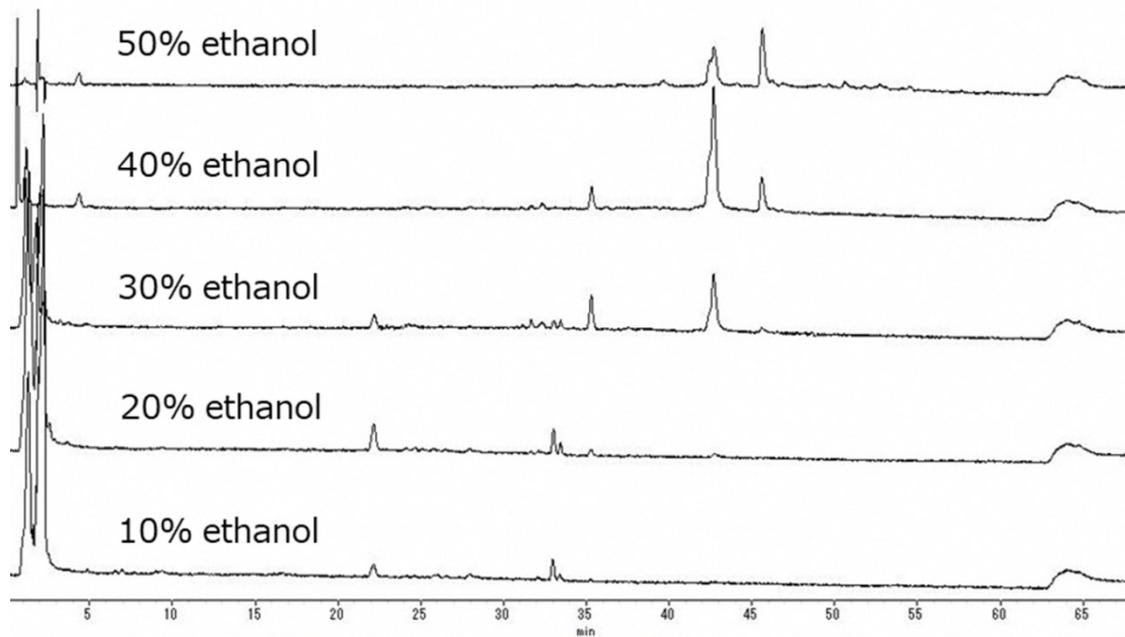


Figure 1 合成吸着樹脂によるナツハゼ抽出物分離画分のHPLCクロマトグラム

合成吸着樹脂 (DIAION HP20) を使ってナツハゼ抽出物を濃度の異なるエタノール水溶液で分離・分取し、得られた画分をHPLCで分析した。10%および20%画分で早く流出した大きなピークにはアントシアニンやクロロゲン酸が含まれていることを別途確認しているが、インフルエンザウイルス感染阻害活性は低かった。一方、30、40、50%画分のIFV感染阻害活性は高く、35から45分あたりに特徴的なピークが3つ確認された。

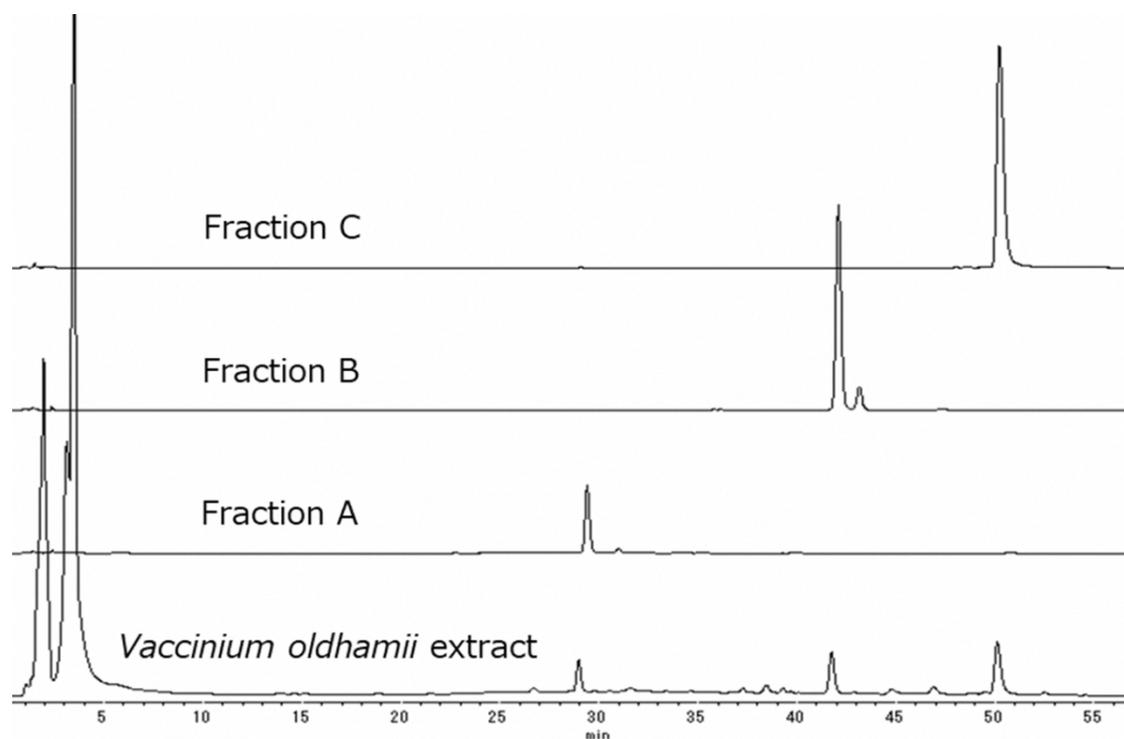


Figure 2 C18 カラムによるナツハゼ抽出物分離画分の HPLC クロマトグラム

C18 カラム (Develosil HG-5) を接続した HPLC を用い、合成吸着樹脂で分離した際に確認された特徴的な 3 つのピークを分離・分取した。ナツハゼ抽出物で確認された 0 から 5 分の大きなピークにはアントシアニンやクロロゲン酸が含まれていることを別途確認している。一方、特徴的な 3 つのピークはそれぞれ分取されたことが確認された。

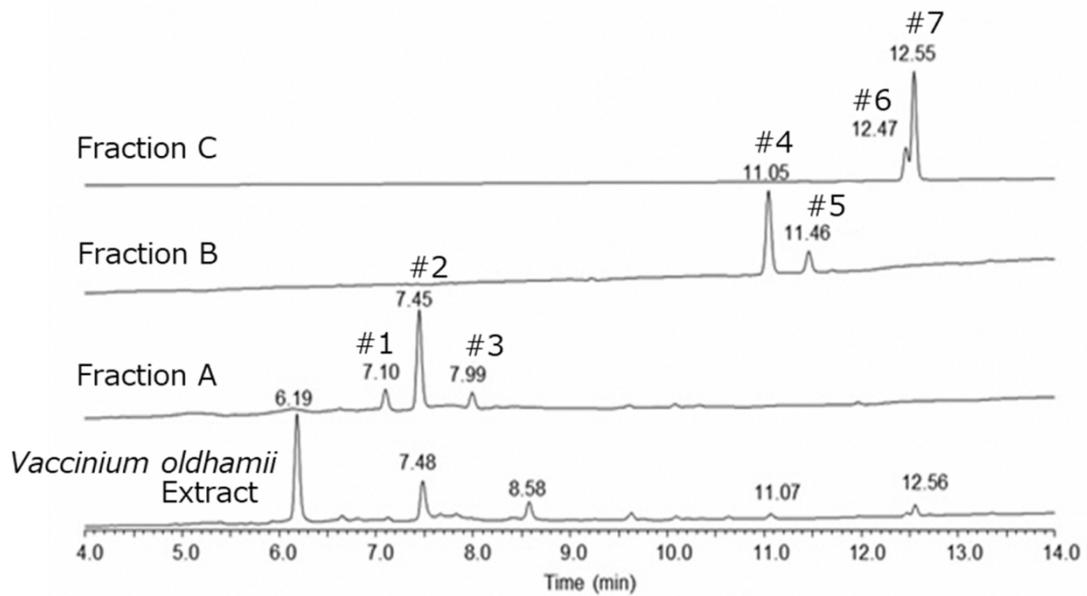


Figure 3 ESI-LC/MS 分析時の HPLC クロマトグラム

ESI-LC/MS 分析時のクロマトグラムを示した。分取時とは分析装置が異なるため、図 2、図 3 とはピークの検出時間や検出数が異なった。画分 A には 3 つ、画分 B と C にはそれぞれ 2 つずつピークが確認された。ピーク #1 はプロシアニジン B2、#2 と #3 はフェルラ酸誘導体、#4 と #5 はフェルラ酸六炭糖、#6 と #7 はケルセチン配糖体であった。