

ナツハゼに含まれるインフルエンザウイルス吸着阻害活性成分の探索

関澤春仁・生田和史*・錫谷達夫*

(福島県農業総合センター・*福島県立医科大学)

Search of the influenza virus adsorption inhibitory activity ingredient included in the Natsuhaze

Haruhito SEKIZAWA, Kazufumi IKUTA* and Tatsuo SUZUTANI*

(Fukushima Agricultural Technology Centre・*Fukushima Medical University)

1 はじめに

‘ナツハゼ’は国内の中山間地に自生しているツツジ科スノキ属の植物であり、地域によっては‘コハゼ’や‘ヤマオトコ’などと呼ばれて親しまれてきた植物である。福島県内では近年、地域特産品として注目されており、栽培量が増加、加工品開発の動きも盛んになってきている。

我々は、同じツツジ科スノキ属であるブルーベリーと比較を行い、ナツハゼにはアントシアニン等のポリフェノールがより多く含まれており、また、抗インフルエンザ作用のひとつであるインフルエンザウイルス吸着阻害活性が高いことを明らかにしてきた。そこで本研究では、ナツハゼに含まれるインフルエンザウイルス吸着阻害活性成分について明らかにするための検討を行ったので報告する。

2 試験方法

(1) ナツハゼ抽出物の調製

凍結乾燥したナツハゼ 5 g に 80% エタノールを加えて抽出液を得た。その後、減圧蒸溜でエタノールを除去し、50 mL の蒸留水で希釈したものをナツハゼ抽出物とした。

(2) 合成吸着樹脂によるナツハゼ抽出物の分離

合成吸着樹脂 (HP-20, 三菱化学) 20 g を詰めたカラム (20×300 mm) を蒸留水で十分に洗浄し、ナツハゼ抽出物を吸着させた。その後、蒸留水と 6 段階に濃度勾配を設けたエタノール (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 80%) で順次溶出させ、7 画分を得た。それぞれの画分は蒸溜乾固後に濃度 20% (v/v) のジメチルスルホキシドで 1 mg/mL に調製して供試サンプルとした。

(3) インフルエンザウイルス (IFV) 吸着阻害活性の測定

インフルエンザウイルス吸着阻害活性の測定は、12 穴プレートに単層培養したイヌ腎尿細管上皮由来 (MDCK) 細胞に、段階希釈したウイルス液と果汁を加え、ウイルス吸着を行った。その後ゲルで重層し、3 日間 CO₂ インキュベータ内で培養した。培養後、固定と染色を行い、プラーク数からウイルス吸着阻害活性を算出した。また、ウイルス吸着を 50% 阻害する濃度を IC₅₀ として算出した。実験には 2009/10 シーズンに流行した A 型インフルエンザウイルスを用いた。

(4) 総ポリフェノール量の測定

測定にはフォーリン・チオカルト法を用いた。96 穴マイクロプレートに 60 μL の蒸留水と 10 μL のサンプルをいれ、2 倍希釈したフォーリン・チオカルト試薬を 15 μL を加えて攪拌し、5 分間静置した。その後 2% 炭酸ナトリウム溶液を 75 μL 加えて攪拌し、15 分静置後、750 nm の吸光度を測定した。標準物質には没食子酸 (和光純薬) を用いた。

(5) 総アントシアニン量の測定

測定には吸光度法を用いた。1% (v/v) のトリフルオロ酢酸でサンプルを適時希釈し、520 nm の吸光度を測定した。標準物質には Cyanidin 3-Glucoside Chloride (フナコシ) を用いた。

3 試験結果及び考察

(1) 各画分の回収量

各画分の回収量については、水面分が最も多いが、エタノール抽出物には糖も多く含まれていることから、その多くは糖類であると考えられた。水以外の画分においては、20% 画分が 114 mg と最も多く、次いで 10%、30%、40% の順であった。また、50% と 80% 画分での回収量はごくわずかであり、本研究で

表 1 各画分の回収量と総ポリフェノール、総アントシアニン含有量および IFV 吸着阻害活性

分画	カラム通液量 (mL)	画分回収量 (mg)	総ポリフェノール量* ($\mu\text{g/mL}$)	総アントシアニン量* ($\mu\text{g/mL}$)	IFV吸着阻害活性*(IC50**) ($\mu\text{g/mL}$)
水画分	200	2867	28	2	ND
10%画分	100	76	415	439	ND
20%画分	100	114	445	377	159
30%画分	100	47	400	149	38
40%画分	100	20	327	80	22
50%画分	100	3	330	90	65
80%画分	200	4	191	91	85

* 採取した画分を1mg/mLに調整後の測定値

** IC50=ウイルス吸着を50%阻害する値

用いた樹脂に吸着し、エタノールで溶出する物質においては、濃度 40%程度でそのほとんどが溶出することが明らかとなった (表 1)。

(2) 総ポリフェノール量

総ポリフェノール量を比較すると、水画分にはポリフェノール類がほとんど含まれていないが、エタノール濃度 10~30%画分では 400~450 $\mu\text{g/mL}$ 程度含まれており、40~50%画分ではやや減少するが 330 $\mu\text{g/mL}$ 程度含まれていた。80%画分ではさらに減少して 190 $\mu\text{g/mL}$ であった。(表 1)

(3) 総アントシアニン量

総アントシアニン量を比較すると、水画分にはアントシアニンはほとんど含まれていなかったが、他の画分には含まれており、特にエタノール濃度 10~20%の含有量が高く、10%画分では 439 $\mu\text{g/mL}$ と最も高かった (表 1)。

この結果から、総ポリフェノール量に対するアントシアニン量を比較すると、10%~20%画分に含まれるポリフェノールの多くがアントシアニンであり、30~40%画分においてはアントシアニン以外のポリフェノール量が高いことが示唆された。

(4) インフルエンザウイルス吸着阻害活性

インフルエンザウイルス吸着阻害活性については、水画分や 10%画分では顕著な阻害活性は確認されなかったが、20%画分から活性を示し、濃度が高い 250 $\mu\text{g/mL}$ のサンプルでは 30~80%画分で大きな

差は無かったが、希釈した場合は 30~40%画分で活性が高い傾向があった。(図 1)。

これらのデータからインフルエンザウイルスの IC50 を算出した結果、30%、40%画分の IC50 が低く、少量でインフルエンザウイルスの吸着を阻害している可能性が示された (表 1)。

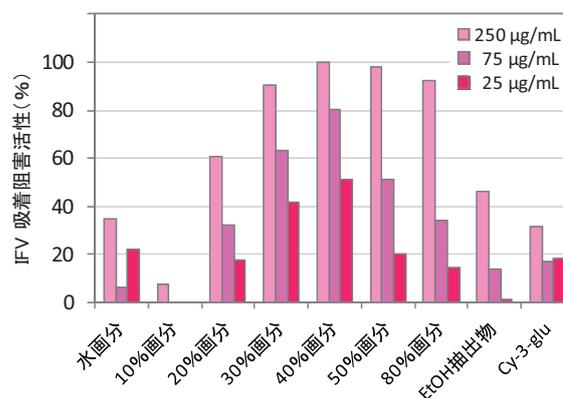


図 1 インフルエンザウイルス吸着阻害活性

4 まとめ

ナツハゼのエタノール抽出物に含まれるインフルエンザウイルス吸着阻害活性を示す主な成分は、アントシアニン以外のポリフェノール類である可能性が高いことが示された。今後は HPLC 等を用いてより精密に分画し、活性成分を特定したいと考えている。