

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501017

研究課題名(和文) 食品から粘膜免疫に対して賦活化効果のある物質の分離同定

研究課題名(英文) Isolation of ingredients activating mucosal immunity from food

研究代表者

伊勢川 裕二 (ISEGAWA, Yuji)

武庫川女子大学・生活環境学部・教授

研究者番号：20184583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：食品から抗インフルエンザウイルス作用を示す成分の検索を行い、はと麦茶中に存在を確認した。有効成分ははと麦、大豆、裸麦中に含まれていた。それら抽出物は全てのA型とB型のインフルエンザウイルスに有効であった。阻害効果はウイルスの細胞への接着時や増殖期に有効な複数の物質が含まれていることが明らかとなった。大豆に含まれる有効物質の中に、イソフラボンであるダイゼインとグリシテインがあることがわかり、これらはウイルスの複製期の後期に阻害効果を示した。

研究成果の概要(英文)：A commercial adlay tea preparation made by the extracts of seeds of adlay, naked barley and cassia, soybean inhibited the multiplication of influenza viruses, when they were added to the culture medium of the virus-infected cells at a dose of the concentration suitable for drinking. The commercial adlay tea preparation inhibited the multiplication of various kinds, H1N1, H3N2, and B types, of influenza viruses included tamiflu-resistant viruses. The antiviral activity for influenza virus depended on the components of the seed grinds of adlay and naked barley, and soy bean grinds, except cassia seed. The adlay tea inhibited influenza virus infection during both the period of the adsorption to the cell of the virus and the period of the virus replication. It was shown that adlay tea might contain some kinds of inhibitory substance components against the viral infection some of which were isoflavones, daidzein and glycitein.

研究分野：病原微生物学

キーワード：はと麦茶 はと麦 大豆 大麦 抗インフルエンザ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) インフルエンザは毎年世界的な流行を引き起こし、高い罹患率や死亡の原因となることから、公衆衛生において重要な問題となっている<sup>(1)</sup>。この疾患の原因となるのがオルトミクソウイルス科に属するインフルエンザウイルスであり、特にヒトへと感染する A 型および B 型インフルエンザウイルスに対する対策が重要である。現在、インフルエンザの予防にはワクチン、治療には抗ウイルス薬が用いられている。しかし、低い予防効果や、薬剤耐性株の出現が問題となっている<sup>(2)</sup>。Kiso らによる報告では、オセルタミビルを投与した子供において、高頻度にその薬剤体制株が出現することが報告された<sup>(3)</sup>。また、2008~2009 年終わりまでのインフルエンザ流行期に単離された H1N1 の 98% がオセルタミビル耐性であることが世界中で示された<sup>(4)</sup>。このため、インフルエンザに対する新たな予防法および治療薬の開発が急務となっている。最近では乳酸菌<sup>(5)</sup>や昆布に含まれるフコイダン<sup>(6)</sup>の抗インフルエンザウイルス作用が報告されている。

(2) はと麦茶は古来より漢方として使用され、抗腫瘍作用やアトピーの改善、利尿作用、新陳代謝促進の効能を有すると言われている。また、免疫力を高めウイルス感染症に対する効果も期待されている。しかし、これらに関する科学的な実証はほとんど報告されていない。

## 2. 研究の目的

(1) 乳酸菌やフコイダンの作用機序については、ウイルス自体に作用しているのではなく、サイトカインの制御や IgA の産生増加など、宿主の免疫機能に影響を及ぼしている可能性が示唆されている。これらのことから、本研究では、薬剤とは異なった作用機序を示す可能性のある食品中の機能性成分に着目し、食品から抗インフルエンザウイルス作用を示す成分を検索することを目的とした。

(2) 本研究では、はと麦茶を用いてインフルエンザウイルスに対する抗ウイルス作用の検討を行い、はと麦茶に含まれる原材料の中でも大豆に着目し、大豆中に含まれる抗ウイルス作用を示す成分の検索を行うことを目的とした。さらに、In vivo においても大豆成分が有効であるかについて検証を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 24 well プレートにイヌ腎臓尿細管上皮細胞由来の Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞を培養し、インフルエンザウイルスを吸着させた。その後、食品抽出物を含む培地とともに 24 時間培養し、上清を回収した。回収した上清中のウイルスカ価はフォーカス法を用いて測定し、ウイルスの減少量によって抗インフルエンザウイルス作用の有無を確認した。

(2) 活性が確認できた食品については分取 LC、HPLC、LC/MS を用いて有効成分の検索を行った。これらの分析には溶媒としてアセトニトリルと水を使用した。

(3) In vitro において活性を示した有効成分が In vivo においても有効であることを確認するために、マウスを用いて検討することとした。マウスは BALB/c マウスを使用し、インフルエンザウイルス感染前後の 5 日間、サンプル投与を行った。そして感染後の 14 日間、体重減少率や死亡率を観察することで抗インフルエンザウイルス作用の有無を判断した。

### インフルエンザウイルス感染モデル

#### 実験 1

サンプルの投与期間はウイルス感染前の 5 日間とし、PBS(n=11)、発酵豆乳(n=14)のいずれかをゾンデを用いて経口投与した(100  $\mu$ l/mouse/day)。

投与 5 日目に、全身麻酔下で 25  $\mu$ l/mouse(100FFU)のウイルスを径鼻感染させ、感染後 14 日間の体重減少量および生存率を観察した。

#### 実験 2

サンプルの投与期間はウイルス感染前の 5 日間とし、PBS(n=10)、発酵豆乳(n=11)、豆乳(n=11)いずれかをゾンデを用いて経口投与した(100  $\mu$ l/mouse/day)。

投与 5 日目、全身麻酔下で 25  $\mu$ l/mouse(200FFU)のウイルスを径鼻感染させ、感染後 14 日間の体重減少量および生存率を観察した。

## 4. 研究成果

(1) 我々は、はと麦茶の抗インフルエンザウイルス作用について検証を行った。その結果、はと麦茶が抗インフルエンザウイルス作用を示すことを確認し、はと麦茶の抗ウイルス作用を科学的に実証した。また、はと麦茶に含まれる原材料のうち、はと麦、

裸麦、大豆においても抗ウイルス作用を確認することができた。さらに各原材料において、品種や産地ごとに抗ウイルス作用が変化するのかを検討したところ、大豆では黒大豆系統で強い抗ウイルス作用を示し、裸麦では同品種の六条大麦であってもカナダ産のものでより強い抗ウイルス作用を示した。これらの結果は、今後、有効成分の検索を行う上で重要な手がかりとなる。また、複数の原材料が抗ウイルス作用を示したことから、はと麦茶に含まれる有効成分は単一ではなく、複数存在している可能性が高い。ウイルス増殖阻害段階の検討では、はと麦茶は培養時において幅広い段階で抗ウイルス作用を示した。この結果に関しては、はと麦茶には複数の原材料が含まれているため、培養時において幅広い抗ウイルス作用を示しているものと考えられる。

(2) オセルタミビルのような薬剤においてウイルス増殖阻害段階の検討を行った場合、2時間程度の短時間の暴露でも明確な抗ウイルス作用を示す。これはウイルス自体に直接作用しているためであると考えられる。しかし、はと麦茶を用いた場合、2時間程度の短時間の暴露では明確な抗ウイルス作用を確認することができず、暴露時間を4時間に延長した場合には明確な抗ウイルス作用を示した。さらに暴露時間を8時間まで延長した場合、より高い阻害効果をもたらすことも判明した。このことから、はと麦茶はウイルス自体に作用して抗ウイルス作用を発揮しているのではなく、細胞側に何らかの作用をすることで抗ウイルス作用を発揮している可能性が示唆された。さらにオセルタミビル耐性株においては特に強い抗ウイルス作用を示した。これは注目すべき点であり、はと麦茶がオセルタミビルとは異なる作用機構であることが推測される。また、生体への応用を考えた場合、ウイルスの培養時に阻害作用を示したという今回の結果は非常に重要であり、生体においても抗ウイルス作用を示す可能性が期待できる。

今後さらなる研究の発展として、抗ウイルス作用を示す有効成分の検索、そして作用機構の解明を行っていくことが必要である。

また、マウスにおけるインフルエンザ感染症に対してもはと麦茶が有効であるかについて検証する必要がある。

(3) 大豆中の抗インフルエンザウイルス作

用を示す有効成分の検索を目的とし、実験を行った。

分取 LC の結果より、Fr. 14-23 で特に強い活性が確認され、この範囲のフラクションはアセトニトリル濃度が 20-40% で溶出されてくる成分が含まれていると考えられる。このことから、これらのフラクションには大豆中のイソフラボン系の成分が含まれている可能性が高い。さらに Fr. 14-23 を LC/MS/MS にて分析を行ったところ、図に示すような結果が得られ、13.7-13.8 min、15.6-15.9 min、23.4-23.5 min で特有のピークを確認し、13.7-13.8 min で確認されたピークはダイゼイン(分子量 254)、15.6-15.9 min で確認されたピークはグリシテインまたはピオカイン A(ともに分子量 284)、23.4-23.5 min ではピークが 2つ確認されゲニステイン(分子量 270)および 6''-O-アセチルゲニステイン(分子量 474)であると推測した。

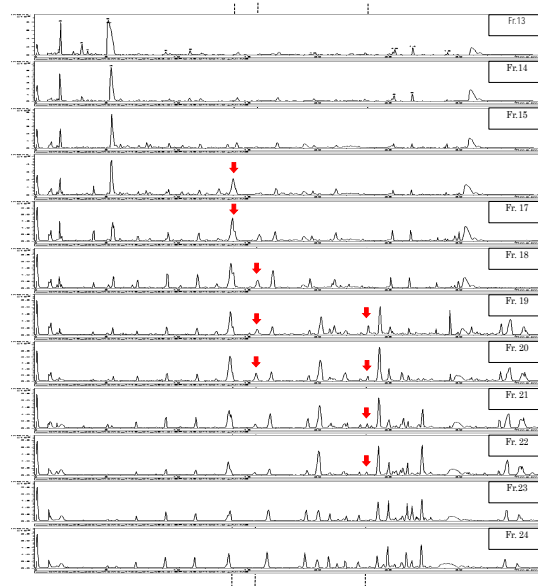


図 LC/MS/MS(qTOFMS)による分析結果

LC/MS/MS(qTOFMS)の結果、13.7-13.8 min、15.6-15.9 min、23.4-23.5 min で特有のピークが確認された。↓はそれぞれの検出時間において確認された、共通の分子量を示すピークを指している。

(4) 候補に挙げた有効成分の内、ダイゼインは In vitro において抗インフルエンザウイルス作用を示した。さらにウイルス増殖阻害段階の検討を行った結果、ダイゼインはウイルスの吸着は阻害せず、ウイルスの培養時のみを阻害していることが判明し

た。また、培養時においても4-8時間特に高い阻害作用を示した。さらに暴露時間を8時間まで延長した場合、より高い阻害作用を示すことも明らかとなった。しかし、暴露時間を2時間にした場合、明確な阻害作用を確認することができなかった。これは第一章で述べたように、ウイルス自体に作用して抗ウイルス作用を発揮しているのではなく、細胞側に何らかの作用をして抗ウイルス作用を発揮している可能性が考えられる。ダイゼインと同様のポリフェノール類であるレスベラトールでは、*In vitro*において抗インフルエンザウイルス作用を有することが報告されており、レスベラトールにおけるウイルス増殖阻害段階の検討では、ウイルスの吸着時は阻害をせず、培養時の3-9時間において阻害作用を示すことが確認されている。また、暴露時間を延長した場合にはより高い阻害作用を示している。このレスベラトールはシグナル伝達系に作用して抗ウイルス作用を発揮している可能性が示唆されている。レスベラトールの阻害パターンとダイゼインの阻害パターンは類似しており、ダイゼインとレスベラトールの阻害機構が類似している可能性も考えられる。また、オセルタミビルのような薬剤とは異なった作用機構である可能性が高い。

今後は、*In vitro*におけるダイゼインの抗ウイルス作用について詳細な作用機構の解明を行うことが必要である。また、マウスインフルエンザ感染症においてもダイゼインの抗ウイルス作用を検討し、ダイゼインが生体においても有効であるかについて、明らかにする必要がある。

(5) ダイゼインはDMSOのみでしか溶解できないため、マウスへの投与方法が限定され、定量的に摂取させることは困難である。このため、2パターンの研究方針を考案した。第一に、ダイゼインの水への可溶化方法を検討すること、そして第二に、食品としてダイゼインを効率的に摂取させる方法を検討することである。現段階ではダイゼインの可溶化法については検討中である。

発酵豆乳は豆乳と比較して約34倍のダイゼインが含まれている。このため本研究では、ダイゼインを多く含む発酵豆乳を用いた、マウスインフルエンザ感染症に対する抗インフルエンザウイルス作用の検証結果について報告をする。

(6) マウスインフルエンザ感染症における

発酵豆乳の抗インフルエンザウイルス作用についての検証を行った。実験1では体重減少の推移に対する発酵豆乳の効果を検証するために、体重減少が観察できる程度の低い致死率となるウイルス量を感染させた。この実験においては、発酵豆乳群で体重減少の抑制および体重回復が早くなることが観察できた。しかし、有意差は得られなかった。また感染後14日目のマウスにおいては、Control群と比較して大きく毛並みが改善していた。実験2では生存率に対する発酵豆乳の効果を観察するために、非常に高い致死率となるウイルス量を感染させた。この実験においては体重減少の抑制は観察できなかったものの、体重回復に関してはControl群と比較して有意に早くなることが観察できた。しかし、今回の実験では生存したマウスの匹数が少ないため、より正確な有意差を求めるために、今後は実験スケールを拡大し、再度検証を行う必要がある。

実験1および実験2において発酵豆乳がインフルエンザ感染症における体重回復および臨床症状の軽減に効果を発揮する可能性が示唆された。

今回使用した発酵豆乳にはダイゼインの他に乳酸菌が含まれている。乳酸菌のインフルエンザウイルスに対する抗ウイルス作用はいくつか報告があり、マウスにおけるインフルエンザ感染症においても、乳酸菌の経口摂取が効果を示すことが実証されている。また、いくつかの乳酸菌株が肺や脾臓での活性化NK細胞の増大、肺でのIFN- $\gamma$ やIL-6の産生抑制、抗インフルエンザウイルスIgG抗体、抗インフルエンザウイルスIgA抗体、I型IFNの産生増強などの免疫学的作用に寄与していることが報告されている。

インフルエンザ感染症の病変形性には宿主の免疫反応が関与している。マウスにおける研究では、炎症細胞の浸潤や炎症性サイトカインの産生上昇によって肺炎が誘発され、死因となったことが確認されている。しかし、乳酸菌を摂取させたマウスにおいては炎症細胞の産生が抑制され、肺炎を減弱させたことが報告された。

また、インフルエンザウイルスに感染した新生児や乳幼児のマウスでは、乳酸菌を摂取させたことで生存率が上昇したことも報告されている。これは、免疫機能が未熟な新生児や乳幼児において、乳酸菌が免疫調節作用を示した結果によるものと考えられる。同じくインフルエンザ感染症におい

て免疫調節作用を示すフコイダンにおいても、免疫不全マウスにフコイダンを摂取させた場合、生存率が上昇したことが報告されている。これらの事実からも、インフルエンザ感染症における免疫調節作用の重要性が示唆される。

ダイゼインはポリフェノール的一种である。ポリフェノールの中にはカテキンやレスベラトロールの様に、抗インフルエンザウイルス作用を示すことが報告されているものがある。特にレスベラトロールでは、マウスインフルエンザ感染症に対しても効果を発揮することが判明しており、細胞内でのシグナル伝達系に作用することで抗ウイルス作用を示している可能性が示唆されている。

同じポリフェノール的一种であるダイゼインにおいても細胞側に働きかけ、抗ウイルス作用を示す可能性も考えられる。この点においては、今後、ダイゼインのみのマウスインフルエンザ感染症に対する効果を十分に検討していく必要がある。

今回の実験において、発酵豆乳がマウスインフルエンザ感染症に対する抗ウイルス作用を発揮する可能性が示唆されたが、この抗ウイルス作用がダイゼインによってもたらされたものなのか、乳酸菌によってもたらされたものなのか、または両者の相乗効果によるものなのかは現段階では不明である。しかし、感染前の投与で効果を発揮していること、および感染後7日目以降の体重回復を促していることから、ウイルス自体に作用しているのではなく、生体の免疫調節機能に作用している可能性が高い。また、豆乳においても体重回復を促す傾向が確認できたことから、発酵豆乳における抗ウイルス作用は、大豆に含まれる成分に加え、乳酸菌による効果が組み合わさった結果ではないかということが推測できる。

今後は実際に細胞性免疫や、IgA抗体およびIgG抗体などの産生が増強されているのか、そしてシグナル伝達系への影響について検証を行う必要がある。また、本来目的としていたダイゼインのマウスインフルエンザ感染症に対する効果を実証するために、ダイゼインのみを用いて今回と同様の実験を行うことが重要であると考えられる。

#### <引用文献>

K.J. Lui, A.P. Kendal, Impact of influenza epidemics on mortality in the United States from October 1972 to May 1985, *American Journal of Public Health* 77 (1987) 712-716.

E.C. Claas, A.D. Osterhaus, R. van Beek, J.C. De Jong, G.F. Rimmelzwaan, D.A. Senne, S. Kraus, K.F. Shortridge, R.G. Webster, Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus, *Lancet* 351 (1998) 472-477.

M. Kiso, K. Mitamura, Y. Sakai-Tagawa, K. Shiraishi, C. Kawakami, K. Kimura, F.G. Hayden, N. Sugaya, Y. Kawaoka, Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study, *Lancet* 264 (2004) 759-765.

N.J. Dharan, L.V. Gubareva, J.J. Meyer, M. Okomo-Adhiambo, R.C. McClinton, S.A. Marshall, K. St. George, S. Epperson, L. Brammer, A.J. Klimov, J.S. Bresee, A.M. Fry, Oseltamivir-Resistance Working Group, Infections with oseltamivir-resistant influenza A (H1N1) virus in the United States, *The Journal of the American Medical Association* 301 (2009) 1034-1041.

N.Kobayashi, T.Saito, T.Uematsu, K.Kishi, M.Toba, N.Kohda, T.Suzuki, Oral administration of heat-killed *Lactobacillus pentosus* strain b240 augments protection against influenza virus infection in mice, *International Immunopharmacology* 11 (2012) 199-203.

K. Hayashi, J.B. Lee, T. Nakano, T. Hayashi, Anti-influenza A virus characteristics of a fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* in mice with normal and compromised immunity, *Microbes and Infection* 15 (2013) 302-309.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 16件)

M. Iwai, E. Nagai, Y. Suzuki, Y. Isegawa, The substance(s) contained in soybeans inhibit influenza virus replication, 12th Asian Congress of Nutrition, 2015. 5. 14. (Pacifico Yokohama, Kanagawa Prefecture, Yokohama City)

A. Sakagami, Y. Suzuki, Y. Isegawa, Isolation of antimicrobial components from Aronia juice against *Staphylococcus aureus*, 12th Asian Congress of Nutrition, 2015. 5. 14. (Pacifico Yokohama, Kanagawa Prefecture, Yokohama City)

E. Nagai, M. Iwai, Y. Suzuki, H. Inui, Y. Isegawa, Inhibition of influenza-virus replication by adlay tea and the extracts

of the tea components, 12th Asian Congress of Nutrition, 2015. 5. 14. (Pacifico Yokohama, Kanagawa Prefecture, Yokohama City)

岩井美和、永井栄美子、鈴木有里、伊勢川裕二、ハト麦茶抽出物のインフルエンザウイルス複製阻害、第53回日本栄養・食糧学会近畿支部大会、2014. 10. 25. (京都府立大学、京都府、京都市)

永井栄美子、岩井美和、高橋和郎、乾博、伊勢川裕二、大豆抽出物の抗インフルエンザ作用の検討、第53回日本栄養・食糧学会近畿支部大会、2014. 10. 25. (京都府立大学、京都府、京都市)

阪上綾、鈴木有里、伊勢川裕二、黄色ブドウ球菌に対するアロニアの抗菌成分の検索、第53回日本栄養・食糧学会近畿支部大会、2014. 10. 25. (京都府立大学、京都府、京都市)

永井栄美子、山脇ほのか、岩井美和、乾博、伊勢川裕二、大豆に含まれる抗インフルエンザウイルス作用を示す成分の検索、第68回日本栄養・食糧学会大会、2014. 5. 30. (酪農学園大学、北海道、江別市)

坂上綾、鈴木有里、伊勢川裕二、食品抽出物のライブラリー作成とライブラリー中の抗菌成分に関する研究、第68回日本栄養・食糧学会大会、2014. 5. 30. (酪農学園大学、北海道、江別市)

鈴木有里、伊勢川裕二、抗ウイルス活性を持つ食品ライブラリーの作成、第68回日本栄養・食糧学会大会、2014. 5. 30. (酪農学園大学、北海道、江別市)

上林友紀菜、伊勢川裕二、鈴木有里、ロタウイルスに対する抗ウイルス物質を含む食品の検索、第68回日本栄養・食糧学会大会、2014. 5. 30. (酪農学園大学、北海道、江別市)

岩井美和、永井栄美子、山脇ほのか、鈴木有里、伊勢川裕二、ハトムギ茶及びハトムギ茶成分の抽出物によるインフルエンザウイルスの複製阻害の検討、第68回日本栄養・食糧学会大会、2014. 5. 30. (酪農学園大学、北海道、江別市)

伊勢川裕二、鈴木有里、安齋祐香、吉川未希子、隅谷栄伸、ローズマリーに含まれる抗菌成分の検索、第68回日本栄養・食糧学会大会、2014. 5. 30. (酪農学園大学、北海道、江別市)

伊勢川裕二、西村沙矢香、砂川舞、横田沙織、宮尾弥佐子、永井栄美子、食

品抽出物ライブラリー作成とライブラリー中の抗菌成分に関する研究(第2報)、第67回日本栄養・食糧学会大会、2013. 5. 24. (名古屋大学、愛知県、名古屋市)

永井栄美子、西村沙矢香、伊勢川裕二、食品抽出物の抗インフルエンザ作用について、第67回日本栄養・食糧学会大会、2013. 5. 24. (名古屋大学、愛知県、名古屋市)

西村沙矢香、上林友紀菜、永井栄美子、砂川舞、伊勢川裕二、食品抽出物のHerpes simplex virusに対する増殖抑制効果の検討、第51回日本栄養・食糧学会近畿支部大会、2012. 10. 20. (甲子園大学、兵庫県、宝塚市)

伊勢川裕二、西村沙矢香、斎藤由佳、鹿嶋智美、中西純子、林奈津美、食品抽出物ライブラリー作成とライブラリー中の抗菌成分に関する研究(第1報)、第66回日本栄養・食糧学会大会、2012. 5. 20. (東北大学、宮城県、仙台市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊勢川 裕二 (ISEGAWA, Yuji)  
武庫川女子大学・生活環境学部・教授  
研究者番号：20184583